THATIANE TEIXEIRA MENDONÇA

**ESTUDO DE BACTÉRIAS RECOMBINANTES E ANÁLISE
DE FLUXOS METABÓLICOS PARA A BIOSÍNTESE DO
COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO)
[P(3HB-*co*-3HHx)]**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Butantã/IPT,
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

THATIANE TEIXEIRA MENDONÇA

**ESTUDO DE BACTÉRIAS RECOMBINANTES E ANÁLISE
DE FLUXOS METABÓLICOS PARA A BIOSÍNTESE DO
COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3-
HIDROXIBUTIRATO-*co*-3-HIDROXIHEXANOATO)
[P(3HB-*co*-3HHx)]**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Butantã/IPT,
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Co-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
2014

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

© reprodução total

Mendonça, Thatiane Teixeira.

Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] / Thatiane Teixeira Mendonça. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Tese (Doutorado) – 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: Bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos.

Versão do título para o inglês: Study of recombinant bacteria and metabolic flux analysis to biosynthesize the biodegradable copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate).

1. Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) 2. Copolímeros biodegradáveis 3. Recombinantes 4. *Burkholderia sacchari* 5. Operon phaPCJ *Aeromonas* sp. 6. Análise de fluxos metabólicos I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0128/2014

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

Candidato(a): Thatiane Teixeira Mendonça.

Título da Tese: Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos
metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável
poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)
[P(3HB-co-3HHx)].

Orientador(a): Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 426/10 referente ao projeto intitulado: *“Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]”* sob a responsabilidade de **Thatiane Teixeira Mendonça**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de outubro de 2010.

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

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

*À minha família, especialmente à
minha avó Hermínia Alves.*

AGRADECIMENTOS

Escrever palavras de agradecimento é fácil, o difícil é expressar no papel o significado do apoio de cada um. Espero que estas palavras alcancem a medida da minha gratidão por todos aqueles que estiveram ao meu lado durante a realização deste trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e pela primeira e todas as outras oportunidades que tive no nosso grupo, para alcançar crescimento profissional e pessoal. Obrigada professora pelo direcionamento, pelas discussões, pelo constante incentivo e pela confiança em mim depositada.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, também pela orientação, e por ter me guiado e discutido comigo cada ponto crucial do trabalho. Obrigada por disponibilizar seu tempo e por todos os ensinamentos que me proporcionou durante esses anos que estive no grupo. Você é para mim um exemplo de dedicação profissional.

Aos meus pais, José Alves Mendonça e Elizabeth Teixeira Mendonça, um obrigado especial, pela dedicação de vocês em me apoiar e incentivar. Obrigada por me darem a oportunidade de estudar e por sempre estarem ao meu lado nos momentos difíceis. A força que vem de vocês me move para que eu alcance os meus objetivos. Amo vocês.

Obrigada Patrícia Mendonça Saorin e Rafael Teixeira Mendonça, meus queridos irmãos, por compartilharem comigo as minhas decisões e por sempre me apoiarem nos momentos que precisava. Obrigada também ao meu cunhado, Ivan Saorin, por suas palavras sinceras de incentivo, e à pequena Julia, minha sobrinha, por me dar, simplesmente, momentos de felicidade.

Agradeço à Dra. Marilda Keico Taciro pelas discussões e pela ajuda nos experimentos conduzidos neste trabalho. Obrigada também pela amizade Marilda.

Obrigada Rafaela Rodrigues Tavares por seu esforço e ajuda na realização das etapas iniciais deste projeto. Saiba que sua participação foi importantíssima para a concretização deste trabalho.

Obrigada Lucas Garbini Cespedes pelo trabalho conjunto, também na fase inicial deste projeto. E por toda ajuda ao longo de todas as etapas durante estes quatro anos.

Às estagiárias Maria Paula Padilla e Eliane Carolina Ortega pela dedicação e compromisso com o trabalho. Obrigada meninas, vocês me ajudaram muito.

À Gabriela Cazonato Lozano pela amizade e por ter me ajudado em muitos momentos, especialmente nos experimentos após noites não dormidas no laboratório, muito obrigada.

Agradeço aos técnicos do laboratório: Aelson Luiz dos Santos, obrigada por compreender que às vezes temos pressa; Aline Carolina da Costa Lemos, obrigada pela paciência e ajuda na etapa final. Alexandre Aparecido Alves, obrigada.

Aos demais integrantes do nosso grupo - Laboratório de Bioprodutos:

Obrigada Juliano Cherix pelas discussões e ajuda em passos importantes deste projeto;
Obrigada Paulo Alexandrino por me auxiliar a conhecer um pouco mais do universo da bioinformática;

Obrigada Karel Olavarria pelas revisões e pela força;

Obrigada Edmar Ramos por me ajudar nos detalhes finais do trabalho;

Obrigada Débora Parrine, Carlos Farjado, Cristiane Honna, Kelli Lopes, Rogério Gomes, Johana Bocanegra, que já não compõem o grupo, mas me apoiaram nas minhas tarefas;
Amanda Flora, Diana Tusso, Thandara Ravelli, Linda Guamán, Sônia Queiróz, Bernardo Camilo, Cesar Moreno, obrigada por estarem dispostos a me ajudar no que fosse preciso;
E aos novos membros Jhoanne Hansen, Juliana Rezende Cardinali e Camilo Roncallo, obrigada.

Obrigada Prof. Dr. Rubén Sánchez pela cooperação com o nosso grupo e, principalmente, com o meu trabalho.

Agradeço à Dra. Marta Torajada e à Dra. Antonia Rojas por me receberem e me auxiliarem no desenvolvimento das atividades com microrreator. Obrigada pelas discussões e pela oportunidade.

Agradezco a la Dra. Marta Tortajada y a la Dra. Antonia Rojas por recibirme y auxiliarme en el desarrollo de las actividades con el microreactor. Muchas gracias por las discusiones y por la oportunidad.

Obrigada Prof. Dr. Christopher T. Nomura pela oportunidade de trabalhar no seu grupo. Foi inestimável a importância desta experiência para a minha vida profissional e pessoal.

Thank Professor Dr. Christopher T. Nomura for the opportunity to work in your group. It was an inestimable experience for my professional and personal life.

Às minhas amigas Alessandra Carneiro e Marilene Santana, e ao amigo Sinei Sales também. Obrigada queridos por aceitarem as minhas manias e me ouvirem quando as coisas estavam difíceis. Considero-me uma pessoa de sorte por ter tido a chance de morar com vocês. Aprendi muito.

Obrigada Laura Lopez Doval por me receber de braços abertos e me fazer sentir em casa. Você foi muito importante na minha adaptação àquela nova fase.

Gracias Laura López Doval por recibirme con los brazos abiertos y hacerme sentir en casa. Tu fuiste muy importante en mi adaptación en aquella nueva fase.

Obrigada Leticia Carolina Izquierdo e Evan Stuart Andrews pela amizade e pelo grande apoio durante os meses em que estivemos juntos. Sem vocês, teria sido mais difícil.

Thank Leticia Carolina Izquierdo and Evan Stuart Andrews for the friendship and all the support that both of you gave me during the months in which we were together. Without you, it would have been harder.

Aos familiares e amigos que me ajudaram de alguma forma, obrigada.

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Processos FAPESP: 2010/51935-1, 2012/51533-6, 2013/06112-5).

“Só o conhecimento vivido, o conhecimento de dentro para fora, aquele que não é aprendido nos livros (...), só aquele conhecimento que se viveu dia a dia, minuto a minuto, no erro e no acerto, na alegria e na tristeza, no desespero e na esperança (...) - só esse conhecimento possibilita a criação.”

Jorge Amado

RESUMO

MENDONÇA, T. T. **Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]**. 2014. 254 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Poli(hidro)alcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias a partir de fontes renováveis que despertam grande interesse industrial por serem termoplásticos, biodegradáveis e biocompatíveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso em diversas aplicações. Os PHA podem ser formados por monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}) ou média (PHA_{MCL}), ou formar copolímeros, contendo dois monômeros diferentes, ou ainda terpolímeros, com três monômeros. O copolímero formado por unidades de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxihexanoato [P(3HB-co-3HHx)] desperta interesse por suas propriedades físicas e possibilidades de aplicações, pois as variações nas quantidades do monômero 3HHx resultam em características diferenciadas. Estudo com a bactéria *Burkholderia sacchari* evidenciou sua capacidade de produção de P(3HB-co-3HHx) com teores de até 2 mol% de 3HHx a partir de glicose e ácido hexanoico. Com o objetivo de obter P(3HB-co-3HHx) com diferentes teores de 3HHx por *B. sacchari*, foram construídas linhagens recombinantes, contendo genes do operon *phaPCJ* de *Aeromonas* spp. e realizou-se análise de fluxos metabólicos no contexto da produção deste copolímero. As linhagens recombinantes de *B. sacchari* obtidas acumularam teores elevados de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico, contendo o monômero 3HHx acima de 20 mol%. Resultados dos experimentos realizados com as linhagens recombinantes indicaram que a composição do copolímero P(3HB-co-3HHx) pode ser modulada dependendo da combinação de genes expressos, bem como da relação glicose/ácido hexanoico fornecida. O uso dos ácidos valérico e heptanoico como precursores demonstrou que a *phaC* de *Aeromonas* spp. é capaz de incorporar monômeros 3HV e 3HHp. Ácidos graxos de óleos vegetais podem ser utilizados como cosubstratos para acumular monômeros 3HHx e modular a composição dos copolímeros produzidos por estas linhagens recombinantes de *B. sacchari*. Cultivos em biorreator com a linhagem recombinante abrigando o operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. foram realizados e permitiram atingir densidades celulares, teores de polímeros, fatores de conversão e produtividades volumétricas elevados. Na análise de fluxos metabólicos, conseguiu-se um bom ajuste dos dados experimentais obtidos a um modelo metabólico proposto. O modelo previu um funcionamento cíclico da via de Entner-Doudoroff para síntese de PHA nos intervalos testados. A deleção do gene *fadB* e seus ortólogos da via de β -oxidação de ácidos graxos foi sugerida tanto para melhorar a eficiência de conversão do ácido hexanoico a 3HHx, como de glicose a 3HB. A análise de propriedades de P(3HB-co-3HHx) produzidos revelou que a temperatura de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_m) variaram em função do teor de 3HHx. De acordo com estas propriedades apresentadas por estes copolímeros, foi proposta a aplicação destes em filmes porosos flexíveis ou sistemas de liberação controlada para uso em medicina e odontologia.

Palavras chave: Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato). Copolímeros biodegradáveis. *Burkholderia sacchari*. Recombinantes. Operon *phaPCJ* *Aeromonas* spp. Análise de fluxos metabólicos.

ABSTRACT

MENDONÇA, T. T. **Study of recombinant bacteria and metabolic flux analysis to biosynthesize the biodegradable copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) [P(3HB-co-3HHx)]**. 2014. 254 p. PhD Thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters accumulated by various bacteria from renewable sources. These polyesters arouse great industrial interest because they are thermoplastic, biodegradable and biocompatible. The variability of the PHA monomer composition determines its mechanical properties and its use in various applications. The PHA may be composed by short-chain length (PHA_{SCL}) or medium-chain length (PHA_{MCL}) monomers. The copolymers contain two different monomers, while terpolymers are composed by three monomers. The copolymer formed by units of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate [P(3HB-co-3HHx)] presents interesting physical properties and can be used for different applications, depending on the amounts of 3HHx monomer. The bacterium *Burkholderia sacchari* is able to accumulate P(3HB-co-2mol%3HHx) from glucose and hexanoic acid. In order to obtain P(3HB-co-3HHx) with different 3HHx amounts by *B. sacchari*, recombinant strains containing *phaPCJ* operon genes from *Aeromonas* spp were constructed and metabolic flux analysis was done in the context of the PHA production. The recombinant strains obtained accumulated P(3HB-co-3HHx) from glucose and hexanoic acid, with 3HHx amounts above 20 mol%. Experiments using these recombinant strains indicated that the composition of the copolymer P(3HB-co-3HHx) can be modulated depending on the combination of the genes expressed and the glucose/hexanoic acid concentration provided. Valeric and heptanoic acids used as precursors demonstrated that the *phaC* gene from *Aeromonas* spp. was able to incorporate 3HV and 3HHp monomers. Fatty acids from vegetable oils could be used as substrates to produce 3HHx monomers and to modulate the composition of the copolymers produced by *B. sacchari* recombinant. Cultivations in bioreactor with the recombinant strain harboring the *phaPCJ* operon from *Aeromonas* sp. were performed and high amounts of cell densities, polymers accumulation, yields of carbon sources to PHA and volumetric productivities were reached. Regarding to analysis of metabolic fluxes, was proposed a metabolic model fitting to the experimental data obtained. The model predicted a cyclic Entner-Doudoroff pathway for PHA synthesis in the tested intervals. The deletion of *fadB* gene and its orthologs in the β -oxidation pathway was suggested to improve the yields of hexanoic acid to 3HHx, or glucose to 3HB. The properties analysis of P(3HB-co-3HHx) produced showed that the glass transition temperature (T_g) and melting temperature (T_m) depending on the content of 3HHx. According to the properties exhibited by these copolymers was suggested its application on flexible porous films or controlled release systems for medicine and dentistry.

Keywords: Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Biodegradable copolymers. *Burkholderia sacchari*. Recombinant. *phaPCJ* operon from *Aeromonas* spp. Metabolic flux analysis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1-** Microscopia eletrônica de células de *Ralstonia eutropha* após acúmulo de grânulos de PHA.....34
- Figura 2.2-** Fórmula química geral dos PHA: **n** pode variar de 1 a 3. Quando o grupo **R** for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para n=1, os PHA são classificados como PHA_{SCL} (“short chain length”), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando **R** = (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHA_{MCL} (“medium chain length”).....35
- Figura 2.3-** Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano (Figura adaptada de ALDOR e KEASLING, 2003). Vias metabólicas para síntese de PHA_{SCL} (polímeros com monômeros de 3 a 5 carbonos) e PHA_{MCL} (polímeros com monômeros de 6 a 14). Abreviações: PhaA –β-cetotiolase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de PHB esta enzima é acetoacetil-CoA redutase); PhaC – PHA sintase ou polimerase; PhaG – (R)-3- hidroxiaçil-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).....36
- Figura 2.4-** Estrutura química de copolímeros: **Esquerda: superior** - poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidrovalertato) P(3HB-co-3HV) e **inferior** - poli(- hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) P(3HB-co-4HB) compostos por monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}); **Direita: superior** - poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx) constituído de monômero de cadeia curta (PHA_{SCL}) e média (PHA_{MCL}) e **inferior** -poli(4-hidroxibutirato) e P(3HHx-co-3HO) com monômeros de cadeia média.....43
- Figura 4.1-** Esquema geral de cultivo de acúmulo de PHA em meio mineral (MM1) com glicose e ácidos orgânicos (MMG+A).....64
- Figura 5.1-** Perfil de migração em gel de agarose de fragmentos amplificados a partir dos *primers* de *Aeromonas* sp. LFM897 e *A. hydrophila*. **1-** produto de PCR *phaPCJ_{Asp}*; **2-** produto de PCR *phaPCJ_{Ah}*; **3** - produto de PCR *phaPC_{Ah}*; **4** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}*; **5** - produto de PCR *phaC_{Ah}*; **6-** produto de PCR *phaJ_{Ah}*.....75
- Figura 5.2–** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% para os clones de *E. coli* S17-1 abrigando genes de interesse. **1** - pBBR1MCS-2 digerido com *XbaI*; **2** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp}* digerido com *KpnI* e *HindIII*; **3** -pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* digerido com *KpnI* e *HindIII*; **4** – produto de PCR *phaPC_{Ah}* digerido com *HindIII* e *XbaI*; **5** - pBBR1MCS-2::*phaPC_{Ah}* digerido com *HindIII* e *XbaI*; **6** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **7-** pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **8** - produto de PCR *phaC_{Ah}* digerido com *SalI* e *XbaI*; **9** - pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* digerido com *SalI* e *XbaI*; **10** -produto de PCR *phaJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **11-** pBBR1MCS-2::*phaJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*.....77
- Figura 5.3-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de *PCR screening* de clones recombinantes de *B. sacchari*. **1** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp}*; **2** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp}* clone; **3** - produto de PCR *phaPC_{Ah}*; **4** - produto de PCR *phaPC_{Ah}* clone; **5** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}*; **6** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}* clone; **7** - produto de PCR *phaC_{Ah}*; **8** -produto de PCR *phaC_{Ah}* clone; **9** -produto de PCR *phaJ_{Ah}*; **10** -produto de PCR *phaJ_{Ah}* clone.....78
- Figura 5.4–** Composição do PHA acumulado a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari*: **(A)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*; **(B)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}*; **(C)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}*; **(D)** – LFM101pBBR1MCS-2.....86
- Figura 5.5-** Correlação da concentração de ácido hexanoico fornecida e da fração molar de 3HHx obtida em experimentos com linhagens de *B. sacchari* selvagem LFM101 e recombinantes LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034), LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037) e

LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* (LFM1035).....88

Figura 5.6- Biossíntese de PHA a partir de carboidratos e ácidos orgânicos. Biossíntese de monômeros 3HB e 3HA_{MCL} (polímeros com monômeros de 6 a 14). Enzimas: PhaA e BktB –β-cetotiolase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase/acetoacetil-CoA redutase; PhaC – PHA sintase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (*R*)-específica.....89

Figura 5.7– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido orgânicos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*; LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}*; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}*. De cima para baixo, gráficos: **1** - ácido butírico; **2** – ácido valérico; **3** – ácido heptanoico, **4** – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L).....96

Figura 5.8– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido graxos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}*. De cima para baixo, gráficos: **1** - ácido láurico; **2** – ácido linoleico; **3** – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L).....101

Figura 5.9- Produção de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari*. No primeiro gráfico – (B00) cultivo suprido com glicose inicial na concentração de 10g/L e manutenção da concentração de ácido hexanoico até 0,9 g/L na fase de acúmulo. No segundo gráfico - (B01) cultivo com manutenção da concentração inicial de glicose inferior a 3 g/L e, na fase de acúmulo, com concentração de ácido hexanoico atingindo 0,2 g/L.....106

Figura 5.10- Consumo de ácido hexanoico nas concentrações 0,25 a 1,5 g/L por *B. sacchari* em experimento em biorreator (B02) contendo MM3 com limitação em fósforo (TACIRO, 2008), na presença de glicose entre 10-15 g/L. Os valores são médias de duas leituras de concentração de ácido.....108

Figura 5.11- Velocidade específica máxima de consumo máxima (μS_{max}) de ácido hexanoico nas concentrações 0,25 a 1,5 g/L de e glicose entre 10 e 15 g/L por *B. sacchari*.....109

Figura 5.12- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari* de cultivo em biorreator (B03) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h.....111

Figura 5.13- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B04) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h.....114

Figura 5.14- Experimentos com linhagens de *B. sacchari* selvagem para teste de meios de cultivo. **Gráfico 1** - (Bloco 1): MM1 (ROCHA *et al.*, 2008) continha Fe (0,06 g/L) Ca (0,01 g/L) e Mg (0,02 g/L). **Gráfico 2** - (Bloco 2): MM1 (ROCHA *et al.*, 2008) continha Fe (0,06 g/L) Ca (0,01 g/L) e Mg (0,02 g/L).....116

Figura 5.15- Representação gráfica de dados obtidos para *B. sacchari* selvagem para teste de meio de cultivo formulado para biorreator com solução de alimentação (glicose 140 g/L e ácido hexanoico 45 g/L) suprida nas vazões 4,95 mL/L.h e 9,9 mL/L.h (B05). Gráfico 1: Velocidade específica de crescimento; Gráfico 2: Biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr) produzidas nas condições experimentais citadas.....118

Figura 5.16- Consumo de substrato e formação de produtos resultantes de experimento com *B. sacchari* selvagem para teste de meio de cultivo em biorreator (B05) com solução de alimentação (glicose 140 g/L e ácido hexanoico 45 g/L) suprida nas vazões 4,95 mL/L.h e 9,9 mL/L.h.....120

Figura 5.17- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo para teste de meio de cultivo em biorreator (B06) com solução

de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....122

Figura 5.18- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B07) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....124

Figura 5.19- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B08) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....126

Figura 5.20- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B09) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....127

Figura 5.21- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B10) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....129

Figura 5.22- Relações molares de ácido hexanoico e glicose supridos e o percentual molar de 3HHx formado para os cultivos de modulação da composição de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06 a B10).....131

Figura 5.23- Experimento com *B. sacchari* selvagem em biorreator (B03) utilizando MM e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14,5 – 27,5 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.....133

Figura 5.24- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B10) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14 – 32 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.....135

Figura 5.25- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B09) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 16 – 32 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.....136

Figura 5.26- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B08) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 16 – 30 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.....137

Figura 5.27- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B07) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 18 – 32 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.....138

Figura 5.28- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator

(B06) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. A - Estado pseudo-estacionário definido 14 – 27 h de cultivo; B – Representação gráfica das velocidades de consumo de O ₂ (OUR) e formação de CO ₂ (CER) em mmol/L.h.....	139
Figura 5.29- Esquema representativo do modelo proposto para análise de fluxos metabólicos nos cultivos de <i>B. sacchari</i>	143
Figura 5.30- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -3HHx) por <i>B. sacchari</i> selvagem no cultivo B03 (Previsto 1).....	148
Figura 5.31- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B10 (Previsto 1).....	149
Figura 5.32- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -6mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B09 (Previsto 1).....	150
Figura 5.33- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -13mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B08 (Previsto 1).....	151
Figura 5.34- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -15mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B07 (Previsto 1).....	152
Figura 5.35- - Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -19mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B06 (Previsto 1).....	153
Figura 5.36- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -3HHx) por <i>B. sacchari</i> selvagem no cultivo B03 (Previsto 2).....	154
Figura 5.37- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B10 (Previsto 2).....	155
Figura 5.38- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -6mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B09 (Previsto 2).....	156
Figura 5.39- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -13mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B08 (Previsto 2).....	157
Figura 5.40- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -15mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B07 (Previsto 2).....	158
Figura 5.41- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -19mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) no cultivo B06 (Previsto 2).....	159
Figura 5.42- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) na eficiência máxima teórica.....	163
Figura 5.43- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -5mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.....	164
Figura 5.44- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -10mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima.....	165
Figura 5.45- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -15mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> . (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.....	166
Figura 5.46- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB- <i>co</i> -19mol%3HHx) por	

LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.....167

Figura 5.47- Relação entre o ATP formado ou o O₂ consumido e o percentual em mol de 3HHx para os cultivos de modulação da composição de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) em biorreator (B06 a B10).....168

Figura 5.48- β-oxidação de ácidos graxos descrita para *E. coli*. O metabolismo de ácidos graxos é mediado pelas enzimas transportadoras: FadL (acil-CoA ligase) e AtoE; e pelas enzimas envolvidas no catabolismo: acetil-CoA e acetoacetato-CoA transferases (AtoD-AtoA) e 3-cetoacil-CoA tiolase II (AtoB), para ácidos graxos de cadeia curta; seguindo o metabolismo pela ação das enzimas acil-CoA sintetase (FadD), que insere uma CoASH ao acil gerando acil-CoA; acil-CoA desidrogenase (FadE) que converte o acil-CoA em *trans*-2-enoil-CoA; 2-dienoil-CoA redutase (FadH) converte acil-CoA insaturado em *trans*-2-enoil-CoA; enoil-CoA hidratase-(*S*)-específica (FadB-FadJ), converte *trans*-2-enoil-CoA a (*S*)-3-hidroxiacil-CoA; 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase-(*S*)-específica (FadBJ), que converte (*S*)-3-hidroxiacil-CoA em 3-cetoacil-CoA; 3-cetoacil-CoA tiolase (FadA-FadI), que converte 3-cetoacil-CoA a acil-CoA e uma molécula de acetil-CoA.....170

Figura 5.49- Possíveis operons da β-oxidação de ácidos graxos encontrados em busca via RAST no genoma sequenciado de *B. sacchari*.....172

Figura 5.50- Fotografia para análise visual de copolímeros produzidos por *B. sacchari* selvagem e recombinante cultivadas em biorreator e suprida de glicose e ácido hexanoico à vazão de alimentação 4,95 mL/L.h. **A** - Copolímero P(3HB-*co*-0,5mol%3HHx) produzido por *B. sacchari* selvagem LFM101 **B** - Copolímero P(3HB-*co*-26mol%3HHx) produzido por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034).....175

Figura 5.51- Copolímeros P(3HB-*co*-3HHx) com composições variando de 5 a 20 mol% de 3HHx produzidos por *B. sacchari* recombinante abrigando pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) cultivados em biorreator suprido com glicose e ácido hexanoico à vazão de 9,9 mL/L.h. **A** – Filme do copolímero P(3HB-*co*-20mol%3HHx); **B** – Filme do copolímero P(3HB-*co*-15mol%3HHx); **C** – Filme do copolímero P(3HB-*co*-10mol%3HHx); **D** – Filme do copolímero P(3HB-*co*-5mol%3HHx); **E** – Filme do polímero P(3HB).....177

Figura A.1 – Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_forward*.....209

Figura A.2 - Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_reverse*.....210

FiguraA.3 - Resultado do alinhamento da sequência *phaCJ_forward*.....211

Figura A.4 - Resultado do alinhamento da sequência *phaCJ_reverse*.....212

Figura A.5 - Resultado do alinhamento da sequência do operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. e *Aeromonas hydrophila*.....214

FiguraA.6 – pBBR1MCS2:: *phaPCJ* de *Aeromonas* sp.(LFM897).....219

FiguraA.7 – pBBR1MCS2:: *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.....219

FiguraA.8 – pBBR1MCS2:: *phaPC* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.....220

FiguraA.9 – pBBR1MCS2:: *phaCJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.....220

FiguraA.10 – pBBR1MCS2:: *phaC* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.....221

FiguraA.11 – pBBR1MCS2:: *phaJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.....221

Figura A.12 – Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14,5 – 27,5 h) para experimento com *B. sacchari* selvagem em biorreator (B03) utilizando MM3 e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h.....238

Figura A.13- Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14 – 27 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....239

Figura A.14 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (18 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B07) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....240

Figura A.15 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (16 – 30 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B08) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....241

Figura A.16 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (16 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B09) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....242

Figura A.17 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B10) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....243

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Classes de PHA sintases.....	37
Tabela 2.2- Comparação entre as propriedades físicas e térmicas de diferentes polímeros.....	44
Tabela 4.1- Bactérias, plasmídeos e genes utilizados no trabalho.....	55
Tabela 4.2- <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos diferentes genes de <i>Aeromonas spp.</i>	58
Tabela 4.3 – Condições de amplificação dos fragmentos de DNA.....	59
Tabela 4.4 – Formulação teste de meios de cultura para frascos agitados para <i>B. sacchari</i>	62
Tabela 4.5 – Formulação de meio de cultura para biorreator para <i>B. sacchari</i> , baseada em meio de cultura teste para frascos agitados.....	63
Tabela 4.6 – Resumo dos experimentos em biorreator realizados neste trabalho e a finalidade para a qual cada um deles foi utilizado.....	68
Tabela 5.1 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (1 g/L).....	81
Tabela 5.2 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico nas concentrações entre 0,5 e 1,5 g/L.....	84
Tabela 5.3 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido butírico (1 g/L).....	90
Tabela 5.4 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido valérico (1 g/L).....	92
Tabela 5.5 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose 10 g/L e ácido heptanoico 1 g/L.....	93
Tabela 5.6 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose 10 g/L e ácido octanoico 1 g/L.....	95
Tabela 5.7 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido láurico (1 g/L).....	99
Tabela 5.8 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido oleico (1 g/L).....	100
Tabela 5.9 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido linoleico (1 g/L).....	101
Tabela 5.10- Alimentação dos cultivos de <i>B. sacchari</i> em biorreator para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico.....	104
Tabela 5.11- Cultivos de <i>B. sacchari</i> em biorreator (B00 e B01) para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico (0, 9 g/L - cultivo 1 - e 0,2 g/L - cultivo 2).....	105
Tabela 5.12 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> selvagem em biorreator com limitação em fósforo (B03) para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).....	110
Tabela 5.13- Cultivo de <i>B. sacchari</i> recombinante LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator (B04) com limitação em fósforo, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de 4,95 mL/L.h.....	113
Tabela 5.14 – Comparação das formulações de meio de cultura para biorreator para <i>B. sacchari</i> : MM3 limitação em fósforo (TACIRO, 2008) e MM reformulado.....	117
Tabela 5.15- Cultivo em biorreator de <i>B. sacchari</i> selvagem em MM reformulado (B05)	

alimentado por solução contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) nas vazões de 4,95/9,9 mL/L.h.....	119
Tabela 5.16- Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B06), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	121
Tabela 5.17- Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B07), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	123
Tabela 5.18- Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B08), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	125
Tabela 5.19- Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B09), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	127
Tabela 5.20- Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B10), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	128
Tabela 5.21- Resumos dos dados obtidos nos cultivos de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B06 a B10), supridos por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (0 a 45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	130
Tabela 5.22 – Análise de elementos químicos presentes em cultivos em biorreator para <i>B. sacchari</i> recombinante utilizando MM reformulado.....	132
Tabela 5.23 – Consumo de substratos e formação de PHA para cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM 101 selvagem em biorreator (B03).....	140
Tabela 5.24 – Consumo de substratos e formação de PHA de cultivo em biorreator (B06 a B10) da linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) suprida de glicose (140 g/L).e ácido hexanoico (0 - 45 g/L).....	141
Tabela 5.25 – Comparação entre dados experimentais (velocidades específicas - mmol/g.h) e previstos pelo modelo metabólico da análise de fluxos para cultivos em biorreator com <i>B. sacchari</i> selvagem (B03) e recombinante (<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> - B06 a B10).....	145
Tabela 5.26 – Comparação entre valores da equação global correspondente ao máximo teórico (velocidades específicas - mmol/g.h) e estimados pelo modelo metabólico da análise de fluxos para cultivos em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante (LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> - B06 a B10).....	161
Tabela 5.27 – Pesos moleculares e temperatura de transição vítrea (T _g) de polímeros produzidos por diferentes linhagens.....	176
Tabela 5.28 – Pesos moleculares e propriedades térmicas de P(3HB-co-3HHx) com diferentes teores de 3HHx produzidos por <i>B. sacchari</i> recombinante LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034).....	178
Tabela A.1 – Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (1 g/L).....	222
Tabela A.2 – Dosagem substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L).....	224

Tabela A.3 – Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido butírico (1,0 g/L).....	226
Tabela A.4 – Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido valérico (1,0 g/L).....	227
Tabela A.5 – Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido heptanoico (1,0 g/L).....	228
Tabela A.6 – Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose (10 g/L) e ácido octanoico (1,0 g/L).....	229
Tabela A.7 – B03 -Cultivo de <i>B. sacchari</i> selvagem em biorreator com limitação em fósforo para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).....	230
Tabela A.8 – B04 -Cultivo de <i>B. sacchari</i> recombinante LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator com limitação em fósforo para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).....	231
Tabela A.9 - B05 - Cultivo em biorreator de <i>B. sacchari</i> selvagem em MM reformulado alimentado por solução contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) nas vazões de 4,95/9,9 mL/L.h.....	232
Tabela A.10 – B06 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	233
Tabela A.11 – B07 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	234
Tabela A.12 - B08 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	235
Tabela A.13 - B09 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	236
Tabela A.14 – B10 - Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ_{Asp}</i> (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.....	237

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – 3-hidroxibutirato

3HB – 3-hidroxibutirato

3HD – 3-hidroxidecanoato.

3HDD – 3-hidroxidodecanoato

3HHp – hidroxihexanoato

3HHx – 3-hidroxihexanoato

3HHx – 3-hidroxihexanoato

3HO – 3-hidroxiocetanoato

3HV – 3-hidroxiacetalato

3MA_{SCL} – 3-malonil-CoA de cadeia curta (4 carbonos)

4HB – 4-hidroxibutirato

AcCoA – acetil-CoA

acoA – gene codificador da enzima piruvato desidrogenase

ACP – proteína transportadora de acila, do inglês *Acyl Carrier Protein*

AFM – Análise de Fluxos Metabólicos

Amp^S – sensibilidade à ampicilina;

ATCC – *American Type Cell Culture*;

AtoA – acetoacetato-CoA transferase

AtoB – 3-cetoacil-CoA tiorixase II enzimas

AtoC – enzima reguladora do operon *atoDAEB*

AtoD – acetil-CoA transferase

atoDAEB – operon codificador de enzima

AtoE – enzima transportadora de membrana

AtoS – sensor histidina-quinase

BktB – β -cetotiorixase descrita para *Ralstonia eutropha*

BktC – β -cetotiorixase descrita para *Ralstonia eutropha*

BPG13 – 1,3-bisfosfoglicerato

ButCoA – butanoil-CoA

ButenCoA – butenoil-CoA

CButCoA – ceto-butiril-CoA

CER – velocidade de formação de CO₂, do inglês *Carbon Evolution Rate*

CG – cromatografia gasosa
CHexCoA – ceto-hexanoil-CoA
Cit – citrato
CoA – acetil-CoenzimaA
CoA – coenzima A
CoASH – coenzima A
DHP – dihidroxicetona
DO – densidade óptica
DSC – calorimetria exploratória diferencial, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*
E4P – eritrose-4-fosfato
F16P – frutose-1,6-bisfosfato
F6P – frutose-6-fosfato
fabD – gene codificador da enzima malonil-CoA-ACP transacilase
FabD - malonil-CoA-ACP transacilase
FabG - 3-cetoacil-ACP redutase
fabG – gene codificador da enzima 3-cetoacil-ACP redutase
FadA – 3-cetoacil-CoA tiolase
fadA – gene codificador da enzima 3-cetoacil-CoA tiolase
FadB – enoil-CoA hidratase-(S)-específica/ 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase-(S)-específica
fadB – genes codificador da enzima enoil-CoA-hidratase-(S)-específica
FadD – acil-CoA sintetase
FadE – acil-CoA desidrogenase
FadH – 2-dienoil-CoA isomerase
FadI – 3-cetoacil-CoA tiolase
FadJ – enoil-CoA hidratase-(S)-específica/ 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase-(S)-específica
FadL – acil-CoA ligase de cadeia longa
FadP – fator transcricional TetR-like
Fum – fumarato
G3P – gliceraldeído-3-fosfato
G6P – glicose-6-fosfato
gcd – gene codificador da enzima glicose desidrogenase
GLX – glioxilato

GPC – cromatógrafo de permeação em gel

HA – hidroxiaçil-CoA.

HA_{LCL} – hidroxiaçil-CoA de cadeia longa (mais de 14 carbonos) (do inglês *Long Chain Length*)

HA_{MCL} – hidroxiaçil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *Medium Chain Length*)

HA_{SCL} – hidroxiaçil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *Short Chain Length*)

HButCoA – hidroxibutiril-CoA

HDPE – polietileno de alta densidade

HexCoA – hexanoil-CoA

HexenCoA – hexenoil-CoA

HHexCOA – hidroxihexanoil-CoA

HPLC - cromatografia líquida, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

Hx⁺ – crescimento em ácido hexanoico;

IPTG - isopropil-tio-β-D- galactosídeo

IsoCit – isocitrato

KDPG2 – 2-ceto-desoxi-6-fosfogluconato

KG2 – α-cetoglutarato

Km^R – resistência à canamicina;

Km^S – sensibilidade à canamicina;

LB - Luria Bertani

LDPE – polietileno de baixa densidade

LFM – Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos

LMG – coleção de cultura da Belgian Coordinated Collections of Microorganisms (BCCM)

Mal – malonato

MM - meio mineral

Mn – número médio de peso molecular

MSC -massa seca celular

Mw/Mn – índice de polidispersão

OAA – oxaloacetato

OUR –velocidade de consumo de O₂, do inglês *Oxygen Uptake Rate*

P(3HB) - poli-3-hidroxibutirato

P(3HB-*co*-3HA) - poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi alcenoato).

P(3HB-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi hexanoato)

P(3HB-*co*-3HV) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato)

P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHp) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato-*co*-3-hidroxi heptanoato)

P(3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato-*co*-3-hidroxi hexanoato)

P(3HB-*co*-3HV-*co*-4HB) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi valerato-*co*-4-hidroxi butirato)

P(3HB-*co*-4HB-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxi butirato-*co*-4-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi hexanoato)

P(3HHx) – poli(3-hidroxi hexanoato).

P(3HHx-*co*-3HO) – poli(3- hidroxi hexanoato -*co*-3-hidroxi octanoato)

PCR – reação de polimerização em cadeia, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PEP – fosfoenolpiruvato

PET – polietileno tereftalato

PG2 – 2-fosfoglicerato

PG3 – 3-fosfoglicerato

PG6 – 6-fosfogluconato

PHA⁻ – ausência de acúmulo de PHA;

PHA – polihidroxi alcenoato

PHA⁺ – acúmulo de PHA;

phaA – gene codificador da enzima β -cetotiolase

PhaA – β -cetotiolase

phaB – gene codificador da enzima acetoacetil-CoA redutase

PhaB –acetoacetil–CoA redutase NADPH dependente

phaC – gene codificador da enzima PHA sintase ou polimerase

PhaC – PHA sintase ou polimerase

phaC1C2Z – operon de biossíntese de PHA de *Burkholderia caryophylli*

phaCAB – operon de biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha*.

PhaE – subunidade da enzima PHA sintase de classe III

phaF – gene cujo produto de expressão estabiliza o grânulo

PhaG – (R)-3- hidroxi acil-CoA:ACP transacilase

phaG – gene codificador da enzima (R)-3- hidroxiacil-CoA:ACP transacilase

phaI – gene cujo produto de expressão participa da formação e estabilidade do grânulo

PhaJ – enoil-CoA hidratase (R)-específica

phaJ – gene codificador da enzima enoil-CoA hidratase (R)-específica

PHAMCL – polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *medium chain length*)

phaP – gene codificador da enzima PHAsina

PhaP – PHAsina, enzima associada ao grânulo

phaPCJ – operon de biossíntese de PHA de *Aeromonas* spp.

PhaR – subunidade da enzima PHA sintase de classe IV

PHASCL – polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *short chain length*)

PhaZ – enzimas despolimerizadoras de PHA (despolimerases)

PIR – piruvato

PNTAB –trans-hidrogenase de membrana

PsrA – fator transcricional TetR-type

Rb5P – ribose-5-fosfato

Rb15P – ribulose-5-fosfato

S7P – sedoheptulose-7-fosfato

Sac⁺ – crescimento em sacarose;

Suc – succinato

SucCoA – succinil-CoA

Tc^R – resistência à tetraciclina.

Tc^S – sensibilidade à tetraciclina;

Tg – temperatura de transição vítrea

T_m – temperatura de fusão

UDH – trans-hidrogenase solúvel

X5P – xilulose-5-fosfato

XGal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D- galactosídeo

Xr – biomassa residual (massa de células sem polímero)

Xt – biomassa total (massa de células e polímero)

Y – fator de conversão de substrato em produto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	30
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	33
2.1 Plásticos biodegradáveis.....	33
2.2 Polihidroxialcanoatos	33
2.3 Síntese de PHA por células bacterianas	35
2.3.1 <i>PHA sintase</i>	36
2.3.2 <i>β-cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase</i>	38
2.3.3 <i>Como são sintetizados os monômeros de cadeia curta e média?</i>	39
2.3.3.1 <i>Síntese de monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL})</i>	39
2.3.3.2 <i>Síntese de monômeros de cadeia curta (PHA_{MCL})</i>	40
2.3.4 <i>Outras enzimas envolvidas no metabolismo de PHA</i>	40
2.3.5 <i>Regulação da síntese de PHA</i>	41
2.4 Composição monomérica associada às propriedades dos PHA	41
2.4.1 <i>Aplicações P(3HB-co-3HHx)</i>	45
2.5 Bactérias naturalmente produtoras de P(3HB-co-3HHx)	47
2.6 Produção de PHA por <i>Burkholderia sacchari</i> e seu potencial para a síntese de P3HB-co-3HHx	48
2.7 Uso de bactérias recombinantes para a produção de P3HB-co-3HHx	50
2.8 Análise de fluxos metabólicos	52
3 OBJETIVOS	54
3.1 Objetivo geral.....	54
3.2 Objetivos específicos.....	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Micro-organismos e genes.....	55
4.2 Obtenção de linhagens recombinantes	56
4.2.1 <i>Manipulação de DNA</i>	56
4.2.1.1 <i>Extração e purificação de DNA</i>	56
4.2.1.2 <i>Digestão e ligação com enzimas de restrição</i>	57
4.2.1.3 <i>Análise de DNA em géis de agarose</i>	57
4.2.2 <i>Amplificação e clonagem de genes por PCR</i>	57
4.2.3 <i>Transformação e conjugação</i>	60
4.2.3.1 <i>Transferência de plasmídios por transformação - choque térmico</i>	60
4.2.3.2 <i>Transferência de plasmídios por conjugação</i>	60

4.3 Condições de cultivo para a produção de PHA	61
4.3.1 Meios de cultura	61
4.3.1.1 Meios de cultura para cultivos em frascos agitados	61
4.3.1.2 Meio de cultura para cultivos em biorreator	62
4.3.1.3 Formulação de meios de cultura para <i>B. sacchari</i> em frascos agitados e biorreator.....	62
4.3.2 Experimentos em frascos agitados	63
4.3.2.1 Experimentos com linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> abrigando genes <i>phaPCJ_{Asp}</i> , ou <i>phaCA_h</i> ou <i>phaJA_h</i> ou <i>phaCJ_{Ah}</i> ou <i>phaPC_{Ah}</i>	63
4.3.2.2 Experimentos com <i>B. sacchari</i> selvagem para teste de meios de cultivo.....	64
4.3.2.3 Cultivos para a obtenção de polímeros padrão para a análise de propriedades ...	64
4.3.3 Cultivos em biorreator	65
4.3.3.1 Cultivos em biorreator utilizando <i>B. sacchari</i> selvagem	66
4.3.3.2 Cultivos em biorreator com linhagem recombinante de <i>B. sacchari</i> abrigando o gene <i>phaPCJ_{Asp}</i>	66
4.3.3.3 Cultivos em biorreator utilizando meio mineral teste para <i>B. sacchari</i> selvagem .	67
4.3.3.4 Cultivos em biorreator utilizando meio mineral teste com <i>B. sacchari</i> recombinante	67
4.4 Busca de genes da β-oxidação de ácidos graxos no genoma de <i>B. sacchari</i>.....	67
4.5 Extração e purificação de polímeros.....	69
4.6 Análise de fluxos metabólicos	69
4.7 Metodologias analíticas	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 Construção e avaliação da capacidade de acúmulo de linhagens recombinantes de <i>Burkholderia sacchari</i> abrigando genes de <i>Aeromonas</i>	73
5.1.1 Amplificação e clonagem de genes	74
5.1.2 Obtenção de linhagens recombinantes abrigando genes de <i>Aeromonas hydrophila</i> ou <i>Aeromonas sp.</i>	77
5.1.3 Avaliação da capacidade de acúmulo das linhagens recombinantes construídas ..	79
5.1.3.1 Ensaio de acúmulo com linhagens recombinantes utilizando glicose e ácido hexanoico.....	79
5.1.3.2 Modulação da composição monomérica de <i>P(3HB-co-3HHx)</i> produzidos por recombinantes <i>B. sacchari pBBB1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> , ou <i>pBBB1MCS-2::phaCJ_{Ah}</i>	83
5.1.3.3 Ensaio de acúmulo com linhagens recombinantes utilizando glicose e diferentes ácidos orgânicos.....	88
5.2 Avaliação da produção de <i>P(3HB-co-3HHx)</i> por linhagens de <i>B. sacchari</i> a partir de glicose e ácido hexanoico em biorreator	103

5.2.1 Experimentos em biorreator utilizando <i>B. sacchari</i> selvagem com limitação em nitrogênio e alimentação de glicose e ácido hexanoico por diferentes métodos	103
5.2.2 Experimentos em biorreator com <i>B. sacchari</i> selvagem e limitação em fósforo para cálculo de velocidades de consumo glicose e ácido hexanoico	107
5.2.3 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> selvagem e limitação em fósforo utilizando vazão de alimentação específica	109
5.2.4 Experimento com limitação em fósforo utilizando vazão de alimentação específica - <i>B. sacchari</i> recombinante abrigoando o operon <i>phaPCJ_{Asp}</i>	112
5.3 Teste de meios de cultura para <i>B. sacchari</i> selvagem.....	115
5.3.1 Experimentos com meios de cultura teste para <i>B. sacchari</i> selvagem	115
5.3.2 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> selvagem utilizando o meio de cultura reformulado.....	117
5.3.3 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante <i>LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> utilizando meio de cultura reformulado	120
5.4 Modulação da composição monomérica de P(3HB-co-3HHx) em biorreator utilizando diferentes proporções glicose/ ácido hexanoico na solução de alimentação	122
5.4.1 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante <i>LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanóico (33 g/L).....	123
5.4.2 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante <i>LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanóico (22 g/L).....	124
5.4.3 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante <i>LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanóico (11 g/L).....	126
5.4.4 Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> recombinante <i>LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L).....	128
5.5 Análise de fluxos metabólicos para a produção de PHA por <i>B. sacchari</i>	132
5.6 Busca de genes da β -oxidação de ácidos graxos no genoma de <i>B. sacchari</i>	169
5.7 Análise de propriedades dos polímeros produzidos	174
5.7.1 Comparação das propriedades de copolímeros P(3HB-co-3HHx) produzidos por linhagens selvagem e recombinante de <i>B. sacchari</i>	174
5.7.2 Análise das propriedades de copolímeros P(3HB-co-3HHx) modulados quanto ao teor de 3HHx.....	177
5.7.3 Avaliação preliminar de possíveis aplicações dos copolímeros de acordo com as propriedades obtidas	179
6 CONCLUSÕES.....	181
REFERÊNCIAS.....	183

APÊNDICE A - Sequência da região do genoma de <i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966 contendo operon de biossíntese de PHA constituído pelo gene <i>phaC</i> (PHA sintase) flanqueado por <i>phaJ</i> (enol-CoA hidratase) e <i>phaP</i> (PHAsina).....	207
APÊNDICE B - Resultados obtidos para o alinhamento das sequências <i>phaPC</i> e <i>phaCJ</i> de <i>Aeromonas hydrophila</i> clonadas e da sequência complementar presente na literatura.....	209
APÊNDICE C - Sequência referente aos genes de biossíntese de PHA do operon clonado <i>phaPCJ</i> de <i>Aeromonas</i> sp. (LFM 897).....	213
APÊNDICE D – Mapas dos plasmídeos pBBR1MCS-2 contendo a ordem dos genes clonados.....	219
APÊNDICE E – Tabelas de dosagens substratos inicial e final de experimentos em frascos agitados.....	222
APÊNDICE F – Consumo de substratos e acúmulo de PHA dos ensaios em biorreator.....	230
APÊNDICE G – Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos dos estados pseudo-estacionários analisados.....	238
APÊNDICE H – Arquivo de entrada para o programa Metatool construído para <i>Burkholderia sacchari</i> no contexto de acúmulo de PHA.....	244
APÊNDICE I – Análise de modos elementares do ponto de vista das reações metabólicas.....	246
ANEXO A – Esquema do plasmídeo pBBR1MCS-2 utilizado na construção dos recombinantes.....	250
ANEXO B – Artigos publicados	251

1 INTRODUÇÃO

Os bioplásticos são cada vez mais estudados e têm se mostrado uma alternativa promissora para substituição dos plásticos de origem petroquímica, pois podem ser produzidos a partir de fontes renováveis. Neste contexto, destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHA) que compõem um grupo bastante diversificado de poliésteres acumulados por grande número de bactérias (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995) e têm sido o foco das atenções por apresentarem propriedades termoplásticas, serem biodegradáveis e biocompatíveis (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

A síntese dos PHA depende de três fatores principais: das vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, do tipo de PHA sintase bacteriano – enzima-chave para a biossíntese de PHA - e da fonte de carbono fornecida no momento de acúmulo. De acordo com o substrato fornecido, as vias metabólicas darão origem a diversos hidroxiaxil-CoA que poderão ou não ser incorporados ao polímero, de acordo com a especificidade da PHA sintase microbiana (REHM, 2003, 2007).

A partir disso, dois grupos distintos de PHA são descritos: PHA contendo monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}), tendo como representante principal o poli-3-hidroxiбутirato P(3HB) e PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}). As propriedades mecânicas do P(3HB) limitam suas aplicações, pois se trata de um material quebradiço, de baixo alongamento até a ruptura, apenas 5%. A incorporação de pequenas quantidades de monômeros HA_{MCL} a um PHA contendo 3HB como principal constituinte permite obter um material com alongamento até a ruptura superior ao valor observado para o homopolímero P(3HB) (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Deste modo, uma estratégia interessante para se ter materiais com propriedades intermediárias entre o P(3HB) e PHA_{MCL} seria a obtenção de copolímeros híbridos.

A variabilidade da composição monomérica dos PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso para diferentes aplicações (SUDESH; ABE; DOI, 2000). A combinação de 3HB com 3-hidroxihexanoato (3HHx), formando P(3HB-co-3HHx), tem sido apontada como uma das possibilidades de se chegar a estas modificações de propriedades (NODA et al., 2005). Quanto maiores as frações do monômero 3HHx no copolímero, mais elástico se torna o material, e isto modifica as

propriedades físicas e mecânicas, permitindo diversificar suas aplicações (LEE; NA, 2013; QU et al., 2006).

O P(3HB-*co*-3HHx) tem sido estudado como suporte ou molde na engenharia de tecidos e outras aplicações médicas (LOMAS et al., 2012; WU; WANG; CHEN, 2009). Seu uso foi reportado na confecção de tecidos cartilagosos híbridos (YANG et al., 2002), em culturas de células ósseas (YANG et al., 2004), válvulas aórticas híbridas (WU et al., 2007), liberação controlada de fármacos (HEATHMAN et al., 2014), além disso, estes copolímeros de P(3HB-*co*-3HHx) têm sido alvo de diferentes patentes apresentadas pela empresa Procter e Gamble (HASSAN et al., 2006; NODA; BOND, 2002; NODA; NODA et al., 2005; SATKOWSKI, 2003) e Kao Corporation Chuo-Ku (MIMURA et al., 2008), indicando interesse industrial pela sua produção.

Bactérias do gênero *Aeromonas* se destacaram por apresentarem capacidade de sintetizar o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; LU et al, 2003). Os genes de biossíntese de PHA nestas bactérias estão organizados em um operon constituído pelo gene *phaC* (codificador da PHA sintase) flanqueado por *phaJ* (codificador da enoil-CoA hidratase) e *phaP* (codificador da PHAsina) (FUKUI; DOI, 1997). Estes genes têm sido utilizados para a construção de linhagens recombinantes abrigando os genes *phaC* e/ou *phaJ* de *Aeromonas* tendo produzido copolímeros P(3HB-*co*-3HHx) com fração 3HHx variando entre 5 e 17 mol% (CHEE et al., 2011; FUKUI et al., 1999; KAHAR et al., 2004; PARK et al., 2001, SATO et al., 2007).

O teor de PHA acumulado pelas bactérias do gênero acima citado é relativamente baixos, entre 1,26 e 6,18% da massa seca celular a partir de óleos vegetais (MATSUDA, 2009), sendo valores próximos aos observados por Doi, Kitamura e Abe (1995) e Gong et al. (2008) para bactérias do gênero *Aeromonas* cultivadas em condições similares. Assim, esses micro-organismos tornam-se relevantes como fontes de genes de interesse a serem expressos em hospedeiros que acumulem maiores teores de PHA, como *Burkholderia sacchari*.

B. sacchari, espécie bacteriana isolada no país (SILVA; GOMEZ, 1998), tem sido amplamente estudada e se mostrou capaz de acumular além do homopolímero poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)], o copolímero de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato [P(3HB-*co*-3HV)] em cultivos contendo glicose e propionato como cosubstrato (PEREIRA et al., 2009; LOPES et al., 2009; ROCHA et al., 2007; ROCHA et al., 2002; SILVA, 1998).

A PHA sintase de *B. sacchari* ainda não está plenamente caracterizada. Embora seja mais específica para polimerizar monômeros HA_{SCL}, é capaz de incorporar monômeros de 3HHx. Quando se fornece glicose e ácido hexanoico a este micro-organismo, produz-se P(3HB-*co*-3HHx) com fração de 3HHx de até 2 mol% (BUFFONI, 2006; MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2014 a, b).

Além dos estudos com recombinantes, o uso de ferramentas como a análise de fluxos metabólicos é bastante eficiente quando se deseja manipular vias metabólicas para a biossíntese de produtos de interesse. Modelos matemáticos podem ser usados para procedimentos de engenharia metabólica para a melhoria de desempenho biocatalítico (ALDOR; KEASLING, 2003).

Para a análise de fluxos, pode ser empregado o software Metatool, de acesso livre, que constrói e analisa rotas metabólicas a partir de dados bioquímicos e/ou sequências genômicas. A partir de um modelo de rede metabólica e utilizando os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, o programa define as possíveis vias que o micro-organismo poderia utilizar na situação em estudo para fechar o balanço estequiométrico, gerando uma ou mais equações globais que representam as transformações líquidas acontecidas nestes caminhos (modos elementares) (TACIRO, 2008). Em decorrência disso pode-se verificar qual é a possível rota metabólica utilizada pelo micro-organismo na condição testada e as possíveis soluções que podem gerar maiores rendimentos. A partir destas soluções, podem-se propor novas modificações genéticas ou formas de condução do processo fermentativo para atingir melhores fatores de conversão de substrato em produto.

Estratégias envolvendo a construção de recombinantes e a análise de fluxos metabólicos foram combinadas no presente trabalho, buscando a biossíntese de poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-*co*-3HHx)].

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plásticos biodegradáveis

Plásticos são materiais indispensáveis na sociedade moderna e se tornaram fundamentais, entre outras características, devido a sua resistência física, química e biológica (HALDEN, 2010; LEEJARKPAI et al., 2011). O consumo mundial de plásticos é maior que 200 milhões de toneladas por ano, com um crescimento anual de aproximadamente 5%, representando o maior campo de aplicação para o petróleo bruto (ÁLVAREZ-CHÁVEZ et al., 2012).

O rápido progresso na tecnologia de materiais tem criado novos plásticos com excelente durabilidade, entretanto, a maioria destes produtos geralmente têm aplicações de uso único, especialmente em embalagens de alimentos e materiais médicos (CARLETTO et al., 2011). O crescente aumento na utilização de plásticos, principalmente em aplicações em curto prazo, constitui um problema ambiental. Devido a sua alta resistência, os materiais poliméricos quando descartados persistem no ambiente por vários anos, gerando grandes volumes de lixo (SILVA, 2010).

Uma alternativa para reduzir o impacto ambiental causado por plásticos de origem petroquímica são os polímeros biodegradáveis (ÁLVAREZ-CHÁVEZ et al., 2012). Neste contexto, os polihidroxialcanoatos se destacam como excelentes substitutos dos polímeros provenientes do petróleo, por serem biodegradáveis e biocompatíveis (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

2.2 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são uma família de poliésteres produzidos e armazenados por diversos micro-organismos sob a forma de grânulos intracelulares (Figura 2.1) (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Os grânulos intracelulares de PHA são acumulados de forma mais expressiva sob condições desbalanceadas de crescimento, quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial para a multiplicação celular, como nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre ou oxigênio (BRANDL; GROSS; LENZ, 1990).

Estes grânulos podem atingir até cerca de 80% da massa seca celular e, para o micro-organismo acumulador, servirão como fontes de energia, carbono e equivalentes redutores quando os elementos essenciais estiverem novamente disponíveis, permitindo o crescimento celular (ANDERSON; DAWES, 1990; CHANPRATEEP, 2010; PARK et al., 2012).

Os grânulos de PHA apresentam-se como inclusões hidrofóbicas, envolvidas por uma membrana fosfolipídica simples, que contém proteínas imersas, tais como as despolimerases (PhaZ), as PHAsinas (PhaP) e a PHA sintase (PhaC) (REHM, 2010; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Figura 2.1- Microscopia eletrônica de células de *Ralstonia eutropha* após acúmulo de grânulos de PHA. Foto esquerda (SUDESH; ABE; DOI, 2000); fotos central e direita (Rita de Cássia Paro Alli).

A descoberta desse grupo de polímeros é atribuída ao microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur de Paris e data de 1923, quando a presença de polihidroxibutirato [P(3HB)] foi observada em uma bactéria do gênero *Bacillus* (LEMOIGNE, 1926). Essa descoberta passou por muitas décadas como curiosidade acadêmica, mas em 1962 foram publicadas as primeiras patentes apresentando as propriedades termoplásticas destes materiais (BAPTIST, 1962). Em 1964, Davis identificou o ácido 3-hidroxi-2-butenóico como constituinte de PHA produzido por uma bactéria do gênero *Nocardia* (WALLEN; DAVIS, 1972). Por volta de 1974, Wallen e Rohwedder identificaram a presença de outros monômeros diferentes do 3HB em amostras de lodo ativado, dentre os quais 3-hidroxivalerato (3HV) e 3-hidroxihexanoato (3HHx). Anos mais tarde, Findlay e White (1983) demonstravam a presença de unidades 3HB, 3-hidroxieptanoato (3HHp) e 3-hidroxioctanoato (3HO) no polímero extraído de *Bacillus megaterium* (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Na década de 80, um número crescente de outros constituintes de PHA foi identificado (BRANDL et al., 1988; DE SMET et al., 1983; DOI, 1990; HUISMAN et al., 1989; LAGEVEEN et al., 1988; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1991).

A estrutura genérica dos PHA está apresentada na Figura 2.2. O radical **R** pode ser formado por cadeias de carbono: alifáticas, cíclicas, com insaturações, ramificações, ou grupos funcionais (fenoxi, acetoxi, p-cianofenoxi, p-nitrofenoxi, hidroxilas secundárias, etc.). Observando a fórmula, o valor de **n** pode variar de 1 a 4, ou seja, é possível se obter 3-hidroxialcanoatos, 4-hidroxialcanoatos, 5-hidroxialcanoatos e 6-hidroxialcanoatos (AMARA, 2008; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

Figura 2.2- Fórmula química geral dos PHA: **n** pode variar de 1 a 3. Quando o grupo **R** for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para **n**=1, os PHA são classificados como PHA_{SCL} (“short chain length”), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando **R** = (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHA_{MCL} (“medium chain length”).

Os PHA estão divididos em dois grandes grupos: PHA_{SCL} (do inglês ‘short chain length’) que contém monômeros (HA_{SCL}) com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e PHA_{MCL} (‘medium chain length’) constituídos por monômeros (HA_{MCL}) contendo de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia principal (REHM; STEINBÜCHEL, 2005; SURIYAMONGKOL et al., 2007). Os PHA_{SCL} apresentam-se como materiais duros e quebradiços, enquanto os PHA_{MCL} são caracterizados por suas propriedades elastoméricas (OJUMU; YU; SOLOMAN, 2004; PARK et al., 2012; SURIYAMONGKOL et al., 2007). Existe uma definição, ainda pouco usual, para aqueles monômeros com número maior que 14 átomos de carbono, são os HA_{LCL} (‘long chain length’), os quais são menos estudados (KUNASUNDARI; SUDESH, 2011; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

2.3 Síntese de PHA por células bacterianas

A biossíntese de PHA depende de três fatores principais: da fonte de carbono fornecida no momento de acúmulo, das vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras e do tipo de PHA sintase bacteriano. Os substratos fornecidos podem ser submetidos a uma das três vias mencionadas a seguir até gerar moléculas de hidroxiacil-CoA (SILVA et al.,

2007): quebra de carboidratos, quebra de ácidos graxos e biossíntese *de novo* de ácidos graxos, Figura 2.3. Os hidroxiacil-CoA assim produzidos são incorporados ao polímero pela ação de uma PHA sintase específica, que catalisa a ligação dos monômeros por transesterificação (REHM, 2003; REHM, 2007; WITHOLT; KESSLER, 1999).

Figura 2.3- Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano (Figura adaptada de ALDOR e KEASLING, 2003). Vias metabólicas para síntese de PHA_{SCL} (polímeros com monômeros de 3 a 5 carbonos) e PHA_{MCL} (polímeros com monômeros de 6 a 14). Abreviações: PhaA –β-cetotiolase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de PHB 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).

2.3.1 PHA sintase

A PHA sintase é considerada a enzima chave para a formação de PHA, pois catalisa a polimerização de unidades (R)-3-hidroxiacil-CoA, determinando o tipo de polímero que é formado pelo micro-organismo (SOLAIMAN; ASHBY, 2005; STEINBÜCHEL, 1996). Aproximadamente 30 genes codificadores destas proteínas

tiveram suas sequências analisadas, sendo observado que existe similaridade entre as estruturas primárias de PHA sintases de diferentes micro-organismos. (REHM, 2003; RHEM, 2007; REHM; STEINBÜCHEL, 2005). De acordo com a estrutura primária das sequências dos genes codificadores e da especificidade pelo substrato, estas enzimas foram divididas em 4 classes (REHM, 2003; REHM, 2006; REHM, 2007; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995), como mostra a Tabela 2.1, que apresenta também as suas respectivas unidades características, espécies microbianas típicas e substrato preferencial.

Tabela 2.1- Classes de PHA sintases (PARK et al., 2012; REHM, 2003; REHM, 2007).

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

PHA sintases da classe I apresentam maior especificidade por HA_{SCL}. Consistem de um único polipeptídio e são encontradas em bactérias como *Aliccaligenes latus* (SCHUBERT; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1988), *Ralstonia eutropha* e (PEOPLES; SINSKEY, 1989), *Rhodococcus ruber* (PIEPER; STEINBÜCHEL, 1992), *Rhodobacter sphaeroides* e (HUESTEDE; STEINBÜCHEL; 1993) *Methylobacterium extorquens* (VALENTIN; STEINBÜCHEL, 1993).

PHA sintases da classe II também se constituem de um único polipeptídio e apresentam especificidade por HA_{MCL}. São encontradas em espécies de *Pseudomonas*: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* e *Pseudomonas putida* (HUISMAN et al., 1989; HUISMAN et al., 1991; TIMM; STEINBÜCHEL; 1992). Algumas PHA sintases da classe II de *Pseudomonas* sp. 61–3 (MATSUSAKI et al., 1998; MATSUSAKI; ABE; DOI, 2000) e *Pseudomonas* sp. 6–19 incorporam ambos HA_{SCL} e HA_{MCL}, entretanto com baixa atividade para os monômeros de cadeia curta.

A classe III de PHA sintases compreende enzimas com especificidade para HA_{SCL} , constituídas de duas subunidades polipeptídicas: (i) subunidade PhaC que contém sequência de aminoácidos com similaridade de 20 a 30% das PHA sintases da classe I e II, (ii) subunidade PhaE que não tem nenhuma similaridade com aquelas PHA sintases (LIEBERGESELL; REHALKAR; STEINBÜCHEL, 2000). É encontrada em *Allochromatium vinosum* (RHEM, 2003).

A classe IV de PHA sintases é encontrada em bactérias do gênero *Bacillus sp.*, usualmente produtores de PHA_{SCL} , e também são constituídas de duas subunidades proteicas, PhaC and PhaR (MCCOOL; CANNON, 2001). As subunidades PhaE e PhaR apresentam somente 18% de identidade entre as sequências de seus aminoácidos (SATO et al., 2002).

No que se refere à especificidade pelo substrato, existem duas exceções a esta classificação. Uma é a PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii*, que, embora seja semelhante à PHA sintases da classe III, é caracterizada pela capacidade de incorporar um amplo espectro de HA_{SCL} e HA_{MCL} (LIEBERGESELL; MAYER; STEINBÜCHEL, 1993; LIEBERGESELL; REHALKAR; STEINBÜCHEL, 2000; MATSUSAKI et al., 1998; VALENTIN; LEE; CHOI, 1994; VALENTIN; SCHÖNENBAUM; STEINBÜCHEL, 1996). A outra é a PHA sintase de *Aeromonas caviae* que tem um único tipo de subunidade similar à de PHA sintase do tipo I (45% de similaridade). Esta última enzima catalisa a polimerização de um copoliéster de 3HB e 3HHx (FUKUI; DOI, 1998)

2.3.2 β -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase

A enzima β -cetotiolase (PhaA), codificada pelo gene *phaA* é responsável por condensar duas moléculas de acetil-CoA para gerar acetoacetil-CoA, o primeiro passo na síntese de P(3HB) (Figura 2.3). Esta enzima contém duas subunidades, A e B, cada uma apresentando especificidades diferentes pelo substrato. A subunidade A é específica para substratos com 4 e 5 carbonos, já a B possui especificidade para intermediários de até 10 carbonos (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998). Existem duas outras β -cetotiolases, descritas para *R. eutropha*, as enzimas BktB e BktC. A primeira age na síntese de 3-cetohexanoil-CoA, pela condensação de acetil-CoA com butiril-CoA e a segunda, sintetiza 3-cetovaleril-CoA, resultante da condensação de propionil-CoA com acetil-CoA (SLATER et al., 1998; FUKUI; ABE; DOI, 2002).

A enzima acetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) é codificada pelo gene *phaB* e catalisa a reação de redução de acetoacetyl-CoA a (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA. Quando utiliza o NADPH esta enzima, também denominada 3-cetoacetyl-CoA redutase, pode gerar isômeros (*R*)-hidroxiacetyl-CoA, contendo 4 a 6 átomos de carbono (Figura 2.3), intermediários os quais a PHA sintase é capaz de reconhecer como substrato, devido à conformação (*R*) (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998).

2.3.3 Como são sintetizados os monômeros de cadeia curta e média?

A síntese de PHA pode ser dividida em dois grupos, quando se consideram os tipos de monômero: síntese de monômeros de cadeia curta e síntese de monômeros de cadeia média (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

2.3.3.1 Síntese de monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL})

Uma das vias mais estudadas para síntese de PHA é aquela de monômeros de cadeia curta, por ser a mais comum entre as espécies bacterianas para a produção do polihidroxiacetylato P(3HB). O operon *phaCAB* codifica as proteínas necessárias para produzir tais polímeros. Os acetyl-CoA gerados a partir do catabolismo de substratos são condensados a acetoacetyl-CoA, pela ação de uma β -cetotiolase (PhaA) (SLATER et al., 1998) (Figura 2.3). Esta reação depende da ação de cisteínas presentes no sítio ativo desta enzima, que desprotonizam as moléculas de acetyl-CoA em duas etapas para promover a condensação (MADISON; HUISMAN, 1999).

O acetoacetyl-CoA é reduzido a (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA pela ação de uma 3-cetoacetyl-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) e, finalmente, o (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA é incorporado a uma cadeia polimérica pela ação de uma PHA sintase (PhaC), ocorrendo a liberação da Coenzima A (CoASH) (ALDOR; KEASLING, 2003; OEDING; SCHLEGEL, 1973; SENIOR; DAWES, 1973; SURIYAMONGKOL et al., 2007) (Figura 2.3). Durante a polimerização realizada pela PHA sintase ocorre a ativação da cisteína, por uma histidina do sítio ativo, liberando CoASH, pelo ataque à ligação tio-éster do (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA, e formando um composto enzima-substrato. A ativação do grupo hidroxila do substrato ligado à enzima ataca a ligação tio-éster do outro (*R*)-3-hidroxiacetyl-CoA, promovendo a ligação entre os monômeros (REHM, 2010).

2.3.3.2 Síntese de monômeros de cadeia média (PHA_{MCL})

A síntese de PHA_{MCL} tanto pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas aos monômeros (ácidos graxos, álcoois e alcanos), como a partir de outras fontes de carbono não relacionadas estruturalmente (carboidratos), que são metabolizados pela β -oxidação ou biossíntese *de novo* de ácidos graxos (Figura 2.3) (MADISON; HUISMAN, 1999; TSUGE, 2002).

No caso da β -oxidação de ácidos graxos, a fonte de carbono é catabolizada e supre intermediários que podem ser incorporados pela PHA sintase (BRANDL et al., 1988; HUIJBERTS et al., 1994; LAGEVEEN et al., 1988). O direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase pode ser realizado por uma enoil-CoA hidratase (codificada pelo gene *phaJ*) (FUKUI; SHIMONI; DOI, 1998; SUDESH; ABE; DOI, 2000; TSUGE et al., 2000, TSUGE, 2002), 3-cetoacil-CoA redutase (codificada pelo gene *phaB*) (TAGUCHI et al., 1999; REN et al., 2000) ou mesmo uma epimerase (KRAAK; KESSLER; WITHOT, 1997; STEINBÜCHEL; LÜTKE-EVERSLOH, 2003). Na biossíntese *de novo* de ácidos graxos, os intermediários (R)-3-hidroxiacil-ACP são direcionados à PHA sintase pela ação de uma 3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase (PhaG, codificada por *phaG*) (Figura 2.3) (MADISON e HUISMAN, 1999; REHM; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1998; TSUGE, 2002).

Ainda a ação de enzimas como 3-cetoacil-ACP redutase (codificada pelo gene *fabG*), e malonil-CoA-ACP transacilase (codificada pelo gene *fabD*) podem gerar monômeros para síntese de PHA (SUDESH; ABE; DOI, 2000; TSUGE, 2000).

2.3.4 Outras enzimas envolvidas no metabolismo de PHA

Existem outras classes de enzimas, associadas aos grânulos de PHA, que participam do metabolismo destes polímeros: as despolimerases, PHAsina e as enzimas repressoras. As despolimerases (codificadas pelo gene *phaZ*) estão envolvidas em reações de degradação dos PHA, podendo ter especificidade por monômero de cadeia curta e/ou média (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). A PHAsina (codificada pelo gene *phaP*) é uma enzima de baixo peso molecular, que auxilia na síntese de PHA, participando da estabilização do grânulo. Esta enzima, é também responsável pela regulação do tamanho,

número e razão superfície/volume destas inclusões intracelulares (LUENGO et al., 2003; SUDESH; ABE; DOI, 2000). As enzimas repressoras (codificadas pelo gene *phaR*) têm um domínio para a interação com o DNA e outro para o grânulo de PHA, sendo capaz de se ligar tanto a polímeros amorfos quanto cristalinos (MA et al., 2013). Esta enzima regula a síntese de PHA pela interação direta com o polímero (MAEHARA et al., 2002). Foram descritos ainda em alguns organismos o cluster *phaIF*, contendo os genes *phaI*, cujo produto de expressão participa da formação e estabilidade do grânulo, e *phaF*, codificador de uma enzima que estabiliza o grânulo e age como reguladora (SURIYAMONGKOL et al., 2007)

2.3.5 Regulação da síntese de PHA

A enzima PhaR regula a síntese de PHA pela ligação direta ao polímero e a uma sequência específica do DNA, *upstream* à *phaP*, processo que dá início à degradação pelas despolimerases (MAEHARA et al., 2002)

Outra forma de regular a síntese de PHA é via enzima β -cetotiolase. A regulação da síntese de acetoacetil-CoA ocorre pelo aumento da concentração de CoASH, que inibe a ação da β -cetotiolase. Assim, quando há altos teores de CoASH, liberado pelo ciclo de Krebs durante a fase de crescimento, a síntese de PHA diminui (ANDERSON; DAWES, 1990; VERLINDEN et al., 2007). Em situações em que há excesso de fonte de carbono e escassez de um nutriente essencial, a quantidade de NADH aumenta, resultando na inibição das enzimas citrato sintetase e isocitrato desidrogenase e, consequentemente, o acetil-CoA acumula, diminuindo a liberação de CoASH pelo ciclo de Krebs e permitindo a ação da β -cetotiolase (AMARA, 2008; ANDERSON; DAWES, 1990).

2.4 Composição monomérica associada às propriedades dos PHA

Uma grande diversidade de monômeros PHA_{SCL} e PHA_{MCL} pode constituir os polihidroxialcanoatos, o que lhes confere características físicas e mecânicas diversas e, portanto aplicações variadas (DOI, 1990). Cerca de 150 monômeros distintos já foram identificados como constituintes de PHA bacterianos, sintetizados por micro-organismos selvagens ou recombinantes e produzidos a partir de diversas fontes de carbono (REHM, 2003; REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

Os homopolímeros se caracterizam pela presença de apenas uma unidade monomérica repetida. As propriedades destes tipos de polímeros podem ser modificadas à medida que são incorporados monômeros distintos, gerando copolímeros ou mesmo terpolímeros.

O poli-3-hidroxibutirato P(3HB), o primeiro PHA descrito, conforme citado anteriormente, é um exemplo de homopolímero com monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}). A molécula de P(3HB) é estereoespecífica e, por ser uma molécula quirállica, com todos os átomos de carbono assimétricos na configuração (*R*), apresenta alta cristalinidade (55-80%). Melhora na cristalinidade, temperatura de fusão e resistência do P(3HB) podem ser conseguidas aumentando-se o peso molecular do polímero pela incorporação de outros monômeros, gerando copolímeros. A copolimerização de 3HB com outros monômeros possibilita a obtenção de polímeros com flexibilidade superior e temperaturas de fusão menores, características mais próximas dos plásticos de origem petroquímica (OJUMU; YU; SOLOMAN, 2004; PARK et al., 2012).

Os copolímeros que mais têm sido estudados são o poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato), P(3HB-*co*-3HV), o poli(3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato), P(3HB-*co*-4HB), e o poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato), P(3HB-*co*-3HHx) (Figura 2.4) (KESHAVARZ; ROY, 2010; VERLINDEN et al., 2007;).

A inserção de monômeros de 3-hidroxivalerato (3HV) ao P(3HB) foi obtida a partir do fornecimento de glicose e ácido propiônico à bactéria produtora (DOI, 1990; GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; HOLMES, 1988). Phukon, Saikia e Konwar (2012) produziram P(3HB-*co*-3HV) a partir de dextrose 10 g/L, cultivando *Bacillus circulans* (MTCC8167). O copolímero P(3HB-*co*-3HV), assim formado, cuja estrutura pode ser observada na Figura 2.4, apresenta um aumento da maleabilidade e resistência, atingindo valores de alongamento para ruptura de até cerca de 100%. Com isso é possível alcançar maior variedade de aplicações (HOLMES, 1985).

Outro copolímero composto por monômeros HA_{SCL} é o poli (3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato) [P(3HB-*co*-4HB)]. O P(3HB-*co*-4HB) foi inicialmente obtido a partir de substratos com estrutura química diretamente relacionada a ele, tais como: ácido 4-hidroxibutírico (KUNIOKA; NAKAMURA; DOI, 1988, MENDONÇA et al., 2014), γ -butirolactona (ZHILA et al., 2011), 4-clorobutirato e 1,4-butanodiol (KUNIOKA; KAWAGUSHI; DOI, 1989). *R. eutropha* suprida com ácido 4-hidroxibutírico produziu um copolímero composto por 67 mol% de 3HB e 33 mol% de 4HB (KUNIOKA;

KAWAGUSHI; DOI, 1989). Quando ácido butírico foi adicionado como cosubstrato, a fração 4HB diminuiu, indicando que sua presença no polímero varia de 0 a 33 mol% dependendo das demais fontes de carbono supridas no meio. Observa-se que, para copolímeros compostos de 10% de 4HB a resistência à tensão cai para 24 MPa, enquanto o alongamento até a ruptura aumenta para mais de 200% (Tabela 2.2). *Cupriavidus eutrophus* B10646 produziu P(3HB-co-4HB) a partir de γ -butirolactona contendo de 8,7 a 24,3 mol % de 4HB (ZHILA et al., 2011). Cultivando *Burkholderia sacchari*, Mendonça et al. (2014) produziram P(3HB-co-4HB) contendo 9,1 mol% de 4HB, a partir de ácido 4-hidroxibutírico.

Figura 2.4- Estrutura química de copolímeros: **Esquerda: superior** - poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidrovalertato) P(3HB-co-3HV) e **inferior** - poli(- hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato) P(3HB-co-4HB) compostos por monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}); **Direita: superior** - poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx) constituído de monômero de cadeia curta (PHA_{SCL}) e média (PHA_{MCL}) e **inferior** - poli(4-hidroxibutirato) e P(3HHx-co-3HO) com monômeros de cadeia média.

A combinação de P(3HB) e monômeros de HA_{MCL}, gerando copolímeros híbridos, apresenta potencial para a obtenção de materiais com valores de alongamento para ruptura maiores que aqueles alcançados com a incorporação de unidades 3HV ou 4HB, chegando a valores superiores a 600% (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; PRADELLA, 2006).

Um PHA que emergiu como um copolímero com propriedades físicas interessantes, resulta da combinação de P3HB com 3-hidroxihexanoato, um monômero de cadeia média, P(3HB-co-3HHx) (LIANGQ et al., 2006), como pode ser verificado na Tabela 2.2. Estudos já revelaram que o copolímero P(3HB-co-3HHx) possui propriedades

mecânicas similares às do polietileno de baixa densidade e se torna cada vez mais maleável com o aumento de unidades 3HHx (XIE; CHEN, 2008), o que dá ao polímero características superiores quando comparado ao P(3HB) e P(3HB-*co*-3HV)

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

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para ruptura (%)
P(3HB)	177	4	43	5
P(3HB- <i>co</i> -10% HV)	150	-	25	20
P(3HB- <i>co</i> -20% HV)	135	-	20	100
P(3HB- <i>co</i> -3% 4HB)	166	-	28	45
P(3BH- <i>co</i> -10% 4HB)	159	-	24	242
P(3BH- <i>co</i> -64% 4HB)	50	-	17	591
P(3HB- <i>co</i> -5% HHx)	151	0	-	-
P(3HB- <i>co</i> -10% HHx)	127	-1	21	400
P(3HB- <i>co</i> -15% HHx)	115	0	23	760
P(3HB- <i>co</i> -17% HHx)	120	-2	20	850
P(3HB- <i>co</i> -19% HHx)	111	-4	-	-
P(3HB- <i>co</i> -25% HHx)	52	-4	-	-
PHO	61	-35	9	380
Polipropileno	170	-	34	400
Poliestireno	110	-	50	-
PET	262	-	56	730
HDPE	135	-	29	-
LDPE	130	-30	10	620

3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; HV: 3-hidroxi valerato; HHx: 3-hidroxihexanoato, HO: 3-hidroxioctanoato, PET – polietileno tereftalato, HDPE – polietileno de alta densidade, LDPE – polietileno de baixa densidade, T_m – temperatura de fusão; T_g temperatura de transição vítrea. Fontes: Holmes (1988); King (1982); Doi, Kitamura e Abe (1995); Sudesh, Abe e Doi (2000); Khanna; Srivastava (2005); Pradella (2006); Carminatti et al. (2006)

Observa-se que há um decréscimo da resistência de 43 para 20 MPa quando a fração de 3HHx é aumentada de 0 para 17 mol%. Em contraste, o alongamento até a ruptura aumentou de 5 para 850%, tornando evidente que os copolímeros P(3HB-*co*-3HHx) (Figura 2.4) tornam-se flexíveis com o acréscimo de unidades 3HHx (Tabela 2.2). Doi, Kitamura e Abe (1995) demonstraram que copolímeros de 3HB e 3HHx produzidos por *Aeromonas caviae* atingiam valores de alongamento até a ruptura de 400%, quando continham 10 mol% de 3HHx. Este valor foi de 850% , quando o copolímero compunha-se de 17 mol% de 3HHx como comonômero. PHA produzidos por *Pseudomonas* sp. 61-3

contendo 3HB e 3H_{AMCL}, com cadeias carbônicas variando de 6 a 12 átomos de carbono apresentaram alongamento para ruptura de 680% quando a fração 3H_{AMCL} correspondia a 6% (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Outro grupo resultante das associações de diferentes monômeros são os terpolímeros ou terpoliésteres, descobertos recentemente, como o P(3HB-co-3HV-co-4HB). Estes polímeros parecem apresentar propriedades térmicas e mecânicas mais variadas que o P(3HB), P(3HB-co-3HV) e P(3HB-co-3HHx), mas ainda estão em estudo (XIE; CHENG, 2008). O terpolímero P(3HB-co-3HV-co-3HHx) possui uma alta temperatura de degradação térmica por volta de 248,5 °C a 481,1 °C, quando comparado ao comparado ao homopolímero P(3HB) (ZHAO; CHEN, 2007). De um modo geral, os terpolímeros têm sido aplicados em estudos de engenharia de tecidos. O P(3HB-co-4HB-co-3HHx) mostrou resultados satisfatórios quando utilizado associado a células mesenquimais (WEI et al., 2008). O P(3HB-co-3HV-co-3HHx) utilizado como molde para formação de tecidos, permite uma alta atividade de crescimento de células da pele humana (JI; LI; CHEN, 2008).

2.4.1 Aplicações P(3HB-co-3HHx)

De um modo geral, as aplicações potenciais dos PHA são muito variadas devido à diversidade de combinações monoméricas possíveis. Podem-se mencionar como possíveis aplicações a produção de embalagens para produtos de higiene, vasilhames para fertilizantes, vasos para mudas de plantas, produtos injetados, brinquedos, cosméticos, produtos farmacêuticos e médicos (fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas para liberação controlada de fármacos), entre outras (CHEN, 2009; ELIGIO et al., 1999; HOLMES, 1985; KHANNA; SRIVASTAVA, 2005; KESHAVARZ; ROY, 2010; VASCONCELOS, 2002; REDDY et al., 2003; VERLINDEN et al., 2007).

A empresa britânica Imperial Chemical Industries, nos anos 1990, iniciou a produção de P(3HB-co-3HV), comercializado com o nome de Biopol (SHAH et al., 2008). As empresas americanas Metabolix Bioplastics e Procter & Gamble Chemicals disponibilizaram no mercado, respectivamente, os polímeros de PHA Mirel e Nodax. No Brasil, a produção de P(3HB) e P(3HB-co-3HV) foi viabilizada pela empresa PHB Industrial (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001). Ainda outras empresas como Biomer, na Alemanha, BioGreen e Kaneka Corporation, no Japão, e Degrapol, na Itália,

também lançaram produtos à base de PHA (CHANPRATEEP, 2010; PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007).

Características como peso molecular, cristalinidade e propriedades térmicas são levadas em consideração na aplicação do polímero (MONTORO et al., 2010). Dependendo da espécie bacteriana e das condições de cultivo, o peso molecular dos PHA varia entre 2×10^5 e 3×10^6 Da (AMARA, 2008; SUDESH; ABE; DOI, 2000). A temperatura de fusão desses polímeros está entre os 40 e 180 °C e, dependendo da constituição monomérica, a cristalinidade se altera desde 30 a 70% (REHM, 2010).

Considerando o copolímero P(3HB-*co*-3HHx), a porosidade deste material faz com que seja uma matriz adequada para o crescimento celular, conferindo-lhe maior biocompatibilidade (LOMAS et al., 2012), tornando-o promissor para aplicações como suporte ou molde para uso em engenharia de tecidos e outras aplicações médicas (WU; WANG; CHEN, 2009). Seu uso tem sido reportado na confecção de tecidos cartilaginosos híbridos (YANG; ZHAO; CHEN, 2002), em culturas de células ósseas (YANG et al., 2004), válvulas aórticas híbridas (WU et al., 2007), como moldes para crescimento de células musculares em estruturas microtubulares uniaxiais (CHEN et al., 2008), como tubos condutores para regeneração de nervos periféricos (BIAN et al., 2009), tecidos cardiovasculares (SUN et al., 2009). Este copolímero também foi estudado como suporte auxiliador na reconstrução de pálpebras de ratos (ZHOU et al., 2010), como implante injetável para prevenção de adesão tecidual pós-cirúrgica (DAI; ZOU; CHEN, 2009) e na liberação controlada de fármacos (KILIÇAY et al., 2011; XIONG et al., 2010). A utilização deste copolímero com associações, visando aumentar a biocompatibilidade, tem sido descrita. Exemplos recentes são a associação ao malato [Ma-P(3HB-*co*-3HHx)] (LI et al., 2008a) ou à hidroxiapatita, mostrando-se promissor para a reconstrução óssea (XI et al., 2008).

Copolímeros de P(3HB-*co*-3HHx) foram alvo de diferentes patentes apresentadas pela empresa Procter & Gamble (NODA; BOND, 2002; NODA et al., 2005; NODA; SATKOWSKI, 2003; HASSAN et al., 2006), indicando interesse industrial pela sua produção. Uma patente depositada pela empresa Kao Corporation Chuo-Ku descreve membranas porosas para aplicação em artigos absorventes, como fraldas, contendo polímeros de 3-hidroxihexanoato (MIMURA et al., 2008).

2.5 Bactérias naturalmente produtoras de P(3HB-co-3HHx)

A incorporação de 3HHx associado a 3HB foi demonstrada para algumas bactérias. Brandl et al. (1989), numa linhagem selvagem de *Rhodospirillum rubrum*, detectaram o acúmulo de cerca de 10% da massa seca celular de PHA contendo 91,1 mol% de 3HB e 8,9 mol% de 3HHx a partir de ácido hexanoico. No mesmo ano, a produção de P(3HB-co-3HHx) contendo 2,2 mol% de 3HHx por *Ralstonia eutropha* foi demonstrada (GROSS et al., 1989; ULMER et al., 1989). O acúmulo de frações de 3HHx associadas ao 3HB foi conseguida também em *Rhodococcus ruber*, *Nocardia corallina* e *Bacillus megaterium* que acumularam P(3HB-co-3HHx) quando cresceram em meio contendo ácido hexanoico (HAYWOOD et al., 1991; DENNIS, 1994), bem como em *Comamonas testosteroni* e *Bacillus cereus*, entre outras bactérias (CABALLERO; KAREL; REGISTER, 1995).

Bactérias do gênero *Aeromonas* mostraram-se eficientes na produção do copolímero P(3HB-co-3HHx) com altos teores de 3HHx (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; SHEN et al., 2009; TAGUCHI et al., 1999; TSUGE et al., 2003; ZHANG et al., 2009). *Aeromonas caviae* se destacou com relação à capacidade de produção de P(3HB-co-3HHx) contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; KOBAYASHI et al., 1994; SHIMAMURA et al., 1994; SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993). *Aeromonas hydrophila* também se mostrou capaz de produzir um PHA de composição similar (CHEN et al., 2001; LEE et al., 2000).

Genes de biossíntese de PHA em *Aeromonas* estão organizados em um operon constituído pelo gene *phaC* (codificador da PHA sintase) flanqueado por *phaJ* (que codifica a enoil-CoA hidratase) e *phaP* (codificador da PHAsina) (FUKUI; DOI, 1997). Assim, na síntese de P(3HB-co-3HHx) em *A. caviae* a partir de ácidos graxos, supõe-se que, intermediários da β -oxidação destes compostos sejam dirigidos para a síntese de PHA por meio da ação do produto do gene *phaJ* (FUKUI et al., 1999). Não foram detectados, neste micro-organismo, os genes *phaA* (codificador da β -cetotiolase) ou *phaB* (que codifica a 3-cetoacil-CoA redutase) próximos ao gene *phaC*, como em *R. eutropha* e diversas outras bactérias. Esta organização de genes talvez explique o tipo de PHA produzido por *Aeromonas*. Na ausência de *phaA* e *phaB*, a bactéria não seria capaz de produzir 3HB a partir de carboidratos via acetil-CoA. Além disso, o suprimento de 3HB a partir de ácidos graxos seria reduzido devido a impossibilidade de aproveitar moléculas de acetil-CoA

geradas no ciclo de β -oxidação para formação desses monômeros. Por outro lado, a enoil-CoA hidratase deve promover o direcionamento de intermediários dos ciclo da β -oxidação contendo 4 e 6 carbonos para a biossíntese de PHA. A especificidade da PHA sintase presente em *Aeromonas* também deve ser um fator importante para determinar a composição do PHA (FUKUI; DOI, 1997; FUKUI et al., 1999).

O gênero *Aeromonas* é representado por bactérias em forma de bacilos Gram-negativos, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase positiva. Vivem livremente em água doce e podem ser encontradas no solo. Algumas espécies desse gênero, *A. hydrophila* e a *Aeromonas salmonicida*, podem causar diarreia ao homem quando ingeridas na água ou alimentos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; VON GRAEVENITZ, 2007).

2.6 Produção de PHA por *Burkholderia sacchari* e seu potencial para a síntese de P(3HB-co-3HHx)

O gênero *Burkholderia* foi descrito por Yabuuchi et al. (1992). São β -proteobactérias (BOONE; CASTENHOLZ, 2006), quimiorganotróficas com crescimento ótimo a entre 28 e 30 °C, aeróbias, com flagelação polar, oxidase e catalase positivas, apresentando-se como bacilos Gram-negativos (BRÄMER et al., 2001; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Têm ampla distribuição, ocorrendo comumente no solo, água, plantas, animais e humanos. Com exceção das espécies *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*, consideradas patogênicas para humanos e animais, a maioria das espécies não é patogênica (COENYE; VANDAMME, 2003; PERIN; ARAÚJO; REIS, 2006; VANDAMME; GOVAN; LIPUMA, 2007).

Existem alguns artigos publicados utilizando bactérias deste gênero para a produção de PHA. A PHA sintase de *Burkholderia cepacia* foi estudada por Rodrigues, Vicente e Steinbüchel (2000) inativando-se este gene por recombinação homóloga. Foi observado que mesmo após a mutação, houve acúmulo de PHA por esta linhagem, quando cultivada em sacarose e glutamato, indicando que esta espécie possuía mais de uma PHA sintase (HANG et al., 2002; RODRIGUES; VICENTE; STEINBÜCHEL, 2000). *B. cepacia* também foi avaliada para a produção de P(3HB-co-3HV), tendo-se obtido entre 80 e 90 mol% de 3HV, a partir de ácido valérico (HSIEH et al., 2011). Em estudo com o operon de síntese de PHA de *Burkholderia caryophylli*, *phaC1C2Z*, clonado em *E. coli*, obtiveram-se copolímeros contendo 1 mol% dos monômeros, 3HHx, 3HO e 3HD, ou 3HO

e 3HD a 3 mol%, quando se ofereceu ácido octanoico ou decanoico, respectivamente, para linhagens recombinantes abrigando os genes *phaC1* ou *phaC2* (HANG et al., 2002). Em estudo com linhagens recombinantes de *B. cepacia* contendo o gene *phaC* de *A. caviae* foi obtido o polímero 3-hidroxi-4-metilvalerato a partir de glicose ou frutose e ácido isopranoico (LAU et al., 2010; LAU; TSUGE; SUDESH, 2011).

Burkholderia sacchari, isolada de solo de cultivo de cana-de-açúcar, se destacou por sua capacidade de rápido crescimento em sacarose, bem como acúmulo de altas porcentagens de PHA, até 68% da massa seca celular (GOMEZ, 1994; GOMEZ et al., 1996, 1997). Estudos taxonômicos, envolvendo laboratórios do Brasil, Alemanha e Bélgica, indicaram que o isolado representava uma nova espécie no gênero *Burkholderia*, tendo sido nomeada *Burkholderia sacchari* (BRÄMER et al., 2001; SILVA; RODRIGUES; GOMEZ, 2001; SILVA et al., 2001).

Foi reportada a produção de P(3HB-co-3HV) com maiores teores de 3HV por mutantes de *B. sacchari* afetados no consumo de propionato para o crescimento, o que direcionou o ácido propiônico utilizado como fonte de carbono para a síntese daquele monômero (SILVA et al., 2000; ROCHA et al., 2008). Alguns estudos seguintes mostraram que o catabolismo do propionato ocorre em duas vias metabólicas (BRÄMER et al., 2002; PEREIRA, 2007; PEREIRA et al., 2009; ROCHA et al., 2007; ROCHA et al., 2008). Utilizando sacarose como fonte de carbono em cultivo com *B. sacchari*, Pradella, Taciro e Mateus (2010) alcançaram a produtividade de 1,7 g/L.h de PHA para cultivo em biorreator de alta densidade celular com limitação em nitrogênio e sacarose.

A capacidade da bactéria *B. sacchari* em usar xilose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foi melhorada (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2009; ROCHA, 2002; ROCHA et al., 2002; SILVA et al., 2002, 2004). Lopes, Gomez e Silva (2009) detectaram que a super-expressão do gene codificador da xilose isomerase (*xyl*), em mutantes *xyl*⁻, não tem efeito na produção de P(3HB). Com esta linhagem também foram conduzidos estudos com mutação UV para observar o efeito na síntese de polímeros de PHA (FILIPOV, 2000). O sistema de mobilização de PHA por *B. sacchari* foi também avaliado, utilizando-se análise bioinformática, complementação heteróloga e construção de mutantes por transposon (CASTELLANOS, 2010; LOZANO, 2013).

B. sacchari foi capaz de produzir P(3HB-co-4HB) contendo 9,1 mol% de 4HB quando suprida de ácido 4-hidroxibutírico (BUFFONI, 2006; MENDONÇA et al, 2014) Cesário et al. (2014) reportaram a capacidade de *B. sacchari* produzir o copolímero

P(3HB-*co*-4HB) a partir de hidrolisado de palha e γ -butirolactona com teores variando entre 4,7 e 11,8 mol% de 4HB.

Em relação à PHA sintase de *B. sacchari*, que ainda não é plenamente conhecida, embora seja mais específica para polimerizar monômeros HA_{SCL}, estudos preliminares com cerca de 30 substratos diferentes indicaram que esta linhagem acumula o copolímero P(3HB-*co*-3HHx), com fração molar de 3HHx de até 2 mol%, a partir de glicose e ácido hexanoico (BUFFONI, 2006; BUFFONI; GOMEZ; SILVA, 2005; MENDONÇA, et al., 2008, MENDONÇA; GOMEZ; SILVA, 2009; MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2013, 2014).

2.7 Uso de bactérias recombinantes para a produção de P(3HB-*co*-3HHx)

A clonagem de genes associados à biossíntese de PHA, em particular de PHA sintases, tem aberto a possibilidade de construção de linhagens recombinantes capazes de sintetizar PHA ainda não detectados em linhagens selvagens (ALDOR; KEASLING, 2003). Para a geração de PHA híbridos, um passo natural seria a expressão de genes codificadores da PHA sintase do tipo I em organismos contendo PHA sintase do tipo II (Tabela 2.1) e vice-versa. Além disso, enzimas específicas para a síntese de PHA, diferentes da PHA sintase, podem gerar (R)-hidroxiacil-CoA utilizando diferentes intermediários de vias metabólicas comuns em bactérias, como a β -oxidação e síntese *de novo* de ácidos graxos (Figura 2.3). Estas enzimas também podem ser alvo para o uso na construção de linhagens recombinantes.

Genes de espécies de *Aeromonas* têm sido utilizados na construção de recombinantes, em geral de *Ralstonia eutropha*. Já em 1998, Fukui e Doi estudaram o uso de óleos vegetais por uma linhagem recombinante de *R. eutropha* abrigando o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae*, tendo obtido o copolímero P(3HB-*co*-3HHx) correspondendo a aproximadamente 80% da massa seca celular, contendo 4-5 mol% de 3HHx, independentemente da estrutura dos triglicerídeos fornecidos.

A co-expressão de *phaC* e *phaJ* de *A. caviae* em *E. coli* possibilitou a síntese de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de diferentes ácidos graxos, com a fração molar de unidades 3HHx oscilando entre 7 e 17% (FUKUI et al., 1999).

Utilizando recombinantes de *R. eutropha* abrigando os genes *phaPCJ* de *A. caviae*, a partir de ácidos butírico, hexanoico ou octanoico foram produzidos copolímeros

contendo 1, 11 ou 26 mol% de 3HHx, respectivamente, para cada fonte de carbono testada (KICHISE et al., 1999).

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

Em 2005 foi reportado que a inserção, em *Aeromonas hydrophila*, de genes de *R. eutropha* envolvidos na síntese de PHA, bem como a superexpressão de genes de *A. hydrophila* permitiram a obtenção de P(3HB-co-3HHx) com teores de 3HHx variando entre 12 a 19 mol%, a partir de substratos não relacionados, como glicose e gliconato (QIU et al., 2005). A massa celular alcançada foi de 2,6 g/L, contendo 15% de PHA, no qual 12 - 19% correspondiam a 3HHx. Óleo de dendê também foi testado para a produção de P(3HB-co-3HHx) por *R. eutropha* recombinante abrigando o gene da PHA sintase de *A. caviae*, tendo-se chegado a 87% da massa celular na forma deste copolímero a partir de 5 g de óleo (LOO et al., 2005). *R. eutropha* recombinante contendo *phaC* de *A. caviae* com mutação por evolução in vitro utilizando óleo de soja como substrato produziu massa seca celular de 34,8 g/L, contendo 9,9 mol% de 3HHx (MIFUNE; NAKAMURA; FUKUI, 2010).

Linhagem recombinante de *Burkholderia* sp. USM (JCM 15050) abrigando gene da *phaC_{Ac}* cultivada em biorreator acumulou até 7 mol% de 3HHx a partir de 0,5 % (v/v) de óleo de dendê combinado a 0,25 % (m/v) de valerato de sódio ou propionato de sódio (CHEE et al., 2011).

Recombinantes de *R. eutropha* abrigando o gene codificador da PHA sintase de *Rhodococcus aetherivorans* e o *phaJ* de *P. aeruginosa* acumularam copolímero P(3HB-co-3HHx) contendo 30 mol% de 3HHx, quando o cultivo foi suprido com óleo de palmeira (BUDDE et al., 2011). Utilizando *R. eutropha* contendo deleções nos genes codificadores das enzimas acetoacetyl-CoA redutase (*phaB*) e PHA sintase (*phaC*), a qual foi substituída pelo gene *phaC2* *Rhodococcus aetherivorans* I24, foi possível produzir P(3HB-co-3HHx) contendo até 40% de 3HHx a partir de ácido butírico, como única fonte de carbono (JEON et al., 2014).

2.8 Análise de fluxos metabólicos

Os fatores que determinam a fisiologia celular são as vias metabólicas e seus fluxos, ou seja, a velocidade das reações que compõem o metabolismo. A análise de fluxos metabólicos (AFM) permite analisar essas velocidades e propor alterações metabólicas para maximizar a produtividade e os fatores de conversão de substrato em produto (STEPHANOPOULOS, 1999).

O interesse pela análise da distribuição de fluxos metabólicos tem aumentado porque esta metodologia permite a compreensão detalhada e quantitativa da fisiologia metabólica, levando à interpretação de dados experimentais. Além disso, fornece um guia para engenharia metabólica, para aperfeiçoar formulações de meios de cultura e métodos para melhorar bioprocessos (VARMA; PALSSON, 1994).

Têm sido desenvolvidas ferramentas computacionais para calcular os fluxos das reações catalisadas por enzimas atuantes no metabolismo. A análise de modos elementares é uma destas ferramentas, que introduz um método sistemático para determinar possíveis rotas de conversão através das vias bioquímicas que compõem uma rede metabólica complexa (TRINH; WLASCHIN; SRIENC, 2010).

Um programa utilizado para analisar fluxos metabólicos é o Metatool (PFEIFFER et al., 1999). A metodologia adotada para o desenvolvimento deste programa é baseada no conceito de modos elementares de fluxos, a partir dos quais se pode testar se conjuntos de enzimas formam uma via metabólica consistente, considerando o direcionamento (irreversibilidade) das reações. A partir da análise de um modelo de rede metabólica e utilizando os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, o programa define as possíveis vias que o micro-organismo utiliza na situação em estudo para fechar o balanço estequiométrico, gerando uma ou mais equações que representam este caminho (modos elementares) (TACIRO, 2008).

Considerando-se a produção de PHA, tem-se uma condição ideal para analisar fluxos metabólicos, uma vez que o fluxo de carbonos é direcionado para a síntese desse polímero, em detrimento do crescimento celular, que nesta fase é predominantemente nulo (BRÄMER et al., 2002). A análise de fluxos metabólicos tem sido estudada em diferentes micro-organismos produtores de PHA, indicando-se pontos relevantes para otimizar a síntese desses polímeros, permitindo também conhecer mais detalhadamente as vias metabólicas utilizadas neste processo (LEE, 2002; LANGE; WEUSTHUIS; HEIJNEN,

2002; POBLETE-CASTRO et al., 2013; SHI; NIKAWA; SHIMIZU, 1999; SRIENC, 2002).

Análise de fluxos metabólicos *in silico* foi aplicada para identificar potenciais genes alvo com o objetivo de otimizar a biossíntese de PHA_{MCL} a partir de glicose em *P. putida* KT2440. Como previsto por aquela análise, cultivo em biorreator com uma linhagem recombinante de *P. putida* KT2440, superexpressando uma subunidade da enzima piruvato desidrogenase (codificada pelo gene *acoA*) em combinação com a deleção do gene codificador da glicose desidrogenase (Δgcd), produziu 121% mais PHA em comparação com a linhagem selvagem (BARRERO-DE ACUÑA et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar bactérias recombinantes e analisar fluxos metabólicos no contexto da biossíntese de poli(3-hidroxi butirato-*co*-3-hidroxi hexanoato) [P(3HB-*co*-3HHx)]

3.2 Objetivos específicos

- Construir recombinantes de *Burkholderia sacchari* portadores dos genes do operon *phaPCJ* de *Aeromonas* spp. e verificar a capacidade destes acumularem P(3HB-*co*-3HHx) a partir de ácidos orgânicos;
- Analisar fluxos metabólicos de ensaios com *B. sacchari* selvagem e recombinante para avaliar a possibilidade de novos melhoramentos;
- Verificar a presença de genes do catabolismo de ácidos graxos de *B. sacchari* a partir do genoma sequenciado;
- Caracterizar as propriedades físicas de copolímeros obtidos para delinear possíveis aplicações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e genes

As linhagens, os plasmídeos e os genes utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 4.1. A preservação de tais linhagens foi feita por liofilização (SILVA et al., 1992) ou suspensão em glicerol (20% m/v) e estoque em freezer a -80 °C.

Tabela 4.1- Bactérias, plasmídeos e genes utilizados no trabalho. (continua)

Bactéria/Plasmídeo	Características	Origem/Referência
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 (LMG 19450)	Linhagem selvagem: Sac ⁺ , PHA ⁺ , Hx ⁺ , Amp ^S , Km ^S , Tc ^S	Brämer et al. (2001)
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM344	Linhagem mutante UV incapaz de produzir polímero (PHA ⁻)	Oliveira et al. (1998)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	Linhagem produtora P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo de soja e ácido láurico	Seshadri et al. (2006)
<i>Aeromonas sp.</i> (LFM897)	Isolado produtor de P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo de soja.	Matsuda (2009)
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Tc ^R , lacI ^q ZΔM15, Tn10.	Bullock, Fernandes e Short (1987)
<i>E. coli</i> S17-1	Tc ^S , recA, genes de transferência do plasmídeo RP4 integrados no DNA genômico.	Simon et al. (1983)
<i>Pseudomonas sp.</i> LFM046	Linhagem produtora de PHA com monômero de cadeia média	Gomez et al. (1996)
<i>Aeromonas sp.</i> LFM836	Isolado produtor de P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo de soja.	Matsuda (2009)
<i>B. sacchari</i> LFM1039	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2 vazio	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1034	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaPCJ de <i>Aeromonas sp.</i> (LFM897)	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1035	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaC de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1036	<i>B. sacchari</i> LFM101 recombinante com pBBR1MCS-2::phaJ de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1037	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaCJ de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho

LFM – Sigla do grupo ‘Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos’; ATCC - *American Type Cell Culture*; Sac⁺-crescimento em sacarose; Hx⁺- crescimento em ácido hexanoico; PHA⁺- acúmulo de PHA; PHA⁻ - ausência de acúmulo de PHA; Amp^S – sensibilidade à ampicilina; Km^S – sensibilidade à canamicina; Tc^S – sensibilidade à tetraciclina; Km^R– resistência à canamicina; Tc^R– resistência à tetraciclina.

Tabela 4.1- Bactérias, plasmídeos e genes utilizados no trabalho. (conclusão)

<i>B. sacchari</i> LFM1038	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaPC</i> de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM936	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 abrigando plasmídeo pBBR1MCS-2 vazio; Sac ⁺ , PHA ⁺ , Km ^R	Mendonça (2010)
pBBR1MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5,144 Kb), Km ^R .	Kovach et al. (1995)
<i>phaPCJ</i> _{Asp.}	Contém os genes <i>phaP</i> que codifica uma PHAsina, responsável pela estabilidade do grânulo de PHA; <i>phaC</i> que codifica a enzima PHA sintase, responsável pela polimerização dos monômeros 3-hidroxiacil-CoA; e <i>phaJ</i> responsável pela codificação de uma enoil-CoA hidratase (<i>R</i>) específica que drena intermediários da β -oxidação para a síntese de PHA.	Fukui e Doi (1997); Fukui, Shimoni e Doi (1998)

LFM – Sigla do grupo ‘Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos’; ATCC - *American Type Cell Culture*; Sac⁺-crescimento em sacarose; Hx⁺- crescimento em ácido hexanoico; PHA⁺- acúmulo de PHA; PHA⁻ - ausência de acúmulo de PHA; Amp^S – sensibilidade à ampicilina; Km^S – sensibilidade à canamicina; Tc^S – sensibilidade à tetraciclina; Km^R– resistência à canamicina; Tc^R– resistência à tetraciclina.

4.2 Obtenção de linhagens recombinantes

A construção de linhagens recombinantes de *B. sacchari* selvagem LFM101 e seu mutante LFM344, obtido por radiação ultravioleta e incapaz de acumular PHA (PHA⁻), foi realizada transferindo-se genes da biossíntese de PHA de *Aeromonas* spp. Os métodos utilizados são descritos a seguir.

4.2.1 Manipulação de DNA

Todas as manipulações de DNA foram realizadas segundo protocolos e técnicas de clonagem molecular estabelecidas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989; SAMBROOK; RUSSELL, 2001) ou segundo instruções dos fornecedores do material em uso.

4.2.1.1 Extração e purificação de DNA

As extrações de DNA genômico e plasmidial foram feitas utilizando-se kits apropriados. Alíquotas de 1 a 5 ml de culturas em meio Luria-Bertani (LB) líquido, incubadas aerobiamente por 24 h em 30°C, foram utilizadas para extração de DNA

genômico (*DNeasy Blood & Tissue Kit* - Qiagen) ou para extração de DNA plasmidial (*QIAprep Spin Miniprep Kit* - Qiagen), seguindo em cada caso as instruções do fabricante.

A análise da pureza e concentração das amostras de DNA foi realizada por leitura de absorbância a 260 e 280 nm (espectrofotômetro *NANOVUE Plus*).

Nos casos em que foi necessária a recuperação de bandas específicas derivadas de produtos de *PCR*, utilizou-se um kit de extração de DNA do gel (*QIAquick Gel Extraction Kit* - Qiagen). Produtos de *PCR* foram purificados com o uso do kit apropriado (*QIAquick PCR Purification Kit* - Qiagen).

4.2.1.2 Digestão e ligação com enzimas de restrição

Para as digestões de produtos de *PCR* e plasmídeos foram utilizadas enzimas de restrição da empresa Fermentas. As reações de digestão eram incubadas durante 5-12 h a 37 °C.

Nas ligações, foram preparadas reações com a enzima T4 DNA ligase (Fermentas) e incubadas a 16 °C, *overnight*.

4.2.1.3 Análise de DNA em géis de agarose

Para visualização dos fragmentos de DNA de interesse, foram aplicadas amostras em gel de agarose 0,8%. As corridas eletroforéticas foram realizadas a 90 V por 60 min em tampão TAE 1x.

Composição do tampão TAE:

Tris-Base	0,04 M
Ácido acético glacial	1 M
EDTA – pH 8,0	50 mM

4.2.2 Amplificação e clonagem de genes por *PCR*

A partir das sequências genômicas disponíveis na literatura foram desenhados *primers* para amplificar genes envolvidos na formação de P(3HB-co-3HHx) no gênero *Aeromonas*. Para *Aeromonas sp.* foram utilizados os *primers* reportados por Lu et al.

(2004), consultar Tabela 4.2. Para o desenho dos *primers* para *A. hydrophila*, utilizou-se o programa *FastPCR* (PrimerDigital) e a sequência genômica descrita por (SESHADRI et al., 2006) – APÊNDICE A. Os *primers* desenhados estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- *Primers* utilizados para a amplificação dos diferentes genes de *Aeromonas spp.*

Gene	Primers	Sequência	% GC	T _M (°C)	Fragmento (pb)
<i>phaPCJ_{Asp.}</i>	Forward	5' - <u>tttgtacc</u> TGGAGACCGATGATGAATATGG (local de restrição: <i>KpnI</i>)	45,2	60,9	2716
	Forward	5' - <u>acggaagctt</u> TTAAGGCAGCTTGACCACGG (local de restrição: <i>HindIII</i>)	51,7	64,2	
<i>phaPCJ_{Ah}</i>	Forward	5' - <u>atcgaagctt</u> GCGACCATAGAGCACAGAGGCT (local de restrição: <i>HindIII</i>)	59,1	61,2	3172
	Reverse	5' - <u>tgcgaattc</u> TTTTGGGGCGCACACCATAGC (local de restrição: <i>EcoRI</i>)	57,1	61,0	
<i>phaC_{Ah}</i>	Forward	5' - <u>atgcgtcgac</u> ATGCTCCGTCACGACAGGCT (local de restrição: <i>SalI</i>)	60,0	67,1	1876
	Reverse	5' - <u>tactctaga</u> ACCTCGAAGGGAGGCATGCTC (local de restrição: <i>XbaI</i>)	53,3	64,4	
<i>phaJ_{Ah}</i>	Forward	5' - <u>attagtcgac</u> CATCCCGAGCGAAGGGCTGGA (local de restrição: <i>SalI</i>)	58,1	67,0	588
	Reverse	5' - <u>tgcgaattc</u> TTTTGGGGCGCACACCATAGC (local de restrição: <i>EcoRI</i>)	53,3	64,4	
<i>phaCJ_{Ah}</i>	Forward	5' - <u>atgcgtcgac</u> ATGCTCCGTCACGACAGGCT (local de restrição: <i>SalI</i>)	58,1	67,0	2464
	Reverse	5' - <u>tgcgaattc</u> TTTTGGGGCGCACACCATAGC (local de restrição: <i>EcoRI</i>)	53,3	64,4	
<i>phaPC_{Ah}</i>	Forward	5' - <u>atcgaagctt</u> GCGACCATAGAGCACAGAGGCT (local de restrição: <i>HindIII</i>)	58,1	67,0	2603
	Reverse	5' - <u>tactctaga</u> ACCTCGAAGGGAGGCATGCTC (local de restrição: <i>XbaI</i>)	53,3	64,4	

As letras minúsculas indicam as regiões dos primer não homólogas aos genes de interesse. As sequências sublinhadas mostram o sítio de restrição das enzimas inseridas em cada *primer*.

Os genes clonados foram obtidos a partir da amplificação do DNA genômico de *Aeromonas sp.* (LFM897, isolado disponível no laboratório) e *A. hydrophila* ATCC 7066, os quais foram extraídos conforme descrito acima. A amplificação das sequências de interesse foi realizada pela técnica de *PCR* (Eppendorf - *Mastercycler gradient*) utilizando a DNA polimerase *Phusion High-Fidelity* (Thermo Scientific®). As condições usadas na *PCR* estão descritas na Tabela 4.3.

A qualidade da amplificação foi verificada por aplicação das amostras em gel de agarose, nas condições descritas anteriormente.

Tabela 4.3 – Condições de amplificação dos fragmentos de DNA.

Fragmento de interesse	Desnaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
<i>phaPCJ_{Asp.}</i>	98 °C/ 5 min	30	98 °C/10 s	61 °C/30 s	72 °C/2,5 min
<i>phaPCJ_{Ah}</i>					
<i>phaPC_{Ah}</i>					
<i>phaCJ_{Ah}</i>	98 °C/ 6 min	30	98 °C/30 s	60 °C/45 s	72 °C/2,5 min
<i>phaC_{Ah}</i>					
<i>phaJ_{Ah}</i>					

Para inserção dos fragmentos amplificados no plasmídeo pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995) – ANEXO A -, fizeram-se digestões com enzimas de restrição adequadas, como descreve o item 4.2.1.2. A introdução do vetor portando o fragmento de interesse foi realizada via transformação por choque térmico em *E. coli* XL1 Blue (BULLOCK; FERNANDEZ; SHORT, 1987), conforme explica o item 4.2.3. Os clones selecionados foram avaliados quanto à presença do fragmento de interesse por uma técnica de triagem via *PCR* (*PCR screening*). Neste procedimento, células a serem testadas foram diluídas em água livre de nuclease e submetidas a *PCR* utilizando primers específicos para os genes esperados. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os plasmídeos dos clones que continham o fragmento de interesse foram extraídos e inseridos por transformação para *E. coli* S17-1 (SIMON; PRIEFER; PUHLER, 1983). Os possíveis clones positivos foram submetidos à avaliação por *PCR screening*, assim como descrito anteriormente.

Para construir as linhagens recombinantes de *B. sacchari* foi realizada a conjugação desta linhagem selvagem (LFM101) ou seu mutante PHA⁻ (LFM344) com células de *E. coli* S17-1, contendo o plasmídeo ligado ao gene de interesse (item 4.2.3). Os clones recombinantes assim obtidos foram avaliados por *PCR screening* e coloração de Gram.

4.2.3 Transformação e conjugação

4.2.3.1 Transferência de plasmídeos por transformação - choque térmico

As linhagens *E. coli* XLI Blue contendo o plasmídeo com genes de interesse ou *E. coli* S17-1 foram inoculadas em 25mL de meio LB contendo MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM e incubadas em agitador rotativo a 37 °C até um DO_{650nm} 0,3-0,5. Em tubos estéreis, foram centrifugadas 8 mL da cultura por 15 min, 4000 rpm, 4 °C e o *pellet* foi ressuspensionado com 4 mL de tampão de transformação, as células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Em seguida as células foram ressuspensionadas em 0,8 mL do tampão de transformação e divididas em alíquotas de 200 µL, sendo usadas imediatamente ou mantidas em freezer -80 °C.

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

Clones transformantes foram selecionados em LBK e, no caso de transformações com *E. coli* XL1Blue, IPTG (isopropil-tio-β-D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) também foram adicionados para diferenciar os possíveis recombinantes contendo o inserto de DNA. Esta última técnica citada aproveita a possibilidade da alfa-complementação permitida pela combinação de enzimas do plasmídeo pBBR1MCS-2 e de *E. coli* XL1Blue. Para verificar a viabilidade das células transformadas, estas foram semeadas em LB sólido suplementado com canamicina (50 µg/mL).

Tampão de transformação:

Tris-HCl pH8	10 mM
CaCl ₂	50 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

2.3.2 Transferência de plasmídeos por conjugação

Após seleção das linhagens de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo com os genes de interesse, realizou-se conjugação com *B. sacchari* LFM101 ou LFM344 em meio sólido. Uma cultura de *B. sacchari* em MM com 1 g/L de glicose (MMG1), incubada por 24 h, foi semeada em placa com MMG1 acrescido de canamicina 50 µg/mL (MMG1K). Células de *E. coli* S17-1 contendo os plasmídeos foram semeadas pontualmente, com auxílio de palitos estéreis, contendo meio MMG1K sólido com *B. sacchari*, incubando-se a 30 °C durante 48 h. As colônias de *B. sacchari* recombinantes assim obtidas foram isoladas através de repicagens sucessivas em MMG1K ou MMS1K (MM contendo sacarose 1g/L e canamicina 50 µg/mL), e finalmente, LBK.

4.3 Condições de cultivo para a produção de PHA

4.3.1 Meios de cultura

4.3.1.1 Meios de cultura para cultivos em frascos agitados

Os cultivos foram realizados em Luria Bertani (LB) ou Meio Mineral (MM), cujas composições estão descritas a seguir:

- LB – triptona (10 g/L), extrato de levedura (5g/L), NaCl (5 g/L).
- MM1 (ROCHA et al., 2008) - Na₂HPO₄ (3,5 g/L); KH₂PO₄ (1,5 g/L); (NH₄)₂SO₄ (1,0 g/L); MgSO₄ · 7H₂O Sol. 20% (1 mL/L); CaCl₂ · 2H₂O Sol. 1% (1,0 mL/L); Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% (1,0 mL/L); Solução de elementos traços (1,0 mL/L). A solução de elementos traços continha: H₃BO₃ (0,30 g/L); CoCl₂ · 6H₂O (0,20 g/L); ZnSO₄ · 7H₂O (0,10 g/L); MnCl₂ · 4H₂O (0,03 g/L); NaMoO₄ · 2H₂O (0,03 g/L); NiCl₂ · 6H₂O (0,02 g/L); CuSO₄ · 5H₂O (0,01 g/L). Fonte de carbono: glicose (10 g/L).

Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de ágar (15-20 g/L) à composição dos meios líquidos acima citados. O antibiótico canamicina (50 µg/mL) foi utilizado para a seleção de clones e cultivo das linhagens recombinantes.

Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 min a 121 °C, exceto aquelas de antibiótico esterilizadas por filtração.

4.3.1.2 Meio de cultura para cultivos em biorreator

Para ensaios em biorreator foi utilizado Meio Mineral com formulação específica, mostrada abaixo:

- MM2 (limitação em nitrogênio) (ROCHA et al., 2008) - KH_2PO_4 0,3876 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2,907 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,31 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,00184 g/L; Citrato Férrico Amoniacal 0,00588 g/L; NaCl 1 g/L; Glicose 10,8 g/L; Solução de elementos traços 2,0mL/L, com formulação idêntica a acima citada.
- MM3 (limitação em fósforo) (TACIRO, 2008) - KH_2PO_4 0,203 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5,467 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,310 g/L; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,002 g/L; Citrato Férrico Amoniacal 0,006 g/L; NaCl 1 g/L; Glicose 15,0 g/L; Solução de elementos traços 2,0 mL/L, com formulação idêntica a acima citada.

4.3.1.3 Formulação de meios de cultura para *B. sacchari* em frascos agitados e biorreator

Foram testados meios de cultura para avaliar o comportamento da fase exponencial do crescimento de *B. sacchari*. Para tanto, testaram-se as formulações apresentadas na Tabela 4.4, em dois blocos de experimentos.

Tabela 4.4 – Formulação teste de meios de cultura para frascos agitados para *B. sacchari*.

Reagente/ [] g/L	MM1 controle	Fe (g/L)			Mg (g/L)			Ca (g/L)	
Citr.FeNH ₄	0,06	0,006	0,012	0,12	0,0600	0,060	0,060	0,060	0,06
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,02	0,020	0,020	0,02	0,3105	0,621	0,020	0,020	0,02
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,01	0,010	0,010	0,01	0,0100	0,010	0,002	0,004	0,02

Aqui estão apresentados somente os reagentes que tiveram suas concentrações modificadas. Dados em preto mostram as diferentes concentrações em que o elemento foi usado naquela formulação. Em todos os cultivos as concentrações dos demais reagentes eram sempre aquelas do Meio Mineral (MM1) controle: Na_2HPO_4 (3,5 g/L); KH_2PO_4 (1,5 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0g/L); Solução de elementos traços (1 mL/L), formulação desta última citada anteriormente (ROCHA et al., 2008).

Baseando-se nos dados obtidos nos testes com meios de cultivo supracitados e no em experimentos realizados com MM (2 e 3) em biorreator, foi desenhada uma nova formulação de meio de cultura para biorreator (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 – Formulação de meio de cultura para biorreator para *B. sacchari*, baseada em meio de cultura teste para frascos agitados.

Reagentes	Quantidade (2 L)	Concentração final (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,814 g	2,9070
KH ₂ PO ₄	0,775 g	0,3875
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,621 g	0,3105
CaCl ₂ .2H ₂ O (sol. 10 g/L)	4 mL	0,0100
Citr. Fe NH ₄ (sol. 60 g/L)	2 mL	0,0600
Elementos traços	4 mL	-
NaCl	2 g	1
Glicose	30 g	15

Composição da solução de elementos traço citada anteriormente MM1(ROCHA et al., 2008).

4.3.2 Experimentos em frascos agitados

4.3.2.1 Experimentos com linhagens recombinantes de *B. sacchari* expressando genes *phaPCJ_{Asp}*, ou *phaC_{Ah}* ou *phaJ_{Ah}* ou *phaCJ_{Ah}* ou *phaPC_{Ah}*

As linhagens recombinantes de *B. sacchari* obtidas neste trabalho foram cultivadas de maneira padrão, em que inicialmente meio LB foi inoculado e incubado a 30 °C, 150 rpm durante 24 h. Ao MM1 (ROCHA et al., 2008), contendo nitrogênio em concentração limitada e glicose a 10 g/L, condição propícia ao acúmulo de PHA, inoculou-se um volume do cultivo em LB correspondente a 10% do volume total de MM. Estas culturas foram incubadas a 30 °C, sob agitação de 150 rpm durante 24 h. Após esse período foi adicionado ácido hexanoico a uma concentração final de 1 g/L. Para verificar se a concentração de ácido hexanoico influenciaria o teor de 3HHx acumulado, foram realizados experimentos com concentrações desse ácido orgânico variando entre 0,5 e 1,5 g/L. Foram testados também os ácidos butírico, valérico, heptanoico, octanoico, oleico e linoleico e láurico, todos à concentração de 1 g/L (Figura 4.1).

Figura 4.1- Esquema geral de cultivo de PHA em meio mineral (MM1) com glicose e ácidos orgânicos (MMG+A)

Foram retiradas amostras no tempo inicial e nas 24 e 72 h de cultivo para análises posteriores (determinação de pH, biomassa, glicose, ácido hexanoico e PHA). Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicata.

4.3.2.2 Experimentos com *B. sacchari* selvagem para teste de meios de cultivo

B. sacchari selvagem foi cultivada para testar meios de cultura, com o objetivo de avaliar a fase exponencial de crescimento deste micro-organismo. Os cultivos foram realizados de maneira padrão em meios líquidos: LB e MM1 controle (ROCHA et al., 2008) e MM teste. LB foi inoculado e incubado 24 h, 30 °C e 150 rpm. Ao MM, com formulação teste (Tabela 4.4), contendo nitrogênio em concentração limitada e glicose 10 g/L, foram inoculados um volume, o qual correspondeu a 10% do volume final, da cultura proveniente de LB lavada com solução salina 0,85%. Foram tomadas amostras a cada hora, durante cerca de 24 h, e medida a densidade óptica (DO_{600nm}). Ao final do cultivo os ensaios eram submetidos a teste de pureza.

4.3.2.3 Cultivos para obtenção de polímeros padrão para análise de propriedades

Foram realizados ensaios com diferentes linhagens para obtenção de polímeros padrão para analisar as propriedades dos polímeros de interesse. Os cultivos foram

realizados em 4 blocos. Cada bloco de cultivo continha um volume total de 1600 mL de cultura, distribuídos em 4 erlenmeyeres de 2000 mL, cada qual contendo 400 mL de meio MM1 (ROCHA et al., 2008).

Culturas preparadas em LB, incubadas a 30 °C, a 150 rpm por 24 h, foram inoculadas em MM1 (10% do volume total final). Dependendo da linhagem cultivada, foram fornecidas diferentes fontes de carbono de maneira diferenciada. No cultivo para produção de P(3HB), *B. sacchari* selvagem (LFM101) foi suprida de glicose a 10 g/L, incubando-se a 30 °C, 150 rpm durante 72 h. Para obtenção de P(3HB-co-3HHx), *B. sacchari* selvagem foi cultivada com glicose a 10 g/L, após 24 h a cultura recebeu ácido hexanoico a 1 g/L, permanecendo incubada por mais 48 h. O homopolímero P(3HHx) foi obtido cultivando-se *Pseudomonas* sp. (LFM046) suprida de ácido hexanoico 1,16 g/L (a cada 24 h) por 72 h, sob agitação e temperatura igual aquelas dos ensaios anteriores. E, finalmente, para obtenção de P(3HB-co-3HHx), padrão com alto teor de 3HHx, cultivou-se linhagem de *Aeromonas* sp. (LFM836) com óleo de soja 9 g/L, incubando-se sob as mesmas condições dos demais. Os cultivos foram centrifugados, liofilizados, e posteriormente submetidos à extração de polímero conforme descrito ao longo do texto.

4.3.3 Cultivos em biorreator

Linhagens selvagem e recombinante de *B. sacchari* foram cultivadas em biorreator em meios de cultura com limitação em fósforo ou nitrogênio. Para os cultivos em biorreator com as linhagens selvagem e recombinante de *B. sacchari*, fez-se um pré-inóculo em meio LB ou LBK por 24 h e inóculo MM1 (ROCHA et al., 2008), contendo glicose (6 g/L) e (NH₄)₂SO₄ (3 g/L), para minimizar a possibilidade de acúmulo. Os inóculos foram incubados por 24 h, 30 °C e sob agitação de 150 rpm. Um volume desta cultura, correspondente a 10% do volume final, foi utilizado para inocular 2 L de MM2 (ROCHA et al., 2008), MM3 (TACIRO, 2008) ou MM teste em biorreator *Biostat* (*BBraun – Biotech International*) com capacidade para 4 L. O cultivo é dividido em etapas de crescimento, em que glicose é fornecida a 15 g/L, e acúmulo, em que o cultivo é alimentado com solução de glicose e do ácido hexanoico. Foram determinados periodicamente: pH, biomassa, teor e composição de polímero, carboidratos, ácidos orgânicos, nitrogênio e O₂ consumido, e CO₂ formado.

4.3.3.1 Cultivos em biorreator utilizando *B. sacchari* selvagem

Em MM2 com limitação em nitrogênio foram testados dois procedimentos. No primeiro, durante a fase de crescimento, glicose foi suprida na concentração de 10 g/L e, durante a fase de acúmulo, foram realizadas quatro alimentações a cada 4 horas com solução contendo glicose e ácido hexanoico. A concentração das soluções de alimentação era: glicose 140 g/L (2,8 g/L no biorreator) e ácido hexanoico 45 g/L (0,9 g/L no biorreator). No segundo cultivo, durante a fase de crescimento, glicose foi mantida a 3 g/L e, no acúmulo, ácido hexanoico foi mantido na concentração de 0,2 g/L, sob alimentação constante, via controle de pH, com solução contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L). Para ambos os ensaios, durante as amostragens foram aferidos pH, biomassa, teor e composição de polímero.

Em MM3 com limitação em fósforo foram realizados dois experimentos. No primeiro, para verificar a velocidade de consumo de ácido hexanoico, na fase de acúmulo, foram fornecidas quatro diferentes concentrações deste ácido, entre 0,25 e 1,5 g/L, em presença de glicose (10-15 g/L). Calcularam-se as velocidades específicas de consumo de cada substrato e, a partir disto, uma vazão de alimentação específica. Já no segundo experimento, na fase de acúmulo o cultivo foi alimentado, utilizando-se a vazão calculada, com uma solução de glicose a 140 g/L e ácido hexanoico a 45 g/L.

4.3.3.2 Cultivos em biorreator com linhagem recombinante de *B. sacchari* abrigando o gene *phaPCJ*_{Asp}.

A linhagem recombinante de *B. sacchari* contendo o gene *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. obtida neste trabalho foi cultivada em MM3 com limitação em fósforo. O cultivo foi realizado conforme descrito previamente no item (4.3.3). No acúmulo, iniciou-se alimentação por vazão constante de solução de glicose a 140 g/L e ácido hexanoico a 45 g/L.

4.3.3.3 Cultivos em biorreator utilizando meio mineral teste para *B. sacchari* selvagem

Com a finalidade de ajustar a fase exponencial de crescimento de *B. sacchari*, foi realizado cultivo em biorreator, conduzido conforme explicado no item 4.3.3. Para isto, utilizou-se MM teste, com limitação em nitrogênio, como descrito na Tabela 4.5. Neste experimento, durante a fase de crescimento supriu-se glicose a 15 g/L. Na fase de acúmulo o cultivo foi alimentado com solução de glicose a 140 g/L e ácido hexanoico a 45 g/L. Foram tomadas amostras como citado anteriormente.

4.3.3.4 Cultivos em biorreator utilizando meio mineral teste com *B. sacchari* recombinante

Foi realizado um conjunto de cinco cultivos em biorreator utilizando a linhagem recombinante de *B. sacchari* contendo o operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. Foi utilizado MM teste com limitação em nitrogênio. O experimento foi conduzido conforme explicado previamente (item 4.3.3). Durante a fase de crescimento, supriu-se glicose a 15 g/L e na fase de acúmulo, os cultivos foram alimentados com solução contendo glicose a 140 g/L e ácido hexanoico entre 0 e 45 g/L.

A Tabela 4.6 resume os experimentos realizados em biorreator e o fim para o qual cada um deles foi utilizado.

4.4 Busca de genes da β -oxidação de ácidos graxos no genoma de *B. sacchari*

Para realizar a busca de genes da β -oxidação de ácidos graxos no genoma sequenciado de *B. sacchari* foi utilizada a plataforma de livre acesso RAST (*Rapid Annotation using System Technology*) (AZIZ et al., 2008) e dados da literatura.

Tabela 4.6 – Resumo dos experimentos em biorreator realizados neste trabalho e a finalidade para a qual cada um deles foi utilizado.

Experimento	Micro-organismo	Alimentação na fase de acúmulo		Meio de cultura/ Nutriente limitado	Finalidade do experimento			
		Glicose (g/L)	Ác. hexanoico (g/L)		Acúmulo de PHA	Análise de fluxos	Consumo de substratos	Modulação da composição do PHA
B00	<i>B. sacchari</i> selvagem LFM101	140	45	MM2/N	X			
B01	<i>B. sacchari</i> selvagem LFM101	140	45	MM2/N	X			
B02	<i>B. sacchari</i> selvagem LFM101	15 a 10	0,25 a 1,5	MM3/P			X	
B03	<i>B. sacchari</i> selvagem LFM101	140	45	MM3/P	X	X		
B04	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	45	MM3/P	X			
B05	<i>B. sacchari</i> selvagem LFM101	140	45	MMRef./N			X	
B06	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	45	MMRef./N	X	X		X
B07	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	33	MMRef./N	X	X		X
B08	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	22	MMRef./N	X	X		X
B09	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	11	MMRef./N	X	X		X
B10	<i>B. sacchari</i> + <i>phaPCJ_{Asp.}</i> LFM1034	140	0	MMRef./N	X	X		X

MM2(ROCHA et al., 2008);

MM3(TACIRO, 2008);

MMRef. - MM reformulado neste trabalho;

N – limitação em nitrogênio;

P – limitação em fósforo.

4.5 Extração e purificação de polímeros

Cultura proveniente de ensaio de acúmulo de polímero foi centrifugada em equipamento Sorvall® (*Biofuge PrimoR*) a 6000 rpm, durante 20 min a 4 °C. O *pellet* foi liofilizado e submetido à extração. A extração de PHA foi realizada utilizando-se extrator Soxhlet, em que se faz refluxo com clorofórmio em cartucho de papel, preenchido com células liofilizadas e inserido no sistema. Uma massa de células liofilizadas foi pesada e transferida para o cartucho, sendo utilizados 150 mL de clorofórmio sob aquecimento (80 °C), mantendo fluxo por 12 h para a extração. Decorrido este tempo, a mistura obtida foi concentrada em rotavapor e o polímero nela presente foi precipitado em 10 partes de éter de petróleo. Após a decantação do polímero, foi retirado o excesso de éter com auxílio de uma micropipeta e o restante da mistura ficou em descanso até a secagem, pela evaporação completa do solvente.

Para purificação dos polímeros, estes foram solubilizados, após serem precipitados e secos, em quantidade suficiente de clorofórmio. A mistura foi precipitada em éter de petróleo, como descrito anteriormente, e seca. A solubilização e precipitação foram repetidas aproximadamente cinco vezes, até que o polímero aparentasse coloração uniforme.

Foi determinada a composição do PHA extraído por cromatografia gasosa.

4.6 Análise de fluxos metabólicos

A análise de fluxos metabólicos foi baseada no procedimento proposto por Stephanopoulos, Aristidou e Nielsen (1998). De ensaios realizados em biorreator, obtiveram-se dados de concentração de biomassa total, PHA e fontes de carbono consumidas, ou ainda do teor de O₂ e CO₂, consumido ou produzido, respectivamente.

Para análise de fluxos metabólicos, foi desenhada uma rede metabólica em que se consideravam os substratos supridos (glicose, ácido hexanoico e O₂) e os produtos formados [P(3HB-*co*-3HHx) e CO₂]. A rede metabólica incluía vias de metabolismo reconhecidas como presentes em *Burkholderia* spp. (Entner-Doudoroff, Via das Pentoses, Ciclo de Krebs, β -oxidação de ácidos graxos e biossíntese de PHA). Os *softwares* Metatool (PFEIFFER et al., 1999) e o Matlab (versão 7.6.0) foram utilizados para processar a rede metabólica e determinar os possíveis modos elementares. Levando-se em conta as

velocidades de consumo de substratos e formação de produtos dos intervalos analisados em cada experimento, foi selecionado o modo elementar ou conjunto daqueles mais apropriado. A distribuição de fluxos apresentada pelo modo elementar escolhido foi considerada como representativa do metabolismo bacteriano, naquelas condições experimentais.

4.7 Metodologias analíticas

Carboidratos: A concentração de glicose foi determinada por cromatografia líquida (HPLC). Um volume de 10 μL foi injetado em aparelho Dionex[®] (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) equipado com coluna de separação de açúcares (Aminex-HPX-87H). Para detecção, um refratômetro diferencial (Shodex IR-101) foi usado. A separação ocorreu a 45 °C com solução de H_2SO_4 (5 mmol/L) com baixa vazão (0,6 mL/min). A curva padrão foi construída utilizando soluções contendo até 3 g/L de carboidrato.

Ácidos orgânicos: A concentração de ácidos orgânicos foi determinada por cromatografia gasosa (CG) após acidificação da amostra (800 μL) com 200 μL de solução contendo HCl (0,2 mol/L) e ácido butírico ou ácido acético (4,8 g/L). Os ácidos orgânicos foram analisados em aparelho Agilent 7890A equipado com uma coluna capilar FFAP, após *split* das amostras (1:5). Hélio (3,0 mL/min) foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e detector (FID) foi 250 °C e 300 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi mantida a 130°C durante os primeiros 5 min. Então, a temperatura foi aumentada à razão de 10 °C/min até a temperatura final de 185 °C, a qual permaneceu por 1 min.

Nitrogênio amoniacal: A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada utilizando um eletrodo de íons (Orion 9512HPBNWP) e um potenciômetro (Thermo Scientific, Orion 4 Star, pH-ISE Benchtop, Singapore). Após alcalinização da amostra (3 ml) com solução de NaOH a 10 M (30 μL), há liberação de NH_4 gasoso, devido ao desequilíbrio provocado pelo aumento do pH. O gás liberado permeia a membrana presente no eletrodo e é detectado, gerando uma leitura em mV (por diferença de potencial). A curva padrão foi feita usando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo até 0,5 g/L de nitrogênio.

Massa seca celular (MSC): A biomassa foi determinada por gravimetria, centrifugando-se 10 mL do cultivo (10600 x g, 10 min, 4 °C), suspendendo-se em água e filtrando-se em membranas de poro 0,45 µm (Millipore). A membrana junto com as células foi seca a 105 °C, até massa constante, e pesada, determinando-se a MSC por meio da seguinte equação:

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

Em que:

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

MM = massa da membrana (g)

UM = umidade média do lote de membrana (g)

VOL = volume de cultura centrifugado e filtrado (mL)

Quantidade e composição de PHA: A quantidade e composição de PHA foram determinadas por cromatografia gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzoico (40 mg/mL) em propanol. Os tubos foram mantidos em banho de água a 100 °C por 3 h. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram resfriados e, separaram-se a fase aquosa da fase orgânica, utilizando-se água destilada. A fase aquosa foi retirada e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase orgânica, contendo os propil-ésteres. A mistura resultante foi transferida para frascos de cromatografia. O volume de 1 µL de amostra foi analisado após fracionamento (*split* 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95% dimetil-polisiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 320 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

Gás de arraste: Hélio (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 minutos (6 °C/min), elevação da temperatura até 180 °C por 5 min (6 °C/min) e até 240 °C por 1 min.

Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P(3HB) e P(3HB-co-3HV) (Aldrich Chem. CO) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos monômeros presentes, que poderiam ser os seguintes: 3HB (3-hidroxibutirato), 3HV (3-hidroxivalerato), 3HHx (3-hidroxihexanoato), 3HHp (3-hidroxiheptanoato), 3HO (3-hidroxi octanoato), 3HN (3-hidroxinonanoato), 3HD (3-hidroxidecanoato) e 3HDD (3-hidroxidodecanoato).

Medidas de CO₂ e O₂ de cultivos em biorreator: As pressões parciais de CO₂ e O₂ no gás de saída do biorreator foram determinadas usando sensores de gases. O princípio da medida de CO₂ e O₂ foi o infravermelho (comprimento de onda duplo) e ZnO₂, respectivamente.

Determinação do peso molecular: amostras de polímeros foram analisadas em cromatógrafo de permeação em gel (GPC) Waters[®], composto de degasser (Viscotek[®] VE 7510), bomba (Mod.1515), injetor (Mod.717 plus Autosampler), detector de índice de refração (Waters[®] - Mod. 2414), acoplados a um duo detector (TDA 302 - Viscotek[®]). As colunas de GPC (Phenomenex[®]) tinham diâmetros na faixa de 500 a 10⁴ Å. Foi utilizada curva de calibração com padrão de poliestireno solubilizado em clorofórmio.

Calorimetria exploratória diferencial (DSC): os dados desta análise foram obtidos em equipamento TA Instruments DSC-2910, calibrado com indium. Cerca de 8 a 12 mg de amostra foram encapsuladas em placas de alumínio hermeticamente fechadas e aquecidas à temperatura de 120 a 190 °C, a uma razão de aquecimento de 10 °C por min.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção e avaliação da capacidade de acúmulo de linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* abrigando genes de *Aeromonas*

Em trabalhos anteriormente realizados, *B. sacchari* mostrou-se capaz de acumular alguns copolímeros quando testada frente a trinta fontes de carbono como cosubstrato. Ao se oferecer glicose e ácido hexanoico, esta bactéria foi capaz de acumular o copolímero P(3HB-co-3HHx), com frações bastante reduzidas do monômero 3HHx. Para avaliar o potencial de *B. sacchari* produzir este copolímero, cujo interesse para algumas aplicações está bem descrito na literatura, foi realizado um conjunto de experimentos que combinavam várias concentrações de glicose (5 a 15 g/L) e ácido hexanoico (0 a 2,0 g/L). Os resultados obtidos mostraram que o maior teor de acúmulo de unidades 3HHx por este micro-organismo, nas condições testadas, foi de 2 mol%. Entretanto, para se obter copolímeros com propriedades adequadas para aplicações médicas e industriais, estes devem conter maiores quantidades de 3HHx. Os dados obtidos a partir dos experimentos acima descritos resultaram em uma publicação no Journal of Applied Microbiology (DOI: 10.1111/jam.12406) (ANEXO B).

Outra estratégia empregada na tentativa de se acumular copolímeros com teores maiores e variados de 3HHx, foi o cultivo em microrreator, no qual foi possível testar várias condições de suprimento de carbono ao mesmo tempo. Neste caso, *B. sacchari* foi cultivada oferecendo-se diferentes combinações de soluções de alimentação, contendo ácido hexanoico, para uma concentração final fixa de 0,23 g/L, e variadas concentrações de glicose (0 a 1,05 g/L – concentração final). A composição mais promissora para o acúmulo de 3HHx por *B. sacchari* foi aquela que continha glicose a 0,35 g/L e ácido hexanoico 0,23 g/L, a qual levou à biossíntese de PHA contendo 2,40 mol% de 3HHx. Este trabalho foi realizado em colaboração com o Programa Ibero-americano de Ciencia e Tecnologia para el Desarrollo (CYTED) e permitiu a publicação de um capítulo no livro Bioplásticos (ISBN-10: 84-15413-30-0/ ISBN-13: 978-84-15413-30-1), que compila o trabalho de todos os que participaram de colaborações promovidas por esta rede entre os anos de 2011 e 2013 (ANEXO B).

Diante dos resultados obtidos com as estratégias utilizadas, foi concluído que o fator limitante para a síntese de copolímeros com maiores teores de 3HHx por *B. sacchari*

seria a especificidade de sua PHA sintase por monômeros de cadeia média, que parece ser baixa. É do conhecimento científico, na área de estudo de polihidroxialcanoatos, que bactérias do gênero *Aeromonas* têm PHA sintases com alta especificidade pelos monômeros alvo deste estudo, sendo capaz de acumular até 25 mol% de 3HHx. Diante do exposto, optou-se por construir linhagens recombinantes que abrigassem os genes para a biossíntese de PHA de *Aeromonas* spp. Assim, o presente trabalho foi delineado como estratégia para a síntese de copolímeros P(3HB-co-3HHx) com as quantidades desejáveis daqueles monômeros com 6 carbonos. Além disso, foi realizada a análise de fluxos metabólicos em cultivos de acúmulo deste copolímero pelas linhagens construídas.

5.1.1 Amplificação e clonagem de genes

A primeira etapa do trabalho consistiu-se em desenhar *primers* para o sítio de síntese de PHA (operon *phaPCJ*) de *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), englobando o promotor original desta bactéria. Han et al. (2004) testaram a influência da presença do promotor original no vetor e indicaram que a expressão dos genes é mais significativa quando sob o controle deste do que do promotor *lac*.

Foram desenhados *primers* para algumas combinações de genes do operon *phaPCJ_{Ah}*: *phaPC_{Ah}* (contendo promotor), *phaCJ_{Ah}*, *phaC_{Ah}* e *phaJ_{Ah}*. Aos pares de *primers* selecionados foram adicionados sítios adequados de enzimas de restrição, ou seja, as quais não cortassem o DNA de interesse em fragmentos e que permitissem a inserção dos genes na orientação de transcrição do promotor *lac* presente no vetor utilizado. Foram selecionadas duas enzimas diferentes e não complementares, para evitar a recircularização do vetor quando das reações de digestão/ligação. A determinação da temperatura de anelamento para estes *primers* foi realizada testando-se gradiente de temperatura na PCR e posterior avaliação dos resultados em gel de agarose.

Para linhagens de *Aeromonas* sp. existentes no laboratório, isoladas por Matsuda, (2009), foram utilizados *primers* para o operon *pha* de *Aeromonas caviae* desenhados por Lu et al. (2004). De um total de 12 isolados testados, somente para a linhagem identificada como LFM897 foi amplificado fragmento de 2700 pb, que segundo Lu et al. (2004) corresponde ao tamanho do operon *phaPCJ* de *A. caviae*. O fragmento de 2,7 Kb foi purificado do gel de agarose para dar continuidade ao processo de clonagem. A Figura 5.1

mostra o perfil de migração em eletroforese dos fragmentos amplificados utilizando os *primers* acima mencionados.

Figura 5.1- Perfil de migração em gel de agarose de fragmentos amplificados a partir dos *primers* de *Aeromonas* sp. LFM897 e *A. hydrophila*. **1-** produto de PCR *phaPCJ_{Asp}*; **2-** produto de PCR *phaPCJ_{Ah}*; **3** - produto de PCR *phaPC_{Ah}*; **4** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}*; **5** - produto de PCR *phaC_{Ah}*; **6-** produto de PCR *phaJ_{Ah}*.

Observando a Figura 5.1 verifica-se que a banda presente no gel, entre 2000 pb e 3000 pb, corresponde ao tamanho do operon de *Aeromonas* sp. LFM897 (aproximadamente 2716 pb). Pode-se verificar também, ainda na Figura 5.1, que fragmento correspondente ao operon *phaPCJ* de *A. hydrophila* está localizado pouco acima da banda 3000 pb do marcador usado, assim como o *phaC* está compreendido entre 1500 pb e 2000 pb e, segundo a sequência disponível na literatura (SESHADRI et al., 2006) este gene possui 1876 pb. O mesmo se verifica para os genes restantes: *phaJ* (588 pb) está entre 500 pb e 700 bp, *phaCJ* (2464 pb) e *phaPC* (2603) estão entre 2000 pb e 3000 pb, compatível com a obtenção dos fragmentos desejados.

Uma vez obtidos os fragmentos de DNA de interesse, processou-se a ligação destes ao vetor pBBR1MCS-2, conforme descrito em Material e Métodos no item 4.2.1.2. A razão inserto:vetor foi inicialmente 1:1 e, posteriormente, devido a resultados negativos,

na etapa seguinte, optou-se por usar 3:1. O aumento da quantidade de inserto favoreceu a ligação ao vetor, possibilitando a clonagem dos plasmídeos contendo os genes alvo.

Os plasmídeos construídos, contendo um gene ou grupo de genes de interesse foram, primeiramente, clonados em *E. coli* XL1-Blue, conforme explicado no item 4.2.3.1 de Material e Métodos, e selecionados pela complementação da β -galactosidase, além da seleção por resistência à canamicina promovida pelo vetor. Clones considerados positivos pelo teste visual foram submetidos a uma triagem por PCR, aqui denominada “PCR *screening*”, seguida de corrida em gel de agarose, para selecionar clones que continham o gene de interesse.

Os clones de *E. coli* XL1-Blue selecionados pela *PCR screening* tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos usando as respectivas enzimas de restrição. Estes plasmídeos extraídos apresentaram, para uma digestão dupla, duas bandas em gel de agarose: vetor vazio e gene.

Após seleção dos clones de *E. coli* XL1-Blue, realizou-se a transformação dos seus respectivos plasmídeos, portando os genes de interesse, para *E. coli* S17-1, conforme descrito no item 4.2.3.2 de Material e Métodos. *E. coli* S17-1 contém em seu cromossomo genes que permitem a transferência de plasmídeos mobilizáveis por conjugação (SIMON; PRIEFER; PUHLER, 1983), podendo, assim, transferir os vetores abrigando os fragmentos de DNA para linhagens de *B. sacchari*.

Os clones positivos da transformação de *E. coli* S17-1 foram selecionados, primeiramente, quanto à resistência à canamicina oriunda do plasmídeo e *PCR screening*, seguida de corrida em gel de agarose. Posteriormente, os clones identificados quanto à presença da construção de interesse, tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos com as respectivas enzimas de restrição. A Figura 5.2 mostra os fragmentos obtidos após o este processo, confirmando a obtenção dos clones.

A amplificação do operon *phaPCJ* de *A. hydrophila* foi realizada eficientemente, entretanto, após várias tentativas não foi possível obter clones positivos contendo este fragmento. Foram realizadas várias reações de ligação, com diferentes razões vetor: inserto e tempos de reação, contudo sem sucesso. Para este inserto foram escolhidas duas enzimas de restrição, a *EcoRI* e *HindIII*, que estavam muito próximas no local de restrição múltipla do vetor, o que, provavelmente, dificultou a digestão eficiente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Uma alternativa para a obtenção desse operon clonado no vetor seria digerir o vetor utilizando um sítio de restrição que deixe extremidade abrupta, por exemplo utilizando

EcoRV. O próximo passo seria digeri-lo com *EcoRI* e *HindIII* para ligar o inserto no vetor, pois o sítio *EcoRV* está entre os sítios *EcoRI* e *HindIII* no pBBR1MCS-2, isto faria com que eles se afastassem e pudessem ser digeridos. Outra estratégia a ser considerada seria uma reação de desfosforilação do vetor, de forma a evitar a sua recirculação e assim promover a sua ligação com o inserto (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Neste caso da construção do recombinante contendo operon completo de *A. hydrophila*, em que foi incluído o promotor original, apesar das tentativas não se obteve sucesso.

Figura 5.2– Perfil de migração em gel de agarose 0,8% para os clones de *E. coli* S17-1 abrigando genes de interesse. **1** - pBBR1MCS-2 digerido com *XbaI*; **2** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp}* digerido com *KpnI* e *HindIII*; **3** -pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* digerido com *KpnI* e *HindIII*; **4** – produto de PCR *phaPC_{Ah}* digerido com *HindIII* e *XbaI*; **5** - pBBR1MCS-2::*phaPC_{Ah}* digerido com *HindIII* e *XbaI*; **6** - produto de PCR *phaCJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **7**- pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **8** - produto de PCR *phaC_{Ah}* digerido com *SalI* e *XbaI*; **9** - pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* digerido com *SalI* e *XbaI*; **10** -produto de PCR *phaJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*; **11**- pBBR1MCS-2::*phaJ_{Ah}* digerido com *SalI* e *EcoRI*.

5.1.2 Obtenção de linhagens recombinantes abrigando genes de *Aeromonas hydrophila* ou *Aeromonas sp.*

A construção de linhagens recombinantes contendo genes de *Aeromonas* foi realizada em *B. sacchari* selvagem LFM101 e seu mutante LFM344, obtido por radiação ultravioleta e incapaz de acumular PHA (PHA⁻) (FILIPOV, 2000). Testes de complementação heteróloga deste mutante, utilizando genes do operon de síntese de PHA de *R. eutropha* (*phaCAB*), indicaram que a presença apenas do gene *phaC* (codificador da PHA sintase) é suficiente para restabelecer a capacidade de LFM344 sintetizar polímero. (dados não publicados).

Uma vez obtidos os clones de *E. coli* S17-1, foi realizada a conjugação destes com a linhagem mutante (PHA⁻) de *B. sacchari* LFM 344 para os vetores contendo os genes *phaPCJ_{Asp.}*, *phaPC_{Ah.}*, *phaCJ_{Ah.}*, *phaC_{Ah.}*. *B. sacchari* LFM 344 sendo mutada no gene *phaC* (codificador da PHA sintase), é uma linhagem adequada para inserção de grupos de genes como os acima citados, uma vez que a presença de duas PHA sintases com diferentes especificidades no micro-organismo promoveria a formação de cadeias poliméricas de PHA com composições diferentes, o que não seria interessante do ponto de vista deste estudo. O gene *phaJ_{Ah.}* foi clonado em *B. sacchari* LFM101 e não na linhagem mutante, uma vez que estando, provavelmente, afetada na PHA sintase, a ausência desta enzima no recombinante construído, não resultaria no acúmulo de polímero.

O isolamento de colônias recombinantes de *B. sacchari* foi realizado em placas de MM com sacarose e canamicina e posteriormente em meio LB sólido com canamicina, além de coloração de Gram. Os clones obtidos foram confirmados através de PCR *screening* e tiveram seus plasmídeos extraídos e digeridos, seguido de corrida em eletroforese. Na Figura 5.3 estão apresentados os resultados obtidos para os recombinantes de *B. sacchari* selecionados.

Figura 5.3- Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de PCR *screening* de clones recombinantes de *B. sacchari*. **1** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp.}*; **2** - produto de PCR *phaPCJ_{Asp.}* clone; **3** - produto de PCR *phaPC_{Ah.}*; **4** - produto de PCR *phaPC_{Ah.}* clone; **5** - produto de PCR *phaCJ_{Ah.}*; **6** - produto de PCR *phaCJ_{Ah.}* clone; **7** - produto de PCR *phaC_{Ah.}*; **8** - produto de PCR *phaC_{Ah.}* clone; **9** - produto de PCR *phaJ_{Ah.}*; **10** - produto de PCR *phaJ_{Ah.}* clone.

A partir da análise da Figura 5.3, pode-se confirmar a presença de genes de interesse nos clones obtidos para as linhagens de *B. sacchari* LFM101 e LFM344. Além disso, foi realizado o sequenciamento dos genes *phaPC* e *phaCJ* de *A. hydrophila* para confirmar se a clonagem foi conseguida sem maiores alterações. Entretanto, este sequenciamento apenas permite obter parte do gene, até cerca de 800 pb no sentido *forward* e no sentido *reverse*. Contudo, as sequências obtidas foram complementares às disponíveis na literatura (SESHADRI et al., 2006), como se pode verificar no APÊNDICE B.

O operon *phaPCJ_{Asp}* utilizado na construção da linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) foi sequenciado e alinhado com o operon *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila*, mostrando alta similaridade entre ambas as sequências. Lu et al. (2004) reportaram similaridade de mais de 90% entre sequências de operons de *Aeromonas* spp. (APÊNDICE C).

5.1.3 Avaliação da capacidade de acúmulo das linhagens recombinantes construídas

5.1.3.1 Ensaios de acúmulo com linhagens recombinantes utilizando glicose e ácido hexanoico

A escolha de genes de linhagens do gênero *Aeromonas* se justifica pela capacidade deste micro-organismo acumular o copolímero P(3HB-co-3HHx) com altos teores do monômero 3HHx (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; FUKUI; DOI; 1998; LU; WU; CHEN, 2004) Isto quer dizer que a PHA sintase (*phaC*) deste micro-organismo tem especificidade por monômeros de cadeia média (3HHx) e de cadeia curta (3HB). NUMATA et al., 2012). Além disso, o gene *phaJ*, que codifica para uma enoil-CoA hidratase (*R*)-específica, drena intermediários da β -oxidação para a síntese de PHA. Nesse caso, a enzima por ele codificada realizaria a conversão do *trans*-2-enoil-CoA (*trans*-2-hexenoil-CoA, quando for utilizado ácido hexanoico), produzido como intermediário da β -oxidação, ao (*R*)-3-hidroxiacil-CoA [(*R*)-3-hidroxihexanoil-CoA] para a síntese de 3HHx.

As construções de recombinantes obtidas estão descritas a seguir, juntamente com a identificação de controle recebida: LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034); LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPC_{Ah}* (LFM1038); LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037); LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* (LFM1035); LFM101 pBBR1MCS-2::*phaJ_{Ah}* (LFM1036). Mapas dos plasmídeos construídos são mostrados no APÊNDICE

D. Uma vez obtidos os recombinantes, estes foram submetidos a ensaios de acúmulo de PHA.

Os ensaios de acúmulo foram realizados conforme descrito no item 4.3.2.1 em Material e Métodos. Em MM1 (ROCHA et al., 2008) e glicose (10 g/L), condições de cultivo adequadas ao acúmulo do polímero, após 24h de cultivo, ácido hexanoico (1 g/L) foi fornecido, conforme metodologia previamente definida (MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2014). Nestas condições, a bactéria, numa primeira fase, utiliza as fontes de carbono e o nitrogênio para crescer e, quando o nitrogênio torna-se limitante - aproximadamente em 24h de cultivo -, passa a utilizar a fonte de carbono para acumular polímero. Por esta razão, ácido hexanoico foi fornecido com o intuito de direcionar intermediários do seu metabolismo para a síntese do monômero 3HHx. Experimentos controle foram realizados concomitantemente, nas mesmas condições testadas para as linhagens recombinantes, com LFM344 pBBR1MCS-2 (LFM1039) ou LFM101 pBBR1MCS-2 (LFM936). Além disso, ensaios em que apenas glicose 10 g/L foi fornecida também foram realizados como condição controle.

O uso de ácido hexanoico, um ácido orgânico de 6 carbonos, como cosubstrato tem sido reportado como precursor do monômero 3HHx para *B. sacchari* (BUFFONI, 2006; MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2013), tal como já foi verificado para outros micro-organismos (BRANDL et al., 1989; BUDDE et al., 2011; DENNIS, 1994; DENNIS et al., 1998; GROSS et al., 1989; HAYWOOD et al., 1991; ULMER et al., 1989; VOLOVA; KALACHEVA; STEINBÜCHEL, 2008).

Na Tabela 5.1 estão apresentados os resultados dos experimentos supracitados. No APÊNDICE E (Tabela A.1) estão mostradas as dosagens inicial e final de substratos. Verificando-se estes dados, as linhagens recombinantes construídas apresentaram capacidade de acumular PHA entre 25 e 60% da massa seca celular (MSC), ou seja, os genes inseridos complementaram a PHA sintase mutada dessa linhagem. Além disso, estas linhagens continuaram a acumular PHA tão bem quanto a selvagem. Resultados importantes foram atingidos quanto ao aumento do teor do monômero 3HHx nos copolímeros produzidos, podendo-se destacar aqueles observados para as linhagens LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034), LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037) e LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* (LFM1035) que acumularam, respectivamente, 14 mol%, 7,84 mol% e 2,78 mol % de 3HHx. A linhagem LFM344

pBBR1MCS-2::*phaPC_{Ah}* (LFM1038) acumulou P(3HB-*co*-3HHx) contendo 1,88 mol% de monômero com 6 carbonos.

Tabela 5.1 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)				PHA		Y _{HHx/AHex} (g/g)
				3HB		3HHx		(% MSC)		
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	2,11 ±0,0	ND		0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0		
MMKGli.	72	2,32 ±0,1	6,67 ±0,0		0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0		
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	2,17 ±0,1	ND		0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	2,18 ±0,1	7,59 ±0,2		0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0		
LFM936 pBBR1MCS-2	24	2,15 ±0,1	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	31,93 ±16,2		
MMKGli.	72	4,21 ±0,3	6,50 ±0,1		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	49,25 ±1,0		
LFM936 pBBR1MCS-2	24	2,80 ±0,2	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	0,00 ±0,0	50,47 ±0,6		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,92 ±0,3	7,48 ±0,0		98,24 ±0,3	1,76 ±0,3	49,05 ±1,4		0,04	
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	2,41 ±0,1	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	53,59 ±1,0			
MMKGli.	72	3,76 ±0,9	6,54 ±0,0		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	46,31 ±5,6			
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	2,39 ±0,1	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	52,96 ±1,2			
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,43 ±0,7	7,05 ±0,0		85,91 ±0,3	14,09 ±0,3	53,54 ±1,4		0,33	
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,52 ±0,3			100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	32,57 ±1,4			
MMKGli.	72	4,90 ±0,1	6,67 ±0,0		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	29,83 ±2,2			
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,58 ±0,2			100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	28,75 ±2,4			
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,79 ±0,1	7,54 ±0,1		97,22 ±1,0	2,78 ±1,0	25,59 ±2,0		0,14	
LFM1036 <i>phaJA_h</i>	24	3,73 ±0,2	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	54,80 ±2,6			
MMKGli.	72	4,47 ±4,3	6,69 ±0,0		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	43,82 ±17,0			
LFM1036 <i>phaJA_h</i>	24	3,26 ±0,4	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	47,41 ±4,1			
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	3,68 ±0,3	7,47 ±0,1		99,28 ±0,1	0,72 ±0,1	57,53 ±2,4		0,02	
LFM1037 <i>phaCJA_h</i>	24	3,23 ±0,4	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	52,05 ±4,4			
MMKGli.	72	4,18 ±0,3	6,67 ±0,0		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	54,52 ±2,1			
LFM1037 <i>phaCJA_h</i>	24	3,92 ±0,3	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	54,86 ±0,4			
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,88 ±0,2	7,47 ±0,0		92,16 ±0,3	7,84 ±0,3	63,27 ±4,1		0,24	
LFM1038 <i>phaPCA_h</i>	24	3,22 ±0,6	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	66,42 ±7,9			
MMKGli.	72	4,26 ±0,5	6,67 ±0,2		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	58,55 ±5,5			
LFM1038 <i>phaPCA_h</i>	24	3,07 ±0,9	ND		100,00 ±0,0	0,00 ±0,0	50,85 ±12,1			
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,10 ±0,5	7,46 ±0,1		98,12 ±0,3	1,88 ±0,3	48,93 ±8,1		0,04	

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado; Y_{3HHx/AHex}: fator de conversão de ácido hexanoico em monômeros 3HHx.

Estes dados, aqui apresentados, são comparáveis àqueles observados na literatura.

Para linhagens recombinantes de *R. eutropha* abrigando os genes *phaPCJ*, *phaCJ* e *phaC* de *Aeromonas caviae*, construídas por Kichise et al. (1999), alcançaram acúmulo de 11

mol%, 17 mol% e 18 mol% de 3HHx, respectivamente, quando foram supridas com hexanoato de sódio. Já a linhagem LFM101 pBBR1MCS-2::*phaJ_{Ah}* (LFM1036), produziu um PHA apenas 0,72 mol% de 3HHx, resultado semelhante foi conseguido por Mendonça (2010), quando expressou nesta mesma linhagem bacteriana os genes *phaJ1* e *phaJ4* de *Pseudomonas aeruginosa*, os quais apresentam maior afinidade por monômeros 3HHx (TSUGE et al., 1999; 2003).

Os resultados aqui apresentados são bastante interessantes no que se refere ao conteúdo de 3HHx, indicando um aumento de até 12,4% no acúmulo deste monômero. Como pode ser verificado no experimento controle com a linhagem LFM936 (LFM101 pBBR1MCS-2), houve acúmulo de 1,76 mol% do monômero com 6 carbonos. Em estudos anteriores, a linhagem selvagem de *B. sacchari* demonstrou capacidade para produzir PHA com uma fração molar do monômero 3HHx igual a 1,06 mol%, na presença de glicose 10 g/L e ácido hexanoico 1 g/L (MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2013). Em um estudo semelhante, Chee et al. (2011) avaliaram a produção de polímeros de PHA com o monômero 3HHx a partir de óleo de palma em estirpes recombinantes de *Burkholderia* sp. com gene da PHA sintase de *A. caviae*. Neste caso, foi conseguido um polímero com 1 mol% de 3HHx.

Em relação à quantidade de PHA acumulada, as linhagens recombinantes construídas são muito promissoras, pois linhagens selvagens de *Aeromonas* produzem o copolímero P(3HB-co-3HHx), entretanto o teor de PHA acumulado é pequeno. Matsuda (2009) utilizou *Aeromonas* sp. cultivadas em óleo de soja e tais bactérias acumularam PHA correspondendo a 6,18% da massa seca celular, sendo que a fração molar de 3HHx no polímero chegou a 17,11 mol%. No trabalho de Doi, Kitamura e Abe (1995), *Aeromonas caviae* suprida de óleo de soja produziu o copolímero com 87% de 3HB e 13% de 3HHx correspondendo a cerca de 12% da massa seca celular de PHA. Em experimentos em frascos agitados, Lee et al. (2000) conseguiram o acúmulo de quantidades maiores de PHA por *Aeromonas hydrophila*. A partir de ácido láurico, o teor de PHA atingiu até 28,8% da massa seca celular e a fração molar de 3HHx 17 mol%.

Pôde-se observar que a presença de DNA exógeno não afetou negativamente a capacidade de acúmulo de polímero. Observa-se o aumento deste acúmulo em LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037), principalmente (Tabela 5.1). Contudo, o cálculo do acúmulo de PHA depende de fatores como a biomassa total sintetizada.

Observando dados da literatura, pode-se exemplificar o quanto o trabalho com micro-organismos recombinantes pode ser promissor. Budde et al. (2011) construíram várias linhagens recombinantes de *R. eutropha* H16. Dentre elas, destacaram-se aquelas contendo genes *phaC1* e *phaC2* de *Rhodococcus aetherivorans* I24, pois produziram PHA contendo 11 mol% ou 18 mol% de 3HHx, respectivamente, a partir de ácido hexanoico 0,4% (m/v). Contudo a partir de óleo vegetal, a fração de 3HHx acumulada por estes recombinantes foi menor que 2 mol%. Outra recombinante, do mesmo estudo, contendo *phaC_{Ac}* produziu um copolímero contendo 13,9 mol% de 3HHx a partir de azeite de dendê (1%). No trabalho de Riedel et al. (2012), uma linhagem recombinante abrigando os genes *phaC2_{Ra}* e *phaJ1_{Pa}* produziu um copolímero com 22 mol% de 3HHx a partir de óleo de dendê.

Foram calculados os fatores de conversão de ácido hexanoico em monômeros 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) (Tabela 5.1). Para as linhagens abrigando os genes *phaPCJ_{Asp}* e *phaCJ_{Ah}*, os valores foram de 0,33 e 0,24 g/g, respectivamente, os quais correspondem a menos de 35% do valor máximo teórico que poderia ser alcançado (0,98 g/g). Isto significa que, mesmo com uma PHA sintase com maior especificidade por monômeros 3HHx, ainda há possibilidade de melhorar a eficiência de conversão com um melhor direcionamento de intermediários contendo seis carbonos do ciclo de β -oxidação, em que ácido hexanoico é metabolizado.

5.1.3.2 Modulação da composição monomérica de P(3HB-co-3HHx) produzidos por recombinantes *B. sacchari* *pBBB1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* ou *pBBB1MCS-2::phaC_{Ah}* ou *pBBB1MCS-2::phaCJ_{Ah}*

O efeito da modificação das condições de cultivo e acúmulo na capacidade da linhagem selvagem de *B. sacchari* para produzir o copolímero P(3HB-co-3HHx) foi avaliado anteriormente (MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al., 2013, 2014). De acordo com os resultados, um aumento na concentração de ácido hexanoico acima de 1 g/L resulta num efeito inibitório sobre o crescimento. Utilizando-se a concentração de glicose a 10 g/L, foi observado um aumento nos teores de 3HHx do copolímero, à medida que se aumentava a concentração de ácido hexanoico fornecida (MENDONÇA et al., 2013).

Baseando-se nos dados acima foram desenhados experimentos, conforme descrito em Material e Métodos item 4.3.2.1, com três das linhagens recombinantes construídas

LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034), LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC_{Ah}* (LFM1035) e LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037), as quais foram capazes de acumular maiores teores de 3HHx. Em MM1 e glicose 10 g/L, condições de cultivo adequadas ao acúmulo do polímero, após 24 h de cultivo ácido hexanoico foi fornecido nas concentrações entre 0,5 e 1,5 g/L. Ensaios controle foram realizados com a linhagem LFM344 pBBR1MCS-2 (LFM1039) nas mesmas condições, e o suprimento de apenas glicose como fonte de carbono também foi avaliado.

Os resultados obtidos nestes experimentos estão mostrados na Tabela 5.2 e na Figura 5.4. Como pode ser observado, a concentração de ácido hexanoico influencia no teor de 3HHx acumulado, para as três linhagens cultivadas.

Tabela 5.2 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico nas concentrações entre 0,5 e 1,5 g/L. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão. (Continua)

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)		PHA (mol%)				PHA		Y3HHx/AHex g/g
				3HB		3HHx		(%MSC)		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	24	3,47	±1,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
	72	3,27	±1,6	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	24	5,33	±0,4	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
	72	6,49	±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	24	5,40	±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
	72	6,78	±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	24	4,98	±0,8	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
	72	7,18	±0,4	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.	24	4,44	±1,6	100,00	±0,0	0,00	±0,0	14,41	±2,6	
	72	6,04	±0,8	100,00	±0,0	0,00	±0,0	59,43	±3,2	
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	24	4,74	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	50,28	±9,8	0,0127
	72	5,70	±0,0	99,70	±0,1	0,30	±0,1	37,25	±10,0	
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	24	4,61	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	49,43	±13,2	0,0080
	72	5,43	±0,0	99,66	±0,0	0,34	±0,0	43,07	±4,0	
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	24	4,60	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	42,50	±9,3	0,0066
	72	5,11	±0,2	99,54	±0,0	0,46	±0,0	42,39	±3,4	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp} . MMKGli.	24	5,50	±0,3	100,00	±0,0	0,00	±0,0	35,65	±5,3	
	72	5,84	±0,7	100,00	±0,0	0,00	±0,0	31,12	±2,2	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp} . MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	24	5,33	±0,4	100,00	±0,0	0,00	±0,0	33,47	±3,3	0,5468
	72	6,49	±0,3	88,58	±1,2	11,42	±1,2	32,46	±1,9	

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado; Y_{3HHx/AHex}: fator de conversão de ácido hexanoico em monômeros 3HHx.

Tabela 5.2 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico nas concentrações entre 0,5 e 1,5 g/L. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão. (Conclusão)

LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	5,40	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	35,68	±1,6	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	6,78	±0,3	84,84	±0,3	15,16	±0,3	36,69	±4,4	0,3697
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	4,98	±0,8	100,00	±0,0	0,00	±0,0	34,74	±2,2	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	72	7,18	±0,4	81,73	±2,7	18,27	±2,7	38,74	±6,8	0,2937
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,52	±0,3	100,00	±0,0	0,00	±0,0	32,57	±1,4	
MMKGli.	72	4,90	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	29,83	±2,2	
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,53	±0,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	25,56	±3,5	
MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	72	5,01	±0,3	98,11	±0,4	1,89	±0,4	25,75	±0,9	0,0568
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,58	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	28,75	±2,4	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	4,79	±0,1	97,22	±1,0	2,78	±1,0	25,59	±2,0	0,0363
LFM1035 <i>phaCA_h</i>	24	2,64	±0,3	100,00	±0,0	0,00	±0,0	27,24	±2,4	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	72	4,39	±0,2	95,69	±0,4	4,31	±0,4	23,14	±1,4	0,0269
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,83	±0,7	100,00	±0,0	0,00	±0,0	27,17	±2,4	
MMKGli.	72	5,75	±0,5	100,00	±0,0	0,00	±0,0	30,71	±5,9	
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,23	±0,5	100,00	±0,0	0,00	±0,0	27,51	±3,5	
MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	72	5,58	±0,6	92,97	±1,0	7,03	±1,0	29,63	±4,7	0,2039
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,53	±0,4	100,00	±0,0	0,00	±0,0	30,02	±2,7	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	72	5,59	±0,3	89,67	±0,6	10,33	±0,6	29,96	±1,1	0,1765
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,73	±0,5	100,00	±0,0	0,00	±0,0	27,93	±2,0	
MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	72	5,30	±0,0	88,03	±1,5	11,97	±1,5	25,42	±5,3	0,1054

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado; $Y_{3HHx/AHex}$: fator de conversão de ácido hexanoico em monômeros 3HHx.

Para a linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) o teor de 3HHx variou entre 11 e 18 mol%, para a linhagem LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCA_h* (LFM1035) observou-se acúmulo de 1,9 a 4,3 mol%, enquanto para LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037) a fração deste monômero esteve ao redor de 7 a 11 mol% e para LFM101 pBBR1MCS-2 as quantidades do monômero foram menores que 0,5 mol%, para as concentrações de ácido hexanoico estudadas. Este experimento sugere que também é possível modular a composição do copolímero produzido apenas modificando a concentração de substrato fornecida, mais uma vantagem destes recombinantes. Análises de concentração de substratos fornecidos nos tempos iniciais e finais deste experimento encontram-se no APÊNDICE E (Tabela A.2).

Figura 5.4– Composição do PHA acumulado a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari*: **(A)** - LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}; **(B)** - LFM344pBBR1MCS-2::phaC_{Ah}; **(C)** - LFM344pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ah}; **(D)** – LFM101pBBR1MCS-2. (Continua)

Figura 5.4– Composição do PHA acumulado a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari*: **(A)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*; **(B)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaCA_h*; **(C)** - LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}*; **(D)** – LFM101pBBR1MCS-2. (Conclusão)

Os cálculos de $Y_{3HHx/AHex}$ para estes experimentos (Tabela 5.2) indicam sua diminuição com maiores concentrações de ácido hexanoico, atingindo mais de 0,5 g/g no caso do *phaPCJ_{Asp}*, com o ácido hexanoico a 0,5 g/L. Este valor correspondeu a cerca de 50% do valor máximo teórico. Estes resultados sugerem que a eficiência de conversão do ácido hexanoico em 3HHx é afetada por efeitos inibitórios desse ácido.

A Figura 5.5 correlaciona a concentração de ácido hexanoico suprido e a fração molar de 3HHx obtida no polímero, para as linhagens selvagem e as três recombinantes cultivadas com glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L). A partir dos dados abaixo, pode-se verificar que a linhagem selvagem produziu apenas 5 a 10% do conteúdo de 3HHx que as linhagens recombinantes foram capazes de acumular nas mesmas condições de cultivo. Considerando estes dados, poderiam ser estabelecidos modelos para conseguir polímeros sob medida para diferentes aplicações uma vez que o teor de 3HHx variou 0,6 a 18 mol%. As curvas para as linhagens recombinantes indicam que seria possível acúmulo de maiores frações de 3HHx com o fornecimento de maiores concentrações do ácido, entretanto deve-se levar em consideração a inibição que este substrato gera para o crescimento bacteriano. Ácidos orgânicos como o ácido octanoico, por exemplo, geram inibição a partir de 0,4% (m/v) para células de *R. eutropha* (DENNIS et al., 1998). Mendonça (2010) verificou que concentrações acima de 0,2% de ácido hexanoico são inibitórias para o crescimento de *B. sacchari*. Entretanto, para cultivos em batelada alimentada é possível suprir quantidades gradativas desse ácido, impedindo o efeito de inibição por ele causado (MENDONÇA et al., 2014).

Figura 5.5- Correlação da concentração de ácido hexanoico fornecida e da fração molar de 3HHx obtida em experimentos com linhagens de *B. sacchari* selvagem LFM101 e recombinantes LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJAsp* (LFM1034), LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJAh* (LFM1037) e LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCAh* (LFM1035).

A adição de pequenas quantidades de monômeros de cadeia média, como é o caso do 3HHx, ao polímero de 3HB melhora significativamente as propriedades térmicas deste material (NOMURA et al., 2004; TSUGE et al, 2004). Por isso, a modulação da composição de copolímeros aumenta as possibilidades na produção de polímeros para diferentes aplicações.

5.1.3.3 Ensaios de acúmulo com linhagens recombinantes utilizando glicose e diferentes ácidos orgânicos

Para estudar a capacidade metabólica dos recombinantes construídos, foram realizados experimentos utilizando glicose e/ou ácidos butírico, valérico, heptanoico ou octanoico. As linhagens recombinantes utilizadas foram LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJAsp* (LFM1034), LFM344pBBR1MCS-2::*phaCAh* (LFM1035) e LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJAh* (LFM1037), por acumularem maiores teores de 3HHx. Os ensaios foram feitos conforme descrito em Material e Métodos item 4.3.2.1.

Estes recombinantes abrigam importantes genes: *phaC* e/ou *phaJ* de *Aeromonas* spp. Ambos codificam, respectivamente, PHA sintase (responsável pela polimerização) e enoil-CoA hidratase (*R*)-específica, a qual drena intermediários da β -oxidação para a

síntese de PHA, convertendo *trans*-2-enoil-CoA ao (*R*)-3-hidroxiacil-CoA para a síntese de monômeros, com número de carbonos dependente da fonte de carbono suprida. A Figura 5.6 mostra o papel destas enzimas no metabolismo de ácidos orgânicos.

Figura 5.6- Biossíntese de PHA a partir de carboidratos e ácidos orgânicos. Biossíntese de monômeros 3HB e 3HA_{MCL} (polímeros com monômeros de 6 a 14). Enzimas: PhaA e BktB –β-cetotiolase; PhaB – 3-cetoacil-CoA redutase/acetoacetyl-CoA redutase); PhaC – PHA sintase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (*R*)-específica.

Os resultados obtidos nos experimentos em que se forneceu o ácido butírico para as três linhagens recombinantes testadas estão apresentados na Tabela 5.3. Observou-se, acúmulo somente de monômeros 3HB para as linhagens contendo genes *phaPCJ_{Asp}* e *phaCJ_{Ah}*. Entretanto naquelas que abrigavam o gene *phaC_{Ah}*, foi detectado acúmulo de 0,51 mol% de 3HHx.

Tabela 5.3 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido butírico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)		pH		PHA (mol%)				PHA (%MSC)	
						3HB	3HHx				
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,46	±0,2			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.	72	4,23	±0,0	5,38	±0,1	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,68	±0,1			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.+Ac. But. 1,0 g/L	72	4,74	±0,1	6,49	±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> .	24	3,45	±0,1			100,00	±0,0	0,00	±0,0	46,98	±2,2
MMKGli.	72	5,26	±0,3	4,12	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	31,06	±2,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> .	24	3,97	±0,7			100,00	±0,0	0,00	±0,0	46,41	±2,3
MMKGli.+Ac. But. 1,0 g/L	72	5,47	±0,0	6,01	±0,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	38,46	±4,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	24	3,69	±0,3			100,00	±0,0	0,00	±0,0	33,07	±3,6
MMKGli.	72	4,98	±0,7	4,25	±0,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	28,27	±3,2
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	24	3,58	±0,5			100,00	±0,0	0,00	±0,0	29,04	±3,4
MMKGli.+Ac. But. 1,0 g/L	72	5,79	±0,4	6,19	±0,4	99,49	±0,1	0,51	±0,1	29,27	±1,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,19	±0,3			100,00	±0,0	0,00	±0,0	40,72	±0,9
MMKGli.	72	4,89	±0,5	4,41	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	29,63	±1,7
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,69	±0,5			100,00	±0,0	0,00	±0,0	36,95	±1,2
MMKGli.+Ac. But. 1,0 g/L	72	5,35	±0,5	6,01	±0,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	38,33	±2,4

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); ND: não determinado.

O uso do ácido butírico para os recombinantes pode ser justificado por dados apresentados na literatura. Fukui, Abe e Doi (2002) reportaram a capacidade de *R. eutropha* recombinante incorporar 3-hidroxi hexanoil-CoA gerados pela ação da enzima BktB ao condensar acetil-CoA com butiril-CoA, fornecido pela ação da crotonil-CoA redutase de *Streptomyces cinnamonensis* sobre o substrato crotonil-CoA. Mendonça (2010) sugeriu que *B. sacchari* é capaz de promover a condensação de acetil-CoA e butiril-CoA formando 3-ceto hexanoil-CoA, que seria posteriormente reduzido a 3HHx, em um mecanismo similar ao de *R. eutropha*. Caso este passo metabólico realmente ocorra em *B. sacchari*, a geração do intermediário 3-hidroxi hexanoil-CoA promoveria a incorporação de 3HHx pelos recombinantes construídos. Os dados indicando que a linhagem contendo *phaC_{Ah}* é capaz de produzir 3HHx a partir de ácido butírico sugerem fortemente que *B. sacchari* é capaz de realizar a condensação de acetil-CoA com butiril-CoA, conforme reportado previamente por Mendonça (2010). Uma explicação para a ausência de 3HHx nos demais cultivos seria a não detecção pela cromatografia gasosa, uma vez que as quantidades deste monômero nestas condições podem ser muito pequenas. Outra questão

seria: as linhagens abrigando *phaPCJ_{Asp}* e *phaCJ_{Ah}* apresentaram melhor desempenho com o uso de ácido hexanoico, entretanto com ácido butírico, não foram capazes de acumular 3HHx. De fato, o gene *phaJ* não contribui para o direcionamento de 3HHx-CoA, gerado pela condensação de butiril-CoA e acetil-CoA, para a biossíntese, logo não era esperado que beneficiasse ou piorasse o processo, a menos que se admita que houvesse uma carga genética maior com a presença desse gene, que prejudicaria a incorporação de 3HHx.

Fornecendo glicose (1 g/L) e ácido butírico (10 mM), Fukui et al. (1999) produziram apenas monômeros 3HB quando cultivaram linhagens de *E.coli* abrigando *phaPCJ* de *Aeromonas caviae*. Kichise et al. (1999) utilizando ácido butírico reportaram a produção de copolímero com 1 mol% de 3HHx para recombinantes de *R. eutropha* abrigando *phaPCJ_{Ac}* e *phaC_{Ac}*, e apenas 3HB para aquele *phaCJ_{Ac}*. Linhagem mutante de *Pseudomonas putida* KTOY06 (afetadas na PHA sintase), abrigando o operon *phaPCJ_{Ac}* foi cultivada em butirato de sódio (0,05 g/mL) como única fonte de carbono e produziu homopolímero P(3HB), sendo que 10% da biomassa (3,7 g/L) eram PHA (LI et al., 2011).

Os resultados apresentados na Tabela 5.4 mostram acúmulo de PHA quando ácido valérico foi fornecido como cosubstrado. Em relação ao ácido valérico, intermediários com números de carbonos ímpares poderiam ser gerados para incorporação pela PHA sintase do recombinante. Sendo catabolizado pela β -oxidação de ácidos graxos, este ácido poderia simplesmente levar à formação e incorporação de 3-hidroxivaleril-CoA ou geraria intermediários com três carbonos, que, ao se condensarem com acetil-CoA poderiam ser incorporados como 3HV (SILVA, 1998). Ainda poderiam ser gerados 3-hidroxiheptanoil-CoA (3HHp), resultante da condensação de 3-hidroxivaleril-CoA com um acetil-CoA.

O uso do ácido valérico (Tabela 5.4) promoveu o acúmulo de PHA contendo 19,61 mol% de 3HV para a recombinante abrigando *phaPCJ_{Asp}*, 30,72 mol% para a linhagem contendo *phaC_{Ah}* e de 48,31 mol% deste monômero para aquela abrigando *phaCJ_{Ah}*, entretanto 3HHp não foi detectado. Os dados obtidos estão de acordo com a literatura, em um estudo com linhagens recombinantes de *R. eutropha* contendo genes *phaPCJ_{Ac}*, *phaC_{Ac}* e *phaCJ_{Ac}*, houve produção, respectivamente, de copolímeros contendo 95, 75 e 99 mol% de 3HV, a partir de ácido valérico (KICHISE et al., 1999). Chee et al. (2011) utilizando linhagem recombinante de *Burkholderia* sp. JCM15050 contendo *phaC_{Ac}* suprida de valerato de sódio 0,5% produziu copolímero contendo 91 mol% de 3HV. Uma linhagem de *P. putida* KT2442 mutada em suas duas PHA sintases, *phaC1* e *phaC2*, e em

genes do metabolismo de ácidos graxos, e contendo os genes *phaPCJ* de *A. hydrophila*, foi capaz de acumular homopolímeros de 3HV a partir de ácido valérico a 5 g/L (WANG et al., 2010).

Tabela 5.4 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido valérico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)		pH		PHA (mol%)				PHA		Y _{HV/AVal} g/g
						3HB		3HV		(%MSC)		
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,46	±0,2	5,38	±0,1	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.	72	4,23	±0,0			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,50	±0,1	5,92	±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.+Ac. Val. 1,0 g/L	72	4,51	±0,2			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.}	24	3,45	±0,1	4,12	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	39,09	±2,8	
MMKGli.	72	3,54	±2,3			100,00	±0,0	0,00	±0,0	32,73	±2,0	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.}	24	3,79	±0,4	6,05	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	42,93	±5,0	0,28
MMKGli.+Ac. Val. 1,0 g/L	72	5,39	±0,2			80,39	±1,9	19,61	±1,9	35,31	±6,7	
LFM1035 <i>phaC</i> _{Ah}	24	3,69	±0,3	4,41	±0,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	31,34	±3,6	
MMKGli.	72	4,98	±0,7			100,00	±0,0	0,00	±0,0	27,24	±3,2	
LFM1035 <i>phaC</i> _{Ah}	24	3,78	±0,2	6,20	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	31,85	±3,4	0,28
MMKGli.+Ac. Val. 1,0 g/L	72	5,53	±0,4			69,28	±3,1	30,72	±3,1	33,41	±2,1	
LFM1037 <i>phaCJ</i> _{Ah}	24	3,19	±0,3	4,41	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	30,80	±0,8	
MMKGli.	72	4,89	±0,5			100,00	±0,0	0,00	±0,0	36,66	±5,1	
LFM1037 <i>phaCJ</i> _{Ah}	24	3,98	±0,4	6,01	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	35,63	±5,0	0,60
MMKGli.+Ac. Val. 1,0 g/L	72	5,27	±0,1			51,69	±4,2	48,31	±4,2	32,42	±4,8	

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HV: 3-hidroxivalerato (5 C); ND: não determinado.

Observando os dados aqui relatados, a expressão do gene *phaJ* juntamente com o *phaC* promoveu um aumento na eficiência de conversão de valerato em 3HV quando os genes de *A. hydrophila* foram expressos (Tabela 5.4), pois se verifica que, na presença do gene *phaJ*, há o acúmulo de PHA contendo maiores teores de 3HV e com maiores valores de fator de conversão de ácido valérico em 3HV (Y_{3HV/AVal}). Em relação ao recombinante contendo os genes de *Aeromonas* sp., devido à presença de mais variáveis, como PHA sintase diferente e a presença do gene *phaP*, é difícil inferir alguma comparação com as demais linhagens testadas.

Tabela 5.5 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose 10 g/L e ácido heptanoico 1 g/L. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)		pH		PHA (mol%)						PHA		Y _{HV+HHp/AHep} g/g
						3HB		3HV		3HHp		(%MSC)		
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,46	±0,2	5,38	±0,1	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.	72	4,23	±0,0			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	2,92	±0,8	6,55	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.+Ac. Hep. 1,0 g/L	72	4,76	±0,2			0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.}	24	3,45	±0,1	4,12	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	49,73	±0,4	
MMKGli.	72	5,26	±0,3			100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	51,17	±0,5	
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.}	24	2,96	±0,3	6,35	±0,4	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	48,30	±1,6	0,57
MMKGli.+Ac. Hep. 1,0 g/L	72	5,35	±0,5			61,84	±3,9	34,17	±3,9	3,99	±0,3	50,53	±1,4	
LFM1035 <i>phaCA</i> _h	24	3,69	±0,3	4,67	±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	30,37	±5,7	
MMKGli.	72	4,98	±0,7			100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	33,62	±1,3	
LFM1035 <i>phaCA</i> _h	24	3,54	±0,1	6,40	±0,5	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	28,27	±3,2	0,43
MMKGli.+Ac. Hep. 1,0 g/L	72	4,81	±1,0			64,61	±4,5	33,48	±4,3	1,91	±0,2	26,41	±3,5	
LFM1037 <i>phaCJ</i> _{Ah}	24	3,19	±0,3	4,41	±0,1	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	39,85	±2,0	
MMKGli.	72	4,89	±0,5			100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	42,65	±0,4	
LFM1037 <i>phaCJ</i> _{Ah}	24	3,33	±0,2	6,03	±0,9	100,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	36,51	±2,2	0,46
MMKGli.+Ac. Hep. 1,0 g/L	72	4,64	±0,4			57,53	±4,0	41,49	±4,2	0,99	±0,3	38,35	±0,9	

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HV: 3-hidroxivalerato (5 C); 3HHp: 3-hidroxieptanoato (7 C); ND: não determinado.

Com o uso de ácido heptanoico (Tabela 5.5), o resultado é muito interessante e demonstra a capacidade da PHA sintase de *Aeromonas* incorporar monômeros 3HHp. Quando continha o operon completo de *Aeromonas* sp., o recombinante acumulou o terpolímero contendo 61,84 mol% de 3HB, 34,17 mol% de 3HV e 3,99 mol% de 3HHp. Para a construção com *phaCJ_{Ah}*, a composição foi 57,53 mol% de 3HB, 41,49 mol% de 3HV e 0,99 mol% de 3HHp. Já para a linhagem com *phaC_{Ah}*, o polímero acumulado era composto por 64,61 mol% de 3HB, 33,48 mol% de 3HV e 1,91 mol% de 3HHp. O operon *phaPCJ_{Asp}* parece apresentar maior especificidade pelos monômeros 3HHp que as demais construções gênicas testadas, como também foi observado para os monômeros 3HHx. Por outro lado, a especificidade pelos monômeros 3HV é maior pelo *phaCJ_{Ah}* do que pelo *phaPCJ_{Asp}*. A especificidade aqui é levada em consideração por se tratar de *phaC* de espécies supostamente diferentes, *Aeromonas* sp. (*phaPCJ_{Asp}*) e *A. hydrophila* (*phaC_{Ah}* e *phaCJ_{Ah}*).

Resultados semelhantes quanto à composição de PHA descrita neste estudo foram observados por outros autores. Para linhagens recombinantes de *R. eutropha*, aquele abrigando *phaPCJ_{Ac}*, acumulou 33 mol% 3HB, 61 mol% de 3HV e 6 mol% de 3HHp, quando continha *phaC_{Ac}* sintetizou copolímero com 53 mol% de 3HB, 43 mol% de 3HV e 4 mol% de 3HHp. já quando abrigava *phaCJ_{Ac}* a linhagem produziu 35 mol% de 3HB, 61 mol% de 3HV e 4 mol% de 3HHp, utilizando ácido heptanoico (KICHISE et al., 1999). Li et al. (2011) obtiveram um terpolímero contendo 4,4 mol% de 3HB, 46,5 mol% de 3HV e 49,1 mol% de 3HHp quando forneceram ácido heptanoico (5 g/L) como única fonte de carbono para linhagens mutantes de *P. putida* KTOY06 contendo *phaPCJ_{Ac}*.

O emprego de ácido octanoico tem o propósito de indicar se os ácidos orgânicos de cadeia maior seriam uma opção para a produção industrial de PHA híbridos, de modo que ácidos graxos derivados de óleos vegetais pudessem ser uma matéria-prima promissora. E também para verificar se a PHA sintase de *Aeromonas* spp. é capaz de incorporar monômeros 3HO.

O metabolismo de ácido octanoico, que é catabolizado na β -oxidação de ácidos graxos (Figura 5.6), geraria intermediários com 6 carbonos, 2-*trans*-hexenoil-CoA ou 3-hidroxihexanoil-CoA. Poderia gerar ainda intermediários com 8 ou 10 carbonos, por exemplo, pela simples metabolização à 3-hidroxi octanoil-CoA, ou pela condensação daquele com acetil-CoA, originando 3-hidroxi decanoil-CoA.

Os resultados na Tabela 5.6 demonstram a detecção de apenas 3HB no PHA produzido a partir de glicose e ácido octanoico por todas as linhagens recombinantes, sugerindo que 3HO não seria eficientemente incorporado pela PHA sintase de *Aeromonas* e mesmo o direcionamento de intermediários da β -oxidação contendo seis carbonos não foi eficiente. Este experimento deve ser repetido, pois dados da literatura evidenciam a capacidade do gene *phaC* de *A. caviae* incorporar monômeros 3HHx a partir deste substrato.

Utilizando o mesmo ácido orgânico 0,1% (m/v), Kichise et al. (1999) demonstraram a capacidade de recombinante de *R. eutropha* contendo genes *phaPCJ_{Ac}*, *phaC_{Ac}* e *phaCJ_{Ac}* acumularem copolímeros contendo 26, 10 e 22 mol% de 3HHx, respectivamente. Recombinante de *R. eutropha* PHB4⁻ abrigando o gene *phaC_{Ac}* a partir de 0,1% (m/v) de octanoato de sódio produziu copolímero contendo 12 mol% de 3HHx (TSUGE et al., 2007).

Tabela 5.6 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose 10 g/L e ácido octanoico 1 g/L. Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)		pH		PHA (mol%)		PHA	
						3HB		(%MSC)	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,46	±0,2	5,38	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.	72	4,23	±0,0			0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,15	±0,8	5,24	±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.+Ac. Oct. 1,0 g/L	72	3,33	±0,1			0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> .	24	3,45	±0,1	4,12	±0,2	100,00	±0,0	36,84	±2,3
MMKGli.	72	5,26	±0,3			100,00	±0,0	26,67	±1,5
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> .	24	4,06	±0,3	4,59	±0,1	100,00	±0,0	36,93	±3,2
MMKGli.+Ac. Oct. 1,0 g/L	72	5,15	±0,4			100,00	±0,0	33,23	±3,8
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	24	3,69	±0,3	4,35	±0,0	100,00	±0,0	33,07	±3,6
MMKGli.	72	4,98	±0,7			100,00	±0,0	28,27	±3,2
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	24	3,67	±0,4	4,52	±0,3	100,00	±0,0	32,56	±2,4
MMKGli.+Ac. Oct. 1,0 g/L	72	4,49	±0,3			100,00	±0,0	23,54	±2,1
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,19	±0,3	4,41	±0,1	100,00	±0,0	32,92	±3,0
MMKGli.	72	4,89	±0,5			100,00	±0,0	22,59	±3,9
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,74	±0,4	4,72	±0,1	100,00	±0,0	26,04	±0,8
MMKGli.+Ac. Oct. 1,0 g/L	72	4,43	±0,2			100,00	±0,0	29,39	±2,3

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); ND: não determinado.

No trabalho de Mendonça (2010), cultivando *B. sacchari* selvagem em glicose (10 g/L) e ácido octanoico (1 g/L), não foi observado acúmulo de monômeros 3HHx,

apenas 3HB. Entretanto, no resultado apresentado por Lício et al. (2009) fornecendo exclusivamente ácido octanoico (1,44 g/L) como fonte de carbono e limitação maior de nitrogênio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \text{ } 0,2 \text{ g/L}]$, *B. sacchari* acumulou 0,36 mol% de unidades 3HHx. Linhagens de *R. eutropha* cultivadas em condições heterotróficas, em meio com frutose e ácido octanoico produziram 0,2 mol% de 3HHx em 48 h de cultivo (VOLOVA; KALACHEVA; STEINBÜCHEL, 2008). Budde et al. (2011) cultivando linhagens recombinantes de *R. eutropha* H16 abrigando genes *phaC1* ou *phaC2* de *Rhodococcus aetherivorans* I24 em ácido octanoico (0,4%) produziram P(3HB-co-3HHx) contendo 6,56 ou 10,4 mol% de 3HHx, respectivamente.

Os dados referentes às concentrações de glicose e dos ácidos orgânicos butírico, valérico, heptanoico e octanoico, medidas nestes experimentos, estão apresentados no APÊNDICE E (Tabelas A.3 a A.6). A Figura 5.7 resume os dados dos experimentos com estes ácidos orgânicos.

Figura 5.7– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido orgânicos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCAh*; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ*_{Ah}. De cima para baixo, gráficos: **1** - ácido butírico; **2** – ácido valérico; **3** – ácido heptanoico, **4** – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L). (Continua)

Figura 5.7– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido orgânicos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}; LFM344pBBR1MCS-2::*phaC*_{Ah}; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ*_{Ah}. De cima para baixo, gráficos: 1 - ácido butírico; 2 – ácido valérico; 3 – ácido heptanoico, 4 – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L). (Conclusão)

Uma alternativa para se alcançar a incorporação de monômeros relacionados ao número de carbonos do substrato fornecido seria bloquear a degradação de ácidos graxos, inativando genes da β -oxidação, não só para aumentar a eficiência de conversão substrato/produto, mas também para permitir a incorporação de hidroxiácidos de cadeia mais longa (Figura 5.6). Os fatores de conversão de ácido valérico formando 3HV alcançaram até 60 % do valor máximo teórico (0,98 g/g). Já para o ácido heptanoico gerando 3HV e 3HHp, nos experimentos acima citados, o maior valor atingido foi de 36% do máximo teórico, neste caso 1,75 mol/mol.

Além dos ácidos acima citados, foram testados, em cultivos com glicose 10 g/L e, como cosubstratos, alguns ácidos graxos de cadeia mais longa que aqueles previamente discutidos: ácidos láurico, oleico e linoleico. Desta vez, foram realizados experimentos utilizando as linhagens recombinantes LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) e LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}* (LFM1037). A mesma justificativa para o uso de ácido octanoico pode ser utilizada para a realização destes experimentos, pois aqueles ácidos seriam uma alternativa mais barata para promover a inserção de 3HA_{MCL} ao PHA produzido por linhagens recombinantes de *B. sacchari*, porque são encontrados em óleos vegetais.

Os ácidos láurico, oleico e linoleico têm sido reportados como fontes de carbono para o acúmulo de PHA por algumas linhagens (CHEN et al., 2001; CHIEN; HO, 2008; LEE et al., 2000; LU et al., 2004, 2005; SRIVASTAVA; TRIPATHI, 2013).

O ácido láurico contém cadeia saturada de 12 átomos de carbono (ácido dodecanoico). Quando este ácido foi suprido em cultivos com as linhagens recombinantes selecionadas foram obtidos resultados apresentados na Tabela 5.7. Nestes experimentos, pode-se observar o teor de 4,82 e 1,88 mol% de 3HHx no copolímero acumulado pelas linhagens recombinantes contendo *phaPCJ_{Asp}* e *phaCJ_{Ah}*, respectivamente. A quantidade total de PHA acumulada esteve em torno de 50 % da massa seca.

Recombinante de *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) contendo *phaC_{Ac}* quando cultivada em ácido láurico 0,5% (m/v) produziu um copolímero P(3HB-co-3HHx) contendo 1 mol% de 3HHx (CHEE et al., 2011). No trabalho com a linhagem recombinante de *E. coli* LS5218, abrigando os genes *phaJ4* de *P. putida* KT2440, *phaC1* de *Pseudomonas* sp 61-3 e *phaAB* de *R. eutropha*, cultivada com glicose e ácido láurico como fontes de carbono, Wang et al. (2012) reportaram o acúmulo de copolímeros contendo até 8 mol% de 3HHx e outro monômero 3HA_{MCL}.

Tabela 5.7 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido láurico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)				PHA	
			3HB		3HHx		(%MSC)	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,16 ±1,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.	72	4,01 ±0,5	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,56 ±0,6	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.+Ac. Laur. 1,0 g/L	72	4,14 ±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	4,13 ±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	45,88	±12,9
MMKGli.	72	5,59 ±0,7	100,00	±0,0	0,00	±0,0	38,34	±1,5
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i>	24	3,69 ±0,5	100,00	±0,0	0,00	±0,0	50,68	±2,2
MMKGli.+Ac. Laur. 1,0 g/L	72	5,29 ±1,6	95,18	±0,4	4,82	±0,4	46,00	±1,1
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,94 ±0,7	100,00	±0,0	0,00	±0,0	50,95	±1,8
MMKGli.	72	6,62 ±1,0	100,00	±0,0	0,00	±0,0	42,89	±1,8
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,24 ±0,6	100,00	±0,0	0,00	±0,0	55,30	±3,0
MMKGli.+Ac. Laur. 1,0 g/L	72	5,88 ±1,2	98,12	±0,0	1,88	±0,0	55,18	±5,0

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado.

O ácido oleico contém 18 carbonos na sua estrutura e uma insaturação no carbono 9, também é denominado ácido 9-octadecenoico. Na Tabela 5.8 estão apresentados os resultados obtidos com o uso dessa fonte de carbono. Observa-se, aqui, acúmulo apenas de monômeros 3HB por ambas as linhagens recombinantes testadas. E o teor de PHA na massa seca celular foi superior a 45%. Este resultado não foi o esperado, uma vez que os resultados obtidos com os outros ácidos graxos, neste mesmo trabalho, evidenciaram a capacidade dos recombinantes acumularem outros monômeros, além de 3HB, utilizando estas fontes de carbono. Este experimento deve ser repetido.

Budde et al. (2011) utilizando recombinante de *R. eutropha* H16 (Re2136) abrigando *phaC_{Ac}* suprida de óleo de palma, cuja composição contém ácido oleico como um dos principais componentes, reportou acúmulo de 13,9 mol % de 3HHx no copolímero P(3HB-co-3HHx) produzido. Linhagem de *R. eutropha* recombinante abrigando *phaC_{Ac}* e cultivada utilizando óleos vegetais produziu copolímeros de 3HB e 3HHx com até 5 mol% deste último monômero (LOO et al., 2005).

Tabela 5.8 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido oleico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)			PHA (mol%)		PHA	
					3HB		(%MSC)	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	3,07	±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.	72	3,42	±0,5	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	4,28	±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
MMKGli.+Ac. Oleico 1,0 g/L	72	4,78	±0,9	0,00	±0,0	0,00	±0,0	
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i>	24	4,11	±0,8	100,00	±0,0	59,94	±3,1	
MMKGli.	72	5,96	±1,1	100,00	±0,0	51,56	±15,1	
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i>	24	3,87	±0,4	100,00	±0,0	53,96	±3,0	
MMKGli.+Ac. Oleico 1,0 g/L	72	5,89	±0,5	100,00	±0,0	47,32	±2,0	
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,55	±0,4	100,00	±0,0	52,27	±2,1	
MMKGli.	72	5,18	±0,1	100,00	±0,0	41,01	±0,2	
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,84	±0,1	100,00	±0,0	56,08	±6,5	
MMKGli.+Ac. Oleico 1,0 g/L	72	5,47	±0,5	100,00	±0,0	45,84	±4,4	

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); ND: não determinado.

O ácido linoleico, assim como o ácido oleico, contém 18 carbonos, mas com duas insaturações, uma no carbono 9 e outra no 12 (ácido 9,12-octadecadienoico). Os resultados dos experimentos com este ácido graxo estão descritos na Tabela 5.9.

Analisando a Tabela 5.9, podemos observar o acúmulo de monômeros 3HHx em 3,11 e 1,31 mol%, para as linhagens abrigando os genes *phaPCJ_{Asp.}* e *phaCJ_{Ah}*, respectivamente. O acúmulo de PHA ficou entre 40 e 50% da biomassa seca.

Linhagem recombinante de *R. eutropha* H16 PHB-4/pJRDEE32d13 contendo *phaC_{Ac}* quando cultivada em óleo de soja, cujo conteúdo de ácido oleico e linoleico é de aproximadamente 22% e 60%, respectivamente, acumulou copolímero P(3HB-co-3HHx) contendo 5 mol% de 3HHx em 96 h de cultivo (KAHAR et al., 2004).

Os resultados obtidos com os ácidos láurico, oleico e linoleico mostram que as linhagens de *B. sacchari* recombinantes testadas são capazes de introduzir monômeros 3HHx (cadeia média) ao polímero a partir de ácidos graxos. Estes resultados indicam que estas linhagens são promissoras para o uso de fontes de carbono renováveis, tais como óleos vegetais para produzir PHA.

Tabela 5.9 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose (10 g/L) e ácido linoleico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos experimentos em triplicata e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)				PHA	
			3HB		3HHx		(%MSC)	
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	2,67 ±0,6	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.	72	3,37 ±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1039 pBBR1MCS-2	24	2,79 ±0,2	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
MMKGli.+Ac. Linol. 1,0 g/L	72	3,51 ±0,3	0,00	±0,0	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i>	24	3,36 ±0,4	100,00	±0,0	0,00	±0,0	52,37	±2,2
MMKGli.	72	4,86 ±0,7	100,00	±0,0	0,00	±0,0	39,05	±4,7
LFM1034 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,30 ±0,3	100,00	±0,0	0,00	±0,0	45,67	±8,0
MMKGli.+Ac. Linol. 1,0 g/L	72	5,35 ±0,4	96,89	±0,1	3,11	±0,1	50,05	±4,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	4,33 ±0,9	100,00	±0,0	0,00	±0,0	47,03	±2,5
MMKGli.	72	5,12 ±0,2	100,00	±0,0	0,00	±0,0	36,22	±5,1
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	24	3,39 ±0,4	100,00	±0,0	0,00	±0,0	52,92	±2,5
MMKGli.+Ac. Linol. 1,0 g/L	72	5,63 ±0,4	98,69	±0,2	1,31	±0,2	42,45	±1,6

MMK: Meio mineral com canamicina (50 µg/mL); MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); ND: não determinado.

A Figura 5.8 compila os resultados obtidos nos experimentos com estes ácidos graxos testados.

Figura 5.8– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido graxos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp.}*; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJ_{Ah}*. De cima para baixo, gráficos: **1** - ácido láurico; **2** – ácido linoleico; **3** – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L). (Continua)

Figura 5.8– Copolímeros acumulados a partir de glicose (10 g/L) e ácido graxos (1 g/L) por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*; LFM344pBBR1MCS-2::*phaCJA_h*. De cima para baixo, gráficos: **1** - ácido láurico; **2** – ácido linoleico; **3** – percentagem de PHA em relação à massa seca celular (MSC – g/L). (Conclusão)

B. sacchari não é capaz de usar óleos vegetais como fonte de carbono, pois provavelmente não apresentam lipases (MATSUDA, 2009). Entretanto, este micro-organismo metaboliza ácido graxos, componentes de óleos vegetais, como substratos para a formação de monômeros de cadeia média, conforme resultados observados neste trabalho. Uma alternativa de uso de fontes renováveis para produção de monômeros de cadeia média por esta bactéria será o uso de misturas de ácidos orgânicos. Esta mistura é produzida pela empresa holandesa Wate2Chemical, sendo sintetizada por culturas mistas de bactérias, a partir de rejeitos industriais e domésticos (STEINBUSCH et al, 2011).

5.2 Avaliação da produção de P(3HB-co-3HHx) por linhagens de *B. sacchari* a partir de glicose e ácido hexanoico em biorreator

Na tentativa de se obter, em um primeiro momento, dados relativos à resposta de *B. sacchari* em produzir o copolímero P(3HB-co-3HHx), sob diversas condições de cultivo e parâmetros controladas, como disponibilidade de fontes de carbono, pH e O₂, foram conduzidos alguns experimentos em biorreator.

Em princípio, foram realizados dois experimentos em biorreator, ambos com limitação em nitrogênio e fornecimento, de maneiras distintas, de soluções contendo glicose e ácido hexanoico, no momento do acúmulo de polímero (Tabela 4.6), de acordo com cálculos obtidos a partir dos resultados de Mendonça (2010). Limitações em fósforo ou nitrogênio foram consideradas mais adequadas para maior produtividade de PHA por *B. sacchari* (SILVA et al., 2004).

Estes experimentos permitiram definir as condições de cultivos posteriores com linhagens recombinantes de *B. sacchari* abrigando genes de *Aeromonas* spp. construídas neste trabalho.

5.2.1 Experimentos em biorreator utilizando *B. sacchari* selvagem com limitação em nitrogênio e alimentação de glicose e ácido hexanoico por diferentes métodos

Os cultivos que utilizaram MM2 com limitação em nitrogênio (ROCHA et al., 2008) foram realizados para verificar se concentrações mais baixas de glicose, durante a fase de crescimento, eliminam o acúmulo de PHA por *B. sacchari*, a fim de evitar formação de polímero com composição não uniforme, ou seja, em blocos contendo 3HB e 3HB-co-3HHx (Tabela 4.6). Além disso, permitiu estudar se o fornecimento de concentrações de ácido hexanoico baixas e constantes permite um acúmulo maior de unidades 3HHx.

Inicialmente, foram definidas concentrações ideais para o fornecimento de substratos. Em ambos os experimentos descritos abaixo, foram utilizadas soluções de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L), definidos segundo o experimento anterior. O uso dessas concentrações de fonte de carbono partiu da ideia de fornecer uma quantidade de glicose e ácido hexanoico que permitisse obter um polímero com elevada fração 3HHx (por volta de 20 mol%). Foram fornecidos cerca de 0,77 mols de

glicose para 0,38 mols de ácido hexanoico. Como cada mol de glicose permite fazer um mol de 3HB e cada mol de ácido hexanoico 1 mol de 3HHx, se cada substrato fosse convertido a seus respectivos monômeros, seria obtido cerca de 33 mol% de 3HHx no polímero. Entretanto, considerando-se que parte do ácido hexanoico poderia ser convertido a acetil e butiril, e contribuir para a síntese de 3HB, a fração molar de 3HHx seria menor.

No primeiro experimento (B00), glicose foi fornecida a 10 g/L, na fase de crescimento e foram realizadas 4 alimentações, durante a fase de acúmulo, com soluções contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L), sendo a concentração final deste último 0,9 g/L no meio. No segundo experimento (B01), glicose foi mantida a 3 g/L, no crescimento, e ácido hexanoico 0,2 g/L, no acúmulo, com fornecimento de solução de alimentação contendo esses dois substratos, nas mesmas concentrações citadas anteriormente, via controle de pH (Tabela 5.10).

Tabela 5.10- Alimentação dos cultivos de *B. sacchari* em biorreator para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico.

Fase de crescimento		Fase e acúmulo PHA	
Cultivos	Glicose	Glicose 140 g/L*	Ácido hexanoico 45 g/L*
B00	1 x 10 g/L	4 x (Gli 2,8 g/L + Ác. Hex. 0,9 g/L)	
B01	3 x 3 g/L	Ac. Hex 0,2 g/L + alimentação via controle pH*	

Para o primeiro e segundo ensaios, as velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\max}$) atingiram 0,28 h⁻¹ e 0,27 h⁻¹, respectivamente.

Os dados obtidos nestes experimentos estão descritos na Tabela 5.11 e na Figura 5.9. Pode-se observar que o teor de PHA durante a fase de crescimento, entre 2 e 12 h, foi bastante semelhante nos dois cultivos, oscilando entre 13 e 25% durante a fase exponencial e atingindo cerca de 40% da massa seca celular ao final dessa fase. Estes resultados indicam que o suprimento de glicose em menor concentração não foi efetivo em promover um menor acúmulo de 3HB durante a fase de crescimento. O não acúmulo de 3HB durante a fase de crescimento é desejável, pois evitaria a formação de blocos de polímero com diferentes composições ao final do processo.

Tabela 5.11- Cultivos de *B. sacchari* em biorreator (B00 e B01) para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico (0,9 g/L - cultivo 1 - e 0,2 g/L - cultivo 2). (Continua)

Cultivo B00				
Tempo	MSC	PHA (mol%)		PHA
(h)	(g/L)	3HB	3HHx	(%MSC)
0	0,49	100,00	0,00	44,90
2	0,41	100,00	0,00	30,00
4	0,77	100,00	0,00	18,36
6	1,54	100,00	0,00	18,08
8	2,99	100,00	0,00	25,71
10	4,21	100,00	0,00	38,17
12	5,25	100,00	0,00	43,56
23	6,14	99,77	0,23	43,08
25	7,10	99,66	0,34	43,17
27	7,78	99,65	0,35	46,51
29	8,36	99,60	0,40	46,95
30,5	8,34	99,59	0,41	53,39
32,5	8,94	99,58	0,42	48,59
34,75	4,62	99,57	0,43	48,36
36,15	ND	100,00	0,00	13,07
Cultivo B01				
0	0,38	100,00	0,00	29,32
2	0,46	100,00	0,00	20,86
4	0,90	100,00	0,00	13,63
6	1,81	100,00	0,00	12,87
8	2,77	100,00	0,00	22,57
10	2,77	100,00	0,00	38,51
12	4,64	100,00	0,00	44,92
14	8,89	100,00	0,00	51,62
16	10,05	100,00	0,00	43,74
18	11,17	100,00	0,00	56,73
20	11,03	100,00	0,00	52,02
22	11,23	100,00	0,00	50,29
24	11,07	100,00	0,00	57,37
26	11,07	100,00	0,00	52,61
28	12,24	99,84	0,19	50,21
30	12,06	99,73	0,27	54,74
32	12,94	99,81	0,19	51,24
34	11,74	99,63	0,37	54,79
36	13,24	99,69	0,31	55,72
38	ND	99,77	0,23	53,06

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C);
3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C).

Observa-se, na Figura 5.9, que o início do acúmulo de 3HHx é detectado no ensaio 1 em 23 h de cultivo, enquanto no ensaio 2 em 28 h. O ácido hexanoico estava disponível nas 13 h de cultivo no experimento B00 e nas 16 h no experimento B01.

Durante a fase de acúmulo, no cultivo (B01) em que a concentração de ácido hexanoico foi mantida em 0,2 g/L, a massa seca celular atingiu cerca de 13 g/L, contendo 55% de PHA, com até 0,37 mol% de 3HHx. No cultivo B00, a concentração celular atingiu cerca de 8 g/L, contendo até 50% de PHA, com até 0,43 mol% de 3HHx. Os resultados indicam que a manutenção de concentrações mais altas de ácido hexanoico durante a fase de acúmulo de PHA permite alcançar maiores teores de monômeros 3HHx.

No ensaio B00 podemos verificar que a concentração inicial de nitrogênio é aproximadamente 0,6 g/L, caindo para 0,2 g/L, a partir de 12 h de cultivo, quando se inicia a fase de acúmulo. Já no cultivo B01, o nitrogênio está na concentração de 0,6 g/L quando se inicia o experimento, chegando a mais ou menos 0,1 g/L quando se inicia fase de acúmulo, em 17 h de cultivo.

Figura 5.9- Produção de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari*. No primeiro gráfico – (B00) cultivo suprido com glicose inicial na concentração de 10g/L e manutenção da concentração de ácido hexanoico até 0,9 g/L na fase de acúmulo. No segundo gráfico - (B01) cultivo com manutenção da concentração inicial de glicose inferior a 3 g/L e, na fase de acúmulo, com concentração de ácido hexanoico atingindo 0,2 g/L. (Continua)

Figura 5.9- Produção de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari*. No primeiro gráfico – (B00) cultivo suprido com glicose inicial na concentração de 10g/L e manutenção da concentração de ácido hexanoico até 0,9 g/L na fase de acúmulo. No segundo gráfico - (B01) cultivo com manutenção da concentração inicial de glicose inferior a 3 g/L e, na fase de acúmulo, com concentração de ácido hexanoico atingindo 0,2 g/L. (Conclusão)

Diante dos dados obtidos nestes ensaios, optou-se por utilizar outra estratégia, descrita a seguir, para cultivar *B. sacchari* em biorreator. Em experimentos em biorreator cultivando *Pseudomonas* sp., Taciro (2008) obteve acúmulo de maiores teores de PHA sob limitação em fósforo, no qual 70% da massa seca celular (MSC) produzida era polímero. A limitação em nitrogênio, neste caso, promoveu acúmulo de 68% de PHA, em relação à MSC.

5.2.2 Experimento em biorreator com *B. sacchari* selvagem e limitação em fósforo para cálculo de velocidades de consumo glicose e ácido hexanoico

Experimento em MM3 com limitação em fósforo (TACIRO, 2008) (B02) foi realizado para verificar a velocidade específica máxima de consumo ($\mu_{S_{max}}$) de ácido hexanoico em concentrações gradativamente mais altas (0,25 a 1,5 g/L), em presença de glicose em concentração não limitante, variando entre 10-15 g/L. A cada concentração fornecida acompanhou-se periodicamente o cultivo, em minutos ou horas, até o completo consumo desde substrato. A Figura 5.10 mostra como o ácido hexanoico foi consumido neste experimento, em cada concentração fornecida.

É possível observar na Figura 5.10 que o tempo de consumo de ácido hexanoico em baixas concentrações (0,25 g/L) foi menor que naquelas mais altas, o que era esperado, pois quanto mais alta a concentração do ácido, mais tóxico este será para o micro-organismo. Numa concentração de cerca de 0,25 g/L, o ácido hexanoico foi consumido por *B. sacchari*, na presença de glicose, em aproximadamente 40 min. Quando a concentração do ácido foi dobrada, cerca de 0,5 g/L, o tempo de consumo aumentou para cerca de 2 h e 10 min. O mesmo padrão de tempo de consumo foi verificado à medida que se utilizou maiores concentrações de ácido hexanoico, ou seja, esta interfere na velocidade de consumo.

Figura 5.10- Consumo de ácido hexanoico nas concentrações 0,25 a 1,5 g/L por *B. sacchari* em experimento em biorreator (B02) contendo MM3 com limitação em fósforo (TACIRO, 2008), na presença de glicose entre 10-15 g/L. Os valores são médias de duas leituras de concentração de ácido.

Utilizando-se os dados obtidos sobre o consumo de ácido hexanoico e glicose, foram feitos cálculos das velocidades específicas de consumo (μS) destas fontes de carbono (Figura 5.11). Como se pode observar, à concentração de 0,25 g/L, o ácido hexanoico foi consumido a uma velocidade específica máxima de consumo de substrato ($\mu S_{\max \text{Ac.hex.}}$) $0,06 \text{ h}^{-1}$ e cai para $0,03 \text{ h}^{-1}$ quando a concentração do ácido sobe para 1,5 g/L. Em relação à glicose, pode-se verificar que o consumo desta fonte de carbono foi

influenciado pela presença de ácido hexanoico. Nas condições testadas, obtiveram-se $\mu_{S_{\text{maxGlicose}}}$ com valores entre 0,6 e 0,3 h^{-1} .

Calculou-se uma vazão de alimentação apropriada, baseada na velocidade de consumo máxima do ácido hexanoico na concentração de 0,5 g/L [0,0445 g(Ác.Hex)/g(células).h] (Figura 5.11). A intenção ao utilizar os valores obtidos para $\mu_{S_{\text{Ácido hexanoico}}}$ na concentração de 0,5 g/L foi a de fornecer a quantidade máxima deste substrato para que o micro-organismo o consumisse por completo, utilizando-o para produzir monômeros 3HHx e sem que a concentração desse ácido aumentasse no meio de cultura.

Figura 5.11- Velocidade específica máxima de consumo máxima ($\mu_{S_{\text{max}}}$) de ácido hexanoico nas concentrações 0,25 a 1,5 g/L de e glicose entre 10 e 15 g/L por *B. sacchari*.

O cálculo foi realizado da seguinte forma: multiplicou-se $\mu_{S_{\text{Ac.hex}}}$ na concentração escolhida [0,445 g(Ác.Hex)/g.(células).h] pela concentração celular obtida (5 g/L), dividindo o resultado pela concentração da solução de ácido hexanoico que seria oferecida (45 g/L). O resultado deste cálculo para vazão específica foi 4,95 mL/L.h.

5.2.3 Experimento em biorreator com *B. sacchari* selvagem e limitação em fósforo utilizando vazão de alimentação específica

Utilizando a vazão calculada, foi realizado um experimento em biorreator (B03) com fase de crescimento suprida por glicose a 15 g/L e fase de acúmulo alimentada por

solução de glicose a 140 g/L e ácido hexanoico a 45 g/L a uma vazão de 4,95 mL/h.L. Nestas condições, a concentração de substratos oferecida foi 0,69 g/L.h (0,012 g/L.min) para glicose e 0,22 g/L.h (0,004 g/L.min) para ácido hexanoico.

Os dados obtidos neste experimento são mostrados na Tabela 5.12. A massa seca celular máxima atingiu cerca de 14 g/L entre 27,5 e 39 h de cultivo. A porcentagem máxima de PHA total acumulada em relação à massa seca foi 84,09%. O teor de 3HHx alcançou 0,66 mol% em 27,5 h de experimento e subiu para 0,88 mol% ao final. Os fatores de conversão de glicose em Xr e monômeros 3HB e de ácido hexanoico em 3HHx foram calculados (Tabela 5.12), e os respectivos valores médios foram: $Y_{Xr/Gli} = 0,219$; $Y_{3HB/Gli} = 0,202$; $Y_{3HHx/AHex} = 0,010$.

Tabela 5.12 - Cultivo de *B. sacchari* selvagem em biorreator com limitação em fósforo (B03) para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	$Y_{(Xr/Gli)}$ (g/g)	$Y_{(3HB/Gli)}$ (g/g)	$Y_{(3HHx/AHex)}$ (g/g)
		3HB	3HHx				
0	0,69	100,00	0,00	25,8	ND	ND	
1,5	0,28	100,00	0,00	23,13	ND	ND	
3,0	0,80	100,00	0,00	22,23	1,425	ND	
4,5	1,03	100,00	0,00	19,25	0,501	0,031	
6,0	1,54	100,00	0,00	16,87	0,371	0,040	
7,5	2,38	100,00	0,00	18,32	0,378	0,068	
9,25	3,96	100,00	0,00	32,81	0,305	0,157	
10,5	5,22	100,00	0,00	41,79	0,268	0,208	
12,0	7,00	100,00	0,00	50,86	0,226	0,253	
13,0	7,18	100,00	0,00	55,91	0,189	0,263	
14,5	7,64	99,87	0,13	57,93	0,178	0,268	0,021
16,5	9,45	99,67	0,33	67,38	0,149	0,333	0,022
18,5	ND	99,56	0,44	65,07	0,162	0,323	0,018
20,5	11,88	99,45	0,55	60,6	0,185	0,302	0,017
24,0	13,54	99,36	0,64	73,51	0,123	0,354	0,018
27,5	14,40	99,34	0,66	74,51	0,111	0,335	0,015
39,0	14,13	99,65	0,35	69,62	0,099	0,238	0,006
41,75	13,44	99,71	0,29	77,74	0,068	0,240	0,005
43,5	13,61	99,71	0,29	70,36	0,085	0,211	0,004
46,5	12,91	99,75	0,25	84,09	0,043	0,222	0,004
50,5	12,72	99,69	0,31	67,01	0,077	0,169	0,003
61,5	12,10	99,34	0,66	64,15	0,070	0,136	0,004
65,5	12,16	99,33	0,67	65,60	0,064	0,133	0,004
68,5	12,21	99,35	0,65	70,33	0,056	0,138	0,004
72,5	12,02	99,3	0,70	65,49	0,062	0,127	0,004
86,92	10,89	99,12	0,88	62,67	0,059	0,109	0,004

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); $Y_{(Xr/Gli)}$: fator de conversão de glicose em biomassa residual; $Y_{(3HB/Gli)}$: fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; $Y_{(3HHx/AHex)}$: fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 13,34 h de cultivo.

Neste experimento, o $\mu_{\max}$ atingido foi de $0,26 \text{ h}^{-1}$. A fase de crescimento, nestas condições, durou cerca de 12 h. Pôde-se observar uma pequena fase de adaptação celular até, aproximadamente, 4 h de cultivo. Esta fase lag foi também observada no ensaio anterior, o primeiro com limitação nitrogênio (Figura 5.9), entretanto para ambos os cultivos com limitação em nitrogênio, a fase lag foi menor quando comparada àquela dos cultivos com limitação em fósforo (Figura 5.12).

Figura 5.12- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari* de cultivo em biorreator (B03) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico a uma vazão de alimentação de $4,95 \text{ mL/L.h}$.

Na Figura 5.12, estão apresentados os gráficos referentes ao cultivo B03. Os resultados mostram consumo de glicose e nitrogênio e produção de biomassa, PHA total e monômeros 3HB e 3HHx acumulados em g/L. Pode-se observar que, apesar deste experimento estar limitado em fósforo (APÊNDICE F - Tabela A.7), a limitação em nitrogênio também está presente pouco antes de 30 h de cultivo. Nos experimentos realizados com limitação em fósforo, obteve-se também uma limitação tardia de nitrogênio, em aproximadamente 30 h de cultivo. O PHA total acumulado atingiu 10,86 g/L em 46,50 h de ensaio e, após este tempo, ocorre um decréscimo na produção de PHA e, consequentemente na biomassa total. O acúmulo de PHA máximo foi de 10,73 g/L atingindo em 27,50 h de experimento. Foi consumida 36,25 g/L de glicose e 9,96 g/L de ácido hexanoico em 86,92 h de ensaio. Uma observação interessante neste experimento foi entre 14,50 e 27,50 h, a medida de aumentava a concentração de ácido hexanoico no meio de cultura, podia-se verificar o aumento no acúmulo de 3HHx. Neste período do ensaio, foram fornecidas 3,07 g/L de ácido hexanoico e a concentração de 3HHx acumulado foi 0,071 g/L (correspondente a 0,66 mol % do monômero em questão).

5.2.4 Experimento com limitação em fósforo utilizando vazão de alimentação específica - *B. sacchari* recombinante abrigando o operon *phaPCJ_{Asp}*.

Após verificar que a linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) apresentava acúmulo de maior teor de 3HHx em experimentos em frascos agitados, foi realizado experimento em biorreator (B04). As condições empregadas neste cultivo foram iguais àsquelas do experimento anterior (que usou a linhagem selvagem), fornecendo solução de alimentação (glicose 140 g/L e ácido hexanoico 45 g/L) a uma vazão de 4,95 mL/L.h.

O experimento foi realizado conforme descrito no item 4.3.3.2 de Material e Métodos. A velocidade específica de crescimento ($\mu_{\max}$) foi de 0,22 h⁻¹, menor quando comparada àquela observada para a linhagem selvagem (0,26 h⁻¹) nas mesmas condições de cultivo. Isto poderia ser explicado pelo fato de se tratar de uma linhagem mutante, com carga genética diferente da selvagem, pela presença DNA exógeno.

Este ensaio teve duração de 53 horas e alcançou uma biomassa de 20 g/L. A produção de PHA total máxima foi de 58,63% da MSC, nas 52,5 h de cultivo (Tabela 5.13). O acúmulo de 3HHx chegou a pouco mais de 26 mol% ao final do experimento. O

consumo de glicose foi de 39 g/L e de ácido hexanoico cerca de 6 g/L, na fase de acúmulo. Cerca de 1,46 mg/L de fósforo foi detectado até 11,5 h de cultivo (APÊNDICE F - Tabela A.8).

Os valores médios de fatores de conversão foram: $Y_{Xr/Gli} = 0,295$ g/g; $Y_{3HB/Gli} = 0,205$ g/g; $Y_{3HHx/AHex} = 0,609$ g/g (Tabela 5.13). Comparando-se estes dados com aqueles do experimento realizado nas mesmas condições com a linhagem selvagem, a conversão de ácido hexanoico em 3HHx foi melhorada em mais de 60%, utilizando a linhagem recombinante testada. Os dados relativos à biomassa, produção de PHA e consumo de substratos para este experimento estão apresentados na Figura 5.13.

Tabela 5.13- Cultivo de *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B04) com limitação em fósforo, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de 4,95 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	$Y_{Xr/Gli}$ (g/g)	$Y_{3HB/Gli}$ (g/g)	$Y_{3HHx/Hex}$ (g/g)
		3HB	3HHx				
0,00	0,74	100,00		35,81	ND	ND	
2,00	0,73	100,00		31,11	0,038	ND	
4,00	1,1	100,00		28,91	0,247	0,043	
5,50	1,37				0,647	ND	
7,00	1,79	100,00		30,21	0,295	0,104	
8,50	2,65	100,00		29,33	0,354	0,129	
10,00	3,54	100,00		30,01	0,299	0,118	
11,50	5,2	ND		ND	0,475	ND	
13,00	6,67	100,00		43,19	0,253	0,196	
14,50	7,85	98,82	1,18	42,37	0,252	0,186	0,159
16,00	8,38	95,33	4,67	45,72	0,246	0,201	0,417
17,50	8,92	91,96	8,04	42,95	0,269	0,188	0,505
19,50	9,28	89,47	10,53	46,69	0,252	0,20	0,537
21,50	10,04	84,81	15,19	45,96	0,267	0,195	0,643
24,50	12,02	82,57	17,43	50,29	0,281	0,238	0,727
26,00	12,23	81,37	18,63	47,04	0,298	0,217	0,661
29,50	13,91	79,28	20,72	52,19	0,290	0,254	0,738
39,50	16,58	75,31	24,69	54,2	0,289	0,260	0,696
43,50	18,55	74,26	25,74	57,61	0,286	0,291	0,756
45,50	18,64	73,55	26,45	55,54	0,295	0,274	0,713
49,50	19,79	73,48	26,52	58,17	0,282	0,290	0,713
52,50	20,82	73,55	26,45	58,63	0,284	0,298	0,701
62,50	20,82	73,43	26,57	57,01	0,285	0,280	0,560

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); $Y_{Xr/Gli}$: fator de conversão de glicose em biomassa residual; $Y_{3HB/Gli}$: fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; $Y_{3HHx/AHex}$: fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 12,05 h de cultivo.

Em cultivo de alta densidade celular, Kahar et al. (2004) cultivaram *R. eutropha* H16 PHB-4/pJRDEE32d13 contendo *phaC_{Ac}* em óleo de soja, sob limitação em fósforo,

obtiveram biomassa celular alcançando 128–138 g/L, sendo 71-74% de PHA, cuja composição era 95 mol% de 3HB e 5 mol% de 3HHx.

Figura 5.13- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo em biorreator (B04) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h

Riedel et al. (2012) reportaram cultivo de uma linhagem recombinante de *R. eutropha* abrigando os genes *phaC2_{Ra}* (*Rhodococcus aetherivorans*) e *phaI1_{Pa}* em alta densidade (atingindo 119 g/L de MSC) em batelada alimentada utilizando ureia como fonte

de nitrogênio e óleo de dendê na concentração aproximada de 5 g/L. Nestas condições, 74% da MSC era PHA e a fração molar de 3HHx alcançou 19 mol%.

Kamilah et al. (2013) cultivaram o recombinante de *R. eutropha* H16 PHB-4/pJRDEE32d13 abrigando *phaC_{Ac}* em fermentador, fornecendo 2,5 g/L de óleos vegetais usados. Neste experimento, obteve-se biomassa chegando a 25,4 g/L, sendo que 73% correspondia PHA e o conteúdo de 3HHx no copolímero foi 6 mol%.

5.3 Teste de meios de cultura para *B. sacchari* selvagem

5.3.1 Experimentos com meios de cultura teste para *B. sacchari* selvagem

Foi observado em nosso laboratório, quando analisadas as curvas de crescimento de *B. sacchari* selvagem dos últimos experimentos realizados em biorreator, que a fase exponencial de crescimento dessa bactéria estava mais curta que o esperado (GOMEZ et al., 1996; MATEUS, 2003). Para verificar isto, propuseram-se experimentos em frascos agitados conforme descrito no item 4.3.1.3 e na Tabela 4.4. Foram experimentadas diferentes concentrações para alguns nutrientes em dois blocos de ensaios. No primeiro, os nutrientes testados foram ferro (Fe), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). MM1 (ROCHA et al., 2008) foi utilizado como controle. Estes elementos foram testados por serem importantes para o crescimento celular. O Fe está envolvido no metabolismo energético, pois participa da composição dos citocromos, proteínas ferro-enxofre (transportadores de elétrons), sendo importante na respiração, e também é um cofator de enzimas. O Ca e o Mg são ambos cofatores de enzimas e, o último estabiliza o ribossomo na síntese proteica e na membrana celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A Figura 5.14 (Gráfico 1) mostra os resultados obtidos para o primeiro bloco de experimentos, a partir de medidas de densidade óptica (DO_{600nm}). Observa-se que as curvas para as duas concentrações de Fe testadas (0,006 e 0,012 g/L) se estabilizam antes das demais, e tal condição foi repetida no segundo bloco de experimentos. Entendeu-se que seria apropriado repetir as curvas para os meios contendo Ca (0,002 e 0,004), uma vez que, apresentando menor concentração que o meio controle (Ca = 0,01 g/L), tiveram um crescimento maior.

Já no segundo bloco de experimentos, de posse dos resultados do primeiro, foram testados apenas Fe e Ca em outras concentrações. Estes experimentos (Figura 5.14 –

Gráfico 2) indicaram que o Fe na formulação de meio utilizada para cultivos em biorreator seria um nutriente limitante. Como se pode verificar, a curva contendo Fe na concentração 0,06 g/L (controle – MM1) e 0,120 g/L são bastante semelhantes. Quando o meio continha Fe em concentrações menores (0,006 e 0,012 g/L) as curvas se estabilizam entre 10 e 15 h de cultivo, o mesmo ocorrido nos ensaios do bloco 1.

Figura 5.14- Experimentos com linhagens de *B. sacchari* selvagem para teste de meios de cultivo. **Gráfico 1** - (Bloco 1): MM1 (ROCHA *et al.*, 2008) continha Fe (0,06 g/L) Ca (0,01 g/L) e Mg (0,02 g/L). **Gráfico 2** - (Bloco 2): MM1 (ROCHA *et al.*, 2008) continha Fe (0,06 g/L) Ca (0,01 g/L) e Mg (0,02 g/L). Cada ponto representa a média de medidas tomadas em duplicata.

Baseando-se nos meios de cultura previamente utilizados e adicionando os dados obtidos a partir desses experimentos teste em frascos agitados, foi proposta uma nova formulação de meio de cultura, para teste em biorreator, apresentada a seguir.

5.3.2 Experimento em biorreator com *B. sacchari* selvagem utilizando o meio de cultura reformulado

O novo meio de cultura formulado para biorreator foi testado em cultivo com *B. sacchari* selvagem (B05), conforme condições de cultivo descritas no item 4.3.3.4 de Material e Métodos. As formulações dos meios MM3 com limitação em fósforo (TACIRO, 2008), usada previamente, e Meio Mineral reformulado (com limitação em nitrogênio), utilizada neste experimento, estão descritas na Tabela 5.14. A concentração de Fe foi aumentada cerca de 10 vezes e a de Ca 5 vezes na nova formulação, os demais elementos foram mantidos nas mesmas concentrações.

Tabela 5.14 – Comparação das formulações de meio de cultura para biorreator para *B. sacchari*: MM3 limitação em fósforo (TACIRO, 2008) e MM reformulado.

Reagentes	MM3 (g/L)	MM reformulado (1L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,907 g	2,907 g
KH ₂ PO ₄	0,203 g	0,388 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,310 g	0,310 g
CaCl ₂ .2H ₂ O (sol. 10 g/L)	0,002 g	0,010 g
Citr. Fe NH ₄ (sol. 60 g/L)	0,006 g	0,060 g
Elementos traços	2 mL	2 mL
NaCl	1 g	1 g
Glicose	15 g	15 g

Composição da solução de elementos traço citada anteriormente MM1(ROCHA *et al.*, 2008).

A Figura 5.15 mostra a curva de crescimento e a produção de biomassa obtida no ensaio B05. A velocidade específica máxima de crescimento foi de 0,28 h⁻¹, conforme também observada nos experimentos anteriores.

De acordo com os dados observados na Figura 5.15, pode-se aferir que, de acordo com os dados de biomassa total (Xt) e biomassa residual (Xr), utilizando esta nova fórmula de meio de cultura, a fase exponencial de crescimento ocorreu com acúmulo de polímero.

A ausência ou o mínimo de acúmulo é desejável uma vez que a síntese de polímeros na fase de crescimento gera, neste caso específico da biossíntese de copolímeros dependente de substrato adicionado somente na fase de acúmulo, a formação de polímeros com cadeias contendo blocos de homopolímero P(3HB), seguida de outra parte contendo dois monômeros (3HB e 3HHx).

Figura 5.15-. Representação gráfica de dados obtidos para *B. sacchari* selvagem para teste de meio de cultivo formulado para biorreator com solução de alimentação (glicose 140 g/L e ácido hexanoico 45 g/L) suprida nas vazões 4,95 mL/L.h e 9,9 mL/L.h (B05). Gráfico 1: Velocidade específica de crescimento; Gráfico 2: Biomassa total (X_t) e biomassa residual (X_r) produzidas nas condições experimentais citadas.

Observando a Tabela 5.15, pode-se verificar que nas 11 h de cultivo iniciou-se a fase de acúmulo. O PHA acumulado atingiu quase 60% da massa seca celular (MSC) ao

final do cultivo. O conteúdo de 3HHx alcançou cerca de 1,1 mol% e os fatores de conversão médios foram: $Y_{Xr/Gli} = 0,194$ g/g; $Y_{3HB/Gli} = 0,077$ g/g; $Y_{3HHx/AHex} = 0,080$ g/g. Utilizando o MM reformulado neste cultivo, para a linhagem selvagem, o fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx foi de quase 10% do valor máximo teórico ($Y_{3HHx/AHex} = 0,98$ g/g), enquanto para ensaio com MM3 limitação em fósforo (B03), este fator representou apenas 1% daquele valor teórico. Entretanto, o fator de conversão da glicose em 3HB para este experimento foi aquém daquele observado para experimento utilizando MM3, representado, respectivamente, 16% e 42% do máximo teórico ($Y_{3HB/Gli} = 0,48$).

Tabela 5.15- Cultivo em biorreator de *B. sacchari* selvagem em MM reformulado (B05) alimentado por solução contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) nas vazões de 4,95/9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)	Y(3HHx/Hex) (g/g)
		3HB	3HHx				
0,0	0,64	100,00	0,00	25,17	ND	ND	
2,0	0,71	100,00	0,00	24,75	0,044	0,012	
4,0	1,12	100,00	0,00	18,24	0,091	0,009	
6,0	2,36	100,00	0,00	17,95	0,281	0,051	
8,0	3,69	100,00	0,00	21,04	0,323	0,081	
10,0	7,08	100,00	0,00	26,54	0,332	0,120	
12,0	7,33	100,00	0,00	22,26	0,302	0,085	
14,0	7,64	99,89	0,11	19,64	0,293	0,070	
17,0	7,99	99,67	0,33	20,47	0,264	0,067	0,086
20,0	8,36	99,57	0,43	19,57	0,249	0,059	0,087
23,0	8,55	99,10	0,90	17,74	0,236	0,050	0,164
26,0	8,72	99,36	0,64	23,37	0,206	0,061	0,093
29,0	9,19	99,31	0,69	19,09	0,211	0,049	0,087
31,7	9,19	99,21	0,79	21,52	0,194	0,052	0,090
42,3	11,16	99,03	0,97	29,42	0,175	0,070	0,081
45,0	11,62	99,02	0,98	32,01	0,17	0,076	0,078
48,0	11,84	99,05	0,95	29,38	0,172	0,069	0,071
50,0	11,79	98,90	1,10	34,71	0,155	0,077	0,078
52,0	12,77	98,89	1,11	40,69	0,146	0,092	0,074
54,0	13,40	98,87	1,13	42,54	0,142	0,097	0,071
56,0	14,08	98,88	1,12	44,01	0,14	0,101	0,067
67,0	17,37	98,89	1,11	57,57	0,112	0,135	0,054
69,1	17,98	98,87	1,13	57,73	0,113	0,137	0,053
72,0	18,91	98,90	1,10	58,77	0,111	0,142	0,050

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); $Y_{(Xr/Gli)}$: fator de conversão de glicose em biomassa residual; $Y_{(3HB/Gli)}$: fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; $Y_{(3HHx/AHex)}$ fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 1 – 11,45 h de cultivo; 2 – 48,9 h de cultivo.

Aqui foi testada uma nova vazão de alimentação. Assim, de 12 a 48 h de cultivo a vazão utilizada foi 4,95 mL/L.h, a mesma dos experimentos anteriores. Após 48 h de

cultivo, até o final deste (72 h), aplicou-se a vazão 9,9 mL/L.h, o dobro da primeira utilizada, com a qual as células ainda foram capazes de consumir por completo os substratos fornecidos, conforme era o objetivo do uso de tal estratégia de alimentação (Figura 5.16). De posse destes resultados, decidiu-se aumentar a vazão de alimentação para os próximos experimentos (APÊNDICE F – Tabela A.9).

Figura 5.16- Consumo de substrato e formação de produtos resultantes de experimento com *B. sacchari* selvagem para teste de meio de cultivo em biorreator (B05) com solução de alimentação (glicose 140 g/L e ácido hexanoico 45 g/L) suprida nas vazões 4,95 mL/L.h e 9,9 mL/L.h.

5.3.3 Experimento em biorreator com *B. sacchari* recombinante LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} utilizando meio de cultura reformulado (B06)

A fim de testar o novo meio de cultura formulado, foi realizado experimento em biorreator utilizando a linhagem recombinante LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034), nas mesmas condições testadas anteriormente, com modificação apenas na vazão de alimentação (B06). Para o crescimento, supriu-se glicose (15 g/L) e, na fase de acúmulo, foram alimentados glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) com vazão constante de 9,9 mL/L.h .

A fase de crescimento durou cerca de 13 h e a velocidade específica máxima de crescimento calculada foi de $0,23 \text{ h}^{-1}$, valor semelhante àquele obtido pela mesma linhagem

quando cultivada em MM3, um pouco inferior ao valor apresentada para os experimentos com a linhagem selvagem.

A Tabela 5.16 e a Figura 5.18 mostram os dados referentes ao experimento B06. A solução de alimentação foi suprida a partir das 13,5 h de cultivo, fase de acúmulo. A biomassa total atingiu 16 g/L, com conteúdo de PHA ao redor de 70%. A fração máxima de 3HHx foi de 21 mol% ao final do cultivo. Os fatores de conversão substrato produto foram: $Y_{Gli/Xr} = 0,175$ g/g, $Y_{3HB/Gli} = 0,212$ g/g e $Y_{3HHx/AHex} = 0,492$ g/g. Estes valores são menores que àqueles observados para o cultivo anterior com esta linhagem em MM3.

Tabela 5.16- Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B06), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)	Y(3HHx/Hex) (g/g)
		3HB	3HHx				
0,00	0,55	100,00	0,00	44,62			
2,00	0,81	100,00	0,00	47,29	0,087	0,097	
4,33	0,90	100,00	0,00	44,94	0,100	0,084	
6,00	1,37	100,00	0,00	45,90	0,134	0,118	
8,00	2,12	100,00	0,00	46,24	0,153	0,135	
10,00	3,35	100,00	0,00	43,52	0,242	0,185	
12,00	5,22	100,00	0,00	47,18	0,251	0,226	
14,00	8,45	96,52	3,48	40,61	0,304	0,199	0,751
16,00	9,91	88,62	11,38	48,57	0,264	0,221	0,414
18,00	11,61	84,69	15,31	58,99	0,217	0,266	0,526
21,00	12,52	81,47	18,53	61,39	0,189	0,246	0,378
24,00	16,91	80,06	19,94	68,65	0,183	0,321	0,486
27,00	17,84	80,89	19,11	71,76	0,156	0,320	0,503
30,00	17,09	81,19	18,81	68,13	0,156	0,272	0,451
41,00	17,98	79,78	20,22	73,69	0,120	0,265	0,569
44,00	15,54	79,14	20,86	68,54	0,124	0,215	0,506
48,08	16,20	78,65	21,35	69,04	0,127	0,224	0,597

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxi butirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxi hexanoato (6 C); $Y_{(Xr/Gli)}$: fator de conversão de glicose em biomassa residual; $Y_{(3HB/Gli)}$: fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; $Y_{(3HHx/AHex)}$ fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 13,49 h de cultivo.

Na Figura 5.18, estão apresentados os dados de consumo de substrato e acúmulo de PHA calculado em concentração. Os resultados que geraram este gráfico estão apresentados no APÊNDICE F (Tabela A.10).

Figura 5.17- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) de cultivo para teste de meio de cultivo em biorreator (B06) com solução de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

5.4 Modulação da composição monomérica de P(3HB-*co*-3HHx) em cultivos em biorreator utilizando diferentes proporções glicose/ácido hexanoico na solução de alimentação

Resultados previamente obtidos em frascos agitados utilizando algumas linhagens recombinantes construídas, supridas com concentrações crescentes de ácido hexanoico, mostraram ser possível controlar o teor de 3HHx no P(3HB-*co*-3HHx) produzido. Com a finalidade de sintetizar copolímeros com diferentes teores de 3HHx para analisar propriedades térmicas e físicas, foram realizados experimentos em biorreator com a linhagem recombinante LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}*. (LFM1034). Foi utilizado o MM reformulado e variou-se a proporção de glicose/ácido hexanoico na solução de alimentação.

Foram desenhados quatro experimentos (B07 a B10) como descrito a seguir: glicose (15 g/L) foi suprida na fase de crescimento e, durante a fase de acúmulo, solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (variando de 0 - 33 g/L) foi alimentada na vazão 9,9 mL/L.h.

5.4.1 Experimento em biorreator com *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) (B07)

No primeiro ensaio, foi calculada a concentração da solução de alimentação para glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L), esta última para a obtenção de um copolímero com teor de 15 mol% de 3HHx. As medidas de concentração da solução utilizada para alimentar o experimento, após análises de determinação de carboidrato e ácido orgânico, mostraram que glicose estava a 150,5 g/L e ácido hexanoico a 28,0 g/L.

Tabela 5.17- Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B07), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)	Y(3HHx/Hex) (g/g)
		3HB	3HHx				
0,0	0,63	100,00	0,00	51,95	ND	ND	
2,0	0,73	ND	ND	ND	0,491	ND	
4,0	0,86	100,00	0,00	53,05	0,061	0,072	
6,0	1,04	100,00	0,00	51,44	0,171	0,167	
8,0	1,46	100,00	0,00	45,61	0,235	0,159	
10,0	2,39	100,00	0,00	47,69	0,385	0,326	
12,0	3,40	100,00	0,00	46,59	0,259	0,214	
14,0	5,37	100,00	0,00	47,83	0,251	0,224	
16,0	8,41	100,00	0,00	56,21	0,208	0,268	
18,0	10,14	99,75	0,25	45,28	0,258	0,210	0,016
20,0	11,64	94,46	5,54	50,31	0,237	0,225	0,241
22,0	12,73	90,79	9,21	53,25	0,219	0,225	0,320
24,0	14,57	88,98	11,02	58,78	0,202	0,254	0,372
26,0	15,49	87,32	12,68	63,06	0,178	0,262	0,400
28,0	17,50	86,26	13,74	66,80	0,168	0,287	0,443
30,0	18,45	85,96	14,04	69,43	0,154	0,294	0,457
32,0	17,63	86,47	13,53	69,55	0,138	0,267	0,408
34,0	18,59	87,40	12,60	85,85	0,070	0,330	0,472

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); Y(Xr/Gli): fator de conversão de glicose em biomassa residual; Y(3HB/Gli): fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; Y(3HHx/AHex): fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 17 h de cultivo.

Os dados referentes a este cultivo estão na Tabela 5.17 e na Figura 5.18 (APÊNDICE F - Tabela A.11). A fase de crescimento foi de aproximadamente 18 h, a velocidade específica máxima atingiu 0,20 h⁻¹. A solução de alimentação começou a ser fornecida às 18 h de cultivo, caracterizando o início da fase de acúmulo. A biomassa total atingiu 18 g/L, sendo 70% dela PHA. O teor de 3HHx variou de 13-14 mol%, valor próximo ao esperado. O fato do teor de 3HHx ter sido menor que o calculado foi devido à

concentração mais baixa que a prevista para o ácido hexanoico, na solução de alimentação. Os fatores de conversão de substrato em produto foram os seguintes: 0,217 g/g glicose convertida em Xr (biomassa residual) ($Y_{Gli/Xr}$), 0,236 g/g glicose convertida em 3HB ($Y_{3HB/Gli}$) e 0,348 g/g ácido hexanoico convertido em 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$).

Figura 5.18- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) de cultivo em biorreator (B07) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

5.4.2 Experimento em biorreator com *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) (B08)

Segundo os cálculos para este experimento, a solução de alimentação oferecida conteria glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L), para se atingir aproximadamente 10 mol% de monômeros 3HHx. As medidas de concentração de substratos na solução utilizada para alimentar o cultivo foram: glicose 144,44 g/L e ácido hexanoico 23,75 g/L, valores bastante próximos daqueles calculados.

Os resultados obtidos neste ensaio mostram que a fase de crescimento foi de aproximadamente 18 h, sendo a velocidade específica máxima 0,21 h⁻¹.

A Tabela 5.18 e Figura 5.19 compilam os resultados obtidos neste cultivo (APÊNDICE F - Tabela A.12). A alimentação foi iniciada às 17 h de cultivo. O teor

máximo de PHA acumulado foi 83% da biomassa celular. A biomassa total acumulada foi de 19 g/L ao final do cultivo, momento em que o teor de 3HHx era 10 mol%, entretanto este valor variou entre 10-13 mol%.

Os valores de conversão de substrato em produto foram: 0,266 (g/g) glicose para Xr (biomassa residual), 0,257 (g/g) de glicose para 3HB e 0,301 (g/g) ácido hexanoico para 3HHx.

Tabela 5.18- Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B08), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)	Y(3HHx/Hex) (g/g)
		3HB	3HHx				
0,00	0,61	100,00	0,00	47,84	ND	ND	
2,00	0,76	100,00	0,00	45,05	0,517	0,262	
4,00	0,84	100,00	0,00	44,48	0,953	0,524	
6,00	1,07	100,00	0,00	41,67	0,716	0,360	
8,00	1,70	100,00	0,00	41,22	0,346	0,207	
10,00	2,76	100,00	0,00	53,07	0,265	0,316	
12,00	4,24	100,00	0,00	36,62	0,344	0,184	
14,00	6,33	100,00	0,00	47,46	0,201	0,180	
16,00	8,33	97,38	2,62	50,34	0,187	0,184	0,126
18,00	9,03	94,52	5,48	48,77	0,185	0,166	0,167
20,00	10,10	92,08	7,92	54,03	0,168	0,182	0,222
22,00	6,13	89,61	10,39	63,81	0,073	0,116	0,168
24,00	14,17	88,48	11,52	64,79	0,153	0,249	0,361
26,00	15,00	87,71	12,29	68,67	0,135	0,259	0,379
28,00	16,13	87,32	12,68	70,81	0,127	0,268	0,381
30,00	17,30	86,84	13,16	75,55	0,109	0,289	0,410
32,00	18,71	87,17	12,83	71,65	0,129	0,283	0,380
34,00	20,13	88,81	11,19	75,85	0,113	0,311	0,366
44,00	19,94	89,73	10,27	83,59	0,065	0,282	0,354

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); Y(Xr/Gli): fator de conversão de glicose em biomassa residual; Y(3HB/Gli): fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; Y(3HHx/AHex) fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 13,05 h de cultivo.

Figura 5.19- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-*co*-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) de cultivo em biorreator (B08) para produção de P(3HB-*co*-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

5.4.3 Experimento em biorreator com *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) (B09)

No terceiro experimento, o cálculo para solução de alimentação, para obter um copolímero com 5 mol% de 3HHx, indicou glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L). A solução utilizada no cultivo continha, após análise, glicose a 144,15 g/L e ácido hexanoico a 12,10 g/L, também próxima dos valores esperados. Na Tabela 5.19 podem-se observar os resultados obtidos neste ensaio (APÊNDICE F - Tabela A.13).

Na Figura 5.20, os dados mostram que *B. sacchari* recombinante cresceu a uma velocidade específica máxima de $0,22 \text{ h}^{-1}$ e a fase de crescimento durou cerca de 16 h, quando se iniciou a alimentação da solução de glicose/ácido hexanoico. Os teores de 3HHx estiveram entre 5 e 6 mol% e a biomassa total alcançada foi de 18 g/L. O teor de PHA chegou a cerca de 70% dessa massa durante a fase de acúmulo.

Os fatores de conversão obtidos foram: $Y_{\text{Gli}/X_r} = 0,460 \text{ g/g}$, $Y_{3\text{HB}/\text{Gli}} = 0,457 \text{ g/g}$ e $Y_{3\text{HHx}/\text{AHex}} = 0,483 \text{ g/g}$ (Tabela 5.19).

Tabela 5.19- Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B09), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	PHA (mol%)		PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)	Y(3HHx/Hex) (g/g)
		3HB	3HHx				
0,00	0,66	100,00	0,00	50,16	ND	ND	
2,00	0,78	100,00	0,00	50,05	1,925	1,883	
4,00	1,01	100,00	0,00	46,15	3,026	1,907	
6,00	1,30	100,00	0,00	44,13	0,149	0,092	
8,00	2,01	ND	ND	ND	0,388	ND	
10,00	3,25	100,00	0,00	46,04	0,218	0,175	
12,00	5,09	100,00	0,00	43,22	0,261	0,189	
14,00	8,06	100,00	0,00	42,65	0,251	0,181	
16,00	9,41	97,21	2,79	46,27	0,249	0,204	0,444
18,00	10,42	95,74	4,26	52,29	0,217	0,225	0,434
20,00	11,25	94,62	5,38	60,40	0,176	0,250	0,470
22,00	13,50	93,71	6,29	63,47	0,177	0,285	0,530
24,00	14,72	93,45	6,55	66,16	0,166	0,299	0,513
26,00	15,86	93,28	6,72	68,23	0,156	0,308	0,498
28,00	16,73	93,35	6,65	73,94	0,128	0,330	0,510
30,00	16,96	93,63	6,37	73,77	0,124	0,318	0,456
32,00	18,17	93,28	6,72	73,46	0,128	0,323	0,493
34,00	18,47	94,05	5,95	81,69	0,089	0,352	0,483

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); Y(Xr/Gli): fator de conversão de glicose em biomassa residual; Y(3HB/Gli): fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; Y(3HHx/AHex) fator de conversão de ácido hexanoico em 3HHx; ND = não determinado. Início da alimentação: 12,05 h de cultivo.

Figura 5.20- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) de cultivo em biorreator (B09) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

5.4.4 Experimento em biorreator com *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} utilizando meio de cultura reformulado e solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) (B10)

O quarto e último cultivo deste conjunto de experimentos, com a finalidade de produzir copolímeros com teores modulados de 3HHx, foi realizado apenas para produzir um polímero parâmetro para as análises de propriedades. Um polímero contendo apenas monômeros 3HB foi necessário para comparar o impacto de diferentes teores de monômeros com 6 carbonos nas propriedades do copolímero. Além disso, este deveria ser produzido pela mesma linhagem e condições de cultivo dos demais.

A linhagem recombinante LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) foi então cultivada, sob alimentação de solução de glicose 140 g/L (cuja concentração real, após análises, foi 145,86 g/L). Nesta condição, obteve-se um P3HB que correspondia a cerca de 80% da biomassa total na fase de acúmulo. A massa seca celular chegou a 16 g/L (Tabela 5.20 e Figura 5.21) (APÊNDICE F - Tabela A.14).

Tabela 5.20- Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B10), suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	MSC (g/L)	P3HB (mol%)	PHA (%MSC)	Y(Xr/Gli) (g/g)	Y(3HB/Gli) (g/g)
0,00	0,63	100,00	57,89	ND	ND
2,00	0,77	100,00	51,36	2,763	0,777
4,00	1,04	100,00	50,04	0,513	0,314
6,00	1,43	100,00	47,96	0,251	0,168
8,00	2,20	100,00	51,07	0,233	0,217
10,00	3,62	100,00	50,09	0,256	0,240
12,00	5,57	100,00	48,74	0,250	0,227
14,00	8,26	100,00	43,16	0,282	0,205
16,00	9,22	100,00	51,11	0,229	0,234
17,56	9,84	100,00	53,75	0,208	0,236
20,00	11,12	100,00	58,87	0,181	0,254
21,33	10,42	100,00	66,47	0,130	0,252
23,33	12,75	100,00	65,26	0,149	0,275
26,00	14,46	100,00	73,64	0,116	0,316
28,00	15,11	100,00	74,91	0,108	0,313
30,00	15,44	100,00	77,83	0,093	0,315
32,00	16,24	100,00	76,92	0,097	0,313
40,00	15,44	100,00	79,83	0,073	0,277
42,00	15,52	100,00	83,85	0,060	0,287

MSC: Massa Seca Celular; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); Y(Xr/Gli): fator de conversão de glicose em biomassa residual; Y(3HB/Gli): fator de conversão de glicose em monômeros 3HB; ND = não determinado. Início da alimentação: 12,55 h de cultivo.

A fase de crescimento neste cultivo foi de 14 h e a bactéria cresceu a uma velocidade específica máxima de $0,20 \text{ h}^{-1}$. Os fatores de conversão obtidos foram: $Y_{\text{Gli}/X_r} = 0,333 \text{ g/g}$ e $Y_{3\text{HB}/\text{Gli}} = 0,290 \text{ g/g}$ (Tabela 5.20).

Figura 5.21- Consumo de substratos e biossíntese de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) de cultivo em biorreator (B10) para produção de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

A Tabela 5.21 compila alguns dados nos experimentos B06 a B10. Comparando os fatores de conversão de ácido hexanoico a 3HHx, observa-se que estes variaram entre 0,36 e a 0,50 g/g, para os tempos determinados como final dos cultivos, o que corresponde, respectivamente, a 36,76 e 51% do máximo teórico (0,98 g/g). A produtividade de PHA verificada nestes experimentos esteve em torno de 0,4 g/L.h, do ponto de vista do processo, este valor é alto. Considerando a produtividade alcançada por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) nestes experimentos, sugere-se que esta linhagem é interessante para a produção industrial, pois poderia alcançar valores importantes em cultivos de alta densidade celular. Choi e Lee (1997) reportaram produtividades de cultivos de alta densidade celular para *R. eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Methylobacterium organophilum* e recombinante de *Escherichia coli* entre 1,9 e 2,5 g/L.h. Cultivo de *R. eutropha* em ureia como fonte de nitrogênio e óleo vegetais como fonte carbono alcançou 1,1 g/L.h de PHA (RIEDEL et al, 2012). *B. sacchari* quando cultivada em biorreator *airlift* em um cultivo alimentado com sacarose como fonte de carbono atingiu uma produtividade de 1,7 g/L.h de

Tabela 5.21- Resumos dos dados obtidos nos cultivos de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado (B06 a B10), supridos por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (0 a 45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Experimento	Tempo (h)	Xt (g/L)	PHA (% MSC)	PHA (g/L)	3HHx (mol%)	μ_{Xr} (h ⁻¹)	$Y_{Xr/Gli}$ (g/g)	$Y_{3HB/Gli}$ (g/g)	$Y_{3HHx/AHex}$ (g/g)	P (g/L.h)
B10	32	16,24	76,92	12,49	-	0,20	0,097	0,313	-	0,39
B09	32	18,17	73,46	13,35	6,72	0,22	0,128	0,323	0,493	0,42
B08	34	20,13	75,85	15,27	11,19	0,21	0,113	0,311	0,366	0,45
B07	32	17,63	69,55	12,26	13,53	0,20	0,138	0,267	0,408	0,38
B06	27	17,84	71,76	12,80	19,11	0,23	0,156	0,320	0,503	0,47

B10 – experimento alimentado por solução de glicose (140 g/L).

B09 – experimento alimentado por solução de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L).

B08 – experimento alimentado por solução de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L).

B07 – experimento alimentado por solução de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L).

B06 – experimento alimentado por solução de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L).

Xt- biomassa de células e PHA.

MSC – massa seca celular.

3HHx – 3-hidroxihexanoato.

μ_{Xr} – velocidade máxima de crescimento na fase de exponencial.

$Y_{Xr/Gli}$ – conversão de glicose em Xr (massa de células sem conteúdo de PHA).

$Y_{3HB/Gli}$ – conversão de glicose em 3HB (3-hidroxibutirato).

$Y_{3HHx/AHex}$ – conversão de ácido hexanoico em 3HHx.

P(3HB) (PRADELLA; TACIRO; MATEUS, 2010). Esta mesma linhagem atingiu a produtividade de 0,7 g/L.h, quando cultivada em batelada alimentada por com glicose e gama-butirolactona (CESARIO et al., 2014).

De posse dos dados dos cultivos descritos nos itens 5.3.3 (B06) e 5.4.1 a 5.4.3 (B07 a B10), nos quais se forneceram concentrações variadas de ácido hexanoico, foi possível relacionar a quantidade de ácido necessária para a produção de P(3HB-co-3HHx) contendo teores de 3HHx definidos. Utilizando a equação descrita na Figura 5.22, é possível calcular a composição da solução de alimentação para a biossíntese de polímeros sob medida, ou seja, modulados quanto ao teor de 3HB e 3HHx.

Figura 5.22- Relações molares de ácido hexanoico e glicose supridos e o percentual molar de 3HHx formado para os cultivos de modulação da composição de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06 a B10).

Com intuito de verificar se o novo meio de cultura para biorreator supria as necessidades nutricionais de *B. sacchari*, em três destes ensaios com o MM reformulado acima discutidos, foram retiradas amostras de 100 mL, após o início da fase de acúmulo, para análise de elementos químicos no sobrenadante por emissão atômica com plasma induzido (ICP-OES), realizada na Central Analítica do Instituto de Química da USP. Os resultados destas análises estão descritos na Tabela 5.22, na qual se pode observar que o Fe foi quase completamente consumido, indicando que talvez a bactéria necessite de maior suprimento deste elemento. Considerando-se que cerca de 50% do Ca fornecido foi

utilizado, a possível carência desse elemento foi devidamente suprida. Quanto ao P, claramente não foi um nutriente limitante, como era esperado, pois menos de 10% da concentração fornecida foi consumida.

Tabela 5.22 – Análise de elementos químicos presentes em cultivos em biorreator para *B. sacchari* recombinante utilizando MM reformulado.

Substratos supridos		[Elementos] (g/L)	[Elementos restantes] (g/L)		Elementos consumidos (%)
B07	KH ₂ PO ₄	P	0,0882	0,0880	0,20
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Mg	0,0306	0,0178	41,81
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Ca	0,0109	0,0052	51,67
	C ₆ H ₈ O ₇ 18% Fe _x NH ₄	Fe	0,0108	0,0008	92,45
B08	KH ₂ PO ₄	P	0,0882	0,0857	2,18
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Mg	0,0306	0,0176	42,48
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Ca	0,0109	0,0046	58,82
	C ₆ H ₈ O ₇ 18% Fe _x NH ₄	Fe	0,0108	0,0002	97,78
B09	KH ₂ PO ₄	P	0,0882	0,0648	26,57
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Mg	0,0306	0,0166	45,93
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Ca	0,0109	0,0054	49,97
	C ₆ H ₈ O ₇ 18% Fe _x NH ₄	Fe	0,0108	0,0004	96,53

Dados do ensaio em biorreator utilizando MM reformulado e cultivando LFM344pBBR1MCS2::*phaPCJ*_{Asp}. suprido de solução de alimentação contendo glicose e ácido hexanoico.

B07 - glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L).

B08 - glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L).

B09 - glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L).

5.5 Análise de fluxos metabólicos para a produção de PHA por *B. sacchari*

Para avaliar o desempenho das linhagens selvagem LFM 101 e recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) na produção do copolímero P(3HB-co-3HHx) foi realizada análise de fluxos metabólicos (AFM) dos experimentos em biorreator. Foram utilizados para esta análise os dados de seis cultivos em biorreator (Tabela 4.6): o cultivo B03, no qual a linhagem selvagem foi suprida com glicose e ácido hexanoico para produção do copolímero P(3HB-co-3HHx) e os cultivos de B06 a B10, nos quais se avaliaram a produção de P(3HB) e de copolímeros contendo diferentes frações de 3HHx pela linhagem recombinante *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034).

Inicialmente, para a realização dessa análise, foi necessário definir estágios pseudo-estacionários para os cultivos, ou seja, aqueles em que, embora se observasse variações nas concentrações de substratos e produtos, o metabolismo encontrava-se fluindo

de forma constante, sem acúmulo de intermediários metabólicos. Classicamente, a fase exponencial de crescimento é reconhecida como um período pseudo-estacionário. Entretanto, essa fase é pouco útil para os propósitos deste trabalho, pois a biossíntese de P(3HB-co-3HHx) ocorre apenas na fase de acúmulo (fase estacionária do ponto de vista do crescimento). A fase de acúmulo de PHA também pode ser reconhecida como um período pseudo-estacionário. Nesta fase, como a biomassa residual (X_r) é constante, tanto as velocidades como as velocidades específicas de consumo de substrato ou formação de produtos devem ser constantes durante um determinado período pseudo-estacionário.

A Figura 5.23 apresenta os resultados do experimento em biorreator com a linhagem selvagem (LFM101) para produção do copolímero P(3HB-co-3HHx) (B03). Aqui, o período pseudo-estacionário de acúmulo de PHA foi definido entre 14,5 e 27,5 h de cultivo. Nesse intervalo, a concentração de biomassa residual (X_r) foi constante, assim como as velocidades de produção de 3HB e 3HHx, e de consumo de glicose e ácido hexanoico, características de um estado pseudo-estacionário, como previamente definido. Glicose e ácido hexanoico não foram detectados no meio de cultura durante este período, pois todo o substrato fornecido era completamente consumido. Além disso, as velocidades

Figura 5.23- Experimento com *B. sacchari* selvagem em biorreator (B03) utilizando MM e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14,5 – 27,5 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em mmol/L.h. (Continua)

Figura 5.23- Experimento com *B. sacchari* selvagem em biorreator (B03) utilizando MM e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14,5 – 27,5 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h. (Conclusão)

de formação de CO₂ (CER – *carbon evolution rate*) e de consumo de oxigênio (OUR – *oxygen uptake rate*) também foram constantes (Figura 5.23 – B).

As Figuras 5.24 a 5.28 apresentam os resultados dos experimentos em biorreator com a linhagem recombinante (LFM1034) para a produção de P(3HB) e copolímeros P(3HB-*co*-3HHx) contendo diferentes frações molares de 3HHx (B06 a B10). Os períodos pseudo-estacionários foram definidos entre: 14 e 32 h para o cultivo B10 [produção de P(3HB)]; 16 e 32 h para o cultivo B09 (produção de copolímero contendo aproximadamente 5 mol% de 3HHx); 16 e 30 h para o cultivo B08 (produção de copolímero contendo aproximadamente 10 mol% de 3HHx); 18 e 32 h para o cultivo B07 (produção de copolímero contendo aproximadamente 15 mol% de 3HHx) e 14 e 27 horas para o cultivo B06 (produção de copolímero contendo aproximadamente 20 mol% de 3HHx). Nesses intervalos de tempo, também se observou concentração constante de biomassa residual (*X_r*) e velocidades constantes de consumo de substratos (glicose, ácido hexanoico e O₂) e formação de produtos (3HB, 3HHx e CO₂), caracterizando-os como períodos pseudo-estacionários.

Figura 5.24- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B10) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14 – 32 h de cultivo; **B** - Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h.

Figura 5.25- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B09) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 16 – 32 h de cultivo; **B** – Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em mmol/L.h.

Figura 5.26- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B08) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 16 – 30 h de cultivo; **B** - Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em mmol/L.h.

Figura 5.27- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B07) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 18 – 32 h de cultivo; **B** - Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em mmol/L.h.

Figura 5.28- Experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. **A** - Estado pseudo-estacionário definido 14 – 27 h de cultivo; **B** - Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em mmol/L.h.

A Tabela 5.23 apresenta os resultados dos cálculos de velocidades de consumo de substratos e O_2 , bem como de formação de PHA e CO_2 para o cultivo B03 realizado com a linhagem selvagem. Os cálculos de velocidades (g/h) correspondentes aos períodos pseudo-estacionários definidos, estão no APÊNDICE G (Figura A.12). Considerando o valor médio da quantidade de biomassa residual nesse período, é possível calcular as velocidades específicas (g/g.h), que podem ser convertidas a velocidades específicas molares (mmol/g.h), utilizando a massa molar de cada um dos componentes consumidos ou produzidos. Levando-se em conta o número de carbonos em cada componente da Tabela 5.23, estimaram-se as velocidades específicas de consumo de substratos e formação

de produtos em Cmmol/g.h, permitindo-se estabelecer um balanço de carbonos, ou seja, a parcela dos carbonos consumidos nos substratos, presentes nos produtos formados. Um balanço de 100% corresponde à detecção das mesmas quantidades de carbonos nos substratos consumidos e produtos formados. Valores superiores a 100% podem indicar erros de subestimativa nas velocidades de consumo dos substratos e/ou superestimativa nas velocidades de formação dos produtos. Valores inferiores a 100% podem indicar erros de superestimativa das velocidades de consumo dos substratos e/ou subestimativas das velocidades de formação dos produtos ou ainda a existência de um produto não detectado. Os carbonos presentes nos produtos formados corresponderam a 88,30% dos carbonos presentes nos substratos consumidos para o cultivo da linhagem selvagem.

Tabela 5.23 – Consumo de substratos e formação de PHA para cultivo de *B. sacchari* LFM 101 selvagem em biorreator (B03).

	Ác. Hex.	Glicose	3HB	3HHx	CO ₂	O ₂	Balanço C
g/h	0,47	1,47	1,00	0,01	-	-	
g/g.h	0,06	0,19	0,13	0,00	-	-	
mmol/g.h	0,53	1,08	1,53	0,01	2,35	1,54	
Cmmol/g.h	3,18	6,46	6,11	0,07	2,35	-	88,30

A Tabela 5.24 apresenta os valores de velocidade de consumo de substratos e formação de produtos obtidos nos cultivos com a linhagem recombinante B06 a B10 (APÊNDICE G – Figuras A.13 a A.17). A partir desses dados também foram calculadas velocidades específicas e velocidades específicas molares, bem como as velocidades específicas em Cmmol/g.h, o que permitiu estimar o balanço de carbonos em cada experimento. Para estes cultivos, observaram-se valores variando entre 83,13 e 91,38% dos carbonos consumidos presentes nos produtos.

Uma vez que todos os balanços de carbono foram inferiores a 100%, os sobrenadantes dos cultivos foram analisados por cromatografia líquida para detecção de eventuais subprodutos. Foram analisados os seguintes ácidos orgânicos: acético, láctico, fórmico, succínico, cítrico e pirúvico. Apenas o ácido succínico foi detectado, entretanto, a velocidade de formação deste produto contribuía com menos de 1% dos carbonos presentes nos substratos consumidos, pouco expressivo para melhorar o balanço de carbonos. Desta forma, este não foi considerado no modelo metabólico e admitiu-se que o balanço não atingia 100% em decorrência de desvios experimentais nos diferentes compostos medidos.

Tabela 5.24 – Consumo de substratos e formação de PHA de cultivo em biorreator (B06 a B10) da linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) suprida de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (0 - 45 g/L).

		Glicose	3HB	Ác. Hex	3HHx	CO ₂	O ₂	Balanco C
B10	P(3HB)	g/h	2,85	1,11	0,00	0,00	-	-
		g/g.h	0,35	0,14	0,00	0,00	-	-
		mmol/g.h	1,97	1,60	0,00	0,00	4,26	3,57
		mmolC/g.h	11,82	6,42	0,00	0,00	4,26	-
B09	P(3HB-co-6mol%3HHx)	g/h	2,78	1,21	0,21	0,11	-	-
		g/g.h	0,28	0,12	0,02	0,01	-	-
		mmol/g.h	1,54	1,40	0,18	0,09	3,29	3,16
		mmolC/g.h	9,22	5,61	1,10	0,55	3,29	-
B08	P(3HB-co-13mol%3HHx)	g/h	2,86	1,18	0,47	0,23	-	-
		g/g.h	0,35	0,14	0,06	0,03	-	-
		mmol/g.h	1,95	1,68	0,50	0,25	4,00	3,98
		mmolC/g.h	11,68	6,74	2,98	1,51	4,00	-
B07	P(3HB-co-15mol%3HHx)	g/h	3,00	1,05	0,50	0,26	-	-
		g/g.h	0,27	0,10	0,05	0,02	-	-
		mmol/g.h	1,51	1,11	0,39	0,20	2,92	2,77
		mmolC/g.h	9,07	4,43	2,34	1,23	2,92	-
B06	P(3HB-co-19mol%3HH)	g/h	2,84	1,19	0,75	0,38	-	-
		g/g.h	0,29	0,12	0,08	0,04	-	-
		mmol/g.h	1,62	1,42	0,67	0,34	3,98	3,18
		mmolC/g.h	9,74	5,69	4,02	2,05	3,98	-

Valores para o período pseudo-estacionário dos respectivos cultivos: (B10) 14 a 32 h de cultivo; (B09) 16 a 32 h de cultivo; (B08) 16 a 30 h de cultivo; (B07) 18 a 32 h de cultivo; (B06) 14 a 27 h de cultivo.

Uma rede representativa do metabolismo de *B. sacchari* foi construída considerando dados da literatura (MARZZOCO; TORRES, 2011; WHITE, 2007). O modelo proposto para o metabolismo deste micro-organismo está mostrado na Figura 5.29. Foram considerados: via de Entner-Doudoroff (ED), via das pentoses (VP), ciclo de Krebs (CK), ciclo do glioxilato, β -oxidação do ácido hexanoico, biossíntese de P(3HB) a partir de acetil-CoA, frutose 1,6-bisfosfatase (permite gliconeogênese de glicose 6-fosfato a partir de gliceraldeído 3-fosfato, importante na forma cíclica da ED), complexo piruvato desidrogenase, piruvato carboxilase (permite a formação de oxaloacetato a partir de piruvato), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (permite a formação de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato), enoil-CoA hidratase (*R*)-específica (permite converter 2-*trans*-hexenoil-CoA ou 2-*trans*-butenoil-CoA a (*R*)-3-hidroxihexanoil-CoA ou (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA, respectivamente), oxidação de FADH₂ ou NADH em cadeia

respiratória com O_2 como aceptor final de elétrons, trans-hidrogenases de membrana (PntAB) e solúvel (UdhA) (SAUER et al., 2004).

Utilizando o arquivo de entrada mostrado no APÊNDICE H, simulou-se no Metatool os possíveis caminhos metabólicos. O programa gerou 82 modos elementares e suas respectivas reações globais, que foram analisados e reduzidos para 66, quando se considerou a equivalência entre eles. A partir dos 66 modos elementares gerou-se uma matriz e, utilizando a função `fmincon` presente no programa Matlab (versão 7.6.0) para otimização, estimou-se o vetor que multiplicado por esta matriz levaria à obtenção de resultados mais próximos dos dados experimentais, ou seja, com o mínimo de resíduo. A matriz inicialmente gerada foi reduzida a 14 modos elementares, com maior representação, que permitiu atingir resultados com o mesmo resíduo, ou seja, com o mesmo desvio em relação aos dados experimentais. Estes modos elementares foram utilizados para representar a distribuição de fluxos nos experimentos com a linhagem recombinante. Para a linhagem selvagem foram necessários 19 modos elementares.

Observou-se que alguns dos modos elementares apresentavam contribuição semelhante para o resultado final da distribuição de fluxos, assim, estes foram analisados do ponto de vista das reações metabólicas envolvidas em cada um. Os modos elementares puderam ser reunidos em quatro grupos: (i) oxidação da glicose a CO_2 , (ii) conversão de glicose a P(3HB), (iii) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB) e (iv) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB-co-3HHx) (APÊNDICE I).

Figura 5.29- Esquema representativo do modelo proposto para análise de fluxos metabólicos nos cultivos de *B. sacchari*.

Foram detectadas algumas vias/reações presentes apenas em determinados grupos de modos elementares, o que permitiu descartá-los. O restante das reações puderam ser reunidas naquelas que envolviam ED linear ou ED cíclica. Para os modos elementares

contendo a conversão de glicose e ácido hexanoico em PHA, todos apresentavam apenas ED cíclica. A partir de todas estas considerações, para os cultivos em biorreator com a linhagem recombinante, optou-se por, utilizar um grupo de 4 modos elementares que consideravam somente a forma cíclica da ED e outros 4 com ED principalmente linear. Da mesma forma, para o cultivo com a linhagem selvagem, foram utilizados 6 modos elementares, os quais convergiam para uma ED cíclica, e 5 outros contendo ED principalmente linear. Esta análise permitiu avaliar os extremos das distribuições de fluxos nestas duas situações (ED linear ou cíclica).

A Tabela 5.25 apresenta os dados experimentais e a previsão pelos modelos metabólicos considerando a via ED principalmente linear (previsto 1) ou ED cíclica (previsto 2). Para o ajuste do modelo, invariavelmente, foram previstos valores de consumo de glicose e ácido hexanoico menores que os experimentais e de produção de 3HB e 3HHx

Tabela 5.25 – Comparação entre dados (velocidades específicas - mmol/g.h) experimentais e previstos pelo modelo metabólico da análise de fluxos para cultivos em biorreator com *B. sacchari* selvagem (B03) e recombinante (*B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} - B06 a B10).

Parâmetros	<i>B. sacchari</i> LFM101						<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ</i> _{Asp} (LFM1034)											
	P3HB-co-3HHx (B03) ^a			P3HB (B10) ^b			P3HB-co-6%3HHx (B09) ^c			P3HB-co-13%3HHx (B08) ^d			P3HB-co-15%3HHx (B07) ^e			P3HB-co-19%3HHx (B06) ^f		
	Experim.	Previsto 1	Previsto 2	Experim.	Previsto 1	Previsto 2	Experim.	Previsto 1	Previsto 2	Experim.	Previsto 1	Previsto 2	Experim.	Previsto 1	Previsto 2	Experim.	Previsto 1	Previsto 2
Glicose	1,08	1,07	1,03	1,97	1,84	1,84	1,54	1,49	1,49	1,95	1,83	1,83	1,51	1,43	1,43	1,62	1,53	1,53
Ác. hexanoico	0,53	0,52	0,48	0,00	0,00	0,00	0,18	0,14	0,14	0,50	0,38	0,38	0,39	0,31	0,31	0,67	0,57	0,57
3HB	1,53	1,68	1,57	1,60	1,69	1,69	1,40	1,43	1,43	1,68	1,76	1,76	1,11	1,17	1,17	1,42	1,49	1,49
3HHx	0,01	0,07	0,06	0,00	0,00	0,00	0,09	0,13	0,13	0,25	0,37	0,37	0,20	0,29	0,29	0,34	0,44	0,44
CO ₂	2,35	2,40	2,36	4,26	4,28	4,28	3,29	3,30	3,30	4,00	4,02	4,02	3,98	3,99	3,99	3,98	4,00	4,00
Balanço C	88,30			90,19			91,38			83,13			84,39			85,15		
Resíduo		0,04	0,10		0,16	0,16		0,08			0,22	0,22		0,16	0,16		0,18	0,18
AHex-3HHx ^g	1,89	13,46	12,50				50,00	92,86	92,86	50,00	97,37	97,37	51,28	93,55	93,55	50,75	77,19	77,19
GliAHex-3HB ^h	82,26	96,28	94,58	81,22	91,85	91,85	83,58	95,02	95,02	72,26	95,39	95,39	61,84	80,14	80,14	67,14	86,38	86,38

a. Valores para o período pseudo-estacionário (B03) 14,5 a 27,5 h de cultivo.

b. Valores para o período pseudo-estacionário (B010) 14 a 32 h de cultivo.

c. Valores para o período pseudo-estacionário (B09) 16 a 32 h de cultivo.

d. Valores para o período pseudo-estacionário (B08) 16 a 30 h de cultivo.

e. Valores para o período pseudo-estacionário (B07) 18 a 32 h de cultivo.

f. Valores para o período pseudo-estacionário (B06) 14 a 27 h de cultivo.

g. Eficiência percentual de conversão de ácido hexanoico em 3HHx.

h. Eficiência percentual de conversão de glicose e parte do ácido hexanoico (não utilizado para formar 3HHx) em 3HB.

maiores que os obtidos nos experimentos. Isto ocorreu, porque o modelo ajustou os dados à estequiometria das reações, considerando o balanço de carbonos 100%. Entretanto, como apresentado anteriormente, o balanço de carbonos obtidos a partir dos dados experimentais correspondeu a valores entre 83,13 e 91,38%, isto explica a diferença entre previsto e experimental.

A análise dos dados experimentais (Tabela 5.25) indica que menos de 2% do ácido hexanoico suprido para linhagem selvagem foi convertido a 3HHx. Já, para a linhagem recombinante, converteu-se aproximadamente 50% do ácido oferecido a 3HHx, em todos os cultivos realizados. Estes resultados apontam que ainda há um espaço importante para a melhora do desempenho na produção de P(3HB-*co*-3HHx) pela linhagem recombinante. Uma alternativa para se alcançar este desempenho seria a inativação de genes da β -oxidação, que permitiria maximizar o direcionamento do ácido hexanoico para a síntese de 3HHx. Outros autores realizaram a interrupção de genes dessa via em *P. putida* (TRIPATHI et al., 2012; WANG et al., 2010), *E. coli* (TAPPEL; WANG; NOMURA, 2012) e *R. eutropha* (INSOMPHUN et al., 2014). Entretanto, esses trabalhos tinham por objetivo modular a composição do PHA produzido. Neste trabalho, a inativação de genes da β -oxidação seria aplicada com intuito de atingir a eficiência máxima teórica de conversão de ácido hexanoico em 3HHx. Esta estratégia é sugerida devido à conclusão aqui alcançada de que é possível aumentar a eficiência de conversão deste ácido ao monômero alvo, utilizando uma PHA sintase com maior especificidade, entretanto apenas 50% do máximo teórico (0,98 g de 3HHx/g de ácido hexanoico) foi atingido.

Um mol de glicose gera dois mols de acetil-CoA e estes seriam utilizados para sintetizar 1 mol de 3HB; um mol de ácido hexanoico produz três mols de acetil-CoA, podendo estes ser utilizados para sintetizar 1,5 mol de 3HB. Considerando estas informações, é possível estimar o máximo de 3HB que poderia ser produzido a partir da glicose consumida e do ácido hexanoico não metabolizado a 3HHx. Os valores experimentais indicam a eficiência de formação de 3HB a partir das fontes de carbono disponíveis, conforme o citado previamente, entre 61,84 e 83,58% do valor máximo teórico (Tabela 5.25), indicando possibilidades de melhorar o desempenho desta bactéria em converter glicose e ácido hexanoico no copolímero P(3HB-*co*-3HHx).

As Figuras 5.30 a 5.35 apresentam a previsão das distribuições de fluxos pelo modelo metabólico considerando ED principalmente linear e tomando como base o ajuste dos resultados experimentais. Mesmo tendo sido priorizados modos elementares que

consideravam a via ED de forma linear, as distribuições de fluxos previstas indicam um aumento da ciclicidade da via ED quanto maior a quantidade de ácido hexanoico suprido para a linhagem recombinante. Este resultado era esperado, uma vez que a maior oferta do ácido, proveria mais acetil-CoA dessa fonte de carbono e exigiria maior quantidade de NADPH para biossíntese de 3HB. Entretanto, quando se analisa o fluxo pela trans-hidrogenase solúvel (UdhA), verifica-se que a via ED não necessitaria ser cíclica, pois a quantidade adicional de NADP⁺ reduzido, é oxidado pela trans-hidrogenase para reduzir NAD⁺. Apenas para a linhagem selvagem observa-se que a ciclicidade da via ED é necessária para suprir o NADPH adicional para o biossíntese de P(3HB) a partir do acetil-CoA proveniente da oxidação do ácido hexanoico. Neste caso, a quantidade de acetil-CoA é muito elevada devido à oxidação total de grande parcela do ácido suprido.

Os resultados com a linhagem recombinante indicam ainda que, o acetil-CoA dirigido para o Ciclo de Krebs poderia ser direcionado para biossíntese de P(3HB), aumentando a eficiência de conversão das fontes de carbono no PHA. Assim, mesmo uma baixa ciclicidade da ED seria suficiente para suprir todo o NADPH necessário à biossíntese de 3HB, eliminando-se a parcela de NADPH oxidado pela trans-hidrogenase solúvel (UdhA). Entretanto, esta forma de funcionamento do metabolismo levaria a uma redução da quantidade de ATP disponível para a manutenção celular e o impacto dessa redução deve ser avaliado para verificar se o metabolismo realmente poderia ser mantido dessa forma.

As Figuras 5.36 a 5.41 mostram as distribuições de fluxos previstas pelo modelo metabólico que considera ED cíclica e tomando como base o ajuste dos resultados experimentais. A distribuição de fluxos neste modelo é muito semelhante aos dados anteriores (ED principalmente linear). O aumento da ciclicidade da via ED é simplesmente compensado por um aumento no fluxo pela trans-hidrogenase solúvel (UdhA). Assim, sugere-se que o modelo considerando a ED principalmente linear deve representar melhor o metabolismo de *B. sacchari*, pois a forma cíclica da via ED tem como principal papel aumentar o suprimento de NADPH para o metabolismo (CONWAY, 1992).

Figura 5.30- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari* selvagem no cultivo B03 (Previsto 1).

Figura 5.31- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B10 (Previsto 1).

Figura 5.32- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-6mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) no cultivo B09 (Previsto 1).

Figura 5.33- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-13mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B08 (Previsto 1).

Figura 5.34- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-15mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B07 (Previsto 1).

Figura 5.35- - Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-19mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B06 (Previsto 1).

Figura 5.36- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-3HHx) por *B. sacchari* selvagem no cultivo B03 (Previsto 2).

Figura 5.37- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B10 (Previsto 2).

Figura 5.38- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-6mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034) no cultivo B09 (Previsto 2).

Figura 5.39- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-13mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B08 (Previsto 2).

Figura 5.40- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-15mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) no cultivo B07 (Previsto 2).

Figura 5.41- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-19mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) no cultivo B06 (Previsto 2).

Como apresentado anteriormente, com base na distribuição de fluxos obtida a partir dos dados experimentais ajustados ao modelo metabólico, seria possível a via ED funcionar com baixa ciclicidade e ainda suprir todo o NADPH necessário para biossíntese de 3HB, sem fluxo no Ciclo de Krebs. Assim, para estimar a distribuição de fluxos que corresponderia à eficiência máxima teórica (50% do ácido hexanoico fornecido sendo convertido em 3HHx) relacionada às condições experimentais obtidas: (i) foi proposto um novo modelo metabólico sem as reações de trans-hidrogenases (solúvel – UdhA e de membrana – PntAB) e obtidos os modos elementares; (ii) foi estimada uma equação global de conversão de glicose e ácido hexanoico a 3HB, 3HHx e CO₂, que correspondia à máxima eficiência de conversão para a situação observada experimentalmente, ou seja, 50% do ácido convertido a 3HHx.

Com o novo modelo metabólico, que não considera a ocorrência de reações de trans-hidrogenases (solúvel e de membrana), foram obtidos 33 modos elementares. Estabeleceram-se diferentes equações globais, correspondendo à situação particular acima: produção de copolímeros contendo 0, 5, 10, 15 ou 20 mol% 3HHx. Para estas equações globais, considerou-se que todo o ácido hexanoico não utilizado para formação de 3HHx, bem como toda a glicose, foram convertidos a acetil-CoA para a síntese de 3HB, o que representava a eficiência máxima teórica. O CO₂ produzido na equação global foi estimado levando-se em conta o balanço de carbonos, ou seja, todo o C proveniente da glicose e do ácido hexanoico, não convertidos aos monômeros 3HB ou 3HHx, formava o dióxido de carbono.

A Tabela 5.26 apresenta os valores da equação global correspondentes ao máximo teórico (na tabela: proposto). Utilizando uma matriz dos 33 modos elementares e a função `fmincon` presente no programa Matlab (versão 7.6.0) para otimização, estimou-se o vetor que multiplicado por esta matriz levaria à obtenção de resultados mais próximos dos dados da equação global, ou seja, com o mínimo de resíduo. Verificou-se que apenas 3 modos elementares contribuíam de forma significativa para atingir o resultado da equação global para o máximo teórico e uma nova rodada de otimização foi realizada utilizando apenas estes 3 modos elementares.

Tabela 5.26 – Comparação entre valores da equação global correspondente ao máximo teórico (velocidades específicas - mmol/g.h) e estimados pelo modelo metabólico da análise de fluxos para cultivos em biorreator com *B. sacchari* recombinante (LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} - B06 a B10).

Parâmetros	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ</i> _{Asp} (LFM1034)									
	P3HB (B10) ^a		P3HB-co-6%3HHx (B09) ^b		P3HB-co-13%3HHx (B08) ^c		P3HB-co-15%3HHx (B07) ^d		P3HB-co-19%3HHx (B06) ^e	
	Proposto	Estimado	Proposto	Estimado	Proposto	Estimado	Proposto	Estimado	Proposto	Estimado
Glicose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Ác. hexanoico	0,00	0,00	0,11	0,11	0,27	0,27	0,48	0,48	0,80	0,80
O ₂	-	1,50	-	1,43	-	1,33	-	1,20	-	1,00
ATP	-	10,00	-	9,17	-	8,07	-	6,52	-	4,20
3HB	1,00	1,00	1,09	1,09	1,20	1,20	1,36	1,36	1,60	1,60
3HHx	0,00	0,00	0,06	0,06	0,13	0,13	0,24	0,24	0,40	0,40
CO ₂	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

a. Valores para o período pseudo-estacionário (B010) 14 a 32 h de cultivo.

b. Valores para o período pseudo-estacionário (B09) 16 a 32 h de cultivo.

c. Valores para o período pseudo-estacionário (B08) 16 a 30 h de cultivo.

d. Valores para o período pseudo-estacionário (B07) 18 a 32 h de cultivo.

e. Valores para o período pseudo-estacionário (B06) 14 a 27 h de cultivo.

A Tabela 5.26 apresenta também os dados estimados a partir do modelo metabólico (3 modos elementares). Foram obtidos ajustes com resíduos muito baixos (entre 10^{-5} e 10^{-6}). O valor de resíduo muito baixo indica que a rede metabólica pode funcionar perfeitamente nas condições propostas de eficiência máxima teórica. As Figuras 5.42 a 5.46 apresentam as distribuições de fluxos na rede metabólica que levariam à eficiência máxima teórica de conversão de glicose e ácido hexanoico em polímeros contendo diferentes frações de 3HHx, considerando apenas 50% do ácido sendo convertido a 3HHx.

A eficiência máxima teórica é obtida sem qualquer fluxo na via das pentoses (VP) ou Ciclo de Krebs (CK). Os resultados também mostram claramente que quanto maior a fração de 3HHx no polímero, é necessário um maior fluxo cíclico na via ED. Esse resultado era esperado uma vez que há uma demanda crescente de NADPH para conversão do acetil-CoA derivado do ácido hexanoico a 3HB.

A partir dos dados estimados pelo modelo metabólico, verifica-se que, quanto maior a fração de 3HHx no polímero, menor é a demanda de O_2 por mol de glicose consumido. Por outro lado, menor é a quantidade de ATP disponibilizada para a manutenção celular (Figura 5.47), que pode impedir a célula de atingir estes valores máximos teóricos de conversão de fontes de carbonos em produtos.

Utilizando uma matriz dos modos elementares do novo modelo metabólico (sem trans-hidrogenases), estimou-se o vetor que multiplicado por ela levaria à obtenção de resultados mais próximos dos dados experimentais. Com 3 modos elementares, os resíduos foram sempre superiores àqueles obtidos com o modelo metabólico inicial (com trans-hidrogenases). Utilizando os 33 modos elementares (do modelo novo, sem trans-hidrogenase) os resíduos foram maiores para 3 composições do copolímero e menores nas outras 2. Estes resultados indicam que as reações de trans-hidrogenase são importantes para explicar pelo menos alguns dos dados experimentais.

É importante destacar que os 33 modos elementares obtidos com o novo modelo metabólico estão incluídos nos 66 modos do modelo anterior, aquele que considerou as trans-hidrogenases. Assim, no processo iterativo do Matlab deveriam ter sido identificadas as distribuições de fluxos sem trans-hidrogenases, as quais levavam a um menor resíduo. Esta falha pode ser explicada pois, quanto maior a complexidade da rede metabólica, maior a dificuldade de se encontrar no processo iterativo a solução que melhor explica o resultado experimental.

Figura 5.42- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. (LFM1034) na eficiência máxima teórica.

Figura 5.43- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-5mol%3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.

Figura 5.44- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-10mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.

Figura 5.45- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-15mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.

Figura 5.46- Distribuições de fluxos representativas da produção de P(3HB-co-19mol% 3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. (LFM1034) considerando 50% do ácido hexanoico suprido convertido a 3HHx, na eficiência máxima teórica.

Figura 5.47- Relação entre o ATP formado ou o O₂ consumido e o percentual em mol de 3HHx para os cultivos de modulação da composição de P(3HB-co-3HHx) por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06 a B10).

Os resultados de análise de fluxos, baseados em dados experimentais e em condições otimizadas de conversão das fontes de carbono nos produtos desejados, indicam que há um espaço interessante para melhorar a eficiência de produção do copolímero como um todo. Entretanto, as modificações necessárias para atingir o máximo teórico são bastante complexas, pois exigem uma ciclicidade crescente na via ED. Além disso, a menor disponibilidade de ATP para a manutenção celular pode tornar este processo não viável.

A ciclicidade na via ED surge pela necessidade de NADPH para converter o acetil-CoA derivado do ácido hexanoico para produzir 3HB. Assim, a inativação da β -oxidação deve levar a um aumento na eficiência global de conversão das fontes de carbono em 3HB ou 3HHx, pois se todo o ácido fosse convertido a 3HHx, o problema do acetil-CoA excedente não existiria. Além disso, não haveria redução no ATP disponível para a manutenção celular.

5.6 Busca de genes da β -oxidação de ácidos graxos no genoma de *B. sacchari*

O ácido hexanoico, um dos substratos essenciais para os cultivos realizados neste trabalho, é convertido a monômeros 3HHx por sua parcial degradação na via da β -oxidação de ácidos graxos.

A utilização de ácidos graxos de cadeia longa (C12 a C18) e cadeia média (C7 a C11) por *E. coli* requer a ação de várias proteínas codificadas pelos genes do regulon *fad*, cujos produtos estão envolvidos no transporte e oxidação de ácidos graxos (CLARK; CRONAN, 1996). Ácidos graxos de cadeia longa são transportados através da membrana pelo transportador (FadL) e pela acil-CoA sintetase, internamente associada à membrana, (FadD). O catabolismo de ácidos graxos pela β -oxidação corresponde à clivagem de acil-CoA, que ocorre de maneira cíclica, e envolve a conversão a enoil-CoA pela ação da acil-CoA desidrogenase (FadE), seguida pela hidratação, oxidação e tiólise realizada pelos conjuntos de enzimas (FadB-FadA ou FadI-FadJ). Além disso, FadH é responsável por iniciar a degradação de ácidos graxos de cadeia insaturadas (Figura 5.48) (DIRUSSO, 1990; FIEDLER; STEINBÜCHEL; REHM, 2002; INSOMPHUN et al., 2014; KAZAKOV et al., 2009; OUYANG et al., 2007). A ligação entre a β -oxidação e a biossíntese de PHA é mediada pela ação da enzima enoil-CoA hidratase-(*R*)-específica (PhaJ), que gera monômeros (*R*)-3-hidroxiacil-CoA do intermediário da degradação de ácidos graxos *trans*-2-enoil-CoA (DIRUSSO; BLACK; WEIMAR, 1999; FIEDLER; STEINBÜCHEL; REHM, 2002; INSOMPHUN et al., 2014; OUYANG et al., 2007) (Figura 5.6).

A regulação transcricional do metabolismo dos ácidos graxos de cadeia longa e média em *E. coli* é mediada pela ação da proteína FadR. A disponibilidade de ácidos graxos é detectada por FadR, sendo este liberado do DNA na presença de acil-CoA de cadeia longa e média. Neste micro-organismo, FadR age como repressor dos operons *fad* (*fadL*, *fadD*, *fadE*, *fadBA*, *fadH* e *fadIJ*), que atuam no catabolismo de ácidos graxos e como ativador da biossíntese de ácidos graxos saturados e insaturados (KAZAKOV et al., 2009; RHIE; DENNIS, 1995).

Figura 5.48- β -oxidação de ácidos graxos descrita para *E. coli*. O metabolismo de ácidos graxos é mediado pelas enzimas transportadoras: FadL (acil-CoA ligase) e AtoE; e pelas enzimas envolvidas no catabolismo: acetil-CoA e acetoacetato-CoA transferases (AtoD-AtoA) e 3-cetoacil-CoA tiolase II (AtoB), para ácidos graxos de cadeia curta; seguindo o metabolismo pela ação das enzimas acil-CoA sintetase (FadD), que insere uma CoASH ao acil gerando acil-CoA; acil-CoA desidrogenase (FadE) que converte o acil-CoA em *trans*-2-enoil-CoA; 2-dienoil-CoA redutase (FadH) converte acil-CoA insaturado em *trans*-2-enoil-CoA; enoil-CoA hidratase-(*S*)-específica (FadB-FadJ), converte *trans*-2-enoil-CoA a (*S*)-3-hidroxiacil-CoA; 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase-(*S*)-específica (FadBJ), que converte (*S*)-3-hidroxiacil-CoA em 3-cetoacil-CoA; 3-cetoacil-CoA tiolase (FadA-FadI), que converte 3-cetoacil-CoA a acil-CoA e uma molécula de acetil-CoA. Baseado em Di Russo et al (1999), Kazakov et al. (2009) e Tappel, Wang e Nomura (2012).

O uso de ácidos graxos de cadeia curta (C4 a C6) em *E. coli*, depende da ação de um transportador de membrana (AtoE) e mais duas enzimas catabólicas: acetil-CoA e acetoacetato-CoA transferases (AtoD-AtoA) e 3-cetoacil-CoA tiolase II (AtoB)

(JENKINS; NUNN, 1987 a, b). Estas proteínas são codificadas pelo operon *atoDAEB*, o qual é altamente induzido por acetoacetato (MATTA et al., 2007; RHIE; DENNIS, 1995). AtoC atua como um fator regulatório positivo necessário para induzir a expressão do operon *atoDAEB* (JENKINS; NUNN, 1987b, MATTA et al., 2007; RHIE; DENNIS, 1995). A enzima AtoC também age como regulador de resposta de um sistema de transdução de sinal de dois componentes, AtoS-AtoC (AtoS - sensor histidina-quinase), que ativa o operon *atoDAEB* na presença de acetoacetato (MATTA et al., 2007).

Em estudo comparativo dos regulons transcricionais do metabolismo de ácidos graxos em genomas de proteobactérias, Kazakov et al. (2009) relataram que a degradação de ácidos graxos em β -proteobactérias, que inclui *Burkholderia* spp., é regulada por PsrA e FadP, fatores transcricionais TetR-type e TetR-like, respectivamente.

De posse do genoma sequenciado de *B. sacchari*, decidiu-se buscar genes da β -oxidação de ácidos graxos presentes neste micro-organismo para possibilitar o uso dessas sequências em trabalhos futuros.

A sequência genômica de *B. sacchari*, com um tamanho de 7,265 Mb, foi depositada na plataforma *Rapid Annotation using Subsystems Technology* (RAST – de livre acesso na internet), que auxilia na montagem e anotação de genomas sequenciados (AZIZ et al., 2008). Utilizando a montagem preliminar do genoma de *B. sacchari* disponibilizado nesta plataforma (ALEXANDRINO et al., dados não publicados), foram feitas buscas de genes ligados à β -oxidação de ácidos graxos, baseando-se na organização de subsistemas fornecida pelo programa e em dados observados na literatura.

Nas buscas realizadas no genoma de *B. sacchari*, foram encontradas 16 sequências anotadas automaticamente como codificando enzimas acil-CoA sintetase/acil-CoA ligase (FadLD) (EC 6.2.1.3), 15 anotadas automaticamente como codificando acil-CoA desidrogenase (FadE) (EC 1.3.99.2/EC 1.3.99.3); 2 anotadas automaticamente como codificando acil-CoA desidrogenase de cadeia curta (EC 1.3.8.1); 17 sequências para a enzima com atividade de enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17) e 7 para aquela com atividade de 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (EC 1.1.1.35) (FadBJ) e 13 sequências para atividade de 3-cetoacil-CoA tiolase (FadAI) (EC 2.3.1.16). Para as atividades de acetil-CoA transferase e acetoacetato-CoA transferase (AtoD-AtoA) (EC 2.8.3.6/EC 2.8.3.16/EC 2.8.3.5/ EC 2.8.3.12) foram encontradas 10 sequências. Já para a atividade de 3-cetoacil-CoA tiolase II (AtoB) (EC 2.3.1.9), foram encontradas 12 sequências. Foram encontrados 17 supostos operons desta via metabólica e 10 outros genes isolados no genoma, segundo a

montagem organizada até o momento. É sabido que são encontradas várias sequências homólogas de genes da via de β -oxidação para bactérias como *P. putida* (OUYANG et al., 2007).

Na Figura 5.49 estão apresentados 4 possíveis operons *fad* encontrados a partir da busca no genoma de *B. sacchari*. A organização do primeiro operon *fad* proposto parece condizente com os dados da literatura, especialmente pela presença do gene regulador *fadP* (KAZAKOV et al., 2009). Segundo dados observados na plataforma RAST, esta organização de genes é conservada em *Burkholderia xenovorans*, *Burkholderia ambifaria* e *Ralstonia solanacearum*. A mesma organização do segundo conjunto de genes ocorre em *B. xenovorans* e *B. ambifaria*. Já para o terceiro e o quarto são conservados para *R. eutropha*. Estes conjuntos de genes, bem como os genes isolados encontrados, necessitam ser mais profundamente analisados, utilizando-se outras técnicas para que sejam anotados como genes da β -oxidação deste micro-organismo.

Figura 5.49- Possíveis operons da β -oxidação de ácidos graxos encontrados em busca via RAST no genoma sequenciado de *B. sacchari*.

Foi demonstrado para *E. coli* e *Pseudomonas* spp. um complexo enzimático trifuncional FadBA na β -oxidação. Este complexo é composto por duas subunidades na conformação $\alpha_2\beta_2$, em que a subunidade maior α , codificada por *fadB*, exibe atividade de enoil-CoA-hidratase-(S)-específica e uma 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase-(S)-específica, e a subunidade menor β , codificada por *fadA*, é uma 3-cetoacil-CoA tiolase (DIRUSSO, 1990; FIEDLER; STEINBÜCHEL; REHM, 2002)

A busca no genoma de *R. eutropha* H16 revelou muitos genes potenciais homólogos para a via de β -oxidação de ácidos graxos. Foram detectados, por exemplo, 50 genes naquele genoma anotados como enoil-CoA hidratases e 46 genes como acil-CoA desidrogenases. Utilizando esse tipo de análise é difícil prever qual destes homólogos desempenha verdadeiro papel na degradação dos ácidos graxos. Para solucionar este problema se faz necessária a análise da expressão destes genes, como em ensaio em microarranjos (BRIGHAM et al., 2010).

Foram encontrados pelo menos dois conjuntos de genes codificando proteínas putativas 3-cetoacil-CoA tiolase (FadAx e FadA) e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase $-(S)-$ específica (FadB2x e FadB) em *P. putida* KT2442, segundo alinhamentos com sequências disponíveis no NCBI. Os genes *fadB2x* e *fadBx*, estavam localizados no meio do operon *fad*, em que *fadDx* e *fadB1x* eram os genes localizados *upstream* e *downstream*, respectivamente. Os genes *fadB* e *fadA* formavam um operon. A busca no genoma de *P. putida* KT2442 também indicou haver muitas proteínas putativas com funções similares (OUYANG et al., 2007).

O conhecimento do número de homólogos de genes ligados a β -oxidação de ácidos graxos neste micro-organismo, levará a determinação de estratégias para interromper genes desta via metabólica a fim de atingir maiores eficiências de conversão substrato/produto, como é o caso do ácido hexanoico em 3HHx.

Tappel, Wang e Nomura (2012) inativaram os genes *fadB* e seu homólogo *fadJ* (formalmente *yfcX*) da via de β -oxidação de ácidos graxos de *E. coli*, tornando a linhagem estudada capaz de produzir PHA contendo monômeros com o mesmo número de carbonos do substrato fornecido no cultivo. Linhagem de *P. putida* KTHH08, mutada nos genes *phaG* (que codifica 3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilase), da β -oxidação (*fadB*, *fadA*, *fadB2x*, e *fadAx*) e na própria *phaC*, abrigando o operon *phaPCJ_{Ah}* produziu copolímero contendo 1,9 mol% de 3HB e 98,1mol% de 3HV a partir de ácido valérico (5 g/L) (WANG et al., 2010).

Insomphun et al. (2014) mostram que a deleção de genes *fadB* (os homólogos *fadB'*, *fadB1* e *fadB2*) da β -oxidação em *Ralstonia eutropha* aumentou a fração de 3HHx acumulada a partir de óleo de soja. Um destes mutantes, abrigando *phaJ* [(R)-enail-CoA hidratase] de *Aeromonas caviae*, produziu até 21 mol% de 3HHx, provavelmente pelo alto suprimento de H_{AMCL} proveniente de 2-*trans*-enail-CoA da via de β -oxidação interrompida. Têm sido reportados estudos de interrupção de genes da oxidação de ácidos

graxos para aumentar a produção de monômeros com número de carbonos relacionado ao substrato (LU; CHEN, 2003; NOMURA et al., 2008; OUYANG et al., 2007; TRIPATHI et al., 2012; WANG; NOMURA, 2010).

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, especialmente no que se refere à análise de fluxos metabólicos, uma estratégia para se aumentar a eficiência de conversão de ácido hexanoico a 3HHx seria a interrupção do gene *fadB* e de seus homólogos na via de β -oxidação de *B. sacchari*. Conforme os dados reportados na literatura, o bloqueio no ponto em que as enzimas codificadas pelo gene *fadB* atuariam na β -oxidação (Figura 5.48) causaria um acúmulo do intermediário *trans*-2-enoil-CoA, o qual seria convertido a (*R*)-3HA-CoA pela ação da enzima *phaJ* (enoil-CoA hidratase (*R*)-específica), sendo incorporado pela PHA sintase como monômero 3HHx (Figura 5.6).

5.7 Análise de propriedades dos polímeros produzidos

As análises de propriedades dos polímeros produzidos foram realizadas no Laboratório de Materiais Avançados (LAMAV) coordenado pelo Prof. Dr. Rubén Sanchez, na Universidade Federal Norte Fluminense (UENF). As técnicas que foram utilizadas para a caracterização dos polímeros incluem peso molecular e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

5.7.1 Comparação das propriedades de copolímeros P(3HB-co-3HHx) produzidos por linhagens selvagem e recombinante de *B. sacchari*

Para a realização de análise de caracterização de propriedades dos copolímeros produzidos por *B. sacchari* selvagem e recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034), foi necessária a produção de polímeros padrão. Os polímeros biossintetizados para tal fim foram: P3HB produzido por *B. sacchari* selvagem (LFM101); homopolímero de 3HHx acumulado por *Pseudomonas* sp. (LFM046); e P(3HB-co-3HHx) acumulado por linhagem de *Aeromonas* sp. (LFM836).

Os experimentos para produção dos polímeros padrão foram realizados conforme descrito em Material e Métodos item 4.3.2.3. As linhagens foram selecionadas para a

produção porque fazem parte da coleção de linhagens do laboratório e eram capazes de acumular os polímeros necessários.

Para realização de análises de caracterização de propriedades dos copolímeros, o material produzido em cultivos em biorreator ou em frascos agitados, no caso dos polímeros padrão, foi extraído e purificado conforme descrito no item 4.5 de Material e Métodos.

A Figura 5.50 mostra as diferenças no aspecto de copolímeros P(3HB-co-3HHx) sintetizados por *B. sacchari* selvagem e pela linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034), em biorreator com limitação em fósforo (conforme descrito nos itens 4.3.3.1 e 4.3.3.2 de Material e Métodos) com diferentes teores de 3HHx. Com apenas análise visual da amostra do PHA produzido pela linhagem recombinante é possível observar a elasticidade do material.

Figura 5.50- Fotografia para análise visual de copolímeros produzidos por *B. sacchari* selvagem e recombinante cultivadas em biorreator e suprida de glicose e ácido hexanoico à vazão de alimentação 4,95 mL/L.h. **A** - Copolímero P(3HB-co-0,5mol%3HHx) produzido por *B. sacchari* selvagem LFM101 **B** - Copolímero P(3HB-co-26mol%3HHx) produzido por LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034).

As composições monoméricas de todos os polímeros produzidos para este bloco de análises, bem como os dados de peso molecular e a temperatura de transição vítrea (T_g) estão descritos na Tabela 5.27. Podemos verificar que o peso molecular do copolímero produzido por *B. sacchari* selvagem e recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) é muito semelhante, apesar de a composição monomérica ser diferente, portanto o conteúdo de 3HHx não influenciou no peso molecular dos copolímeros. Comparando os dados obtidos, observa-se que o peso molecular do P(3HB-co-3HHx) sintetizado por *B. sacchari* e *Pseudomonas* sp., é quase 3 vezes maior que aquele acumulado por *Aeromonas* sp. Os pesos moleculares dos copolímeros P(3HB-co-3HHx)

produzidos por *B. sacchari*, independente do teor de 3HHx, apresentam valores muito próximos, e são menores que aqueles observados para o P(3HB), indicando que inserção dos dois comonômeros pode levar a cadeias poliméricas mais curtas.

Tabela 5.27– Pesos moleculares e temperatura de transição vítrea (Tg) de polímeros produzidos por diferentes linhagens

Linhagem/ Condições de cultivo	Composição PHA (mol%)		Peso Molecular		Tg (°C)
	3HB	3HHx	Mw (Da)	Mw/Mn	
LFM101MMG10 g/L	100,00	0,00	370539	1,51	4,05
LFM101MMG10H1g/L	98,75	1,25	272437	1,56	2,97
LFM344MMG140H45g/L	73,81	26,19	296141	1,83	-2,36
LFM046 MMH1,16	2,32	97,68	314073	1,73	-18,57
TSM21 MMOS 9 g/L	79,90	20,10	102454	1,93	-6,82

MMG: Meio mineral contendo glicose; MMH: Meio mineral contendo ácido hexanoico; MMOS: Meio mineral contendo óleo de soja; 3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); Mn: número médio de peso molecular; Mw/Mn: índice de polidispersão.

O peso molecular de polímeros é um importante fator que determina a processabilidade do material, pois afeta a resistência mecânica do polímero (MONTORO et al., 2010, RIEDEL et al., 2012). Polímeros com alto peso molecular médio formam fibras ou filmes resistentes, o que é desejável para diferentes aplicações (TSUGE et al., 2007). Alguns estudos têm reportado a mutação de genes de PHA sintases, que são responsáveis pela polimerização, para produção de polímeros com alto ou ultra-alto (300×10^4) peso molecular (Mw) (KICHISE; TAGUCHI; DOI, 2002; THOMSON et al., 2013; TSUGE et al., 2004, 2007;). Entretanto polímeros de baixo peso molecular são preferencialmente utilizados para a liberação controlada de fármacos, pois têm taxa de degradação maior e, conseqüentemente, a matriz polimérica será mais facilmente absorvida (MONTORO et al., 2010).

Dados da literatura mostram que PHA produzido por *R. eutropha* H16 selvagem apresentou Mw de 3×10^6 (BUDDE et al., 2010). *E coli* LS5218 contendo *phaC_{Ac}* produziu um P(3HB-co-3HHx) com Mw igual a $98,4 \times 10^4$ (KICHISE; TAGUCHI; DOI, 2002). Tsuge et al. (2007) reportaram que copolímero produzido por *R. eutropha* recombinante abrigando *phaC_{Ac}* apresentou Mw de 65×10^4 .

A temperatura de transição vítrea (Tg) é aquela em que não mais ocorre o movimento conformacional entre os segmentos da cadeia polimérica, o que é definido como estado vítreo. A Tg é uma importante propriedade térmica que pode diferenciar os tipos de polímeros (MONTORO et al., 2010). Os dados relativos à Tg para os polímeros

analisados (Tabela 5.27) indicam que quanto maior o teor de 3HHx no polímero, menor é a temperatura de transição vítrea, conforme foi observado por Cheung, Wan e Yu (2002). Doi, Kitamura e Abe (1995) reportaram T_g entre 0 a -4°C para copolímeros de P(3HB-co-3HHx) com 3HHx variando de 5 a 25 mol%, indicando que o acréscimo destas unidades ao 3HB diminui a T_g .

5.7.2 Análise das propriedades de copolímeros P(3HB-co-3HHx) modulados quanto ao teor de 3HHx

Os polímeros dos cinco experimentos realizados para obtenção de diferentes composições produzidos pela linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) foram extraídos, purificados (item 4.5 de Material e Métodos) e confeccionaram-se filmes. A Figura 5.51 mostra os filmes destes materiais com diferentes teores de 3HHx, que foram enviados para a análise de propriedades térmicas.

Figura 5.51- Copolímeros P(3HB-co-3HHx) com composições variando de 5 a 20 mol% de 3HHx produzidos por *B. sacchari* recombinante abrigando pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) cultivados em biorreator suprido com glicose e ácido hexanoico à vazão de 9,9 mL/L.h. **A** – Filme do copolímero P(3HB-co-20mol%3HHx); **B** – Filme do copolímero P(3HB-co-15mol%3HHx); **C** – Filme do copolímero P(3HB-co-10mol%3HHx); **D** – Filme do copolímero P(3HB-co-5mol%3HHx); **E** – Filme do polímero P(3HB).

A Tabela 5.28 apresenta os pesos moleculares obtidos para os copolímeros com diferentes teores de 3HHx. Conforme detectado anteriormente, os copolímeros produzidos por *B. sacchari* apresentam peso molecular muito semelhante, independente do teor de 3HHx. Porém neste caso, o P(3HB-co-20mol%3HHx) apresentou peso molecular um pouco inferior aos demais.

A temperatura de fusão (T_m) assim como a T_g , observadas neste lote de polímeros analisados, foram obtidas a partir da análise das curvas de calorimetria diferencial exploratória (DSC). A temperatura de fusão (T_m) está associada à fase

cristalina dos polímeros. T_m é a temperatura na qual as cadeias poliméricas se tornam líquidas, saindo do estado cristalino (MONTORO et al., 2010).

Tabela 5.28 – Pesos moleculares e propriedades térmicas de P(3HB-co-3HHx) com diferentes teores de 3HHx produzidos por *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (LFM1034)

Composição da solução de alimentação (g/L)	Composição PHA (mol%)				Peso Molecular		Propriedades Térmicas	
	3HB		3HHx		Mw (Da)	Mw/Mn	Tg (°C)	Tm (°C)
Glicose 140	100,0	±0,00	0,00	±0,00	270633	1,56	2-4	177,8
Glicose 140 / Ác. hex 11,2	94,2	±0,08	5,85	±0,08	303685	1,43	2,87	167,7
Glicose 140/ Ác.hex 22,5	89,8	±0,10	10,25	±0,10	285562	1,49	0,33	167,6
Glicose 140/ Ác.hex 33,7	86,4	±0,06	13,57	±0,06	302592	1,42	-1,26	171,8
Glicose 140/ Ác.hex 45	80,3	±0,41	19,69	±0,41	232833	1,96	-3,2	NO

3HB: 3-hidroxibutirato (4 C); 3HHx: 3-hidroxihexanoato (6 C); Mn: número médio de peso molecular; Mw/Mn: índice de polidispersão; Tg: temperatura de transição vítrea; Tc: temperatura de cristalização; Tm: temperatura de fusão; NO: não observada.

Podemos observar na Tabela 5.28 que a Tg para o copolímero contendo 19 mol% de 3HHx é a menor, quando comparada aos demais. Isto corrobora o que foi comentando anteriormente e em comparação com dados da literatura (CHEUNG; WAN; YU, 2002; DOI; KITAMURA; ABE, 1995).

A Tm para os copolímeros contendo entre 5 e 10 mol% de 3HHx caiu cerca de 10 °C em relação à Tm do homopolímero P(3HB), entretanto, considerando outros dados da literatura esperava-se uma queda mais acentuada. Copolímeros formados por monômeros 3HB e 3HHx, por exemplo, apresentam propriedades melhoradas, pois apresentam Tm menores. Neste caso, quando se considera a temperatura de degradação, uma Tm mais baixa permite aumentar o intervalo de processabilidade do material (MONTORO et al., 2010; NOMURA et al., 2004). A análise de temperatura de degradação do P3HB produzido por *B. sacchari* selvagem e dos copolímeros P(3HB-co-3HHx) produzidos pelas linhagens selvagem e recombinante (item 5.7.1) indicaram início da degradação do material acima de 230 °C, assim, mesmo com uma pequena redução na Tm, ainda se obtém uma janela de processabilidade relativamente ampla.

As propriedades térmicas e mecânicas são influenciadas pelos diferentes teores de comonômeros presentes nos copolímeros (FENG et al., 2002; NOMURA et al., 2004). Copolímeros P(3HB-co-3HHx) apresentam propriedades como alongamento para ruptura maiores, tornando-se mais macios e flexíveis, com o aumento da fração 3HHx (ASRAR et

al., 2002; DOI; KITAMURA; ABE, 1995). A temperatura de fusão (T_m) destes poliésteres diminuiu de 150 °C para 52 °C quanto maior é o teor 3HHx, entre 1,5 e 25 mol% (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; FUKUI; ABE; DOI., 2002; LOO e SUDESH, 2007; TSUGE et al., 2004; WANG et al., 2011).

Para o polímero P(3HB-co-3HHx) contendo 25 mol% de 3HHx a temperatura de fusão (T_m) medida foi de 52 °C (DOI; KITAMURA; ABE, 1995). Um copolímero contendo 11 mol% de 3HHx apresentou valor de T_m de 98,62 °C (WANG et al., 2011). O alongamento para ruptura reportado para copolímeros contendo 12 mol% de 3HHx foi de 400% (LI et al., 2011), enquanto para aqueles com teores de 17 mol% foi de 850% (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; LOO; SUDESH, 2007).

5.7.3 Avaliação preliminar de possíveis aplicações dos copolímeros de acordo com as propriedades obtidas

De acordo com a interpretação dos resultados pelo Dr. Rubén Sanchez (Laboratório de Materiais Avançados, UENF), podem ser destacados os seguintes aspectos com relação aos copolímeros obtidos utilizando a linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS2::*phaPCJ_{Ah}* (LFM1034): apresentam menor cristalinidade em relação ao P3HB; T_g relativamente baixas; comportamento mecânico com maior contribuição do comportamento viscoso em relação ao elástico, à medida que aumenta a fração de 3HHx. Essas características abrem espaço para desenvolver filmes porosos flexíveis, que podem ser utilizados em medicina e odontologia. Além disso, poderiam ser aplicados como matrizes na formulação de sistemas de liberação controlada, por apresentarem um menor efeito barreira e maior volume livre.

De acordo com a literatura, o copolímero P(3HB-co-3HHx) tem apresentado especialmente biocompatibilidade e adequação para aplicações médicas. Wang et al. (2005) estudaram o efeito da composição deste copolímero no crescimento de osteoblastos e fibroblastos e concluíram que o conteúdo de 3HHx no copolímero altera suas propriedades de superfície permitindo atender às necessidades de requisitos de crescimento de diferentes tecidos e células. Estudos de biocompatibilidade de copolímero contendo 12 mol% 3HHx para osteoblastos (LI et al., 2005; WANG et al., 2005), fibroblastos (MEI et al., 2006), nanofibras matrizes como suporte para crescimento de células da pele humana (LI; ZHANG; CHEN, 2008b), células mesenquimais da medula óssea (HU et al., 2009),

células tronco (LOMAS et al., 2012) ou ainda contendo 20 mol% de 3HHx para fibroblastos (WANG et al., 2005) têm sido reportados. Bond (2003) estudou este copolímero contendo 11 mol% de 3HHx associado ao ácido polilático (PLA) para produção de fibras. Um copolímero de mesma composição foi estudado como revestimento na fabricação de válvulas aórticas híbridas (WU et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

As conclusões obtidas neste trabalho estão apresentadas a seguir.

Os ensaios realizados permitiram confirmar que linhagens recombinantes de *B. sacchari* contendo genes de *Aeromonas* spp. acumulam P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico. A presença de genes heterólogos não afetou significativamente a capacidade de acúmulo de polímero nestas linhagens.

O operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. ou diferentes combinações de genes do operon de biossíntese de PHA de *A. hydrophila* inserido em *B. sacchari* LFM344 possibilitou a produção de copolímeros com frações molares de 3HHx variáveis.

A composição do copolímero P(3HB-co-3HHx) produzido por linhagens recombinantes de *B. sacchari* pode ser modulada pela relação glicose/ácido hexanoico fornecida.

Observou-se a incorporação de 3HHx utilizando ácido butírico como cosubstrato, com a expressão do gene *phaC* de *A. hydrophila*, indicando que *B. sacchari* deve possuir uma β -cetotiolase capaz de catalisar a condensação entre butiril-CoA e acetil-CoA para formar 3-cetohexanoil-CoA.

O uso dos ácidos valérico e heptanoico como precursores demonstrou que a *phaC* de *Aeromonas* spp. é capaz de incorporar monômeros 3HV e 3HHp. A composição do polímero assim produzido também pode ser modulada explorando-se os diferentes genes expressos.

Com o fornecimento dos ácidos láurico e linoleico, juntamente com glicose, detectou-se a presença de 3HHx no polímero acumulado, sugerindo que ácidos graxos de óleos vegetais podem ser utilizados como cosubstratos para modular a composição dos copolímeros produzidos por linhagens recombinantes de *B. sacchari*.

Testes com meio de cultura indicaram que as quantidades de Ca e Fe eram limitantes. E mesmo com a reformulação do meio de cultura para *B. sacchari* ainda pode existir uma limitação do Fe.

Cultivos em biorreator foram realizados com a linhagem recombinante abrigando pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. e permitiram controlar a composição do P(3HB-co-3HHx) produzido. Foram obtidos valores de densidades celulares (16,24 a 20,13 g/L) e teores de polímeros (69,55 a 76,92 % da massa seca celular) altos. Também foram alcançados fatores de conversão de glicose a 3HB (entre 0,267 e 0,323 g/g) e ácido hexanoico a 3HHx

(entre 0,366 e 0,503 g/g) elevados. As produtividades volumétricas atingidas (de 0,38 a 0,47 g/L.h) são muito promissoras e indicam que processos economicamente viáveis poderão ser realizados com o aumento da densidade celular utilizando esta linhagem recombinante de *B. sacchari*.

Períodos pseudo-estacionários de produção de polímeros P(3HB) e P(3HB-co-3HHx) foram analisados e verificou-se um balanço de carbonos entre 83,13 e 91,38%. A análise do sobrenadante para a presença de outros subprodutos, na tentativa de fechar o balanço de carbono em 100%, identificou apenas a produção de ácido succínico em pequena quantidade.

Nos períodos pseudo-estacionários analisados, a eficiência de conversão do ácido hexanoico em 3HHx correspondeu a 50% do valor máximo teórico para a linhagem *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034). A eficiência de conversão da glicose e do ácido hexanoico em monômeros 3HB variou entre 61,84 e 83,58% do máximo teórico. Os menores valores foram observados para síntese de polímeros com maiores teores de 3HHx.

Conseguiu-se um bom ajuste dos dados experimentais obtidos das linhagens selvagem e recombinante a um modelo metabólico proposto. O modelo previu um funcionamento cíclico da via ED pelas linhagens testadas. Entretanto, para a linhagem recombinante, a análise da distribuição de fluxos indicou que a via ED não necessitaria ser cíclica para o suprimento de NADPH para a biossíntese de 3HB, ainda que não existisse fluxo no Ciclo de Krebs.

A análise de uma situação para se atingir a eficiência máxima teórica de conversão de glicose e ácido hexanoico em 3HB e 3HHx, considerando-se 50% do ácido sendo convertido ao monômero 3HHx, demonstrou que seriam necessárias maiores ciclicidades na via ED quanto maior fosse a fração de 3HHx incorporada ao PHA. Propõe-se que a deleção do gene *fadB* e seus ortólogos da via de β -oxidação de ácidos graxos deve ser efetiva tanto em melhorar a eficiência de conversão do ácido hexanoico a 3HHx, como de glicose em 3HB.

As propriedades como a Tg e Tm para os copolímeros produzidos variaram em função do teor de 3HHx. Foi proposta a confecção de filmes porosos flexíveis ou sistemas de liberação controlada para aplicação em medicina e odontologia.

REFERÊNCIAS*

- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 85, p. 732-743, 2010.
- ALDOR, I.S. E KEASLING, J.D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Cur. Op. Biotechnol.**, v. 14, p. 475-483, 2003.
- AMARA, A. A. Polyhydroxyalkanoates: from Basic Research and Molecular Biology to Application., **IUM Engineering Journal**, v. 9, p. 37-73, 2008.
- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ASRAR, J.; VALENTIN, H. E.; BERGER, P. A.; TRAN, M.; PADGETTE, S. R.; GARBOW, J. R. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) polymers. **Biomacromolecules**, v. 3, p.1006-1011, 2002.
- AZIZ, R. K; BARTELS, D.; BEST, A. A; DEJONGH, M.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; FORMSMA, K.; GERDES, S.; GLASS, E. M.; KUBAL, M.; MEYER, F.; OLSEN, G. J.; OLSON, R.; OSTERMAN, A. L.; OVERBEEK, R. A.; MC NEIL, L. K.; PAARMANN, D.; PACZIAN, T.; PARRELLO, B.; PUSCH, G. D.; REICH, C.; STEVENS, R.; VASSIEVA, O.; VONSTEIN, V.; WILKE, A.; ZAGNITKO, O. The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1-15, 2008.
- BAPTIST, J.N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. **US Patent Application** 3036959, 1962.
- BIAN, Y.Z; WANG, Y; AIBAIDOU, G.; CHEN, G.Q.; WU, Q. Evaluation de poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 30, p. 217-225, 2009.
- BOND, E.B., Fiber spinning behavior of a 3-hydroxybutyrate/3-hydroxyhexanoate copolymer. **Macromol. Symp.**, v. 197, p. 19-31, 2003.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^a ed. **Springer**, 2006. p-130-435-451.
- BORRERO-DE ACUÑA, J. M.; BIELECKA, A.; HÄUSSLER, S.; SCHOBERT, M.; JAHN, M.; WITTMANN, C.; JAHN, D.; POBLETE-CASTRO, I. Production of medium chain length polyhydroxyalkanoate in metabolic flux optimized *Pseudomonas putida*. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 1-15, 2014.

*De acordo com:

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

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

BRÄMER, C. O., SILVA, L. F., GOMEZ, J. G., PRIEFERT, H. , STEINBUCHER, A., Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101^(T) and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 271-279, 2002.

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

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

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

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects, **J. Biotechnol.**, v. 65, p. 127-161, 1998.

BRIGHAM, C. J.; BUDDE, C. F.; HOLDER, J. W.; ZENG, Q.; MAHAN, A. E.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Elucidation of β -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 5454–5464, 2010.

BUDDE, C. F.; MAHAN, A. E.; LU, J.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Roles of multiple acetoacetyl coenzyme A reductases in polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Ralstonia eutropha* H16. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 5319–5328, 2010.

BUDDE, C.F.; RIEDEL, S.L.; WILLIS, L.B.; RHA, C.; SINSKEY, A.J. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil engineering *Ralstonia eutropha* strains. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, p. 2847-2854, 2011.

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

BUFFONI, E. **Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por *Burkholderia sacchari* a partir de diferentes substratos.** 2006. 80f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

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

CARLETTO, R.A.; CHIADO, A.; GILLIO, F.; BASCO, F.; MARMO, L. Application of SBB staining technique for monitoring PHA production in milk whey fermentation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 24, p. 487-492, 2011.

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

CASTELLANOS, N. A. M. **Avaliação do sistema de mobilização de poli-3-hidroxibutirato em Burkholderia sacchari**. 2010. 89 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CESÁRIO, M. T.; RAPOSO, R. S.; ALMEIDA, M. C. M. D.; KEULEN, F. V.; FERREIRA, B. S.; TELO, J. P.; FONSECA, M. M. R. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Burkholderia sacchari* using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. **Int. J. Biol. Macromol.** DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054 0141-8130, 2014.

CHANPRATEEP, S. Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, p. 621-632, 2010.

CHEE J.Y; LAU, N.S; SAMIAN, M.R; TSUGE. T; SUDESH, K. Expression of *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from palm oil products. **J. Appl. Microbiol.** v. 112, p. 45-54, 2011.

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

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

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, p. 2434-2446, 2009.

CHEUNG, M. K., WAN, K. P. Y., YU, P. H. Miscibility and morphology of chiral semicrystalline poly-(*R*)-(3-hydroxybutyrate)/chitosan and poly-(*R*)-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)/chitosan blends studied with DSC, ¹H T₁ and T₁ CRAMPS. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 86, p. 1253–1258, 2002.

CHIEN, C. C.; HO, L. Y. Polyhydroxyalkanoates production from carbohydrates by a genetic recombinant *Aeromonas* sp. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 47, p. 587-593, 2008.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, p. 335-342, 1997.

CLARK, D. P.; CRONAN, J. E. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources, *In* F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology***, 2nd ed., v. 1. ASM Press, Washington, DC. 1996, p. 343–357.

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

CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMS Microbiol. Reviews**, v. 103, p. 1-28, 1992.

DAI, Z.W; ZOU, X.H; CHEN, G.Q. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) as an injectable implant system for prevention of post-surgical tissue adhesion. **Biomaterials**, v. 30, p. 3075–3083, 2009.

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

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

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

DIRUSSO, C. C. Primary sequence of the *Escherichia coli fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6459-6468, 1990.

DIRUSSO, C. C.; BLACK, P. N.; WEIMAR, J. D. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. **Progress in Lipid Research**, v. 38, p.129-197, 1999.

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

DOI, Y. KITAMURA, S. ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822-4828, 1995.

ELIGIO, T.; RIEUMONT, J.; SÁNCHEZ, R.; SILVA, J. F. S. Characterization of chemically modified poly(3-hydroxyalkanoates) and their performance as matrix for hormone release **Angew. Makromol. Chem.**, v. 270, p. 69-75, 1999.

FENG, L.; WATANABE, T.; WANG, Y.; KICHISE, T.; FUKUCHI, T.; CHEN, G.; DOI, Y.; INOUE, Y. Studies on comonomer compositional distribution of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)s and the thermal characteristics of their fractions. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 1071-1077, 2002.

FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. The role of the fatty acid beta-oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *Pseudomonas putida*. **Arch. Microbiol.**, v. 178, p. 149-160, 2002.

FILIPPOV, M. C. O. **Obtenção e caracterização de mutantes de *Burkholderia sp.* IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato - um plástico biodegradável.** 2000. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

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

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

FUKUI, T.; SHIOMI, N.; DOI, Y. Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 18, p. 667-673, 1998.

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

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

GOMEZ, J. G. C. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos**. 1994. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

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

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

GOMEZ, J.G.C; BUENO NETTO. Produção de poliésteres bacterianos. In: Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3, 219-248.

GONG, Y. A.; WU, H. S.; WEI, Y. H.; SUN, Y. M. Fermentation strategy for the production of poly(3-hydroxyhexanoate) by *Aeromonas* sp. KC014. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 25, p.1422-1426, 2008.

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

HALDEN, R. U. Plastics and health risks. **Annu. Rev. Public Health**. v. 31, p. 179–194, 2010.

HAN, J.; QIU, Y. Z.; LIU, D. C.; CHEN, G. Q. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 239, p. 195-201, 2004.

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

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

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; WILLIAMS, G.A.; DAWES, E.A.; EWING, D.F. Accumulation of a poly (hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by *Rhodococcus* sp. NCIMB 40126. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 13, p. 83-88, 1991.

HEATHMAN, T. R. J.; WEBB, W. R.; HAN, J.; DAN, Z.; CHEN, G. Q.; FORSYTH, N. R.; EL HAJ, A. J.; ZHANG, Z. R.; SUN, X. Controlled production of poly (3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) nanoparticles for targeted and sustained drug delivery. **Pharmaceutical Nanotechnology**. DOI 10.1002/jps.24035, 2014.

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

HOLMES, P.A. Biologically produced PHA polymers and copolymers. In. D.C. Bassett (ed.), Develop. in crystalline polymers. **Elsevier**, London, England, p. 1-65, 1988.

HSIEH, W., CHEN, W. U., YANG, S. , CHOU, X. 3D tissue culture and fermentation of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyvalerate) from *Burkholderia cepacia* D1. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 883-888, 2011.

HU , Y.J., WEI , X., ZHAO, W., LIU, Y. S., CHEN, G.Q. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3 hydroxyvalerate-*co*-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p.1115–1125, 2009.

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

HUIJBERTS, G.N.M.; DE RIJK, T.C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1661-1666, 1994.

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

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

INSOMPHUN, C.; MIFUNE, J.; ORITA, I.; NUMATA, K.; NAKAMURA, S.; FUKUI, T. Modification of β -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 117, p. 184-190, 2014.

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

JENKINS, L. S.; NUNN, W. D. Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the *ato* system. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 42–52, 1987a.

JENKINS, L. S.; NUNN, W. D. Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 2096–2102, 1987b.

JEON, J. M.; BRIGHAM, C. J.; KIM, Y. H.; KIM, Y. H.; YI, D. H.; KIM, H.; RHA, C. K.; SINSKEY, A. J.; YANG, Y. H. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (P(HB-co-HHx)) from butyrate using engineered *Ralstonia eutropha*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, p. 5461–5469, 2014.

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

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

KAMILAH, H.; TSUGE, T.; YANG, T. A.; SUDESH, K. Waste cooking oil as substrate for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate): turning waste into a value-added product. **Malaysian J. Microbiol.**, v. 9, p. 51-59, 2013.

KAZAKOV, A. E.; RODIONOV, D. A.; ALM, E.; ARKIN, A. P.; DUBCHAK, I.; GELFAND, M. S. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. **J. Bacteriol.** Vol. 191, No. 1, p. 52-64, 2009.

KESHAVARZ, T., ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 13, p. 321-326, 2010.

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

KICHISE, T., FUKUI, T., YOSHIDA, Y. , DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 69-77, 1999.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2411–2419, 2002.

KILIÇAY, E; DEMIRBILEK, M; TÜRK, M; GÜVEN, E; HAZER, B; DENKBAS, E. B . Preparation and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHB-HHx) based nanoparticles for targeted cancer therapy. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 44, p. 310-20, 2011.

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

KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y., DOI, Y. Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by

Aeromonas sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA-440. **Biodegrad. Plastics Polym.**, p. 410-416, 1994.

KOVACH, M. E., ELZER, P. H., HILL, D. S., ROBERTSON, G. T., FARRIS, M. A., ROOP, R. M., 2ND, PETERSON, K. M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175-176, 1995.

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

KUNASUNDARI, B.; SUDESH, K. Isolation and recovery of microbial polyhydroxyalkanoates. **Polymer Lett.**, vol.5, p.620–634, 2011.

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

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

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

LANGE, H. C.; WEUSTHUIS, R.; HEIJNEN, J. J. Maximum yields studies of PHA production using metabolic network analysis. In: International Symposium on Biological Polyesters - ISBP, 2002. Münster, Germany. **Abstracts...Münster: Wetsfalische Wilhelms – Universität.** p. 60. SL4.

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

LAU, N. S.; TSUGE, T.; SUDESH. K. Formation of new polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer in *Burkholderia* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 1599–1609, 2011.

LEE, G. N.; NA, J. Future of microbial polyesters. **Microbial Cell Factories**, v. 12, p. 1-4. 2013

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

LEE, S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production SCL-MCL PHAs. In: International Symposium on Biological Polyesters - ISBP, 2002. Münster, Germany. **Abstracts...Münster: Wetsfalische Wilhelms – Universität.** p. 33. L18.

LEEJARKPAI, T.; SUWANMANEE, U.; RUDEEKIT, Y.; MUNGCHAROEN, T. Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions, **Waste Manag.**, v. 31, p. 1153-1161, 2011.

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of γ -hydroxybutyric acid. **Bull. Soc. Chem. Biol.**, v.8, p. 770-782, 1926.

LI, J.; YUN, H.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Effects of surface modification of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHx) on physicochemical properties and on interactions with MC3T3-E1 cells. **Wiley InterScience** DOI: 10.1002/jbm.a.30504, 2005

LI, X. T.; SUN, J.; CHEN, S.; CHEN, G. Q. In vitro investigation of maleated poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for its biocompatibility to mouse fibroblast L929 and human microvascular endothelial cells. **Wiley InterScience**, DOI: 10.1002/jbm.a.31890, 2008a.

LI, X.T., ZHANG, Y., CHEN,G.Q. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, v. 29, p. 3720–3728, 2008b.

LI, S. Y., DONG, C. L., WANG, S. Y., YE, H. M. , CHEN, G. Q. Microbial production of polyhydroxyalkanoate block copolymer by recombinant *Pseudomonas putida*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 90, p. 659-669, 2011.

LIANGQ, Z.; JINGFAN, X.; TAO, F.; HAIBIN, W. Synthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyoctanoate) by a *Sinorhizobium fredii* strain. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 344-349, 2006.

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

LIEBERGESELL, M.; REHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of *Thiocapsa pfeningii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p 186-194, 2000.

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

LOMAS, A.J., CHEN, G.Q ., HAJ, A. J.E., FORSYTH, N.R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) supports adhesion and migration of mesenchymal stem cells and tenocytes **World J. Stem Cells**, v. 4, p. 94-100, 2012.

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

LOO, C. Y., SUDESH, K. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. **Malays. Polymer J.**, v. 2, p. 31-57, 2007.

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

LOZANO, G. C. **Avaliação do papel de genes envolvidos na mobilização de poli-3-hidroxibutirato em linhagens recombinantes de *Escherichia coli***. 2013. 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

LU, X., ZHANG, J., WU, Q. , CHEN, G. Q. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 221(1). 97-101, 2003.

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

LU, X. Y., WU, Q., ZHANG, W. J., ZHANG, G. , CHEN, G. Q. Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from *Aeromonas hydrophila* and its expression in *Escherichia coli*, **Biotechnol. Prog.**, v. 20, p. 1332-1336, 2004.

LU, X.; ZHANG, W.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases from two strains of *Aeromonas hydrophila* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 24, p. 149–155, 2005.

LUENGO, J. M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms, **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 251-260, 2003.

MA, H. K.; LIU, M. M. ; LI, S. Y.; WU, Q.; CHENA, J. C.; CHEN, G. Q. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a bio-surfactant and bactericidal agent. **J. Biotechnol.**, v. 166, p. 34– 41, 2013.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Prentice Hall. 12^a ed., 1160 p., 2010.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 3992–4002, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3ª ed., 2011. 386 p.

MATEUS, A.Y.P. **Melhoramento das condições de produção de polihidroxibutirato a alta densidade celular em biorreatores “airlift”**. 2003. 183 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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

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**, v. 1, p. 17-22, 2000.

MATTA, M. K., LIOLIOU, E. E., PANAGIOTIDIS, C. H., KYRIAKIDIS, D. A., & PANAGIOTIDIS, C. A. Interactions of the antizyme *AtoC* with regulatory elements of the *Escherichia coli* *atoDAEB* operon. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 6324–6332, 2007.

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

MEI, N., · ZHOU, P., · PAN, L. F., · CHEN, G., · WU, C. G., · CHEN, X., · SHAO, Z. Z., · CHEN, G. Q. Biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) modified by silk fibroin. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 17, p. 749–758, 2006.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; CAMARGO, A. R. O; SILVA, L. F. Estratégias para a obtenção do copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx) acumulado por *Burkholderia sacchari*. In: Congresso Brasileiro de Genética, 54., out., 2008, Salvador, **Anais...** 2008, Salvador, BA.

MENDONÇA, T.T.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Avaliação da capacidade de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] a partir de ácidos orgânicos. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 17., 2-5 ago. 2009, Natal, RN. **Anais...** 2009. Natal, RN.

MENDONÇA, T.T.; **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]**. 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, R. J.; SCHRIPESEMA, J.; LOPES, M. S. G.; SILVA, L. F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **J. App. Microbiol.**, v. 116, p. 815-829, 2013.

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; TORTAJADA, M.; VIDAL, D. R.; ROJAS, A.; BUSTAMANTE, D.; SILVA, L. F. Effects of the supply of different glucose/ hexanoic acid ratios in the composition of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) P(3HB-co-3HHx) produced by *Burkholderia sacchari*. In: Reis, M. A.; Méndez, B. S. **Bioplásticos**. PRIBOP – CYTED, 2014. v. 1, p. 9-21.

MIFUNE, J., NAKAMURA, S., FUKUI, T. Engineering of *pha* operon on *Cupriavidus necator* chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil. **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 95, p. 1305-1312, 2010.

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

MONTORO, S. R., SHIGUE, C. Y.; SORDI, M. L. T.; SANTOS, A. M.; RÉ, M. I. Estudo cinético da redução da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 19-24, 2010.

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

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

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

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

NOMURA, C. T.; TANAKA, T.; EGUEN, T. E.; APPAH, A. S.; MATSUMOTO, K.; TAGUCHI, S.; ORTIZ, C. L.; DOI, Y. FabG mediates polyhydroxyalkanoate production from both related and nonrelated carbon sources in recombinant *Escherichia coli* LS5218. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, p. 342-351, 2008.

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

NUMATA, K.; MOTODA, Y.; WATANABE, S.; TOCHIO, N.; KIGAWA, T.; DOI, Y. Active Intermediates of polyhydroxyalkanoate synthase from *Aeromonas caviae* in polymerization reaction. **Biomacromolecules**, v. 13, p.3450-3455, 2012.

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

OJUMU, T. V., YU, J. , SOLOMON, B. O. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, **Afri. J. Biotechnol.**, v. 3, p. 18-24, 2004.

OLIVEIRA, M. C., ANJOS, M. D., SILVA, L. F., TORRES, B. B., PRADELLA, J. G. C. , GOMEZ, J. G. C. Obtenção de mutantes bacterianos deficientes na síntese de poli-3-hidroxibutirato. In: Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil, **Resumo...**, 1998.

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

PARK, S. J.; AHN, W. S.; GREEN, P. R.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 248-254, 2001.

PARK, S. J., KIM, T. W., KIM, M. K., LEE, S. Y. , LIM, S. C. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnol. Adv.**, v. 30, p. 1196-1206, 2012.

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

PEREIRA, E. M. **Avaliação da influência de genes do catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *B. sacchari* e outras bactérias.** 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas-, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PEREIRA, EM, SILVA-QUEIROZ, SR, GOMEZ, JGC, SILVA, LF . Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 688-697, 2009.

PERIN, L.; ARAÚJO, J. L. S.; REIS, V. M. O gênero *Burkholderia*: um importante componente da comunidade microbiana. **Embrapa: doc. 219**, 2006. Disponível em: www.cnpab.embrapa.br/publicacoes. Acesso em: 28/06/2008.

PFEIFFER, T, SÁNCHEZ-VALDENEBRO, I; NUNO, J.C; MONTERO, F.; SCHUSTER, S, Metatool: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, p. 251-257, 1999.

PHILIP, S., KESHAVARZ, T. , ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 233-247, 2007.

PHUKON, P.; SAIKIA, J. P.; KONWAR, B. K. Bio-plastic (P-3HB-co-3HV) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) and its biodegradation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 30–34, 2012.

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

POBLETE-CASTRO, I.; BINGER, D.; RODRIGUES, A.; BECKER, J.; SANTOS, V. A. P. M.; WITTMANN, C. In-silico-driven metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for enhanced production of poly-hydroxyalkanoates. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 113–123, 2013.

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

PRADELLA, J. G. C.; TACIRO, M. K.; MATEUS, A. Y. P. High-cell-density poly(3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 8355–8360, 2010.

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

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

REDDY, C. S., GHAI, R., RASHMI , KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview, **Bioresour. Technol.**, v. 87, p. 137-146, 2003.

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

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

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

REHM, B. H. A. , STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases: The Key Enzymes of PHA Synthesis. In: _____ **Biopolymers Online**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. p. 234 -289.

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

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

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications, **Nat. Rev. Micro.**, v. 8, p. 578-592, 2010.

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

RHIE, H. G.; DENNIS, D. Role of *fadR* and *atoC*(Con) mutations in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *pha1 Escherichia coli*. **App. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 2487-2492, 1995

RIEDEL, S.L.; BADER, J.; BRIGHAM, C.J.; BUDDE, C.F.; YUSOF, Z.A.M.; RHA, C.; SINSKEY, A.J. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by *Ralstonia eutropha* in high cell density palm oil fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 109, p. 2847-2854, 2012.

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

ROCHA, R.C.S. **Produção de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato por *Burkholderia sacchari* IPT 189.** 2002. 140 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas-, Universidade São Paulo, São Paulo, 2002.

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

ROCHA, R. C. S.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Controle da biossíntese de poli-hidroxialcanoatos bacterianos através do fluxo de substratos. **Química Nova**, v. 30, p. 53-55, 2007.

ROCHA, R.C.S., SILVA, L. F., TACIRO, M. K., PRADELLA, J. G. C. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World. J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 427-431, 2008.

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

SAMBROOK, J. , RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

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

SATO, S.; NOMURA, C. T.; ABE, H.; DOI, Y.; TSUGE, T. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] formation in *Escherichia coli* from glucose through an enoyl-CoA hydratase-mediated pathway. **J. Biosci. Bioeng.**, 103(1). 38-44, 2007.

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

SAUER, U.; CANONACO, F.; HERI, S.; PERRENOUD, A.; FISCHER, E. Metabolism of *Escherichia coli* divergent functions in NADPH transhydrogenases UdhA and PntAB have the soluble and membrane-bound. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 6613-6619, 2004.

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

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

SESHADRI R; J. S.W.; CHOPRA, A. K.; SHA, J; SHAW, J.; GRAF, J.; HAFT, D.; WU, M.; REN, Q; ROSOVITZ, M. J.; MADUPU, R.; TALLON, L.; KIM, M.; JIN, S; VUONG, H.; STINE, O. C.; ALI, A.; HORNEAMAN, A. J.; HEIDELBERG, J. F. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 8272-8282, 2006.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review, **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 246-265, 2008.

SHEN, X. W., YANG, Y., JIAN, J., WU, Q. , CHEN, G. Q. Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant *Aeromonas hydrophila* strain 4AK4, **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 4296-4299, 2009.

SHI, H.; NIKAWA, J.; SHIMIZU, K. Effect of modifying metabolic network on poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis in recombinant *Escherichia coli*. **J. Biosci. Bioeng.** V. 87, p. 666-677, 1999.

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

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

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

SILVA, L. F. **Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) – um plástico biodegradável.** 1998. 62 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, L.C.A. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos à base de polihidroxialcanoato/ atapulgita.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Programa Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, 2010.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nat. Biotech.**, v. 1, p. 784-791, 1983.

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

SOLAIMAN D.K.Y; ASHBY R.D. Genetic characterization of the poly(hydroxyalkanoate) synthases of various *Pseudomonas oleovorans* strains. **Curr. Microbiol.**, v. 50, p. 329–333, 2005.

SRIENC, F. Metabolic pathway construction. In: International Symposium on Biological Polyesters - ISBP, 2002. Münster, Germany. **Abstracts...** Münster: Wetsfalische Wilhelms – Universität. p. 18. L3.

SRIVASTAVA, S. K.; TRIPATHI, A. D. Effect of saturated and unsaturated fatty acid supplementation on bio-plastic production under submerged fermentation. **Biotechnology**, v. 3, p. 389–397, 2013.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms, **Bioch. Engineer. J.**, v. 16, p. 81-96, 2003.

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

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

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

STEINBUSCH, K. J. J.; HAMELERS, H. V. M.; PLUGGE, C. M.; BUISMAN, C. J. N. Biological formation of caproate and caprylate from acetate: fuel and chemical production from low grade biomass. **Energy Environ. Sci.**, v. 4, p. 216-224, 2011.

STEPHANOPOULOS, N. G., ARISTIDOU, A. A., NIELSEN, J. **Metabolic engineering principles and methodologies**. San Diego: Academic Press, 1998. 725 p.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metab. Eng.**, v. 1, p. 1-11, 1999.

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

SUN, M., ZHOU, P., PAN, L. F., LIU, S. , YANG, H. X. Enhanced cell affinity of the silk fibroin- modified PHBHHx material, **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 20, p. 1743-1751, 2009.

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M. , SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. **Biotechnol. Adv.**, v.25, p. 148-175, 2007.

TACIRO, M. K. **Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{mcl}) sob limitação múltipla de nutrientes.** Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

TAPPEL, R. C., WANG , Q., NOMURA. C. T. Precise control of repeating unit composition in biodegradable poly(3-hydroxyalkanoate) polymers synthesized by *Escherichia coli*. **J. Biosc. Bioeng.**, v. 113, 480–486, 2012.

THOMSON, N. M.; SAIKA, A.; USHIMARU, K.; SANGIAMBUT, S.; TSUGE, T.; SUMMERS, D. K.; SIVANIAH, E. Efficient Production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *Escherichia coli* by coexpression of molecular chaperones. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 79, p. 1948–1955, 2013.

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

TRINH, C. T.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Elementary mode analysis: a useful metabolic pathway analysis tool for characterizing cellular metabolism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 81, p. 813-826, 2010.

TRIPATHI, L., WU, L. P., CHEN, J., CHEN, G. Q. Synthesis of diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-b-PHHx] by a β -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. **Microbial Cell Factories**, v. 44, p. 1-11, 2012.

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

TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates, **J. Biosci. Bioeng.**, v. 94, p. 579-584, 2002.

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

TSUGE, T.; WATANABE, S.; SATO, S.; HIRAISHI, T.; ABE, H.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by saturation mutagenesis of *Aeromonas caviae* PHA synthase, **Macromol. Biosci.**, v. 7, p. 846-854, 2007.

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

VALENTIN, H. E.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and characterization of the *Methylobacterium extorquens* polyhydroxyalkanoic-acid-synthase structural gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p.309-317, 1993.

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

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

VANDAMME, P.; GOVAN, J.; LIPUMA, J. Diversity and role of *Burkholderia* spp. In CONYE, T.; VANDAMME, P. **Burkholderia Molecular Microbiology and Genomics**. C. T. V. P. Norfolk, UK., Horizon Bioscience, p.1-28, 2007.

VARMA, A.; PALSSON, B. O. Metabolic flux balancing: basic concepts, scientific and practical use. **Nat. Biotechnol.**, v. 12, p. 994-998, 1994.

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

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

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

VON GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a review, **Infection**, v. 35, p. 59-64, 2007.

WALLEN, L.L.; ROHWEDDER, W.K. Poly3 β -hydroxyalkanoate from activated sludge. **Env. Sci. Technol.**, v. 8, p. 576-579, 1974.

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

WANG YW, YANG F, WU Q, CHENG YC, YU PHF, CHEN J, CHEN GQ. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast. **Biomaterials**, v. 26, p. 755–761, 2005.

WANG, Q.; NOMURA, C. T. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 110, p. 653-659, 2010.

WANG, H. H., ZHOU, X. R., LIU, Q., GHEN, G.Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. **Chem. Appl. Microbiol. Biotechnol** DOI 10.1007/s00253-010-2964-x, 2010.

WANG, H. H., ZHOU, X. R., LIU, Q., CHEN, G. Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 1497-1507, 2011.

WANG, Q.; ZHU, C.; YANCONE, T. J.; NOMURA, C. T. The Effect of co-substrate feeding on polyhydroxyalkanoate (PHA) homopolymer and copolymer production in recombinant *Escherichia coli* LS5218. **J. Bioprocess Eng. Biorefinery**, vol. 1, p.1-7, 2012.

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

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. New York: Oxford Univerty Press, 3^a ed., 2007. 628 p.

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

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

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

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

XIE, W.P.; CHEN, G.Q. Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) by recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 harboring genes *phaPCJ*. **Biochem. Engineer. J.**, v. 38, p. 384-389, 2008.

XIONG, Y. C., YAO, Y. C., ZHAN, X. Y., CHEN, G. Q. Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors. **J. Biomat. Scien.**, v. 21, p. 127-140, 2010.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, J.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T., ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol. Immunol.**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YANG, X. S.; ZHAO, K.; CHEN, G. Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v. 23, p. 1391-7, 2002.

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

YU, J.; WANG, J. Metabolic flux modeling of detoxification of acetic acid by *Ralstonia eutropha* at slightly alkaline pH levels. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 73, p. 458-464, 2001.

ZHANG, H. F.; MA, L.; WANG, Z. H.; CHEN, G. Q. Biosynthesis and characterization of 3-hydroxyalkanoate terpolyesters with adjustable properties by *Aeromonas hydrophila*, **Biotechnol. Bioeng.**, v. 104, p. 582-589, 2009.

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

ZHILA, N. O.; VOLOVA, T. G.; NIKOLAEVA, E. D.; SYRVACHEVA, D. A. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymers. **J. Siberian Federal University**, v. 2, p. 158-171, 2011.

ZHOU, J., PENG, S. W., WANG, Y. Y., ZHENG, S. B., WANG, Y. CHEN, G. Q. The use of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tarsal repair in eyelid reconstruction in the rat. **Biomaterials**, v. 31, p. 7512-7518, 2010.

APÊNDICES

APÊNDICE A -

Sequência da região do genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 contendo operon de biossíntese de PHA constituído pelo gene *phaC* (PHA sintase) flanqueado por *phaJ* (enoil-CoA hidratase) e *phaP* (PHAsina)

As regiões sublinhadas evidenciam, respectivamente, *phaP* (351 bp), *phaC* (1785 pb) e *phaJ* (405 bp). As partes marcadas em amarelo correspondem à localização dos *primers* desenhados para esta linhagem.

CCCAGCCAATGCCGATGGCATCCATGTGTTCCATTGTCATGCCAGTGTACCTCTGCACGCTATCAATGCAGC
ACAGGGTAATGGCTGGAGCCCCATAAGCAAGGTTGGCGGCGGGCTTAGAAGGATTTCTTGAAATTGATCAGC
GGCAAGATGGGGAACCCCGTTCTCGGCGTAGTTGGCGAGGCCAATCTGCAGACCGTCCAAGTGCTTGGTGG
CGTTGATGAAGCCCAGCTGGAAGGTGGTGGCTCGGCATAGTTGACGAAGCCGACGTTGGCCAGGGCATTGCC
CTTGGCGATGTTGACGGCACCCAGTTGAGGCCCTGCACATTGTTGGTCAGGTTGACGAAGCCAAGGTTGACG
CCCTTGTCCTGACCCCTCGTGCCAGTTGACCGCGTTGATCGCCACCCCGCCAACTGGTGGCGTACCCGACCGG
CGCCAAGGAAGATGCCAAGCTGCAGACCGGTGAATTGATCCACGTCGGAGAGGGCGAAGACCGGCAGATCGAT
CCCTTTCACCTGACCGGTSCGACCATAGAGCACAGAGGCTCTGGCCCCCTCCACCTGATGGGACGCGGGCAGA
TTGACGCCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGGTACTGGCGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCATGG
CAAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCATCGATGCATTCCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCCG
CGGCCTGGGAACGAGACCCGACGGACGTGGCTGGCTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAACTGGACAG
ACCAGAAATCAATATTTTCGCCAAAAATTAACATTTTATATTATTTACATCAAGCCTCATTTGGTAACACAATGCC
TAAACGTGCGTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGGATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAA
TGGGCCCATCGGCCTTTTGAATACCCTTCTGCCAACCACGGAGACACGCGATGAATATGGACGTAATCAAGA
CCTTTACCAGCAGATGCAAGGCTTTGCCGCCCCCTCACCCGTTATAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGA
ACAGCTGACCCGGCTACAGTTGGCGTCCGCCAACGCCATGCGGAGCTGGGACTGAACCAGCTGCAGGCCGCC
GGCAAGGTGCAGGATGCCAGAGCCTGGCGGCCCTCGGCACCGTCCAGCTGGAGACCGCCAGCCAGCTCTCCC
GCCAGATGCTGGACGACATCCAGAAGCTCAACACCCCTCGGCCAGCAGTTCAAGGACGACCTCGACGCCCTGGC
TGCCGACGGCATCAAAAAGAGCACGGGCAAGGCCTGATATCCCCCTGGCTGCCCAGGAGCGGCGAGCCACATCT
CCCCATGCTCCGTCACGACAGGCTCGCCCTGCGCCGGGGATGGGTGAAGGAGAGAACATGAGCCAATCATCTT
ACGGCCCGCTGTTTCAGAGCCCTGGCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACCGAGCG
CACGGCCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGGGTAGCCAACAGCCC
TGGCAACTGATCAATGCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCAAACCTGATGCAGCACACCCCTGCTCAAAA
GCGCAGGCCAGCAGAGCGAACCCTCATCGCTCCCAGCGCAGCGATCGTCGCTTCAAGGCCGACGCCCTGGAG
CGAGCAGCCCATTATGACTACCTCAAACAATCCTATCTGCTGACCGCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGAT
GCCCTCGAGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGTTTCTTTACCCGCCAGTACATCAACGCCATGG
CCCCAGCAACTTTCTGGCCACCAACCCGGAGCTGCTCAAGCTGACCCCTGGAGTCTGACGGCCAGAATCTGGT
GCGCGGGCTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCGCCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAG
TCCGCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGGCGCTGACGCCGGGCGGGTGGTGCAGCGCACCCGAGCTGTATGAGC
TCATTACGTACAGCCCGACACGGAACCGTGGCCAGGACGCCGCTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACAA
GTACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCCCTGGTGGCCTGGCTGGTCGCCAGGGCCAGACGGTGTTC
ATGATCTCCTGGCGCAACCCGGGTCCGGCCAGGCCGACATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGCGTCA
TCGCCGCGCTGGATGGCGTGGAGGCGGCCACCGCGAGCGGGAAGTGCACGGCATCGGCTACTGCATCGGCGG
TACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAGCAACGGGTTTCATCCGCCACCCCTG
TTCACCACCCCTGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGGAACTTGGCATTTCATCCACGAGCCCATCATTTGCGGCGC
TGGAAGCCCAGAACGAAGCCAAGGCCATCATGGACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTTACGCTGCTGCGGGA
GAACAGCCTCTACTGGAATTACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGCGAGAGCCCGGTGGCGTTTCGATCTGCTG
CACTGGAACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTATCTGGAGA
ACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGCAAGGTGAAGACCCCGGTGCT
GCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAAGGGACCTGGCAGGGCATGAAGCTGTTTCGGTGGC

GAGCAGCGCTTCATCCTGGCTGAATCGGGCCACATCGCCGGCATCGTCAATCCGCCGGACGCCAACAAGTACG
 GCTTCTGGCAGAACGACGCCGAGGCCATCAGCCCCGAGGCGTGGCTCGCCGGCGCAAGCCACACCCCAGGCTC
 CTGGTGGCCGCAGATGGCCGCCCTTCATCCAGAGCCGGGAAGAGGATCCCGCCCCCTCCCTGCCCGCATCCCCG
 AGCGAAGGGCTGGAAGCGGCCCCCGGTAGCTACGTCAAGGTAAGGCTCAACCCAGTCTTTGCCAGACCCCCG
 AGGAGGAGCCAGCATGAGCATGCCTCCCTTCGAGGTGGGCCAACAGGCCAGCCTGACCAAGCGGTTTCGGTGCG
 GCAGAGGTCGAGGCGTTTGCCGGGTGTGTCGGAGGATTTCAATCCGCTGCACCTGGATCCCGCTTTCGCCGCCA
 CCACGCCGTTTCGAGCGCCCCATCGTGCACGGCATGCTGCTGGCCAGCCTCTTCTCGGGGCTGCTGGGCCAGCA
 ACTGCCGGGCAAGGGCACCGTCTACCTCGGTTCAGAGCCTCGCCTTCAAGCAGCCGGTGTTTGTGGGGGATGAG
 GTGACGGCAGAGGTGGAGATCATCGCCCTGCGCAGCGACAAGCCCATCATCACCTGGCCACCCGCATCCTGA
 CGGCCACCGGCGCCATCGCCGTACGCGTGAAGCCGTGGTGAAGTTCGGCTGAAGGGGTTTGCCCCATGATC
 TCAGTCAGCCCGGCCACTGCCGGGCTGACTGCTATGGTGTGCGCCCCAAAAATGGTCTTGCAAACCACAATTG
 CCCGCAGAGAGGTGCCCTTGCCCTTTCTTTGGCGGCCCGAACTGCCTAAAATAACCGCCCTGCTGTTTCAGCC
 ATTCATCCACTAGAGGATTTCCCATGGAGACGTTTCTGCTCGAAGGCCACCCCTTCGTTGCCTTGTGCGACCT
 TATCAAACATCAGGGTTGGGCGGATTGTGGCGGTGCGGCCAAGGCGCTGGTCGCCGAAGGGCTGGTAGAGGTG
 GACGGTCAGGTCGAGACCCGCAAACGCTGCAAGATCGTGGCCGAGCAAGTAGTCAACTTCAACGGCATGAAAG
 TGGTCGTGAAAGAAGGCGTCAGCCCCGAGATCCTCTGATCCCGACGCTCTGCCACGCAAGCGCTACCCAGCAC
 AGTGGCCAAGCTGATGGCCAACTTCAACGACATGAAGGTGGTGGTGAAAGAAGGCATCAGCCCCGAGATCCTC
 TGATCCCTATGCTCTGCCACGCAAGTGCTACCCAGCACAGTGGGCGAGCAAGTGGTCAACTTCAACGGCATGA
 AAGTGGTCGTGAAAGAAGGCGTCAGCCCGAGATCCTCTGACCTCGCTTGAATAAGGGCGCCAACGCGCCCTT
 TGATATTAGCTGGCTTTGATCGACAGGGTCAGCACGAAGCGCGCCATCGCCTCATCCCCGTTTCAGCGACGGA
 CAGGTGGCCACCACCTGGATGGGGCGGTTGATGCGCTGACCGCTGGCCAGCGACTCGTCGATCATGGCGTCGA
 TCACCTCCCCGGCCGCGCAGTCAAACCTGCACATCCCCCTCGGGCCGTTTCAAAAACCTCCCCCTGCACATCCTT
 GAAGGCGAAGTGACCTTCTTGCGCCGCTGCCGCCCTTCTCCATCACCAGCAGACCGCCCACCAGATCGGCG
 CCGGTGGCCAGCGCGCCGAAATACATGCTGC

APÊNDICE B -

Resultados obtidos para o alinhamento das sequências *phaPC* e *phaCJ* de *Aeromonas hydrophila* clonadas e da sequência complementar presente na literatura.

```

Alignment of Sequence_1: [phaPC_forward.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]
Similarity : 803/913 (87,95 %)

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 CAAGGAAGATGCCAAGCTGCAGACCGGTGAATTGATCCACGTCGGAGAGGGCGAAGACCG 60

Seq_1 1 -----A-g-tttAA---CAT 10
Seq_2 61 GCAGATCGATCCCTTTACCTGACCGGTGCGACCATAGAGCACAGAGGCTCTGGCCCCCT 120

Seq_1 11 G-TCTCTGTGAGGGAGTGCAGATTGACCCC-----GAGAGCTGGACAGGGGTACTGG 62
Seq_2 121 CCACCTGATGGGACGCGGGCAGATTGACGCCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGGTACTGG 180

Seq_1 63 CGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGCAAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCA 122
Seq_2 181 CGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGCAAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCA 240

Seq_1 123 TCGATGCATTCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCGGCGGCCTGGGAA 182
Seq_2 241 TCGATGCATTCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCGGCGGCCTGGGAA 300

Seq_1 183 CGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAAACTGGAC 242
Seq_2 301 CGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAAACTGGAC 360

Seq_1 243 AGACCAGAATCAATATTTGCCCCAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCAT 302
Seq_2 361 AGACCAGAATCAATATTTGCCCCAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCAT 420

Seq_1 303 TGGTAACACAATGCCTAAACGTGCGCTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGG 362
Seq_2 421 TGGTAACACAATGCCTAAACGTGCGCTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGG 480

Seq_1 363 ATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAATGGGCCCATCGGCCTTTTGCAATACCCCTTCTG 422
Seq_2 481 ATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAATGGGCCCATCGGCCTTTTGCAATACCCCTTCTG 540

Seq_1 423 CCAACCACGGAGACACGCGATGAATATGGACGTAATCAAGACCTTTACCGAGCAGATGCA 482
Seq_2 541 CCAACCACGGAGACACGCGATGAATATGGACGTAATCAAGACCTTTACCGAGCAGATGCA 600

Seq_1 483 AGGCTTTGCCGCCCCCTCACCCGTTATAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGAACAGCT 542
Seq_2 601 AGGCTTTGCCGCCCCCTCACCCGTTATAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGAACAGCT 660

Seq_1 543 GACCCGGCTACAGTTGGCGTCCGCCAACGCCTATGCCGAGCTGGGACTGAACAGCTGCA 602
Seq_2 661 GACCCGGCTACAGTTGGCGTCCGCCAACGCCTATGCCGAGCTGGGACTGAACAGCTGCA 720

Seq_1 603 GGCCGCCGG-AAGGTGCAGGATGCCCA-AGCCTGGCGGCCCTCGGCACCGTCCAGCTGGA 660
Seq_2 721 GGCCGCCGGCAAGGTGCAGGATGCCCAGAGCCTGGCGGCCCTCGGCACCGTCCAGCTGGA 780

Seq_1 661 GACCGCCAGCCAGCTCTCCCGCCAGATGCTGGACGACATCCAGAAGCTCAACACCCCTCG- 719
Seq_2 781 GACCGCCAGCCAGCTCTCCCGCCAGATGCTGGACGACATCCAGAAGCTCAACACCCCTCGG 840

Seq_1 720 CCAGCAGTT-AAGGACGACCTCGACGCCCTGGCTGCCGACGGCATCAAAA--GAGACGGG 776
Seq_2 841 CCAGCAGTTCAAGGACGACCTCGACGCCCTGGCTGCCGACGGCATCAAAAAGAGCACGGG 900

```

Figura A.1 – Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_forward*.

Alignment of Sequence_1: [phaPC_reverse.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]

Similarity : 872/962 (90,64 %)

```

Seq_1 962 ----- 963
Seq_2 1    CTGTATGAGCTCATTCACTACAGCCGACACGGAAACGGTGGCCAGGACGCCGGTACTG 60

Seq_1 962 ----- 963
Seq_2 61    ATCGTGCCGCCCTTCATCAACAAGTACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCCCTG 120

Seq_1 962 -----G-TTTACTGTGTGCCTGCGTCGCCCAGGTGAGACGGTT 926
Seq_2 121    GTGGCCTGGCTGGTCGCCCAGGGCCAGACGGTGTTCATGATCTCCTGGCGCAACCCGGGT 180

Seq_1 925    TCATGATCTCTGGCCATCAGTCCGGCCAGCCGATCGATTGACGACTACGTGAGACGCGTC 866
Seq_2 181    CCGGCCCAGGCCGACATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGCGTCATCGCCGCGCTG 240

Seq_1 865    ATCGCGCTGATGCGTGAGCGCCCGCAGCGGTAGTGAC-GCATCGGCTACTGCATCGGC 807
Seq_2 241    GATGGCGTGGAGGCGGCCACCGGCGAGCGGGAAGTGACGGCATCGGCTACTGCATCGGC 300

Seq_1 806    G-TACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAGCAACGGGTT 748
Seq_2 301    GGTACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAGCAACGGGTT 360

Seq_1 747    CGATCCGCCACCCTGTTCAACCACC-TGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGAACTTGGCATT 689
Seq_2 361    CGATCCGCCACCCTGTTCAACCACCCTGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGAACTTGGCATT 420

Seq_1 688    TTCATCCACGAGCCCATCATTTGCGGCGCTGGAAGCCAGAACGAAGCCAAGGGCATCATG 629
Seq_2 421    TTCATCCACGAGCCCATCATTTGCGGCGCTGGAAGCCAGAACGAAGCCAAGGGCATCATG 480

Seq_1 628    GACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTAGCCTGCTGCGGGAGAACAGCCTCTACTGGAAT 569
Seq_2 481    GACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTAGCCTGCTGCGGGAGAACAGCCTCTACTGGAAT 540

Seq_1 568    TACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGCGAGCCCGGTGGCGTTTCGATCTGCTGCACTGG 509
Seq_2 541    TACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGCGAGCCCGGTGGCGTTTCGATCTGCTGCACTGG 600

Seq_1 508    AACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTAT 449
Seq_2 601    AACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTAT 660

Seq_1 448    CTGGAGAACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGC 389
Seq_2 661    CTGGAGAACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGC 720

Seq_1 388    AAGGTGAAGACCCCGGTGCTGCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAA 329
Seq_2 721    AAGGTGAAGACCCCGGTGCTGCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAA 780

Seq_1 328    GGGACCTGGCAGGCATGAAGCTGTTTCGGTGGCGAGCAGCGCTTCATCCTGGTGAATCG 269
Seq_2 781    GGGACCTGGCAGGCATGAAGCTGTTTCGGTGGCGAGCAGCGCTTCATCCTGGTGAATCG 840

Seq_1 268    GGCCACATCGCCGGCATCGTCAATCCGCGGACGCCAACAAAGTACGGCTTCTGGCAGAAC 209
Seq_2 841    GGCCACATCGCCGGCATCGTCAATCCGCGGACGCCAACAAAGTACGGCTTCTGGCAGAAC 900

```

Figura A.2 - Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_reverse*.

Alignment of Sequence_1: [phaCJ_forward.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]
 Similarity : 823/939 (87,65 %)

```

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 ATCCCCCTGGCTGCCCCGACGGGCAGCCACATCTCCCCATGCTCCGTACAGACAGGCTC 60

Seq_1 1 -----AATA-GCGCTTC-TG-AC-GGGAGACATGAGCC-ATCATCTTACGGCCCCGCTGT 49
          |||
Seq_2 61 GCCCTGCGCCGGGGATGGGTGAAGGAGAGAACATGAGCCAATCATCTTACGGCCCCGCTGT 120

Seq_1 50 TCGAGGCCC-GGCCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACCGAGC 108
          |||
Seq_2 121 TCGAGGCCCTGGCCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACCGAGC 180

Seq_1 109 GCACGGCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGG 168
          |||
Seq_2 181 GCACGGCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGG 240

Seq_1 169 GTAGCCAACAGCCCTGGCAACTGATCAATGCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCA 228
          |||
Seq_2 241 GTAGCCAACAGCCCTGGCAACTGATCAATGCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCA 300

Seq_1 229 AACTGATGCAGCACACCCTGCTCAAAAGCGCAGGCCAGCAGAGCGAACCGCTCATCGCTC 288
          |||
Seq_2 301 AACTGATGCAGCACACCCTGCTCAAAAGCGCAGGCCAGCAGAGCGAACCGCTCATCGCTC 360

Seq_1 289 CCGAGCGCAGCGATCGTCGCTTCAAGGCCGACGCCCTGGAGCGAGCAGCCATTATGACT 348
          |||
Seq_2 361 CCGAGCGCAGCGATCGTCGCTTCAAGGCCGACGCCCTGGAGCGAGCAGCCATTATGACT 420

Seq_1 349 ACCTCAAACAATCCTATCTGCTGACGCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGATGCCCTCG 408
          |||
Seq_2 421 ACCTCAAACAATCCTATCTGCTGACGCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGATGCCCTCG 480

Seq_1 409 AGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGTTTCTTTACCCGCCAGTACATCAACG 468
          |||
Seq_2 481 AGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGTTTCTTTACCCGCCAGTACATCAACG 540

Seq_1 469 CCATGGCCCCCAGCAACTTTCTGGCCACCAACCCGAGCTGCTCAAGCTGACCCCTGGAGT 528
          |||
Seq_2 541 CCATGGCCCCCAGCAACTTTCTGGCCACCAACCCGAGCTGCTCAAGCTGACCCCTGGAGT 600

Seq_1 529 CTGACGGCCAGAATCTGGTGCGCGGCTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCG 588
          |||
Seq_2 601 CTGACGGCCAGAATCTGGTGCGCGGCTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCG 660

Seq_1 589 CCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAGTCCGCCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGG 648
          |||
Seq_2 661 CCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAGTCCGCCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGG 720

Seq_1 649 CGCTGACGCGCGGCGCGGTGGTGACGCGACCGAGCTGTATGAGCTCATTAGTACAGCC 708
          |||
Seq_2 721 CGCTGACGCGCGGCGCGGTGGTGACGCGACCGAGCTGTATGAGCTCATTAGTACAGCC 780

Seq_1 709 CGACCACGGAA-CGGTGGCCAGGACGCCGGTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACA-GT 766
          |||
Seq_2 781 CGACCACGGAAACGGTGGCCAGGACGCCGGTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACAAGT 840

Seq_1 767 ACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCC----- 798
          |||
Seq_2 841 ACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCCCTGGTGGCCTGGCTGGTCGCCCAGGGCC 900

```

FiguraA.3 - Resultado do alinhamento da sequência *phaCJ_forward*.

Alignment of Sequence_1: [phaCJ_reverse.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]

Similarity : 597/834 (71,58 %)

```

Seq_1 866 ----- 867
Seq_2 1   GCGGTCTCTTTTTCAGCCTGCTGCGGGAGAACAGCCTCTACTGGAATTACTACATCGACAGC 60

Seq_1 866 ----- 867
Seq_2 61   TACCTCAAGGGGCAGAGCCCCTGGCGTTCGATCTGCTGCACTGGAACAGCGACAGCACC 120

Seq_1 866 -----CCGTGTCGATCTTGCATGAACACTA 842
Seq_2 121  AACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTATCTGGAGAACCAGCTG 180

Seq_1 841  GCCACTGCGGCCAACACAGCAGCTGCTGGCGCTCATCTGAGATCAGTGGGAAGGGGAGC 782
Seq_2 181  GGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGCAAGGTGAAGACCCCG 240

Seq_1 781  TCCAGTCGCCACCCGCATCGTCTGCAGTGAGACCCGGCTGTGGTCTCAGCCATGCCATCA 722
Seq_2 241  GTGCTGCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAAGGGACCTGGCAGGGC 300

Seq_1 721  CATCCCGTCTGGCAGACATGACGGGCATGAAGTTACGGTGGAGCACGCTTCATGCCTGCC 662
Seq_2 301  ATGAAGCTGTTCGGTGGCGAGCAGCGCTTCATCCTGGCTGAATCGGGCCACATCGCCGGC 360

Seq_1 661  TGAACGGCCATGCTGCTCGTCAATGCCCAACAAGTGGCTCTGCAAACGACGCGAGATCGC 602
Seq_2 361  ATCGTCAATCCGCCGACGCCAACAAGTACGGCTTCTGGCAGAACGACGCGGAGGCCATC 420

Seq_1 601  GGCGCTCCGGCGCACCCACCGGTTGTGCGCGTGGCGCCTCATCCAGACGGAAGAGGATCC 542
Seq_2 421  AGCCCCGAGGCGTGGCTCGCCGCGCAAGCCACACCCAGGCTCCTGGTGGCCGAGATG 480

Seq_1 541  GCCCCCTCTCGCATCCCGAG----- 520
Seq_2 481  GCGCCCTTCATCCAGAGCCGGGAAGAGGATCCCGCCCCCTCCCTGCCCGCATCCCGAGC 540

Seq_1 519  GAAGGGCTGGAAGCGGCCCCCGGTAGCTA-GTCAATAA---GCTCAACCCAGTCTTTGCC 464
Seq_2 541  GAAGGGCTGGAAGCGGCCCCCGGTAGCTACGTCAAGGTAAGGCTCAACCCAGTCTTTGCC 600

Seq_1 463  CAGACCCCGAGGAGGAGCCAGCATGA-CATGCCTCCCTT-GAGGTGGGCCAACAGGCCA 406
Seq_2 601  CAGACCCCGAGGAGGAGCCAGCATGAGCATGCCTCCCTTCGAGGTGGGCCAACAGGCCA 660

Seq_1 405  GCCTGACCAAGCGGTTTCGGTGCAGGAGGTCGAGGCGTTTGCCGGGTGT-GGAGGATT 347
Seq_2 661  GCCTGACCAAGCGGTTTCGGTGCAGGAGGTCGAGGCGTTTGCCGGGTGTGTCGAGGATT 720

Seq_1 346  TCAATCCGCTGCACCTGGATCCCGCTTT-GCCGCCACCACGCGTTCGAGCGCCCCATCG 288
Seq_2 721  TCAATCCGCTGCACCTGGATCCCGCTTTGCGCGCCACCACGCGTTCGAGCGCCCCATCG 780

Seq_1 287  TGCACG-CATG-TGCTGGCCAGCCTCTTCTCGGGG-TGCTGGGCCAGCAACT-CCGGGCA 232
Seq_2 781  TGCACGGCATGCTGCTGGCCAGCCTCTTCTCGGGGCTGCTGGGCCAGCAACTGCGGGGCA 840

Seq_1 231  AGGGCACCGTCTACCTCGGTGAGAGCCTCGCCTTCAAGCAGCCGGTGTGTTGTGGGGGATG 172
Seq_2 841  AGGGCACCGTCTACCTCGGTGAGAGCCTCGCCTTCAAGCAGCCGGTGTGTTGTGGGGGATG 900

```

Figura A.4 - Resultado do alinhamento da sequência *phaCJ_reverse*.

APÊNDICE C -

Sequência referente aos genes de biossíntese de PHA do operon clonado *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. (LFM 897).

As regiões sublinhadas evidenciam os genes *phaP* (345 bp), *phaC* (1784 pb) e *phaJ* (405 bp).

GeneBank submission number: 1710426 (CESPEDES, L. G. dados não publicados).

ACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGGTACCTGGAGACCGATGATGAATATGGACTTGATCAAGAGCTTTAC
CGAGCAGATGCAAGGCTTTGCCGCCCCCTCACCCGCTACAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGAACAGCTG
ACCCGTTGTCAGCTGGCTCCGCCAACGCCTACGCCGAAGTGGCCCTCAACCAGTTGCAGGCCGTGAGCAAGG
TGCAGGATGCCAGAGCTGGCGGCTCTCGGCACGGTGCAGCTGGAGACCGCCAGCCAGCTCTCCCGCCAGAT
GCTGGATGACATCCAGAAGCTCAACGCCCTCGGCCTGCAGTTCAAGGAAGAGCTGGATGCCCTGACCGCGGAC
GGCATCAAGAAGAGCACGGGCAAGGCCTGATAAACCCTGGCTGCCCGTCCGGGCAGCCACATCTCCCCACGAC
ACGAGTGCGCGGGCCCCCTGCCCCGCTCGGGTGTGGGTGAAGGAGAACACATGAGCCAACCATCTTACGGCCCG
CTGTTTCGAGGCCCTGGCCCACTACAATGACAAGCTGCTGGCCATGGCCAAGGCCAGACCGAGCGCACAGCCC
AGGCCCTGCTGCAGACCAATCTGGACGATCTGGGCAAGGTGCTGGAGCAGGGCAGCCAGCAACCCTGGCAGCT
GATCCAGGCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCAGGCTGATGCAGCACACCCTGCTCAAGAGCGCGGGC
CAGGAGAGCGACCCCGTGATCACCCCGAGCGCAGCGATCGCCGCTTCAAGGCCGAGGCTGGAGCGAACAGC
CCATCTTCGACTATCTCAAGCAATCCTATCTGCTCACCGCCAGACACCTGCTGGCCTCGGTGGATGCCCTTGA
CGGCGTGCCCCGAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGGTTCTTACCCGCCAGTACATCAACGCCATGGCCCCCAGC
AACTTCCTGGCCACCAACCCGGAAGTGTCTAGGCTCACCTGGAGTCCGACGGCCAGAACCCTGATGCGCGGGC
TGGCCCTGCTGGCCGAGGATCTGGAACGCAGCGCCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAGTCCGCCTT
CGAGCTCGGGCGGGATCTGGCGACCACCCCGGGCCGGGTGGTGCATCGCACCAGCTCTTCGAGCTGATCCAG
TACAGCCCCACCACGAAACCGTGGGCAAGACCCCTGTGCTGATAGTCCCCCCTTCATCAACAAGTACTACA
TCATGGACATGCGGCCCCAGAATTCCCTGGTGGCCTGGCTGGTGCAGGGCCAGACGGTGTTCATGATCTC
CTGGCGCAATCCGGGCGTGATCAGGCCAGATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGGGTCATCGCCGCC
CTGGACGCCGTGGAGGCGGCCACCGGCGAGCGGGAGGTGCACGGCATCGGCTACTGCATCGGCGGCACCTGCCC
TCTCCTTAGCCATGGGCTGGCTGGCGGCCCGGCCAGAAACAGCGGGTACGCACTGCCACCCTGTTACACCAC
CTTGCTGGACTTCTCCAGCCCCGGGAGCTCGGCATCTTCATCCACGAGCCCATCATAGCGGCGCTCGAGGCC
CAGAATGAAGCCAAGGGCATCATGGACGGTCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTTCAGCCTGCTGCGGGGAGAACAGCC
TCTACTGGAATACTACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGCCAGAGCCCGTGGCCTTCGATCTGCTGCACTGGAA
CAGCGACAGCACCCATGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGTCTGCTGCGCCGTCTCTACCTGGAGAACCAGCTG
GTGAAGGGGGAGCTCAGGATCCGCAACACCCGCATCGAGCTCGCCAAGGTGAAGACCCCGGTGCTGCTGGTGT
CGGCCGTGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAGGGCACCTGGCAGGGCATGGCGCTGTTGGCGGCGAGCGGCG
CTTCATCCTGGCCGAGTCGGGCCACATCGCCGGCATCATCAACCCGCCGCGAGCCAACAATACGGCTTCTGG
CAGAGCGAGATCGAGGCCGGCAGCCAGAGGCGTGGCTGGCGGGCGCGACCCACAGCACCGGCTCCTGGTGGC
CCGAGATGATCCGTTTCATCCAGGGCCGTGACGAGGGGGCCGAGCCCGTCCCCGACGCGTGCCGGCCGAAGG
GCTGGAGGCTGCGCCAGGCAGCTACGTCAAGGTGCGGCTCAACCCGGTGTTCGCCAGCGCCAGCAGGAGGAC
GCAGCATGAATCTACCAGCCCTCGCCGTGGGCCAGAAGGCGCGTCTGACCAAGCGGTTGGGGGAGGCCGAGGT
CTCGGCCTTTGCCGGCCTGTCCGAGGACTTCAACCCCTGCACCTGGATCCGGCCTTCGCCGCCACCACGCCG
TTCGAGCGTCCATCGTCCACGGCATGCTGCTGGCGAGCCTCTTCTCGGGGCTGCTGGGCCAGCAGTTGCCGG
GCAAGGGGAGCATCTACCTGGGCCAGGGCCTCAGTTTCAAGCAGCCGGTCTTCGTGCGCGACGAGGTGACGGC
CGAGGTGGAGGTGACCGCCCTTCGCAGCGACAAGCCCATCGCCACCCTGACCACCCGCATCTTACCTCAAGT
GGCGCCCTCGCCGTGACGGGGGAAGCCGTGGTCAAGCTGCCTTAAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCCG
GGGATCCACTAGTT

Nas Figura A.5 está apresentado os resultados obtidos para o alinhamento da sequência dos operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. (LFM 897) e *Aeromonas hydrophila* ATCC7966 (SESHADRI *et al.*, 2006) (Clustal W).

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

```

A_hydrophila      CCCAGCCAATGCCGATGGCATCCATGTGTTCCATTGTCATGCCAGTGTACCTCTGCACG
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      CTATCAATGCAGCACAGGGTAATGGCTGGAGCCCCATAAGCAAGGTTGGCGGCGCGGCTT
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      AGAAGGATTTCTTGAAATTGATCAGCGGCAAGATGGGGAAAACCCCGTTCTCGGCGTAGT
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      TGGCGAGGCCAATCTGCAGACCGTCCAAGTGCTTGGTGGCGTTGATGAAGCCCAGCTGGA
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      AGGTGGTGCGCTCGGCATAGTTGACGAAGCCGACGTTGGCCAGGGCATTGCCCTTGCGGA
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      TGTGACGGCACCCCAGTTGAGGCCCTGCACATTGTTGGTCAGGTTGACGAAGCCAAGGT
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      TGACGCCCTTGTCTGACCCTCGTGCCAGTTGACCGCGTTGATCGCCACCCCGCCAACT
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      GGTGGCGTACCCGACCGGCGCCAAGGAAGATGCCAAGCTGCAGACCGGTGAATTGATCCA
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      CGTCGAGAGGGCGAAGACCGGCAGATCGATCCCTTTACCTGACCGGTGCGACCATAGA
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      GCACAGAGGCTCTGGCCCCCTCCACCTGATGGGACGCGGGCAGATTGACGCCGGGCAAGG
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      AGAGCTGGACAGGGGTACTGGCGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGCAA
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      GCAGCAGGCGAGCAGGTTTCATCGATGCATTCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCT
Aeromonas_sp      -----

A_hydrophila      ACCAGCCCGGCGGCCTGGGAACGAGACCCGACGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGA
Aeromonas_sp      -----

```


A_hydrophila
Aeromonas_sp
GCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGATGCCCTCGAGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAG
GCCAGACACCTGCTGGCTTCGGTGGATGCCCTTGACGGCGTGCCCGAGAAGAGCCGGGAG
.** **.****** ** **.****** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CGGCTGCGTTTCTTTACCCGCCAGTACATCAACGCCATGGCCCCAGCAACTTTCTGGCC
CGGCTGCGGTTCTTCACCCGCCAGTACATCAACGCCATGGCCCCAGCAACTTCTGGCC
***** ***** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
ACCAACCCGGAGCTGCTCAAGCTGACCCTGGAGTCTGACGGCCAGAATCTGGTGCGCGGG
ACCAACCCGGAACCTGCTCAGGCTCACCTGGAGTCCGACGGCCAGAACCTGATGCGCGGG
*****.******.*** ***** ***** ***** **.******

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCGCCGATCAGCTCAACATCCGCTGACC
CTGGCCCTGCTGGCCGAGGATCTGGAACGCAGCGCCGATCAGCTCAACATCCGCTGACC
***** *****.****** **.****** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
GACGAGTCCGCCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGGCGCTGACGCCGGGCCGGGTGGTGCA
GACGAGTCCGCCTTCGAGCTCGGGCGGGATCTGGCGACCAACCCGGGCCGGGTGGTGCA
***** ***** *****.* ** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CGCACCGAGCTGTATGAGCTCATTCAGTACAGCCCCACCACGGAACGGTGGCCAGGACG
CGCACCGAGCTCTTCGAGCTGATCCAGTACAGCCCCACCACGGAACGGTGGGCAAGACC
***** *: ***** ** ***** ***** ***** **.*

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CCGGTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACAAGTACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAG
CCTGTGCTGATAGTCCCCCTTCATCAACAAGTACTACATCATGGACATGCGGCCCCAG
** **.******.* ** ***** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
AACTCCCTGGTGGCTGGCTGGTCGCCCAGGGCCAGACGGTGTTTCATGATCTCCTGGCGC
AATTCCTGGTGGCTGGCTGGTCGCCCAGGGCCAGACGGTGTTTCATGATCTCCTGGCGC
** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
AACCCGGGTCCGGCCAGGCCGACATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGCGTCATC
AATCCGGGCGTGGATCAGGCCAGATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGGTCATC
** ***** **.* ***** *

A_hydrophila
Aeromonas_sp
GCCGCGCTGGATGGCGTGGAGGCGGCCACCGGCGAGCGGGAAGTGCACGGCATCGGCTAC
GCCGCCCTGGACGCGCTGGAGGCGGCCACCGGCGAGCGGGAAGTGCACGGCATCGGCTAC
***** ***** * *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
TGCATCGGCGGTACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAG
TGCATCGGCGGCACTGCCCTCTCCTTAGCCATGGGCTGGCTGGCGGCCCGGCGCCAGAAA
***** ** *****.* ***** *****.*

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CAACGGGTTCGATCCGCCACCCTGTTACCAACCCTGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGGAA
CAGCGGTACGCACTGCCACCCTGTTACCAACCCTGCTGGACTTCTCCAGCCCGGGGAG
.****.***.* ***** ***** ***** *****.*

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CTTGGCATTTTCATCCACGAGCCCATCATTCGCGCGCTGGAAGCCCAGAACGAAGCCAAG
CTCGCATCTTCATCCACGAGCCCATCATAGCGGCGCTCGAGGCCAGAATGAAGCCAAG
** ***** *****.* ***** **.******

A_hydrophila
Aeromonas_sp
GGCATCATGGACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTTCAGCTGCTGCGGGAGAACAGCCTC
GGCATCATGGACGGTCCGACAGCTGGCGGTCTCTTTTCAGCTGCTGCGGGAGAACAGCCTC
***** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
TACTGGAATTACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGAGAGCCCGGTGGCGTTTCGATCTG
TACTGGAATTACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGAGAGCCCGGTGGCTTCGATCTG
***** ***** ***** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CTGCACTGGAACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCTGCTGCGC
CTGCACTGGAACAGCGACAGCACCCATGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGTCTGCTGCGC
*****.* ***** *****

A_hydrophila
Aeromonas_sp
CGGCTCTATCTGGAGAACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATC
CGTCTCTACCTGGAGAACCAGCTGGTGAAGGGGAGCTCAGGATCCGCAACACCCGCATC
** ***** *****.* *****

A_hydrophila Aeromonas_sp	AAGGCCACCCCTTCGTTGCCTTGTGCGACCTTATCAAACATCAGGGTTGGGCCGATTGTG -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	GCGGTGCGGCCAAGGCGCTGGTCGCCGAAGGGCTGGTAGAGGTGGACGGTCAGGTCGAGA -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	CCCGCAAACGCTGCAAGATCGTGGCCGAGCAAGTAGTCAACTTCAACGGCATGAAAGTGG -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	TCGTGAAAGAAGGCGTCAGCCCCGAGATCCTCTGATCCCGACGCTCTGCCACGCAAGCGC -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	TACCCAGCACAGTGGCCAAGCTGATGGCCAACTTCAACGACATGAAGGTGGTGGTGAAG -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	AAGGCATCAGCCCCGAGATCCTCTGATCCCTATGCTCTGCCACGCAAGTGCTACCCAGCA -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	CAGTGGGCGAGCAAGTGGTCAACTTCAACGGCATGAAAGTGGTCGTGAAAGAAGGCGTCA -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	GCCCCGAGATCCTCTGACCTCGCTTGAATAAGGGCGCCAACGCGCCCTTTGATATTGAGC -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	TGGCTTTGATCGACAGGGTCAGCACGAAGCGCGCCATCGCCTCATCCCCGTTGAGCGACG -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	GACAGGTGGCCACCACCTGGATGGGGCGGTTGATGCGCTGACCGCTGGCCAGCGACTCGT -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	CGATCATGGCGTCGATCACCTCCCCGCGCGCAGTCAAAGTGCACATCCCCCTCGGGCC -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	GTTTCAAAAACTCCCCCTGCACATCCTTGAAGGCGAAGTGCACCTTCTTGCGCCGCTGCC -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	GCCCCCTTCTCCATCACCAGCAGACCGCCACCAGATCGGCGCCGGTGGCCAGCGCGCCGA -----
A_hydrophila Aeromonas_sp	AATACATGCTGC -----

Figura A.5 - Resultado do alinhamento da sequência do operon *phaPCJ* de *Aeromonas* sp. e *Aeromonas hydrophila*.

APÊNDICE D –

Mapas dos plasmídeos pBBR1MCS-2 contendo a ordem dos genes clonados.

Nas Figuras A.6 a A.11 estão os mapas dos plasmídeos pBBR1MCS-2 (KOVACH *et al.*, 1995) contendo a ordem dos genes clonados. Este vetor apresenta resistência à canamicina (*Kan*), com genes de mobilização (*mob*) e replicação (*rep*) os genes de interesse foram inseridos sobre o controle do promotor *lac* (KOVACH *et al.*, 1995).

FiguraA.6 – pBBR1MCS2:: *phaPCJ* de *Aeromonas sp.*(LFM897).

FiguraA.7 – pBBR1MCS2:: *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

FiguraA.8 – pBBR1MCS2:: *phaPC* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

FiguraA.9 – pBBR1MCS2:: *phaCJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

FiguraA.10 – pBBR1MCS2:: *phaC* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

FiguraA.11 – pBBR1MCS2:: *phaJ* de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

APÊNDICE E –

Tabelas de dosagens de substratos inicial e final de experimentos em frascos agitados.

Tabela A.1– Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão. (continua)

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose		Ácido hexanoico	
		(g/L)		(g/L)	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	11,36	±0,9		
	24	5,23	±0,3		
	72	2,16	±0,2		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	10,78	±0,7	0,00	±0,0
	24	4,66	±1,5	0,93	±0,3
	72	1,09	±0,7	0,58	±0,4
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	9,88	±1,7		
	24	4,98	±0,5		
	72	0,57	±0,1		
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	10,91	±1,2	0,00	±0,0
	24	5,00	±1,7	1,14	±0,0
	72	0,00	±0,6	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.	0	9,76	±0,8		
	24	3,95	±1,2		
	72	0,00	±0,0		
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	12,01	±1,5	0,00	±0,0
	24	6,45	±3,2	1,02	±0,2
	72	0,54	±1,3	0,00	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.	0	11,08	±0,8		
	24	4,59	±0,6		
	72	0,00	±0,0		
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	12,27	±1,4	0,00	±0,0
	24	4,89	±2,1	1,45	±0,1
	72	0,71	±0,2	0,03	±0,0
LFM1036 <i>phaJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	10,55	±1,3		
	24	4,07	±0,6		
	72	0,00	±0,0		
LFM1036 <i>phaJ_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	13,40	±2,3	0,00	±0,0
	24	5,78	±0,4	1,47	±0,1
	72	0,04	±0,8	0,25	±0,9
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	13,08	±0,9		
	24	6,65	±1,7		
	72	0,34	±0,5		
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	10,03	±0,7	0,00	±0,0
	24	4,56	±0,8	1,23	±0,2
	72	0,56	±0,3	0,16	±0,8

Tabela A.1– Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (1 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão. (conclusão)

LFM1038 <i>phaPC_{Ah}</i>	0	8,97	±1,8		
MMKGli.	24	3,25	±0,9		
	72	0,00	±0,0		
LFM1038 <i>phaPC_{Ah}</i>	0	11,91	±0,8	0,00	±0,0
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	24	4,05	±0,2	1,38	±0,1
	72	0,03	±0,1	0,08	±0,0

Tabela A.2– Dosagem substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão. (continua)

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose		Ácido hexanoico	
		(g/L)		(g/L)	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	12,27	±2,3		
	24	5,15	±1,4		
	72	0,58	±0,3		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	0	12,87	±0,9		
	24	4,70	±1,1	0,63	±0,2
	72	0,43	±0,1	0,43	±0,1
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	12,03	±1,5		
	24	4,28	±1,3	0,73	±0,3
	72	0,33	±0,3	0,48	±0,4
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	0	12,73	±0,9		
	24	4,68	±1,1	1,67	±0,2
	72	0,24	±0,3	1,22	±0,6
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	12,43	±1,4		
	24	3,89	±0,3		
	72	0,00	±0,0		
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	0	11,28	±0,1		
	24	3,92	±0,2	0,60	±0,0
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	11,20	±0,5		
	24	4,23	±1,0	1,20	±0,0
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM936 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	0	11,06	±0,1		
	24	3,89	±0,9	1,78	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.} MMKGli.	0	11,07	±1,1		
	24	4,60	±0,5		
	72	0,00	±0,0		
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.} MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	0	9,87	±0,6		
	24	4,10	±0,3	0,44	±0,0
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.} MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	0	10,07	±0,2		
	24	3,94	±0,1	1,02	±0,2
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ</i> _{Asp.} MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	0	10,10	±0,7		
	24	4,13	±0,6	1,73	±0,3
	72	0,00	±0,0	0,24	±0,4

Tabela A.2– Dosagem substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido hexanoico (0-1,5 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão. (conclusão)

LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	0	12,27	±1,2		
MMKGli.	24	4,78	±1,4		
	72	0,22	±0,3		
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	0	12,53	±4,0		
MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	24	3,15	±1,4	0,57	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,02	±0,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	0	13,17	±1,6		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	24	3,70	±1,5	0,98	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i>	0	12,37	±0,6		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	24	3,72	±1,0	1,53	±0,3
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	0	10,14	±0,7		
MMKGli.	24	4,18	±0,4		
	72	0,00	±0,0		
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	0	10,00	±0,2		
MMKGli.+Ac. Hex. 0,5 g/L	24	3,98	±0,3	0,43	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	0	9,17	±0,1		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,0 g/L	24	3,93	±0,2	0,94	±0,2
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i>	0	9,88	±0,5		
MMKGli.+Ac. Hex. 1,5 g/L	24	4,23	±0,4	1,63	±0,0
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0

Tabela A.3— Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido butírico (1,0 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Acido butírico (g/L)		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	9,58	±0,8		
	24	4,13	±0,3		
	72	0,00	±0,0		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Butirico. 1,0 g/L	0	10,16	±2,4	0,00	±0,0
	24	4,42	±0,6	0,98	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,60	±0,2
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.	0	9,56	±1,2		
	24	0,24	±0,4		
	72	0,00	±0,0		
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.+Ac. Butirico. 1,0 g/L	0	11,05	±0,2	0,00	±0,0
	24	0,59	±0,2	1,00	±0,1
	72	0,70	±0,6	0,60	±0,1
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	9,49	±1,0		
	24	0,86	±0,7		
	72	1,07	±0,1		
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.+Butirico. 1,0 g/L	0	11,65	±0,2	0,00	±0,0
	24	0,96	±0,5	1,022	±0,4
	72	1,22	±0,2	0,925	±0,9
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.	0	10,40	±1,2		
	24	3,67	±0,5		
	72	0,00	±0,0		
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Butirico. 1,0 g/L	0	12,59	±1,9	0,00	±0,0
	24	3,83	±0,2	0,94	±0,2
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0

Tabela A.4– Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido valérico (1,0 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose (g/L)		Ácido valérico (g/L)	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	9,58	±0,8		
	24	4,13	±0,3		
	72	0,00	±0,0		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Valer. 1,0 g/L	0	10,04	±1,4	0,00	±0,0
	24	4,24	±0,4	1,65	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,16	±0,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> . MMKGli.	0	9,56	±1,2		
	24	0,24	±0,4		
	72	0,00	±0,0		
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp}</i> . MMKGli.+Ac. Valer. 1,0 g/L	0	8,80	±1,0	0,00	±0,0
	24	1,06	±0,5	1,47	±0,3
	72	0,00	±0,0	0,14	±0,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	9,49	±1,0		
	24	0,86	±0,7		
	72	1,07	±0,1		
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.+Valer. 1,0 g/L	0	9,21	±0,4	0,00	±0,0
	24	1,55	±0,4	1,52	±0,2
	72	0,00	±0,0	0,15	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.	0	10,40	±1,2		
	24	3,67	±0,5		
	72	0,00	±0,0		
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Valer. 1,0 g/L	0	12,73	±0,5	0,00	±0,0
	24	3,93	±0,2	2,00	±0,1
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0

Tabela A.5– Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido heptanoico (1,0 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose (g/L)		Acido hepatanoico (g/L)	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	9,58	±0,8		
	24	4,13	±0,3		
	72	0,00	±0,0		
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Heptan. 1,0 g/L	0	11,29	±1,0	0,00	±0,0
	24	5,27	±0,5	2,88	±0,6
	72	0,57	±1,0	2,06	±2,9
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.	0	9,56	±1,2		
	24	0,24	±0,4		
	72	0,00	±0,0		
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.+Ac. Heptan. 1,0 g/L	0	10,42	±0,7	0,00	±0,0
	24	4,27	±0,4	2,72	±0,6
	72	0,05	±0,1	0,00	±0,0
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	9,49	±1,0		
	24	0,86	±0,7		
	72	1,07	±0,1		
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.+Heptan. 1,0 g/L	0	10,44	±0,7	0,00	±0,0
	24	5,35	±1,2	2,78	±0,2
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.	0	10,40	±1,2		
	24	3,67	±0,5		
	72	0,00	±0,0		
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Heptan. 1,0 g/L	0	12,34	±1,8	0,00	±0,0
	24	4,72	±0,7	1,79	±0,0
	72	0,00	±0,0	0,00	±0,0

Tabela A.6– Dosagem de substratos de experimento com recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose (10 g/L) e ácido octanoico (1,0 g/L). Os dados correspondem à média dos dados e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ Condições de cultivo	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Acido octanoico (g/L)
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.	0	9,58 ±0,8	
	24	4,13 ±0,3	
	72	0,00 ±0,0	
LFM1039 pBBR1MCS-2 MMKGli.+Ac. Octan. 1,0 g/L	0	11,68 ±1,5	0,00 ±0,0
	24	4,77 ±0,8	2,42 ±0,7
	72	1,22 ±0,4	1,69 ±1,0
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.	0	9,56 ±1,2	
	24	0,24 ±0,4	
	72	0,00 ±0,0	
LFM1034 <i>phaPCJ_{Asp.}</i> MMKGli.+Ac. Octan. 1,0 g/L	0	10,55 ±1,0	0,00 ±0,0
	24	4,83 ±1,4	2,39 ±0,7
	72	2,52 ±0,1	1,66 ±0,6
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.	0	9,49 ±1,0	
	24	0,86 ±0,7	
	72	1,07 ±0,1	
LFM1037 <i>phaCJ_{Ah}</i> MMKGli.+Octan. 1,0 g/L	0	12,59 ±1,9	0,00 ±0,0
	24	4,29 ±0,8	3,29 ±0,4
	72	1,29 ±0,5	1,59 ±0,4
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.	0	10,40 ±1,2	
	24	3,67 ±0,5	
	72	0,00 ±0,0	
LFM1035 <i>phaC_{Ah}</i> MMKGli.+Ac. Octan. 1,0 g/L	0	10,91 ±1,6	0,00 ±0,0
	24	4,44 ±0,5	1,29 ±0,0
	72	0,00 ±0,0	0,02 ±0,0

APÊNDICE F –

Consumo de substratos e acúmulo de PHA dos ensaios em biorreator.

Tabela A.7 – B03 -Cultivo de *B. sacchari* selvagem em biorreator com limitação em fósforo para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	PO ₄ (g/L)	Xt g/L	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,00	0,049	0,000	0,858	0,126	0,690	0,512	0,178	0,178	0,000
1,50	0,656	0,000	0,818	0,101	0,280	0,215	0,065	0,065	0,000
3,00	0,197	0,000	0,734	0,077	0,800	0,622	0,178	0,178	0,000
4,50	0,823	0,000	0,651	0,066	1,030	0,832	0,198	0,198	0,000
6,00	2,347	0,000	0,560	0,055	1,540	1,280	0,260	0,260	0,000
7,50	4,174	0,000	0,469	0,028	2,380	1,944	0,436	0,436	0,000
9,25	7,572	0,000	0,397	0,000	3,960	2,661	1,299	1,299	0,000
10,50	10,041	0,000	0,325	0,000	5,220	3,039	2,181	2,181	0,000
12,00	13,773	0,000	0,288	0,000	7,000	3,440	3,560	3,560	0,000
13,00	15,035	0,000	0,250	0,000	7,180	3,166	4,014	4,014	0,000
14,50	15,734	0,077	0,217	0,000	7,640	3,214	4,426	4,420	0,006
16,50	16,882	0,276	0,185	0,000	9,450	3,083	6,367	6,346	0,021
18,50	17,993	0,475	0,145	0,000	10,670	3,727	6,943	6,912	0,031
20,50	19,106	0,674	0,105	0,000	11,880	4,681	7,199	7,160	0,040
24,00	21,002	1,020	0,054	0,000	13,540	3,587	9,953	9,890	0,064
27,50	22,955	1,364	0,003	0,000	14,400	3,671	10,729	10,659	0,071
39,00	27,811	0,705	0,002	0,000	14,130	4,293	9,837	9,803	0,034
41,75	28,650	0,716	0,002	0,000	13,440	2,992	10,448	10,418	0,030
43,50	30,455	0,966	0,001	0,000	13,610	4,034	9,576	9,548	0,028
46,50	32,616	1,679	0,001	0,000	12,910	2,054	10,856	10,829	0,027
50,50	34,631	2,629	0,001	0,000	12,720	4,196	8,524	8,497	0,026
61,50	39,814	4,389	0,001	0,000	12,100	4,338	7,762	7,711	0,051
65,50	41,691	4,505	0,001	0,000	12,160	4,183	7,977	7,924	0,053
68,50	42,312	4,383	0,001	0,000	12,210	3,623	8,587	8,531	0,056
72,50	42,319	4,425	0,001	0,000	12,020	4,148	7,872	7,817	0,055
86,92	41,751	4,960	0,001	0,000	10,890	4,065	6,825	6,765	0,060

Tabela A.8 – B04 -Cultivo de *B. sacchari* recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator com limitação em fósforo para biossíntese de P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanoico utilizando a vazão de alimentação calculada (4, 95 mL/L.h).

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	PO4 (g/L)	Xt g/L	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,00	0,000	0,000	0,930	0,138	0,740	0,475	0,265	0,265	0,000
2,00	0,767	0,000	0,662	0,103	0,730	0,503	0,227	0,227	0,000
4,00	1,287	0,000	0,494	0,067	1,100	0,782	0,318	0,318	0,000
5,50	1,456	0,000	0,513	0,061	1,370	1,370	0,000	0,000	0,000
7,00	2,750	0,000	0,754	0,054	1,790	1,249	0,541	0,541	0,000
8,50	4,116	0,000	0,822	0,036	2,650	1,873	0,777	0,777	0,000
10,00	6,932	0,000	0,745	0,019	3,540	2,478	1,062	1,062	0,000
11,50	10,167	0,000	0,754	0,001	5,200	5,200	0,000	0,000	0,000
13,00	13,458	0,018	0,646	0,000	6,670	3,789	2,881	2,881	0,000
14,50	16,345	0,067	0,612	0,000	7,850	4,524	3,326	3,287	0,039
16,00	16,746	0,115	0,436	0,000	8,380	4,549	3,831	3,652	0,179
17,50	17,149	0,164	0,624	0,000	8,920	5,089	3,831	3,523	0,308
19,50	17,686	0,230	0,619	0,000	9,280	4,947	4,333	3,877	0,456
21,50	18,224	0,295	0,568	0,000	10,040	5,426	4,614	3,913	0,701
24,50	19,029	0,393	0,559	0,000	12,020	5,975	6,045	4,991	1,054
26,00	19,433	0,443	0,543	0,000	12,230	6,477	5,753	4,681	1,072
29,50	20,373	0,557	0,565	0,000	13,910	6,650	7,260	5,755	1,504
39,50	23,018	0,879	0,491	0,000	16,580	7,594	8,986	6,768	2,219
43,50	24,018	1,008	0,491	0,000	18,550	7,863	10,687	7,936	2,751
45,50	24,551	1,072	0,480	0,000	18,640	8,287	10,353	7,614	2,738
49,50	25,650	1,200	0,456	0,000	19,790	8,278	11,512	8,459	3,053
52,50	26,437	1,295	0,452	0,000	20,820	8,613	12,207	8,978	3,229
62,50	26,919	1,610	0,419	0,000	20,820	8,951	11,869	8,716	3,154

Tabela A.9- B05 - Cultivo em biorreator de *B. sacchari* selvagem em MM reformulado alimentado por solução contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) nas vazões de 4,95/9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	Xt g/L	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,00	0,000	0,000	0,942	0,640	0,479	0,161	0,161	0,000
2,00	1,320	0,000	0,961	0,710	0,534	0,176	0,176	0,000
4,00	5,016	0,000	0,902	1,120	0,916	0,204	0,204	0,000
6,00	5,511	0,000	0,451	2,360	1,936	0,424	0,424	0,000
8,00	8,093	0,000	0,346	3,690	2,914	0,776	0,776	0,000
10,00	15,162	0,000	0,176	7,080	5,201	1,879	1,879	0,000
12,00	17,796	0,592	0,125	7,330	5,698	1,632	1,632	0,000
14,00	20,205	1,411	0,123	7,640	6,140	1,500	1,499	0,110
17,00	23,796	2,631	0,102	7,990	6,354	1,636	1,630	0,330
20,00	27,374	3,847	0,074	8,360	6,724	1,636	1,629	0,430
23,00	30,930	5,059	0,056	8,550	7,033	1,517	1,503	0,900
26,00	34,487	6,269	0,031	8,720	6,682	2,038	2,025	0,640
29,00	38,062	7,469	0,017	9,190	7,436	1,754	1,742	0,690
31,70	41,145	8,539	0,001	9,190	7,212	1,978	1,962	0,790
42,32	52,666	12,458	0,000	11,160	7,877	3,283	3,251	0,970
45,00	55,529	13,433	0,000	11,620	7,900	3,720	3,683	0,980
48,00	58,709	14,517	0,000	11,840	8,361	3,479	3,446	0,950
50,00	61,686	15,539	0,000	11,790	7,698	4,092	4,047	1,100
52,00	65,742	16,913	0,000	12,770	7,574	5,196	5,138	1,110
54,00	69,761	18,282	0,000	13,400	7,700	5,700	5,636	1,130
56,00	73,723	19,631	0,000	14,080	7,883	6,197	6,127	1,120
67,00	92,914	26,165	0,000	17,370	7,370	10,000	9,889	1,110
69,08	96,503	27,385	0,000	17,980	7,600	10,380	10,263	1,130
72,00	101,423	29,063	0,000	18,910	7,797	11,113	10,991	1,100

Tabela A.10 – B06 - Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	Xt g/L	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,00	0,000	0,000	0,618	0,550	0,305	0,245	0,245	0,000
2,00	1,410	0,000	0,603	0,810	0,427	0,383	0,383	0,000
4,33	1,900	0,000	0,599	0,900	0,496	0,404	0,404	0,000
6,00	3,255	0,000	0,585	1,370	0,741	0,629	0,629	0,000
8,00	5,485	0,000	0,517	2,120	1,140	0,980	0,980	0,000
10,00	6,610	0,000	0,429	3,350	1,892	1,458	1,458	0,000
12,00	10,165	0,000	0,296	5,220	2,757	2,463	2,463	0,000
14,00	16,120	0,162	0,032	8,450	5,019	3,431	3,312	0,119
16,00	19,391	1,065	0,002	9,910	5,097	4,813	4,266	0,548
18,00	22,586	1,848	0,001	11,610	4,761	6,849	5,801	1,048
21,00	27,255	3,680	0,001	12,520	4,834	7,686	6,261	1,425
24,00	31,775	4,893	0,001	16,910	5,301	11,609	9,295	2,315
27,00	36,049	5,161	0,001	17,840	5,039	12,801	10,354	2,447
30,00	39,734	5,355	0,001	17,090	5,447	11,643	9,454	2,190
41,00	48,634	5,987	0,000	17,980	4,731	13,249	10,569	2,679
44,00	49,770	6,010	0,001	15,540	4,888	10,652	8,430	2,222
48,08	51,598	6,059	0,000	16,200	5,015	11,185	8,797	2,388

Tabela A.11 – B07 - Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	Xt (g/L)	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,0	0,000	0,000	0,713	0,630	0,303	0,327	0,327	0,000
2,0	0,859	0,000	0,702	0,730	0,730	0,000	0,000	0,000
4,0	1,735	0,000	0,696	0,860	0,404	0,456	0,456	0,000
6,0	1,242	0,000	0,580	1,040	0,505	0,535	0,535	0,000
8,0	2,167	0,000	0,517	1,460	0,794	0,666	0,666	0,000
10,0	2,576	0,000	0,404	2,390	1,250	1,140	1,140	0,000
12,0	6,124	0,000	0,335	3,400	1,816	1,584	1,584	0,000
14,0	10,231	0,000	0,131	5,370	2,802	2,568	2,568	0,000
16,0	16,521	0,000	0,067	8,410	3,683	4,727	4,727	0,000
18,0	20,428	0,722	0,001	10,140	5,549	4,591	4,580	0,011
20,0	23,928	1,376	0,001	11,640	5,784	5,856	5,531	0,324
22,0	27,388	2,025	0,000	12,730	5,951	6,779	6,155	0,625
24,0	30,801	2,661	0,000	14,570	6,006	8,564	7,620	0,944
26,0	34,172	3,292	0,001	15,490	5,721	9,769	8,530	1,238
28,0	37,544	3,903	0,001	17,500	5,810	11,690	10,084	1,606
30,0	40,788	4,300	0,001	18,450	5,641	12,809	11,010	1,799
32,0	44,003	4,555	0,000	17,630	5,368	12,262	10,603	1,659
34,0	46,955	4,818	0,000	18,590	2,630	15,960	13,950	2,010

Tabela A.12 - B08 - Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	Xt g/L	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,0	0,000	0,000	0,706	0,610	0,318	0,292	0,292	0,000
2,0	0,170	0,000	0,592	0,760	0,418	0,342	0,342	0,000
4,0	0,120	0,000	0,687	0,840	0,466	0,374	0,374	0,000
6,0	0,395	0,000	0,664	1,070	0,624	0,446	0,446	0,000
8,0	1,965	0,000	0,624	1,700	0,999	0,701	0,701	0,000
10,0	3,748	0,000	0,443	2,760	1,295	1,465	1,465	0,000
12,0	7,024	0,000	0,412	4,240	2,687	1,553	1,553	0,000
14,0	15,637	0,315	0,239	6,330	3,326	3,004	3,004	0,000
16,0	20,685	0,871	0,060	8,330	4,136	4,194	4,084	0,110
18,0	24,091	1,470	0,001	9,030	4,626	4,404	4,163	0,242
20,0	27,448	2,019	0,000	10,100	4,643	5,457	5,025	0,432
22,0	30,754	2,565	0,000	6,130	2,219	3,911	3,505	0,406
24,0	34,018	3,098	0,000	14,170	4,989	9,181	8,124	1,057
26,0	37,240	3,599	0,000	15,000	4,699	10,301	9,035	1,266
28,0	40,420	4,154	0,000	16,130	4,708	11,422	9,974	1,448
30,0	43,556	4,651	0,000	17,300	4,229	13,071	11,350	1,721
32,0	46,654	5,111	0,000	18,710	5,305	13,405	11,685	1,720
34,0	49,734	5,384	0,001	20,130	4,860	15,270	13,561	1,709
44,0	63,698	6,057	0,001	19,940	3,272	16,668	14,956	1,712

Tabela A.13 - B09 - Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	Ahex cons. (g/L)	N (g/L)	Xt (g/L)	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)	3HHx (g/L)
0,00	0,000	0,000	0,670	0,660	0,329	0,331	0,331	0,000
2,00	0,029	0,000	0,643	0,780	0,390	0,390	0,390	0,000
4,00	0,073	0,000	0,606	1,010	0,544	0,466	0,466	0,000
6,00	2,705	0,000	0,570	1,300	0,726	0,574	0,574	0,000
8,00	4,370	0,000	0,487	2,010	2,010	0,000	0,000	0,000
10,00	6,727	0,000	0,406	3,250	1,754	1,496	1,496	0,000
12,00	10,099	0,000	0,235	5,090	2,890	2,200	2,200	0,000
14,00	17,669	0,008	0,038	8,060	4,622	3,438	3,438	0,000
16,00	21,052	0,280	0,001	9,410	5,056	4,354	4,233	0,121
18,00	24,151	0,552	0,000	10,420	4,971	5,449	5,217	0,232
20,00	27,215	0,810	0,001	11,250	4,455	6,795	6,429	0,366
22,00	30,302	1,068	0,000	13,500	4,932	8,568	8,029	0,539
24,00	33,262	1,320	0,000	14,720	4,981	9,739	9,101	0,638
26,00	36,228	1,570	0,000	15,860	5,039	10,821	10,094	0,727
28,00	39,141	1,754	0,000	16,730	4,359	12,371	11,549	0,822
30,00	41,749	1,937	0,000	16,960	4,449	12,511	11,714	0,797
32,00	44,240	2,036	0,000	18,170	4,823	13,347	12,451	0,896
34,00	46,636	2,128	0,000	18,470	3,382	15,088	14,190	0,898

Tabela A.14 – B10 - Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} (LFM1034) em biorreator utilizando MM reformulado, suprido por solução de alimentação contendo glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h.

Tempo (h)	Gli cons. (g/L)	N (g/L)	Xt (g/L)	Xr (g/L)	PHA (g/L)	3HB (g/L)
0,00	0,000	0,677	0,630	0,265	0,365	0,365
2,00	0,038	0,665	0,770	0,375	0,395	0,395
4,00	0,508	0,672	1,040	0,520	0,520	0,520
6,00	1,962	0,629	1,430	0,744	0,686	0,686
8,00	3,601	0,546	2,200	1,077	1,123	1,123
10,00	6,240	0,433	3,620	1,807	1,813	1,813
12,00	10,772	0,262	5,570	2,855	2,715	2,715
14,00	16,558	0,052	8,260	4,695	3,565	3,565
16,00	19,899	0,002	9,220	4,508	4,712	4,712
17,56	22,491	0,001	9,840	4,551	5,289	5,289
20,00	26,500	0,001	11,120	4,573	6,547	6,547
21,33	28,685	0,001	10,420	3,494	6,926	6,926
23,33	31,950	0,001	12,750	4,430	8,320	8,320
26,00	36,249	0,001	14,460	3,812	10,648	10,648
28,00	39,418	0,001	15,110	3,791	11,319	11,319
30,00	42,371	0,001	15,440	3,424	12,016	12,016
32,00	45,205	0,001	16,240	3,748	12,492	12,492
40,00	54,338	0,001	15,440	3,114	12,326	12,326
42,00	56,253	0,001	15,520	2,507	13,013	13,013

APÊNDICE G –

Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos dos estados pseudo-estacionários analisados.

Figura A.12 – Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14,5 – 27,5 h) para experimento com *B. sacchari* selvagem em biorreator (B03) utilizando MM3 e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 4,95 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

Figura A.13- Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14 – 27 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B06) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (45 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

Figura A.14 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (18 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B07) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (33 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

Figura A.15 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (16 – 30 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B08) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (22 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

Figura A.16 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (16 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B09) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) e ácido hexanoico (11 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

Figura A.17 - Cálculos de velocidades de consumo de substratos e formação de produtos de estado pseudo-estacionário definido (14 – 32 h) para experimento com LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ_{Asp}* (LFM1034) em biorreator (B10) utilizando MM reformulado e alimentação de glicose (140 g/L) a uma vazão de alimentação de 9,9 mL/L.h. *Velocidades são representadas pelo valor que acompanha a variável x na equação da reta.

APÊNDICE H –

Arquivo de entrada para o programa Metatool construído para *Burkholderia sacchari* no contexto de acúmulo de PHA.

Biossíntese de P3HB-*co*-3HHx a partir de glicose e ácido hexanoico.

Considera vias ED, PPP, CK, Glioxilato, anapleróticas e respiração aeróbia de coenzimas.

Considerando *phaJ* como única saída β -oxidação para a síntese de PHA.

-ENZREV

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

EMP1 ED1 ED2 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8 CGLX1
CGLX2 GLN3 AD1 AD2 P3HB OXFAD OXNAD BOXI1 BOXI2 BOXI3 BOXI4 BOXI5 BOXI6
BOXI7 BOXI8 BOXI9 PHAJ1 PHAJ2 PNTAB UDH

-METINT

G6P KDPG2 NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rb15P Rb5P X5P S7P
E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD FADH2 NAD NADH
CoASH HexCoA HexenCoA HHexCOA CHexCoA ButCoA ButenCoA HButCoA CButCoA

-METEXT

Gliex Hexext ADP ATP CO2 O 3HB 3HHx

-CAT

EMP1 : Gliex + ATP = G6P + ADP .

EMP2 : G6P = F6P .

VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .

ED1 : PG6 = KDPG2 .

ED2 : KDPG2 = PIR + G3P .

EMP4 : F16P = G3P + DHP .

EMP5 : DHP = G3P .

EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .

EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .

EMP8 : PG3 = PG2 .

EMP9 : PG2 = PEP .

EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .

CPD : PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO2 .

VP5 : PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO2 .

VP6 : Rb15P = Rb5P .

VP7 : Rb15P = X5P .

VP8 : Rb5P + X5P = S7P + G3P .

VP9 : G3P + S7P = E4P + F6P .

VP10 : X5P + E4P = F6P + G3P .

CK1 : OAA + AcCoA = Cit + CoASH .

CK2 : Cit = IsoCit .

CK3 : IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO2 .

CK4 : KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO2 .

CK5 : SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH .

CK6 : Suc + FAD = Fum + FADH2 .

CK7 : Fum = Mal .

CK8 : $\text{Mal} + \text{NAD} = \text{OAA} + \text{NADH}$.
 CGLX1 : $\text{IsoCit} = \text{GLX} + \text{Suc}$.
 CGLX2 : $\text{GLX} + \text{AcCoA} = \text{Mal} + \text{CoASH}$.
 GLN3 : $\text{F16P} = \text{F6P}$.
 AD1 : $\text{PIR} + \text{CO}_2 + \text{ATP} = \text{OAA} + \text{ADP}$.
 AD2 : $\text{OAA} + \text{ATP} = \text{PEP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$.
 P3HB : $2 \text{ AcCoA} + 1 \text{ NADPH} = 3 \text{ HB} + 2 \text{ CoASH} + 1 \text{ NADP}$
 OXFAD : $\text{FADH}_2 + 2 \text{ ADP} + \text{O} = \text{FAD} + 2 \text{ ATP}$.
 OXNAD : $\text{NADH} + 3 \text{ ADP} + \text{O} = \text{NAD} + 3 \text{ ATP}$.
 BOXI1 : $\text{Hexext} + 2 \text{ ATP} + \text{CoASH} = \text{HexCoA} + 2 \text{ ADP}$.
 BOXI2 : $\text{HexCoA} + \text{NADH} = \text{HexenCoA} + \text{NAD}$.
 BOXI3 : $\text{HexenCoA} = \text{HHexCOA}$.
 BOXI4 : $\text{HHexCOA} + \text{NAD} = \text{CHexCoA} + \text{NADH}$.
 BOXI5 : $\text{CHexCoA} + \text{CoASH} = \text{ButCoA} + \text{AcCoA}$.
 BOXI6 : $\text{ButCoA} + \text{NADH} = \text{ButenCoA} + \text{NAD}$.
 BOXI7 : $\text{ButenCoA} = \text{HButCoA}$.
 BOXI8 : $\text{HButCoA} + \text{NAD} = \text{CButCoA} + \text{NADH}$.
 BOXI9 : $\text{CButCoA} + \text{CoASH} = 2 \text{ AcCoA}$.
 PHAJ1 : $\text{ButenCoA} = 3 \text{ HB} + \text{CoASH}$.
 PHAJ2 : $\text{HexenCoA} = 3 \text{ HHx} + \text{CoASH}$.
 PNTAB : $\text{NADH} + \text{NADP} + \text{ATP} = \text{NADPH} + \text{NAD} + \text{ADP}$.
 UDH : $\text{NADPH} + \text{NAD} = \text{NADH} + \text{NADP}$.

APÊNDICE I –

Análise de modos elementares do ponto de vista das reações metabólicas: (i) oxidação da glicose a CO₂, (ii) conversão de glicose a P(3HB), (iii) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB) e (iv) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB-*co*-3HHx). (Continua)

		EMP1	VP1	ED1	ED2	EMP5	EMP4	GLN3	EMP2	EMP6	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10	CPD	VP5	VP6
Respiração Glicose	68	1,0000	4,0000	4,0000	4,0000	-3,0000	-3,0000	3,0000	-3,0000	-2,0000	-2,0000	-2,0000	-2,0000	0,0000	4,0000	0,0000	0,0000
	78	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	4,0000	0,0000	0,0000
	44	1,0000	6,0000	0,0000	0,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-5,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	6,0000	2,0000
	70	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	76	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	3,0000	4,0000	0,0000	0,0000
	55	1,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-2,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	2,0000	3,0000	1,0000
	59	1,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-2,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	3,0000	1,0000
	80	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	0,0000	0,0000
Gli PHB	52	1,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-2,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	3,0000	1,0000
	64	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	74	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	0,0000	0,0000
GliHex3HB	65	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	72	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	61	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	73	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	62	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	66	1,0000	4,0000	4,0000	4,0000	-3,0000	-3,0000	3,0000	-3,0000	-2,0000	-2,0000	-2,0000	-2,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
GliAHex3HB3HHx	60	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	71	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	2,0000	0,0000	0,0000
	63	1,0000	2,0000	2,0000	2,0000	-1,0000	-1,0000	1,0000	-1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000

Análise de modos elementares do ponto de vista das reações metabólicas: (i) oxidação da glicose a CO₂, (ii) conversão de glicose a P(3HB), (iii) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB) e (iv) conversão de glicose e ácido hexanoico a P(3HB-*co*-3HHx). (Conclusão)

		BOXI1	BOXI2	BOXI3	BOXI4	BOXI5	BOXI6	BOXI7	BOXI8	BOXI9	PHAJ1	PHAJ2	P3HB	OXNAD	OXFAD	UDH	PNTAB
Respiração Glicose	68	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	10,0000	2,0000	4,0000	0,0000
	78	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	10,0000	2,0000	2,0000	0,0000
	44	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	12,0000	0,0000	12,0000	0,0000
	70	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	10,0000	2,0000	4,0000	0,0000
	76	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	10,0000	2,0000	1,0000	0,0000
	55	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	11,0000	1,0000	6,0000	0,0000
	59	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	11,0000	1,0000	7,0000	0,0000
	80	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	10,0000	2,0000	3,0000	0,0000
Gli PHB	52	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	7,5000	0,0000	5,5000	0,0000
	64	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	3,0000	0,0000	1,0000	0,0000
	74	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000
GliHex3HB	65	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,0000	0,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	72	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
	61	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000	0,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	73	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	4,0000	0,0000	0,0000	0,0000	3,0000
	62	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	4,0000	0,0000	0,0000	0,0000	2,0000
	66	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	4,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
GliAHex 3HB3HHx	60	3,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	3,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000
	71	3,0000	3,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	3,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	63	2,6667	2,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,6667	0,0000	2,0000	2,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

ANEXOS

ANEXO A –

Esquema do plasmídeo pBBR1MCS-2 utilizado na construção dos recombinantes.

A sequência referente a cada gene clonado está descrita de modo genérico como gene. Este vetor apresenta resistência à canamicina (Km^R), com genes de mobilização (*mob*) e replicação (*rep*) e com um local de restrição múltipla onde o gene de interesse foi inserido sobre o controle do promotor *lacZα* (KOVACH *et al.*, 1995).

ANEXO B –

Artigos publicados.

ORIGINAL ARTICLE

Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoatesT.T. Mendonça¹, J.G.C. Gomez¹, E. Buffoni¹, R.J. Sánchez Rodríguez², J. Schripsema³, M.S.G. Lopes¹ and L.F. Silva¹¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil² Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brasil³ Grupo Metabômica, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, Brasil**Keywords**biodegradable copolymers, *Burkholderia sacchari*, PHA, polyhydroxyalkanoate.**Correspondence**Luiziana Ferreira da Silva, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.
E-mail: lukneif@usp.br

2013/1039: received 27 May 2013, revised 21 November 2013 and accepted 21 November 2013

doi:10.1111/jam.12406

Abstract**Aim:** Evaluation of the capability of *Burkholderia sacchari* to incorporate different monomers into polyhydroxyalkanoates (PHA).**Methods and Results:** Thirty different carbon sources were evaluated as cosubstrates for *B. sacchari* growing on glucose with the intention to promote the incorporation of different monomers into the PHA produced by this species. With odd-numbered fatty acids, incorporation of the 3HV monomer was achieved, up to 65 mol% in the case of valerate. With 4-hydroxybutyrate, incorporation of 4HB was obtained, representing 9.1 mol%. With hexanoic acid, the production of P3HB-co-3HHx was achieved, containing up to 1.6 mol% of 3HHx. The molar fraction of 3HHx was found to be dependent on the ratio of glucose to hexanoic acid supplied. Metabolic flux analysis revealed a high efficiency of *B. sacchari* in converting carbon sources into P3HB-co-3HHx. Nevertheless, hexanoic acid was only poorly converted to 3HHx.**Conclusions:** *Burkholderia sacchari* is able to incorporate 3HV, 4HB and 3HHx in PHA containing mainly 3HB. The 3HHx content of P3HB-co-3HHx can be controlled by varying the glucose to hexanoic acid ratio. *Burkholderia sacchari* is highly efficient in converting carbon sources into PHA; however, only 2% of the hexanoic acid supplied could be converted to 3HHx.**Significance and Impact of the Study:** This is the first report describing an approach to modulate the composition of P3HB-co-3HHx produced by bacteria using mixtures of carbohydrate and hexanoic acid as carbon source.**Introduction**

A number of bacteria are able to produce polyhydroxyalkanoates (PHA) from different carbon sources. They are stored as intracellular granules, which serve as carbon and energy reserves (Steinbüchel and Fuchtenbusch 1998; Khanna and Srivastava 2005). PHA are bacterial polyesters showing remarkable similarities in physical properties to synthetic polymers. They have attracted commercial interest as environmentally friendly alternatives to petrochemical plastic as they are biodegradable and biocompatible (Anderson and Dawes 1990; Verlinden *et al.* 2007; Salgaonkar *et al.* 2013).

Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) was the first PHA discovered, and its thermoplastic properties were investigated already in the 60s (Baptist 1962). Presently, is the most studied PHA, but is brittle and has rather poor mechanical properties (Holmes 1985; Sudesh *et al.* 2000; Tsuge 2002). In the 80s, a bacterial process was developed allowing the production of copolymers of 3HB and 3HV (3-hydroxyvalerate) with considerably improved material properties (Holmes *et al.* 1983; Byrom 1994; Loo and Sudesh 2007).

P3HB biosynthesis starts from acetyl-CoA involving three enzymatic steps (Steinbüchel and Schlegel 1991). The copolymer (P3HB-co-3HV) is obtained supplying a

Efeito do suprimento de diferentes proporções glicose/ácido hexanóico na composição do copolímero poli(3-hidroxiбутирато-co-3-hidroxihexanoato) P(3HB-co-3HHx) produzido por *Burkholderia sacchari*

Thatiane Teixeira Mendonça¹, José Gregório Cabrera Gomez¹, Marta Tortajada², Daniel Ramón Vidal², Antonia Rojas², Daniel Bustamante², Luiziana Ferreira da Silva¹

¹Laboratório de Bioprodutos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. ²Departamento de Biotecnologia Microbiana, Biopolis S.L., Parc Científic de la Universitat de València, Valencia, Espanha.

1. Introdução

Os bioplásticos são cada vez mais estudados e têm se mostrado uma alternativa promissora para substituição dos plásticos de origem petroquímica, pois podem ser produzidos a partir de fontes renováveis. Neste contexto, destacam-se os polihidroxicarboxilatos (PHA) que compõem um grupo bastante diversificado de poliésteres acumulados por um grande número de bactérias (Steinbüchel & Valentin, 1995) e têm sido o foco das atenções por apresentarem propriedades termoplásticas, serem biodegradáveis e biocompatíveis (Sudesh et al., 2000; Akaraonye et al., 2010).

A síntese de PHA depende de três fatores principais: as vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, o tipo de PHA sintase bacteriano – enzima-chave para a biossíntese de PHA – e a fonte de carbono fornecida no momento de acúmulo. De acordo com o substrato fornecido, as vias metabólicas darão origem a diversos hidroxiacil-CoA, que poderão ou não ser incorporados ao polímero, de acordo com a especificidade da PHA sintase microbiana (Rehm, 2003, 2007).

Effects of the supply of different glucose/hexanoic acid ratios in the composition of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) P(3HB-co-3HHx) produced by *Burkholderia sacchari*

Thatiane Teixeira Mendonça¹, José Gregório Cabrera Gomez¹, Marta Tortajada², Daniel Ramón Vidal², Antonia Rojas², Daniel Bustamante², Luiziana Ferreira da Silva¹

¹Laboratory of Bioproducts, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

²Department of Microbial Biotechnology, Biopolis S.L., Parc Científic de la Universitat de València, Valencia, Spain

1. Introduction

Bioplastics have been increasingly studied as a promising alternative for replacing petrochemical plastics, since they can be produced from renewable sources. In this context, a class of bioplastics that could be highlighted includes the polyhydroxyalkanoates (PHA), which are a very diverse group of polyesters accumulated by many bacteria (Steinbüchel & Valentin, 1995). These polymers have been the focus of attention because they have thermoplastic properties, are biodegradable and biocompatible (Sudesh et al., 2000; Akaraonye et al., 2010).

PHA synthesis depends on three main factors: metabolic pathways present in the producer bacteria, type of bacterial PHA synthase – the key enzyme to the PHA biosynthesis – and carbon sources provided at the time of accumulation. According to the substrate supplied, the metabolic pathways in the microorganism will produce different hydroxyacyl-CoAs, which may or may not be incorporated into the polymer, depending on PHA synthase specificity (Rehm, 2003, 2007).