

TATIANA SAYURI MATSUDA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA CURTA E MÉDIA A
PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS**

**Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2009**

TATIANA SAYURI MATSUDA

**ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE
POLIHIDROXIALCANOATOS DE CADEIA CURTA E MÉDIA A
PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS**

**Dissertação (Mestrado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT,
para obtenção do Título de Mestre em
Biotecnologia.**

**Área de concentração:
Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera
Gomez**

**São Paulo
2009**

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

© reprodução total

Matsuda, Tatiana Sayuri.

Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais / Tatiana Sayuri Matsuda. -- São Paulo, 2009.

Orientador: José Gregório Cabrera Gomez.

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

Versão do título para o inglês: Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates containing short-chain-length and medium-chain-length monomers from plant oils.

Descritores: 1. Polihidroxicanoatos 2. Aeromonas 3. Óleo de soja 4. P3HB-co-3HHx 5. Ácido láurico I. Gomez, José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0209/2009

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

Candidato(a): Tatiana Sayuri Matsuda.

Título da Dissertação: Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais .

Orientador(a): José Gregório Cabrera Gomez.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 290, referente ao projeto intitulado: *“Isolamento de bactérias para a produção de polihidroxicanoatos contendo monômeros de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais”* sob a responsabilidade de **Tatiana Sayuri Matsuda**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

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

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

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pela oportunidade, paciência e conhecimento transmitido durante todos estes anos. Um exemplo de profissional e ser humano.

À Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pelo apoio, amizade e paciência.

Aos meus pais, por tudo, pela criação, estudo, sabedoria, oportunidade que me deram todos esses anos. Sou muito grata por ter vocês como exemplo a seguir.

As minhas irmãs queridas Cimara e Erica, meu cunhado-irmão Minoru pela paciência e compreensão nos meus momentos de nervosismo. Por me mimarem sempre.

Aos amores da minha vida, meus sobrinhos Diogo e Daniela, por alegrarem todos os dias as nossas vidas.

Ao meu querido namorado Renato, por toda ajuda, paciência, carinho e amor dedicado. Você foi essencial para a realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas Thati minha amiga-gêmea, Dani minha professora de química e Lú minha companheira de trânsito, que foram importantíssimas para a realização deste trabalho. Amigas que fiz para a vida inteira.

Ao meu amigo-professor Rogério, que me ensinou e ajudou muito durante todos esses anos, Big head, muito Obrigada.

A Diana Maria, minha estagiária sempre disposta, interessada e responsável com o trabalho, sem a sua ajuda seria impossível a conclusão deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratórios Rafael, Mariana, Romine, Lucas, Liege, Karina, Johana, Diana P., Mateus, Estela, Natália, Karen, Érica, Márcia, e principalmente Marco Antonio, Nuri, Paola que me ajudaram muito nesta última etapa do trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Aos pesquisadores, técnicos e auxiliares que colaboraram na realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

RESUMO

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais.** 2009. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por bactérias como material de reserva de carbono e energia. Este polímero tem despertado grande interesse industrial pois são termoplásticos biodegradáveis. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina suas propriedades mecânicas e permite seu uso para diferentes aplicações. Óleos vegetais são fontes de carbono interessantes para produção de PHA pois são materiais renováveis e sua composição permite a inserção de diferentes monômeros no PHA. Neste trabalho, foi avaliado o potencial de bactérias em produzir PHA a partir de óleo de soja com ênfase em *Aeromonas* spp. Dez isolados que apresentaram características de *Aeromonas* spp. (colônias amarelas em GSP agar e produção de P3HB-co-3HHx) e perfis ARDRA similares foram obtidos. Dois isolados produtores de PHA_{MCL} também foram obtidos e experimentos de identificação adicionais serão necessários para confirmar se pertencem ao gênero *Aeromonas*. P3HB-co-3HHx contendo diferentes frações molares de 3HHx foram produzidos por diferentes isolados sugerindo que PHA para diferentes aplicações podem ser produzidos. Isolados produtores P3HB-co-3HHx a partir de óleo de soja ou ácido láurico foram incapazes de produzir P3HB a partir de glicose sugerindo sua incapacidade de gerar monômeros 3HB a partir de acetil-CoA. Assim, a expressão dos genes *phaA* (β -cetotiolase) e *phaB* (3-cetoacil-CoA redutase) poderá permitir a produção de maiores quantidades de PHA por estes isolados. Introdução de plasmídeo abrigando genes de biossíntese de P3HB de *Ralstonia eutropha* em isolados capazes de utilizar eficientemente óleo de soja como fonte de carbono permitiu a produção de P3HB, mas não PHA contendo monômeros de cadeia média, sugerindo uma transferência eficiente de intermediários a partir da β -oxidação para PHA sintase.

Palavras-chave: Polihidroxicanoatos. *Aeromonas*. P3HB-co-3HHx. Ácido láurico. Óleo de soja.

ABSTRACT

MATSUDA, T. S. **Isolation of bacteria producing polyhydroxyalkanoates containing short-chain-length and medium-chain-length monomers from plant oils.** 83 p. Master dissertation (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters accumulated by bacteria as reserve material of carbon and energy. This kind of polymers has attracted great industrial interest since they are biodegradable thermoplastics. Variability in the PHA monomer composition determines their mechanical properties and allows their use for different applications. Plant oils are appropriate carbon sources for PHA production since they are renewable materials and their composition allows the insertion of different monomers into PHA. In this work, the potential of PHA production from plant oils was evaluated especially in *Aeromonas* spp. Ten isolates presenting features of *Aeromonas* spp. (yellow colonies in GSP agar and production of P3HB-*co*-3HHx) and similar ARDRA profiles were obtained. Two isolates producing PHA_{MCL} were also obtained and further identification experiments will be needed to confirm their position in *Aeromonas* genus. P3HB-*co*-3HHx containing different molar fractions of 3HHx were produced by different isolates suggesting that PHA for different applications could be produced. Isolates producing P3HB-*co*-3HHx from soybean oil or lauric acid were unable to produce P3HB from glucose suggesting their incapability to generate 3HB monomers from acetyl-CoA. Thus, the expression of *phaA* (β -ketothiolase) and *phaB* (3-ketoacyl-CoA reductase) may allow the production of higher amounts of PHA by this isolates. Introduction of a plasmid harboring P3HB biosynthesis genes from *Ralstonia eutropha* into isolates able to use efficiently soybean oil as carbon source allowed the production of P3HB but not PHA containing medium-chain-length monomers suggesting an inefficient transfer of medium-chain-length intermediates from β -oxidation to PHA synthase.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates. *Aeromonas*. P3HB-*co*-3HHx. Lauric acid. Soybean oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura genérica de polihidroxicanoatos	19
Figura 3.2	Esquema da síntese de PHA em bactérias (GOMEZ e BUENO-NETTO, 2001)	23
Figura 3.3	Biossíntese de PHA a partir de ácidos carboxílicos (Modificado a partir de GOMEZ, 2000)	26
Figura 3.4	Biossíntese de PHA a partir de ácidos carboxílicos pelo gênero <i>Aeromonas</i> (Modificado a partir de GOMEZ, 2000)	30
Figura 5.1	Correlação entre crescimento (massa seca celular – MSC) em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono e a produção (+) ou não (-) de lipases. Cada ponto representa um isolado avaliado	48
Figura 5.2	Produção de P3HB-co-3HHx por isolados de lodo de esgoto. A. Massa seca celular. B. Teor de PHA acumulado. C. Composição monomérica	57
Figura 5.3	Coloração de colônias de isolados quando cultivados em GSP agar por 24 horas a 30 °C. A. 1 – TSM14, 2 – TSM18, 3 – TSM19, 4 – TSM20, 5 – TSM21, 6 – TSM23, 7 – TSM26, 8 – TSM32, 9 – TSM59, 10 – TSM 72, 11 – TSM81 e 12 – TSM86. B. 1 – TSM22, 2 – TSM24, 3 – TSM25, 4 – TSM27, 5 – TSM28, 6 – TSM31, 7 – TSM44, 8 – TSM52, 9 – TSM53, 10 – TSM55, 11 – TSM57, 12 – TSM58, 13 – TSM67, 14 – TSM70, 15 – TSM74, 16 – TSM76, 17 – TSM85, 18 – TSM91, 19 – TSM115, 20 – TSM116, 21 – TSM117, 22 – TSM118, 23 – TSM124, 24 – TSM125, 25 – TSM127 e 26 – TSM129. C. 1 – TSM30, 2 – TSM33, 3 – TSM36, 4 – TSM45, 5 – TSM49, 6 – TSM50, 7 – TSM55, 8 – TSM56, 9 – TSM60, 10 – TSM65, 11 – TSM79, 12 – TSM80, 13 – TSM89, 14 – TSM94, 15 – TSM95, 16 – TSM96, 17 – TSM97, 18 – TSM98, 19 – TSM100, 20 – TSM101, 21 – TSM102, 22 – TSM103, 23 – TSM106, 24 – TSM130, 25 – TSM131, 26 – TSM132 e 27 – TSM133.	59
Figura 5.4A	Perfis de migração em gel de agarose 2%, 1- GeneRuler 100bp DNA Ladder- fermentas, 2- TSM 14, 3- TSM 18, 4- TSM 19, 5- TSM 20, 6- TSM 21, 7- TSM 23, 8- TSM 24, 9- TSM 26, 10- TSM 30, 11- TSM 52, 12- TSM 59, 13- TSM 79, 14- TSM 81, 15- TSM 86, 16- TSM 92, 17- TSM 106 e 18- ATCC 7966, digeridos com <i>HAE</i> III.	60
Figura 5.4B	Perfis de migração em gel de agarose 2%, 1- GeneRuler 1kb DNA Ladder-fermentas, 2- TSM 14, 3- TSM 18, 4- TSM 19, 5- TSM 20, 6- TSM 21, 7- TSM 23, 8- TSM 24, 9- TSM 26, 10- TSM 30, 11- TSM 52, 12- TSM 59, 13- TSM 79, 14- TSM 81, 15- TSM 86, 16- TSM 92, 17- TSM 106 e 18- ATCC 7966, digeridos com <i>Hha</i> I.	61
Figura 5.5	Produtores de PHA detectados utilizando óleo de soja ou ácido láurico. A. Número de isolados produtores de cada tipo de PHA obtidos. B e C. Percentual de isolados produtor de cada tipo de PHA obtido a partir de óleo de soja e ácido láurico, respectivamente.	63

Figura 5.6

A – Esquema do plasmídeo pBBR1MCS-2. B. Análise do perfil de restrição dos plasmídios pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-2::*phaCAB* por eletrofores em gel de agarose. 1. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind* III). 2. Vetor pBBR1MCS-2 digerido com *Hind* III. 3. pBBR1MCS-2::*phaCAB* digerido com *Hind* III.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros.	21
Tabela 3.2	Classes de PHA sintases.	23
Tabela 3.3	Ácidos graxos componentes de diferentes óleos vegetais.	25
Tabela 5.1	Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto industrial.	43
Tabela 5.2	Produção de PHA a partir de ácido láurico por linhagens isoladas de lodo de esgoto industrial.	45
Tabela 5.3	Produção de PHA utilizando glicose (10 g/L) como única fonte de carbono.	47
Tabela 5.4	Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico.	49
Tabela 5.5	Produção de PHA a partir de ácido láurico por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico.	53
Tabela 5.6	Produção de P3HB- <i>co</i> -3HHx por isolados de lodo de esgoto.	56
Tabela 5.7	Produção de PHA por <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966 a partir de diferentes fontes de carbono.	58
Tabela 5.8	Produção de PHA a partir de óleo de soja por outros isolados.	65
Tabela 5.9	Teste de resistência a canamicina em isolados não produtores de PHA, mas com bom crescimento em óleo de soja.	66
Tabela 5.10	Crescimento e produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens selvagens.	68
Tabela 5.11	Crescimento e produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens recombinantes abrigando o plasmídeo pBBR1MCS2:: <i>phaCAB</i>	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVO	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1 Polihidroxicanoatos	18
3.2 Metabolismo de PHA	22
3.3 PHA a partir de óleos vegetais	24
3.3.1 Óleos vegetais	24
3.3.2 Biossíntese de PHA a partir de óleos vegetais	27
3.4 O gênero <i>Aeromonas</i>	27
3.5 Produção de P3HB-co-3HHx pelo gênero <i>Aeromonas</i>	28
3.5.1 Produção de PHA em linhagens recombinantes abrigando genes da PHA sintase de <i>Aeromonas</i>	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Microrganismos e condições de cultivo	34
4.2 Meios de cultura	34
4.2.1 Caldo nutriente (CN) ou Agar nutriente (AN)	34
4.2.2 Meio mineral (MM)) (RAMSAY <i>et al.</i>, 1990)	34
4.2.3 Agar Rodamina (MAR)	34
4.2.4 GSP Agar (Glutamate Starch Phenol Red Agar)	35
4.2.5 Luria Bertani (LB)	35
4.3 Esterilização	36
4.4 Isolamento de bactérias	36
4.5 Avaliação da capacidade de produção de lipases e PHA (teste qualitativo)	37
4.7 Obtenção de linhagens recombinantes	38
4.8 Métodos analíticos	39

4.8.1 pH	39
4.8.2 Massa seca celular	39
4.8.3 Quantidade e Composição de PHA	39
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	41
5.1 Isolamento e caracterização de <i>Aeromonas</i> de amostra de lodo de esgoto industrial	41
5.2 Produção de PHA por isolados de lodo de esgoto industrial a partir de ácido láurico	43
5.3 Produção de PHA a partir de glicose por isolados de <i>Aeromonas</i>	46
5.4 Isolamento e caracterização de bactérias a partir de amostra de lodo de esgoto doméstico	47
5.5 Avaliação dos isolados de lodo de esgoto doméstico para a produção de PHA utilizando ácido láurico como única fonte de carbono	52
5.6 Produção de PHA por <i>Aeromonas</i>	55
5.7 Produção de PHA por outros isolados a partir de óleo de soja	64
5.8 Construção de linhagens recombinantes para a produção de PHA a partir de óleos vegetais	66
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

Na sociedade atual, o uso de materiais plásticos é cada vez mais freqüente, e estes vêm substituindo matérias-primas convencionais como papel, vidros e metais, em função do baixo custo e grande durabilidade. Devido à maneira incorreta de descarte dos plásticos, eles vêm se tornando um sério problema ambiental. O principal motivo é que eles permanecem no meio ambiente sem se degradarem, e quando depositados em aterros sanitários prejudicam a circulação de gases e a troca de líquidos resultantes do processo de decomposição da matéria orgânica. Pensando na preservação do meio ambiente, desenvolveram-se alternativas para resolver ou minimizar os problemas gerados pelos plásticos, uma das alternativas é a substituição dos plásticos convencionais pelos plásticos biodegradáveis. Um exemplo de polímeros que apresentam propriedades termoplásticas e são biodegradáveis são os polihidroxialcanoatos (GOMEZ e BUENO-NETTO, 2001).

Desde o início da década de 90, o Brasil vem dedicando um considerável esforço no desenvolvimento de processos para a produção de polihidroxialcanoatos (PHA). PHA são poliésteres acumulados como material de reserva de carbono e energia por bactérias e tem despertado grande interesse, pois são materiais que apresentam propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas. A grande diversidade de PHA que podem ser sintetizados por bactérias permite prever que estes materiais poderão atender aos requisitos para diferentes aplicações que atualmente são satisfeitas por materiais de origem petroquímica, tornando-se uma alternativa ambientalmente correta, uma vez que se tratam de materiais biodegradáveis, biocompatíveis e que podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997; GOMEZ e BUENO NETTO, 2001).

Para que o potencial associado aos PHA se concretize, serão necessários: (a) obtenção de linhagens bacterianas eficientes na síntese de PHA com diversas composições; (b) desenvolvimento de processos que permitam a produção destes materiais com custos compatíveis e de maneira reproduzível; (c) caracterização química e físico-mecânica do material para definição de aplicações possíveis.

Os óleos vegetais são uma excelente opção de substrato para a produção de PHA, pois apresentam custo relativamente baixo e a estrutura química dos ácidos graxos

presentes no óleo vegetal têm um reflexo direto sobre a composição do PHA sintetizado. (SILVA-QUEIROZ *et al.*, 2009)

O Brasil é responsável por cerca de 28% da produção mundial de soja, com a safra de 2006 estimadas ao redor de 57 milhões de toneladas. O país é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grãos, farelo e óleo de soja. O Complexo Soja que reúne a cadeia produtiva de soja em grãos, farelo e óleo, é um dos principais itens da Balança Comercial Brasileira e as exportações atingiram cerca de US\$ 9,5 bilhões em 2005, colocando o país na liderança mundial do setor em valor (FONTE: Associação brasileira das indústrias de óleos vegetais).

Os trabalhos realizados no Brasil relacionados à produção de PHA têm explorado diversos aspectos para o desenvolvimento efetivo de tecnologias para produção desses polímeros e incluem: (a) o isolamento e caracterização de bactérias produtoras de PHA (GOMEZ, 1994; RODRIGUES *et al.*, 1995; GOMEZ *et al.*, 1996a; GOMEZ *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002); (b) compreensão do metabolismo de síntese destes polímeros a partir de diferentes substratos e melhoramento genético de linhagens bacterianas (GOMEZ *et al.*, 1996b; SILVA e GOMEZ, 1998; SILVA, 1998; SILVA *et al.*, 2000; GOMEZ, 2000; BRÄMER *et al.*, 2002, SILVA *et al.*, 2004); (c) avaliação de processos de produção (PICCOLI, 1995; PEREIRA, 1996; TACIRO *et al.*, 1997; GOMEZ *et al.*, 1997; DINIZ *et al.*, 2004; ROCHA, 2002; ROCHA *et al.*, 2002; TACIRO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002; TAVARES *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2007) ou de modelos matemáticos descritores destes processos (FERRAZ *et al.*, 1999; PICCOLI *et al.*, 1999) e (d) avaliação de processos de extração e purificação de PHA (DERENZO *et al.*, 1993; ZUCCOLO *et al.*, 1994; ZUCCOLO *et al.*, 1995; KAPRITCHKOFF *et al.*, 2001, KAPRITCHKOFF *et al.*, 2006). Os trabalhos realizados no Brasil direcionaram seus esforços para os seguintes temas-chave para a produção de PHA a custos reduzidos: obtenção de microrganismos eficientes no acúmulo de PHA; produção destes materiais pelo uso de matérias-primas de baixo custo no país e renováveis pela agricultura; aumento de produtividade, pelo cultivo microbiano a alta densidade celular; busca de reatores alternativos e, adequação das características do produto pela modulação da massa molar (SILVA *et al.*, 2007).

Dois grupos distintos de PHA têm sido focalizados nesses trabalhos: PHA contendo monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL}) e PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}). PHA_{MCL} são elastômeros (alongamento para ruptura maior que 1000%), enquanto o P3HB é um termoplástico rígido (alongamento para ruptura menor que 5%). A incorporação de unidades 3HV ao P3HB permite aumentar a maleabilidade e resistência,

atingindo-se valores de alongamento para ruptura de cerca de 50%. A incorporação de monômeros HA_{MCL} a um PHA contendo 3HB como principal constituinte tem se revelado como uma estratégia interessante para obtenção de materiais com propriedades intermediárias entre o P3HB e PHA_{MCL} , a incorporação de apenas 6 mol% de $3HA_{MCL}$ permite obter um material com alongamento para ruptura superior a 600% (SUDESH *et al.*, 2000).

PHA contendo em sua composição 3HB e $3HA_{MCL}$ têm sido obtidos essencialmente utilizando óleos vegetais ou ácidos graxos (KOBAYASHI *et al.*, 1994; FUKUI e DOI, 1998; KAHAR *et al.*, 2004). *Aeromonas caviae* foi a primeira espécie descrita como capaz de sintetizar o copolímero P3HB-co-3HHx a partir de ácidos alcanóicos e óleos vegetais (SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993; SHIMAMURA *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1994; DOI *et al.*, 1995) e tem despertado especial interesse, pois demonstrou capacidade de incorporar quantidades expressivas de HA_{MCL} ao PHA (KOBAYASHI *et al.*, 1994; FUKUI e DOI, 1997).

Outras espécies do gênero *Aeromonas* também têm sido citadas como produtoras de P3HB-co-3HHx (LEE *et al.*, 2000; AMARA *et al.*, 2002), entretanto nenhum estudo sistemático foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de produção de PHA por esse gênero bacteriano.

A produção de PHA contendo 3HB e $3HA_{MCL}$ foi também descrita para outras bactérias. Em síntese, o que se observa é que pequenas quantidades de $3HA_{MCL}$ podem ser detectados em bactérias abrigando genes de PHA sintase do tipo I, que apresentam capacidade de produzir essencialmente P3HB (CABALLERO *et al.*, 1995; GROSS *et al.*, 1989; ULMER *et al.*, 1989; GREEN *et al.*, 2002). Por outro lado, PHA sintases do tipo II que apresentam maior especificidade por HA_{MCL} , são capazes de incorporar pequenas frações de 3HB ao PHA. Neste último caso, diversos trabalhos têm demonstrado a possibilidade de aumentar expressivamente a fração de 3HB desde que vias efetivas de suprimento desses monômeros estejam disponíveis (ABE *et al.*, 1994; KATO *et al.*, 1996a; KATO *et al.*, 1996b; LEE *et al.*, 1995; SCHROLL *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2006; SHEU *et al.*, 2004)

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial da biodiversidade microbiana para a produção de polihidroxialcanoatos a partir de óleos vegetais, contendo em sua composição 3HB e 3HA_{MCL}. Ênfase especial foi dada ao gênero *Aeromonas*, embora bactérias de outros gêneros também foram avaliadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres produzidos e armazenados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares (STEINBUCHER e VALENTIN, 1995). Esses grânulos podem atingir até cerca de 80% da massa seca celular, e podem ter sua concentração intracelular aumentada sob condições nas quais há limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação celular e excesso de fonte de carbono (ANDERSON e DAWES, 1990). Por isso sua função mais frequentemente atribuída é como reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (BRANDL *et al.*, 1990). PHA são ainda materiais com propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas despertando grande interesse industrial (GOMEZ e BUENO NETTO, 1997). Outra grande vantagem com relação a estes grânulos é que podem ser sintetizados em grandes quantidades pelas células a partir de fontes de fácil renovação, tais como carboidratos e óleos vegetais (BRAUNEGG *et al.*, 1998; REN *et al.*, 1998).

Cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA produzidos por bactérias a partir de diversas fontes de carbono (REHM e STEINBUCHER, 1999). A estrutura genérica de PHA está apresentada na Figura 3.1. O radical “R” pode ser desde um átomo de hidrogênio até cadeias de carbono contendo até 13 átomos de carbono, que podem ser alifáticas, cíclicas, conter insaturações, ramificações, grupos funcionais (fenoxi, acetoxi, p-cianofenoxi, p-nitrofenoxi, hidroxilas secundárias, etc). “n” pode variar de 1 a 4, ou seja, já foram detectados 3-hidroxicanoatos, 4-hidroxicanoatos, 5-hidroxicanoatos e 6-hidroxicanoatos (STEINBUCHER e VALENTIN, 1995).

Os monômeros constituintes de PHA são classificados em dois grandes grupos: (i) aqueles de cadeia curta (HA_{SCL} – “HydroxyAcids of Short-Chain-Length”), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal, e (ii) aqueles de cadeia média (HA_{MCL} – “HydroxyAcids of Médium-Chain-Length”), contendo de 6 a 16 átomos de carbono na

cadeia principal, portanto os PHA podem ser classificados como (i) PHA_{SCL}, compostos por HA_{SCL} e (ii) PHA_{MCL}, formados por HA_{MCL} (STEINBUCHER e VALENTIN, 1995).

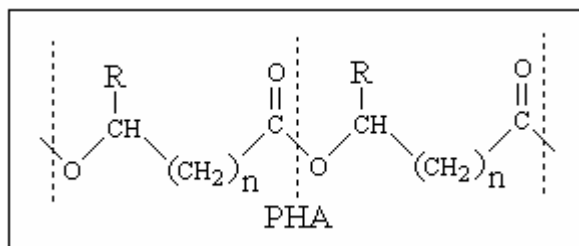


Figura 3.1. Estrutura genérica de polihidroxiálcanoatos.

Poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), um PHA_{SCL} produzido por uma linhagem de *Bacillus*, foi o primeiro PHA descoberto (LEMOIGNE, 1926). Também neste período, descobriu-se que a ocorrência destes biopolímeros é algo natural entre a maioria das linhagens bacterianas Gram-negativas (LENZ e MARCHESSAULT, 2005). Por volta de 1974, Wallen e Rohwedder, contrariando o que se pensava sobre estes poliésteres bacterianos serem formados apenas por monômeros 3HB, identificaram a presença de outros monômeros diferentes do 3HB em amostras de lodo ativado, dentre os quais 3-hidroxi-valerato (3HV) e 3-hidroxi-hexanoato (3HHx). Anos mais tarde, Findlay e White (1983) demonstravam a presença de unidades 3HB, 3-hidroxi-heptanoato (3HHp) e 3-hidroxi-octanoato (3HO) no polímero extraído de *B. megaterium* (SUDESH *et al.*, 2000).

Os PHA_{MCL} são produzidos por diferentes espécies do gênero *Pseudomonas* e PHA_{SCL} (principalmente P3HB) são produzidos por espécies pertencentes aos mais diversos grupos bacterianos (STEINBUCHER, 1991). A capacidade de acumular PHA contendo HA_{MCL} e HA_{SCL} em uma mesma cadeia polimérica também foi observada. (SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993; KOBAYASHI *et al.*, 1994; SHIMAMURA *et al.*, 1994; DOI *et al.*, 1995; LIEBERGESELL *et al.*, 1993; LEE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001).

A composição monomérica, ao lado da massa molecular e da distribuição de massas moleculares do polímero, é responsável pelas propriedades físicas e mecânicas destes materiais. Uma vez que PHA apresentam propriedades termoplásticas, diversas aplicações podem ser mencionadas desde a produção de embalagens para produtos de higiene, vasilhames para fertilizantes, vasos para mudas de plantas, brinquedos,

cosméticos, produtos farmacêuticos e médicos, como fios de sutura, próteses ósseas e cápsulas para liberação controlada de fármacos, entre outras (HOLMES, 1985; ELIGIO *et al.*, 1999; VASCONCELOS, 2002).

PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}) são considerados elastômeros e apresentam valores de alongamento para ruptura superiores a 1000% (STEINBÜCHEL, 2003). Entretanto, apresentam outros problemas que limitam suas aplicações como termoplásticos devido a sua baixa temperatura de fusão e lenta taxa de cristalização (DE KONING *et al.*, 1994). O P3HB apresenta-se como material duro e quebradiço, o que limita sua utilização em muitas das aplicações nas quais atualmente são utilizados os plásticos de origem petroquímica. P3HB possui um alongamento para ruptura de apenas 5%, ou seja, significativamente inferior ao valor de 400% apresentado pelo polipropileno (SUDESH *et al.*, 2000). A incorporação de unidades 3HV, obtendo-se o copolímero P3HB-*co*-3HV, permite a obtenção de materiais com propriedades melhores. O P3HB-*co*-3HV com baixa incorporação de unidades 3HV é duro e quebradiço, assemelhando-se ao poliestireno; com uma média incorporação de unidades 3HV, tem flexibilidade e dureza semelhantes às do polipropileno e com altos níveis de incorporação das unidades 3HV, o polímero se assemelha ao polietileno (HOLMES, 1985). Entretanto, a incorporação de unidades 3HV permite no máximo atingir valores de alongamento para ruptura de 50-60% (HOLMES, 1985; SUDESH *et al.*, 2000), ainda distante do valor obtido com polipropileno ou polietileno. A produção de polímeros formados principalmente por ácido 3-hidroxiбутírico (3HB) e contendo frações molares menores (<20 mol%) de 3-hidroxiálcanoatos de cadeia média (HA_{MCL} - C6 a C12) tem despertado grande interesse, pois apresentam propriedades muito semelhantes ao polietileno de baixa densidade (Tabela 3.1). Esses polímeros podem ser biossintetizados por linhagens bacterianas naturais e recombinantes. A combinação de P3HB e monômeros de HA_{MCL} têm permitido obter materiais com valores de alongamento para ruptura muito superiores aqueles obtidos com a incorporação de unidades 3HV.

Por exemplo, Doi *et al.* (1995) demonstraram que copolímeros de 3HB e 3HHx produzidos por *Aeromonas caviae* atingiam valores de alongamento para ruptura de 400% com 10 mol% de 3HHx e de 850% com 17 mol% do co-monômero. Estudos já revelaram que o copolímero P3HB-*co*-3HHx possui propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, e o P3HB-*co*-3HHx se torna cada vez mais maleável com o aumento de unidades 3HHx (XIE e CHEN, 2007). PHA produzidos por *Pseudomonas* sp. 61-3 contendo P3HB e 3HA_{MCL} com cadeias carbônicas variando de 6 a 12 átomos de carbono

apresentaram alongamento para ruptura de 680% quando a fração 3HA_{MCL} correspondia a 6% (SUDESH *et al.*, 2000).

Tabela 3.1. Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros.

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para Ruptura (%)	Cristalinidade (%)	Referência
P3HB	180	4	40	5	69	Sudesh <i>et al.</i> , 2000
P3HB Alto peso molecular	185	4	43	5	60	Tsuge, 2002
P(3HB-co-20 mol% 3HV)	145	-1	20	50	45	Sudesh <i>et al.</i> , 2000
P4HB	53	-51	50	1000		Martin e William, 2003
P(3HB-co-16mol% 4HB)	150	-7	26	444	45	Tsuge, 2002
P(3HB-co-11mol% 3HHx)	136	-1		400	36	Sudesh <i>et al.</i> , 2000
P(3HO-co-12mol% 3HHx)	61	-35	9	380		Martin e William, 2003
Polipropileno	176	-10	38	400	50-70	Verlinden <i>et al.</i> , 2007
Polietileno Baixa Densidade	130	-30	10	620	---	Sudesh <i>et al.</i> , 2000

T_m – Temperatura de fusão; T_g – Temperatura de transição vítrea; Monômeros 3HA: 3HO (< 1mol%); 3HD,(3 mol%); 3HDd (3 mol%); 3-hidroxi-cis-5-dodecanoato (< 1mol%)

Para se ter uma idéia da relevância dessa propriedade, P3HB e copolímeros de P3HB-co-3HV não podem ser utilizados para fazer filmes plásticos, utilizados em sacolas, fraldas, absorventes higiênicos, entre outras aplicações. Por outro lado, os valores de alongamento para ruptura de P3HB-co-3HA_{MCL} permitem sua utilização para essas aplicações.

As propriedades de P3HB-co-3HHx também conferem maior biocompatibilidade, tornando-o promissor para aplicações como suporte ou molde para uso em engenharia de tecidos. Seu uso tem sido reportado na confecção de tecidos cartilagosos híbridos (YANG *et al.*, 2002; YE *et al.*, 2009), 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) ou em tecidos cardiovasculares (SUN *et al.*, 2009). A utilização deste copolímero com associações visando aumentar a biocompatibilidade tem sido descrita. Exemplos recentes são a associação ao malato (Ma- P3HB-co-3HHx) (LI *et al.*, 2007) ou à hidroxiapatita,

mostrando-se promissor para a reconstrução óssea (XI *et al.*, 2008). Uma patente recente envolve o desenvolvimento de uma membrana porosa contendo uma resina de poliésteres alifáticos, entre os quais estão contemplados os polímeros contendo 3-hidroxihexanoato. Estas membranas porosas apresentam potencial aplicação no campo de artigos absorventes, como fraldas. Nestes artigos, estas membranas porosas são amplamente empregadas como revestimento para prevenir o encharcamento durante o uso (MIMURA *et al.*, 2008).

Foi descoberto recentemente os terpoliésters como o P3HB-*co*-3HV-*co*-4HB que parecem apresentar propriedades térmicas e mecânicas melhores do que o P3HB, P3HB-*co*-3HV e P3HB-*co*-3HHx, mas as propriedades termo-mecânicas desses terpoliésters ainda estão em estudo (XIE e CHENG, 2007). O terpoliéster P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx possui uma alta temperatura de termo-degradação por volta de 248,5 °C a 481,1 °C se comparado com o homopoliéster PHB (ZHAO e CHEN, 2007).

3.2 Metabolismo de PHA

A síntese de PHA depende do fornecimento de uma fonte de carbono adequada que possa ser convertida a um hidroxiacil-CoA através das vias metabólicas existentes na célula (Figura 3.2), bem como da presença de uma PHA sintase na bactéria capaz de incorporar este hidroxiacil-CoA ao poliéster em formação. Ambos fatores podem impedir a combinação de certos monômeros em uma mesma cadeia polimérica ou restringir a quantidade de um determinado monômero incorporado ao PHA (GOMEZ, 2000).

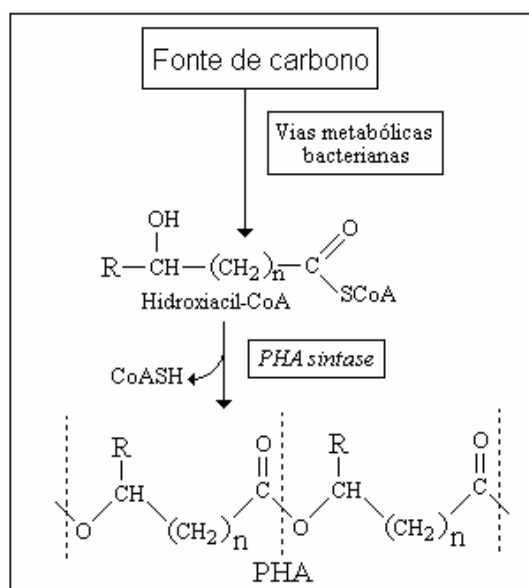


Figura 3.2. Esquema da síntese de PHA em bactérias (GOMEZ e BUENO-NETTO, 2001).

PHA sintases são as enzimas chaves no processo de síntese de PHA e catalisam a ligação dos monômeros por transesterificação (WITHOLT e KESSLER, 1999). PHA sintases têm sido agrupadas em quatro classes (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; REHM, 2003; REHM, 2006; REHM, 2007) (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Classes de PHA sintases.

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

Fonte: REHM, 2003.

PHA sintases da classe I são encontradas em diversas bactérias, consistem de um único polipeptídeo e apresentam especificidade por HA_{SCL}, raramente incorporando HA_{MCL}. PHA sintases da classe II são encontradas em *Pseudomonas*, constituem-se de um único

polipeptídio e apresentam especificidade por HA_{MCL}, dificilmente incorporando HA_{SCL}. A classe III de PHA sintases compreende enzimas com especificidade para HA_{SCL}, constituídas de duas subunidades polipeptídicas (i) subunidade PhaC que contém uma seqüência de aminoácidos com similaridade de 21 a 28% das PHA sintases da classe I e II, (ii) subunidade PhaE que não tem nenhuma similaridade com as PHA sintases. Uma exceção a esta classificação é a PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii*, que, embora seja semelhante a PHA sintases da classe III, é caracterizada pela capacidade de incorporar um amplo espectro de HA_{SCL} e HA_{MCL}. (LIEBERGESELL *et al.*, 1993; VALENTIN *et al.*, 1994) Um quarto tipo de PHA sintase foi encontrada em *Bacillus sp* e que também são constituídas de duas subunidades protéicas como as de classe III, mas a subunidade PhaE é substituída pela subunidade PhaR (MCCOOL e CANNON, 2001).

3.3 PHA a partir de óleos vegetais

Uma vez que a fonte de carbono representa um importante item nos custos de produção de PHA, processos para produção comercial em grande escala deverão considerar substratos de baixo custo (GOMEZ, 2000). Assim, fica evidente que o uso de óleos vegetais, bem como ácidos graxos deles derivados são excelentes fontes de carbono a serem utilizadas para a produção de PHA (SILVA–QUEIROZ, 2003).

3.3.1 Óleos Vegetais

Óleos vegetais são formados por triacilgliceróis, ou seja, são lipídios formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos ao glicerol através de ligações tipo éster. Os ácidos graxos que participam da estrutura de um triacilglicerol são geralmente diferentes entre si.

Como pode ser visto na Tabela 3.3, a composição de óleos vegetais pode variar grandemente com relação aos ácidos graxos presentes.

Tabela 3.3. Ácidos graxos componentes de diferentes óleos vegetais.

Óleos	ácidos graxos					
	Saturados	oleico	Linoleico	linolênico	ricinolêico	Outros
Soja	13,7	22,3	54,5	8,3	-	1,1
Canola	7,0	56,3	25,0	8,3	-	3,4
Girassol	10,3	14,3	75,4	-	-	-
Mamona	2,5	3,3	3,6	0,2	89,1	1,3
Dendê	84,2	14,6	1,2	-	-	-
Linhaça	9,0	19,1	15,3	56,6	-	-

Fonte: Dubois *et al.*, 2007.

Lipases pertencem a uma classe de enzimas insolúveis em água que catalisam a hidrólise da ligação ésteres dos lipídios, como os triacilgliceróis, em ácidos graxos de cadeia longa. Além da hidrólise, elas podem causar uma série de reações de conversão que incluem esterificações, alcoólises e aminolises (SAVITHA *et al.*, 2007). Lipases são produzidas por plantas, animais e bactérias.

3.3.2 Biossíntese de PHA a partir de óleos vegetais

Quando óleos vegetais são supridos como fonte de carbono para a produção de PHA, os triacilgliceróis são inicialmente hidrolisados em ácidos graxos e glicerol pela ação de uma lipase. O glicerol é convertido a gliceraldeido-3-fosfato sendo então utilizado em vias do metabolismo central da célula bacteriana (DIRUSSO *et al.*, 1999). Muitas bactérias podem crescer em ácido graxos de cadeia longa, que são oxidados a acetil-CoA por uma via denominada β -oxidação (WHITE, 2000).

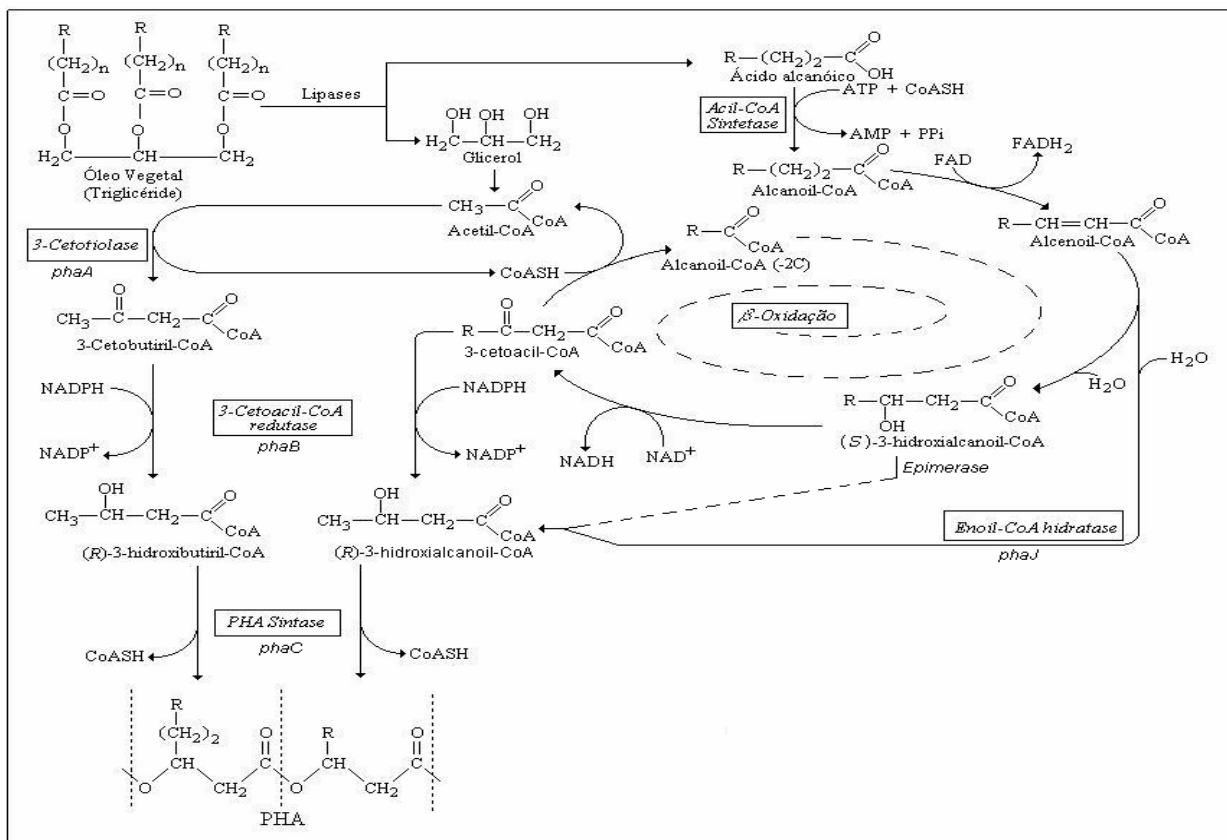


Figura 3.3. Biossíntese de PHA a partir de ácidos carboxílicos (Modificado a partir de GOMEZ, 2000).

A Figura 3.3 apresenta a biossíntese de PHA a partir de óleos vegetais. Após sua ativação a alcanoil-CoA por uma acil-CoA sintetase, o ácido graxo é oxidado em uma série de quatro reações que envolvem a formação dos intermediários: alcenoil-CoA, (*S*)-hidroxi-alcenoil-CoA, 3-ceto-alcenoil-CoA e finalmente um novo alcanoil-CoA contendo dois carbonos a menos que o original, com a liberação simultânea de um acetil-CoA (DIRUSSO *et al.*, 1999). Diversas rotas metabólicas têm sido propostas para o direcionamento desses intermediários da β -oxidação para a biossíntese de PHA. A ação de uma epimerase convertendo o intermediário (*S*)-hidroxi-alcenoil-CoA a (*R*)-hidroxi-alcenoil-CoA foi proposta por Kraak *et al.* (1997) com base no fato que tanto (*R*) como (*S*)-hidroxi-octanoil-CoA eram utilizados por grânulos de *Pseudomonas putida*, embora apenas monômeros na configuração (*R*) estavam presentes no polímero sintetizado. A capacidade de uma 3-cetoacil redutase converter 3-ceto-alcenoil-CoA a 3-hidroxi-alcenoil-CoA foi demonstrada em diferentes trabalhos (DENNIS *et al.*, 1998; TAGUCHI *et al.*, 1999; REN *et al.*, 2000). A capacidade de uma enoil-CoA hidratase fazer a conversão do intermediário 3-alcenoil-CoA para (*R*)-3-hidroxi-alcenoil-CoA foi demonstrada a partir dos estudos com *Aeromonas caviae* (FUKUI e DOI, 1997) e linhagens recombinantes de *Escherichia coli*

(FUKUI *et al.*, 1999). Além dessas rotas metabólicas que conduzem ao direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para a biossíntese de PHA, outra possibilidade envolve a condensação dos acetil-CoA por uma β -cetotiolase, levando a formação de 3-cetobutiril-CoA, que é posteriormente reduzido a (*R*)-hidroxibutiril-CoA. Essa última rota metabólica é a mesma que aquela encontrada em *R. eutropha* e que permite a síntese de P3HB a partir de carboidratos (STEINBÜCHEL, 1991).

Desta forma, óleos vegetais representam uma fonte de carbono interessante para a produção de PHA pois o seu metabolismo permite a síntese tanto de 3HB como 3HA_{MCL}. Ou seja, uma bactéria capaz de direcionar eficientemente esses intermediários para biossíntese de PHA e que apresente uma PHA sintase com especificidade por esses monômeros seria capaz de produzir P3HB-co-3HA_{MCL}.

Recentemente, foram avaliadas linhagens bacterianas isoladas de solos de canavial e de Mata Atlântica, bem como obtidas em coleções de culturas quanto à produção de PHA a partir de óleos vegetais (MATSUDA *et al.*, 2007). Todas as bactérias foram analisadas para a produção de lipases como critério para selecionar bactérias capazes de utilizar óleos vegetais como fonte de carbono. As linhagens de *R. eutropha*, *P. oleovorans* e *B. cepacia* avaliadas apresentaram capacidade de produzir lipases. As maiores eficiências de conversão do óleo de soja em PHA foram observadas para linhagens de *R. eutropha* com valores de $Y_{P/S}$ entre 0,33 e 0,45 g/g. Dentre os isolados de solo de canavial, 53 produziram lipases, 16 apresentaram eficiência na conversão do óleo de soja em 3HB semelhantes aos valores observados com *R. eutropha*. Para algumas das linhagens analisadas observou-se a produção de PHA contendo P3HB como principal constituinte e 3HA_{MCL} correspondendo a uma pequena fração do polímero produzido (<1 mol%). As linhagens bacterianas isoladas de solo de Mata Atlântica, embora tenham apresentado um número expressivo de produtoras de lipases e tenham demonstrado bom crescimento em óleo de soja, não apresentaram boa eficiência na produção de P3HB, sendo que em apenas três linhagens foram detectadas pequenas quantidades desse polímero (<5% da massa seca celular).

3.4 O gênero *Aeromonas*

Aeromonas são bactérias Gram negativas, não esporulantes, móveis, com um flagelo polar, são bastonetes, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. São oxidase e catalase

positivas, reduzem nitrato a nitrito e fermentam glicose, e realizam a fermentação butanodiol onde a quantidade de ácidos formados é pequena, predominando como produtos finais compostos neutros como o etanol, acetoína e butanodiol, são comumente encontrados em água doce, sistemas de distribuição de água potável, mesmo clorada, solos, verduras, leite e derivados de alimentos a base de peixe. Ocasionalmente são isolados de répteis, anfíbios, peixes e alguns pássaros. As espécies *A. hydrophila* e *A. salmonicida* são importantes agentes patogênicos para peixes, possuem habilidade de crescer bem e produzir exotoxinas em temperatura de refrigeração. A doença humana geralmente é adquirida através do consumo de água e alimentos contaminados, apesar que o desafio oral de 57 voluntários com 5 linhagens de *A. hydrophila* produtoras de fatores de virulência levou a apenas quadros diarréicos leve/moderado em dois participantes que receberam doses elevadas de bactérias (10^7 e 10^9) (GRAEVENITZ, 2007).

O gênero *Aeromonas* teve a sua nomenclatura e taxonomia revisada por diversas vezes. Inicialmente, foi classificada como pertencente à família *Vibrionaceae* que estão incluídas o gênero *Vibrio*, *Photobacterium* e *Plesiomonas*, mas estudos indicaram que o gênero *Aeromonas* não possuía características similares com os vibrios, então foram transferidas para uma nova família denominada *Aeromonadaceae*. Apenas 5 espécies de *Aeromonas* foram reconhecidas a 15 anos atrás, três das quais (*A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*) existem fenoespécies, ou seja, o espécies denominadas que possuem múltiplos grupos de DNA, os membros dos quais não podem ser diferenciados um dos outros apenas pelas características bioquímicas (ABBOTT *et al.*, 2003)

Atualmente, bactérias do gênero *Aeromonas* são classificadas como pertencentes ao Filo Proteobactéria, Classe Gamaproteobactéria, Ordem Aeromonadales, Família Aeromonadaceae onde também estão classificadas bactérias do Gênero *Tolumonas* (BOONE *et al.*, 2001)

3.5 Produção de P3HB-co-3HHx pelo Gênero *Aeromonas*

A avaliação de várias bactérias isoladas a partir de amostras de solo ou lodo de esgoto com relação à capacidade de produção de PHA a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos revelou um isolado identificado como *Aeromonas caviae* capaz de produzir P3HB-co-3HHx contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx (SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993;

SHIMAMURA *et al.*, 1994; KOBAYASHI *et al.*, 1994; DOI *et al.*, 1995). A linhagem bacteriana *Aeromonas caviae* FA-440 é uma bactéria Gram-negativa, com forma de bastão e anaeróbia facultativa, que produz oxidase, catalase e lipase. Ela cresce em glicose e sacarose, mas não acumula poliésteres dentro das células a partir dessas fontes de carbono. Já em ácido oléico ou óleo vegetal, ela cresce e acumula poliésteres dentro das células (DOI *et al.*, 1995). A capacidade de produzir um PHA de composição similar também foi demonstrada para um isolado de *Aeromonas hydrophila* (LEE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001). Entretanto, nenhum estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de produção de PHA pelo gênero *Aeromonas*.

Genes de biossíntese de PHA em *Aeromonas* estão organizados em um operon constituído pelo gene *phaC* (PHA sintase) flanqueado por *phaJ* (enoil-CoA hidratase) e *phaP* (PHAsina) (FUKUI e DOI, 1997). Não foram detectados genes *phaA* (β -cetotiolase) ou *phaB* (3-cetoacil-CoA redutase) próximos ao gene *phaC* como é encontrado 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 do ciclo de β -oxidação contendo 4 e 6 carbonos para a biossíntese de PHA (Figura 3.4). A especificidade da PHA sintase presente em *Aeromonas* também deve ser fator importante para determinar a composição do PHA.

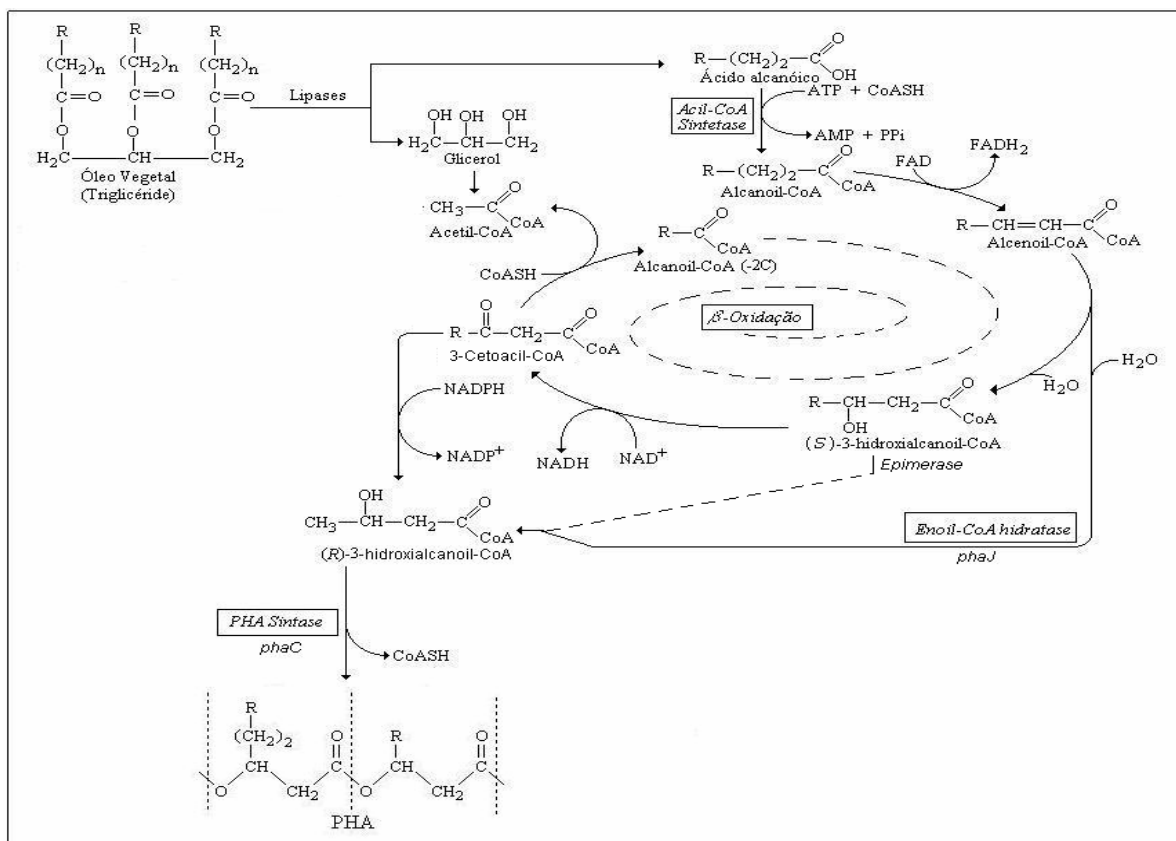


Figura 3.4. Biossíntese de PHA a partir de ácidos carboxílicos pelo gênero *Aeromonas* (Modificado a partir de GOMEZ, 2000).

3.5.1 Produção de PHA em linhagens recombinantes abrigando genes da PHA sintase de *Aeromonas*

A produção de PHA em linhagens recombinantes desperta um interesse especial, pois é possível controlar a composição do polímero de diferentes formas. Em princípio, a composição do PHA é determinada pela especificidade da PHA sintase bem como pela capacidade da linhagem hospedeira em suprir os diferentes monômeros. Dessa forma, a expressão de uma determinada PHA sintase em uma linhagem hospedeira pode revelar uma especificidade por monômeros não detectada na linhagem natural. Isto ocorre pois esta linhagem hospedeira pode apresentar vias metabólicas que conduzem a um suprimento mais efetivo de um determinado monômero. Além disso, as linhagens recombinantes podem ser construídas abrigando genes que codificam enzimas envolvidas no suprimento de intermediários do metabolismo para biossíntese de PHA. Dependendo da especificidade

dessas enzimas por intermediários do metabolismo, diferentes monômeros podem ser supridos e em quantidades variáveis, permitindo sintetizar PHA de diferentes composições e de forma controlada.

Claramente, a PHA sintase de *Aeromonas* spp. apresenta especificidade para monômeros 3HB, 3HV e 3HHx. A confirmação de uma maior especificidade da PHA sintase por monômeros 3HHx vem de trabalhos nos quais o gene da PHA sintase de *A. caviae* ou outras *Aeromonas* foi expresso em outras linhagens hospedeiras.

Fukui e Doi (1997) clonaram e sequenciaram um fragmento de DNA contendo genes responsáveis pela biossíntese de PHA em *A. caviae*. O gene *phaC* encontra-se flanqueado por duas ORFs. A ORF imediatamente após o gene *phaC* apresentou similaridade com o domínio enoil-CoA hidratase da proteína multifuncional de β -oxidação de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, avaliação de atividade enzimática em clones de *E. coli* abrigando a ORF3 em plasmídeo confirmou uma atividade enoil-CoA hidratase codificada por essa ORF. *R. eutropha* PHB-04 abrigando esses genes produziu P3HB-co-3HHx a partir de ácidos hexanóico ou octanóico contendo entre 4 e 67 mol% de 3HHx (FUKUI e DOI, 1997; KICHISE *et al.*, 1999). A partir dos ácidos heptanóico e nonanóico foram produzidos terpolímeros P3HB-co-3HV-co-3HHp (KICHISE *et al.*, 1999). Deve-se destacar que a capacidade da PHA sintase de *A. caviae* incorporar monômeros 3HHp foi revelada apenas nessa linhagem recombinante e não havia sido detectada na linhagem selvagem (DOI *et al.*, 1995). A expressão desses genes em *P. putida* GPP104 também levou a produção de P3HB-co-3HHx, com 3HHx variando entre 29 e 40 mol%. A partir de óleos vegetais, *R. eutropha* PHB-04 abrigando apenas o gene *phaC_{Ac}* produziu P3HB-co-3HHx contendo 4-5 mol% de 3HHx, enquanto a linhagem selvagem (*R. eutropha* H16) produziu apenas o homopolímeros P3HB (FUKUI e DOI, 1999).

Em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando genes de biossíntese de PHA de *A. caviae* também foi possível sintetizar P3HB-co-3HHx, entretanto, a biossíntese desses copoliésteres só foi obtida com a co-expressão dos genes *phaC_{Ac}* (PHA sintase) e *phaJ* (enoil-CoA hidratase *R*-específica) (FUKUI *et al.*, 1999).

Fukui *et al.* (2001) identificaram o produto da ORF antecedendo o gene *phaC* como sendo uma proteína associada ao grânulo de PHA, que foi identificado como PhaP, ou seja, constituiria uma PHAsina. Recentemente, a PHAsina também foi apontada como sendo responsável por alterar a composição do PHA produzido (FUKUI *et al.*, 2001; TIAN *et al.*, 2005).

Qin *et al.*, (2007) estudaram a síntese de P3HB-*co*-3HHx e clonaram um fragmento de DNA contendo genes relacionados à biossíntese de PHA em *Aeromonas hydrophila* 4AK4. Neste fragmento de DNA, foram detectados os genes *phaP*, *phaC* e *phaJ* que codificam, respectivamente, para PHAsina, PHA sintase e enoil- CoA hidratase (*R*)-específica. Ou seja, a organização de genes de biossíntese de PHA em *A. hydrophila* apresenta uma estrutura muito semelhante àquela encontrada em *A. caviae*.

Aeromonas hydrophila possuem a PHA sintase do tipo I (PhaC) que produz apenas P3HB-*co*-3HHx a partir de ácido láurico. PHA_{MCL} são produzidos a partir de ácido láurico ou glicose apenas quando a PhaC da *A. hydrophila* é inativada, indicando a existência de outra PHA sintase na linhagem selvagem (HU e YOU, 2007).

A partir dos trabalhos iniciais sobre a produção de PHA em *Aeromonas* e a posterior clonagem de genes envolvidos nesse processo (FUKUI *et al.*, 1999; HU e YOU, 2007; LU *et al.*, 2004b; LU *et al.*, 2005), foram realizados diversos trabalhos com a construção de linhagens recombinantes abrigando genes de biossíntese de PHA em *Aeromonas* quando expressos em *Aeromonas* (FUKUI *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2004; QIU *et al.*, 2004; QIU *et al.*, 2006), *R. eutropha* (KICHISE *et al.*, 1999; AMARA *et al.*, 2002), *E. coli* (FUKUI *et al.*, 1999; TAGUCHI *et al.*, 1999; TSUGE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2001a; PARK *et al.*, 2001b; LU *et al.*, 2003) e *Arabidopsis thaliana* (ARAI *et al.*, 2002; MATSUMOTO *et al.*, 2005). Além disso, foram realizados trabalhos de evolução dirigida dos genes da PHA sintase (KICHISE *et al.*, 2002; TSUGE *et al.*, 2004; TSUGE *et al.*, 2007a; TSUGE *et al.*, 2007b) ou da enoil-CoA hidratase (*R*)-específica (TSUGE *et al.*, 2003). Em alguns casos, foi possível sintetizar PHA contendo HA_{SCL} e HA_{MCL} a partir de carboidratos (FUKUI *et al.*, 2002; NOMURA *et al.*, 2004; QIU *et al.*, 2005).

A evolução dirigida da PHA sintase de *Aeromonas* têm se mostrado uma estratégia interessante para alterar sua especificidade por monômeros 3HHx, capacidade de acúmulo de PHA e a massa molar do polímero sintetizado e tem sido explorada em diferentes trabalhos (KICHISE *et al.*, 2002; AMARA *et al.*, 2002; TSUGE *et al.*, 2004; TSUGE *et al.*, 2007a; TSUGE *et al.*, 2007b).

Recentemente, foi descrito que o terpoliéster P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx foi sintetizado pela linhagem recombinante *Escherichia coli* abrigando os genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* spp. ou por linhagem recombinante de *Aeromonas hydrophila* 4AKA abrigando os genes *phaAB* (LU *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2001, QIU *et al.*, 2004; ZHAO e CHEN, 2007). *A. hydrophila* 4AKA e sua linhagem recombinante foram capazes

de produzir o copolímero P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx quando ácido láurico e ácido propiônico ou ácido undecanoico foram usados como fonte de carbono (LU *et al.*, 2004; ZHAO e CHEN, 2007). Zhang *et al.*, 2009 demonstrou ser possível ajustar as propriedades do terpoliéster P3HB-*co*-3HV-*co*-3HHx modificando a concentração de ácido láurico e/ou valerato.

Enzima quimérica é a fusão de duas ou mais enzimas que exibem as características das enzimas parentais juntas, a construção da linhagem recombinante de *E.coli* abrigando uma enzima quimérica composta pelas PHA sintases da *Ralstonia eutropha* (PhaC_{RE}) e da *Aeromonas caviae* (PhaC_{AC}) demonstrou ser um estratégia interessante para o acúmulo de PHA, a linhagem recombinante acumulou o copolímero P3HB-*co*-3HHx com 98% da HB e 2% de HHx (MATSUMOTO *et al.*, 2009)

Além da especificidade da PHA sintase, outro fator importante para o controle da composição do PHA sendo sintetizado são enzimas que promovem o suprimento de monômeros para a PHA sintase. Deve-se destacar que mesmo as enzimas supridoras de monômeros apresentam especificidade variável pelos diferentes substratos e, dessa forma, podem aumentar ou diminuir a quantidade de determinados monômeros disponibilizados para a PHA sintase.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Neste estudo, foram utilizadas linhagens bacterianas isoladas a partir de amostras de lodo ativado provenientes de uma estação de tratamento de esgotos industriais e uma estação de tratamento de esgotos domésticos. As linhagens bacterianas foram cultivadas em estufa ou agitador rotativo (150 rpm) a 30 °C.

4.2 Meios de Cultura

As diferentes linhagens bacterianas foram cultivadas em meios de cultura descritos a seguir:

4.2.1 Caldo Nutriente (CN) ou Agar Nutriente (AN)

Denominado caldo nutriente quando líquido e agar nutriente quando sólido:

Peptona	5g/L
Extrato de carne	3g/L
Agar (para meio sólido)	15 – 20g/L
Água destilada	

4.2.2 Meio Mineral (MM) (RAMSAY *et al.*, 1990)

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0g/L
Na ₂ HPO ₄	3,5g/L
KH ₂ PO ₄	1,5g/L
Solução de elementos traços	1,0mL/L
Citrato férrico amoniacal 6% (m/v)	1,0mL/L
MgSO ₄ .7H ₂ O 20% (m/v)	1,0mL/L
CaCl ₂ .2H ₂ O 1% (m/v)	1,0mL/L
Agar (para meio sólido)	15 – 20g/L
Água destilada	

O tipo de fonte de carbono e sua concentração são descritas em cada experimento.

* Solução de elementos traços:

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

4.2.3 Agar Rodamina (MAR)

Peptona	5g/L
Extrato de carne	3g/L
Agar (para meio sólido)	15 – 20g/L
NaCl	4g/L
Óleo de soja	2,5%
Rodamina B	0,001%
Água destilada	

4.2.4 GSP Agar (Glutamate Starch Phenol Red Agar)

Glutamato de sódio	10,0 g/L
Amido solúvel	20,0 g/L
KH ₂ PO ₄	2,0 g/L
MgSO ₄	0,5 g/L
Vermelho de fenol	0,36 g/L
Agar-agar	12,0 g/L
Penicilina G	100.000 IU/L
Água destilada	

4.2.5 Luria Bertani (LB)

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

4.3 Esterilização

Soluções e meios de cultura em geral foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. O óleo de soja foi esterilizado em forno a 180 °C por 1 hora e adicionado asépticamente aos meios de cultura.

4.4 Isolamento de bactérias

Amostras de lodo ativado foram coletadas da Estação de Tratamento de Esgoto de Suzano e do Parque Novo Mundo, a primeira situa-se no município de Suzano, localizado 30 km à leste da capital do Estado de São Paulo. A estação foi projetada para uma população de 670.000 habitantes e hoje atende aproximadamente 470.000, divididos entre os municípios de Suzano, Mogi das Cruzes, Poá, Itaquaquecetuba e Ferraz de Vasconcelos. Aproximadamente 10% do esgoto recebido na E.T.E. é oriundo de fontes não-domésticas, o qual contribui com 75% da carga orgânica recebida, medida em DQO e foi identificada neste trabalho como “Esgoto industrial”, enquanto a Estação de Tratamento de Esgoto do Parque Novo Mundo esta localizada no município de São Paulo, na margem direita do rio Tietê, cerca de 300 m a jusante da foz do rio Cabuçu de Cima, junto à Avenida de interligação Marginal Tietê – Fernão Dias, esse sistema atende parte das zonas Leste e Norte do município de São Paulo e foi projetado para atender parte do município de Guarulhos, neste trabalho foi identificada como “Esgoto doméstico” (SABESP, 2008). As linhagens bacterianas foram isoladas após o enriquecimento do lodo ativado por 18-24 horas em água peptonada (VILLARRUEL-LÓPES *et al.*, 2005) ou após cultivos sucessivos em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono. O isolamento foi realizado em meio sólido (GSP agar ou agar nutriente). Cada uma das colônias isoladas foi estriada no meio de cultura GSP Agar (MERCK) e cultivada a 30°C por 2-5 dias, para verificar se apresentavam o fenótipo característico do gênero *Aeromonas*. Todos os isolados apresentando o fenótipo característico do gênero *Aeromonas* receberam numeração seqüencial TSM-XXX e foram preservados em solução de glicerol 10% em freezer -80 °C.

4.5 Avaliação da capacidade de produção de lipases e PHA (teste qualitativo)

A produção de lipases foi avaliada pelo método descrito por KOUKER e JAEGER (1987) modificado. Cada uma das linhagens foi semeada em Meio Agar Rodamina e a produção de lipases foi avaliada a cada 24 horas por 3 dias de cultivo (30 °C) pela medida de fluorescência quando expostas a radiação ultravioleta (360 nm).

Para detectar bactérias produtoras de PHA, os isolados foram cultivados em meio mineral sólido, com menor concentração de sulfato de amônio (0,06 g/L (NH₄)₂SO₄) para favorecer o acúmulo destes materiais (GOMEZ *et al.*, 1996), adicionados do corante Nile Red que permite a identificação de clones com grânulos de PHA no seu interior (SPIEKERMANN *et al.*, 1999). Duas fontes de carbono foram utilizadas para avaliar o acúmulo de PHA: um carboidrato (glicose 5 g/L) e um ácido graxo (ácido octanóico 3 g/L).

4.6 Avaliação da produção de PHA em frascos agitados (teste quantitativo).

A produção de PHA a partir de óleo de soja ou glicose foi realizada em cultivos em agitador rotativo. Células das diferentes linhagens foram estriadas em AN e cultivadas por 72 horas a 30 °C. Colônias isoladas desse cultivo foram inoculadas em Caldo Nutriente e cultivadas por 24 horas (30 °C – 150 rpm). A cultura em Caldo Nutriente foi utilizada para inocular meio mineral contendo óleo de soja (1% v/v – aproximadamente 9 g/L), glicose (10 g/L) ou ácido láurico (5 g/L) como únicas fontes de carbono e quantidade limitada da fonte de nitrogênio (sulfato de amônio 1 g/L), de forma a oferecer condições propícias ao acúmulo de PHA. Após 72 horas de cultivo em meio mineral, foram determinados pH, massa seca celular (MSC) e teor e composição do PHA acumulado.

4.7 Obtenção de linhagens recombinantes

Alguns isolados que apresentaram bom crescimento utilizando óleo de soja como única fonte de carbono, mas que não foram capazes de produzir PHA, foram selecionados

para receber genes de biossíntese de P3HB de *Ralstonia eutropha*. O operon *phaCAB* encontra-se clonado no vetor de amplo espectro de hospedeiros pBBR1MCS-2 (KOVACH *et al.*, 1995), constituindo o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* (GOMES *et al.*, 2007). *E. coli* S17-1 (SIMON *et al.*, 1983) abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* foi utilizada para transferência deste por conjugação. Inicialmente, os isolados foram avaliados com relação à sua resistência a canamicina em meio mineral contendo glicose (1 g/L) como única fonte de carbono. Foram testadas as concentrações de 10, 50, 100, 200, 250 e 300 µg/mL de canamicina. Para a conjugação, a linhagem *E. coli* S17-1 pBBR1MCS-2::*phaCAB* foi cultivada em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina por 16-24 horas a 37 °C. As linhagens receptoras foram cultivadas em meio LB por 24 horas a 30 °C. Um mililitro das culturas doadora ou receptora foram centrifugados, lavados e ressuspensos com 100 µL de solução salina (NaCl 0,85%). As suspensões de células doadoras e receptoras foram reunidas e espalhadas na superfície de meio mineral contendo glicose (1 g/L) e canamicina (concentração ajustada para cada linhagem de forma a permitir diferenciar aquelas que receberam o plasmídeo). Colônias crescidas no meio contendo canamicina foram estriadas novamente nesse meio de cultura para confirmar que se tratavam de linhagens recombinantes.

4.8 Métodos Analíticos

4.8.1 pH

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Tecnal TEC-2) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0 (Synth).

4.8.2 Massa Seca Celular

Dez mililitros da suspensão celular foram centrifugados (10600 *xg*, 10 minutos, 10 °C), suspendidos em solução de tween 0,1% (m/v), novamente centrifugadas (10600 *xg*,

10 minutos, 10 °C) e filtrados com o uso de membranas de poro 0,45µm (Millipore). As membranas junto com as células foram secas por 4 horas a 100 °C. Após ser retirado da estufa, este conjunto permaneceu 20 minutos no dessecador e, após este período, foi determinada a massa seca celular através da seguinte equação:

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

Onde:

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

MM = massa da membrana (g)

UM = umidade média do lote de membrana (g)

VOL = volume de suspensão centrifugada (mL)

4.8.3 Quantidade e Composição de PHA

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RISS e MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, e as amostras agitadas e submetidas a propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação após os primeiros 30 minutos de propanólise. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

Gás de arraste: Hélio (0,8mL/ min)

Temperatura do injetor: 250 °C.

Temperatura do detector: 300 °C.

Sistema de detecção: ionização de chama (FID).

Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 200 °C a 8 °C/min e 185 °C por 15 minutos.

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e caracterização de *Aeromonas* de amostra de lodo de esgoto industrial

Para o isolamento de bactérias, amostras de lodo de uma estação de tratamento de esgoto industrial foram submetidas a diluições decimais seriadas e foram inoculadas em GSP Agar, um meio seletivo e diferencial para *Aeromonas* e *Pseudomonas*, no qual as primeiras formam colônias amarelas e as últimas formam colônias rosas. Após 72 horas de cultivo, colônias isoladas amarelas foram novamente avaliadas em GSP Agar para confirmar que apresentavam o fenótipo característico de *Aeromonas*. Muitos isolados foram obtidos a partir das diluições, 28 dos quais apresentaram colônias amarelas no meio de cultura GSP Agar. Experimentos em frascos agitados de produção de PHA em meio mineral utilizando óleo de soja como única fonte de carbono foram realizados (Tabela 5.1). Nesses experimentos, foram determinados ao final do cultivo (72 horas) massa seca celular, pH, teor e composição do PHA produzido.

Nove isolados apresentaram concentrações de células muito baixas (menor que 0,5 g/L) em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono, indicando que essas bactérias não apresentam capacidade de utilizar eficientemente óleos como única fonte de carbono. Também não foi observada a produção de qualquer PHA por esses isolados. Em muitos casos, a incapacidade de crescer em óleos vegetais está associada à não produção de lipases (SOLAIMAN *et al.*, 2001), ou seja, enzimas responsáveis pela hidrólise de triglicérides levando à formação de ácidos graxos e glicerol.

Para onze isolados, embora tenham apresentado concentrações celulares mais expressivas (maior que 0,5 g/L), não se detectou a produção de qualquer PHA. Dois destes isolados (TSM 10 e TSM 15), que apresentaram massa seca celular superior a 2 g/L, mas que não foram capazes de produzir PHA, foram testados na construção de linhagens recombinantes abrigando genes de biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha* com objetivo de avaliar o seu potencial para produção de PHA a partir de óleos vegetais (Ver item 5.8 a seguir).

Em dois isolados (TSM14 e TSM24) foi detectada a produção de PHA contendo apenas 3HB como constituinte, entretanto o teor de P3HB acumulado foi bastante pequeno (<2% da massa seca celular).

Seis isolados (TSM18, TSM19, TSM20, TSM21, TSM26 e TSM32) apresentaram a capacidade de produzir PHA contendo 3HB e 3HHx. O teor de PHA acumulado variou entre 1,26 e 6,18% da massa seca celular. A fração molar de 3HHx no polímero variou entre 11,87 e 17,11 mol%.

Kobayashi *et al.* (1994) isolaram bactérias capazes de utilizar óleos vegetais para produção de PHA. Dois isolados, posteriormente identificados como *Aeromonas caviae*, produziram um PHA contendo 3HB e 3HHx, sendo que a fração molar de 3HHx variou entre 9 e 16%,

No trabalho de Doi *et al.* (1995), foram feitos testes de produção de PHA com a linhagem bacteriana *Aeromonas caviae* a partir de diferentes fontes de carbono. Quando óleo de soja foi fornecido como única fonte de carbono, o copolímero acumulado atingiu valores de 87% de 3HB e 13% de 3HHx com cerca de 12% da massa seca celular de PHA. Neste trabalho, a linhagem isolada TSM 19 atingiu valores semelhantes com 86,99% de 3HB e 13,01% de 3HHx.

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%. A partir de ácido oléico, o teor de PHA atingiu 21% e fração molar de 3HHx 20,4 mol%. Os maiores teores de PHA acumulado foram obtidos em cultivos sob limitação de fosfato.

Desta forma, as linhagens isoladas até o momento são promissoras para a produção de copolímeros P3HB-*co*-3HHx. No próximo item, serão descritos experimentos de produção de PHA utilizando ácido láurico como fonte de carbono. O objetivo desses experimentos foi avaliar se um número maior dos isolados seria capaz de produzir PHA devido a deficiência na utilização do óleo vegetal.

Tabela 5.1. Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto industrial.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	3HB (mol%)	3HHx (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDd (mol%)	PHA (%MSC)
TSM 02	0,06	6,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 05	0,02	6,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 07	1,14	6,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 08	1,48	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 09	2,52	6,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 10	2,87	6,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 11	0,24	7,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 12	0,91	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 13	0,28	6,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 14	1,00	6,92	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,35
TSM 15	2,26	5,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 16	0,75	6,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 17	0,23	6,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 18	2,28	6,60	82,89	17,11	0,00	0,00	0,00	3,02
TSM 19	0,94	6,72	86,99	13,01	0,00	0,00	0,00	6,18
TSM 20	1,52	6,67	83,11	16,89	0,00	0,00	0,00	4,08
TSM 21	0,86	6,76	82,90	17,10	0,00	0,00	0,00	3,25
TSM 22	0,69	6,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 23	0,59	6,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 24	0,65	6,64	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,81
TSM 25	0,22	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 26	0,65	6,79	83,51	16,49	0,00	0,00	0,00	2,10
TSM 27	0,22	6,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 28	0,22	6,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 29	0,22	6,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 30	0,57	6,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 31	0,68	6,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 32	0,93	6,89	88,13	11,87	0,00	0,00	0,00	1,26

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO –3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato %MSC percentual da massa seca celular.

5.2 Produção de PHA por isolados de lodo de esgoto industrial a partir de ácido láurico

Os isolados de lodo de esgoto industrial foram avaliados utilizando também o ácido láurico como única fonte de carbono, o objetivo desses experimentos foi verificar se a

ausência de produção de PHA na maioria dos isolados não foi decorrente da incapacidade na utilização de triglicérides como fonte de carbono, ou ainda se esses são utilizados com baixa eficiência. Os resultados desses experimentos estão apresentados na Tabela 5.2.

Dos nove isolados que anteriormente apresentaram pouco crescimento em óleo de soja, quatro foram capazes de atingir concentrações de massas secas celulares superiores a 0,5 g/L. Dois destes isolados não produziram qualquer PHA, em dois isolados foi detectado P3HB correspondendo a 0,23% (TSM28) e 6,76% (TSM25) da massa seca celular (Tabela 5.2). Os outros cinco isolados que anteriormente haviam apresentado pouco crescimento em óleo de soja, continuaram apresentando baixo crescimento em ácido láurico, entretanto, foi detectada uma pequena quantidade de 3HB para o isolado TSM27 (Tabela 5.2).

Dos onze isolados que apresentaram massas secas celulares maiores que 0,5 g/L, mas não haviam produzido qualquer PHA, três isolados não foram mais recuperados a partir do estoque em freezer, quatro ainda não se detectou a produção de qualquer PHA, mesmo utilizando o ácido láurico como fonte de carbono. Dois deste isolados detectou-se a produção de P3HB, embora em um deles a quantidade é muito pequena (0,08% da massa seca celular). Um dos isolados foi capaz de produzir um PHA contendo 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal constituinte e correspondendo a 5,85% da massa seca celular. Para outro isolado detectou-se a produção do copolímero P3HB-*co*-3HHx, correspondendo a 2,05% da massa seca celular e contendo uma fração molar de 3HHx de 8,68%.

Dos dois isolados que produziram P3HB em óleo de soja, um deles não se detectou qualquer polímero em ácido láurico (Tabela 5.2) e para o outro detectou-se a produção do copolímero P3HB-*co*-3HHx (TSM14). Considerando que o isolado TSM14 havia produzido uma quantidade muito pequena de PHA no cultivo em óleo de soja, é bem provável que já estivesse produzindo o copolímero a partir dessa fonte de carbono, entretanto, os monômeros 3HHx não foram encontrados devido a sua produção em quantidades abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Todos os isolados detectados como produtores do co-polímero P3HB-*co*-3HHx a partir de óleo de soja, também produziram esse PHA a partir de ácido láurico. Em todos os isolados, o teor de P3HB-*co*-3HHx acumulado a partir de ácido láurico foi superior àquele detectado em óleo de soja, atingindo até 22,29% da massa seca celular. Por outro lado, a fração molar de 3HHx reduziu para 6,99%-9,41% na maioria dos isolados. Apenas o isolado TSM26 continuou acumulando um P3HB-*co*-3HHx contendo cerca de 18 mol% de

3HHx, embora a massa seca celular atingida foi muito baixa que indica a produção de quantidade muito pequena de polímero (Tabela 5.2).

De forma geral, o que se observou, com o uso de ácido láurico, foi que um número maior de isolados produtores de PHA pode ser detectado, provavelmente devido a maior facilidade de utilização dessa fonte de carbono, sobretudo se for levado em conta ainda que a concentração de ácido láurico suprida foi quase a metade da de óleo de soja.

Tabela 5.2. Produção de PHA a partir de ácido láurico por linhagens isoladas de lodo de esgoto industrial.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 02	0,12	6,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 05	0,34	6,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 09	1,66	6,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 10	1,52	5,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 11	0,13	6,73	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 13	1,49	5,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 14	1,23	6,15	93,00	7,00	0,00	0,00	0,00	4,21
TSM 15	0,29	5,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 16	1,81	5,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 17	0,36	6,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 18	2,22	6,25	91,11	8,89	0,00	0,00	0,00	15,47
TSM 19	2,18	6,10	93,01	6,99	0,00	0,00	0,00	6,75
TSM 20	2,09	6,27	91,05	8,95	0,00	0,00	0,00	12,04
TSM 21	1,34	6,00	90,59	9,41	0,00	0,00	0,00	18,83
TSM 22	1,50	6,11	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
TSM 23	1,53	5,67	91,32	8,68	0,00	0,00	0,00	2,05
TSM 24	2,13	5,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 25	1,60	4,33	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,76
TSM 26	0,28	6,78	82,27	17,73	0,00	0,00	0,00	10,29
TSM 27	0,29	6,10	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,36
TSM 28	0,55	5,67	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23
TSM 29	0,80	6,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 30	1,95	5,89	0,00	0,00	15,43	71,87	12,70	5,85
TSM 31	2,01	3,94	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,58
TSM 32	2,33	5,34	91,89	8,11	0,00	0,00	0,00	22,29

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato %MSC percentual da massa seca celular.

5.3 Produção de PHA a partir de glicose por isolados de *Aeromonas*

Claramente a capacidade de produzir P3HB-*co*-3HHx por linhagens de *Aeromonas* está associada ao direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos contendo 6 carbono para a biossíntese de PHA, uma vez que esses polímeros são obtidos apenas em cultivos contendo ácidos graxos ou óleos vegetais. A partir de carboidratos, que são metabolizados a acetil-CoA, essas bactérias produzem apenas P3HB ou não produzem qualquer PHA (KOBAYASHI *et al.*, 1994). Lee *et al.* (2000) verificaram a produção de P3HB por *A. hydrophila* a partir de glicose apenas em cultivo sob limitação de fosfato.

A incapacidade de produzir PHA a partir de glicose sugere que essas bactérias não apresentam a capacidade de promover a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para gerar acetoacetil-CoA, que após sua redução para 3-hidroxiacetil-CoA, poderia ser utilizado como monômero na biossíntese de P3HB-*co*-3HHx. Assim, quando óleos vegetais ou mesmo ácidos graxos de cadeia de carbonos longas são utilizados, boa parte da fonte de carbono não pode ser utilizada para biossíntese de PHA, pois é convertida a acetil-CoA.

Foram feitos ensaios de produção de PHA em meio mineral contendo glicose (10 g/L) como única fonte de carbono com os oito isolados que foram capazes de produzir o copolímero P3HB-*co*-3HHx a partir de óleo de soja e/ou ácido láurico (Tabelas 5.1 e 5.2). Os resultados desses experimentos estão apresentados na Tabela 5.3. Foi observado que os valores de pH das culturas dessas linhagens em glicose diminuíram bastante quando comparadas ao experimento com óleo de soja ou ácido láurico. Esse resultado sugere que, como o gênero *Aeromonas* é classificada como anaeróbia facultativa, essas linhagens utilizam a glicose como fonte de carbono e liberem compostos que modificam o pH do meio. Nenhum dos isolados foi capaz de produzir P3HB a partir de glicose, sugerindo que não apresentam capacidade de sintetizar monômeros 3HB a partir de acetil-CoA. Estes resultados podem explicar a baixa capacidade de acúmulo de P3HB-*co*-3HHx a partir de óleos vegetais ou mesmo de ácido láurico conforme foi observado neste trabalho. Além disso, sugerem que a expressão dos genes *phaA* e *phaB* nesses isolados poderia permitir aumentar a produção de PHA a partir de óleos vegetais.

Tabela 5.3. Produção de PHA utilizando glicose (10 g/L) como única fonte de carbono.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
TSM 14	0,63	4,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 18	0,68	4,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 19	0,58	4,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 20	0,86	4,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 21	0,81	4,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 23	0,99	4,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 26	0,77	4,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 32	0,36	5,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato %MSC percentual da massa seca celular.

5.4 Isolamento e caracterização de bactérias a partir de amostra de lodo de esgoto doméstico

Para o isolamento de bactérias a partir de amostra de lodo de esgoto doméstico, foram realizados previamente enriquecimentos em água peptonada e cultivos sucessivos em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono. Os isolamentos, a partir desses cultivos de enriquecimento, foram realizados em agar nutriente e GSP agar. Um total de 813 isolados foi obtido. Estes isolados foram caracterizados em GSP agar para confirmar se apresentavam o fenótipo característico de *Aeromonas* (colônias amarelas). Foram obtidos 95 isolados apresentando colônias amarelas.

Os 95 isolados apresentando características do gênero *Aeromonas* foram avaliados com relação à capacidade de produção de lipases. Quarenta e sete isolados demonstraram capacidade de produzir lipases. Experimentos em frascos agitados de produção de PHA em meio mineral utilizando óleo de soja como única fonte de carbono também foram realizados com esses isolados (Tabela 5.4).

Com o objetivo de correlacionar a capacidade de produção de lipases e o crescimento em meio mineral contendo óleo de soja com única fonte de carbono, foi comparada a massa seca celular atingida pelos diferentes isolados caracterizados como produtores ou não de lipases (Figura 5.1). Um grande número de isolados caracterizados como produtores de lipases como daqueles caracterizados como não produtores

apresentaram baixo crescimento (<1 g/L) em meio mineral contendo óleo de soja como fonte de carbono, indicando que a produção de lipases não é o único fator importante para utilização de triglicérides. Resultados semelhantes a este já haviam sido observados anteriormente. Matsuda *et al.* (2007) verificaram que uma linhagem de *Pseudomonas oleovorans* embora fosse capaz de produzir lipases não era capaz de crescer eficientemente em óleo de soja.

O resultado mais surpreendente foi a observação que três isolados, para os quais não foi detectada a capacidade de produção de lipases, ainda assim apresentaram bom crescimento (>1 g/L) em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono. Para dois desses isolados não se observou a produção de qualquer PHA (TSM41 e TSM45), mas um deles (TSM49) foi capaz de acumular cerca de 20% da massa seca celular de PHA_{MCL} (Tabela 5.4). Estes resultados demonstram que a simples verificação de incapacidade de produção de lipases em meio de cultura contendo rodamina B não pode ser utilizada como critério para considerar o isolado incapaz de utilizar o óleo de soja como única fonte de carbono. É interessante notar na Figura 5.1, entretanto, que os isolados que apresentaram maior crescimento em óleo de soja como única fonte de carbono (cerca de 3 g/L ou acima deste valor) foi detectada a produção de lipases.

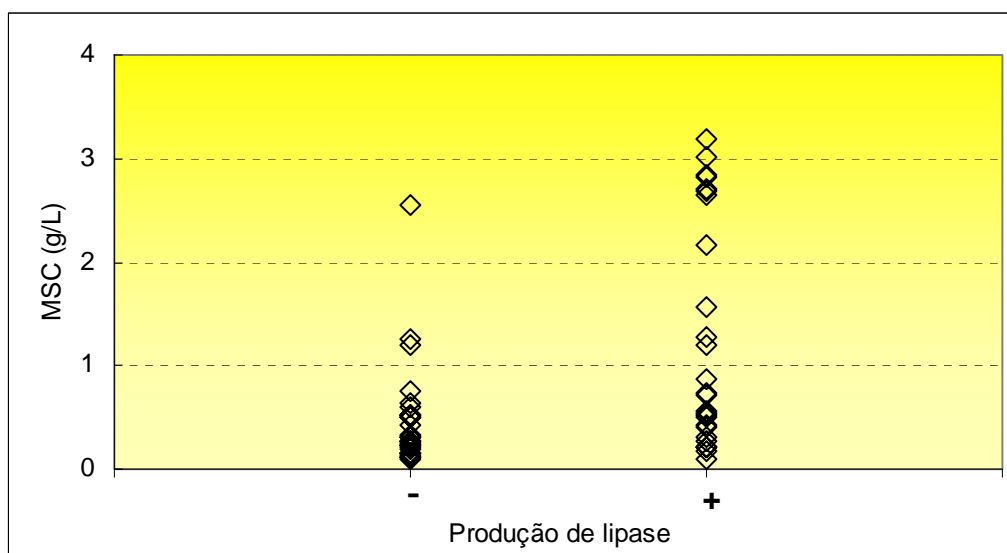


Figura 5.1. Correlação entre crescimento (massa seca celular – MSC) em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono e a produção (+) ou não (-) de lipases. Cada ponto representa um isolado avaliado.

A Tabela 5.4 apresenta os resultados dos cultivos em meio mineral contendo óleo de soja como única fonte de carbono. Nenhum dos isolados demonstrou capacidade de produção de P3HB-*co*-3HHx a partir de óleo de soja.

Não se detectou a produção de qualquer PHA para 74 dos isolados analisados, sendo que apenas 23 destes apresentou massas secas celulares superiores a 0,5 g/L e 7 superior a 1,0 g/L. Desta forma, boa parte dos isolados apresentou dificuldades de utilização do óleo de soja, seja para o crescimento, seja a produção de PHA.

Foram observadas 19 linhagens bacterianas produtoras de PHA_{MCL}, contendo em sua composição 3HD, 3HO, 3HHx e 3HDd. Para uma das linhagens produtoras desse polímero (TSM 49) foi detectada ainda a presença de pequena quantidade de 3HB (0,95 mol%) no polímero. O teor de PHA acumulado por estes isolados variou entre 11,69% e 40,07% da massa seca celular. Resultados de acúmulo semelhantes a estes foram obtidos por *P. putida* IPT 046 quando cultivada em diferentes óleos vegetais (SILVA-QUEIROZ *et al.*, 2009), indicando que estes isolados podem ser bastante promissores para produção desses elastômeros. Outros dois isolados provavelmente também produziram PHA_{MCL} embora em quantidades muito pequenas (<3% da massa seca celular). Nestes isolados foram detectados apenas os monômeros 3HD e/ou 3HDd.

Tabela 5.4. Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 33	3,18	4,15	0,00	3,85	32,90	52,00	11,25	18,98
TSM 35	1,57	6,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 36	0,71	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 37	0,54	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 38	0,51	7,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 39	0,51	7,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 40	0,63	7,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 41	1,19	6,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 42	0,51	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 43	0,53	7,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 44	0,53	7,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 45	1,25	6,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 46	0,73	6,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxiabutirato ; 3HHx – 3-hidroxi-hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi-octanoato 3HD – 3-hidroxi-decanoato 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular (continua)

Tabela 5.4. Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico (continuação).

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 47	0,20	6,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 48	0,53	6,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 49	2,55	4,36	0,95	4,83	38,77	43,00	12,44	22,72
TSM 50	2,68	4,39	0,00	4,71	38,40	43,79	13,10	19,57
TSM 52	0,30	7,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 53	0,30	6,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 54	0,21	6,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 55	2,70	4,59	0,00	4,57	32,85	53,84	8,74	27,86
TSM 56	2,83	5,86	0,00	4,99	33,07	42,90	19,04	30,23
TSM 57	0,26	7,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 58	0,15	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 59	0,24	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 60	2,17	5,76	0,00	4,79	33,79	52,19	9,23	23,99
TSM 62	0,16	7,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 63	0,22	7,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 64	0,12	7,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 65	0,10	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 66	0,13	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 67	0,59	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 68	0,21	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 69	0,24	7,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 70	0,31	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 71	0,17	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 72	0,57	6,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 73	0,12	7,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 74	0,27	7,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 75	0,28	7,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 76	0,09	7,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 77	0,33	7,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 78	1,19	6,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 79	0,40	7,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 80	2,64	5,17	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,61
TSM 81	0,43	6,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 82	0,75	6,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 83	0,86	6,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 85	0,28	7,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 86	0,26	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 87	0,20	7,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 88	3,02	4,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato ; 3HHx – 3-hidroxihexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular (continua)

Tabela 5.4. Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico (continuação).

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 89	2,84	4,61	0,00	0,00	0,00	37,05	62,95	2,49
TSM 90	0,42	6,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 91	0,19	7,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 92	0,41	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 93	0,39	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 94	2,61	5,66	0,00	5,52	40,51	45,43	8,54	23,65
TSM 95	2,06	5,99	0,00	3,03	22,21	66,58	8,19	21,92
TSM 96	2,28	5,66	0,00	1,83	14,73	66,33	17,10	40,07
TSM 97	1,55	5,80	0,00	2,45	19,37	70,47	7,71	29,88
TSM 98	0,37	5,22	0,00	3,01	22,02	65,03	9,95	19,33
TSM 100	2,46	5,99	0,00	2,45	17,70	71,43	8,42	17,25
TSM 101	2,52	5,75	0,00	1,86	14,86	70,68	12,61	37,30
TSM 102	2,94	5,62	0,00	2,03	16,52	72,54	8,91	36,39
TSM 103	2,37	5,72	0,00	2,11	17,33	71,72	7,34	36,63
TSM 104	0,33	7,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 105	0,21	7,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 106	1,01	6,72	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 107	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 108	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 109	0,22	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 110	0,21	7,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 111	0,21	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 112	0,19	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 113	0,38	7,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 114	0,74	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 115	0,16	7,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 116	0,16	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 117	0,79	6,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 118	0,19	6,99	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 119	0,19	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 120	0,38	6,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 122	1,72	6,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 123	0,16	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 124	0,24	7,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 125	0,27	7,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 126	0,19	7,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 127	0,21	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 128	0,17	7,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular (continua)

Tabela 5.4. Produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico (continuação).

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 129	0,18	7,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 130	3,06	6,01	0,00	Tr	19,52	71,74	7,73	28,41
TSM 131	4,12	6,06	0,00	Tr	18,56	72,43	8,12	33,84
TSM 132	2,78	5,93	0,00	Tr	27,06	72,94	0,00	13,32
TSM 133	2,37	5,96	0,00	Tr	35,23	56,08	8,69	31,55

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular. (conclusão)

5.5 Avaliação dos isolados de lodo de esgoto doméstico para a produção de PHA utilizando ácido láurico como única fonte de carbono

Assim como com os isolados de lodo de esgoto industrial, os isolados de lodo de esgoto doméstico também foram avaliados para a produção de polihidroxi alcenoatos a partir de ácido láurico (Tabela 5.5).

Quando ácido láurico foi suprido como única fonte de carbono, 32 isolados não foram capazes de produzir qualquer PHA.

Para 20 isolados foi detectada a produção de P3HB, embora apenas em 6 isolados o teor de P3HB acumulado foi superior a 15% da massa seca celular, um isolado (TSM57) acumulou P3HB representando quase 50% da massa seca celular. Em 9 isolados o teor de 3HB detectado foi menor que 1%, restando à dúvida se realmente esses monômeros encontram-se polimerizados.

Tabela 5.5. Produção de PHA a partir de ácido láurico por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico.

Linhagem	MSC (g/L)	Ph	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
TSM 33	1,94	4,79	0,00	0,00	19,00	68,12	12,88	10,79
TSM 36	1,99	4,73	0,00	0,00	18,53	69,06	12,41	4,84
TSM 44	1,83	6,24	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	11,80
TSM 45	2,08	5,83	0,00	2,19	22,61	56,77	18,43	16,88
TSM 49	1,95	4,75	0,00	2,19	24,01	59,57	14,24	19,78
TSM 50	1,74	4,76	0,00	2,53	24,23	57,91	15,33	16,12
TSM 52	2,69	4,70	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	30,69
TSM 53	2,22	6,37	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	19,07
TSM 55	1,84	5,65	0,00	2,01	22,32	60,85	14,81	27,53
TSM 56	2,31	4,23	0,00	2,24	25,04	53,85	17,35	29,42
TSM 57	3,03	6,18	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	49,33
TSM 58	2,12	5,04	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	42,95
TSM 59	1,52	5,28	100,00	Tr	0,00	0,00	0,00	35,33
TSM 60	0,53	6,71	0,00	3,38	31,32	49,59	15,72	2,51
TSM 62	0,63	7,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 63	0,07	6,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 64	0,87	6,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 65	1,45	6,07	0,00	1,90	40,66	38,83	18,60	11,33
TSM 66	0,40	7,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 67	0,28	6,97	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10
TSM 68	1,36	6,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 69	0,42	6,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 70	1,79	5,22	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,45
TSM 71	2,14	5,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 72	0,83	5,73	92,99	7,01	0,00	0,00	0,00	2,88
TSM73	1,36	6,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 74	1,64	6,05	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
TSM 75	0,73	7,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 76	0,51	6,93	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07
TSM 77	1,39	6,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 78	1,92	5,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 79	1,19	5,29	0,00	0,00	16,13	68,91	14,96	10,79
TSM 80	0,43	6,49	0,00	2,59	36,59	40,58	20,23	7,38
TSM 81	2,79	5,91	92,15	7,85	0,00	0,00	0,00	4,45
TSM 82	1,42	6,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 83	1,07	6,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 85	0,55	6,69	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,59
TSM 86	0,37	5,91	91,62	8,38	0,00	0,00	0,00	11,65
TSM 88	1,56	5,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 89	1,68	4,56	0,00	0,00	14,67	70,15	15,18	5,16
TSM 90	0,19	6,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 91	0,21	6,15	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,49
TSM 92	2,76	6,00	0,00	0,00	19,64	63,85	16,51	3,79
TSM 93	0,16	6,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 94	1,79	4,87	0,00	2,13	30,60	53,54	13,73	11,34
TSM 95	2,64	6,20	0,00	1,39	19,14	69,60	9,87	35,05
TSM 96	1,61	6,01	0,00	1,22	18,24	69,68	10,86	34,50

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular. (continua)

Tabela 5.5. Produção de PHA a partir de ácido láurico por linhagens isoladas de lodo de esgoto doméstico (continuação).

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD	
TSM 97	2,14	5,06	0,00	0,00	9,82	81,01	9,18	15,72
TSM 98	2,54	5,06	0,00	0,00	7,74	84,17	8,09	21,49
TSM 100	0,78	7,01	0,00	1,18	17,07	69,97	11,79	36,51
TSM 101	1,08	6,87	0,00	3,85	38,75	41,41	16,00	3,29
TSM 102	2,15	6,25	0,00	0,00	34,67	50,02	15,31	4,96
TSM 103	2,34	6,36	0,00	0,00	29,76	56,90	13,35	8,08
TSM 104	0,94	7,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 105	0,06	6,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 106	0,94	6,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 107	0,17	6,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 108	0,13	7,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 109	0,42	6,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 110	1,98	6,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 111	0,36	6,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 112	2,34	6,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 113	1,36	6,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 114	1,66	6,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 115	0,24	6,79	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41
TSM 116	2,64	6,48	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,16
TSM 117	0,98	5,81	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,06
TSM 118	1,65	5,77	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84
TSM 119	0,11	4,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 120	0,12	7,02	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
TSM 121	4,01	6,10	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,64
TSM 122	0,95	6,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 123	0,33	7,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 124	1,65	4,70	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,69
TSM 125	2,39	6,73	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43,64
TSM 126	0,77	7,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 127	2,25	5,93	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30
TSM 128	2,36	6,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 129	1,76	6,58	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,13
TSM 130	1,53	5,88	0,00	1,35	20,47	65,01	13,17	29,43
TSM 131	2,12	5,92	0,00	2,07	23,88	60,61	13,44	34,32
TSM 132	1,63	5,56	0,00	2,99	29,35	49,92	17,74	34,81
TSM 133	1,76	4,91	0,00	2,52	27,00	55,65	14,83	32,84

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato ; 3HHx – 3-hidroxihexanoato ; 3HO – 3-hidroxioctanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDD – 3-hidroxidodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular. (conclusão)

Além dos 21 isolados para os quais havia sido detectada a produção de PHA_{MCL} a partir de óleo de soja (Tabela 5.4), a produção desses PHA foi detectada para mais cinco isolados quando ácido láurico foi utilizado como fonte de carbono. Dois isolados (TSM80 e TSM89), nos quais havia se detectado apenas quantidades muito pequenas de

monômeros HA_{MCL} a partir de óleo de soja, a partir de ácido láurico o teor de $3HA_{MCL}$ detectados foi maior. Entretanto, nem sempre se detectou um aumento da produção de PHA_{MCL} com o uso de ácido láurico quando comparado ao uso de óleo de soja, devendo-se tomar em conta que a concentração de ácido láurico suprida foi quase metade da concentração de óleo de soja.

Com o uso de ácido láurico foram detectados ainda a produção de $P3HB-co-3HHx$, com a composição característica do polímero produzido por *Aeromonas*, ou seja, contendo uma importante parcela de monômeros $3HHx$ (neste caso, entre 7-8 mol%), por três isolados (TSM72, TSM81 e TSM86), correspondendo entre 2,88 e 11,65% da massa seca celular. Destaca-se que não se detectou a produção de qualquer PHA por esses isolados a partir de óleo de soja.

A partir de ácido láurico, observou-se a produção de quantidades expressivas (35% da massa seca celular) de um PHA de composição interessante. O PHA é constituído essencialmente de $3HB$, mas traços de $3HHx$ também foram detectados. Recentemente, foi demonstrada a produção de polímeros com essa característica por *Burkholderia sacchari*, seja a partir de misturas de glicose e ácido hexanóico (MENDONÇA *et al.*, 2009), seja a partir de ácido octanóico (LÍCIO *et al.*, 2009).

5.6 Produção de PHA por *Aeromonas*.

Os isolados analisados até aqui foram presuntivamente identificados como pertencentes ao gênero *Aeromonas* com base na coloração de colônias em meio de cultura GSP agar. Entretanto, não houve uma preocupação em quanto tempo era necessário para desenvolver a coloração amarela nas colônias.

A literatura descreve somente a produção do copolímero $P3HB-co-3HHx$ pelo gênero *Aeromonas*, entretanto, neste trabalho, foi detectada também a produção de $P3HB$ e PHA_{MCL} por alguns dos isolados. A questão que imediatamente surge é se esses isolados realmente pertencem ao gênero *Aeromonas*.

Inicialmente, foi investigada a produção de $P3HB-co-3HHx$ por três isolados que haviam acumulado PHA correspondendo a mais que 15% da massa seca celular. Foram realizados experimentos em triplicata de produção de PHA a partir de ácido láurico (Tabela 5.6 e Figura 5.2). Como se observa na Figura 5.2, os teores de PHA acumulados

são muito semelhantes nos três isolados analisados. Embora o valor médio de massa seca celular atingido pelo isolado TSM32 tenha sido superior, ainda assim esse valor não é significativamente diferente dos valores atingidos pelos outros dois isolados, considerando-se o desvio padrão. A concentração de PHA atingida pelos três isolados (aproximadamente 0,25 g/L) também não é significativamente diferente. A composição do polímero, por outro lado, mostrou diferenças significativas. Enquanto os isolados TSM18 e TSM21 atingem frações molares de 3HHx pouco superiores a 10 mol%, o isolado TSM32 atingiu valores próximos a 5 mol%. Estes resultados sugerem que é possível obter polímeros de diferentes composições dependendo do isolado bacteriano utilizado.

Tabela 5.6. Produção de P3HB-co-3HHx por isolados de lodo de esgoto.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
TSM 18	1,00	6,06	88,54	11,46	0,00	0,00	0,00	22,25
	1,29	5,55	90,24	9,76	0,00	0,00	0,00	22,11
	1,31	5,90	89,37	10,63	0,00	0,00	0,00	15,98
Média	1,20	5,84	89,38	10,62	0,00	0,00	0,00	20,11
+ DP	0,17	0,26	0,85	0,85	0,00	0,00	0,00	3,58
TSM 21	1,34	6,00	90,59	9,41	0,00	0,00	0,00	18,83
	0,78	5,99	88,33	11,67	0,00	0,00	0,00	17,08
	1,23	5,13	87,61	12,99	0,00	0,00	0,00	24,58
Média	1,12	5,71	88,84	11,36	0,00	0,00	0,00	20,16
+ DP	0,30	0,50	1,55	1,81	0,00	0,00	0,00	3,92
TSM 32	1,42	6,51	94,03	5,97	0,00	0,00	0,00	16,92
	1,65	6,14	95,53	4,47	0,00	0,00	0,00	18,61
	1,53	6,43	94,75	5,25	0,00	0,00	0,00	15,53
Média	1,53	6,36	94,77	5,23	0,00	0,00	0,00	17,02
+ DP	0,12	0,19	0,75	0,75	0,00	0,00	0,00	1,54

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato ; 3HHx – 3-hidroxihexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular DP – Desvio padrão.

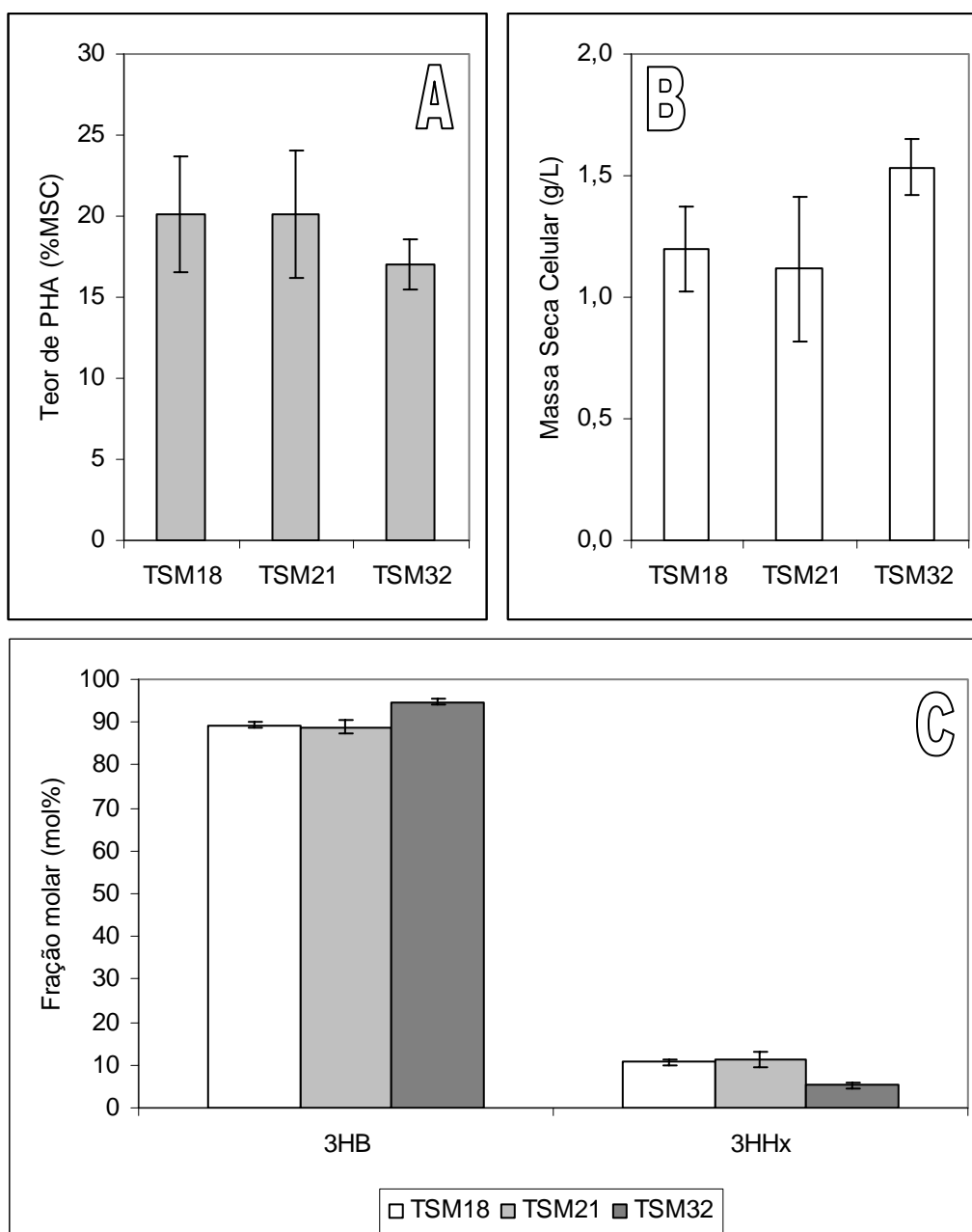


Figura 5.2. Produção de P3HB-co-3HHx por isolados de lodo de esgoto. **A.** Massa seca celular. **B.** Teor de PHA acumulado. **C.** Composição monomérica.

Ainda com o objetivo de caracterizar a produção de PHA pelo gênero *Aeromonas*, foi obtida junto a Faculdade de Saúde Pública da USP em vigilância sanitária, a linhagem *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Foi avaliada a produção de PHA por essa linhagem a partir de diferentes fontes de carbono com a finalidade de se verificar sua capacidade de produzir PHA (Tabela 5.7). Quando glicose foi fornecida como única fonte de carbono, nenhum PHA foi produzido, o que já era esperado. Já com óleo de soja e ácido láurico, *A. hydrophila* ATCC 7966 foi capaz atingir um crescimento muito pequeno (MSC < 0,3 g/L)

e de acumular apenas 3HB e em pequenas quantidades (<2,5% da massa seca celular). Esses resultados podem ser interpretados de duas formas: 1) Essa linhagem pode ser capaz de acumular o copolímero P3HB-*co*-3HHx, mas a fração de 3HHx foi muito pequena e não pode ser detectada ou 2) Essa linhagem é capaz de produzir apenas P3HB.

Recentemente, foram disponibilizados os genomas de duas espécies de *Aeromonas* (NCBI), um dos quais da linhagem ATCC 7966. Buscas neste genoma por genes semelhantes aos que codificam PHA sintase e análise dos genes adjacentes revelou que este isolado apresenta um organização de genes muito semelhante àquela encontrada em *A. caviae* (FUKUI e DOI., 1997) e *A. hydrophila* (QIN *et al.*, 2007), ou seja, o gene *phaC* (PHA sintase) encontra-se flanqueado pelo gene *phaP* (PHAsina) e *phaJ* (enoil-CoA hidratase). Assim, a primeira interpretação acima parece ser a mais plausível. Os resultados como um todo demonstram que, mesmo tendo a capacidade de produzir o co-polímero, este pode não ser detectado facilmente e somente aqueles isolados que apresentem uma capacidade melhor de metabolizar óleos vegetais ou ácidos graxos demonstram claramente a produção de P3HB-*co*-3HHx.

Tabela 5.7. Produção de PHA por *A. hydrophila* ATCC 7966 a partir de diferentes fontes de carbono.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
Glicose	0,27	6,51	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
O. soja	0,21	6,75	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12
A. láurico	0,22	6,71	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,13

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi butirato ; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular

O passo seguinte consistiu em confirmar a coloração das colônias de todos aqueles isolados produtores de algum PHA quando cultivadas em GSP agar (Figura 5.3).

Dos 12 isolados produtores do copolímero, 10 confirmaram a coloração amarela (bastante intensa) no meio de cultura GSP Agar característico do gênero *Aeromonas* (Figura 5.3.A). TSM59 foi um dos isolados que não apresentou colônia de coloração amarela. Esse isolado produziu um P3HB-*co*-3HHx contendo uma fração de 3HHx muito pequena (traços), se assemelhando muito mais a bactérias que produzem P3HB e conseguem inserir com muita dificuldade pequenas quantidades de monômeros HA_{MCL} ao

polímero. TSM86 foi o outro isolado que não apresentou colônia de coloração amarela, que, embora tenha produzido um PHA de composição muito semelhante àquele produzido por linhagens de *Aeromonas* e o teor de PHA seja bastante razoável (cerca de 12%), a massa seca celular atingida foi muito reduzida (0,37 g/L), o que indica a produção de uma quantidade muito pequena de polímero.



Figura 5.3. Coloração de colônias de isolados quando cultivados em GSP agar por 24 horas a 30 °C. **A.** 1 – TSM14, 2 – TSM18, 3 – TSM19, 4 – TSM20, 5 – TSM21, 6 – TSM23, 7 – TSM26, 8 – TSM32, 9 – TSM59, 10 – TSM 72, 11 – TSM81 e 12 – TSM86. **B.** 1 – TSM22, 2 – TSM24, 3 – TSM25, 4 – TSM27, 5 – TSM28, 6 – TSM31, 7 – TSM44, 8 – TSM52, 9 – TSM53, 10 – TSM55, 11 – TSM57, 12 – TSM58, 13 – TSM67, 14 – TSM70, 15 – TSM74, 16 – TSM76, 17 – TSM85, 18 – TSM91, 19 – TSM115, 20 – TSM116, 21 – TSM117, 22 – TSM118, 23 – TSM124, 24 – TSM125, 25 – TSM127 e 26 – TSM129. **C.** 1 – TSM30, 2 – TSM33, 3 – TSM36, 4 – TSM45, 5 – TSM49, 6 – TSM50, 7 – TSM55, 8 – TSM56, 9 – TSM60, 10 – TSM65, 11 – TSM79, 12 – TSM80, 13 – TSM89, 14 – TSM94, 15 – TSM95, 16 – TSM96, 17 – TSM97, 18 – TSM98, 19 – TSM100, 20 – TSM101, 21 – TSM102, 22 – TSM103, 23 – TSM106, 24 – TSM130, 25 – TSM131, 26 – TSM132 e 27 – TSM133.

Os isolados detectados como produtores de P3HB e que apresentaram colônias de coloração amarela foram apenas TSM22, TSM24, TSM27, TSM28, TSM70, TSM76, TSM117 e TSM118 (Figura 5.3. B). Vale destacar que esses isolados produziram P3HB representando menos que 2% da massa seca celular. Assim, podem se tratar de produtores do copolímero e que as unidades 3HHx não foram detectadas pela pequena quantidade de polímero produzida. Apenas os isolados TSM22 e TSM24 apresentaram coloração de colônias em amarelo tão intenso como aquele detectado para as bactérias produtoras do copolímero P3HB-*co*-3HHx.

Dos vinte e sete isolados capazes de acumular PHA_{MCL}, vinte e cinco isolados apresentaram colônias com coloração rosa característico do gênero *Pseudomonas*. Dois isolados (TSM30 e TSM79) apresentaram colônias amarelas no meio de cultura GSP Agar,

embora com coloração bem menos intensa do que aquela detectada para bactérias produtoras do co-polímeros P3HB-*co*-3HHx.

Hu e You (2007) construíram uma linhagem de *A. hydrophila* com uma interrupção no gene *phaC*. Surpreendentemente, esta linhagem passou a acumular PHA_{MCL} tanto a partir de ácido láurico como a partir de glicose. Estes autores conseguiram ainda clonar um gene com homologia àqueles que codificam PHA sintase do tipo II em *Pseudomonas* e que apresentam especificidade por monômeros HA_{MCL}.

Com o objetivo de investigar melhor se *Aeromonas* conteriam genes que permitiriam em determinadas circunstâncias produzir PHA_{MCL}, os genomas de *A. hydrophila* ATCC 7966 e de *A. salmonicida* A449 foram analisados para a presença de genes codificando PHA sintases do tipo II. A busca nos genomas utilizando a seqüência de nucleotídeos dos genes *phaC1* ou *phaC2* de *P. aeruginosa* PAO1 (TBLASTX) detectou apenas o gene *phaC* flanqueado pelos genes *phaP* e *phaJ* e com uma baixa similaridade (<50%). Nenhum outro gene, apresentando similaridade àqueles que codificam PHA sintases do tipo II foi detectado nesses genomas. Assim, pelo menos nos genomas disponíveis não há evidência da existência de outras PHA sintases em *Aeromonas*.

Com o objetivo de investigar melhor a identidade de alguns dos isolados com o gênero *Aeromonas* foi realizada a extração do DNA genômico e amplificação da região que codifica o RNA ribossomal 16S. Os amplicons foram digeridos com as enzimas de restrição *Hae* III e *Hha* I e os perfis de fragmentos obtidos (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA restriction analysis ou Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado) analisados eletroforeticamnete em gel de agarose (Figuras 5.4a e 5.4b).

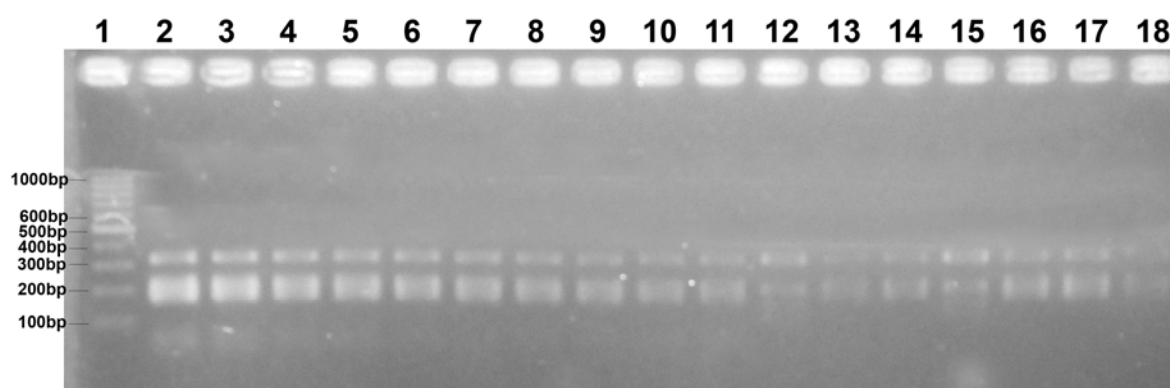


Figura 5.4a. Perfis de migração em gel de agarose 2%, 1- GeneRuler 100bp DNA Ladder-fermentas, 2- TSM 14, 3- TSM 18, 4- TSM 19, 5- TSM 20, 6- TSM 21, 7- TSM 23, 8- TSM 24, 9- TSM 26, 10- TSM 30, 11- TSM 52, 12- TSM 59, 13- TSM 79, 14- TSM 81, 15- TSM 86, 16- TSM 92, 17- TSM 106 e 18- ATCC 7966, digeridos com *HAE* III.

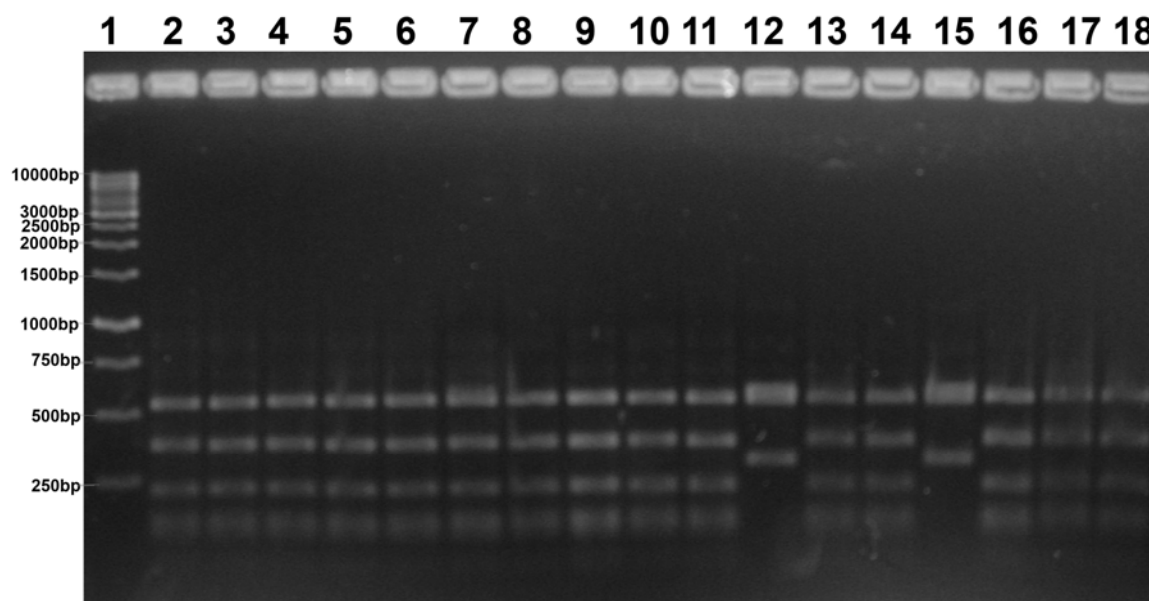


Figura 5.4b. Perfis de migração em gel de agarose 2%, 1- GeneRuler 1kb DNA Ladder- fermentas, 2- TSM 14, 3- TSM 18, 4- TSM 19, 5- TSM 20, 6- TSM 21, 7- TSM 23, 8- TSM 24, 9- TSM 26, 10- TSM 30, 11- TSM 52, 12- TSM 59, 13- TSM 79, 14- TSM 81, 15- TSM 86, 16- TSM 92, 17- TSM 106 e 18- ATCC 7966, digeridos com *Hha* I.

A análise por ARDRA demonstra que apenas 2 dos isolados (TSM 59 e TSM 86) apresentam perfil de fragmentos diferentes dos outros 15 isolados analisados, embora muito semelhantes entre si. Esses isolados apresentaram coloração de colônias rosa quando cultivados em GSP agar, o que sugere não pertencer ao gênero *Aeromonas*. É surpreendente que os isolados TSM 59 e TSM 86 apresentem perfis de fragmentos muito semelhantes entre si, uma vez que o PHA produzido é bastante distinto. Como discutido anteriormente, o isolado TSM 59, produz um PHA contendo 3HB como principal constituinte e apenas traços de 3HA_{MCL}, que é característico de outras bactérias que produzem essencialmente P3HB, mas que conseguem incorporar com certa dificuldade monômeros HA_{MCL} ao polímero. O isolado TSM 86, por outro lado, produziu PHA de composição muito similar àquele encontrado em *Aeromonas*, entretanto, em quantidades muito pequenas considerando-se a massa seca celular atingida (cerca de 12% de 0,37 g/L – Tabela 5.5). Assim, é bem provável que esse isolado não pertença ao gênero *Aeromonas* e que o PHA produzido tenha uma outra composição, se é que realmente essa linhagem é capaz de produzir qualquer PHA.. Estes resultados indicam ainda que o perfil ARDRA não foi adequado para distinguir bactérias com perfis muito diferentes de produção de PHA.

Os isolados TSM 14, TSM 18, TSM 19, TSM 20, TSM 21, TSM 23, TSM 26 e TSM 81 apresentaram perfis de fragmentos semelhantes, e no teste de coloração de colônias no meio de cultura GSP agar todos estes isolados apresentaram colônias de coloração amarela intensa. Estes isolados apresentam perfil de fragmentos ARDRA semelhantes àquele observado para *A. hydrophila* ATCC 7966. Esses resultados sugerem que estes isolados pertencem ao gênero *Aeromonas*, pois todos estes isolados foram capazes de acumular o copolímero P3HB-*co*-3HHx, característico do gênero *Aeromonas*.

O isolado TSM 24 foi capaz de acumular P3HB apenas quando óleo de soja foi fornecido como única fonte de carbono e correspondendo a uma pequena parcela da massa seca celular (<2%). Este isolado, no teste do meio de cultura GSP agar, apresentou colônias de coloração amarela intensa e demonstrou um perfil de fragmentos ARDRA semelhante aos outros isolados que provavelmente pertencem ao gênero *Aeromonas*. Esses resultados indicam que esse isolado provavelmente pertence a esse gênero. É provável também que seja capaz de produzir o copolímero P3HB-*co*-3HHx assim como os outros isolados, mas que devido à baixa quantidade de polímero produzido não foi possível detectar os monômeros 3HHx.

Os isolados TSM 30 e TSM 79 apresentaram colônias amarelas, mas de uma coloração bem mais fraca que a observada para os isolados que provavelmente correspondem ao gênero *Aeromonas*. Os perfis de fragmentos ARDRA também foram muito semelhantes aos isolados com características do gênero *Aeromonas*. Estes isolados foram capazes de acumular PHA_{MCL}. Considerando que a capacidade de produzir PHA_{MCL} é característica do gênero *Pseudomonas*, uma questão importante é se estes isolados não seriam *Aeromonas* produtoras de PHA_{MCL}, como havia sido observado para mutantes com o gene *phaC* inativado (HU e YOU, 2007). Os perfis ARDRA obtidos para os isolados TSM86 e TSM106, entretanto, não contribuem para sustentação dessa hipótese, pois, embora apresentem perfis ARDRA semelhantes a *Aeromonas*, não produzem nem P3HB-*co*-3HHx, nem PHA_{MCL}. Experimentos adicionais para identificação dos isolados TSM30 e TSM79 (sequenciamento do rDNA 16S e/ou provas bioquímicas, por exemplo) serão fundamentais para verificar se *Aeromonas* isoladas do ambiente também podem ser capazes de produzir PHA_{MCL} da mesma forma que mutantes afetados no gene *phaC* (HU e YOU, 2007).

A Figura 5.5 apresenta um resumo comparativo dos isolados detectados como produtores de PHA a partir de óleo de soja e de ácido láurico. Claramente, o ácido láurico

demonstrou ser uma melhor fonte de carbono que o óleo de soja para a produção de PHA, permitindo a detecção de um número maior de isolados produtores de todos os PHA.

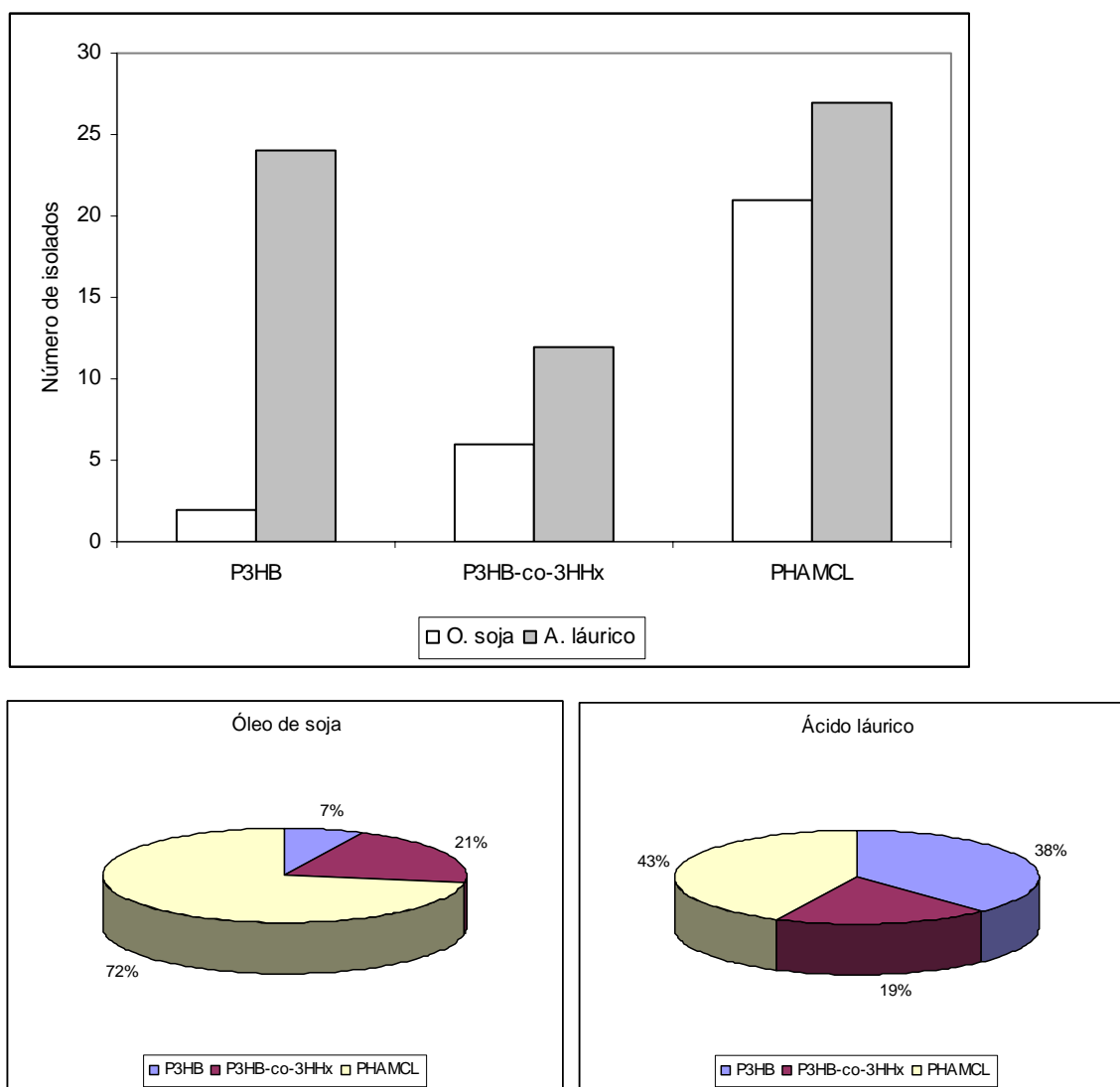


Figura 5.5. Produtores de PHA detectados utilizando óleo de soja ou ácido láurico. A. Número de isolados produtores de cada tipo de PHA obtidos. B e C. Percentual de isolados produtor de cada tipo de PHA obtido a partir de óleo de soja e ácido láurico, respectivamente.

Em síntese, os resultados obtidos até o momento ainda apontam a produção apenas de P3HB-co-3HHx por isolados do gênero *Aeromonas*. Estudos mais detalhados serão necessários para confirmar se a produção de P3HB ou PHA_{MCL}, ou mesmo a não produção de qualquer PHA, pode ser associada a esse gênero bacteriano.

Este trabalho permitiu avançar no conhecimento sobre a produção de PHA por bactérias do gênero *Aeromonas*. Um outro importante resultado foi disponibilizar linhagens que permitirão a produção de PHA que poderão ser caracterizados com relação às suas propriedades térmicas e mecânicas. Os isolados poderão ser utilizados para clonagem dos genes *phaP*, *phaC* e *phaJ*, permitindo a construção de linhagens recombinantes. Este era um importante desafio para este laboratório, uma vez que os outros grupos de pesquisa no Japão, Coréia e China não disponibilizavam para outros laboratórios os isolados produtores de P3HB-*co*-3HHx ou mesmo os genes clonados e apenas recentemente se tornaram públicos os genomas de duas espécies de *Aeromonas*.

5.7 Produção de PHA por outros isolados a partir de óleo de soja

Dos 813 isolados obtidos a partir de lodo de esgoto doméstico, apenas 95 apresentaram colônias amarelas e foram analisados conforme descrito a partir do item 5.4. Os 718 isolados remanescentes foram caracterizados com relação à capacidade de produzir PHA em cultivos em meio sólido utilizando carboidratos (glicose) ou ácidos graxos (octanoato) com fonte de carbono e contendo o corante para detecção de PHA (Nile Red – SPIEKERMAN *et al.*, 1999). 69 isolados apresentaram capacidade de produzir PHA quando avaliados em meio mineral contendo glicose como única fonte de carbono e 18 isolados quando avaliados em meio mineral contendo octanoato como única fonte de carbono. Onze isolados apresentaram capacidade de produzir PHA em ambas as fontes de carbono. Assim, 77 isolados foram detectados como capazes de produzir PHA. Os 18 isolados capazes de acumular PHA a partir de ácido octanóico foram avaliados com relação à capacidade de produzir PHA a partir de óleo de soja (Tabela 5.8). O objetivo de avaliar estes clones foi investigar a capacidade de produção de PHA a partir de óleo de soja por outras bactérias não caracterizadas como pertencentes ao gênero *Aeromonas*.

Dos 18 isolados analisados, 14 não foram capazes de acumular PHA a partir de óleo de soja como única fonte de carbono. Uma hipótese para a incapacidade de acúmulo de PHA por estes isolados, é que não possuam a enzima lipase que é responsável pela hidrólise dos triglicerídeos. Esta explicação se ajusta bem a sete isolados que apresentaram pouco crescimento (MSC < 0,5 g/L), mas não aos sete isolados que apresentaram um bom crescimento, em alguns casos atingindo valores de massa seca celular bastante elevados.

Assim, os resultados deste experimento sugerem que a simples verificação da produção da PHA pelo método de coloração Nile Red não é suficiente para se afirmar o acúmulo destes polímeros. Além disso, com os ensaios em frascos agitados é possível se determinar não só a quantidade do polímero acumulado, mas também a sua composição.

Tabela 5.8. Produção de PHA a partir de óleo de soja por outros isolados.

Isolados	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	3HDd Δ_5	
DTO 06	2,88	5,71	0,00	3,91	30,76	46,61	9,48	9,24	22,96
DTO 08	3,24	5,56	0,00	4,26	30,85	45,26	9,82	9,82	21,25
DTO 11	5,07	5,47	0,00	3,89	30,55	49,74	7,63	8,18	19,34
DTO 14	2,87	5,93	0,00	4,53	31,95	46,48	6,58	10,47	28,80
DTO 18-A	0,62	6,96	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 18-B	0,13	6,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 22-A	0,19	6,97	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 182-A	0,03	7,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 217	3,08	5,87	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 218	3,76	6,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 221	5,95	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 226	4,12	5,89	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 227	0,54	6,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 266-A	0,09	6,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 266-B	0,09	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 271-A	0,76	6,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 271-B	0,24	6,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DTO 272	0,07	7,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi-butirato ; 3HHx – 3-hidroxi-hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi-octanoato 3HD – 3-hidroxi-decanoato 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato. 3HDd Δ_5 – 3-hidroxi-5-dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular.

Quatro isolados foram capazes de produzir PHA_{MCL} tendo como principal constituinte o 3HD e apresentaram valores expressivos do teor de PHA acumulado 19,34% a 28,80% da massa seca celular.

Em estudo anterior, Matsuda (2005) avaliou a produção de PHA a partir de óleo de soja por bactérias produtoras de P3HB isoladas de solo de canavial, bem como isolados de solo de Mata Atlântica. Em nenhum dos isolados foi detectada a produção de copolímeros contendo frações expressivas de monômeros 3HA_{MCL}. Foram esses resultados que motivaram no início desse trabalho uma investigação mais detalhada sobre a produção de PHA em *Aeromonas*. As condições adequadas para produção desses co-polímeros, contendo mais que 80% de 3HB e menos que 20% de 3HA_{MCL}, necessita de condições adequadas encontradas em diferentes isolados do gênero *Aeromonas* e também em algumas linhagens recombinantes de *P. putida* (GOMES *et al.*, 2007).

5.8 Construção de linhagens recombinantes para produção de PHA a partir de óleos vegetais

Dois isolados obtidos a partir de lodo de esgoto industrial (TSM 10 e TSM 15), foram selecionados para abrigar genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* com o objetivo de avaliar seu potencial de produção de PHA a partir óleo de soja, uma vez que apresentaram bom crescimento nessa fonte de carbono, embora PHA não foram detectados. Além desses isolados, também foram selecionados outros 12, obtidos a partir de solo de Mata Atlântica (MATSUDA, 2005), que também apresentaram bom crescimento em óleo de soja, contudo não acumularam qualquer PHA.

Inicialmente, os isolados selecionados foram analisados com relação ao seu padrão de resistência a canamicina (Tabela 5.9). Um isolado foi sensível mesmo a canamicina na concentração de 10 µg/mL e quatro outros para concentração de 50 µg/mL. Quatro isolados apresentaram-se resistentes a canamicina na concentração de 100 µg/mL, três dos quais foram resistentes até mesmo a 250 µg/mL. Todos os isolados foram sensíveis a canamicina na concentração de 300 µg/mL.

Tabela 5.9. Teste de resistência a canamicina em isolados não produtores de PHA, mas com bom crescimento em óleo de soja.

Linhagens	Canamicina (µg/mL)					
	10	50	100	200	250	300
TSM 10	-	-	-	-	-	-
TSM 15	+	+	+	+	+	-
RDB 464	+	+	+	-	-	-
RDB 323B	+	-	-	-	-	-
RDB 354	+	+	+	-	-	-
RDB 550 ^a	+	-	-	-	-	-
RDB 550B	+	+	+	-	-	-
RDB 101	+	+	-	-	-	-
RDB 308	+	-	-	-	-	-
RDB 340 ^a	+	+	-	-	-	-
RDB 394cB	+	+	-	-	-	-
RDB 294B	+	+	-	-	-	-
RDB 367B	+	-	-	-	-	-
RDB 489	+	+	-	-	-	-

- sensíveis a concentração de canamicina + resistentes a concentração de canamicina.

O plasmídio selecionado para ser expresso nestes isolados foi o pBBR1MCS-2::*phaCAB* (GOMES *et al.*, 2007), que abriga o operon de biossíntese de PHA de *R. eutropha*. A Figura 5.6. apresenta o gel de agarose da análise eletroforética deste plasmídio após digestão com a enzima *Hind* III. Este plasmídio é um vetor de amplo espectro de hospedeiros capaz de se replicar em diferentes bactérias Gram-negativas (KOVACH *et al.*, 1994; KOVACH *et al.*, 1995).

O plasmídio pBBR1MCS2::*phaCAB* encontra-se na linhagem *Escherichia coli* S17-1 (SIMON *et al.*, 1983). Essa linhagem possui incorporado ao seu cromossomo, genes que permitem a transferência do plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB* por conjugação. Assim, foram feitos experimentos de conjugação com o objetivo de obter linhagens recombinantes abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*. As linhagens selvagens e recombinantes obtidas foram avaliadas quanto à produção de PHA utilizando óleo de soja como única fonte de carbono (Tabelas 5.10 e 5.11).

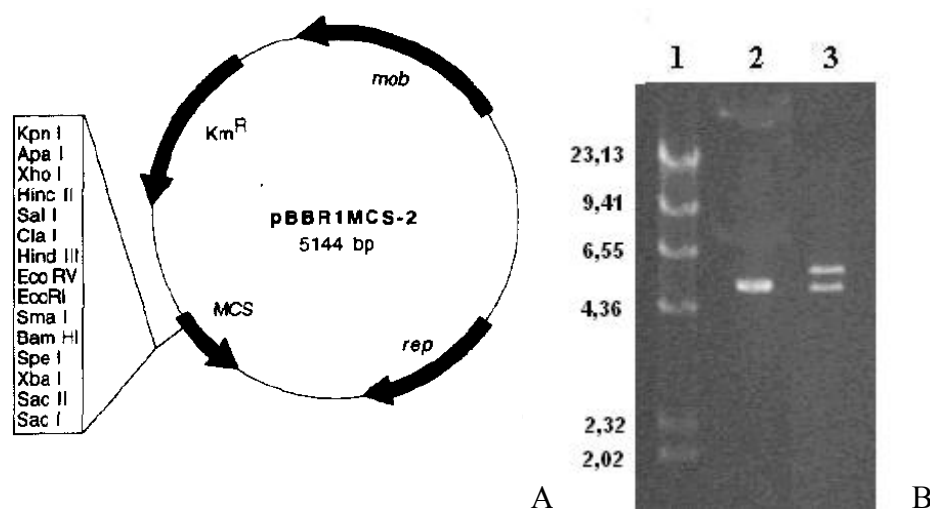


Figura 5.6 A – Esquema do plasmídeo pBBR1MCS-2. B. Análise do perfil de restrição dos plasmídios pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-2::*phaCAB* por eletrofores em gel de agarose. 1. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind*III). 2. Vetor pBBR1MCS-2 digerido com *Hind*III. 3. pBBR1MCS-2::*phaCAB* digerido com *Hind*III.

Os isolados selvagens, ou seja, sem abrigar o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* não foram capazes de produzir PHA, exceto pelo isolado RDB308 para o qual se detectou uma quantidade muito pequena de P3HB (Tabela 5.10).

Tabela 5.10. Crescimento e produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens selvagens.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	3HDd Δ_5	
TSM 10	0,73	7,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 15	0,86	6,49	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 101	2,52	5,91	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 294-B	0,97	6,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 308	2,67	6,74	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60
RDB 323-B	0,43	6,39	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 340-A	2,55	6,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 354	0,41	5,79	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 367-B	0,49	6,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 394cB	2,33	6,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 464	0,70	3,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 489	0,75	6,95	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 550-A	0,56	6,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 550-B	3,44	5,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi-butirato ; 3HHx – 3-hidroxi-hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi-octanoato 3HD – 3-hidroxi-decanoato 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato. 3HDd Δ_5 – 3-hidroxi-5-dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular.

Tabela 5.11. Crescimento e produção de PHA a partir de óleo de soja por linhagens recombinantes abrigoando o plasmídeo pBBR1MCS-2::phaCAB.

Linhagem	MSC (g/L)	pH	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDD Δ_5	3HDD	
TSM 10	0,24	6,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TSM 15	0,86	6,49	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,53
RDB 101	3,17	5,86	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	9,26
RDB 294-B	2,23	6,73	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,29
RDB 308	1,83	6,54	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,31
RDB 323-B	2,03	6,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
RDB 340-A	2,13	6,40	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,81
RDB 354	1,56	6,06	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,53
RDB 367-B	2,93	6,47	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,50
RDB 394Cb	1,55	6,25	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,10
RDB 464	0,09	6,91	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63
RDB 489	1,89	6,45	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,64
RDB 550-A	2,23	6,10	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,49
RDB 550-B	0,25	7,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxi-butirato ; 3HHx – 3-hidroxi-hexanoato ; 3HO – 3-hidroxi-octanoato 3HD – 3-hidroxi-decanoato 3HDd – 3-hidroxi-dodecanoato. 3HDd Δ_5 – 3-hidroxi-5-dodecanoato. %MSC – percentual da massa seca celular.

Dos quatorze isolados que foram selecionados para a construção de linhagens recombinantes, dez se tornaram capazes de produzir PHA tendo apenas 3HB na sua composição. Os teores de PHA acumulado de sete desses isolados foram menores que 5% da massa seca celular e nos três isolados restantes o teor máximo de PHA atingido foi de 9,26% da massa seca celular. Deve-se destacar que muitos dos isolados selvagens e recombinantes não apresentaram bom crescimento em óleo de soja, com massas secas celulares inferiores a 1 g/L.

No isolado RDB 308 sem o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* detectou-se o acúmulo de pequenas quantidades de P3HB (0,06% da massa seca celular), com o plasmídeo este isolado continuou acumulando P3HB, mas o teor de PHA acumulado aumentou para 2,31% da massa seca celular.

Os isolados TSM10, RDB323B, RDB550B foram os únicos que não foram capazes de acumular qualquer tipo de PHA mesmo após ter recebido o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB*. Os isolados que atingiram os maiores acúmulos de P3HB (cerca de 8-9% da massa seca celular) alcançaram densidades celulares superiores a 2 g/L.

Nenhum dos isolados foi capaz de acumular o copolímero P3HB-*co*-3HH_x, o que sugere que eles não são capazes de direcionar monômeros 3HA_{MCL} eficientemente para a PHA sintase de *R. eutropha*.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram estabelecer as seguintes conclusões:

- O teste de produção de lipases com rodamina B não pode ser utilizado como critério para distinguir bactérias capazes de utilizar triglicérides como fonte de carbono, uma vez que bactérias positivas nesse teste não foram capazes de utilizar eficientemente óleo de soja e bactérias com bom crescimento nessa fonte de carbono não indicaram a produção de lipases por esse teste.
- Foram obtidos 10 isolados apresentando as características de *Aeromonas* em GSP agar (colônias amarelas) e na produção de PHA (acumulo de P3HB-co-3HHx). Além disso, estes isolados apresentaram perfis ARDRA muito semelhantes entre si.
- Outros isolados apresentaram perfis ARDRA semelhantes à das prováveis *Aeromonas* e produziram PHA_{MCL}. A identificação desses isolados será fundamental para confirmar se esses isolados ambientais são *Aeromonas* capazes de produzir esse tipo de PHA.
- Avaliação do P3HB-co-3HHx produzido por três isolados capazes de acumular PHA correspondendo a cerca de 20% da massa seca celular indica que a fração de 3HHx pode variar em função da linhagem bacteriana.
- Isolado produtores de P3HB-co-3HHx a partir de ácido láurico e/ou óleo de soja, característica do gênero *Aeromonas*, não foram capazes de produzir P3HB a partir de glicose, sugerindo que essas bactérias não apresentam capacidade de sintetizar os monômeros 3HB a partir de acetil-CoA e que a expressão dos genes *phaA* e *phaB* pode levar a um aumento no teor de PHA acumulado por esses isolados.
- O ácido láurico se apresentou como uma fonte de carbono mais eficiente que o óleo de soja para detecção de bactérias produtores de PHA.
- A transferência de plasmídeo contendo genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha* habilitou a produção de P3HB em alguns isolados eficientes em utilizar óleo de soja como fonte de carbono. A não detecção de monômeros HA_{MCL} sugere que essas bactérias não conseguem transferir esses monômeros eficientemente a partir da β -oxidação de ácidos graxos para PHA sintase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

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

ABBOTT, S.L.; CHEUNG, W.K.W.; JANDA, J.M. The genus *Aeromonas*: Biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 2348-2357, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: 29 out. 2009.

AMARA, A.A.; STEINBUCHER, A.; REHM, B.H.A. In vivo evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, n. 4-5, p. 477-482, 2002.

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

ARAI, Y.; NAKASHITA, H.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, T.; YASUDA, M.; DOI, Y. Synthesis of novel class of polyhydroxyalkanoate in *Arabidopsis peroxisomes* and their use in monitoring short-chain-length intermediates of beta-oxidation. **Plant Cell Physiol.**, v. 43, n. 5, p. 555-562, 2002.

BRÄMER, C. O.; SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; 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. 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, B.; LEFEBVRE, J.M.; SHORT, J.M. XL1- Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with Beta-galactosidase selection. **BioTechniques**, v. 5, n. 4, p. 376-378, 1998.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*, 2 ed, Berlin: Springer, 2001.

* De acordo com:

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

CABALLERO, K.P.; KAREL, S.F.; REGISTER, R.A. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 2, p. 86-92, 1995.

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. Biomed. Materials**, 2008. DOI: 10.1002/jbm.a.31780.

CHEN, J. Y.; SONG, G.; CHEN, G.Q. A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p.157-167, 2006.

CHEN, G.Q.; ZHANG, G.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, n. 1-2, p. 50-55, 2001.

DE KONING, G.J.M.; VAN BILSEN, H.M.M.; LEMSTRA, P.J.; HAZENBERG, W.; WITHOLT, B.; PREUSTING, H.; VAN DER GALIËN, J.G.; SCHIRMER, A.; JENDROSSEK, D. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. **Polymer**, v. 35, p. 2090-2097, 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. 177-86, 1998.

DERENZO, S.; SAITO, R.M.; GARÓFALO, G.M.C.; RIBEIRO, A.M.M.; BUENO NETTO, C.L.; MANTELATTO, P.E.; ROSSEL, C.E.L. **Processo de extração de biopolímeros**. BR n. PI 9302312, 1993.

DINIZ, S.C.; TACIRO, M.K.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, S.R.; PRADELLA, J.G.C. High-cell-density cultivation os *Pseudmomas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 199, p. 51-69, 2004.

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

DOI Y.; KITAMURA S.; ABE H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822-4828, 1995.

DUBOIS, V.; BRETON, S.; LINDER, M.; FANNI, J.; PERMENTIER, M. Fatty acids profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 109, p. 710-732, 2007.

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

FERRAZ, L.; BONOMI, A.; PICCOLI, R.A.M.; KAPRITCHKOFF, F.M.; SCHIMIDELL, W.; ALLI, R.C.P.; TAKANO, C.Y.; MATTOS, M.N.; OLIVEIRA, V.; FONTOLAN, V. Cybernetic structured modeling of production of polyhydroxyalkanoates by *Alcaligenes eutrophus*. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, n. 2, p. 205-212, 1999.

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.; 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, n. 3, p. 618-324, 2002.

FUKUI, T.; KICHISE, T.; IWATA, T.; DOI, Y. Characterization of 13kDa granule-associated protein in *Aeromonas caviae* and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p.148-153, 2001.

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.; 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.; 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.

GOMES, R.S.; UNGAR, A.B.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Produção de polihidroxialcanoatos contendo 3-hidroxibutirato e 3-hidroxialcanoatos de cadeia média (3HA_{MCL}) por linhagens recombinantes de *Pseudomonas putida*. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16., 29 jul. - 01 ago. 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 2007.

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

GOMEZ, J.G.C. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos.** 1994. Tese (Mestrado em Microbiologia) Universidade de São Paulo, 1994.

GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de poliésteres bacterianos. In: LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biociência Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Ed. Edgard Blücher, 2001. v. 3, p.219-248.

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

GOMEZ, J.G.C.; SILVA-QUEIROZ, S.R.; SILVA, L.M.B.; COSTA, M.; BRETAS, A.F.; SILVA, L.F.; TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C.; SANCHES, R.J.; SCHEMBERG, A.C.; TORRES, B.B. PHA_{MCL} production from renewable substrates – INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL POLYESTERS, 2002, Germany. **Abstracts...** Germany: Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002. p. 94.

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

GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F.; RODRIGUES, M.F.A.; BUENO NETTO, C.L.; SIMÕES, D.A.; TORRES, B.B. Rendimento máximo teórico na conversão de fontes de carbono em polihidroxialcanoatos (PHAs). SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 11., ago. 1996, São Carlos. **Anais...** São Carlos: **UFSCar**, 1996b. p. 382-387.

GRAEVENITZ, A. The role of *Aeromonas* in diarrhea: a Review. **Infection**, v. 35, n. 2, p.59-64. 2007.

GREEN, P.R.; KEMPER, J.; SCHECHTMAN, L.; GUO, L.; SATWOSKI, M.; FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Formation of short chain length/Medium chain length polhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 208-213, 2002.

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

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. Let.**, v. 239, n. 1, p. 195-201, 2004.

HU, F.; YOU, S. Inactivation of type I polyhydroxyalkanoate synthase in *Aeromonas hydrophila* resulted in discovery of another potencial PHA synthase. **J. Ind. Microbial. Biotechnol.**, v. 35, p. 255-260, 2007.

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

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.

KAPRITCHKOFF, F.M.; ALLI, R.C.P.; ZUCCOLO, M.; MAIORANO, A. E.; PRADELLA, J.G.C.; MIRANDA, E.A; BONOMI, A. Recovery and purification of polyhydroxybutyrate from *Ralstonia eutropha* by enzymatic lysis. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBM, 2001.

KAPRITCHKOFF, F.M.; VIOTTI, A.P.; ALLI, R.C.P.; ZUCCOLO, M.; PRADELLA, J.G.C.; MAIORANO, A.E.; MIRANDA, E.A.; BONOMI, A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha*. **J. Biotechnol.**, v. 122, p.453-462, 2006.

KATO, M.; BAO, H. J.; KANG, C.K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 363–370, 1996a.

KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanolic acids. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 69, p. 515–520, 1996b.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer by in vitro evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 5, p. 2411-2419, 2002.

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. Bio. Macromol.**, v. 25, n. 1-3, p. 69-77, 1999.

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

KOUKER, G.; JAEGER; K.E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.53, n.1, p. 211-3, 1987.

KOVACH, M.E.; ELZER, P.H.; HILL, D.S.; ROBERTSON, G.T.; FARRIS, M.A.; ROOP II, R.M.; 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.

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

KRAAK, M.N.; SMITS, T.H.M.; KESSLER, B. Polymerase C1 levels and poly(R-3-hydroxyalkanoate) synthesis in wild-type and recombinant *Pseudomonas* strains. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4985-4991, 1997.

LEE, S.H.; OH, D.H.; AHN, W.S.; LEE, Y.; CHOI, J.; LEE, S.Y. Production of poly(3-

hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnol. and Bioeng.**, v. 67, n.2, p. 240-244, 2000.

LEE, E.Y.; JENDROSSEK, D.; SCHIMER, A.; CHOI, C.Y.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 901-909, 1995.

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

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1-8, 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. **J. Biomed. Materials Res. Part A**. DOI: 10.1002/jbm.a.31890, 2007.

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.

LIEBERGESELL M.; MAYER F.; STEINBÜCHEL A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 292-300, 1993.

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.243, n. 1, p.149-155, 2005.

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. and Biotechnol.**, v. 64, n. 1, p.41-45, 2004a.

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, n. 5, p. 1332-1336, 2004b.

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

MARTIM, D.P.; WILLIAMS, S. Medical application of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochem. Eng. J.**, v. 16, p. 97-105, 2003.

MATSUDA, T.S.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C. 2007. Seleção de bactérias para a produção de polihidroxialcanoatos a partir de óleo de soja. Pôster apresentado no CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 24., 2 a 6 out., 2007. **Anais...** Brasília: SBM, 2007.

MATSUDA, T.S. **Isolamento e Caracterização de Bactérias produtoras de polihidroxicanoatos a partir de óleos vegetais.** Processo 05/51707-0, 2005. São Paulo: FAPESP, 2005. Relatório FAPESP.

MATSUMOTO, K.; TAKASE, K.; YAMAMOTO, Y.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Chimeric enzyme composed of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas caviae* enhances production of PHAs in recombinant *Escherichia coli*. **Biomacromol.**, v. 10, p. 682-685. 2009.

MATSUMOTO, K.; NAGAO, R.; MURATA, T.; ARAI, Y.; KICHISE, T.; NAKASHITA, H.; TAGUCHI, S. Enhancement of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in the transgenic *Arabidopsis thaliana* by the in vitro evolved highly active mutants of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase from *Aeromonas caviae*. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 4, p. 2126-2130, 2005.

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.

MENDONÇA, T.T.; GOMEZ, J.G.C.; SILVA, L.F. Avaliação da capacidade de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)] a partir de ácidos orgânicos. SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2-5 ago. 2009, Natal. **Anais...** Natal-RN: UFRN, 2009.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 28 out. 2009.

NOMURA, C.T.; TAGUCHI, K.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-ACP synthase III (fabH) and polyhydroxyalkanoate synthase (phaC) genes leads to short-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 2, p. 999-1007, 2004.

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, n. 1, p. 248-254, 2001a.

PARK, S.J.; AHN, W.S.; GREEN, P.R.; LEE, S.Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74, n. 1, p. 81-86, 2001b.

PEREIRA, R.P.M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi valerato) por *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 sob diferentes condições de oferta de substratos.** 149f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 1996. 149 p.

PICCOLI, R.A.M.; GOMEZ, J.G.C.; BONOMI, A.; FERRAZ, L.; KAPRITCHKOFF, F.M.; TAKANO, C.Y.; MATTOSs, M.N.; OLIVEIRA, V.; FONTOLAN, V. Analysis of bioreactor experimental data by the application of metabolic pathway stoichiometry to polyhydroxyalkanoate production by *Alcaligenes eutrophus*. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 16, p. 199-204, 1999.

PICCOLI, R.A.M. **Cultivos em altas concentrações e produtividades da bactéria *Alcaligenes eutrophus* DSM 545**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 1995.

QIN, L.F.; GAO, X.; LIU Q.; WU, Q.; CHEN, G.Q. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate copolyesters by *Aeromonas hydrophila* mutant expressing a low-substrate-specificity PHA synthase PhaC2ps. **Biosci. Eng. J.**, v. 37, p. 144-150, 2007.

QIU, Y.Z.; HAN, J.; CHEN, G.Q. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, n. 5, p.537-542, 2006.

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

QIU, Y.Z.; OUYANG, S.P.; SHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, G.Q. Metabolic engineering for the production of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate by *Aeromonas hydrophila*. **Macromol. Biosci.**, v. 4, n. 3, p. 255-261, 2004.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATILLE, P., RAMSAY, J. A. Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

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

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

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

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.

REN, Q.; SIERRA, N.; WITHOLT, B. FabG, an NADPH-dependent 3-ketoacyl reductase of *Pseudomonas aeruginosa*, provides precursors for medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoate biosynthesis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 2978-2981, 2000.

RISS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R.C.S. **Produção de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato por *sacchari* IPT 189.** 140f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2002.

ROCHA, R.C.S.; SILVA, L.F.; TACIRO, M.L.; PRADELLA, J.G.C. Production of P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high $Y_{3HV/prop}$ values by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, n. 3, 2008. DOI 10.1007/s11274-007-9480-x.

ROCHA, R.C.S.; TACIRO, M.K.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C. Feeding strategy for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with *Burkholderia sacchari* IPT 189. EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL SCIENCES, 4., 2002, The Netherlands. **Abstracts...** The Netherlands: Delft University of Technology, 2002. p. 174.

RODRIGUES, M.F.A.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 43, p. 880-886, 1995.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMIM G.W.; ROSHINI, K.T.; SHANTALA, M. Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase. **African J. Biotechnol.**, v. 6, n. 5, p. 564-568. 2007.

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. **Título da patente.** Jpn Patent. Appl. 93049, 1993.

SHEU, D.; LEE, C. Altering the substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase 1 derived from *Pseudomonas putida* GPo1 by localized semirandom mutagenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 13, p. 4177-4184, 2004.

SCHROL, G.; DENNER, E.B.M.; RÖLLEKE, S.; LUBITZ, W.; BUSSE, H. Characterization of a new *Pseudomonas* isolate, capable of accumulating polyesters of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids. **J. Biotechnol.**, v. 47, p. 53-63, 1996.

SILVA-QUEIROZ, S.R.; SILVA, L.F.; PRADELLA, J.G.C.; PEREIRA, E.M.; GOMEZ, J.G.C. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **J. Biotechnol.**, v. 143, p. 111-118, 2009.

SILVA-QUEIROZ, S.R. **Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável.**

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2008.

SILVA-QUEIROZ, S.R. **Biossíntese de polihidroxicanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) por bactérias a partir de óleos vegetais.** 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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.; 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 for sugar cane bagasse hydrolysate. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL POLYESTERS, 2002, Germany. **Abstracts...** Germany: Westfälische Wilhelms-Universität Münster, 2002. SL 08, p. 64.

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.; GOMEZ, J.G.C. **Cepa mutante de *Burkholderia* sp e método de obtenção da cepa.** BR n. PI 9806557-2, 1998.

SILVA, L.F. Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando ao aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) - um plástico biodegradável. 62 f. Dissertação (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 1998.

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

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 664-669, 2001.

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

STEINBÜCHEL, A. In vivo and in vitro metabolic engineering of PHA biosynthesis pathways. In: CHENG, H.N.; GROSS, R.A. (Ed.). **Biocatalysis in Polymer Science.**,

2003. v.840, p.120-123. (ACS Symposium Book series).

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (Ed.). **Biomaterials. Novel materials from biological sources.** Basingstoke: Macmillan Publishers, 1991. p. 123-213.

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

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.**, v. 20, p. 1743-1751. 2009.

TACIRO, M.K.; PRADELLA, J.G.C.; GOMEZ, J.G.C.; MICHELIN, M.E.; SILVA, L.F. Production of poly-3-hydroxybutyrate by bacteria from xylose, glucose and sugar cane bagasse hydrolysate. EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCES, 4., 2002, The Netherlands. **Abstracts...** The Netherlands: Delft University of Technology, 2002. p. 201.

TACIRO, M.K.; PEREIRA, R.P.M.; PRADELLA, J.G.C.; NETTO, C.L.B.; SIMÕES D.A. Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate accumulation at different strategies of substrate feeding. – **Braz. J. Microbiol.**, v. 28, p.49-53, 1997.

TAGUCHI, K.; AOYAGI, Y.; MATSUZAKI, H.; FUKUI, T.; DOI, Y. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 176, p. 183-190, 1999.

TAVARES, L.Z.; SILVA, E.S.; PRADELLA, J.G.C. Production of poly(3-hydroxybutyrate) in an airlift bioreactor by *Ralstonia eutropha*. **Biosci. Eng. J.**, p.18-21, 2004.

TIAN, S.; LAI, W.; ZHENG, Z.; WANG, H.; CHEN, G. Effect of over-expression of phasin gene from *Aeromonas hydrophila* on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, p. 19-25, 2005.

TSUGE, T. 2002. Metabolic Improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 94, n. 6, p. 579-584, 2002.

TSUGE, T.; WATANABE, S.; SHIMADA, D.; ABE, H.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Combination of N149S and D171G mutations in *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 277, n. 2, p. 217-222, 2007a.

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, n. 6, p. 846-854, 2007b.

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

TSUGE, T.; HISANO, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Alteration of chain length substrate specificity of *Aeromonas caviae* R-enantiomer-specific enoyl-coenzyme A hydratase through site-directed mutagenesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 8, p. 4830-4836, 2003.

TSUGE, T.; FUKUI, T.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; KOBAYASHI, 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, n. 2, p. 193-198, 2000.

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, n.2, p.402-407, 1989.

VALENTIN, H.E. LEE, E.Y.; CHOI, C.Y.; STEINBÜCHEL, A. Identification of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 710-16, 1994.

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

VERLIDEN, R.A.J; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA I. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 1437-1449, 2007.

VILLARRUEL-LÓPEZ, A.; FERNÁNDEZ-RENDÓN, E.; MOTA-DE-LA-GARZA, L.; ORTIGOZA-FERADO, J. Presence of *Aeromonas* spp in Water from Drinking-Water-and Wastewater-Treatment Plants in México City. **Water Environ. Res.**, v. 77, p. 3074-3079, 2005.

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.**, 2008. DOI: 10.1177/0885328207075425, 22: 293.

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. Eng. J.**, v.38, p.384-389, 2007.

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

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokariotes**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. p. 565.

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

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

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.

YANG, X.S.; ZHAO K.; CHEN G.Q. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates. **Biomaterials**, v. 23, n.5, p.1391–7, 2002.

YE, C.; HU, P.; MA, M.; XIANG, Y.; LIU, R.; SHANG, X. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering. **Biomaterials**, v. 30, p. 4401-4406. 2009.

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. 23, p. 1-8. 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 Biochem.**, v. 42, p.1342-1347, 2007.

ZUCCOLO, M.; CARTER, J.M.; RIBEIRO, A.M.M.; ALLI, R.C.P.; OGAKI, Y.; GONÇALVES, I.M.; BUENO NETTO, C.L. Purificação de biopolímeros pela via enzimática. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 2., 1995, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 1995.

ZUCCOLO, M.; RIBEIRO, A.M.M.; OGAKI, Y.; ALLI, R.C.P.; BUENO NETTO, C.L. Utilização de enzimas comerciais no estudo de lise celular de *Alcaligenes eutrophus* DSM 545. SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 4., 1994, Maringá. **Anais...** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 1994.