

JEFFERSON GONÇALVES PINHEIRO SILVA

Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* na conversão de xilose e ácido hexanóico em copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato [P(3HB-co-3HHx)]

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2020

JEFFERSON GONÇALVES PINHEIRO SILVA

Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* na conversão de xilose e ácido hexanóico em copolímero poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxihexanoato [P(3HB-co-3HHx)]

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

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

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gonçalves Pinheiro Silva, Jefferson
Estudo em biorreator e análise de fluxos
metabólicos em cepas recombinantes de Burkholderia
sacchari na conversão de xilose e ácido hexanóico em
copolímero poli-3-hidroxi butirato-co-3-
hidroxi hexanoato [P(3HB-co-3HHx)] / Jefferson
Gonçalves Pinheiro Silva; orientadora Luiziana
Ferreira da Silva. -- São Paulo, 2020.
174 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Poli (3-hidroxi butirato-co-3-
hidroxi hexanoato). 2. Copolímeros biodegradáveis. 3.
Xilose. 4. Ensaio em biorreator. 5. Análise de
fluxos metabólicos. I. Ferreira da Silva, Luiziana,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Jefferson Gonçalves Pinheiro Silva

Titulo da Dissertação/Tese: Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* na conversão de xilose e ácido hexanóico em copolímero poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato [P (3HB-co-3HHx)]

Orientador (a): Luiziana Ferreira da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o (a) candidato (a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador (a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



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

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **881/2017** referente ao projeto intitulado: ***“Estudo em biorreator e análise de fluxos metabólicos em cepas recombinantes de Burkholderia sacchari na conversão de xilose e hexanoato em copolímero poli-3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato [P(3HB-co-3HHx)]”*** sob a responsabilidade de ***Jefferson Gonçalves Pinheiro Silva*** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) ***Luiziana Ferreira da Silva***, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 11 de maio de 2017.

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela oportunidade de ingressar no meio científico. Oportunidade essa que me foi dada no ano de 2015, onde pude desenvolver meu trabalho de conclusão de curso (TCC), junto ao grupo de pesquisas. Essa oportunidade fez toda diferença em minha vida. Em relação a este trabalho, quero agradecer pela confiança que em mim foi atribuída mais uma vez.

Meus sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pela paciência e dedicação em me co-orientar, despendendo do seu tempo para me guiar durante todas as etapas do meu trabalho. Com certeza um profissional no qual me espelho.

Meus sinceros agradecimentos à Dra. Marilda Keico Taciro pelas orientações referentes às análises dos dados obtidos desse trabalho. Obrigado pela paciência e tempo despendido.

Aos meus pais, Genivaldo de Jesus Silva e Cícera Gonçalves Pinheiro Silva, por não questionarem minhas escolhas, apenas me apoiarem. Obrigado por me mostrarem o valor do trabalho.

Obrigado as minhas jovens irmãs, Geovanna Gonçalves Pinheiro Silva e Julianna Gonçalves Pinheiro Silva, que mesmo tão jovens e sem entender muitas coisas, sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus avôs, Manoel Gonçalves Pinheiro e Maria das Dores Pinheiro, pelo apoio e estímulo a continuar na minha caminhada.

Obrigado Pedro Henrique Santos Oliveira, não apenas por me auxiliar em toda metodologia analítica deste mestrado, que sem elas este trabalho não poderia ser entregue, mas também pela sua amizade e companheirismo.

Agradeço a Sofia Alejandra Lopes por todo suporte dado com os meus ensaios em biorreator, no qual dividimos muitas noites de experimentos, e agradecer mais ainda, pela amizade construída.

Aos demais membros do nosso grupo - Laboratório de Bioprodutos:

Obrigado Edmar Ramos Oliveira Filho pelas discussões e auxílio em etapas importantes deste projeto;

Obrigado a Rosmary Rebaza Penãfiel pelo auxílio durante meus ensaios em biorreator e pela amizade.

Obrigado Jung Hun Park e Guilherme Santos de Oliveira pela ajuda com os meus ensaios.

Obrigado Aline Carolina da Costa Lemos por manter a ordem neste laboratório, pelo apoio e por todos os conselhos.

Obrigado aos novos membros do Laboratório, Franz Wagner Laurett Veras, Raoni Kempfer Pantoja e Ruideglan Alencar, pelo auxílio nos ensaios em biorreator nos momentos finais deste projeto.

Gostaria de agradecer a todos os membros do laboratório de biopolímeros que de alguma forma me ajudaram.

A minha amiga de longa data, Nathaly Bruna Guimarães Bispo, pela paciência em sempre escutar meus problemas e sempre me ajudar da maneira mais coerente possível.

E hoje, meu amigo Elcio Gomes Castro Júnior, uma pessoa incrível, que com toda sua paciência sempre me incentivou a buscar o melhor para mim.

Aos meus alunos, que me proporcionam momentos de descontração, aprendizado e estão sempre dispostos a me escutar e a fornecer palavras de incentivo.

E por fim, gostaria de agradecer a CAPES (Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior), pelo suporte financeiro.

RESUMO

O impacto ambiental de produtos de origem petroquímica, como os plásticos, têm levado à busca por materiais similares que sejam ambientalmente corretos e possam ser produzidos a partir de fontes renováveis. Uma alternativa são os polihidroxicanoatos (PHA), uma família de poliésteres termoplásticos ou elastoméricos, biodegradáveis e biocompatíveis, acumulados por algumas bactérias. A incorporação e a modulação de monômeros variáveis à estrutura dos PHA apresentam potencial para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações médicas. A literatura e patentes recentes apontam copolímeros de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato (3HB-co-3HHx) como produtos de grande potencial nesta área. Foram construídos, no laboratório de Bioprodutos do Instituto de Ciências Biomédicas-USP, recombinantes da bactéria *Burkholderia sacchari*, abrigando genes de *Aeromonas sp*, com o objetivo de se ter um organismo seguro capaz de produzir altos teores do copolímero. Este trabalho estudou aspectos da produção do copolímero 3HB-co-3HHx a partir de xilose e ácido hexanóico, por esses recombinantes, para dar subsídios à produção deste material com diferentes teores de 3HHx, potencialmente capazes de conferir variações nas propriedades e aplicações deste. Analisaram-se os perfis desses recombinantes, frente ao consumo de xilose e ácido hexanóico, para propor alternativas metabólicas para o aprimoramento no consumo de xilose por esses mutantes a partir da análise de fluxos metabólicos. A xilose foi selecionada como principal fonte de carbono por ser uma pentose oriunda de hidrolisados hemicelulósicos do bagaço de cana-de-açúcar que se apresenta como um resíduo da produção de etanol de segunda geração. Foram testados seis recombinantes, abrigando os genes P, C e J de *Aeromonas sp*. ou *Aeromonas hydrophila*, em frascos agitados, selecionando-se o recombinante *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} para ensaios em biorreator. Esses experimentos, em meio de cultura contendo xilose mais ácido hexanóico como fontes de carbono, permitiram delimitar: a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{max}=0,18 \text{ h}^{-1}$), a eficiência de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}=0,40 \text{ g.g}^{-1}$) e a eficiência de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}=0,89 \text{ g.g}^{-1}$), este último maior do que dados reportados na literatura. Foram propostas e aplicadas condições para experimentos visando modular o teor de 3HHx no copolímero a partir de xilose e ácido hexanóico em biorreator. As células foram capazes de acumular entre 35 a 64% da biomassa na forma de PHA. Os teores de 3HHx nos copolímeros variaram de 10 mol% a 40mol %, mostrando que é possível controlar a composição monomérica e as propriedades do material. Os valores obtidos foram superiores a experimentos da literatura com glicose e ácido hexanóico. Finalmente, utilizaram-se os programas *Metatool* e *Matlab* para análise preliminar de fluxos metabólicos, sendo observada a necessidade de se melhorar a produção de poder redutor (NADPH) pela célula.

Palavras chave: Poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato). Copolímeros biodegradáveis. Xilose. *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. Ensaios em biorreator. Análise de fluxos metabólicos.

ABSTRACT

The environmental impact of products of petrochemical origin, such as plastics, has led to the search for similar materials that are environmentally friendly and can be produced from renewable sources. An alternative is the polyhydroxyalkanoates (PHA), a family of thermoplastic or elastomeric polyesters, biodegradable and biocompatible, accumulated by some bacteria. The incorporation and modulation of variable monomers to the PHA structure present potential for the development of new materials for medical applications. Recent literature and patents have reported poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate copolymers (3HB-co-3HHx) as products of great potential in this area. *Burkholderia sacchari* recombinants, harboring *Aeromonas sp.* genes, were constructed in the laboratory of Bioproducts of the Institute of Biomedical Sciences-USP, with the objective of having a safe organism capable of producing high levels of the copolymer. This work studied some aspects of the production of 3HB-co-3HHx from xylose and hexanoic acid, by these recombinants, to subsidize the production of this material with different levels of 3HHx, potentially conferring improved properties to the copolymer and widening its applications. Recombinants profiles in xylose and hexanoic were analyzed, to propose metabolic alternatives to improve xylose consumption based on metabolic flux analysis. Xylose was selected as the main carbon source due to the fact that, besides being a significant component of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates, it is a residue of second generation ethanol production. Six *B. sacchari* recombinants, harboring genes P, C and J from *Aeromonas sp.* or *Aeromonas hydrophila*, were tested shaken flasks; recombinant *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2 :: *phaPCJ_{Asp}* was selected for bioreactor experiments. The parameters delimited were: the maximum specific growth rate ($\mu_{max} = 0,18 \text{ h}^{-1}$), the efficiency in converting xylose to 3HB monomers ($Y_{3HB/xil} = 0,40 \text{ g.g}^{-1}$), the efficiency in converting hexanoic acid to 3HHx monomers ($Y_{3HHx/AHex} = 0,89 \text{ g.g}^{-1}$) in culture medium containing xylose plus hexanoic acid as carbon sources. Conditions were proposed and applied in order to modulate 3HHx content in the copolymer. Cells were able to accumulate from 35 to 64% of cell dry biomass as PHA. 3HHx content in the copolymers ranged from 10 mol% to 40 mol%, evidencing the possibility of controlling monomers composition and thus polymer properties. Moreover, those figures were higher than previous values from the literature. Finally, *Metatool* and *Matlab* programs were tested as a preliminary analysis of metabolic fluxes, indicating the the need for the cell to improve reducing power production (NADPH).

Keywords: Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Biodegradable copolymers. Xylose. *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2 :: *phaPCJ_{Asp}*. Bioreactor tests. Analysis of metabolic transfers.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Células bacterianas contendo grânulos citoplasmáticos de PHA35
- Figura 2:** Vias do catabolismo de xilose. Via de *Dahms* em azul; Via de *Weimberg* em verde; Via da xilose *isomerase* em laranja; e Via da xilose redutase em roxo..38
- Figura 3:** Valores de biomassa total alcançados pelas bactérias testadas durante os blocos experimentais 1, 2 e 3, com o fornecimento de xilose (15-20 g.L⁻¹) e Ácido hexanóico (1 g.L⁻¹). As bactérias apresentadas são: *B. sacchari* selvagem LFM 101, *B. sacchari* LFM 344 mutante PHA⁻, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPC*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM101 pBBR1MCS-2::*phaJ*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ*_{Ahy} e *B. sacchari* LFM 344PBBRMCS-2 Plasmídeo sem inserto.....51
- Figura 4:** Biomassa residual produzida pelas diferentes bactérias ao final de cada bloco experimental. A biomassa residual se refere à subtração da biomassa total pelo valor obtido de PHA em gramas. As bactérias apresentadas são: *B. sacchari* selvagem LFM 101, *B. sacchari* LFM 344 mutante PHA⁻, *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPC*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaC*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM101 pBBR1MCS-2::*phaJ*_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaCJ*_{Ahy} e *B. sacchari* LFM 344PBBRMCS-2 Plasmídeo sem inserto.....52
- Figura 5:** Comparação entre o desempenho da linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 e mutante PHA⁻ LFM 344 durante os blocos experimentais. (1) Primeiro experimento. (2) segundo experimento. (3) Terceiro experimento.53
- Figura 6:** Perfil de crescimento de *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} em meio mineral contendo xilose a 6 g.L⁻¹ e sulfato de amônia 3 g.L⁻¹ para determinação do melhor tempo de inóculo para ensaio em biorreator. A linhagem *B. sacchari* LFM 101 foi utilizada nos experimentos A00 e A01 e a linhagem *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} para os ensaios A02 a A1257
- Figura 7:** Primeiro bloco de experimentos. Experimentos A00 e A01: Experimentos A00 e A01: Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM 101. Experimento A00: Limitação em fósforo. Experimento A01: Limitação em nitrogênio. Experimentos A00 e A01: Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp}. Experimento A02: Limitação em nitrogênio. Experimento A03: Limitação em fósforo.68
- Figura 8:** Experimento de produção de 3HB por *B. sacchari* LFM 101. (Ensaio A00 e A01) cultivo suprido com uma adição inicial de xilose para uma concentração de 15g.L⁻¹ e

manutenção da concentração de xilose em um valor acima de 5g.L^{-1} por meio de pulsos de alimentação durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (g.L^{-1}) ao longo do tempo.....69

Figura 9: Experimento de produção de 3HB por *B. sacchariPCJ_{Asp}*. (Ensaio A02 e A03) cultivo suprido com uma adição inicial de xilose para uma concentração de 15g.L^{-1} e manutenção da concentração de xilose em um valor acima de 5g.L^{-1} por meio de pulsos de alimentação durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.73

Figura 10: Comparação porcentual dos níveis de 3HB produzido ao longo do experimento sob limitação de nitrogênio (A02) ou fósforo (a03) pela linhagem recombinante *B. sacchariPCJ_{Asp}*.....76

Figura 11: Segundo bloco de experimentos. Linhagem avaliada: *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Experimento A04 e A07: Fornecimento de xilose e Ácido Hexanóico durante a fase estacionária através de alimentação contínua. Experimentos B05,A06 e A06REP: Fornecimento de xilose durante a fase estacionária através de alimentação contínua.....79

Figura 12: Produção de 3HB-co-3HHx por *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Cultivo suprido com um batch inicial de xilose com concentração de 15g.L^{-1} e alimentação contínua de xilose ($0,37\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e ácido hexanóico ($0,06\text{g.L}^{-1}$) durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.81

Figura 13: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A04.81

Figura 14: Experimento para a produção de 3HB por *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* para ajuste de alimentação contínua (Ensaio B05). Cultivo suprido com adição inicial de xilose para uma concentração de 10g.L^{-1} e fornecimento contínuo de xilose ao longo do cultivo conforme as necessidades do bioprocessos. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.....84

Figura 15: Vazão de alimentação ao longo do cultivo B0585

Figura 16: Experimento de produção de 3HB por *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* (Ensaio A06 e A06REP). Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose

para uma concentração de 10 g.L ⁻¹ e fornecimento contínuo de xilose ao longo do cultivo conforme as necessidades do bioprocessamento. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH ₄ ⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.	88
Figura 17: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A06REP	89
Figura 18: Comparação dos fatores de conversão obtidos ao longo dos cultivos A06 e A06EP.....	92
Figura 19: Comparação do perfil de consumo de xilose nos ensaios A06 e A06REP.....	92
Figura 20: Produção de 3HB-co-3HHx por <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} . Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose com concentração de 10g.L ⁻¹ e alimentação contínua de xilose (0, 45g.L ⁻¹) e Ácido hexanóico (0,07 g.L ⁻¹). Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH ₄ ⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.....	94
Figura 21: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A07	95
Figura 22: Estratégias de alimentação contínua de xilose ou xilose e ácido hexanóico ao longo do segundo e terceiro bloco de experimentos.	98
Figura 23: Terceiro bloco de experimentos. Linhagem avaliada: <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} . Limitação em Nitrogênio. Experimento A09 a A11: Fornecimento de xilose e Ácido Hexanóico durante a fase estacionária. Experimento A12: Fornecimento de xilose durante a fase estacionária.....	99
Figura 24: Produção de 3HB-co-3HHx por <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} (A09 a A11) e 3HB (A12). Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose com concentração de 10 g.L ⁻¹ e alimentação contínua de xilose para os cultivos A09 a A12 (0,45 g.L ⁻¹) e ácido hexanóico para os cultivos A09 a A11 (0,04 g.L ⁻¹ , 0,02 g.L ⁻¹ e 0,03 g.L ⁻¹) durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH ₄ ⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.....	102
Figura 25: Comparação do acúmulo médio de PHA porcentual ao longo dos ensaios (A09, A10 e A11) envolvendo modulação da composição de 3HHx no copolímero (3HB-co-3HHx).....	107
Figura 26: Comparação do consumo de xilose ao longo dos ensaios (A09, A10 e A11) envolvendo modulação da composição de 3HHx no copolímero (3HB-co-3HHx).	108

Figura 27: Fração molar de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx ao longo dos ensaios A09a A11.	109
Figura 28: Relações molares de ácido hexanóico e xilose supridos e o percentual molar de 3HHx formado para os cultivos de modulação da composição de 3HB-co-3HHx por <i>LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> em biorreator (A07, A09, A10 e A11).	110
Figura 29: Experimento com <i>B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> (A11) utilizando MM e alimentação de Xilose (97g.L ⁻¹) e ácido hexanoico (6,8 g.L ⁻¹) a uma vazão de alimentação de 4,6 mL.L ⁻¹ .h ⁻¹ . Estado pseudo-estacionário definido 29,5h - 38h de cultivo (Fase 1) e 55,5h-67,5h (Fase 2).	112
Figura 30: Representação gráfica das velocidades de consumo de O ₂ (OUR) e formação de CO ₂ (CER) em mmol/L.h. Determinação dos estados pseudos-estacionários através da respiração. Estado pseudo-estacionário definido 29,5h - 38h de cultivo (Fase 1) e 55,5h-67,5h (Fase 2). Consumo médio de O ₂ para a Fase 1 igual a 0,93 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ – Desvio padrão igual a 0,04. Para a Fase 2 o consumo médio de O ₂ foi igual a 0,21 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ - Desvio padrão igual a 0,05. Formação de CO ₂ para a Fase 1 igual a 1,54 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ - Desvio padrão igual a 0,03. Para a Fase 2 a formação média de CO ₂ foi igual a 0,78 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ - Desvio padrão igual a 0,05.	113
Figura 31: Experimento com <i>B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> (A12) utilizando MM e alimentação de Xilose (98 g.L ⁻¹) a uma vazão de alimentação de 4,6 mL.L ⁻¹ .h ⁻¹ . Estado pseudo-estacionário definido entre 30h – 40h (Fase 1) e 52h- 58h (Fase 2) de cultivo.	113
Figura 32: Representação gráfica das velocidades de consumo de O ₂ (OUR) e formação de CO ₂ (CER) em mmol/L.h. Determinação dos estados pseudos-estacionários através da respiração. Estado pseudo-estacionário definido 30h - 40h de cultivo (Fase 1) e 52h-58h (Fase 2). Consumo médio de O ₂ para a Fase 1 igual a 1,02 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ – Desvio padrão igual a 0,08. Para a Fase 2 o consumo médio de O ₂ foi igual a 0,37 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ -Desvio padrão igual a 0,04. Formação de CO ₂ para a Fase 1 igual a 1,71 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ - Desvio padrão igual a 0,06. Para a Fase 2 a formação média de CO ₂ foi igual a 0,94 mmol. g ⁻¹ .h ⁻¹ - Desvio padrão igual a 0,04.	114
Figura 33: Esquema representativo do modelo proposto para análise de fluxos metabólicos nos cultivos de <i>B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i>	116
Figura 34: Grupo 1- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em <i>B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> a partir do fornecimento de xilose e eliminação no	

fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 119

Figura 35: Grupo 2- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 120

Figura 36: Grupo 2-Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 121

Figura 37: Grupo 2- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 122

Figura 38: Grupo 3- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 123

Figura 39: Grupo 3- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação. 124

Figura A.1: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) do experimento A00. 143

Figura A.2: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A00. Biomassa residual (X_r) considerada: 9,8 g. 143

Figura A.3: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A00. Biomassa residual (X_r) considerada: 9,8 g. 143

Figura A.4: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A00. 144

Figura A.5: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A01.....	144
Figura A.6: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A01. Biomassa residual (X_r) considerada: 29,7 g.....	144
Figura A.7: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A01. Biomassa residual (X_r) considerada: 29,7 g.....	145
Figura A.8: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A01.....	145
Figura A.9: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A02.....	145
Figura A.10: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A02. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,8 g.....	146
Figura A.11: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A02. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,8 g.....	146
Figura A.12: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A02.....	146
Figura A.13: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A03.....	147
Figura A.14: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A03. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.....	147
Figura A.15: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A03. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.....	147

Figura A.16: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A03.....	148
Figura A.17: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A04.....	148
Figura A.18: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.....	148
Figura A.19: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.....	149
Figura A.20: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.....	149
Figura A.21: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.....	149
Figura A.22: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.....	150
Figura A.23: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A04.....	150
Figura A.24: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A04.....	150
Figura A.25: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento B05.....	151
Figura A.26: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento B05. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.....	151

Figura A.27: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento B05. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.....	151
Figura A.28: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento B05.....	152
Figura A.29: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A06REP. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,6 g.....	152
Figura A.30: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A06REP. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,6 g.....	152
Figura A.31: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A06REP.....	153
Figura A.32: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.....	153
Figura A.33: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.....	153
Figura A.34: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.....	154
Figura A.35: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.....	154
Figura A.36: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.....	154
Figura A.37: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A07.....	155

Figura A.38: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A07.....	155
Figura A.39: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	155
Figura A.40: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	156
Figura A.41: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	156
Figura A.42: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	156
Figura A.43: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	157
Figura A.44: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A09.....	157
Figura A.45: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A09.....	157
Figura A.46: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	158
Figura A.47: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	158
Figura A.48: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	158

Figura A.49: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	159
Figura A.50: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.....	159
Figura A.51: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A10.....	159
Figura A.52: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A10.....	160
Figura A.53: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.....	160
Figura A.54: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.....	160
Figura A.55: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.....	161
Figura A.56: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.....	161
Figura A.57: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.....	161
Figura A.58: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A11.....	162
Figura A.59: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A11.....	162

Figura A.60: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A12. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,5 g.....162

Figura A.61: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A12. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,5 g.....163

Figura A.62: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A12.....163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens utilizadas nos experimentos em frascos agitados e biorreatores.....	41
Tabela 2: Formulações de meio de cultura para biorreator testados.	42
Tabela 3: Primeiro bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> em MM limitado em nitrogênio e excesso de xilose e fornecimento de 1(g.L ⁻¹) de ácido hexanóico após 24h de cultivo. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.....	47
Tabela 4: Segundo bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> em MM limitado em nitrogênio e excesso de xilose e fornecimento de 1 (g.L ⁻¹) de ácido hexanóico após 24h de ensaio. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.....	48
Tabela 5: Terceiro bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de <i>B. sacchari</i> em MM limitado em nitrogênio e excesso de xilose e fornecimento de 1 (g.L ⁻¹) de ácido hexanóico. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.	49
Tabela 6: Resumo dos trabalhos conduzidos em biorreator.	59
Tabela 7: Resumo dos parâmetros experimentais obtidos a partir de ensaios em biorreator.	63
Tabela 8: Padronização dos resultados obtidos nos três blocos experimentais com o objetivo de se comparar a similaridade entre os mesmos.	66
Tabela 9: Cultivos de <i>B. sacchari</i> LFM 101 em biorreator (A00 e A01) para biossíntese de 3HB a partir de xilose.....	71
Tabela 10: Cultivos de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} em biorreator (A02 e A03) para biossíntese de 3HB a partir de xilose.....	75
Tabela 11: Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} em biorreator (A04) para biossíntese de 3HB-co3HHx a partir de Xilose e ácido hexanóico.	83
Tabela 12: Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} em biorreator (B05) para para ajuste da vazão de alimentação de xilose.	86
Tabela 13: Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} em biorreator (A06 e A06REP) para ajuste da vazão de alimentação de xilose.	90
Tabela 14: Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ _{Asp} em biorreator (A07) para biossíntese de 3HB-co-3HHx a partir de Xilose e ácido hexanóico e validação da vazão de alimentação.	96

Tabela 15: Cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ</i> _{Asp} em biorreator (A09 a A12) para biossíntese de 3HB-co-3HHx e 3HB a partir de Xilose (A09 a A12) e ácido hexanóico (A09 a A11) para modulação da composição da quantidade molar de 3HHx.	103
Tabela 16: Experimentos em biorreator utilizados para a análise de fluxos metabólicos.	115
Tabela 17: Simulação dos vetores de fluxos metabólicos em diferentes experimentos em biorreator utilizando-se o <i>MatLab</i>	117
Tabela A.1: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o primeiro bloco de experimentos.....	140
Tabela A.2: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o segundo bloco de experimentos.....	141
Tabela A.3: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o terceiro bloco de experimentos.....	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – 3-hidroxibutirato
3HD – 3-hidroxidecanoato.
3HDD – 3-hidroxidodecanoato
3HHp – hidroxihexanoato
3HHx – 3-hidroxihexanoato
3HO – 3-hidroxiocetanoato
3HV – 3-hidroxivalerato
3MASCL – 3-malonoil-CoA de cadeia curta (4 carbonos)
4HB – 4-hidroxibutirato
AcCoA – acetil-CoA
acoA – gene codificador da enzima piruvato desidrogenase
AFM – Análise de Fluxos Metabólicos
ATCC – *American Type Cell Culture*;
BPG13 – 1,3-bisfosfoglicerato
ButCoA – butanoil-CoA
ButenCoA – butenoil-CoA
CButCoA – ceto-butiril-CoA
CER – velocidade de formação de CO₂, do inglês *Carbon Evolution Rate*
CG – cromatografia gasosa
CHexCoA – ceto-hexanoil-CoA
Cit – citrato
CoA – acetil-CoenzimaA
CoA – coenzima A
CoASH – coenzima A
Conab- Companhia Nacional de Abastecimento
DHP – dihidroxicetona
DO – densidade óptica
E4P – eritrose-4-fosfato
F16P – frutose-1,6-bisfosfato
F6P – frutose-6-fosfato
Fum – fumarato
G3P – gliceraldeído-3-fosfato
G6P – glicose-6-fosfato

GLX – glioxilato

HA – hidroxiacil-CoA.

HALCL – hidroxiacil-CoA de cadeia longa (mais de 14 carbonos) (do inglês *Long Chain Length*)

HAMCL – hidroxiacil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *Medium Chain Length*)

HASCL – hidroxiacil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *Short Chain Length*)

HButCoA – hidroxibutiril-CoA

HexCoA – hexanoil-CoA

HexenCoA – hexenoil-CoA

HHexCOA – hidroxihexanoil-CoA

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

IsoCit – isocitrato

KDPG2 – 2-ceto-desoxi-6-fosfogluconato

KG2 – α -cetoglutarato

LDPE – polietileno de baixa densidade

LFM – Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos

Mal – malonato

MM - meio mineral

MSC -massa seca celular

OAA – oxaloacetato

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

P3HB - poli-3-hidroxibutirato P(3HB-co-3HA) - poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxialcanoato).

P (3HB-co-3HHx) – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)

P (3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)

P (3HB-co-3HV-co-3HHp) – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-3hidroxiheptanoato)

P (3HB-co-3HV-co-3HHx) – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-3-hidroxihexanoato)

P (3HB-co-3HV-co-4HB) – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato-co-4-hidroxibutirato)

P (3HB-co-4HB-co-3HHx) – poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)

P (3HHx) – poli(3-hidroxihexanoato).

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

PEP – fosfoenolpiruvato

PG2 – 2-fosfoglicerato
PG3 – 3-fosfoglicerato
PG6 – 6-fosfogluconato
PHA- – ausência de acúmulo de PHA;
PHA – polihidroxialcanoato
PHA+ – acúmulo de PHA;
phaA – gene codificador da enzima β -cetotiolase
PhaA – β -cetotiolase
phaB – gene codificador da enzima acetoacetil-CoA redutase
PhaB –acetoacetil–CoA redutase NADPH dependente
phaC – gene codificador da enzima PHA sintase ou polimerase
PhaC – PHA sintase ou polimerase
phaCAB – operon de biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha*.
PhaJ – enoil-CoA hidratase (*R*)-específica
phaJ – gene codificador da enzima enoil-CoA hidratase (*R*)-específica
PHAMCL – polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *medium chain length*)
phaP – gene codificador da enzima PHAsina
PhaP – PHAsina, enzima associada ao grânulo
phaPCJ – operon de biossíntese de PHA de *Aeromonas* spp.
PhaR – subunidade da enzima PHA sintase de classe IV
PHASCL – polihidroxialcanoato com monômeros de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *short chain length*)
PhaZ – enzimas despolimerizadoras de PHA (despolimerases)
PIR – piruvato
PNTAB –trans-hidrogenase de membrana
Rb5P – ribose-5-fosfato
Rbl5P – ribulose-5-fosfato
S7P – sedoheptulose-7-fosfato
Suc – succinato
SucCoA – succinil-CoA ;
Tg – temperatura de transição vítrea
Tm – temperatura de fusão
UDH – trans-hidrogenase solúvel
X5P – xilulose-5-fosfato

X_r – biomassa residual (massa de células sem polímero)

X_t – biomassa total (massa de células e polímero)

Y – fator de conversão de substrato em produto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	30
2	SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL	33
2.1	Biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produzir PHA	33
2.2	<i>Burkholderia sacchari</i> e construção de linhagens recombinantes para melhoramento da fração molar de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx.	35
2.3	Metabolismo da xilose e utilização de hidrolisado hemicelulósico por <i>B. sacchari</i> para produção de PHA	37
2.4	Análises de fluxos metabólicos (AFM).....	39
3	Objetivo	40
3.1	Objetivos específicos.....	40
4	Material e métodos	41
4.1	Microrganismos	41
4.2	Meios de cultura	41
4.2.1	Meios de cultura para cultivo em frascos agitados e para ensaios em biorreator.....	41
4.3	Ensaio em frascos agitados.....	42
4.3.1	Ensaio de acúmulo de PHA para seleção de recombinante para ensaios em biorreator... ..	42
4.3.2	Ensaio em frascos agitados para determinação de tempo de inóculo para experimentos em biorreator	43
4.4	Ensaio em biorreator	44
4.4.1	Ensaio em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM 101 e <i>B. sacchari</i> LFM 344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> adotando diferentes estratégias de cultivo	44
4.5	Análise de fluxos metabólicos (AFM)	44
4.6	Metodologias analíticas	45
5	Resultados e discussões	46
5.1	Avaliação da capacidade de acúmulo de copolímero 3HB-co-3HHx pelas linhagens recombinantes a partir de xilose e ácido hexanóico como fontes de carbono... ..	46
5.2	Ensaio em biorreatores.....	56

5.2.1	Determinação das condições de inóculo para experimentos em biorreator com as linhagem selvagem <i>B. sacchari</i> LFM 101 e <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i>	56
5.2.2	Estratégias para o cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM 101e <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> em biorreator	58
5.2.3	Resumo dos resultados obtidos durante os cultivos de <i>B. sacchari</i> selvagem e <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> em biorreator.....	61
5.2.4	Padronização dos resultados obtidos durante o cultivo de <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> em biorreator.....	65
5.2.5	Primeiro bloco de experimentos	68
5.2.5.1	Avaliação da linhagem selvagem <i>B. sacchari</i> LFM 101 na produção de 3HB a partir de xilose em cultivos limitados em fósforo ou nitrogênio	68
5.2.5.2	Experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> com limitação em nitrogênio e fósforo para cálculo de velocidades de consumo de xilose	72
5.2.6	Segundo bloco de experimentos	78
5.2.6.1	Experimento em biorreator para verificação da vazão de alimentação anteriormente calculada com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> em meio limitado em nitrogênio utilizando vazão específica de alimentação de xilose e ácido hexanóico.....	79
5.2.6.2	Ajuste da vazão de alimentação calculada em experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> com limitação em nitrogênio.....	84
5.2.6.3	Ajuste da vazão de alimentação para se obter maiores quantidades de PHA em relação à biomassa total a partir de experimento em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i>	87
5.2.6.4	Validação da vazão de alimentação utilizada nos experimentos anteriores a partir de ensaios em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i> com limitação em nitrogênio	93
5.2.7	Terceiro bloco de experimentos	99
5.2.7.1	Modulação de copolímero 3HB-co-3HHx e produção de 3HB a partir de uma vazão única e contínua de alimentação em experimentos em biorreator com <i>B. sacchari</i> LFM344 <i>pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i>	99

6 Análise preliminar dos fluxos metabólicos	110
6.1 Determinação dos estados pseudo-estacionários e cálculos de velocidade de consumo de substrato e produção de PHA e balanço de carbono durante a fase de acúmulo.....	111
6.2 Geração de modos elementares no <i>Metatool</i> para representação das redes metabólicas.....	115
6.3 Otimização de dados no programa <i>Matlab</i> para determinação dos fluxos metabólicos.....	117
6.4 Análise do metabolismo de <i>B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}</i>	118
7 Conclusão	126
Referências	128
Apêndices.....	139
APÊNDICE A-.....	140
Tabelas de dosagens de substratos iniciais e finais de experimentos em frascos agitados.....	140
APÊNDICE B-.....	143
Gráficos utilizados para determinar os parâmetros experimentais dos ensaios em biorreatores A00-A12.....	143
APÊNDICE C-.....	164
Arquivo de entrada para o arquivo <i>Metatool</i>	164
APÊNDICE D-.....	166
Agrupamentos de modos elementares em famílias. Cada cor representa uma família.....	166
APÊNDICE E-.....	169
Fluxo na via das pentoses durante os períodos pseudo-estacionários 1 e 2 a partir do fornecimento de xilose ou xilose e ácido hexanóico.	169
ANEXOS.....	173
ANEXO A-.....	174
Artigo submetido	174

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Nas décadas recentes, devido ao impacto ambiental do uso de plásticos de origem petroquímica, de difícil degradação, diversas alternativas vêm sendo estudadas para se produzirem materiais dotados das mesmas propriedades, que sejam menos danosos ao meio ambiente. Uma dessas alternativas são os polihidroxicanoatos (PHA), que constituem uma classe de ésteres poliméricos, presentes tanto em procariotos quanto em eucariotos, porém, a quantidade detectada nesses últimos é considerada baixa, quando comparada à capacidade em que os procariotos têm em acumular até 80% de sua biomassa na forma de PHA (SILVA et al., 2001, SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014). O poli β -hidroxibutirato (PHB) foi o primeiro tipo de PHA descoberto, em 1923 por Lemoigne (GOMEZ, 1994), tendo sido inicialmente utilizado como um dado adicional na identificação bacteriana. A partir da década de 1980, suas propriedades termoplásticas foram detectadas e, com isso, surgiu o interesse na sua produção em maior escala (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

O acúmulo de PHA por bactérias ocorre em forma de grânulos citoplasmáticos. Nos microrganismos, os PHA constituem uma reserva de carbono, energia e equivalentes redutores, tendo sido reportado seu envolvimento em processos de resistência à pressão osmótica, a proteção da célula contra a dessecação e a ação dos raios ultravioleta (UV) (BRANDL et al, 1990). Para que o microrganismo seja capaz de acumular o biopolímero de modo mais expressivo, em geral, é necessário que no meio de cultivo haja excesso da fonte de carbono e a limitação simultânea de ao menos um nutriente essencial a sua multiplicação, como nitrogênio, fósforo, oxigênio e etc. (LAFFERTY et al., 1988; BRANDL et al., 1990).

Além de serem termoplásticos, ou seja, poderem ser conformados e moldados sob ação do calor (SILVA et al., 2004), PHA são biocompatíveis e assim podem ser empregados em procedimentos cirúrgicos, sem que haja rejeição do órgão ou tecido, e na produção de cápsulas para liberação controlada de fármacos (SILVA et al., 2001), entre outras aplicações médico-farmacêuticas. São biodegradáveis por fungos e bactérias, quando descartados no meio ambiente, liberando como produtos CO₂ e água (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Em meio intracelular, a degradação ocorre por meio de enzimas denominadas PHA

despolimerases e é realizada em todos os microrganismos que possuem a capacidade de acumular esse polímero naturalmente (GOMEZ, 1994). Uma vantagem industrial e ambiental dos PHA é que podem ser produzidos a partir de matérias-primas de baixo custo econômico e de fontes renováveis, como carboidratos, óleos vegetais e até mesmo a partir de resíduos agroindustriais (SILVA et al., 2007, SILVA et al., 2014).

Diversos estudos foram realizados para buscar no meio ambiente bactérias com bom potencial de produção de PHA, destacando-se neste trabalho *Burkholderia sacchari*, isolada no Brasil a partir de solo de canavial (GOMEZ et al., 1996, BRÄMER et al., 2001, ALEXANDRINO et al., 2015) sendo capaz de produzir até 80% da biomassa na forma de PHA. Esta bactéria mostrou-se promissora para uso industrial, sendo alvo de patente (SILVA;GOMEZ.,2013), tendo sido utilizada em estudos recentes e proposta como plataforma biológica para a expressão de genes de outras vias envolvidos na produção de PHA, visando obter PHA com composição monomérica variável, o que implica na diversificação de propriedades físico-químicas e, portanto, ampliando suas aplicações, diretamente dependentes dessa composição monomérica, como apresentado mais adiante (GOMEZ et al., 1996, SILVA et al., 2000, BRÄMER et al., 2001, 2002, SILVA et al., 2004, PEREIRA et al., 2009; LOPES et al 2009; 2011, MENDONÇA et al., 2013; SILVA et al., 2015; MENDONÇA et al., 2016, NASCIMENTO et al., 2016). Os monômeros constituintes dos PHA podem ser hidroxialcanoatos dotados de estrutura química de cadeia curta (SCL), contendo 3-5 átomos de carbono, ou ainda, monômeros de cadeia média (MCL), com 6-12 carbonos. Copolímeros contendo mais de um monômero diferente podem ser formados a depender da especificidade da PHA sintase, enzima responsável pela esterificação dos monômeros. Quatro classes de PHA sintases foram descritas e, de modo geral, têm especificidade ou para monômeros SCL ou MCL, sendo difícil incorporar percentuais equivalentes de ambos (MADISON; HUISMAN, 1999; RHEM 2003). Este aspecto é relevante, já que, a variedade da composição monomérica determina as propriedades mecânicas do polímero e, conseqüentemente suas aplicações. A partir de carboidratos como xilose ou sacarose, o PHA produzido é o 3HB cristalino e quebradiço, com limitadas aplicações (SUDESH et al., 2000). A inserção de outros monômeros na cadeia, como 3-hidroxivalerato (3HV), 4-hidroxibutirato (4HB), ou especialmente monômeros de cadeia média (mcl-HA) com 6 (3- hidroxihexanoato, 3HHx) ou mais

átomos de C confere maior elasticidade aos PHA. O copolímero P (3HB-co-3HHx) exibe uma flexibilidade adequada para muitos usos, com propriedades mecânicas similares ao polietileno de baixa densidade, tornando-se mais flexível com o aumento do teor de 3HHx. Atualmente, várias empresas estão investindo na produção deste copolímero. A Kaneka no Japão e Bélgica produzem a AONILEX®, a base de 3HB-co-HHx. A Meredian, Ga, USA, inaugurou recentemente o que parece ser a maior instalação de produção de PHA, principalmente dos copolímeros (PHB-co-HHx) P (3HB-co-3HO, 3HO:3-hidroxiocetanoato) e (3HB-co-3HOD, 3HOD: 3-hidroxiocetadecanoato), com uma capacidade anual de cerca de 300.000 toneladas. O uso de 3HB-co-3HHx tem sido reportado na área médica (tecidos cartilagosos, suporte para a proliferação de células ósseas e musculares) (LIZARRAGA-VALDERRAMA et al., 2015). 3HB-co-3HHx é naturalmente produzido por bactérias pertencentes ao gênero *Aeromonas*, (*A. caviae* e *A. hydrophila*) a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos com uma incorporação de 5 a 25 % molar de 3HHx (DOI et al., 1995; Lu et al., 2005). No entanto, a porcentagem (m/m) em copolímero é geralmente baixa e a separação das células é difícil devido à elevada viscosidade do meio decorrente da fonte de C utilizada. *B. sacchari* demonstrou ser capaz de acumular cerca de 60 % de PHB a partir de hidrolisados lignocelulósicos (SILVA et al., 2004; CESÁRIO et al., 2014) e de sintetizar 3HB-co-3HHx a partir de glicose e ácido hexanóico (MENDONÇA et al., 2012, MENDONÇA et al., 2013, MENDONÇA et al., 2014) com uma incorporação de cerca de 2 % de 3HHx. De modo a aumentar a incorporação dos monômeros de 3HHx na cadeia polimérica, foram construídos recombinantes de *B. sacchari* com genes de *A. hydrophila* ou genes de *Ralstonia eutropha* envolvidos na síntese de PHA, tendo-se obtido 10 a 15 vezes maior teor de HHx no copolímero, modulando o teor de 3HHx no PHA (MENDONÇA, 2009; MENDONÇA et al., 2012; MENDONÇA et al., 2013 a, b; TAVARES et al., 2012; MENDONÇA et al., 2017).

Em projeto finalizado no nosso laboratório (FAPESP BeBasic, processo 2012/51533-6), em colaboração com a empresa ChainCraft, B. V. (<http://www.chaincraft.nl/home-en/>), esta desenvolveu um processo em que, a partir de resíduos agro-alimentícios, gerou uma mistura de ácidos graxos de cadeia média (MCFA) especialmente desenhada para alimentar os recombinantes construídos, que foram testados nessa mistura de MCFA em presença de glicose

(Mendonça et al., artigo em preparação).

No Brasil, com o desenvolvimento de etanol de 2ª geração e a incapacidade de leveduras fermentarem a xilose a etanol de modo eficiente, há a perspectiva de haver grandes quantidades de xilose disponíveis para gerar outros produtos (SILVA et al., 2015). Embora diversas iniciativas tenham sido anunciadas, dados científicos ainda são escassos. Biopolímeros da família dos PHA tem sido um dos bioprodutos modelo de estudo empregando diversos derivados de biomassa.

Neste contexto, este trabalho de mestrado se propõe a avaliar linhagens de *B. sacchari* construídas por Mendonça 2014, abrigando genes do operon *phaPCJ* de *Aeromonas sp.*

2 SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

2.1 Biomassa lignocelulósica como matéria-prima para produzir PHA

Essencialmente as plantas são formadas por três tipos básicos de polímeros: lignina, hemicelulose e celulose. Vários fatores podem interferir na composição desses compostos presentes no vegetal, tais como: fatores ambientais, como a disponibilidade de água, luz, dióxido de carbono, temperatura, pH do solo ou fatores internos, como as características genéticas intrínsecas à espécie (BAJPAI, 2016; CARERE et al., 2008; CHANDRA et al., 2007; KICHISE; TAGUCHI; DOI, 2002)

Matérias-primas lignocelulósicas necessitam de um pré-tratamento químico para produzir um substrato que possa ser facilmente degradado por enzimas de origem industrial ou por enzimas provenientes de microrganismos, representando assim uma etapa a ser superada na obtenção de matéria-prima proveniente de compostos lignocelulósicos para a produção de biomateriais (BAJPAI, 2016). A celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal e sua função está ligada à sustentação e resistência contra impactos. Esse polímero é encontrado em eucariotos, como fungos e algas, e procariotos, como as bactérias. A hemicelulose é o segundo polímero mais abundante nos vegetais, representando cerca de 20% a 50 % da biomassa total lignocelulósica.

Diferentemente da celulose, a hemicelulose não possui uma composição química homogênea (BAJPAI, 2016; DESVAUX, 2005). A hemicelulose tem em sua composição diversos tipos de monossacarídeos. Entre esses monossacarídeos há pentoses, moléculas orgânicas formadas por cinco carbonos,

como a *D*-xilose e *D*-arabinose e monossacarídeos formados por seis carbonos como *D*-glicose, *D*-manose e *D*-galactose e ácidos urônicos como o 4-*o*-metilglicurônico, o *D*-glicurônico e o *D*-galactourônico (BAJPAI, 2016; SAHA, 2003). A hemicelulose pode ser um homopolímero ou um heteropolímero. A composição da hemicelulose é variável, por exemplo, em biomassa de origem agrícola, como os representantes da família *Poaceae*, a hemicelulose é composta principalmente de xilana (SILVA et al., 1998).

As xilanas são polímeros de xilose e podem ser classificadas em xilobiose, um dissacarídeo de xilose, em xilotriose, um trissacarídeo de xilose, em xilotetrose, um tetrassacarídeo de xilose e assim sucessivamente. Industrialmente, as xilanas são utilizadas para a fabricação de furfural, papel, adesivos e emulsificantes, em ração animal e em farinhas de trigo. A xilose, um monossacarídeo da xilana, tem sido aplicada na produção de etanol e xilitol e atualmente tem se buscado aplicá-la na produção de bioprodutos como os PHA a partir dos resíduos provenientes de biorrefinarias (KAMM, KAMM 2004; HAHN HARGEDAL et al., 2007; GRANSTRON et al., 2007).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é um dos principais produtos agrícolas brasileiro, sendo o Brasil o principal produtor mundial. A indústria canavieira brasileira é altamente qualificada para a produção desse vegetal, apresentando um ótimo custo benefício e excelentes perspectivas futuras para o aumento nessa produção. A cana-de-açúcar é responsável por manter cerca de 370 usinas e destilarias em funcionamento, gerando toneladas em resíduos agroindustriais. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), no ano de 2018 a safra de cana de açúcar chegou a 646,34 milhões de toneladas. Diante desses números exorbitantes na produção de cana-de-açúcar e na incapacidade de leveduras em fermentar pentoses hemicelulósicas como a xilose, a implementação da produção de PHA por bactérias, em biorrefinarias, a partir do bagaço hidrolisado, se faz uma opção financeiramente viável a produção de PHA, visto que mais de 50% dos custos desse produto provém da matéria-prima.

2.2 *Burkholderia sacchari* e construção de linhagens recombinantes para melhoramento da fração molar de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx.

Em 2001 *B. sacchari* foi reconhecida como uma nova espécie. (BRÄMER et al., 2001). *B. sacchari* foi isolada e descrita pelo professor doutor José Cabrera Gomez em 1994 em sua dissertação de mestrado intitulado “*Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos*”. A figura 1 apresenta a estrutura celular de *B. sacchari* e grânulos citoplasmáticos de PHA.

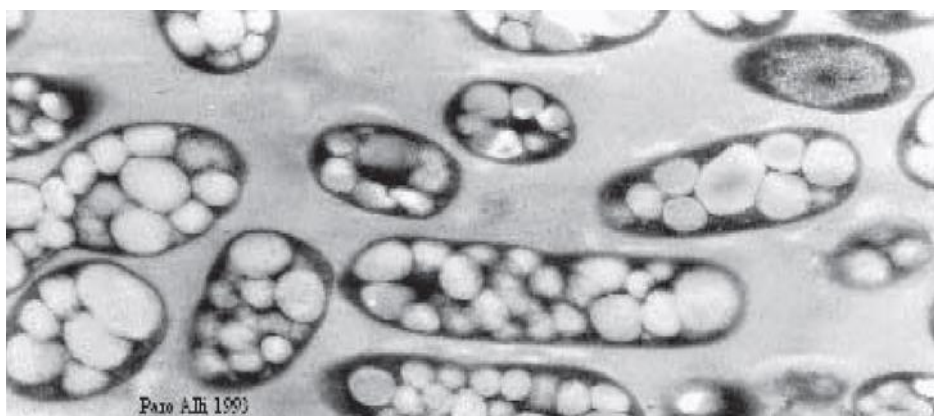


Figura 1: Células bacterianas contendo grânulos citoplasmáticos de PHA. Fonte: Retirado de SILVA et al. (2007). Cedido por ALLI, RC

Em seu trabalho foram realizadas análises da capacidade de acúmulo de bactérias isoladas a partir do solo de canavial frente ao uso de sacarose, frutose, glicose e ácido propiônico como fontes de carbono, tendo sido demonstrada a capacidade de *B. sacchari* em acumular cerca de 60% do seu peso em PHB (GOMEZ et al., 1996).

O microrganismo em questão apresenta estrutura celular em forma de bacilus, sendo gram negativa. O crescimento ótimo da cepa ocorre entre 28°C a 30°C. Essa espécie quando cultivada em excesso de xilose como fonte de carbono, com limitação em um nutriente ou mais nutriente essenciais, como o nitrogênio e o fósforo, acumula o homopolímero 3HB (GOMEZ et al. 1994, SILVA et al., 2000;).

Buffoni (2006) avaliou a capacidade de acúmulo de PHA em *B. sacchari* selvagem a partir de diferentes tipos de substratos. Foram fornecidos ao microrganismo trinta tipos de fontes de carbono e glicose como co-substrato. Entre as fontes de carbono utilizadas, estão diversos tipos de ácidos, tais como o ácido hexanóico. Os resultados desse trabalho indicaram a capacidade de *B. sacchari* em acumular monômeros de 3HHx a partir do fornecimento de ácido

hexanóico, entretanto, esse era acumulado em baixas quantidades (menos de 1% mol de 3HHx no copolímero) (BUFFONI, ERNESTO 2006; MENDONÇA et al., 2013).

Desde o final dos anos 80 se conhece a capacidade de alguns microrganismos em acumular frações de 3HHx associados ao acúmulo de 3HB. Biopolímeros com frações elevadas de monômeros de 3HHx tem despertado grande interesse da indústria biotecnológica. Quanto maiores as frações do monômero 3HHx no copolímero, maior é a maleabilidade do material, devido a mudanças nas propriedades físicas promovidas pela adição do monômero de 3HHx. Essa propriedade elastomérica amplia a aplicação deste material pela indústria (LEE; NA, 2013; QU et al., 2006). O copolímero 3HB-co-3HHx tem sido amplamente utilizado na área médica (LOMAS et al., 2012; WU; WANG; CHEN, 2009). Seu uso foi reportado na confecção de tecidos cartilagosos híbridos, na confecção de suporte ou molde na engenharia de tecidos (YANG et al., 2002), em culturas de células ósseas (YANG et al., 2004), na confecção de válvulas aórticas híbridas (WU et al., 2007), na liberação controlada de fármacos (HEATHMAN et al., 2014) entre outras aplicações. Dentre os microrganismos capazes de acumular monômeros de 3HHx estão: *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodococcus ruber*, *Nocardia corallina*, *Bacillus megaterium*, *Ralstonia eutropha*, *Comamonas testosteroni*, *Bacillus cereus* entre outros (GROSS et al., 1989; ULMER et al., 1989, HAYWOOD et al., 1991; DENNIS, 1994, CABALLERO; KAREL; REGISTER, 1995). O gênero *Aeromonas* destaca-se por possuir a capacidade de acumular frações molares de 3HHx em grandes quantidades devido a especificidade de sua *PHA sintase* por monômeros de cadeia média (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; SHEN et al., 2009; TAGUCHI et al., 1999; TSUGE et al., 2003; ZHANG et al., 2009). As espécies *Aeromonas caviae* e *Aeromonas hydrophila* demonstram-se capazes de produzir um copolímero com frações molares entre 5% a 25% de 3HHx quando óleos vegetais e ácidos graxos foram fornecidos. Embora produzam um copolímero com elevadas quantidades de 3HHx, o gênero *Aeromonas* apresenta células altamente patogênicas, o que na prática representa um risco durante o desenvolvimento de bioprocessos.

A eficiência no acúmulo de PHA nesse gênero também é considerada baixa, representando cerca de 40% do seu peso seco em biopolímero. Diante de fatores como, a alta eficiência de acúmulo de 3HB a partir de diversos tipos de fontes de

carbono fornecidas a *B.sacchari* selvagem, demonstrada por GOMEZ (1994), a possibilidade de *B. sacchari* selvagem em acumular monômeros de 3HHx, evidenciada por BUFFONI (2006) e as altas frações de monômeros de 3HHx acumulados pelo gênero *Aeromonas*, MENDONÇA (2014) desenvolveu em seu trabalho de doutorado a construção de recombinantes de *B. sacchari* abrigando genes de *Aeromonas* envolvidos na síntese de PHA. Os genes de *Aeromonas* escolhidos para a construção dos recombinantes foram os genes do operon PCJ de *Aeromonas hydrophila* ou *Aeromonas sp.* O gene phaP sintetiza a proteína *Phasina*, essa está associada aos grânulos de PHA e auxilia na estabilidade dos mesmos enquanto são sintetizados. O gene C expressa a *PHAsintase* de *Aeromonas*, que possui especificidade por monômeros de cadeia média. O gene J é responsável por sintetizar uma enoil-coA hidratase que drena intermediários da via da β -oxidação dos ácidos graxos. Os genes foram clonados em um plasmídeo PBBRMCS-2 e expressos no mutante UV pha⁻ de *B. sacchari*.

2.3 Metabolismo da xilose e utilização de hidrolisado hemicelulósico por *B. sacchari* para produção de PHA

Trabalhos realizados por SILVA e colaboradores (2004) em que foi avaliado a capacidade de *B. sacchari* acumular 3HB a partir de xilose, foram demonstrados a capacidade de acúmulo em biopolímero desta cepa em um valor de cerca de 60% em polímero e um fator de conversão de substrato em produto de 0,39 g.g⁻¹, assim, a utilização do bagaço poderia ser de grande interesse na produção de PHA, visto que leveduras são incapazes de metabolizar pentoses para a produção de etanol de segunda geração.

As vias descritas na literatura para a degradação de xilose são: Via oxidoreductase, via Isomerase, via de *Weimberg* e via de *Dahms* (Figura 2) (MATSUSHIKA et al., 2009; WEIMBERG,1961; DAHMS,1974; JOHNSEN et al., 2009).

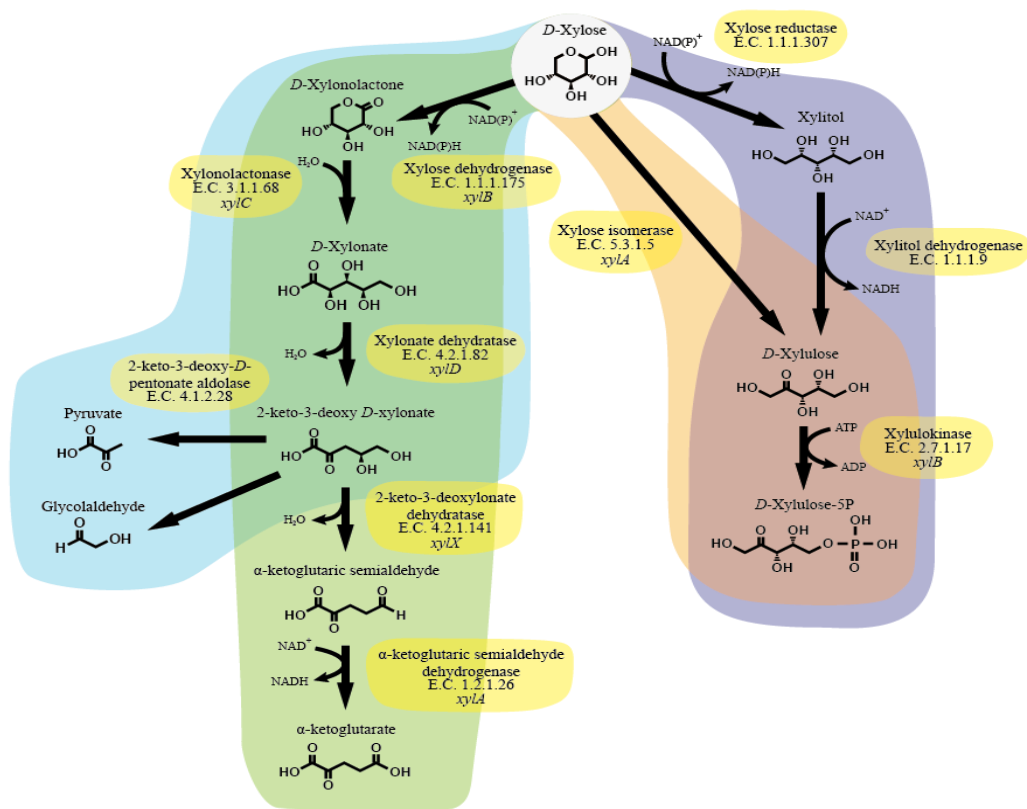


Figura 2: Vias do catabolismo de xilose. Via de *Dahms* em azul; Via de *Weimberg* em verde; Via da xilose *isomerase* em laranja; e Via da xilose redutase em roxo. Fonte: Roncallo (2016).

Em microrganismos que consomem xilose como fonte de carbono, há dois mecanismos de transporte desse substrato para a matriz intracelular. A xilose externa pode ser transportada por um sistema quimiosmótico de simporte de prótons, de baixa afinidade (XylE ou XylT) ou por um sistema de transporte de alta afinidade (XylFGH) (SONG; PARK, 1998), XylF é uma proteína periplasmática com alta afinidade por xilose, XylH é uma permease e XylG é uma *ATPase* que fornece energia para a translocação da xilose. Após o transporte de xilose para matriz intracelular, ocorre sua conversão em xilulose, por meio da enzima xilose isomerase (codificado pelo gene *xyIA*), sendo então fosforilada pela ação da xiluloquinase (codificada pelo gene *xyIB*) fornecendo a via das pentoses o metabolito xilulose-5-fosfato (ZHOU et al., 2012). Os metabolitos xilulose-5-fosfato e ribose-5-fosfato resultante de uma reação de isomerização ingressam na via das pentoses (VP) a partir de sua fase não oxidativa. Para que a célula possa então sintetizar outros metabólitos essenciais, a xilulose-5-fosfato ingressante na VP passa a correr caminhos comuns à via *Embden meyerhof parnas* (EMP) e via *Entner Doudoroff* (ED) (LIU et al., 2013; MATSUSHIKA et al., 2012; SMITH, VAN

RENSBURG E GÖRGENS, 2014). Diversos trabalhos foram realizados tentando melhorar a eficiência no consumo de xilose por bactérias e fungos. Os principais problemas envolvidos na metabolização da xilose são: Repressão catabólica em presença de outros açúcares, como glicose, por exemplo, e a ineficiência do consumo de xilose.

2.4 Análises de fluxos metabólicos (AFM)

O estado fisiológico celular é um parâmetro importante para se caracterizar o metabolismo. O estado fisiológico pode ser influenciado por diversos fatores, como por exemplo, limitação ou excesso de algum nutriente essencial. A principal ferramenta utilizada com o objetivo de se investigar o estado metabólico celular é a Análise de Fluxos metabólicos (AFM). A AFM se utiliza da avaliação das velocidades de reações envolvidas nas vias metabólicas, possibilitando o entendimento de forma detalhada e quantitativa da natureza dos fluxos das reações bioquímicas.

É essencial que se conheça todos os componentes de uma rede metabólica e não apenas um metabolito em particular (PRADELHA et al., 2012). Segundo MENDONÇA (2014):

“O interesse pela análise da distribuição de fluxos metabólicos vem aumentando, devido à possibilidade da interpretação quantitativa da fisiologia metabólica, por meio da análise de dados experimentais. A AFM requer apenas informações sobre as reações estequiométricas necessárias ao crescimento, e a quantificação de alguns parâmetros específicos de uma linhagem. A construção de modelos para a AFM envolve quatro etapas essenciais: definir o sistema, obter reações estequiométricas; definir funções “objetivo” biologicamente relevantes e adicionar restrições bioquímicas adequadas, e resolver a matriz de variáveis (HÖFFNER; HARWOOD; BARTON, 2013).”

Várias ferramentas vêm sendo desenvolvidas para se resolver matematicamente as múltiplas variáveis em uma AFM. Dentre essas várias ferramentas podemos destacar o *Metatool*. O *Metatool* baseia-se no conceito de modos elementares de fluxos. Os modos elementares são construídos a partir de uma rede metabólica onde podem testar conjuntos de enzimas que formam uma via metabólica consistente, considerando o direcionamento (irreversibilidade) das

reações. A partir da análise de um modelo de rede metabólica, e utilizando os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente, o programa define as possíveis vias que o microrganismo utiliza na situação em estudo para fechar o balanço estequiométrico, gerando uma ou mais equações que representam este caminho (modos elementares) (TACIRO, 2008).

3 OBJETIVO

Delimitar parâmetros de cultivo para cepas recombinantes de *Burkholderia sacchari* para o acúmulo de 3HB-co-3HHx, utilizando xilose e ácido hexanóico como substratos. Definir a eficiência dos recombinantes para crescer em xilose e ácido hexanóico, convertendo-os em biomassa e/ou PHA. Verificar preliminarmente a possibilidade do uso dos dados obtidos para realizar uma análise de fluxos metabólicos (AFM) para propor estratégias de melhoramento da produção do copolímero, que podem ser baseadas em modificações genéticas e/ou de condução de processo em biorreator.

3.1 Objetivos específicos

1. Testar cepas recombinantes, previamente construídas, em agitador rotativo, como base definidora para a seleção daquela (s) a ser (em) testada (s) em biorreator.
2. Avaliar a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}), a eficiência de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$), a eficiência de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$), e as velocidades de consumo dos substratos, em meio de cultura contendo xilose mais ácido hexanóico como fontes de carbono em ensaios de frascos agitados.
3. Em biorreator, testar a cepa selecionada empregando estratégias para se obter polímeros com diferentes teores de 3HHx.
4. Submeter os dados obtidos a tratamentos no *Metatool* e *Matlab* e identificar pontos a serem melhorados na produção do copolímero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

A tabela 1 apresenta as linhagens utilizadas nesse trabalho.

Tabela 1: Linhagens utilizadas nos experimentos em frascos agitados e biorreatores.

Bactéria	Características	Origem/Referência
<i>B. sacchari</i> LFM 344	Linhagem mutante UV de LFM101, deficiente no acúmulo de PHA (PHA-)	Oliveira et al., (1998)
<i>B. sacchari</i> LFM 101	PHA + sac+ prp + Ap s Tcs (GOMEZ et al.,1996)	GOMEZ et al.(1996)
<i>B. sacchari</i> LFM1039	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2 sem inserto	Mendonça (2014)
<i>B. sacchari</i> LFM1034	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaPCJ</i> de <i>Aeromonas</i> sp. (LFM897)	Mendonça (2014)
<i>B. sacchari</i> LFM1035	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Mendonça (2014)
<i>B. sacchari</i> LFM1036	<i>B. sacchari</i> LFM101 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaJ</i> de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Mendonça (2014)
<i>B. sacchari</i> LFM1037	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaCJ</i> de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Mendonça (2014)
<i>B. sacchari</i> LFM1038	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2:: <i>phaPC</i> de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Mendonça (2014)

LFM – Sigla do Grupo Laboratório de Fisiologia de Micro-organismo; ATCC – *American Type Culture collection*. LFM 344 – Mutante de *B. sacchari* LFM 101 selvagem na qual foi inativado o gene da PHA sintase.

4.2 Meios de cultura

4.2.1 Meios de cultura para cultivo em frascos agitados e para ensaios em biorreator

Os meios de cultura utilizados durante os experimentos foram *lysogeny broth* (LB) (NaCl, 5.1 g.L⁻¹; Triptona 10 g.L⁻¹; Extrato de levedura, 5 g.L⁻¹) e meio mineral (MM) (Tabela 2).

Tabela 2: Formulações de meio de cultura para biorreator testados.

Reagentes/[g.L ⁻¹]	Formulação meio mineral (g.L ⁻¹)		
	MM1 (ROCHA et al., 2008)	MM4 (limitação N)	MM5 (limitação P)
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,907	2,907	11,63
KH ₂ PO ₄	0,3876	0,872	0,209
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,310	0,310	0,310
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,00184	0,0092	0,0092
Citr. Férrico amoniacoal	0,00588	0,0588	0,0588
Elementos traços	2 mL.L ⁻¹	2 mL.L ⁻¹	2 mL.L ⁻¹
NaCl	1	1	1
Xilose	-	15	15

Composição da solução de elementos traços: H₃BO₃ (0,30 g.L⁻¹); CoCl₂.6H₂O (0,20 g.L⁻¹); ZnSO₄.7H₂O (0,10 g.L⁻¹); MnCl₂.4H₂O (0,03 g.L⁻¹); NaMoO₄.2H₂O (0,03 g.L⁻¹); NiCl₂.6H₂O (0,02 g.L⁻¹); CuSO₄.5H₂O (0,01 g.L⁻¹).

Inicialmente uma estria foi feita em meio LB sólido para a reativação de uma cultura criopreservada a -80°C. Para os ensaios de acúmulo em frascos agitados, o meio LB foi utilizado para cultivo do inóculo. Para os procedimentos em biorreator, o meio LB foi utilizado como pré-inóculo. O meio mineral 6/3 (MM 6/3) foi utilizado como inóculo para os ensaios em biorreator (OLIVEIRA-FILHO et al., 2019). Esse meio contém seis gramas de xilose para três gramas de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), essas condições minimizaram o acúmulo de PHA durante a fase de crescimento. Todos os demais componentes foram mantidos nas concentrações estabelecidas no MM1 (Tabela 2). Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição de ágar (15-20 g.L⁻¹) à composição dos meios líquidos acima citados. O antibiótico canamicina (50 µg. mL⁻¹) foi utilizado para o crescimento das linhagens recombinantes.

4.3 Ensaios em frascos agitados

4.3.1 Ensaios de acúmulo de PHA para seleção de recombinante para ensaios em biorreator

Para todos os experimentos foram utilizados os controles positivo *Burkholderia sacchari* LFM 101 (*B. sacchari* LFM 101) e negativo *Burkholderia sacchari* LFM 344 (*B. sacchari* LFM 344). Os cultivos seguiram as seguintes etapas: Inicialmente as cepas foram semeadas em LB sólido, sendo mantidas em estufa 30 °C durante 48h. Para o preparo do inóculo, foram coletadas uma porção significativa de colônias e essas foram transferidas para um erlenmeyer (com capacidade entre 50 mL-250mL) contendo LB líquido, essa solução foi

mantida em agitador rotativo por 24h, a 150 rotações por minuto (rpm), a 30 °C. Posteriormente, o inóculo (10% do volume da cultura) foi transferido para um erlenmeyer de maior capacidade volumétrica (1L) contendo MM 1 (ROCHA et al., 2008) e xilose (15-20 g.L⁻¹), essa solução final foi homogeneizada e distribuída entre erlenmeyers (com capacidade de 100mL-500mL), onde os ensaios de acúmulo foram conduzidos durante 72h, a 150 rpm, a 30 °C. Foram retiradas amostras em triplicata biológica e duplicata analítica durante os tempos 0h, 24h e 72h para determinação de pH, biomassa, consumo de substrato produção de PHA .

4.3.2 Ensaio em frascos agitados para determinação de tempo de inóculo para experimentos em biorreator

O tempo e concentração celular do inóculo são parâmetros importantes, visto que, se deseja inocular ao reator células metabolicamente ativas e que não estejam em fase de acúmulo. Para o preparo do inóculo para ensaios em biorreatores foram utilizados meio mineral (MM1) sem limitação na fonte de nitrogênio e nem excesso na fonte de carbono, com o objetivo de se minimizar qualquer possibilidade de acúmulo. As etapas seguidas para o ensaio de determinação do melhor tempo de inóculo foram: Pré inóculo: Cerca de três colônias, anteriormente crescidas em LB sólido, foram transferidas para um erlenmeyer contendo LB líquido (com capacidade entre 50 mL-250mL), essa solução foi mantida em agitador rotativo por 24h, a 150 rpm, a 30 °C. Para o inóculo, foi utilizado MM em uma concentração 6/3, ou seja, seis gramas de xilose para três gramas de sulfato de amônio por litro de meio. O pré inóculo anteriormente preparado (10% do volume do inóculo) foi adicionado a um erlenmeyer de maior capacidade volumétrica (1L) juntamente com o MM 6/3. A solução final de inóculo foi mantida em agitador rotativo por 10h, a 150 rpm, a 30°C. Após esse período, um volume referente a 10% do inóculo foi distribuído entre erlenmeyers (Capacidade volumétrica igual a 250 mL) contendo MM 6/3 e o ensaio foi iniciado. As amostragens foram realizadas a intervalos de uma ou duas horas, pelo período de 24h. Os pontos experimentais foram utilizados para se construir um gráfico semi logaritmico onde foi possível determinar a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), bem como o melhor tempo de inóculo.

4.4 Ensaios em biorreator

4.4.1 Ensaios em biorreator com *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM 344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* adotando diferentes estratégias de cultivo

B. sacchari LFM 101 e a linhagem recombinante *B. sacchari* LFM 344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* foram avaliadas em MM4 e MM5 utilizando-se xilose como única fonte de carbono durante o primeiro bloco de experimentos. Na segunda parte dos ensaios (segundo e terceiro bloco de experimentos), apenas a linhagem recombinante *B. sacchari* LFM 344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* foi avaliada, utilizando xilose ou xilose e ácido hexanóico como fontes de carbono através de alimentação contínua em meio mineral limitado em nitrogênio. Os ensaios foram conduzidos para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}), velocidade específica de produção de 3HB ou 3HB-co-3HHx (μ_{3HB} e μ_{3HHx}) e velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}), assim como os fatores de conversão de xilose e ácido hexanóico em monômeros de 3HB e 3HHx, respectivamente ($Y_{3HB/xil}$ e $Y_{3HHx/AHex}$) conforme descrito por HISS no capítulo 6 do livro “*Biotechnologia industrial vol. 2*”. Os experimentos foram conduzidos em *fed-batch* em um reator de bancada (*Applikon, EZ-Control* ou *B. Braun Melsungen*) volume útil de 3L, 30°C, pH controlado (7.0), oxigênio dissolvido acima de 30% da saturação. Foram determinados durante o cultivo: concentração de biomassa seca, os teores de polímero, carboidratos, nitrogênio, pressões parciais de O₂ e CO₂ no gás de saída e ácido hexanóico, quando fornecido.

4.5 Análise de fluxos metabólicos (AFM)

A análise de fluxos metabólicos (AFM) foi realizada a partir de dados experimentais obtidos por meio de ensaios em biorreatores. Os dados obtidos foram utilizados para se calcular as velocidades específicas de consumo de xilose e ácido hexanóico (μ_{xil} e μ_{AHex}) e de formação de PHA (μ_{3HB} e μ_{3HHx}), bem como as taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂. No programa *metatool* (Pfeiffer et al., 1999), simulou-se os possíveis modos elementares (rotas metabólicas) a partir de uma rede metabólica. Para a construção da rede considerou-se as vias metabólicas presentes em *B. sacchari* de acordo com o seu sequenciamento genético (ALEXANDRINO et al., 2015). Nessa rede metabólica foram considerados os substratos consumidos (xilose, ácido hexanóico e O₂) e os

produtos formados 3HB/3HB-co-3HHx e CO₂. Os modos elementares gerados foram agrupados em famílias. O agrupamento em famílias levou em conta a relação estequiométrica das reações presentes nos modos elementares, àqueles modos que possuíam relações estequiométricas iguais foram agrupados na mesma família. A partir dos modos elementares e das velocidades específicas (μ_{XII} , μ_{AHex} , μ_{3HB} e μ_{3HHx}) foram calculados no programa *MatLab* (2015) por meio da função *fmincon*, os vetores de fluxos que mais se aproximavam dos dados experimentais, bem como, a contribuição para o metabolismo celular de cada uma das famílias de modos elementares consideradas. As famílias que não contribuíam para o metabolismo foram desconsideradas e àquelas que apresentavam contribuição foi considerado para a AFM.

4.6 Metodologias analíticas

A massa seca celular total (Xt) foi determinada gravimetricamente (MENDONÇA 2014). O pH foi medido diretamente do sobrenadante de amostras centrifugadas, por meio de um potenciômetro *Tecnal – TEC-2*, previamente calibrado utilizando soluções padrões de pH 4,0 e 7,0. A composição e a quantidade de PHA foram determinadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis & Mai, 1988) em cromatógrafo 7890A (Agilent) equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95% dimetil-polisiloxane, comprimento 30 cm, diâmetro 32 mm, espessura do filme 0,25 μ m) com sistema de detecção por ionização de chama (FID). Os valores de PHA total foram utilizados para calcular a quantidade de biomassa residual (Xr), ou seja, a quantidade total de PHA subtraído da massa seca celular total. As concentrações de xilose foram estabelecidas por cromatografia líquida de alto desempenho (*High performance liquid chromatography-HPLC*) em equipamento Dionex HPLC (Ultimate 3000, *Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA*), equipado com uma coluna de separação de açúcares e sistema de detecção por refratômetro (Shodex IR 101). O ácido hexanóico foi determinado por cromatografia gasosa em um cromatógrafo *Agilent 7890A* equipado com uma coluna FFAP (split das amostras 1:5). Hélio (3,0 mL/min). Temperatura do injetor e detector (FID) foi (250 °C e 300°C). O sulfato de amônia teve sua concentração verificada utilizando-se um eletrodo íon seletivo (Orion 9512HPBNWP), modelo e um potenciômetro (*Thermo Scientific, Orion 4 Star, pH-ISE Benchtop, Singapore*). Para as medidas de gases na saída do

biorreator foram utilizados sensores específicos (*BlueSens, Applikon, Netherlands*).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da capacidade de acúmulo de copolímero 3HB-co-3HHx pelas linhagens recombinantes a partir de xilose e ácido hexanóico como fontes de carbono

O presente ensaio foi proposto para se realizar uma confirmação dos resultados obtidos por MENDONÇA (2014) e fazer uma análise comparativa com os valores atingidos por MENDONÇA (2014) em glicose 10 g.L⁻¹. As linhagens testadas foram *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*, *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}*, *LFM344 pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy}*, *LFM344 pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}*, *LFM101 pBBR1MCS-2::phaJ_{Ahy}* e *LFM344 pBBR1MCS-2* sem inserto.

Os ensaios de acúmulo foram divididos em três blocos experimentais. No primeiro bloco de experimentos, foram avaliados os recombinantes *B. sacchari* *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* e *B. sacchari* *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}* (Tabela 3).

Tabela 3: Primeiro bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* em MM1 e excesso de xilose com fornecimento de ácido hexanóico após 24h de cultivo. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	MSC g.L ⁻¹	DO	pH	PHA (Mol %)		PHA (MSC %)	Y 3HHx/AHex g.g ⁻¹	Pp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
					3HB	3HHx			
<i>B.sacchari</i> LFM 101 Xil+ AHex	0	0,27 ± 0,0	0,8 ± 0,0	7,1 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	4,65 ± 0,2	16,1 ± 0,18	6,12 ± 0,13	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	51,54 ± 2,03	0.04	0.06
	72	6,73 ± 0,2	28 ± 0,23	6,43 ± 0,0	99,90 ± 0,1	0,10 ± 0,1	61,46 ± 1,73		
<i>B.sacchari</i> LFM 344 Xil+ AHex	0	0,23 ± 0,0	0,63 ± 0,00	7,1 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	2,34 ± 0,1	5,3 ± 0,0	5,13 ± 0,17	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0.00	0.00
	72	2,7 ± 0,4	6,7 ± 0,35	6,11 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
<i>B.sacchari</i> phaPCJ_{Asp} Xil+ AHex	0	0,31 ± 0,0	0,34 ± 0,0	7,05 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	3,56 ± 0,1	12,63 ± 0,08	5,98 ± 0,11	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	33,05 ± 4,42		
	72	6,51 ± 0,4	27,19 ± 0,42	6,39 ± 0,09	94,3 ± 3,0	5,70 ± 3,0	54,01 ± 7,55	0.72	0.05
<i>B.sacchari</i> phaPC_{Ah} Xil+ AHex	0	0,24 ± 0,0	0,16 ± 0,0	7 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	3,59 ± 0,3	12,6 ± 0,32	6,12 ± 0,0	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	23,88 ± 1,24		
	72	6,71 ± 0,8	25,7 ± 0,76	6,33 ± 0,09	100,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	53,75 ± 5,23	0.00	0.05

MSC: Massa seca celular. DO: Densidade óptica. $Y_{3HHx/AHex}$: Fator de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx. pPHA (g.L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de PHA em gramas por litro de cultivo por hora de ensaio. Xil: Xilose. AHex: Ácido hexanóico. Quantidade de ácido hexanóico fornecido durante esse experimento foi entre 0,2 a 0,7 g.L⁻¹ (Apêndice A)

No segundo bloco de experimentos, foram avaliados os recombinantes *B.sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}*, *B. sacchari* LFM101 *pBBR1MCS-2::phaJ_{Ahy}* e *B. Sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy}* (Tabela 4).

Tabela 4: Segundo bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* em MM1 e excesso de xilose com o fornecimento de ácido hexanóico após 24h de ensaio. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	MSC g.L ⁻¹	pH	PHA (Mol %)		PHA (MSC %)	Y 3HHx/AHex g.g ⁻¹	Pp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
				3HB	3HHx			
<i>B. sacchari</i> LFM 101 Xil+ AHex	0	0,30 ± 0,0	7,14 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00		
	24	5,60 ± 0,1	6,45 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00±0,00	58,38 ± 2,04		
	72	6,96 ± 0,2	6,9 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00±0,00	68,79 ± 2,22	0.00	0.07
<i>B. sacchari</i> LFM 344 Xil+ AHex	0	0,29 ± 0,0	7,14 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00		
	24	2,31 ± 0,0	5,69 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00		
	72	2,76 ± 0,2	6,63 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00	0.00	0.00
<i>B. sacchari</i> <i>phaC_{JAh}</i> Xil+ AHex	0	0,18 ± 0,0	7,07 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00 ± 0,00		
	24	4,67 ± 0,0	6,30 ± 0,0	100 ± 0,00	0 ± 0,00	54,65 ± 2,19		
	72	6,54 ± 0,7	6,84 ± 0,0	95,58 ± 1,87	4,42 ± 1,87	65,23 ± 3,59	0.19	0.06
<i>B. sacchari</i> <i>phaC_{Ah}Xil+</i> AHex	0	0,08 ± 0,0	6,6 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		
	24	1,88 ± 0,1	7,00 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ±	18,4 ± 1,38		
	72	6,53 ± 0,3	6,79 ± 0,0	98,55± 0,40	1,45± 0,40	63,55 ± 9,21	0.06	0.06
<i>B. sacchari</i> <i>phaJ_{Ah}Xil+</i> AHex	0	0,23 ± 0,0	7,10 ± 0,0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00		
	24	4,79 ± 0,3	6,35 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00±0,00	55,31 ± 1,21		
	72	6,77 ± 0,1	6,83 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00±0,00	64,84 ± 1,47	0.00	0.06

MSC: Massa seca celular. $Y_{=3HHx/AHex}$: Fator de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx. pPHA (g.L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de PHA em gramas por litro de cultivo por hora de ensaio. Xil: Xilose. AHex: Ácido hexanóico. . Quantidade de ácido hexanóico fornecido durante esse experimento foi entre 1,0 a 1,5 g.L⁻¹ (Apêndice A)

O último bloco de experimentos foi uma repetição dos ensaios com os recombinantes *B. sacchari* LFM 344

BBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}, LFM344 pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy} e o recombinante *B. sacchari* LFM 344PBRRMCS-2 (Tabela 5).

Tabela 5: Terceiro bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* em MM1 e excesso de xilose com fornecimento de ácido hexanóico. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	MSC g.L ⁻¹	pH	PHA (Mol %)		PHA (MSC %)	Y _{3HHx/AHex} g.g ⁻¹	Pp (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
				3HB	3HHx			
<i>B. sacchari</i> LFM 101 Xil+ AHex	0	0,27 ± 0,0	7,02 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	4,78 ± 0,1	6,40 ± 0,0	100 ± 0,00	100 ± 0,00	32,55 ± 3,54		
	72	6,93 ± 0,2	7,06 ± 0,1	100 ± 0,00	100 ± 0,00	53,50 ± 2,73	0.00	0.05
<i>B. sacchari</i> LFM 344 Xil+ AHex	0	0,35 ± 0,0	6,98 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	2,63 ± 0,1	5,82 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	72	3,22 ± 0,0	6,77 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0.00	0.00
<i>B. sacchari</i> <i>phaPCJ</i> _{Asp} Xil+ AHex	0	0,25 ± 0,1	7,00 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	3,74 ± 0,2	6,43 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	30,02 ± 3,91		
	72	7,14 ± 0,5	6,89 ± 0,0	88,84 ± 1,61	11,16 ± 1,61	47,37 ± 3,95	0.36	0.05
<i>B. sacchari</i> <i>phaPC</i> _{Ah} Xil+ AHex	0	0,18 ± 0,0	7,02 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	3,46 ± 0,2	6,38 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	25,69 ± 1,42		
	72	6,23 ± 0,2	6,89 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	46,72 ± 1,13	0.00	0.03
<i>B. sacchari</i> <i>phaCJ</i> _{Ah} Xil+ AHex	0	0,26 ± 0,0	7,04 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	3,86 ± 0,1	6,39 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	29,92 ± 7,89		
	72	7,23 ± 0,1	6,91 ± 0,0	100 ± 0,00	0,00 ± 0,00	43,26 ± 4,49	0.00	0.04
<i>B. sacchari</i> <i>pha</i> <i>Plasmideo</i> <i>sem</i> <i>inserto</i> Xil+AHex	0	0,22 ± 0,1	6,97 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	24	2,53 ± 0,1	6,17 ± 0,2	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00		
	72	3,71 ± 0,2	6,86 ± 0,0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0.00	0.00

MSC: Massa seca celular. Y_{3HHx/AHex}: Fator de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx. pPHA (g.L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de PHA em gramas por litro de cultivo por hora de ensaio. Xil: Xilose. AHex: Ácido hexanóico. . Quantidade de ácido hexanóico fornecido durante esse experimento foi entre 1,3 a 1,7 g.L⁻¹ (Apêndice A)

Em todos os experimentos foram utilizados como controle a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 e o mutante PHA negativo *B. sacchari* LFM 344. No apêndice A estão os valores das dosagens de xilose e ácido hexanóico desses experimentos.

Verificou-se que as linhagens capazes de acumular 3HB o acumularam em uma faixa entre 40 a 70% da massa seca celular (Tabelas: 3 a 5), o que demonstra a reprodutibilidade de valores anteriormente já conquistados com o fornecimento de xilose como fonte de carbono. Em estudos conduzidos por PAN e colaboradores

(2012), em que *Burkholderia cepacia* foi avaliada com o fornecimento de xilose como única fonte de carbono, foi verificado um acúmulo de 58,4% do seu peso celular em polímero. SILVA e colaboradores (2004) indicaram que *Burkholderia cepacia* IPT 048 era capaz de acumular até 54% do seu peso em PHA, enquanto *B. sacchari*, acumulava 58% de PHB sob as mesmas condições. Esses valores foram confirmados posteriormente por LOPES e colaboradores (2009).

Em relação aos valores monoméricos de 3HHx nos copolímeros produzidos no momento após a adição e consumo de ácido hexanóico, podemos destacar o acúmulo de 11,2% desse monômero em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*, um valor equivalente ao valor verificado por MENDONÇA (2014) quando fornecido glicose e ácido hexanóico, em que o percentual acumulado foi de 15%. O controle positivo *B. sacchari* LFM 101 demonstrou-se incapaz de acumular monômeros de 3HHx, verificando-se o valor de apenas 0,1% no primeiro bloco de experimentos.

Nos três blocos experimentais, foi possível verificar que não houve acúmulo de PHA pelo mutante PHA- LFM 344. Na linhagem selvagem, pode se observar apenas o acúmulo de monômeros de 3HB celular (Tabelas: 3 a 5). A figura 3 apresenta a evolução nas quantidades de biomassa total obtidas ao final de cada período experimental (Tempos 0h, 24h e 72h).

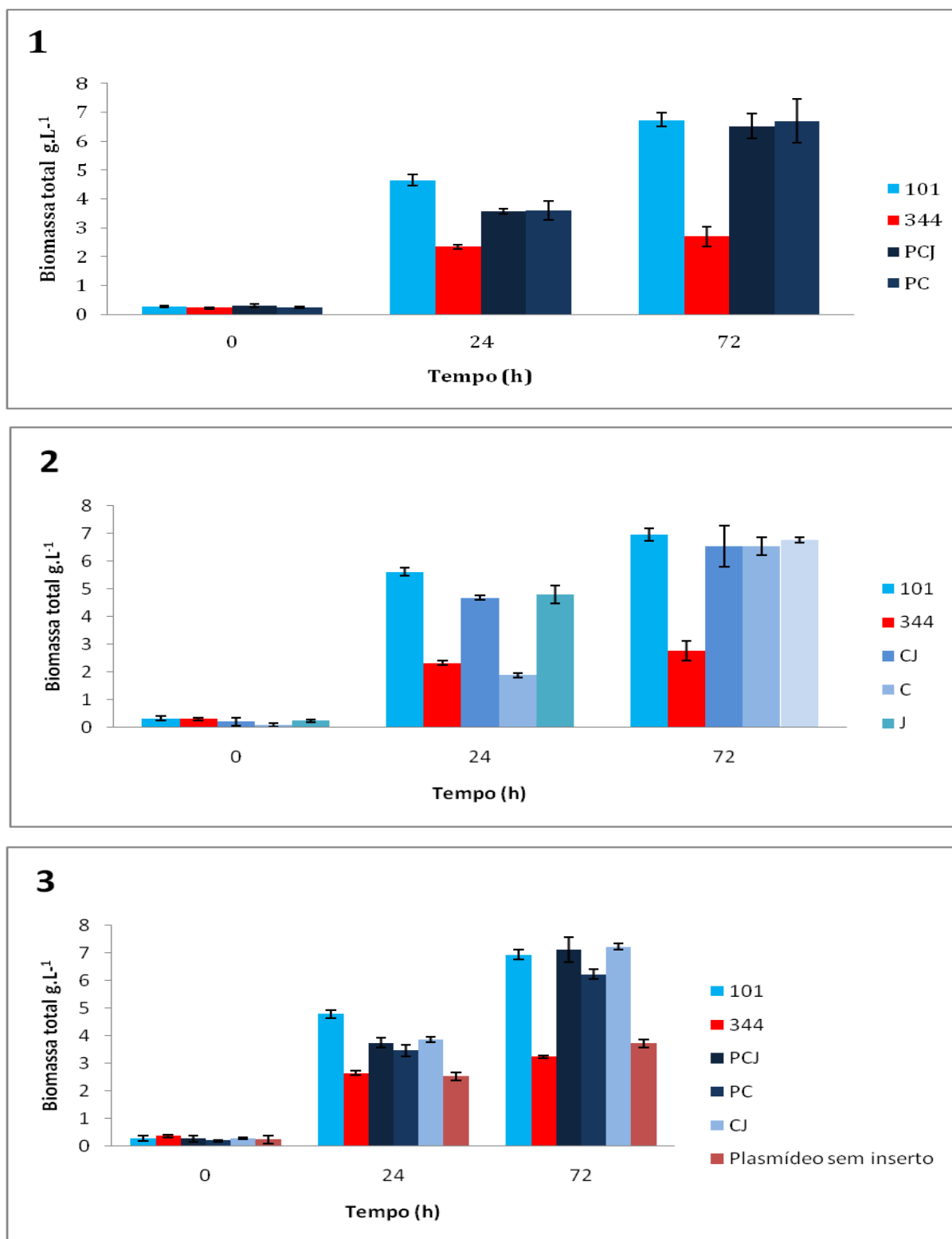


Figura 3: Valores de biomassa total alcançados pelas bactérias testadas durante os blocos experimentais 1, 2 e 3, com o fornecimento de xilose (15-20 g.L⁻¹) e Ácido hexanóico (1 g.L⁻¹). As bactérias apresentadas são: *B. sacchari* selvagem LFM 101, *B. sacchari* L FM 344 mutante PHA; *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}, *B. sacchari* LFM101 pBBR1MCS-2::phaJ_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy} e *B. sacchari* LFM 344PBBRMCS-2 Plasmídeo sem inserto.

Segundo pode se observar, todos os recombinantes avaliados com capacidade de acumular biopolímero nos três blocos de experimentos o acumularam com valores finais de biomassa total próximos ao valor do controle selvagem *B. sacchari* LFM 101. A biomassa residual (X_r) de todos os microrganismos avaliados durante os blocos experimentais se aproximou do controle negativo *B. sacchari* LFM 344 (Figura 4).

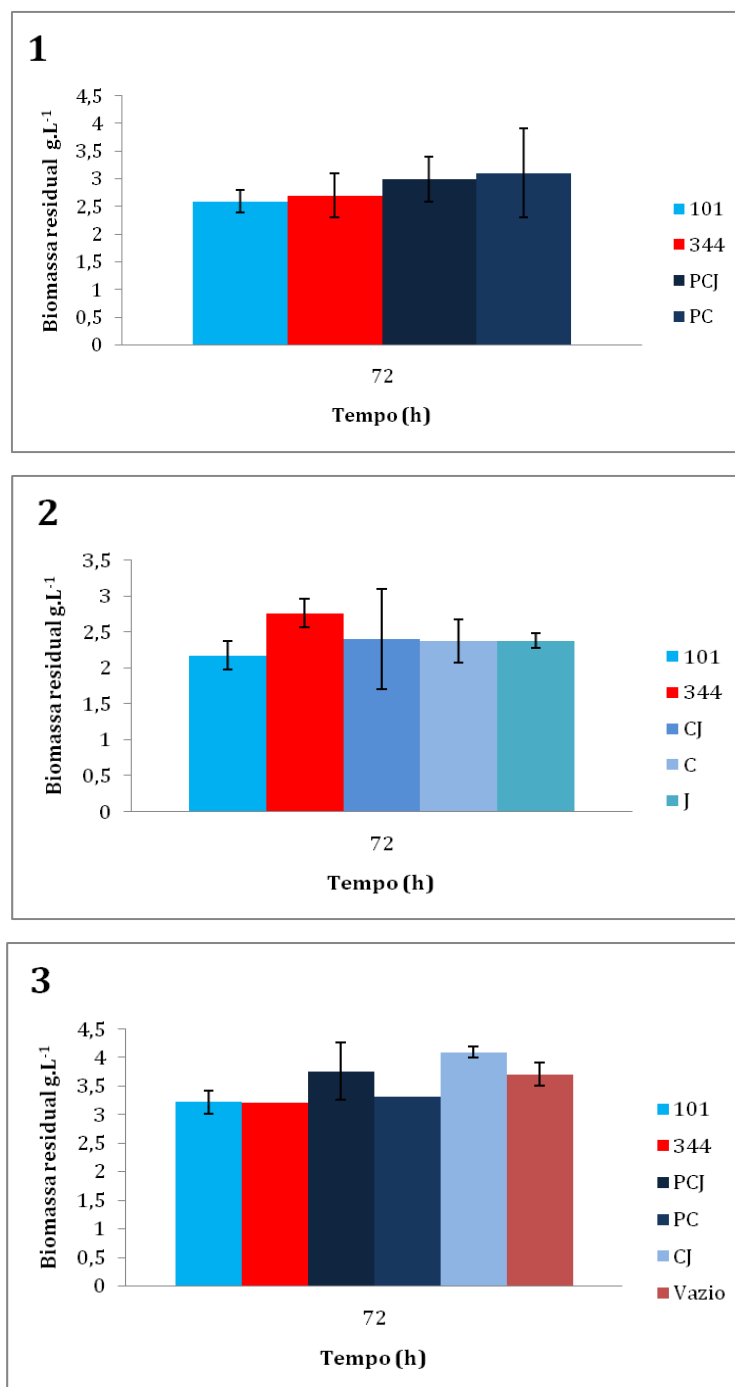


Figura 4: Biomassa residual produzida pelas diferentes bactérias ao final de cada bloco experimental. A biomassa residual se refere à subtração da biomassa total pelo valor obtido de PHA em gramas. As bactérias apresentadas são: *B. sacchari* selvagem LFM 101, *B. sacchari* LFM 344 mutante PHA-, *B. sacchari* LFM344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}, *B. sacchari* LFM101 pBBR1MCS-2::phaJ_{Ahy}, *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy} e *B. sacchari* LFM 344PBBRMCS-2 Plasmideo sem inserto.

Os valores atingidos nesses ensaios demonstram a capacidade desses recombinantes em acumular PHA de forma praticamente igual ao da linhagem selvagem, tendo como vantagem o acúmulo de monômeros de 3HHx. Sua produção de biomassa residual é similar ao controle negativo, indicando assim que se trata da linhagem *B. sacchari* LFM 344 e que o acúmulo foi promovido através da inserção do plasmídeo *PBBRMCS-2* com os genes testados. Na figura 5 estão representados o crescimento e acúmulo das linhagens selvagem e do mutante PHA⁻ nos diferentes ensaios de acúmulo. Observa-se um comportamento equivalente dos controles nos diferentes ensaios.

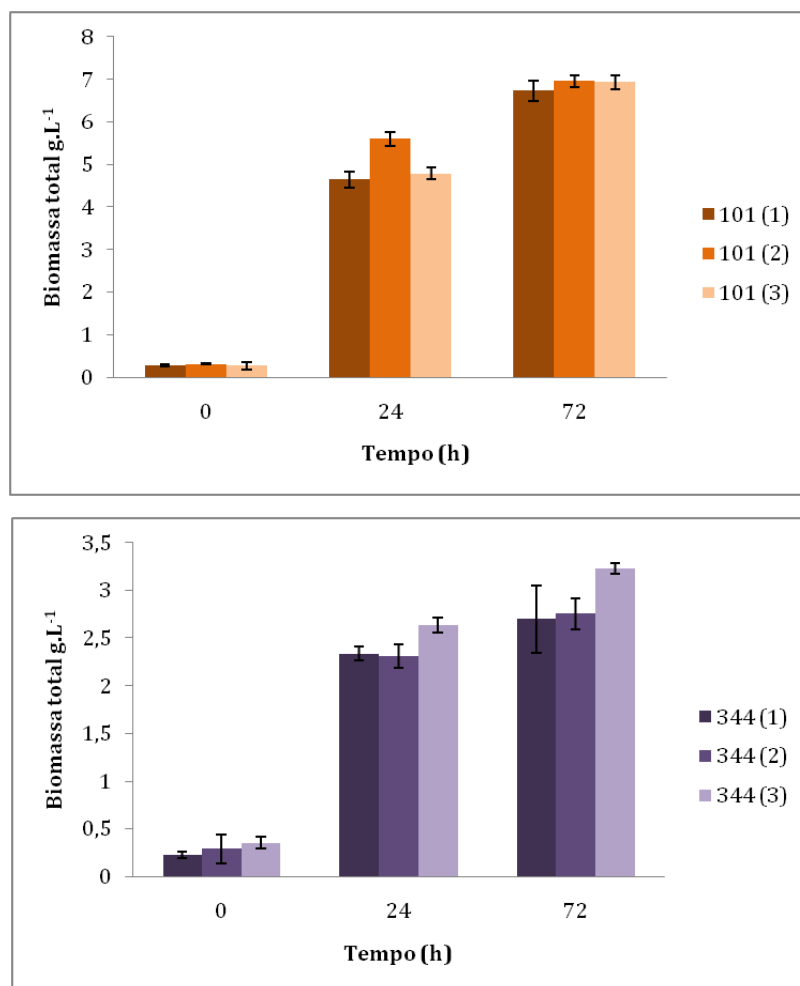


Figura 5: Comparação entre o desempenho da linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 e mutante PHA⁻ LFM 344 durante os blocos experimentais. (1) Primeiro experimento. (2) segundo experimento. (3) Terceiro experimento.

Algumas observações podem ser realizadas a partir desse conjunto de ensaios. Na figura 5, é possível observar, no terceiro bloco de experimentos, um crescimento um pouco mais elevado do controle *B. sacchari* LFM 344. A linhagem que mais se

aproximou do acúmulo do microrganismo selvagem foi a linhagem *B. sacchari* LFM101 *pBBR1MCS-2::phaJ_{Ahy}*, avaliada durante o segundo bloco experimental, tendo esse microrganismo acumulado cerca de 65% da sua biomassa em polímero, enquanto que no mesmo ensaio a linhagem selvagem obteve cerca de 69%. O recombinante abrigando o plasmídeo *PBBRMCS-2* sem nenhum gene obteve um crescimento similar ao do controle negativo *B. sacchari* LFM 344, sendo esse resultado esperado, visto que essa cepa abriga o plasmídeo, porém, esse não expressa nenhum gene relacionado ao metabolismo de PHA. Lopes et al. 2009 ao avaliar *B. sacchari* selvagem com o fornecimento de xilose como fonte de carbono obteve um fator de conversão de xilose em PHB igual a 0,26 g.g⁻¹ e uma produtividade desse biopolímero igual a 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹. Neste trabalho, os fatores de conversão observados para mesma linhagem foram de 0,23 g.g⁻¹, 0,29 g.g⁻¹ e 0,24 g.g⁻¹, respectivamente, para cada bloco de experimentos, em relação às produtividades foram obtidos 0,06 g.L⁻¹.h⁻¹, 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,05 g.L⁻¹.h⁻¹ respectivamente (média da triplicata biológica e duplicata analítica).

As linhagens LFM 344 *B. sacchari pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}* e LFM344 *pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy}* também alcançaram um crescimento e um acúmulo de PHA equivalentes aos da linhagem selvagem. Adicionalmente, essas linhagens foram capazes de acumular monômeros de 3HHx numa porcentagem de 1,5% e 4,4%, respectivamente, do polímero total acumulado. As linhagens *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}* e LFM344 *pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy}* acumularam 64% e 65% do seu peso em PHA no segundo bloco experimental. No último bloco de experimentos, o acúmulo de PHA pela cepa *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy}* foi de apenas 43% e não houve presença de monômeros de 3HHx, entretanto, a quantidade de sulfato de amônia presente nesse experimento foi cerca de 43% maior do que no segundo experimento, o que levou à produção de 42% a mais de biomassa residual no terceiro ensaio; sendo assim, grande parte do consumo da fonte de carbono, inclusive o ácido hexanóico, foi direcionada ao crescimento celular e não ao acúmulo de polímero, e esse pode ser um dos motivos pelos quais não foi detectada a presença de monômeros de 3HHx nesse ensaio (Tabelas: 3 a 5). Em relação aos fatores de conversão, *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaC_{Ahy}* apresentou um fator de conversão de ácido hexanóico a monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) igual a 0,06 g.g⁻¹, em condições similares MENDONÇA 2014 atingiu um valor de conversão para essa linhagem igual a 0,04 g.g⁻¹. Para a linhagem *B. sacchari*

LFM344 pBBR1MCS-2::phaCJ_{Ahy} o valor de conversão ($Y_{3HHx/AHex}$) foi de 0,19 g.g⁻¹. MENDONÇA (2014), ao avaliar essa mesma linhagem em glicose e ácido hexanóico obteve um valor de conversão igual a 0,18 g.g⁻¹.

As linhagens *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPC_{Ahy}* e *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* acumularam, no primeiro bloco de experimentos, 54% da massa seca em forma de PHA, respectivamente. No último bloco de experimentos, os valores percentuais de biomassa na forma de PHA obtidos foram de 47,4% e 46,7%, respectivamente. Como discutido anteriormente, o último bloco de experimentos apresentou uma maior concentração de sulfato de amônia, o que levou a uma maior taxa de crescimento celular e um menor acúmulo de PHA.

No primeiro bloco de experimentos, o ácido hexanóico fornecido às cepas não se encontrava com o pH ajustado; sem esse ajuste, a solubilidade desse ácido é baixa, o que levou à adição de uma quantidade menor de ácido ao ensaio do que o previsto, cerca de 0,2 g.L⁻¹ (Tabela 1.A, apêndice A). Após esse ensaio, as soluções de ácido passaram a ter seu pH ajustado (com uma solução 10M NaOH) para uma condição neutra; essa neutralidade fez com que o ácido passasse a ter uma excelente solubilidade. A menor concentração de hexanoato testada por MENDONÇA (2014) foi de 0,5 g.L⁻¹; nessas condições, a linhagem *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* apresentou um $Y_{3HHx/AHex}$ igual a 0,55 g.g⁻¹. Para o primeiro bloco de ensaio neste trabalho, em que o ácido apresentava um valor de 0,2 g.L⁻¹, a mesma linhagem chegou a um $Y_{3HHx/AHex}$ igual a 0,72 g.g⁻¹. No trabalho de doutorado realizado por MENDONÇA (2014) foram avaliadas cinco diferentes concentrações de hexanoato, concluindo-se que quanto menor a concentração desse ácido no meio, maior é o fator de conversão em monômeros de 3HHx do mesmo. Assim, os resultados aqui obtidos corroboram com o que foi apontado por MENDONÇA (2014). No último ensaio, em que o pH da solução ácida estava ajustada, o $Y_{3HHx/AHex}$ para a linhagem *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* foi de 0,36 g.g⁻¹ quando 1 g.L⁻¹ de ácido foi fornecido (Tabela 3.A, apêndice A), enquanto que o valor obtido por MENDONÇA 2014 para condições similares foi de 0,37 g.g⁻¹.

Com base nos resultados obtidos nesses blocos experimentais, com os objetivos propostos e com os valores já conquistados por MENDONÇA 2014, o recombinante escolhido para os ensaios em biorreatores foi *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*, visto a sua capacidade em acumular uma porcentagem de PHA em valores muito próximos ao da linhagem selvagem e da alta porcentagem

molar de 3HHx obtidos.

5.2 Ensaio em biorreatores

5.2.1 Determinação das condições de inóculo para experimentos em biorreator com as linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*

Segundo definição, o inóculo é um volume pré-determinado com a suspensão de microrganismos em uma quantidade mínima que possa garantir o desenvolvimento microbiano no meio de cultura (BORZANI, 1975). Para os experimentos realizados nesse trabalho, o inóculo consistiu de um cultivo obtido em um meio de cultura mineral (MM) com a formulação 6/3, ou seja, contendo xilose (6 g.L^{-1}) e sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g.L^{-1}). Essas condições minimizaram as possibilidades do microrganismo em acumular PHA antes do cultivo em biorreator, pois não levava à limitação de nitrogênio (GOMEZ, 1994).

A partir desse meio de cultura, foram realizados ensaios em frascos agitados, seguindo a metodologia descrita no item 4.3.2 (material e métodos) para se determinar o melhor tempo para o inóculo. O tempo de inóculo escolhido foi entre a metade e o final da fase exponencial, cerca de 20h de crescimento, pois, após o final dessa fase, os microrganismos passam a acumular PHA.

Na fase exponencial de crescimento, as linhagens estão crescendo e consumindo substrato em velocidades específicas máximas (μ_{max} e μ_{maxS}). Considera-se ideal que o inóculo esteja em fase de crescimento exponencial uma vez que desta forma padroniza-se o inóculo (células no mesmo estado fisiológico de crescimento) e minimiza-se a formação de fase lag de crescimento nos cultivos em biorreator. A figura 6 apresenta o perfil da fase exponencial das cepas utilizadas para inocular os ensaios em biorreator.

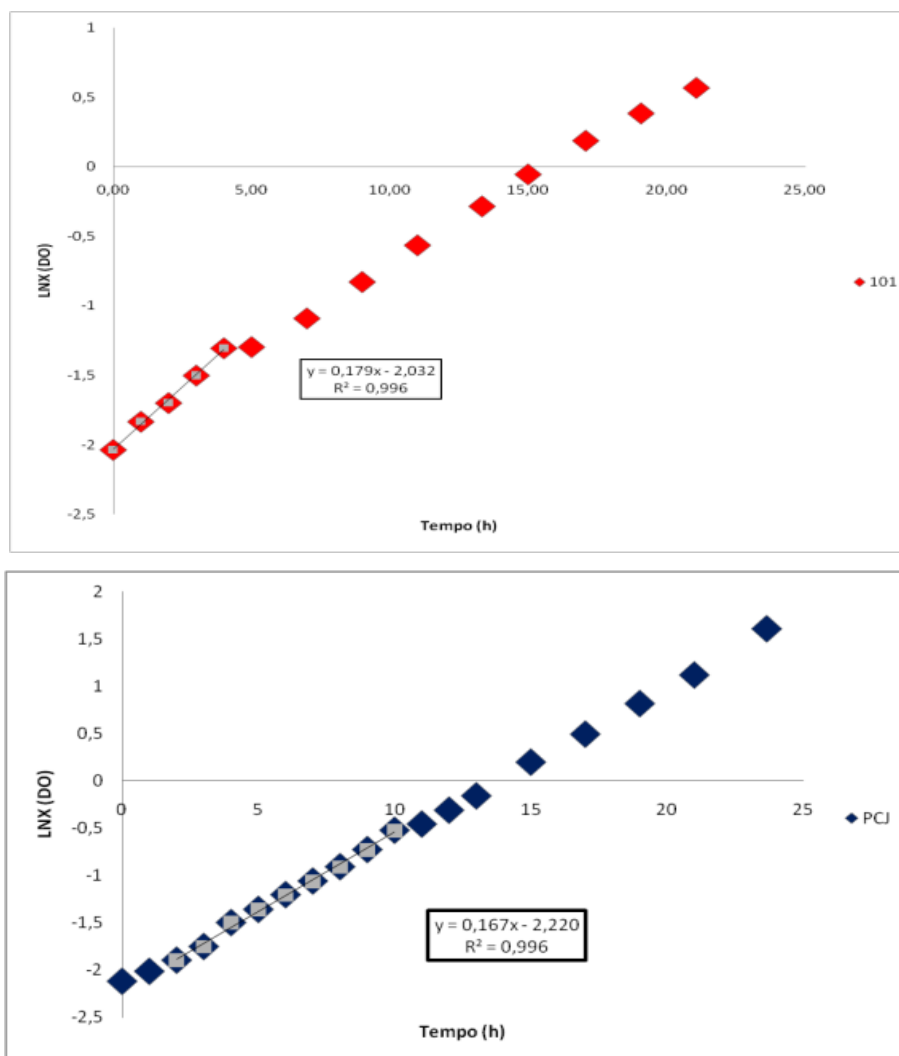


Figura 6: Perfil de crescimento de *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* em meio mineral contendo xilose a 6 g. L⁻¹ e sulfato de amônia 3 g.L⁻¹ para determinação do melhor tempo de inóculo para ensaio em biorreator. A linhagem *B. sacchari* LFM 101 foi utilizada nos experimentos A00 e A01 e a linhagem *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* para os ensaios A02 a A12

A partir dos dados obtidos, é possível observar desacelerações do crescimento microbiano ao longo da fase exponencial, porém, foi possível verificar que o crescimento ocorre por cerca de 24h. Esses ensaios foram conduzidos por meio da avaliação da densidade óptica (DO) celular no meio de cultura, e como o acúmulo de PHA interfere na análise da DO, foram coletadas, ao final de cada experimento, amostras para a verificação de um possível acúmulo de biopolímero. As análises demonstraram que não houve acúmulo de PHA pela linhagem selvagem e que a linhagem recombinante acumulou em torno de 15 % do seu peso seco em PHA durante as 24h de ensaio (dados não apresentados).

A linhagem recombinante super expressa genes da biossíntese de PHA e o

acúmulo de polímero durante a fase de crescimento, sendo essa uma possível explicação para os resultados obtidos. Esse acúmulo durante a fase de crescimento também pode ser observado durante os ensaios conduzidos por MENDONÇA (2014).

5.2.2 Estratégias para o cultivo de *B. sacchari* LFM 101 e *B. sacchari* LFM344 $pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}$ em biorreator

O texto a seguir resume as estratégias adotadas e as adaptações realizadas. Os resultados detalhados estão a partir do item 5.2.5.

Os experimentos em biorreator foram divididos em três blocos. A tabela 6 apresenta o resumo das condições adotadas em cada um destes blocos experimentais.

Tabela 6: Resumo dos trabalhos conduzidos em biorreator.

Ensaio	Microrganismo/ Linhagem	Tempo de ensaio (h)	NL	Tempo para limitação	FC inicial (g.L ⁻¹)	FC fornecida durante a fase de acúmulo	Estratégia de alimentação	Vazão de alimentação Média (g.L.h ⁻¹) ao longo da fase de acúmulo
A00	<i>B. Sacchari</i> LFM 101	90	N	28	15	Xilose	Batelada por pulso	-
A01	<i>B. Sacchari</i> LFM 101	90	P	ND	15	Xilose	Batelada por pulso	-
A02	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	64	N	24	15	Xilose	Batelada por pulso	-
A03	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	64	P	ND	15	Xilose	Batelada por pulso	-
A04	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	63	N	28	15	Xilose + Hexanoato	Alimentação contínua	(0.33g.L.h ⁻¹)*
B05	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	70	N	31	10	Xilose	Alimentação contínua	(0.30g.L.h ⁻¹)*
A06	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	40	N	28	10	Xilose	Alimentação contínua	-
A06 REP	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	90	N	28	10	Xilose	Alimentação contínua	(0.22g.L.h ⁻¹)*
A07	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	79	N	27	10	Xilose + Hexanoato	Alimentação contínua	(0.45g.L.h ⁻¹)**
A09	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	72	N	28	10	Xilose + Hexanoato	Alimentação contínua	(0.45g.L.h ⁻¹)**
A10	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	72	N	31	10	Xilose + Hexanoato	Alimentação contínua	(0.45g.L.h ⁻¹)**
A11	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	72	N	27	10	Xilose + Hexanoato	Alimentação contínua	(0.45g.L.h ⁻¹)**
A12	<i>B. sacchari</i> LFM344 pBBR1MCS- 2::phaPCJ _{Asp}	72	N	28	10	Xilose	Alimentação contínua	(0.45g.L.h ⁻¹)**

A: Reator utilizado marca: *Applikon Biotechnology*. B: Reator utilizado marca: *B-Braun* Melsugen. NL: Nutriente limitante N: Nitrogênio. P: Fósforo. Primeiro bloco de experimentos: A00, A01, A02 e A03. Segundo bloco de experimentos: A04, B05, A06, A06REP e A07. Terceiro bloco de experimentos: A09, A10, A11 e A12. * Variação na vazão de alimentação fornecida ao longo do tempo. ** Ensaio com vazão única de alimentação ao longo do tempo.

No primeiro bloco de experimentos, o objetivo principal foi determinar o nutriente limitante que proporcionaria o melhor acúmulo de PHA. Neste trabalho, foram avaliadas as limitações em nitrogênio e fósforo. O nitrogênio é essencial no processo de crescimento celular e está presente em cerca de 50% da célula (NEIDHARDT et al. 1996). O fósforo também apresenta uma grande importância para a célula e está envolvido estruturalmente e enzimaticamente nas funções celulares (NEIDHARDT et al. 1996). Além de determinar o melhor nutriente limitante, o primeiro bloco de experimentos avaliou o perfil de consumo da linhagem *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* frente ao fornecimento de xilose.

Esses experimentos foram conduzidos por meio de batelada alimentada por pulso, cuja estratégia de alimentação adiciona, sempre, fonte de carbono em excesso, de forma que o monitoramento dos parâmetros a serem avaliados tornam-se mais difíceis. Dessa forma, adotar uma estratégia de alimentação que forneça a fonte de carbono em quantidades adequadas, resultaria em um bioprocessamento mais eficiente e mais simples de ser interpretado. A estratégia adotada foi realizar os experimentos por meio de batelada alimentada através de alimentação contínua. O cálculo da vazão de alimentação contínua para o fornecimento de xilose como fonte de carbono teve como base o perfil de consumo de *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* na presença de xilose, obtido a partir desse primeiro bloco experimental. O valor determinado foi ajustado ao longo do segundo bloco de experimentos.

O objetivo do segundo bloco de experimentos se concentrou em ajustar a vazão de alimentação calculada durante a fase anterior desse conjunto de experimentos, para que se obtivesse um resultado em que toda ou grande parte da xilose consumida fosse convertida em produto (3HB e CO₂). Com uma vazão de alimentação bem ajustada, seria obtido um experimento com o mínimo de desperdício da fonte de carbono utilizada, representando assim economia do bioprocessamento. Além disso, seriam gerados dados experimentais mais concisos, uma vez que não haveria grandes oscilações nas quantidades de fonte de carbono oferecida, de forma a possibilitar o cálculo preditivo da quantidade de ácido hexanóico a ser fornecido nos experimentos envolvendo modulação da composição de 3HHx no polímero 3HB-co-3HHx.

Estrategicamente, o experimento ideal deveria iniciar a fase de acúmulo sem a presença de xilose, fornecida durante a etapa de crescimento e formação de biomassa celular (batelada). Diante do objetivo de sintetizar homopolímeros de 3HB-co-3HHx a

partir da utilização de uma fonte de carbono secundária, o ácido hexanóico, juntamente com o fornecimento de xilose. O excesso de xilose ao iniciar a fase de acúmulo levaria a produção de heteropolímeros, ou seja, a célula inicialmente utilizaria a xilose em excesso para a produção de 3HB e ao longo do fornecimento da alimentação contínua de xilose com ácido hexanóico, a célula sintetizaria outros blocos poliméricos contendo 3HB-co-3HHx. No primeiro experimento desse bloco, o ensaio A04, observou-se que a quantidade de xilose inicial fornecida não era ideal, uma vez que no início da fase de acúmulo ainda eram observados cerca de 5 g.L⁻¹ de xilose no biorreator. Essa quantidade presente na fase de acúmulo inviabilizou o objetivo inicial que era o de não haver xilose excedente no período inicial de acúmulo, resultando em diversas alterações da vazão de alimentação ao longo do experimento para tentar adequar a quantidade de xilose para a menor quantidade residual possível. A partir das observações nesse experimento, forneceu-se xilose inicial a 10 g.L⁻¹ para todos os experimentos subsequentes. Ao longo dos ensaios foram testadas diversas vazões de alimentação e adotou-se aquela que melhor se adequava aos objetivos do terceiro bloco de experimentos.

Para realizar o terceiro bloco de experimentos, todos os resultados e ajustes obtidos durante o primeiro e segundo bloco foram aplicados nessa etapa. O objetivo desse último bloco experimental foi obter copolímeros com quantidades variáveis de monômeros de 3HHx e utilizar esses resultados para a análise do metabolismo celular frente às condições adotadas. Os experimentos nessa etapa, assim como na segunda, foram conduzidos sob limitação de nitrogênio. Inicialmente foi fornecida xilose 10 g.L⁻¹ para ser utilizada durante a fase de crescimento e formação de biomassa celular. No período de acúmulo foi adotada a mesma vazão de alimentação para todos os experimentos, sem que houvesse alteração dessa vazão ao longo do ensaio, tendo apenas a quantidade de ácido hexanóico variada na solução de alimentação fornecida em cada ensaio.

5.2.3 Resumo dos resultados obtidos durante os cultivos de *B. sacchari* selvagem e *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} em biorreator

Observaram-se, a partir dos experimentos, dois perfis de velocidades de produção de polímero e de consumo de substrato durante a fase de acúmulo. Cada um desses perfis será denominado aqui neste trabalho como “fase”. Na tabela 7 são

apresentados os resultados obtidos a partir da primeira fase dos ensaios conduzidos em biorreator.

Tabela 7: Resumo dos parâmetros experimentais obtidos a partir de ensaios em biorreator.

Experimento	Nutriente limitante	Tempo	MSC	PHA	P(3HB)	P(3HHx)	μ_{maxx}	μ_{xil}	μ_{AHex}	μ_{PHA}	μ_{3HB}	μ_{3HHx}	$Y_{3HB/xil}$	$Y_{3HHx/AHex}$	P
		(h)	(g.L ⁻¹)	(%)	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(h ⁻¹)	(g.g ⁻¹)	(g.g ⁻¹)	[gP(PHA).L ⁻¹ .h]
A00	N	70	12.7	65	8.32	-	0.20	0.23	-	0.10	0.10	-	0.37	-	0.12
A01	P	70	29.9	53	15.7	-	0.19	0.11	-	0.04	0.04	-	0.33	-	0.23
A02	N	64	13.2	57	7.52	-	0.18	0.24	-	0.05	0.05	-	0.29	-	0.13
A03	P	64	10.5	48	5.05	-	0.17	0.12	-	0.04	0.04	-	0.31	-	0.08
A04	N	63	9.9	52	4.12	1.1	0.19	0.18	0.01	0.04	0.034	0.008	0.32	0.54	0.09
B05	N	70	8.2	36	2.94	-	0.15	0.09	-	0.03	0.03	-	0.31	-	0.04
A06	N	40	7.3	35	2.52	-	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	-	0.06
A06REP	N	90	9.8	43	4.18	-	ND	0.05	-	0.02	0.02	-	0.36	-	0.04
A07	N	79	11.4	64	3.96	3.38	ND	0.10	0.02	0.04	0.02	0.02	0.30	0.86	0.09
A09	N	71	10.3	61	4.98	1.35	ND	0.09	0.01	0.04	0.034	0.008	0.38	0.75	0.09
A10	N	71	9.9	57	4.99	0.6	ND	0.11	0.005	0.04	0.04	0.004	0.33	0.89	0.08
A11	N	72	10.5	61	5.72	1.18	ND	0.09	0.008	0.04	0.03	0.006	0.36	0.79	0.10
A12	N	72	9.7	56	5.49	-	ND	0.11	-	0.04	0.04	-	0.40	-	0.07

N: Nitrogênio. P: Fósforo. MSC: Massa seca celular. μ_{maxx} : Velocidade máxima específica de crescimento. μ_{xil} : Velocidade específica de consumo de xilose. μ_{AHex} : Velocidade específica de consumo de ácido hexanóico. μ_{PHA} : Velocidade específica de produção de PHA. μ_{3HB} : Velocidade específica de produção de 3HB. μ_{3HHx} : Velocidade específica de produção de 3HHx. $Y_{3HB/xil}$: Fator de conversão de xilose em 3HB. $Y_{3HHx/AHex}$: Fator de conversão ácido hexanóico em 3HHx. P[gP(PHA)/L.h]: Produtividade de PHA por litro de reator por hora de ensaio.

Como mostra a tabela 7, nos experimentos em batelada alimentada através de pulsos (A00 a A03), foram avaliadas a linhagem controle *B. sacchari* LFM 101 e a linhagem recombinante *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* sob limitação de nitrogênio ou fósforo. Em todos esses experimentos, foram fornecidos apenas xilose como fonte de carbono. Na linhagem selvagem, a limitação de nitrogênio proporcionou um acúmulo de 65% de PHA frente a 53% de PHA obtido com a limitação em fósforo. Na linhagem recombinante *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*, a produção de PHA quando limitada em nitrogênio foi de 57% e na condição limitada em fósforo o valor foi de 48%.

O tempo médio dos experimentos foi de 70h, valor esse composto por uma média de 25h de crescimento do microrganismo no reator e um valor aproximado de 45h de acúmulo, tempo suficiente para que altos valores percentuais de PHA em relação à massa seca celular (MSC) fossem atingidos. O ensaio A06REP teve um tempo de 90h para verificar se a linhagem recombinante *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* conseguiria manter a sua capacidade de produção por mais tempo de ensaio. Observou-se, no entanto, que a cada hora passada de ensaio, a produção de PHA declinava, o que resultou em parâmetros experimentais menores quando comparados aos demais ensaios, tanto em relação à velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xii}) durante o período de síntese de PHA, quanto na velocidade específica de produção do polímero (μ_{PHA}). Além disso, a vazão de alimentação utilizada nesse experimento foi muito abaixo da capacidade máxima metabólica do microrganismo estudado. Esse experimento foi uma repetição das mesmas condições do experimento A06 que durou cerca de 40h. Por razões estruturais o experimento A06 não pode ser conduzido na sua totalidade, de forma a impossibilitar, de forma adequada, a avaliação de condições experimentais essenciais como consumo de fonte de carbono e produção de biopolímero. Entretanto, ele será aqui discutido com a proposta de comparar seu período de 40h com o ensaio subsequente (A06REP).

Os valores da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) foram calculados apenas nos experimentos A00 a B05. O foco deste trabalho não é a análise do crescimento bacteriano. Dessa maneira, os dados coletados nos experimentos A00 a B05 foram o suficiente para que se pudesse entender a dinâmica desse período, que embora não seja foco de estudo, compõe uma etapa essencial dos cultivos em biorreator e compreendê-la se faz necessário para que todo o restante do processo

não seja afetado. A linhagem selvagem apresentou um $\mu_{\max X}$ igual a $0,20 \text{ h}^{-1}$ em limitação de nitrogênio e um $\mu_{\max X}$ igual a $0,19 \text{ h}^{-1}$ quando limitada em fósforo. Os valores obtidos pela linhagem selvagem foram maiores em relação à linhagem recombinante, que apresentou um $\mu_{\max X}$ de $0,18 \text{ h}^{-1}$ no meio limitado em nitrogênio e $0,17 \text{ h}^{-1}$ em meio limitado em fósforo. No experimento B05 é observado um $\mu_{\max X}$ igual a $0,15 \text{ h}^{-1}$. A partir da avaliação dos μ_{Xil} é possível observar um valor de consumo próximo a $0,10 \text{ h}^{-1}$ para todos os experimentos supridos com alimentação contínua, com exceção dos ensaios A04 e A06REP. As velocidades máximas específicas de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}), de síntese de 3HHX (μ_{3HHX}) e o fator de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHX ($Y_{3HHX/AHex}$) variaram entre os ensaios tendo em vista que houve variação nas quantidades fornecidas desse substrato nos diferentes experimentos. O experimento A07 foi o ensaio com a maior relação de fornecimento xilose/ácido hexanóico. Durante este experimento, não foi detectada a presença dessa fonte secundária de carbono, ou seja, provavelmente a capacidade máxima de metabolização desse substrato pela bactéria ainda não tenha sido atingida. Outra observação importante é que mesmo com o fornecimento de ácido hexanóico as velocidades de consumo de xilose se mantiveram constantes. A velocidade máxima específica de produção de PHB (μ_{3HB}) nos experimentos em batelada alimentada por pulso com a linhagem recombinante foi de $0,05 \text{ h}^{-1}$ para a limitação em nitrogênio. Esse valor é próximo aos obtidos nos ensaios conduzidos por alimentação contínua, cujo os valores obtidos variaram em torno de $0,03 \text{ h}^{-1}$ a $0,04 \text{ h}^{-1}$. Na linhagem selvagem observou-se um μ_{3HB} para a limitação em nitrogênio ($0,07 \text{ h}^{-1}$) e um valor de μ_{3HB} ($0,04 \text{ h}^{-1}$) para a limitação em fósforo.

Os fatores de conversão de xilose em 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) obtiveram valores aproximados entre os experimentos conduzidos por batelada alimentada contínua e batelada alimentada por pulso. O valor médio de $Y_{3HB/Xil}$ foi de $0,34 \pm 0,04 \text{ g.g}^{-1}$. Nos itens 5.2.5.1 a 5.2.7.1 cada um dos experimentos serão discutidos individualmente.

5.2.4 Padronização dos resultados obtidos durante o cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator

Na tabela 8 estão apresentados os valores calculados a partir do início dos experimentos até o ponto máximo de produção de biopolímero. Esses valores obtidos entre o início dos cultivos até o ponto máximo de produção de PHA foram utilizados

para padronizar os resultados obtidos entre os ensaios. A padronização se faz importante, tendo em vista que, os ensaios foram conduzidos em diferentes momentos ao longo deste trabalho e os tempos de cultivo não foram exatamente os mesmos. Dessa forma, ao se obter valores similares dos parâmetros escolhidos entre os ensaios realizados, expõe-se a reprodutibilidade e a confiabilidade dos valores obtidos neste trabalho.

Tabela 8: Padronização dos resultados obtidos nos três blocos experimentais com o objetivo de se comparar a similaridade entre os mesmos.

Condição do experimento	Experimento	MSC (g.L ⁻¹)	PHA (%)	3HB (g.L ⁻¹)	3HHx (g.L ⁻¹)	μ_{maxX} (h ⁻¹)	Y _{3HB/xil} (g.g ⁻¹)	Y _{3HHx/Hex} (g.g ⁻¹)	P [gP(PHA).L ⁻¹ .h ⁻¹]
Pulso/Xilose	A02	13.2	57	7.52	-	0.18	0.20	NR	0.14
	A03	10.5	48	5.05	-	0.17	0.15	NR	0.08
Alimentação contínua Xilose	B05	8.2	36	2.94	-	0.15	0.09	NR	0.04
	A06	7.3	35	2.52	-	ND	ND	NR	ND
	A06REP	9.8	43	4.18	-	ND	0.19	NR	0.06
	A12	9.7	56	5.49	-	ND	0.22	NR	0.10
	A04	9.9	52	4.12	1.1	0.18	0.18	0.6	0.09
	A07	11.4	64	3.96	3.38	ND	0.22	0.74	0.11
Alimentação contínua Xilose+ ÁHex	A09	10.3	61	4.98	1.35	ND	0.23	0.75	0.10
	A10	9.9	57	4.99	0.6	ND	0.20	0.76	0.08
	A11	10.5	61	5.72	1.18	ND	0.24	0.73	0.09

A: Reator utilizado marca: *Applikon Biotechnology*. B: Reator utilizado marca *B-Braun* Melsugen. N: Nitrogênio. P: Fósforo. Primeiro bloco de experimentos: A00, A01, A02 e A03. Segundo bloco de experimentos: A04, B05, A06, A06REP e A07. Terceiro bloco de experimentos: A09, A10, A11 e A12. MSC: Massa seca celular. PHA (%): Composição de PHA em relação à biomassa total. P[gP (3HB)/L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de 3HB por litro de reator por hora de ensaio. P[Gp (3HHx)/L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de P3HHx por litro de reator por hora de ensaio. Y_{3HB/xil}: Fator de conversão de xilose em 3HB. Y_{3HHx/ÁHex}: Fator de conversão ácido hexanóico em 3HHx. P[gP (PHA)/L⁻¹.h⁻¹): Produtividade de PHA por litro de reator por hora de ensaio.

Os parâmetros levados em consideração para se verificar a igualdade entre os experimentos foram os fatores de conversão de xilose em 3HB (Y_{3HB/xil}), fatores de conversão de ácido hexanóico em 3HHx (Y_{3HHx/ÁHex}) e a produtividade em PHA em gramas, por litro de biorreator por hora de ensaio (g.PHA. L⁻¹.h⁻¹).

Em relação a conversão de xilose em 3HB é possível observar um valor próximo a 0,20 g.g⁻¹ para todos os experimentos, com exceção dos experimentos B05. Como discutido anteriormente, o ensaio B05 foi suprido com uma baixa quantidade de xilose ao longo do cultivo, o que possivelmente afetou sua capacidade máxima de conversão de xilose em 3HB.

Para o fator de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx, os valores obtidos para o $Y_{3HHx/AHex}$ variaram em torno de $0,70 \text{ g.g}^{-1}$, com exceção do cultivo A04. O valor obtido no cultivo A04 pode ser explicado devido às diversas alterações de vazões de alimentação ao longo do cultivo, em alguns momentos, proporcionando maiores quantidades de ácido hexanóico e em outros períodos oferecendo uma quantidade muito baixa.

As produtividades de PHA ficaram em torno de $0,10 \text{ g.PHA. L}^{-1}. \text{ h}^{-1}$ para a condição de alimentação contínua. Os ensaios B05 e A06REP apresentaram produtividades muito abaixo do observado nos demais experimentos. As razões pelas quais houve essa baixa produtividade são as mesmas destacadas em relação aos fatores de conversão para o experimento B05. Para o experimento A06REP a baixa produtividade está relacionada com o fato do experimento ter durado cerca de 90h. Como a produtividade é um parâmetro que leva em conta o tempo total do experimento, essa ficou muito abaixo, devido às últimas 20h desse ensaio ter sintetizado uma baixa quantidade 3HB.

5.2.5 Primeiro bloco de experimentos

Esse bloco de experimentos corresponde aos ensaios A00, A01, A02 e A03 apresentados na figura 7. A discussão de cada um desses experimentos está apresentada nos itens 5.2.5.1 a 5.2.5.2.

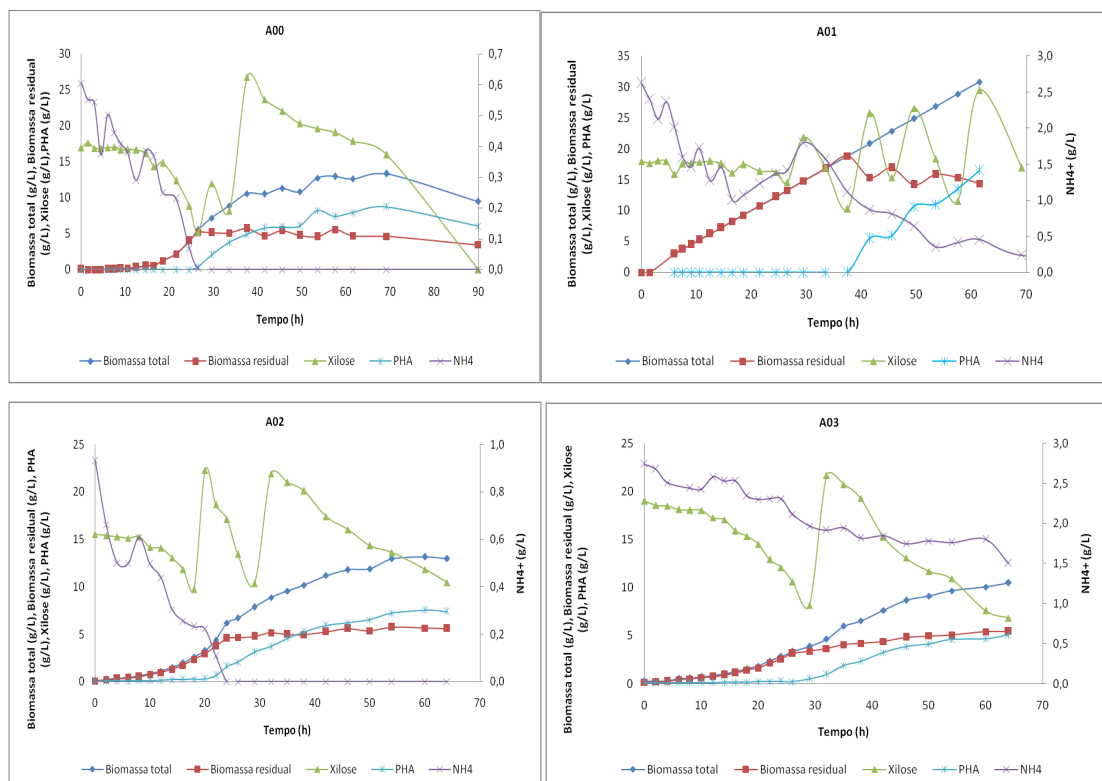


Figura 7: Primeiro bloco de experimentos. Experimentos A00 e A01: Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM 101. Experimento A00: Limitação em fósforo. Experimento A01: Limitação em nitrogênio. Experimentos A00 e A01: Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Experimento A02: Limitação em nitrogênio. Experimento A03: Limitação em fósforo.

5.2.5.1 Avaliação da linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 na produção de 3HB a partir de xilose em cultivos limitados em fósforo ou nitrogênio

Nos experimentos A00 e A01 (Figura 8), xilose foi fornecida a (15 g.L^{-1}) durante a fase de crescimento, em batelada. Durante a fase de acúmulo, foram realizados dois pulsos de alimentação para condição limitada em nitrogênio e quatro pulsos de alimentação para a condição limitada em fósforo. Os pulsos são soluções concentradas de fonte de carbono que são injetadas no biorreator para que esse se mantenha com uma concentração elevada de xilose, mantendo assim a condição de excesso da fonte de

carbono no meio de cultura.

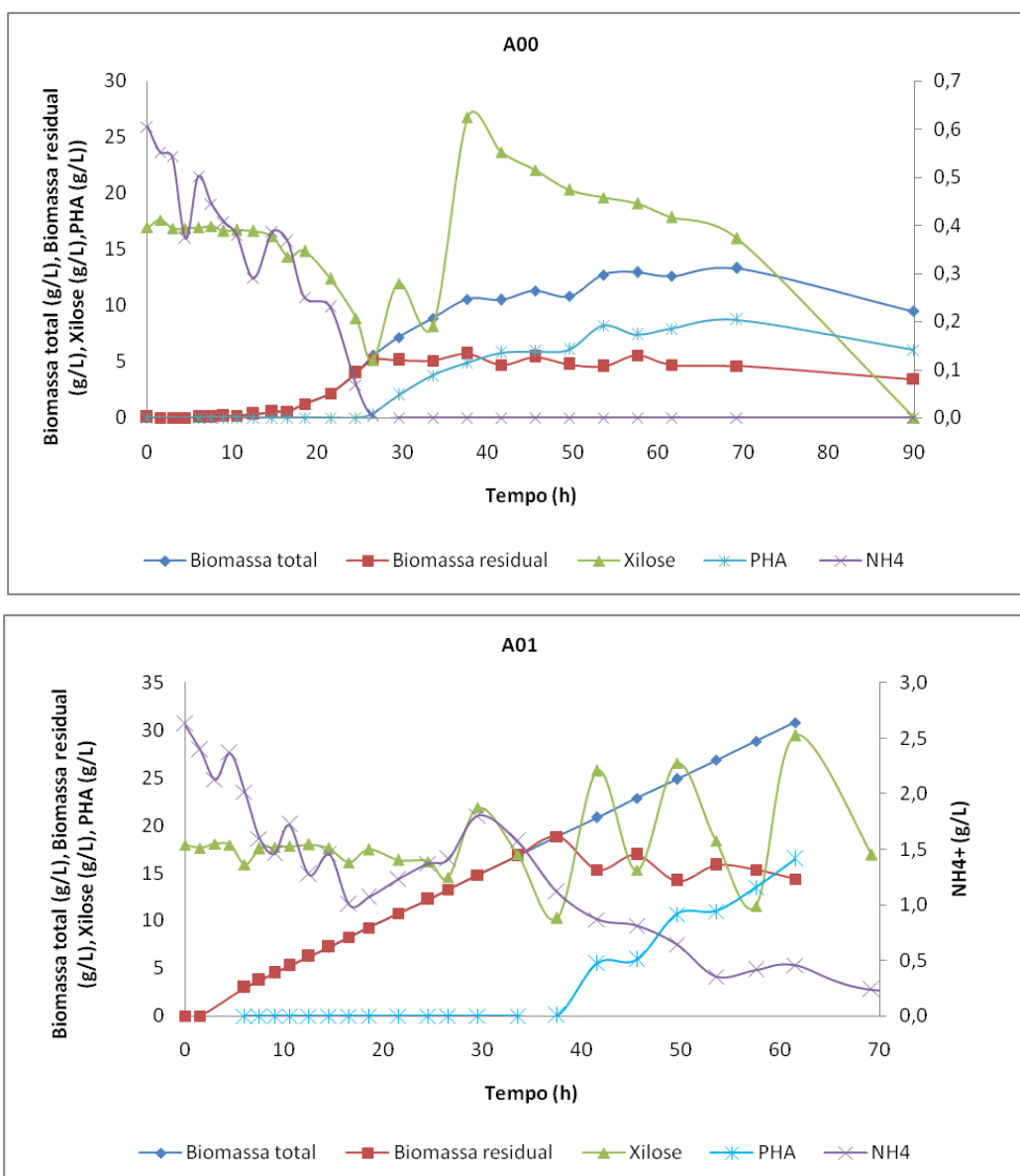


Figura 8: Experimento de produção de 3HB por *B. sacchari* LFM 101. (Ensaio A00 e A01) cultivo suprido com uma adição inicial de xilose para uma concentração de 15g.L^{-1} e manutenção da concentração de xilose em um valor acima de 5g.L^{-1} por meio de pulsos de alimentação durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (X_r), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (g.L^{-1}) ao longo do tempo.

Nesses experimentos, o crescimento celular bacteriano durou 26,5h horas até alcançar a limitação em nitrogênio (A00). Para a limitação em fósforo (A01) houve crescimento acentuado até 41,5h, com uma desaceleração após esse período, embora com uma tendência ascendente até o final do experimento. As velocidades máximas específicas de crescimento ($\mu_{\text{max}X}$) do cultivo atingiram $0,20\text{h}^{-1}$ para o meio limitado em nitrogênio e $0,19\text{h}^{-1}$ para o meio limitado em fósforo. O $\mu_{\text{max}X}$ obtido por FARJADO (2015) para limitação em nitrogênio frente a xilose foi igual a $0,18\text{h}^{-1}$. Silva e colaboradores (2004) ao avaliar *B. sacchari* selvagem em presença de hidrolisado

de cana de açúcar obteve um μ_{\max} igual a $0,24\text{h}^{-1}$ e quando essa mesma cepa foi avaliada em presença de xilose+glicose o μ_{\max} obtido foi igual a $0,25\text{h}^{-1}$. Durante a fase exponencial de crescimento não foi identificado acúmulo de PHA para ambos os ensaios. Os valores da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}), obtiveram valores de $0,23\text{h}^{-1}$ entre os períodos 24,5h a 33,5h (Fase 1) e $0,06\text{h}^{-1}$ entre os tempos 45,5h a 70h (Fase 2) para a limitação em nitrogênio. Na limitação em fósforo o μ_{xil} obtido foi igual a $0,11\text{h}^{-1}$ entre os tempos 49,5h a 70h (Fase 1). Em relação aos valores da velocidade específica de produção de 3HB ($\mu_{3\text{HB}}$), na limitação em nitrogênio, entre os tempos 26,5h a 33,5h (Fase 1), o valor obtido foi igual a $0,10\text{h}^{-1}$ e entre os períodos 37,5h a 70h (Fase 2) o valor conquistado foi $0,01\text{h}^{-1}$. Para a limitação em fósforo o valor de $\mu_{3\text{HB}}$ obtido foi igual a $0,04\text{h}^{-1}$ entre os tempos 49,5h às 70h (Fase 1). A conversão de xilose em PHA ($Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$) teve duas fases para a limitação em nitrogênio, sendo a primeira fase entre 26,5h a 53,5h, com um $Y_{3\text{HB}/\text{xil}} = 0,37\text{ g.g}^{-1}$, e uma segunda fase entre 57,5h a 70h com um $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$ igual a $0,35\text{ g.g}^{-1}$. Para a limitação em fósforo, houve apenas uma fase de $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$, sendo essa fase entre 45,5h às 70h com um $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$ igual a $0,33\text{ g.g}^{-1}$. Silva e colaboradores (2004) obtiveram um $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$ igual a $0,39\text{ g.g}^{-1}$ para limitação em nitrogênio com o fornecimento de hidrolisado lignocelulósico como fonte de carbono. Para limitação em nitrogênio com o suprimento de glicose+xilose Silva e colaboradores (2004) reportaram um $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$ igual a $0,22\text{ g.g}^{-1}$.

Na tabela 9, encontram-se os valores experimentais obtidos nesses ensaios. No apêndice B (Figuras A.1-A. 8) estão os gráficos utilizados para se calcular os valores discutidos. Os experimentos A00 e A01 serviram de base para o artigo submetido (OLIVEIRA FILHO et al. 2019) intitulado "Investigating nutrient limitation role on improvement of growth and poly-3-hydroxybutyrate accumulation by *Burkholderia sacchari* LMG 19450 from xylose as the sole carbon source" (ANEXO A), onde os principais pontos discutidos é a influência das limitações de nitrogênio e fósforo no acúmulo de PHA.

Tabela 9: Cultivos de *B. sacchari* LFM 101 em biorreator (A00 e A01) para biossíntese de 3HB a partir de xilose.

A00						
Tempo (h)	Xilcons g.L ⁻¹	NH ₄ g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)
0	0.00	0.61	0.00	0.00	0.00	0
2	0.37	0.55	0.00	0.00	0.00	0
3	1.36	0.54	0.00	0.00	0.00	0
5	1.62	0.37	0.00	0.00	0.00	0
6	1.77	0.50	0.01	0.01	0.00	0
8	1.88	0.44	0.04	0.04	0.00	0
9	2.49	0.41	0.12	0.12	0.00	0
11	3.59	0.38	0.18	0.18	0.00	0
13	3.92	0.29	0.31	0.31	0.00	0
15	4.65	0.39	0.49	0.49	0.00	0
17	5.70	0.37	0.75	0.75	0.00	0
19	7.04	0.25	1.22	1.22	0.00	0
22	9.25	0.23	2.16	2.16	0.00	0
25	12.77	0.00	3.98	3.98	0.00	0
27	15.99	0.00	5.51	5.15	0.36	7
30	20.17	0.00	7.39	5.30	2.09	28
34	22.95	0.00	9.40	5.41	3.99	42
38	26.24	0.00	10.35	5.55	4.79	46
42	30.06	0.00	11.11	4.99	6.12	55
46	32.10	0.00	11.80	5.65	6.15	52
50	34.37	0.00	11.53	5.05	6.48	56
54	38.78	0.00	12.05	4.29	7.76	64
58	39.87	0.00	12.49	5.36	7.13	57
62	41.64	0.00	12.60	4.70	7.90	63
69	44.13	0.00	12.71	4.39	8.32	65
90	46.53	0.00	10.06	3.66	6.40	64

A01						
Tempo (h)	Xilcons g.L ⁻¹	NH ₄ g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)
0	0.00	2.63	0.00	0.00	0.00	0
2	1.43	2.39	0.00	0.00	0.00	0
3	1.22	2.13	0.01	0.01	0.00	0
5	1.62	2.36	0.01	0.01	0.00	0
6	2.12	2.02	0.02	0.02	0.00	0
8	2.44	1.59	0.07	0.07	0.00	0
9	2.54	1.46	0.09	0.09	0.00	0
11	3.72	1.72	0.15	0.15	0.00	0
13	3.82	1.27	0.17	0.17	0.00	0
15	4.56	1.45	0.29	0.29	0.00	0
17	5.31	1.00	0.49	0.49	0.00	0
19	6.17	1.07	0.43	0.43	0.00	0
22	6.77	1.23	0.68	0.68	0.00	0
25	7.18	1.37	1.15	1.15	0.00	0
27	7.55	1.41	1.45	1.45	0.00	0
30	11.13	1.80	2.45	2.45	0.00	0
34	15.98	1.57	4.50	4.50	0.00	0
38	21.16	1.12	7.55	7.55	0.00	0
42	23.87	0.87	10.20	10.19	0.01	0
46	32.39	0.81	14.81	10.89	1.64	26
50	42.10	0.64	18.36	13.61	4.75	26
54	54.00	0.35	22.24	12.69	7.40	43
58	57.94	0.42	24.96	14.73	10.23	41
62	61.94	0.46	26.45	14.08	12.37	47
69	71.00	0.24	29.33	13.66	15.67	53
90	90.20	0.17	36.76	16.44	20.32	55

Xilcons: Xilose consumida. NH₄: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual; 3HB: 3-hidroxi-butirato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. Pulsos de alimentação no cultivo A00: 27h e 34h de cultivo. Pulsos de alimentação no cultivo A01: 27h, 38h, 46h e 58h de cultivo.

5.2.5.2 Experimento em biorreator com *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{ASP} com limitação em nitrogênio e fósforo para cálculo de velocidades de consumo de xilose

Os experimentos A02 e A03 (Figura 9) foram realizados em meio MM4 e MM5 para se calcular uma vazão específica de alimentação para xilose e para se determinar o melhor tipo de limitação, nitrogênio ou fósforo, a ser utilizada nos experimentos seguintes. A vazão específica de alimentação foi calculada a partir da determinação da velocidade específica de consumo de xilose durante a fase estacionária do cultivo

(μ_{xii}). O μ_{xii} calculado foi durante a fase estacionária do desenvolvimento microbiano, visto que é nessa fase que o microrganismo direciona a fonte de carbono consumida para a síntese de PHA e uma pequena parte para a sua manutenção celular.

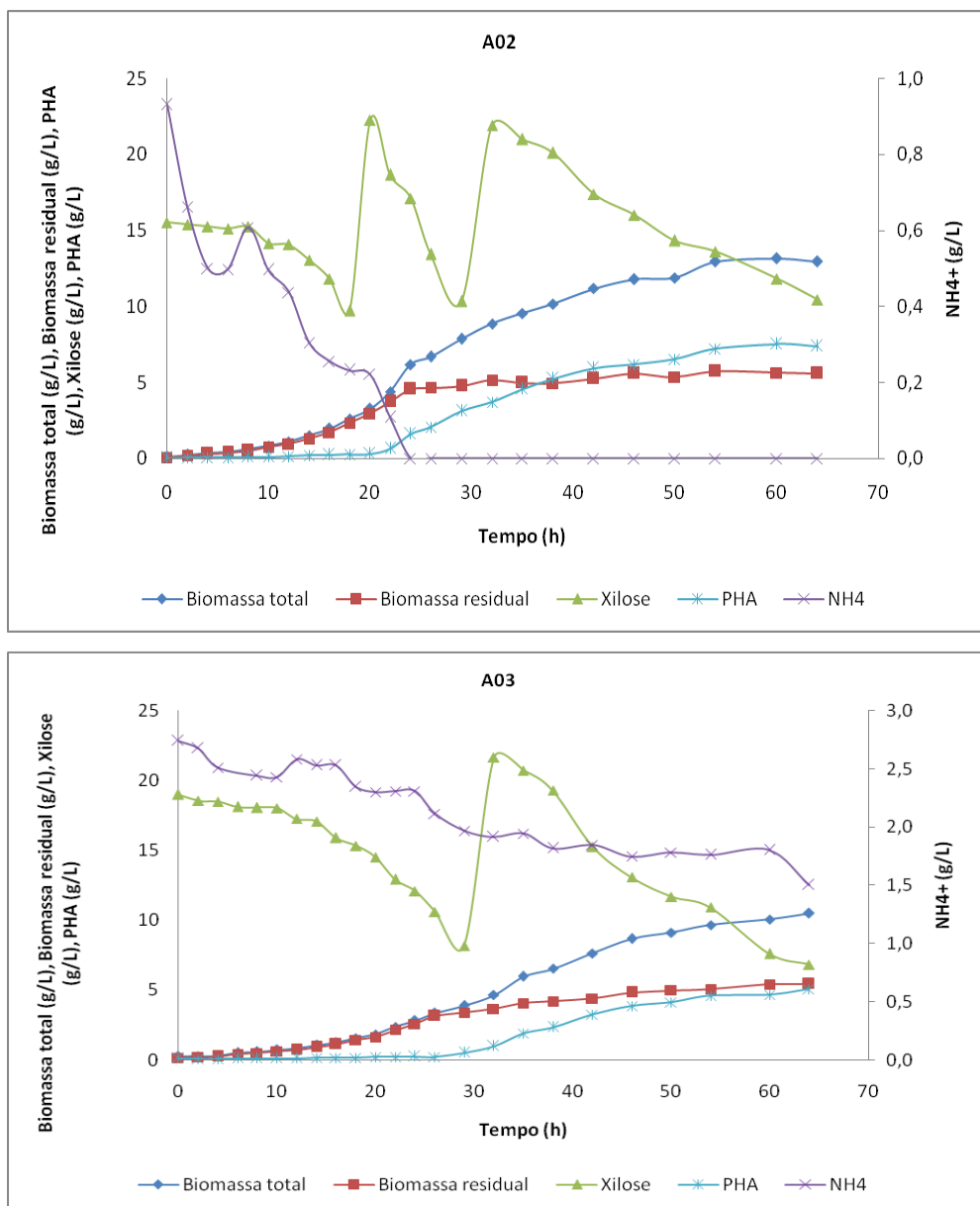


Figura 9: Experimento de produção de 3HB por *B. sacchari*PCJ_{Asp}. (Ensaio A02 e A03) cultivo suprido com uma adição inicial de xilose para uma concentração de 15g.L⁻¹ e manutenção da concentração de xilose em um valor acima de 5g.L⁻¹ por meio de pulsos de alimentação durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (X_r), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH₄⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

Nesse experimento, xilose foi fornecida a 15 g.L⁻¹ durante a fase de crescimento. Durante a fase de acúmulo foram realizados dois pulsos de alimentação para condição limitada em nitrogênio e um pulso de alimentação para a condição limitada em fósforo. As velocidades máximas específicas de crescimento (μ_{maxx}) atingiram 0,18 h⁻¹ para o

meio limitado em nitrogênio e $0,17 \text{ h}^{-1}$ para o meio limitado em fósforo. MENDONÇA (2014) ao avaliar esse mesmo recombinante com o suprimento de glicose como fonte de carbono e limitação em nitrogênio obteve um μ_{max} igual a $0,20 \text{ h}^{-1}$ e no cultivo limitado em fósforo com o fornecimento da mesma fonte de carbono um μ_{max} igual a $0,22 \text{ h}^{-1}$. Mozejko et al. (2018) ao estudar *Aeromonas sp.* em meio de cultura contendo glicerol derivado de biodiesel em estado puro, e limitação em nitrogênio ou fósforo, obteve valores de μ_{max} iguais a $0,43 \text{ h}^{-1}$ e $0,38 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. A partir do fornecimento de glicerol bruto, o μ_{max} conquistado para a limitação em nitrogênio ou fósforo, foram respectivamente, $0,65 \text{ h}^{-1}$. Os valores de μ_{max} reportados por Mozejko et al. (2018) são satisfatórios, entretanto, o microrganismo em questão acumulou um valor máximo de PHA total em relação a biomassa igual a 20,7% em glicerol puro e menos de 45% em glicerol derivado de biodiesel.

Durante o intervalo de tempo entre 0h às 64h o PHA acumulado foi em média $7,4 \text{ g.L}^{-1}$ no meio limitado em nitrogênio e igual a $5,1 \text{ g.L}^{-1}$ no meio limitado em fósforo. Durante o período experimental houve acúmulo médio de 57% de PHA para o meio limitado em nitrogênio e 48% para o meio limitado em fósforo. Mendonça (2014) ao avaliar a mesma linhagem em meio limitado em nitrogênio e com o fornecimento de glicose como única fonte de carbono, obteve mais de 80% da biomassa total em PHA. Para a limitação em fósforo e fornecimento de glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono, o valor de PHA em relação à biomassa total foi próximo a 59%. Wen et. al (2010) ao avaliar os efeitos da limitação de nitrogênio ou fósforo na produção de PHA a partir de microrganismos obtidos do lodo ativado, com o fornecimento de acetato como fonte de carbono, demonstrou um acúmulo equivalente entre as duas limitações, cerca de 30% da biomassa total em PHA. Entretanto, os valores de produtividade apresentaram-se mais satisfatoriamente na limitação em nitrogênio. Esse melhor acúmulo em meio limitado em nitrogênio, segundo Wen et. al (2010), ocorre devido a não produção de novas células sob a limitação de nitrogênio, sendo toda ou a maior parte da fonte de carbono convertida em produto. No meio limitado em fósforo, às bactérias continuam gerando novas células, o que faz com que uma parte do carbono, seja gasto para produzir essas células.

A figura 10 faz uma comparação entre as porcentagens médias de acúmulo entre os dois ensaios ao longo do tempo. Na tabela 10 encontram-se os valores experimentais obtidos nesses ensaios. No apêndice B (Figuras A.9 – A.16) encontram-se os gráficos utilizados para a determinação dos valores apresentados.

Tabela 10: Cultivos de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (A02 e A03) para biossíntese de 3HB a partir de xilose.

Tempo (h)	A02					PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00	0.93	0.08	0.06	0.02	28	100	0
2	0.25	0.66	0.24	0.18	0.06	26	100	0
4	0.53	1.22	0.36	0.29	0.07	20	100	0
6	0.86	0.50	0.45	0.38	0.07	16	100	0
8	0.88	0.61	0.61	0.52	0.10	16	100	0
10	2.19	0.50	0.83	0.73	0.10	12	100	0
12	2.42	0.44	1.08	0.94	0.14	13	100	0
14	3.56	0.30	1.50	1.30	0.20	13	100	0
16	4.99	0.26	1.95	1.72	0.22	12	100	0
18	7.25	0.23	2.61	2.35	0.26	10	100	0
20	7.97	0.22	3.27	2.95	0.31	10	100	0
22	11.00	0.11	4.40	3.74	0.66	15	100	0
24	12.81	0.00	6.18	4.56	1.62	26	100	0
26	16.76	0.00	6.70	4.65	2.05	31	100	0
29	20.13	0.00	7.87	4.76	3.11	40	100	0
32	19.68	0.00	8.86	5.15	3.71	42	100	0
35	19.04	0.00	9.54	4.96	4.58	48	100	0
38	21.00	0.00	10.18	4.94	5.24	51	100	0
42	24.16	0.00	11.18	5.24	5.94	53	100	0
46	25.89	0.00	11.78	5.59	6.19	53	100	0
50	28.05	0.00	11.88	5.34	6.54	55	100	0
54	29.15	0.00	12.94	5.73	7.21	56	100	0
60	31.31	0.00	13.17	5.64	7.52	57	100	0
64	33.19	0.00	12.96	5.59	7.37	57	100	0

Tempo (h)	A03					PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	NH ₄ g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00	2.74	0.25	0.16	0.09	38	100	0
2	0.62	2.67	0.27	0.19	0.07	28	100	0
4	0.86	2.51	0.30	0.23	0.06	21	100	0
6	1.45	2.47	0.52	0.41	0.11	21	100	0
8	1.68	2.44	0.57	0.46	0.11	19	100	0
10	1.89	2.43	0.72	0.60	0.11	16	100	0
12	2.82	2.58	0.83	0.71	0.12	14	100	0
14	3.16	2.53	1.05	0.92	0.13	12	100	0
16	4.59	2.53	1.27	1.13	0.14	11	100	0
18	5.35	2.34	1.57	1.41	0.16	10	100	0
20	6.43	2.30	1.83	1.64	0.19	11	100	0
22	8.25	2.31	2.37	2.15	0.22	9	100	0
24	9.43	2.31	2.82	2.57	0.24	9	100	0
26	11.13	2.11	3.35	3.14	0.21	6	100	0
29	13.78	1.97	3.87	3.37	0.50	13	100	0
32	13.05	1.91	4.64	3.66	0.98	21	100	0
35	13.25	1.94	5.96	4.07	1.89	32	100	0
38	14.98	1.82	6.53	4.20	2.33	36	100	0
42	19.32	1.85	7.63	4.40	3.23	42	100	0
46	21.81	1.75	8.68	4.81	3.87	45	100	0
50	23.58	1.78	9.10	4.98	4.12	45	100	0
54	24.66	1.76	9.64	5.06	4.58	48	100	0
60	28.31	1.80	10.05	5.39	4.66	46	100	0
64	29.47	1.50	10.48	5.43	5.05	48	100	0

Xilcons: Xilose consumida. NH₄: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual; 3HB: 3-hidroxi-butanato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. Pulsos de alimentação no cultivo A02: 20h e 32h de cultivo. Pulso de alimentação no cultivo A03: 32h de cultivo.

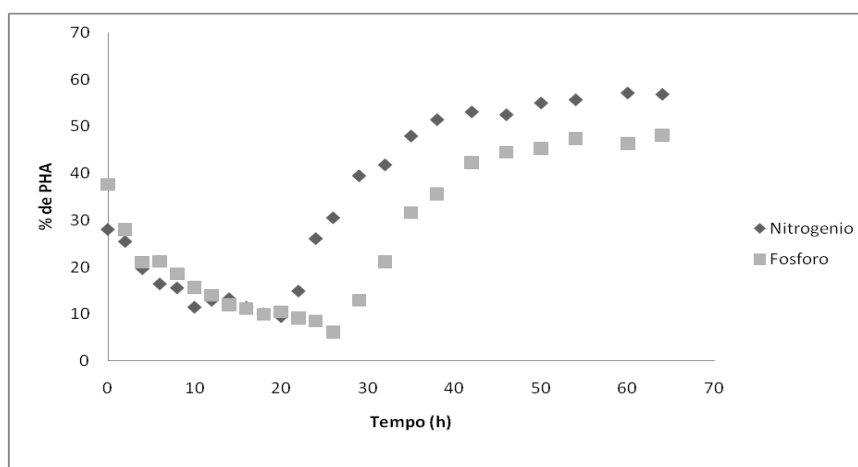


Figura 10: Comparação percentual dos níveis de 3HB produzido ao longo do experimento sob limitação de nitrogênio (A02) ou fósforo (A03) pela linhagem recombinante *B. sacchari*PCJ_{Asp}.

O valor obtido para a velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}), para a limitação em nitrogênio, entre os tempos 24h a 32h (Fase 1), foi igual a $0,24h^{-1}$ e entre 35h a 50h (Fase 2) uma velocidade de consumo igual a $0,08h^{-1}$. No cultivo limitado em fósforo observou-se um μ_{xil} igual a $0,12h^{-1}$ entre os tempos 26h a 42h (Fase 1) e um μ_{xil} igual a $0,08h^{-1}$ entre os tempos 46h a 64h (Fase 2). Em relação à velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}), o cultivo limitado em nitrogênio obteve entre os tempos 24h a 42h (Fase 1), um μ_{3HB} igual a $0,05h^{-1}$ e entre 46h a 64h (Fase 2) um μ_{3HB} igual a $0,01h^{-1}$. No ensaio limitado em fósforo μ_{3HB} obtido entre os tempos 26h a 46h (Fase 1) foi igual a $0,04h^{-1}$ e entre os tempos 50h a 64h (Fase 2) o μ_{3HB} foi igual a $0,01h^{-1}$.

Com base no perfil de consumo de xilose em meio limitado em nitrogênio, visto que o acúmulo de PHA foi mais eficiente nessa limitação, uma vazão de alimentação contínua foi calculada levando-se em consideração a faixa de tempo entre 35h às 50h de cultivo. O objetivo desse experimento foi determinar um valor aproximado do consumo de xilose em função do tempo, para que assim, fosse suprida apenas a demanda necessária para os experimentos seguintes em biorreatores, o valor determinado foi ajustado ao longo do segundo bloco de experimentos, como será discutido no item 5.2.5.3.

O cálculo da vazão específica de alimentação foi realizado da seguinte forma: Multiplicou-se o μ_{xil} na concentração escolhida [$0,06\text{ g (Xilose)/g.(células).h}$] pela concentração celular obtida ($6,18\text{ g.L}^{-1}$), dividindo o resultado pela concentração da solução de xilose que seria oferecida (100 g.L^{-1}). O resultado deste cálculo para vazão específica de alimentação foi igual a $3,7\text{ mL.L}^{-1}.h^{-1}$ ou $0,06\text{ mL.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Assim como nos cultivos com a linhagem selvagem, nos cultivos com a linhagem recombinante também foi possível observar mudanças nos fatores de conversão ($Y_{3HB/xil}$) ao longo do cultivo. Para limitação em nitrogênio, entre os tempos 22h a 35h (Fase 1) o $Y_{3HB/xil}$ foi igual a $0,29\text{ g.g}^{-1}$ e entre 42h a 64h (Fase 2) o $Y_{3HB/xil}$ obtido foi igual a $0,18\text{ g.g}^{-1}$. Mendonça (2014) obteve para essa mesma limitação, a partir do fornecimento de glicose como fonte de carbono, um $Y_{3HB/Gli}$ igual a $0,29\text{ g.g}^{-1}$. Observa-se nos trabalhos realizados por Mendonça (2014) um único perfil de conversão de glicose em monômeros de 3HB ao longo de todo o cultivo. Os valores obtidos a partir do fornecimento de xilose demonstram um alto potencial dessa fonte de carbono frente ao uso de glicose e outras fontes de carbono. Entretanto, algumas barreiras ainda precisam ser superadas, tais como: o tempo em que a linhagem

converte valores máximos de xilose em monômeros de 3HB, sendo esse tempo restrito há uma faixa de apenas 13h do cultivo e após esse período a conversão declina consideravelmente, enquanto que em meio suprido com glicose o valor de conversão máximo permanece inalterado por mais de 20h. Para limitação em fósforo, entre os tempos 29h a 46h (Fase 1) o $Y_{3HB/Xil}$ conquistado foi igual a $0,31 \text{ g.g}^{-1}$ e do período 50h a 64h (Fase 2) o $Y_{3HB/Xil}$ obtido foi de $0,11 \text{ g.g}^{-1}$. Mendonça (2014) em condições similares de cultivo, fornecendo glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono, obteve um $Y_{3HB/Gli}$ igual a $0,20 \text{ g.g}^{-1}$. A partir dos resultados, baseando-se na quantidade de polímero obtido, a limitação em nitrogênio foi à escolhida para os ensaios posteriores.

5.2.6 Segundo bloco de experimentos

Esse bloco de experimentos corresponde aos ensaios A04, B05, A06, A06REP e A07 apresentados na figura 11. A discussão de cada um desses experimentos está apresentada nos itens subsequentes. Nesse bloco de experimentos buscou-se pelo ajuste da vazão específica de alimentação referente ao fornecimento de xilose.

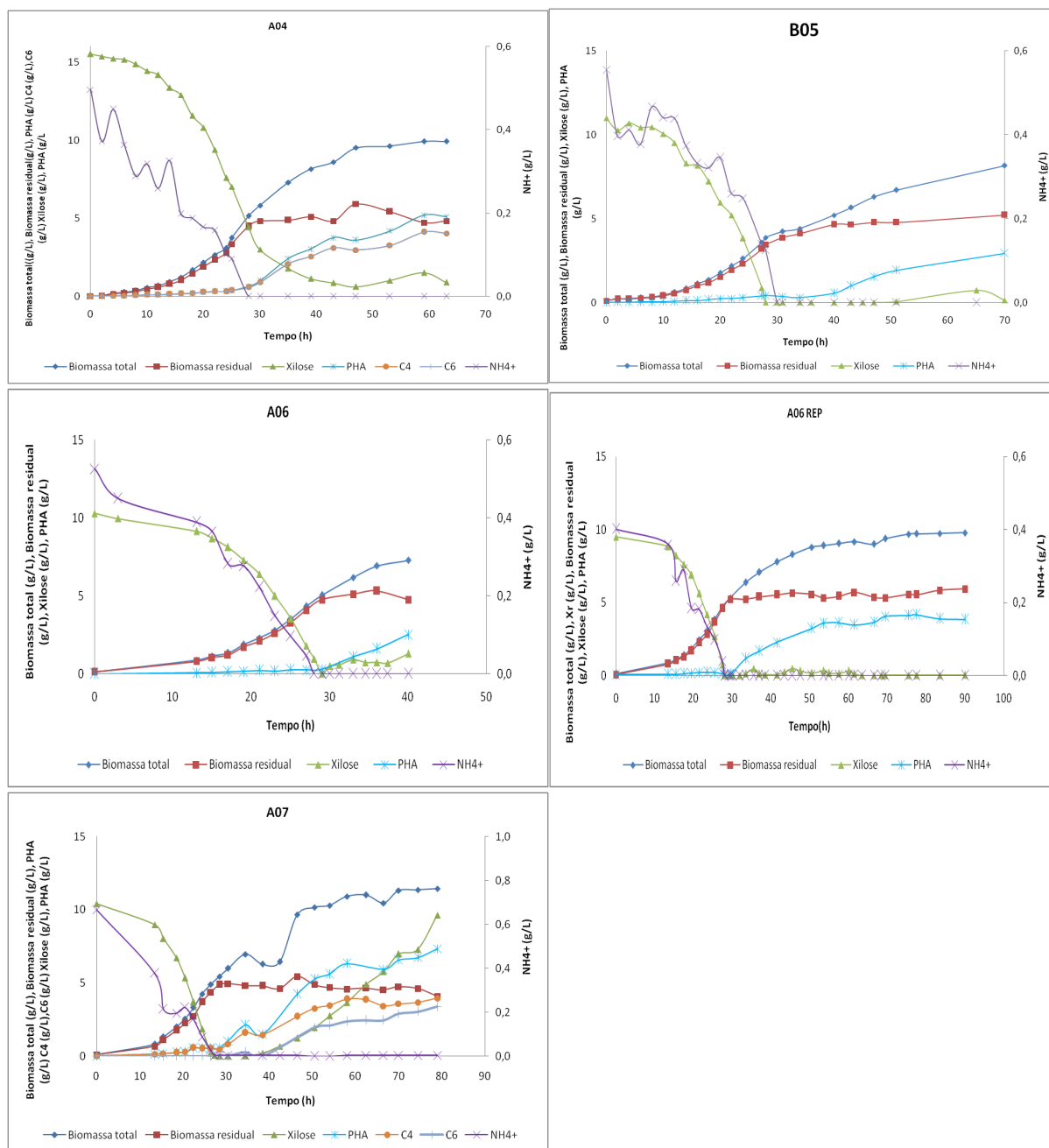


Figura 11: Segundo bloco de experimentos. Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*. Experimento A04 e A07: Fornecimento de xilose e Ácido Hexanóico durante a fase estacionária através de alimentação contínua. Experimentos B05, A06 e A06REP: Fornecimento de xilose durante a fase estacionária através de alimentação contínua.

5.2.6.1 Experimento em biorreator para verificação da vazão de alimentação anteriormente calculada com *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* em meio limitado em nitrogênio utilizando vazão específica de alimentação de xilose e ácido hexanóico

Inicialmente, o objetivo do seguinte experimento era de que a xilose fosse totalmente consumida para que assim fosse possível calcular todos os parâmetros

avaliados levando-se em conta toda fonte de carbono fornecida. Esse experimento seria o experimento base para os experimentos envolvendo a modulação da composição de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx e por essa razão foi avaliado o consumo de xilose e ácido hexanóico. Entretanto, o objetivo central deste experimento não foi atingido, o que levou a necessidade de se realizar outros ensaios para que se pudessem obter bons ajustes experimentais para a etapa de modulação, que será discutida posteriormente. A partir dos resultados aqui obtidos, algumas mudanças foram realizadas e ensaios subsequentes foram realizados, dessa vez, apenas com o fornecimento de xilose, tendo em vista que os maiores desafios se concentravam em cima dessa fonte de carbono. Esses ensaios de ajuste de vazão específica de alimentação deram origem o que aqui neste trabalho é denominado como segundo bloco experimental.

A partir de uma vazão calculada de alimentação, por meio dos dados obtidos através do consumo de xilose na fase estacionária do experimento A02 (35h-50h), realizou-se um ensaio em biorreator (Figura 12), em que houve uma batelada inicial com xilose (15 g.L^{-1}) para a fase de crescimento e a fase de acúmulo alimentada com uma solução de ácido hexanóico (17.4 g.L^{-1}) e xilose (104 g.L^{-1}) a uma vazão de $3,7 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose e ácido hexanóico, a uma vazão de $3,7 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $0,37 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,006 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), e $0,06 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,001 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), respectivamente.

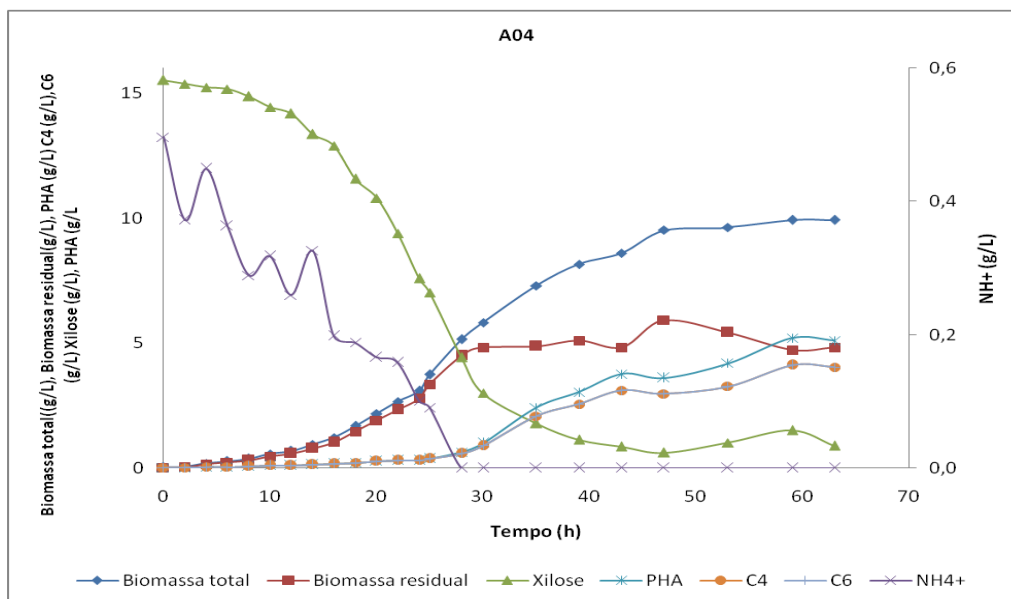


Figura 12: Produção de 3HB-co-3HHx por *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. Cultivo suprido com um batch inicial de xilose com concentração de 15g.L⁻¹ e alimentação contínua de xilose (0,37g.L⁻¹.h⁻¹) e ácido hexanóico (0,06 g.L⁻¹) durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (X_r), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH₄⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

Ao longo do cultivo, a vazão de alimentação foi ajustada em certos períodos, para que se pudesse manter o menor acúmulo de resíduo de xilose, com o menor impacto no andamento do ensaio (Figura 13).

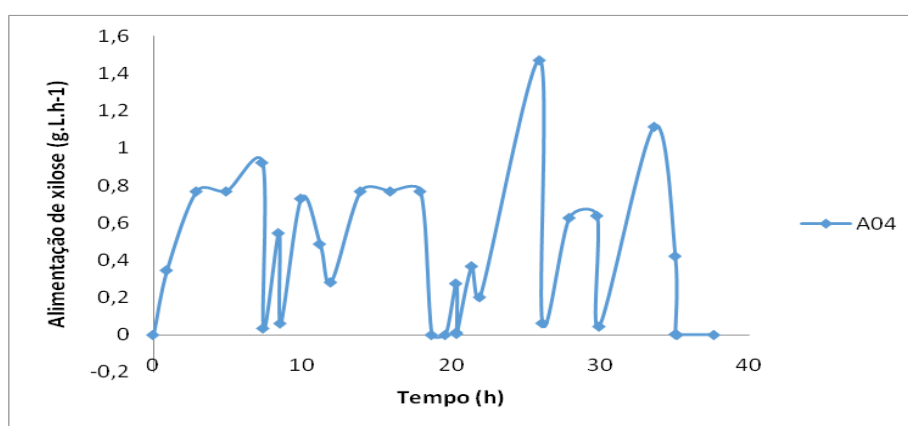


Figura 13: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A04.

O valor de μ_{maxX} obtido foi igual a 0,19 h⁻¹. A fase de crescimento durou cerca de 24h. É possível observar que houve uma quantidade residual de xilose no início da fase de alimentação (24h). Em decorrência desse fato, o μ_{xil} obtido na fase estacionária desse experimento se aproximou mais do μ_{xil} obtido no ensaio conduzido através de batelada alimentada por pulso do que os μ_{xil} obtidos nos experimentos

alimentados por vazão contínua, como será discutido posteriormente. O valor de μ_{xil} obtido neste ensaio foi de $0,18h^{-1}$, no ensaio por alimentação através de pulsos foi de $0,24h^{-1}$ e nos demais ensaios, onde não houve xilose residual no início da fase de acúmulo, o valor médio de μ_{xil} foi em torno de $0,10h^{-1}$ para o período compreendido como fase 1.

Os dados obtidos a partir deste ensaio estão apresentados na tabela 11. Os gráficos utilizados para se determinar os parâmetros experimentais apresentados estão no apêndice B (Figuras A.17- A.24).

Tabela 11: Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (A04) para biossíntese de 3HB-co3HHx a partir de Xilose e ácido hexanóico.

Tempo (h)	A04									PHA (mol %)	
	Xilcons g.L ⁻¹	Áhex cons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	PHA g.L ⁻¹	HB g.L ⁻¹	HHx g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00	0.00	0.50	0.04	0.03	0.01	0.01	0.00	34	100	0
2	0.37	0.00	0.37	0.06	0.05	0.01	0.01	0.00	25	100	0
4	0.65	0.00	0.45	0.20	0.15	0.05	0.05	0.00	23	100	0
6	0.86	0.00	0.36	0.28	0.23	0.05	0.05	0.00	17	100	0
8	0.42	0.00	0.29	0.38	0.32	0.07	0.07	0.00	18	100	0
10	0.62	0.00	0.32	0.57	0.47	0.10	0.10	0.00	18	100	0
12	1.00	0.00	0.26	0.69	0.58	0.11	0.11	0.00	16	100	0
14	0.95	0.00	0.33	0.95	0.80	0.15	0.15	0.00	15	100	0
16	1.54	0.00	0.20	1.22	1.04	0.18	0.18	0.00	15	100	0
18	3.00	0.00	0.19	1.68	1.46	0.22	0.22	0.00	13	100	0
20	3.91	0.00	0.17	2.19	1.91	0.28	0.28	0.00	13	100	0
22	5.46	0.00	0.16	2.66	2.34	0.32	0.32	0.00	12	100	0
24	7.41	0.00	0.10	3.10	2.79	0.31	0.31	0.00	10	100	0
25	8.47	0.06	0.09	3.74	3.35	0.39	0.38	0.01	10	98	2
28	12.24	0.24	0.00	5.15	4.51	0.64	0.60	0.05	13	93	7
30	14.35	0.36	0.00	5.83	4.82	1.01	0.92	0.08	17	92	8
35	17.39	0.65	0.00	7.31	4.88	2.43	2.16	0.27	33	89	11
39	19.26	0.88	0.00	8.16	5.11	3.05	2.66	0.39	37	87	13
43	20.84	1.11	0.00	8.61	4.83	3.77	3.25	0.52	44	86	14
47	22.36	1.33	0.00	9.53	5.92	3.60	3.10	0.50	38	86	14
53	23.90	1.67	0.00	9.64	5.43	4.20	3.46	0.74	44	82	18
59	25.13	1.99	0.00	9.92	4.72	5.21	4.35	0.86	52	83	17
63	26.73	2.18	0.00	9.93	4.82	5.10	4.26	0.84	51	84	16

Xilcons: Xilose consumida. Áhex cons: ácido hexanóico consumido. NH4: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual. 3HB: 3-hidroxi butirato. 3HHx: 3-Hidroxi hexanoato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. PHA (mol %). Fração molar de 3HB ou 3HHx no polímero. Início da vazão de alimentação no cultivo: 24h após o início do bioprocesso.

O teor de biomassa residual (Xr) obtido foi de 4,8 g.L⁻¹ no instante 63h do cultivo. O valor de acúmulo de PHA foi de 51% ao final do bioprocesso. O teor mol obtido de 3HHx no polímero durante o período de alimentação contínua (24h a 64h) foi de 16%. Os fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) entre os períodos 30h a 43h (Fase 1) foi igual a 0,32 g.g⁻¹ e entre os períodos 57h a 63h (Fase 2) igual a 0, 25g.g⁻¹. Em relação aos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) o valor obtido entre os tempos 24h a 63h (Fase 1 e 2) foi igual a 0, 57 g.g⁻¹. MENDONÇA (2014) ao fornecer 11 g.L⁻¹ de solução de alimentação de

ácido hexanóico obteve um $Y_{3HHx/AHex}$ durante a fase de alimentação contínua igual a $0,49 \text{ g.g}^{-1}$.

5.2.6.2 Ajuste da vazão de alimentação calculada em experimento em biorreator com *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} com limitação em nitrogênio

Como discutido anteriormente, o experimento A04 não atingiu os objetivos esperados, por essa razão o experimento B05 foi realizado (Figura 14). Esse experimento foi conduzido no biorreator da marca *B-Braun Melsugen*. As condições adotadas de temperatura, pH e agitação foram as mesmas das adotadas nos experimentos anteriores realizados no biorreator da marca *Applikon*. No experimento A04 observou-se que todo ácido hexanóico fornecido era consumido e que apenas xilose tornava residual ao longo do cultivo, dessa forma, apenas xilose teve sua quantidade de vazão de alimentação ajustada nesse bloco de experimentos.

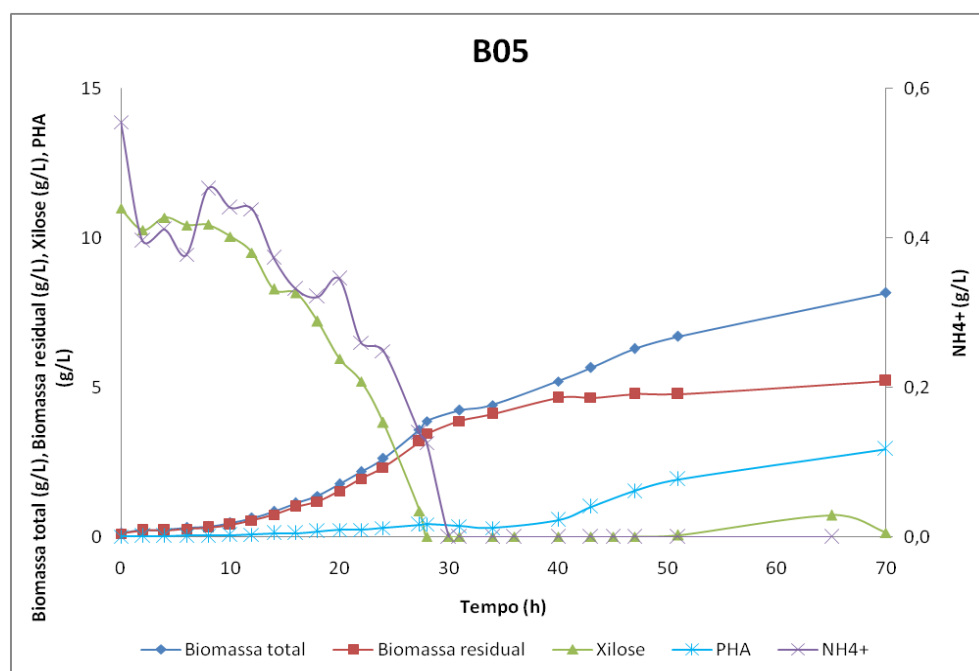


Figura 14: Experimento para a produção de 3HB por *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} para ajuste de alimentação contínua (Ensaio B05). Cultivo suprido com adição inicial de xilose para uma concentração de 10 g.L^{-1} e fornecimento contínuo de xilose ao longo do cultivo conforme as necessidades do bioprocessamento. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH_4^+) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

A partir de uma vazão calculada de alimentação, dessa vez sem a presença de excesso de xilose no início da fase de acúmulo, realizou-se um ensaio em biorreator, em que houve uma batelada inicial com xilose (10 g.L^{-1}) para a fase de crescimento e a fase de acúmulo alimentada com uma solução de xilose (100 g.L^{-1}). Nessas

condições, foram fornecidos ao ensaio xilose a uma vazão de $3,4 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ uma quantidade de $0,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ de xilose ($0,006 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

Ao longo do cultivo, a vazão de alimentação foi ajustada em três momentos do ensaio. Ao iniciar a fase de alimentação uma quantidade de $0,35 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,006 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) foi fornecida por cerca de 20h, posteriormente essa vazão foi alterada para $0,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,004 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) por um período de pouco menos de 20h e sendo novamente alterada para uma vazão de $0,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,003 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) (Figura 15).

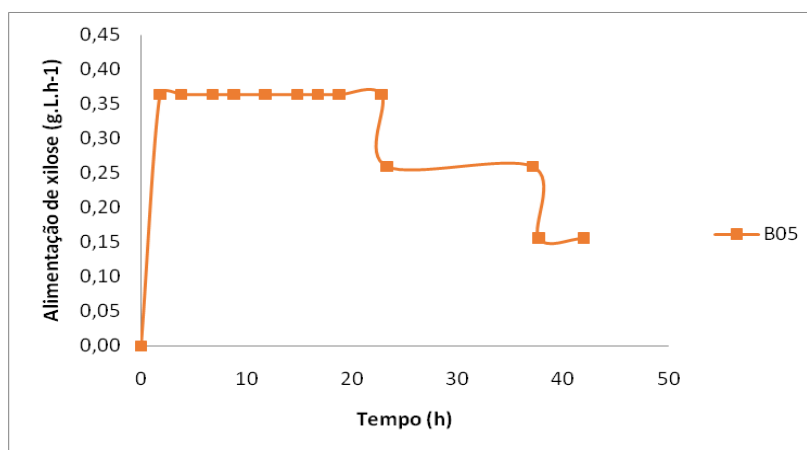


Figura 15: Vazão de alimentação ao longo do cultivo B05

A fase de crescimento durou cerca de 28h. Os dados obtidos a partir deste ensaio estão apresentados na tabela 12. Os gráficos utilizados para se determinar os parâmetros experimentais apresentados estão no apêndice B (Figuras A.25- A.28).

Tabela 12: Cultivo de *B. sacchari* FM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (B05) para para ajuste da vazão de alimentação de xilose.

B05						
Tempo (h)	Xilcons g.L ⁻¹	NH ₄ g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)
0	0.00	0.6	0.12	0.11	0.01	7
2	0.00	0.4	0.23	0.21	0.02	8
4	0.00	0.4	0.24	0.21	0.02	11
6	0.00	0.4	0.31	0.26	0.04	14
8	0.00	0.5	0.34	0.30	0.04	11
10	1.52	0.4	0.46	0.40	0.06	12
12	2.19	0.4	0.62	0.54	0.08	13
14	3.55	0.4	0.85	0.73	0.12	14
16	3.81	0.3	1.13	1.00	0.12	11
18	4.94	0.3	1.37	1.18	0.19	14
20	6.34	0.3	1.77	1.53	0.24	13
22	7.20	0.3	2.18	1.95	0.23	11
24	8.73	0.2	2.62	2.32	0.30	11
27	11.83	0.1	3.59	3.19	0.40	11
28	12.82	0.1	3.87	3.45	0.42	11
30	13.81	0.0	ND	ND	ND	ND
31	14.22	0.0	4.24	3.88	0.36	9
34	15.53	0.0	4.41	4.11	0.30	7
36	16.37	0.0	ND	ND	ND	ND
40	17.99	0.0	5.21	4.65	0.56	11
43	19.20	0.0	5.66	4.65	1.01	18
45	20.03	0.0	ND	ND	ND	ND
47	20.73	0.0	6.30	4.78	1.52	24
51	22.31	0.0	6.70	4.78	1.92	29
65	27.32	0.0	ND	ND	ND	ND
70	27.89	0.0	8.16	5.22	2.94	36

Xilcons: Xilose consumida. NH₄: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual; 3HB: 3-hidroxibutirato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. Início da vazão de alimentação no cultivo: 28h após o início do bioprocesso. ND: Não determinado.

O valor de μ_{maxX} foi igual a 0,15 h⁻¹. O teor de biomassa residual (Xr) obtido foi de 5,2 g.L⁻¹ ao final do cultivo. O maior valor de acúmulo de PHA foi de 36% ao final do experimento, um valor muito abaixo do já observado nos ensaios anteriores.

Por essa razão, um novo ensaio em biorreator foi realizado com o objetivo de se melhorar o valor acumulado de PHA. Nesse experimento não houve xilose residual, entretanto, devido à vazão de alimentação adotada, o acúmulo de biopolímero foi abaixo dos 50%, valor esse que já é sabido ser possível acumular por essa linhagem. Para o experimento seguinte, a vazão de alimentação adotada levou em consideração

as primeiras 10h da fase de acúmulo. Nessa fase a bactéria está consumindo xilose e produzindo PHA a altas velocidades, dessa forma, ao ser fornecido uma alta quantidade de xilose nessas primeiras dez horas, era esperado observar uma maior produção de PHA sem a presença de resíduo. Posteriormente, a vazão de alimentação inicialmente fornecida seria diminuída ao longo do cultivo conforme a velocidade de produção de PHA foi declinando. Para o experimento seguinte também foi proposto aumentar o período de tempo do cultivo, para se verificar por quanto tempo além do conhecido *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* seria capaz de acumular PHA.

O valor de μ_{xil} obtido neste ensaio foi de $0,09h^{-1}$ entre o intervalo de 30h a 47h (Fase 1) e de $0,08h^{-1}$ entre os tempos 51h a 70h (Fase 2). Em relação aos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) entre os períodos 40h a 65h (Fase 1) o valor obtido foi igual a $0,31 g \cdot g^{-1}$ e entre os períodos 65h a 70h (Fase 2) o valor conquistado foi igual a $0,17g \cdot g^{-1}$.

5.2.6.3 Ajuste da vazão de alimentação para se obter maiores quantidades de PHA em relação à biomassa total a partir de experimento em biorreator com *B. sacchari* *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*

Preliminarmente, havia sido proposto apenas o ensaio A06, entretanto, por questões estruturais, o ensaio não pode ser conduzido até o final. Os resultados coletados até as 40h de cultivo desse experimento serão aqui expostos para fim de comparação com seu ensaio subsequente, o ensaio A06 REP (Figura 16). No ensaio A06REP adotaram-se as mesmas estratégias de alimentação do ensaio A06.

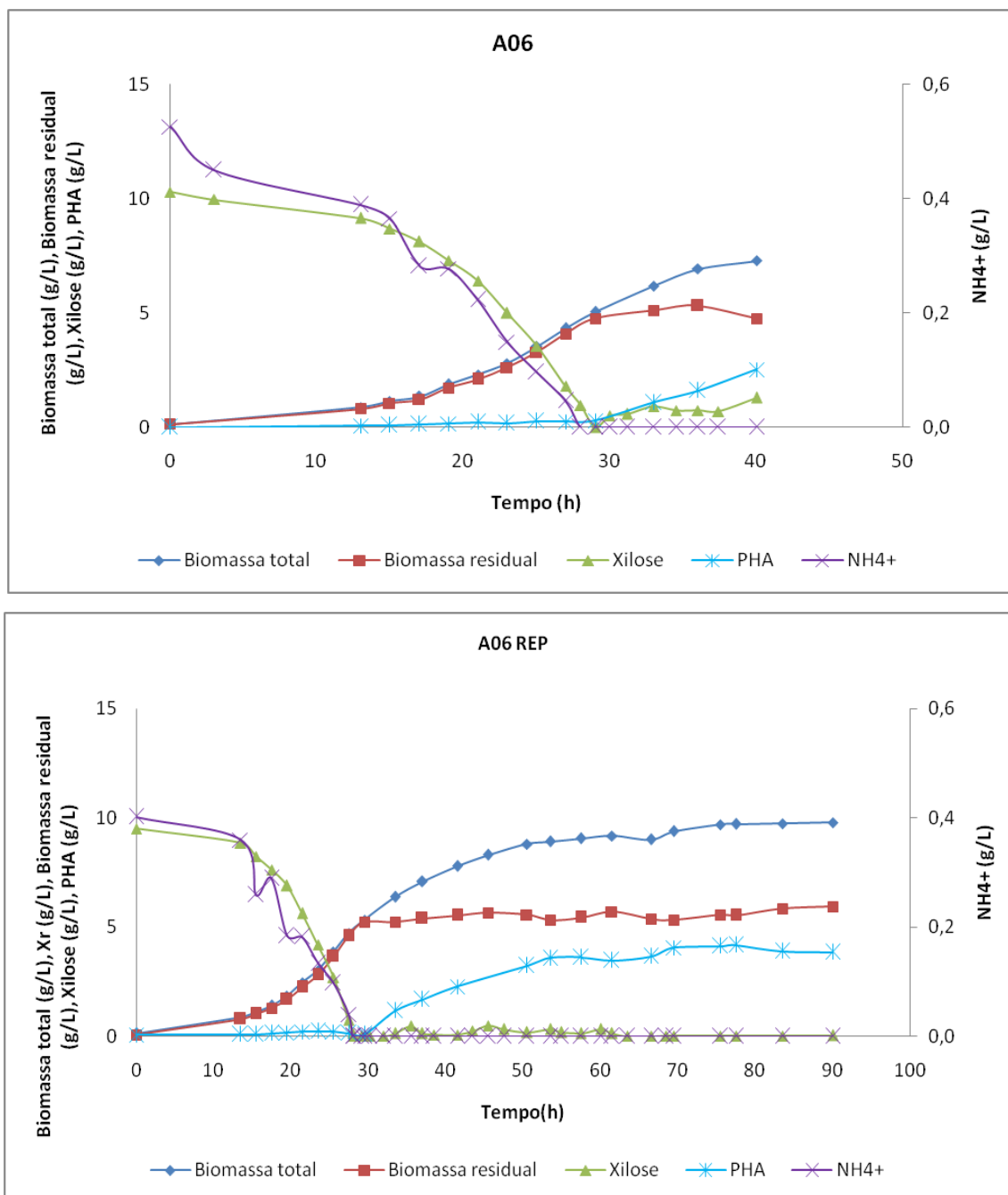


Figura 16: Experimento de produção de 3HB por *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* (Ensaio A06 e A06REP). Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose para uma concentração de 10 g.L⁻¹ e fornecimento contínuo de xilose ao longo do cultivo conforme as necessidades do bioprocessamento. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH₄⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

A partir de uma vazão calculada de alimentação, realizou-se um ensaio em biorreator, em que houve uma batelada inicial com xilose (10 g.L⁻¹) para a fase de crescimento e a fase de acúmulo alimentada com uma solução xilose (100 g.L⁻¹). Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose a uma vazão de 4,8 mL.L⁻¹.h⁻¹ ou 0,48 g.L⁻¹.h⁻¹ (0,008 g.L⁻¹.min⁻¹). Ao longo do cultivo, a vazão de alimentação foi ajustada para uma quantidade inicial maior do que a calculada, esse aumento na

vazão foi até as dez primeiras horas de ensaio. Como discutido anteriormente, nesse período do início da fase de acúmulo até as dez horas seguintes é onde ocorre a maior taxa de consumo de xilose e de produção de PHA. Nesse período não foi observado xilose residual. Após essas primeiras dez horas a vazão de alimentação foi ajustada para a metade do valor anteriormente adotado e esse valor seguiu caindo até se estabilizar em uma faixa em torno de $0,12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ($0,002 \text{ g.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$) sendo essa vazão mantida durante as vinte últimas horas do experimento (Figura 17).

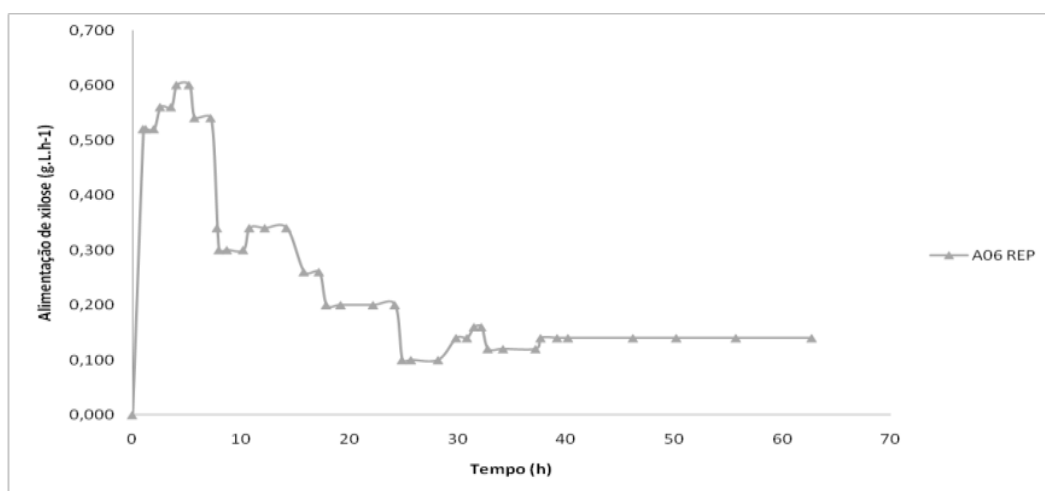


Figura 17: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A06REP

Os dados obtidos a partir deste ensaio estão apresentados na tabela 13. Os gráficos utilizados para se determinar os parâmetros experimentais apresentados estão no apêndice B (Figuras A.29- A.31).

Tabela 13: Cultivo de *B. sacchari* FM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (A06 e A06REP) para ajuste da vazão de alimentação de xilose.

A06						
Tempo (h)	Xilcons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)
0	0.00	0.5	0.14	0.13	0.00	0
3	0.32	0.5	ND	ND	ND	ND
13	1.14	0.4	0.86	0.81	0.05	6
15	1.60	0.4	1.13	1.05	0.08	7
17	2.17	0.3	1.33	1.21	0.12	9
19	2.99	0.3	1.87	1.72	0.15	8
21	3.88	0.2	2.29	2.08	0.21	9
23	5.29	0.1	2.80	2.61	0.18	6
25	6.74	0.1	3.53	3.27	0.26	7
27	8.49	0.0	4.33	4.08	0.25	6
28	9.33	0.0	ND	ND	ND	ND
29	10.28	0.0	5.04	4.75	0.29	6
30	10.64	0.0	ND	ND	ND	ND
31.17	10.91	0.0	ND	ND	ND	ND
33	11.38	0.0	6.18	5.10	1.08	17
34.5	11.90	0.0	ND	ND	ND	ND
36	12.54	0.0	6.93	5.31	1.61	23
37.4	13.10	0.0	ND	ND	ND	ND
40	14.29	0.0	7.28	4.76	2.52	35

A06 REP						
Tempo (h)	Xilcons g.L⁻¹	NH4 g.L⁻¹	MSC g.L⁻¹	Xr g.L⁻¹	3HB g.L⁻¹	PHA (%MSC)
0	0.00	0.4	0.12	0.06	0.06	47
14	0.75	0.4	0.87	0.78	0.09	10
16	1.44	0.3	1.09	1.02	0.07	7
18	2.14	0.3	1.40	1.28	0.13	9
20	2.93	0.2	1.85	1.68	0.16	9
22	4.29	0.2	2.45	2.23	0.21	9
24	5.81	0.1	3.03	2.81	0.22	7
26	7.41	0.1	3.86	3.64	0.21	5
28	9.48	0.0	4.72	4.58	0.13	3
28	10.17	0.0	ND	ND	ND	ND
28	10.33	0.0	ND	ND	ND	ND
29	10.66	0.0	ND	ND	ND	ND
30	10.73	0.0	5.31	5.22	0.09	2
30	11.05	0.0	ND	ND	ND	ND
32	11.61	0.0	ND	ND	ND	ND
34	11.98	0.0	6.38	5.22	1.16	18
36	12.46	0.0	ND	ND	ND	ND
37	12.81	0.0	7.07	5.39	1.68	24
39	13.30	0.0	ND	ND	ND	ND
42	14.17	0.0	7.79	5.53	2.26	29
44	14.72	0.0	ND	ND	ND	ND
46	15.07	0.0	8.31	5.66	ND	32
48	15.64	0.0	ND	ND	ND	ND
51	16.40	0.0	8.80	5.56	3.24	37
54	17.20	0.0	8.90	5.33	3.57	40
55	17.59	0.0	ND	ND	ND	ND
58	18.24	0.0	9.04	5.43	3.60	40
60	18.95	0.0	ND	ND	ND	ND
62	19.23	0.0	9.16	5.70	3.45	38
64	19.95	0.0	ND	ND	ND	ND
67	20.74	0.0	9.00	5.36	3.64	40
69	21.39	0.0	ND	ND	ND	ND
70	21.55	0.0	9.38	5.33	4.04	43
76	23.51	0.0	9.68	5.55	4.13	43
78	23.90	0.0	9.71	5.53	4.17	43
84	25.73	0.0	9.74	5.84	3.89	40
90	27.41	0.0	9.79	5.94	3.85	39

Xilcons: Xilose consumida. NH4: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual; 3HB: 3-hidroxibutirato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. Início da vazão de alimentação no cultivo: 28h após o início do bioprocesso. ND: Não determinado.

A fase de crescimento durou cerca de 28h para ambos os experimentos. O teor de biomassa residual (X_r) obtido foi de $5,1 \text{ g.L}^{-1}$ para o cultivo A06 e $5,4 \text{ g.L}^{-1}$ para o cultivo A06REP. O valor de acúmulo de PHA obtido para o experimento A06 foi de 35% (cerca de 12h de acúmulo) e para o experimento A06REP o maior valor de PHA acumulado foi igual a 43% às 70h do experimento. Após as 70h do ensaio A06REP observa-se uma queda acentuada na quantidade porcentual de PHA. Na figura 18 é possível observar uma mesma tendência de conversão de xilose em 3HB ($Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$) para ambos os experimentos.

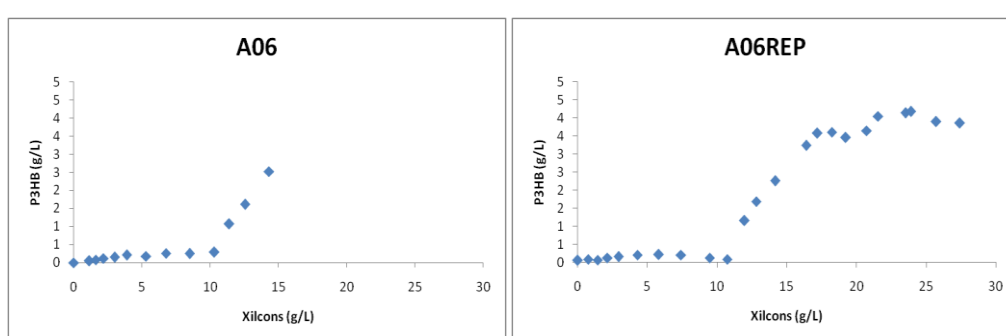


Figura 18: Comparação dos fatores de conversão obtidos ao longo dos cultivos A06 e A06EP.

Além da mesma tendência no $Y_{3\text{HB}/\text{xil}}$ observada nos dois experimentos, a taxa de consumo de xilose por litro de reator (g.L^{-1}) também obteve a mesma tendência (Figura 19).

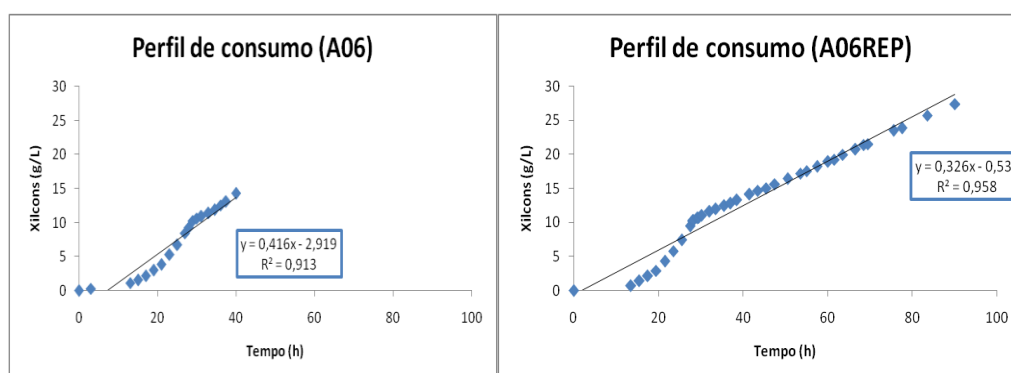


Figura 19: Comparação do perfil de consumo de xilose nos ensaios A06 e A06REP.

O valor de μ_{xil} obtido no ensaio A06 não foi determinado. Para o ensaio A06REP μ_{xil} foi igual a $0,05\text{h}^{-1}$ entre o intervalo de 29h a 90h (Fase 1 e 2) de ensaio. Esse valor de consumo de xilose é metade do valor já observado nos ensaios

anteriores e pode ter sido obtido pelo fato da vazão de alimentação ter passado a maior parte do tempo muito abaixo da adotada nos ensaios A04 e B05, o que levou também há um baixo acúmulo de PHA. O PHA acumulado foi um pouco maior que o ensaio anterior (B05), porém, ainda abaixo dos 50% já observados em ensaios preliminares (A02, A03 e A04). Os resultados obtidos demonstram que após as 70h de cultivo não há relevância na quantidade de PHA obtidos e que manter o ensaio por mais tempo não traz nenhum benefício para o bioprocessamento.

No experimento seguinte, optou-se por escolher uma vazão de alimentação um pouco abaixo da adotada neste ensaio durante as primeiras 10h de experimento, mantendo-a até o final do experimento, com isso obteve-se um experimento com pouca xilose residual no meio de cultura (A07) e um acúmulo de PHA acima dos 50%, como será discutido posteriormente.

Em relação aos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$), entre os períodos 32h a 57h (Fase 1), o valor obtido foi de $0,36 \text{ g.g}^{-1}$ e entre os períodos 62h a 78h (Fase 2) o valor obtido foi igual a $0,16 \text{ g.g}^{-1}$.

5.2.6.4 Validação da vazão de alimentação utilizada nos experimentos anteriores a partir de ensaios em biorreator com *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* com limitação em nitrogênio

Para essa última etapa experimental foram realizados ensaios com o fornecimento de xilose e ácido hexanóico (A07). Nessa última etapa do segundo bloco de experimentos, adotou-se uma vazão única de alimentação durante a fase de acúmulo ao longo de todo o ensaio (Figura 21). O objetivo desses dois últimos experimentos era validar a vazão de alimentação obtida a partir dos ensaios preliminares (A04, B05, A06 e A06REP). A partir dos ensaios preliminares foi possível concluir que não havia como manter a xilose em 0 g.L^{-1} sem que o acúmulo de PHA fosse prejudicado. Dessa forma, buscou-se uma vazão de alimentação que fornecesse o máximo possível de xilose com o mínimo de resíduo no meio de cultura. Os objetivos propostos para esses experimentos foram atingidos. O primeiro dos objetivos era o mínimo de resíduo de xilose ao longo do cultivo. Como pode ser observada na figura 20, a xilose começa a acumular no meio de cultura após um período de aproximadamente 12h de alimentação, sendo o valor acumulado de resíduo ao final do experimento inferior a 10 g.L^{-1} . Além de se obter um valor mínimo de resíduo de xilose ao longo do cultivo, também foi possível conquistar valores de

acúmulo de PHA em relação à biomassa total superiores a 50%. Outra observação interessante obtida a partir desses resultados é que após as 50h de cultivo, nessas condições, o acúmulo incremental de PHA é mínimo.

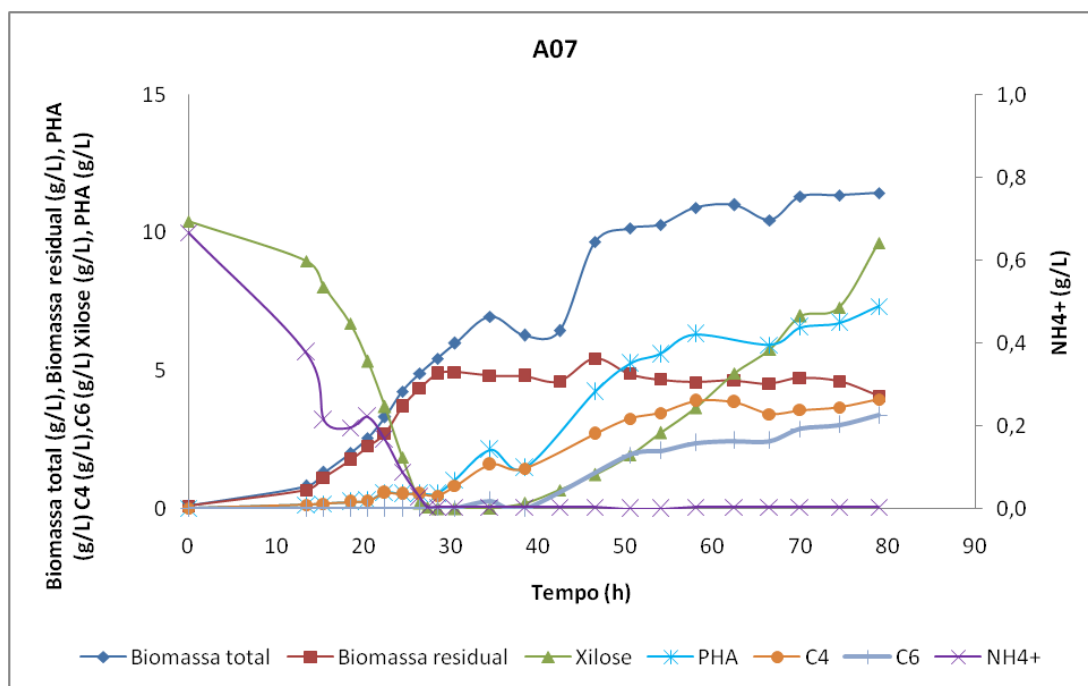


Figura 20: Produção de 3HB-co-3HHx por *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose com concentração de 10g.L⁻¹ e alimentação contínua de xilose (0, 45g.L⁻¹) e Ácido hexanóico (0,07 g.L⁻¹). Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH₄⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

A partir de uma vazão calculada de alimentação, através das observações realizadas à cerca do consumo de xilose e produção de PHA nos experimentos A04, B05, A06 e A06REP, realizou-se um ensaio em biorreator, em que houve uma batelada inicial com xilose (10 g.L⁻¹) para a fase de crescimento e a fase de acúmulo alimentada com uma solução de ácido hexanóico (18,9g. L⁻¹) e xilose (102 g.L⁻¹) com uma vazão igual a 4,4 mL⁻¹. L⁻¹h⁻¹. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose 0,45 g.L⁻¹.h⁻¹ (0,007 g.L⁻¹.min⁻¹) e ácido hexanóico 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹(0,001g.L⁻¹.min⁻¹).

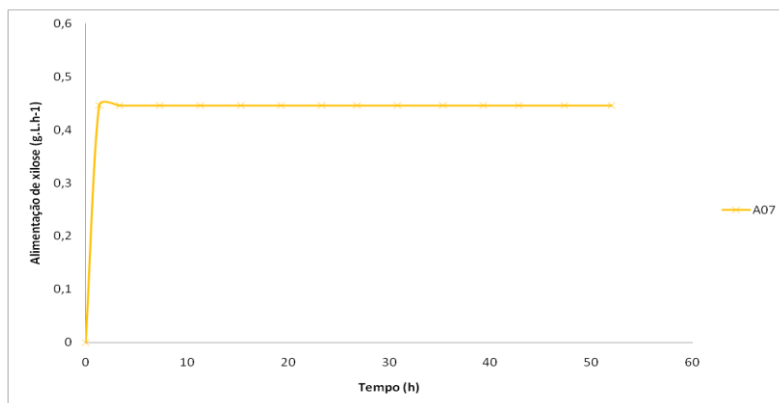


Figura 21: Vazão de alimentação ao longo do cultivo A07

A fase de crescimento durou cerca de 28h. Os dados obtidos a partir deste ensaio estão apresentados na tabela 14. Os gráficos utilizados para se determinar os parâmetros experimentais apresentados estão no apêndice B (Figuras A.32- A. 38).

Tabela 14: Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (A07) para biossíntese de 3HB-co-3HHx a partir de Xilose e ácido hexanóico e validação da vazão de alimentação.

Tempo (h)	A07								PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	Áhex cons g.L ⁻¹	NH ₄ g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	PHA g.L ⁻¹	HB g.L ⁻¹	HHx g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00		0.7	0.13	0.10	0.03	0.03	0.00	22	100	0
13.5	1.53		0.4	0.82	0.68	0.14	0.14	0.00	17	100	0
15.5	2.57		0.2	1.32	1.13	0.18	0.18	0.00	14	99	1
18.5	3.97		0.2	2.02	1.77	0.25	0.25	0.00	12	100	0
20.5	5.45		0.2	2.56	2.27	0.29	0.29	0.00	12	100	0
22.5	7.18		0.2	3.33	2.74	0.59	0.58	0.00	18	98	2
24.5	9.11		0.1	4.24	3.70	0.54	0.54	0.00	13	99	1
26.5	10.86		0.0	4.92	4.37	0.55	0.53	0.01	11	98	2
27.3	11.12	0.00	0.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28.5	11.81	0.12	0.0	5.44	4.89	0.54	0.47	0.04	10	90	10
30.5	12.94	0.33	0.0	5.99	4.95	1.05	0.83	0.02	17	84	16
34.5	15.09	0.74	0.0	6.96	4.82	2.14	1.60	0.28	31	80	20
38.5	16.85	1.13	0.0	6.28	4.80	1.48	1.46	0.00	24	99	1
42.5	18.25	1.51	0.0	6.44	4.62	ND	ND	ND	28	76	24
46.5	19.50	1.88	0.0	9.66	5.43	4.23	2.71	ND	44	71	29
50.5	20.57	2.23	0.0	10.16	4.90	5.26	3.26	1.96	52	69	31
54	21.27	2.54	0.0	10.29	4.69	5.60	3.48	2.10	54	68	32
58	22.14	2.89	0.0	10.90	4.58	6.32	3.91	2.38	58	68	32
62.5	22.85	3.27	0.0	11.00	4.65	ND	3.86	2.46	58	67	33
66.5	23.58	3.58	0.0	10.46	4.53	5.93	3.44	2.46	57	65	35
70	23.60	3.82	0.0	11.31	4.74	6.57	3.58	2.89	58	62	38
74.5	25.17	4.18	0.0	11.35	4.62	6.73	3.67	3.03	59	61	39
79	24.58	4.51	0.0	11.43	4.09	7.34	3.96	3.38	64	61	39

Xilcons: Xilose consumida. Áhex cons: ácido hexanóico consumido. NH₄: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual. 3HB: 3-hidroxibutirato. 3HHx: 3-Hidroxihexanoato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. PHA (mol %). Fração molar de 3HB ou 3HHx no polímero. Início da vazão de alimentação no cultivo: 27h após o início do bioprocessamento. ND: Não determinado.

O teor de biomassa residual (Xr) médio obtido foi de 4,7 g.L⁻¹. O valor de acúmulo de PHA foi 64% ao final do cultivo. O teor mol obtido de 3HHx no polímero durante o período de alimentação contínua (27h a 79h) foi de 39%. Os resultados apontados por Lício et al. (2009), demonstraram que *B. sacchari* selvagem, com o

fornecimento de ácido octanóico, foi capaz de acumular apenas 0,36 mol% de 3HHx. Os valores obtidos nesse bloco de experimentos demonstram o grande potencial de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em produzir copolímeros contendo altas frações de 3HHx. Volova et al. (2014) obteve cerca de 25 mol% de 3HHx em *Cupriavidus eutrophus* B10646 ao fornecer xilose e hexanoato de sódio em ensaios de frascos agitados e biorreator. Os resultados obtidos por Volova et al. (2014) foram um dos mais promissores para a linhagem estudada, tendo sido reportado um acúmulo de cerca de 60 a 75% de polímero em relação à biomassa total. Murugan et al. (2016) ao estudar o recombinante *Cupriavidus necator* Re2058/pCB113 em frascos agitados, com o fornecimento de óleo de palmiste bruto e seiva de tronco de madeira, obteve uma quantidade total de polímero em relação a biomassa total igual a 73% e frações mol% de 3HHx na faixa dos 44%. MENDONÇA (2014) ao fornecer glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono em ensaios em biorreatores, obteve um valor máximo da fração mol% de 3HHx igual a 20% do copolímero total. Dessa maneira, os resultados obtidos neste ensaio demonstram o alto grau de competitividade de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em relação a outras linhagens estudadas e o grande potencial de se utilizar xilose como fonte de carbono primária.

Os fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) entre os períodos 29h a 58h (Fase 1) foi igual a 0,30 g.g⁻¹ e entre os períodos 67h a 75h (Fase 2) o fator de conversão obtido foi igual a 0,13 g.g⁻¹. Em relação aos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) o valor obtido entre os tempos 27h a 79h (Fase 1) foi igual a 0,86 g.g⁻¹. MENDONÇA (2014) ao fornecer 22 g.L⁻¹ de solução de alimentação de ácido hexanóico obteve um $Y_{3HHx/AHex}$ durante a fase de alimentação contínua igual a 0,37 g.g⁻¹.

A partir dos dados obtidos a vazão de alimentação adotada neste ensaio foi validada para os ensaios seguintes por ter proporcionado ao cultivo o mínimo de resíduo de xilose e o máximo acúmulo de PHA. Além disso, os resultados obtidos a partir desse experimento permitiram projetar valores do fornecimento proporcionais de xilose e ácido hexanoico para a etapa de modulação do polímero, onde o objetivo era produzir copolímeros de 3HB-co-3HHx com quantidades mol% de 3HHx iguais a 20%, 10% e 15%.

Esse ensaio concluiu a etapa de validação da vazão de alimentação a ser fornecida para os ensaios envolvendo a modulação do copolímero. Ao longo desse

bloco de experimentos diversas estratégias de alimentação foram adotadas. A figura 22 traz um resumo das estratégias de alimentação adotadas no segundo e terceiro bloco de experimentos.

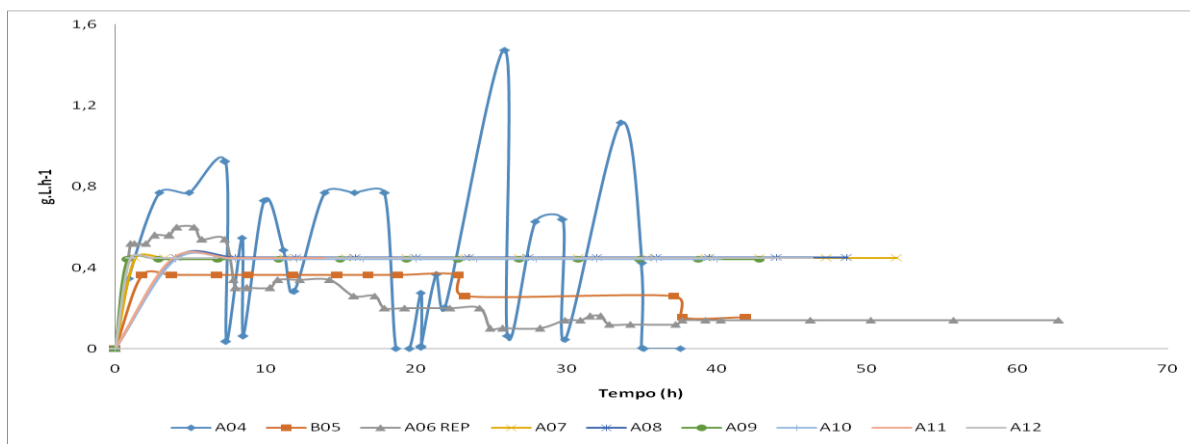


Figura 22: Estratégias de alimentação contínua de xilose ou xilose e ácido hexanóico ao longo do segundo e terceiro bloco de experimentos.

5.2.7 Terceiro bloco de experimentos

Esse bloco de experimentos corresponde aos ensaios A09, A10, A11 e A12 apresentados na figura 23. Os ensaios serão discutidos de maneira comparativa no item 5.2.7.1

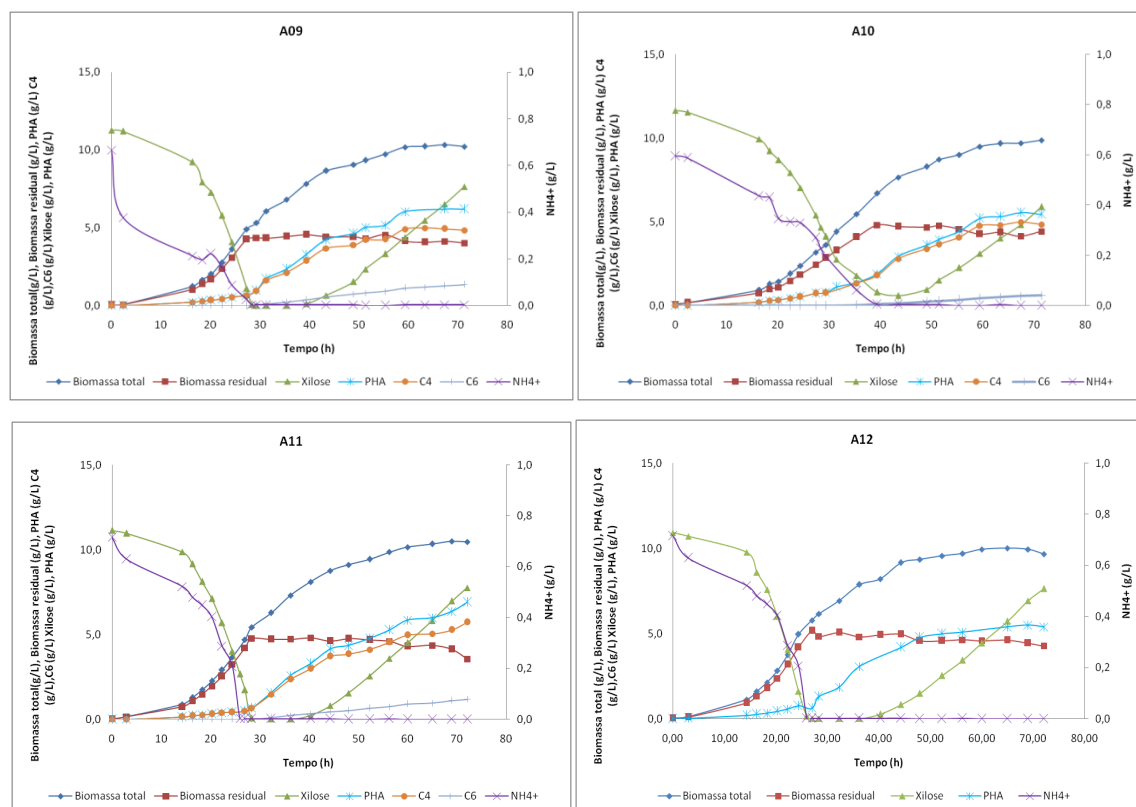


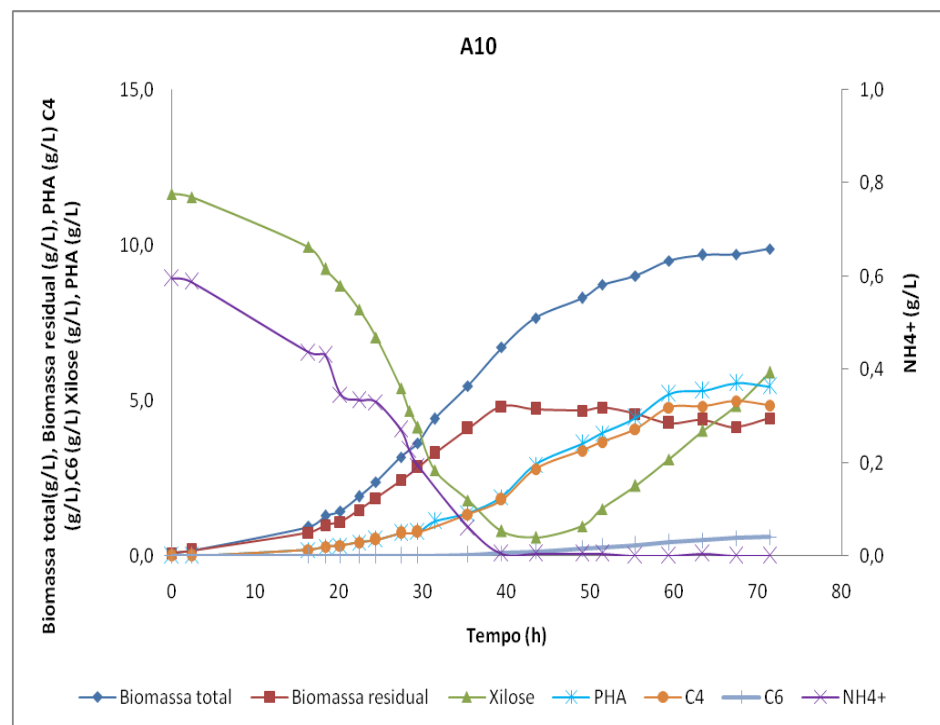
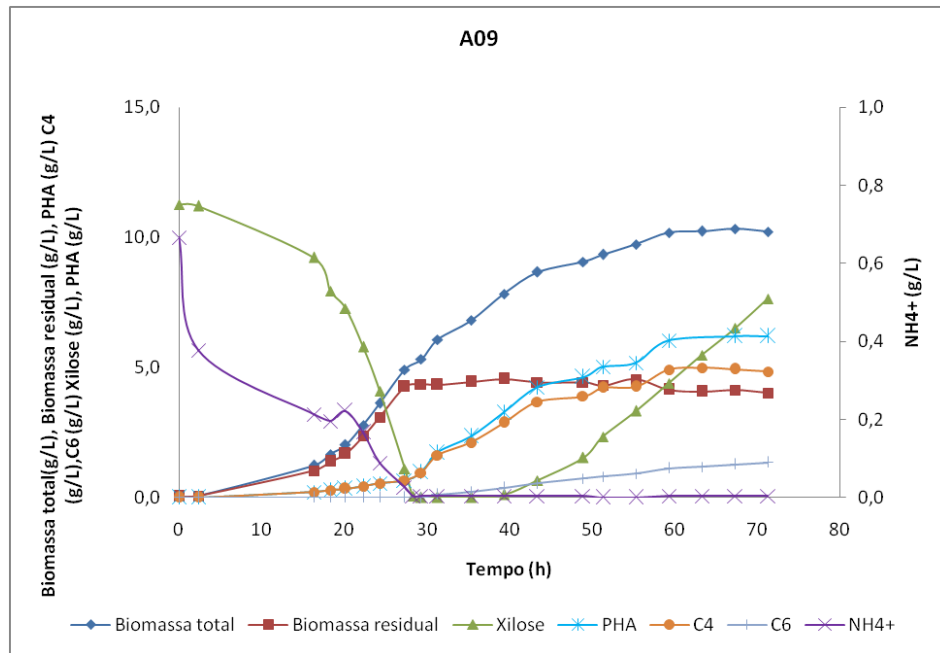
Figura 23: Terceiro bloco de experimentos. Linhagem avaliada: *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. Limitação em Nitrogênio. Experimento A09 a A11: Fornecimento de xilose e Ácido Hexanóico durante a fase estacionária. Experimento A12: Fornecimento de xilose durante a fase estacionária.

5.2.7.1 Modulação de copolímero 3HB-co-3HHx e produção de 3HB a partir de uma vazão única e contínua de alimentação em experimentos em biorreator com *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}

O objetivo do terceiro bloco de experimentos era modular a composição monomérica de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx. Nesse bloco experimental foram supridos como fonte de carbono xilose e ácido hexanóico. Em ensaios anteriores, observou-se que, em um determinado período de tempo após o início da fase acúmulo, xilose começava a acumular no meio de cultura. Vários ajustes experimentais foram realizados ao longo do segundo bloco de experimentos, como discutido anteriormente, entretanto, não foi possível atingir ensaios com grandes quantidades percentuais de PHA acumulado sem a presença de resíduo de xilose. O

experimento B05 e A06REP, foram os únicos a obter uma quantidade residual de xilose próxima de zero ao final do ensaio, porém, a quantidade polimérica em relação à biomassa total foi muito baixa (menos de 50%). Dessa forma, a vazão adotada neste bloco experimental, a mesma adotada no ensaio A07, proporcionou um acúmulo mínimo de resíduo de xilose no biorreator e um alto acúmulo de PHA. Dessa maneira, o termo mais adequado para a modulação realizada nesse bloco de experimentos é a “modulação parcial do polímero” já que xilose se acumulou ao longo do processo e o ácido hexanóico foi totalmente metabolizado. Para os ensaios de modulação parcial, foi realizado primeiramente um ensaio base (A07) para se verificar as quantidades necessárias a serem supridas de ácido hexanoico para se obter copolímeros com composições de 3HHx iguais a 20%,15% e 10% em relação ao polímero total.

A partir de uma vazão calculada de alimentação, realizou-se um conjunto de ensaios em biorreator, em que houve uma batelada inicial de xilose (10 g.L^{-1}) para a fase de crescimento. Para o experimento A09 (Figura 24) a fase de acúmulo foi alimentada continuamente com uma solução de ácido hexanóico ($9,4 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose ($96,3 \text{ g.L}^{-1}$) a uma vazão de $4,7 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose e ácido hexanóico, $0,45 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,008 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e $0,04 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,0007 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), respectivamente. Para o experimento A10 (Figura 24) foram fornecidos ácido hexanóico ($4,2 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose ($96,2 \text{ g.L}^{-1}$) a uma vazão de $4,7 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose e ácido hexanóico, $0,45 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,008 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), e $0,02 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,0003 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), respectivamente. O ensaio A11 (Figura 24) foi suprido com solução de ácido hexanóico ($6,8 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose (97 g.L^{-1}) a uma vazão de $4,6 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose e ácido hexanóico, $0,45 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,008 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), e $0,03 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,0005 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), respectivamente. Para o experimento A12 (Figura 24) adotou-se apenas o fornecimento de xilose como fonte de carbono. A fase de acúmulo desse experimento foi alimentada continuamente com uma solução de xilose (98 g.L^{-1}) a uma vazão de $4,6 \text{ ml.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Nessas condições, foram fornecidos ao ensaio xilose $0,45 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ($0,008 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).



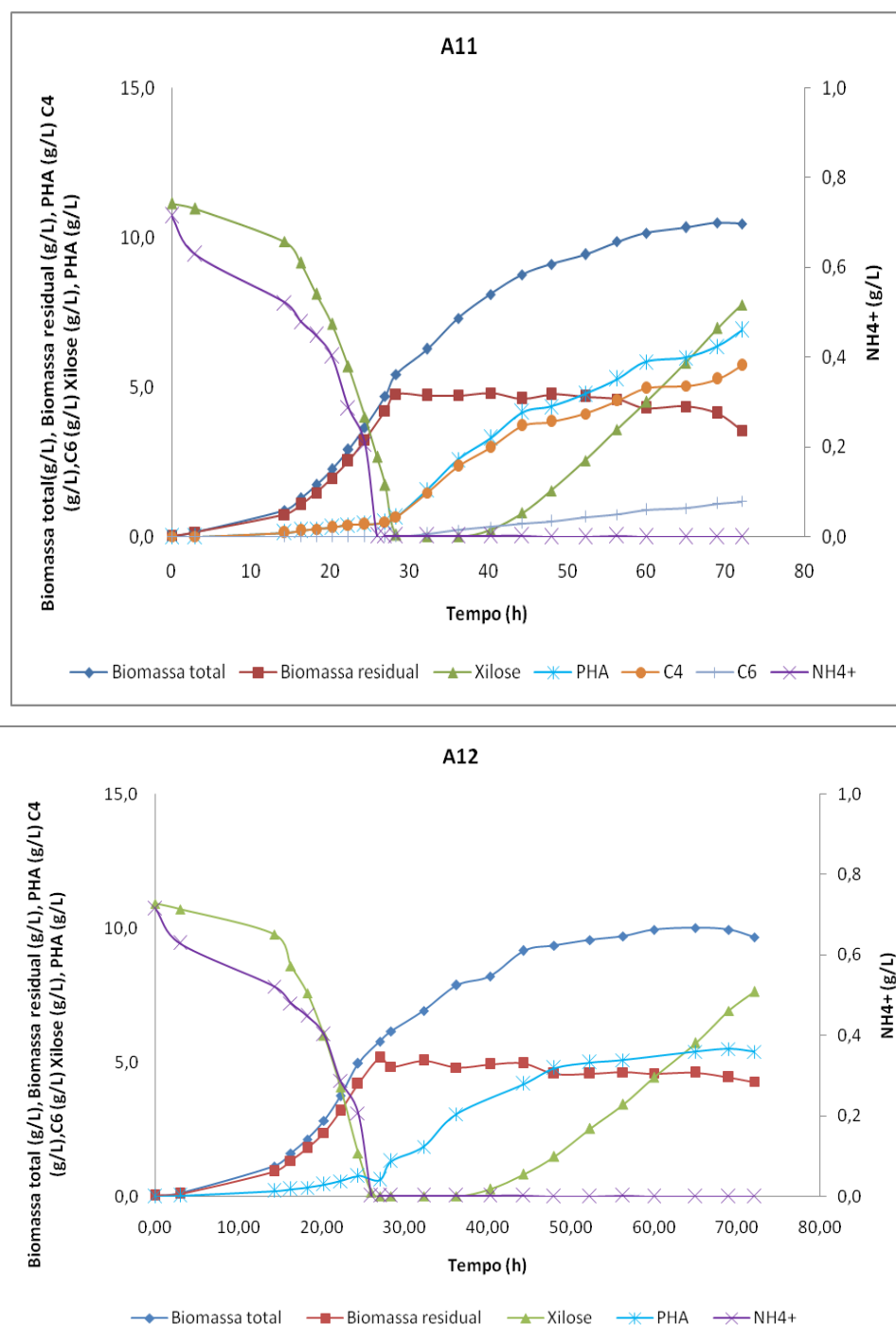


Figura 24: Produção de 3HB-co-3HHx por *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (A09 a A11) e 3HB(A12). Cultivo suprido com uma adição inicial de xilose com concentração de 10 g.L⁻¹ e alimentação contínua de xilose para os cultivos A09 a A12 (0,45 g.L⁻¹) e ácido hexanóico para os cultivos A09 a A11 (0,04 g.L⁻¹, 0,02 g.L⁻¹ e 0,03 g.L⁻¹) durante a fase de acúmulo. Biomassa total (X), biomassa residual (biomassa sem polímero) (Xr), produção de polímero (PHA), consumo de amônia (NH₄⁺) e concentração de xilose (xilose) ao longo do tempo.

Os dados obtidos a partir deste ensaio estão apresentados na tabela 15. Os gráficos utilizados para se determinar os parâmetros experimentais apresentados estão no apêndice B (Figuras A.39- A.62).

Tabela 15: Cultivo de *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em biorreator (A09 a A12) para biossíntese de 3HB-co-3HHx e 3HB a partir de Xilose (A09 a A12) e ácido hexanóico (A09 a A11) para modulação da composição da quantidade molar de 3HHx.

Tempo (h)	A09								PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	Áhex cons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	PHA g.L ⁻¹	HB g.L ⁻¹	HHx g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00		0.7	0.05	0.05	0.00	0.00	0.00	0	0	0
2	0.18		0.4	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0	0	0
16	2.26		0.2	1.24	1.03	0.21	0.21	0.00	17	100	0
18	3.62		0.2	1.66	1.39	0.28	0.28	0.00	17	100	0
20	4.41		0.2	2.02	1.68	0.34	0.34	0.00	17	100	0
22	5.97		0.2	2.79	2.37	0.43	0.43	0.00	15	100	0
24	7.78		0.1	3.63	3.09	0.54	0.54	0.00	15	100	0
27	10.88		0.0	4.91	4.25	0.66	0.66	0.00	13	100	0
28	12.03	0.00	0.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	12.54	0.05	0.0	5.31	4.35	0.97	0.96	0.01	18	99	1
31	13.60	0.15	0.0	6.08	4.34	1.73	1.62	0.11	29	95	5
35	15.59	0.34	0.0	6.81	4.45	2.36	2.12	0.24	35	92	8
39	17.28	0.53	0.0	7.83	4.57	3.26	2.88	0.38	42	91	9
43	18.49	0.72	0.0	8.67	4.43	4.24	3.68	0.56	49	90	10
49	20.02	0.97	0.0	9.06	4.43	4.63	3.90	0.73	51	88	12
51	19.92	1.06	0.0	9.34	4.31	5.03	4.23	0.81	54	87	13
55	20.74	1.24	0.0	9.73	4.55	5.18	4.27	0.92	53	86	14
59	21.22	1.41	0.0	10.18	4.15	6.03	4.91	1.12	59	85	15
63	21.66	1.56	0.0	10.24	4.07	ND	4.98	1.19	60	85	15
67	22.12	1.72	0.0	10.34	4.13	6.21	4.93	1.28	60	84	16
71	22.53	1.87	0.0	10.22	4.02	6.20	4.84	1.35	61	83	17

Tempo (h)	A10								PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	Áhex cons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	PHA g.L ⁻¹	HB g.L ⁻¹	HHx g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00		0.6	0.10	0.10	0.00	0.00	0.00	0	ND	ND
2	0.21		0.6	0.18	0.18	0.00	0.00	0.00	0	ND	ND
16	1.93		0.4	0.95	0.75	0.20	0.20	0.00	21	100	0
18	2.73		0.4	1.29	0.99	0.30	0.30	0.00	23	100	0
20	3.38		0.3	1.44	1.11	0.33	0.33	0.00	23	100	0
22	4.25		0.3	1.92	1.47	0.44	0.44	0.00	23	100	0
24	5.25		0.3	2.37	1.85	0.52	0.52	0.00	22	100	0
27	7.01		0.3	3.18	2.44	0.73	0.73	0.00	23	100	0
28	7.86		0.2	ND	ND	ND	ND	ND	24	100	0
29	8.43		0.2	3.63	2.86	0.77	0.77	0.00	21	100	0
31	9.92	0.00	ND	4.41	3.30	1.11	ND	ND	25	ND	ND
35	12.92	0.08	0.1	5.48	4.10	1.38	1.35	0.03	25	98	2
39	15.82	0.17	0.0	6.71	4.81	1.90	1.81	0.09	28	96	4
43	18.87	0.25	0.0	7.66	4.72	2.94	2.79	0.14	38	96	4
49	20.88	0.36	0.0	8.30	4.68	3.62	3.40	0.22	44	95	5
51	21.01	0.40	0.0	8.73	4.78	3.95	3.67	0.28	45	95	5
55	22.05	0.48	0.0	9.02	4.58	4.44	4.09	0.36	49	94	6
59	22.73	0.55	0.0	9.49	4.27	5.22	4.78	0.43	55	94	6
63	23.31	0.62	0.0	9.69	4.37	5.32	4.81	0.51	55	93	7
67	23.98	0.69	0.0	9.71	4.14	5.57	4.99	0.57	57	92	8
71	24.40	0.76	0.0	9.88	4.43	5.45	4.85	0.61	55	91	9

Tempo (h)	A11								PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	Áhex cons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	PHA g.L ⁻¹	HB g.L ⁻¹	HHx g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00		0.7	0.04	0.04	0.00	0.00	0.00	0	0	0
3	0.27		0.6	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0	0	0
14	1.48		0.5	0.88	0.75	0.14	0.14	0.00	16	100	0
16	2.28		0.5	1.27	1.07	0.20	0.20	0.00	16	100	0
18	3.42		0.4	1.74	1.47	0.26	0.26	0.00	15	100	0
20	4.53		0.4	2.26	1.95	0.30	0.30	0.00	13	100	0
22	6.04		0.3	2.92	2.52	0.39	0.39	0.00	13	100	0
24	7.86		0.2	3.66	3.25	0.41	0.41	0.00	11	100	0
26	9.33		0.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	10.29		0.0	4.70	4.21	0.49	0.49	0.00	10	100	0
28	12.01	0.00	0.0	5.42	4.76	0.66	0.66	0.00	12	100	0
32	14.12	0.15	0.0	6.28	4.71	1.57	1.47	0.10	25	95	5
36	16.05	0.29	0.0	7.30	4.72	2.58	2.35	0.22	35	93	7
40	17.75	0.44	0.0	8.11	4.81	3.30	2.98	0.32	41	92	8
44	19.37	0.59	0.0	8.76	4.61	4.15	3.71	0.44	47	92	8
48	20.33	0.71	0.0	9.11	4.75	4.36	3.84	0.52	48	91	9
52	21.28	0.86	0.0	9.44	4.68	4.76	4.11	0.65	50	89	11
56	21.95	0.99	0.0	9.86	4.59	5.27	4.54	0.74	53	89	11
60	22.62	1.11	0.0	10.14	4.30	5.84	4.96	0.89	58	88	12
65	23.53	1.27	0.0	10.34	4.36	5.98	5.03	0.95	58	88	12
69	23.99	1.39	0.0	10.49	4.12	6.37	5.27	1.10	61	86	14
72	24.42	1.48	0.0	10.46	3.55	6.91	5.72	1.18	66	87	13

Tempo (h)	A12					PHA (mol %)		
	Xilcons g.L ⁻¹	NH4 g.L ⁻¹	MSC g.L ⁻¹	Xr g.L ⁻¹	3HB g.L ⁻¹	PHA (%MSC)	3HB	3HHx
0	0.00	0.71	0.03	0.03	0.00	0	0	0
3	11.01	0.63	0.14	0.10	0.04	27	100	0
14	1.36	0.52	1.13	0.93	0.20	17	100	0
16	2.63	0.48	1.61	1.33	0.27	17	100	0
18	3.75	0.45	2.12	1.80	0.32	15	100	0
20	5.47	0.40	2.82	2.38	0.44	16	100	0
22	7.45	0.29	3.74	3.18	0.56	15	100	0
24	10.02	0.21	4.96	4.19	0.76	15	100	0
26	11.65	0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	12.19	0.00	5.77	5.16	0.61	11	100	0
28	13.04	0.00	6.15	4.83	1.32	21	100	0
32	15.27	0.00	6.92	5.06	1.86	27	100	0
36	17.27	0.00	7.87	4.80	3.07	39	100	0
40	18.99	0.00	8.21	4.93	ND	40	100	0
44	20.36	0.00	9.16	4.96	4.20	46	100	0
48	21.40	0.00	9.35	4.57	4.78	51	100	0
52	22.37	0.00	9.56	4.57	4.99	52	100	0
56	23.22	0.00	9.70	4.62	5.08	52	100	0
60	23.90	0.00	9.94	4.58	5.36	54	100	0
65	24.88	0.00	10.01	4.61	5.40	54	100	0
69	25.31	0.00	9.94	4.44	5.50	55	100	0
72	25.79	0.00	9.66	4.27	5.39	56	100	0

Xilcons: Xilose consumida. Áhex cons: ácido hexanóico consumido. NH4: Concentração de Sulfato de Amônia. MSC: Massa Seca Celular. Xr: Biomassa residual. 3HB: 3-hidroxi butirato. 3HHx: 3-Hidroxi hexanoato. PHA (MSC%): Porcentagem de PHA em relação à biomassa total. PHA (mol %). Fração molar de 3HB ou 3HHx no polímero. ND: Não determinado. Início da vazão de alimentação no cultivo A09: 28h após o início do bioprocesso. A10: 32h após o início do bioprocesso. A11: 29h após o início do bioprocesso. A12: 26h após o início do bioprocesso.

Os dados obtidos serão discutidos de forma comparativa entre os ensaios que envolveram a modulação do copolímero (A09, A10 e A11). O ensaio A12 é um experimento controle, cujo a única fonte de carbono oferecida foi a xilose.

O valor de biomassa residual médio (Xr) obtido no experimento A09 foi igual a 4,3 g.L⁻¹, no experimento A10 esse valor foi igual a 4,5 g.L⁻¹, no experimento A11 o valor de Xr conquistado foi 4,6 g.L⁻¹ e no experimento A12 equivalente a 4,7g. L⁻¹.

A porcentagem de acúmulo de PHA em relação à biomassa total obtido no experimento A09 foi igual a 61%, no ensaio A10 igual a 57% e no ensaio A11 o valor acumulado foi de 61%. O PHA acumulado ao final do experimento A12 foi igual a 56% em relação a biomssa total. Zhang et al. (2019) ao avaliar recombinantes de *Ralstonia*

eutropha capazes de sintetizar copolímeros de 3HB-co-3HHx a partir de cultivos alimentados com glicose, frutose e glicerol, obtiveram uma quantidade de PHA em relação a biomassa total próximo a 75%. Os valores obtidos por Zhang et al. (2019) são equivalentes aos valores reportados por Mendonça (2014) para a produção do mesmo produto, entretanto, Mendonça (2014) forneceu em seus cultivos glicose e ácido hexanóico como fontes de carbono. Bhatia et al. (2019) avaliou a produção de copolímero 3HB-co-3HHx em *Ralstonia eutropha* Re2133/pCB81 utilizando como estratégia de alimentação o fornecimento de diversos tipos de ácidos graxos voláteis (acetato, butirato, lactato e propionato). O valor de PHA acumulado em relação à biomassa total obtido por Bhatia et al. (2019) foi entre 52-56%. Zhang et al. (2019) obteve valores significativos em relação a quantidade total de PHA acumulado, entretanto, glicose, frutose e glicerol são fontes de carbono de alto valor econômico, o que encarece o bioprocesso. Bhatia et al. (2019) obteve valores interessantes de acúmulo total de PHA a partir de fontes de baixo custo, porém, menores do que os conquistados neste trabalho. Dessa maneira, o suprimento de xilose, uma fonte de carbono de baixo custo e a aplicação do recombinante *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em bioprocessos se demonstram economicamente interessantes.

A figura 25 apresenta as quantidades de PHA total em porcentagem acumulado ao longo dos experimentos supridos com xilose e ácido hexanóico (A09, A10 e A11).

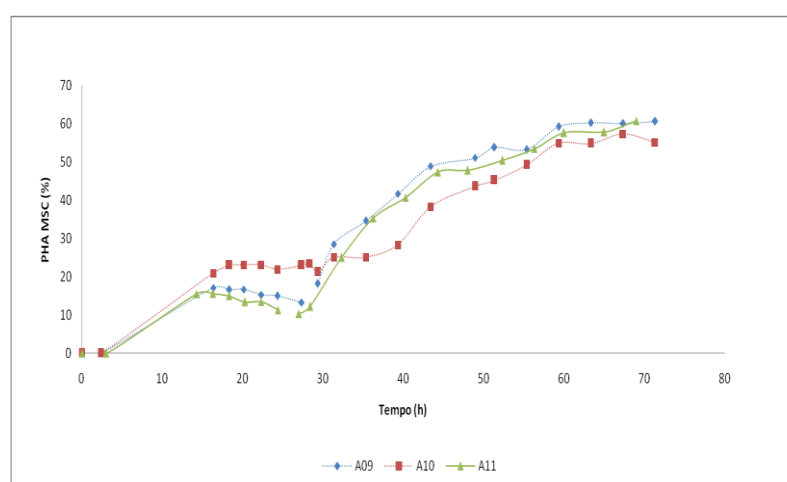


Figura 25: Comparação do acúmulo médio de PHA porcentual ao longo dos ensaios (A09, A10 e A11) envolvendo modulação da composição de 3HHx no copolímero (3HB-co-3HHx).

Em relação ao μ_{Xil} foi observado para o experimento A09 uma velocidade igual a $0,09\text{ h}^{-1}$, entre o período de 28,5h a 50h (Fase 1) e um μ_{Xil} igual a $0,05\text{ h}^{-1}$ (Fase 2). No cultivo A10 o valor de μ_{Xil} obtido foi igual a $0,11\text{ h}^{-1}$ entre os períodos de 39,5h a 51,5h (Fase 1) e um μ_{Xil} igual a $0,05\text{ h}^{-1}$ entre os tempos 55,5h a 71,5h (Fase 2). No experimento A11 o μ_{Xil} obtido foi igual a $0,09\text{ h}^{-1}$ entre os períodos 32,5h a 48h (Fase 1) e igual a $0,05\text{ h}^{-1}$ entre os períodos 52,5h a 72h (Fase 2). No experimento A12 o μ_{Xil} obtido entre o período de 26h a 48h (Fase 1) foi igual a $0,10\text{ h}^{-1}$ e entre os períodos 52h a 72h (Fase 2) igual a $0,06\text{ h}^{-1}$. A figura 26 apresenta a evolução do consumo de xilose ao longo dos ensaios A09, A10 e A11.

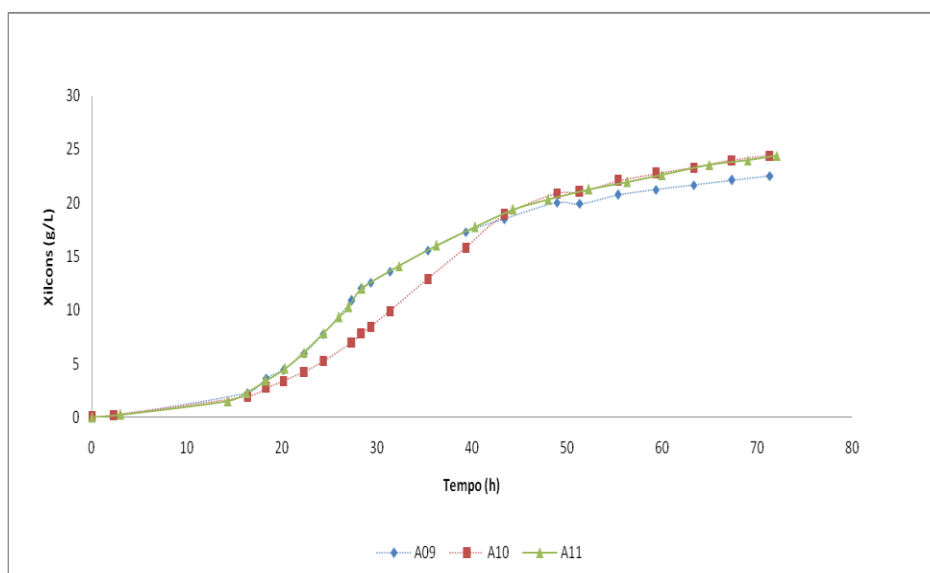


Figura 26: Comparação do consumo de xilose ao longo dos ensaios (A09, A10 e A11) envolvendo modulação da composição de 3HHx no copolímero (3HB-co-3HHx).

Em relação ao teor mol obtido de 3HHx no copolímero durante o período de alimentação contínua, os valores obtidos para os ensaios A09, A10 e A11, respectivamente, foram iguais a 17 mol%, 9 mol% e 14 mol%. Desse modo, o objetivo de se sintetizar copolímeros 3HB-co-3HHx contendo aproximadamente 20 mols%, 10 mols% e 15 mols % foram atingidos. A figura 27 apresenta a evolução ao longo dos cultivos do acúmulo de mols % de 3HHx em relação ao polímero total.

Em frascos agitados, Kichise et al. (1999), ao fornecer ácido octanóico como fonte de carbono, obteve copolímeros com frações molares de 3HHx igual a 26 mol% a partir de *Ralstonia eutropha* contendo genes de *phaPCJ_{Ac}*. KAHAR et al. (2004) ao cultivar *Ralstonia eutropha* H16 PHB-4/Pjrd32D13 em meio contendo óleo de soja como fonte de carbono, obteve copolímeros com apenas 5 mol% de 3HHx. MURUGAN et

al. (2016) obtiveram altas frações molares de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx por linhagem recombinante de *R. eutropha* expressando *phaC* de *Rhodococcus aetherivorans* e *phaJ* de *Pseudomonas aeruginosa* (Re2058/pCB113). Diferentes óleos foram testados como fontes de carbono, sendo reportado uma quantidade de 44 mol% de 3HHx obtidos a partir de ensaios supridos com óleo de palma cru. Os valores obtidos por MURUGAN et al. (2016) são similares aos valores obtidos no ensaio A07 deste trabalho. Os valores conquistados nos ensaios A07, A09, A10 e A11 indicam novamente o alto potencial da linhagem *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} em produzir copolímeros de grande interesse econômico.

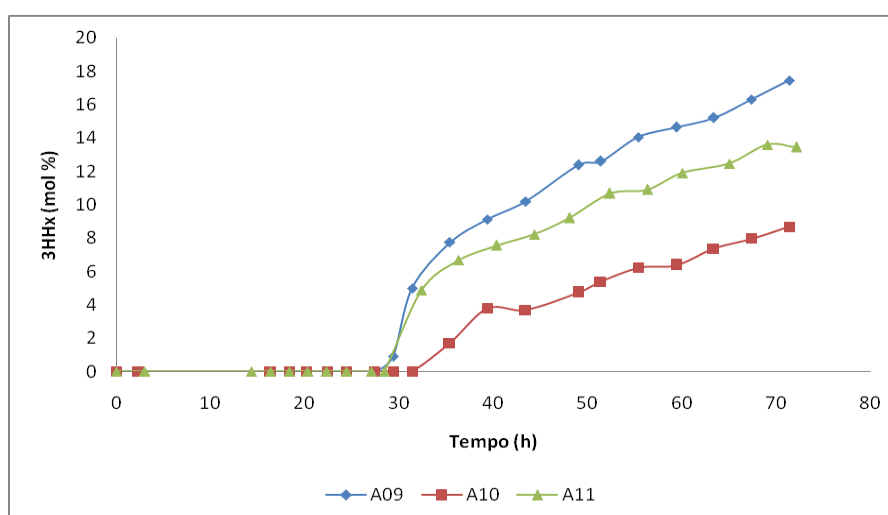


Figura 27: Fração molar de 3HHx no copolímero 3HB-co-3HHx ao longo dos ensaios A09 a A11.

Os fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB observados no cultivo A09, entre os períodos 27,5h a 51,5h (Fase 1), foi igual $0,38 \text{ g.g}^{-1}$ e entre os períodos 55,5h a 71,5h (Fase 2) igual a $0,25 \text{ g.g}^{-1}$. No cultivo A10 os fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB observados foram $0,33 \text{ g.g}^{-1}$, entre o período de 39,5h a 55,5h (Fase 1), e um fator de conversão igual a $0,12 \text{ g.g}^{-1}$ entre os períodos 59,5h a 71,5h (Fase 2). Para o cultivo A11 o fator de conversão observado foi igual a $0,36 \text{ g.g}^{-1}$ na primeira fase (28,5h a 56,5h) e na segunda fase (60h a 69h) igual a $0,36 \text{ g.g}^{-1}$. O cultivo A12 obteve um fator de conversão na primeira fase (26h a 48h) igual a $0,40 \text{ g.g}^{-1}$ e na segunda fase (52h a 72h) um fator de conversão igual a $0,19 \text{ g.g}^{-1}$.

Em relação aos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) foram observadas nos cultivos A09, A10 e A11 uma única fase de consumo, ou seja, velocidade constante de consumo dessa fonte de carbono ao longo

de todo o período de alimentação contínua. Os valores obtidos para os fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx foram $0,75 \text{ g.g}^{-1}$, $0,89 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,79 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente. MENDONÇA (2014) ao fornecer diferentes concentrações de solução de alimentação de ácido hexanóico (11 g.L^{-1} , 22 g.L^{-1} , 33 g.L^{-1} e 45 g.L^{-1}), obteve um $Y_{3\text{HHx}/\text{AHex}}$ durante a fase de alimentação contínua igual a $0,49 \text{ g.g}^{-1}$, $0,36 \text{ g.g}^{-1}$, $0,41 \text{ g.g}^{-1}$, $0,50 \text{ g.g}^{-1}$, respectivamente.

A partir dos cultivos descritos nos itens 5.2.6.4 e 5.2.7.1, onde foram fornecidas diferentes concentrações de ácido hexanóico, é possível relacionar a quantidade de ácido necessária para se produzir 3HB-co-3HHx contendo teores de 3HHx definidos. Através da equação apresentada na figura 28, é possível calcular a composição da solução de alimentação para a biossíntese de polímeros desejada, ou seja, modular a quantidade molar de 3HHx presentes no copolímero.

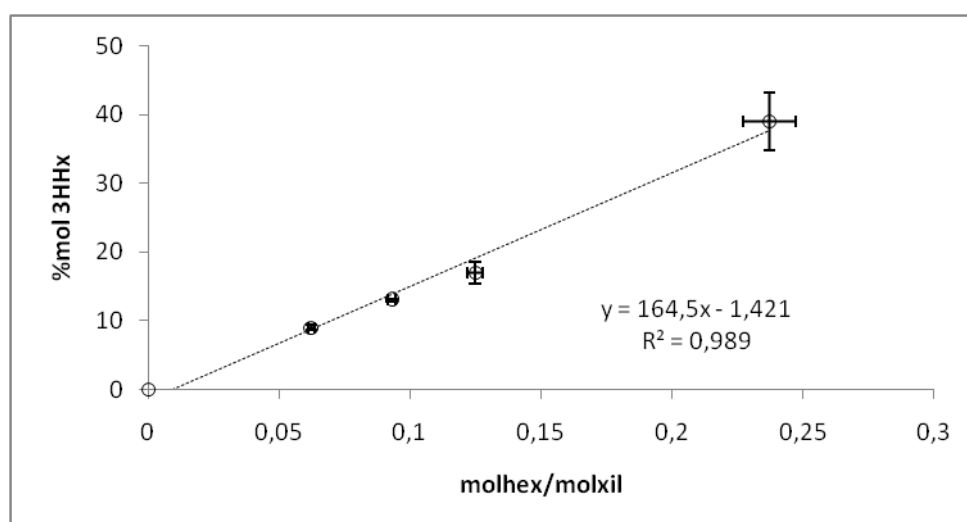


Figura 28: Relações molares de ácido hexanóico e xilose supridos e o percentual molar de 3HHx formado para os cultivos de modulação da composição de 3HB-co-3HHx por *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* em biorreator (A07, A09, A10 e A11).

6 ANÁLISE PRELIMINAR DOS FLUXOS METABÓLICOS

Para avaliar o desempenho da linhagem recombinante *LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* na síntese do copolímero 3HB-co-3HHx e 3HB foi realizada análise de fluxos metabólicos (AFM) dos experimentos em biorreator. Foram utilizados para esta análise os dados de dois experimentos em biorreator, os cultivos A11 e A12 nos quais se avaliaram a produção de 3HB e de copolímeros 3HB-co-3HHx contendo 15% mol de 3HHx.

A linhagem *Burkholderia sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} é um microrganismo recombinante de mutante UV de *B.sacchari* LFM 101 abrigando os genes P, C e J de *Aeromonas* sp. e desperta grande interesse devido sua capacidade em acumular copolímeros com altas taxas de monômeros de 3HHx. Dessa forma, compreender seu metabolismo é um importante ferramenta para superar desafios relacionados à produção desse produto.

A AFM deve ser realizada em períodos experimentais em que o fluxo de transformações intracelulares estejam constantes, ou seja, um estado denominado estacionário ou para um cultivo em batelada alimentada, um estado pseudo-estacionário, já que nesse tipo de experimento há mudanças graduais do volume no biorreator, o que influenciará diretamente nas concentrações mássicas dos substratos MENDONÇA (2014). Para uma AFM cujo objetivo é estudar os fluxos envolvidos no acúmulo de PHA, a única fase considerada foi à fase de acúmulo. A fase exponencial de crescimento também pode ser considerada um período pseudo-estacionário, entretanto, o foco desse estudo é a fase em que ocorre acúmulo de PHA.

6.1 Determinação dos estados pseudo-estacionários e cálculos de velocidade de consumo de substrato e produção de PHA e balanço de carbono durante a fase de acúmulo

Os cálculos de velocidade de consumo e produção de PHA foram realizados em ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}$). Como descrito no item 6, os valores de consumo de substrato e formação de PHA foram determinados a partir dos intervalos considerados como pseudo-estacionários. As Figuras 29 a 32 apresentam os resultados dos experimentos em biorreator com a linhagem recombinante LFM344 pBBR1MCS-2::*phaPCJ*_{Asp} para a produção de 3HB (A12) e copolímeros 3HB-co-3HHx contendo 15% mol de 3HHx (A11), bem como a determinação dos períodos pseudo-estacionários. Os períodos pseudo-estacionários foram definidos entre: 29,5h a 38h (Fase 1) e 55,5h a 67,5h (Fase 2) para o cultivo A12 (produção de 3HB) e 30h a 40h (Fase 1) e 52 a 58h (Fase 2) para o cultivo A11 (produção de copolímero contendo aproximadamente 15 mols% de 3HHx). Nesses intervalos, a concentração de biomassa residual (X_r) foi constante, assim como as velocidades de produção de 3HB e 3HHx, e de consumo de xilose e ácido hexanoico, próprio de um estado pseudo-estacionário, como previamente definido. Para o experimento A11, xilose nos períodos considerados como pseudo-estacionários apresentou uma pequena quantidade residual no biorreator, cerca de

0,27 g.L⁻¹ para o instante compreendido como a Fase 1 e 3.4 g. L⁻¹ para o instante compreendido como a Fase 2. Para o ensaio A11 não houve xilose residual ao final da primeira fase, no período compreendido como segunda fase, observa-se um valor residual de xilose igual a 7g.L⁻¹. Em relação ao ácido hexanóico não houve detecção do mesmo, sendo todo ácido fornecido, consumido. Além disso, as velocidades de formação de CO₂ (CER – *carbon evolution rate*) e de consumo de oxigênio (OUR – *oxygen uptake rate*) também foram constantes (Figura 30 e 32).

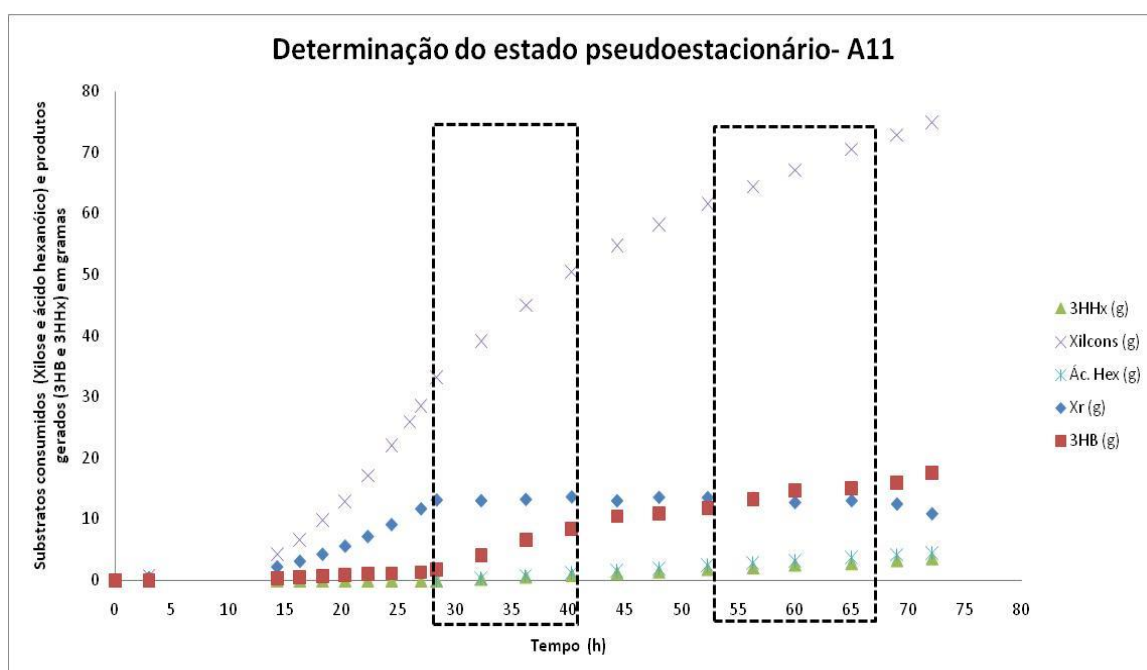


Figura 29: Experimento com *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* (A11) utilizando MM e alimentação de Xilose (97g.L⁻¹) e ácido hexanóico (6,8 g.L⁻¹) a uma vazão de alimentação de 4,6 mL.L⁻¹.h⁻¹. Estado pseudo-estacionário definido 29,5h - 38h de cultivo (Fase 1) e 55,5h-67,5h (Fase 2).

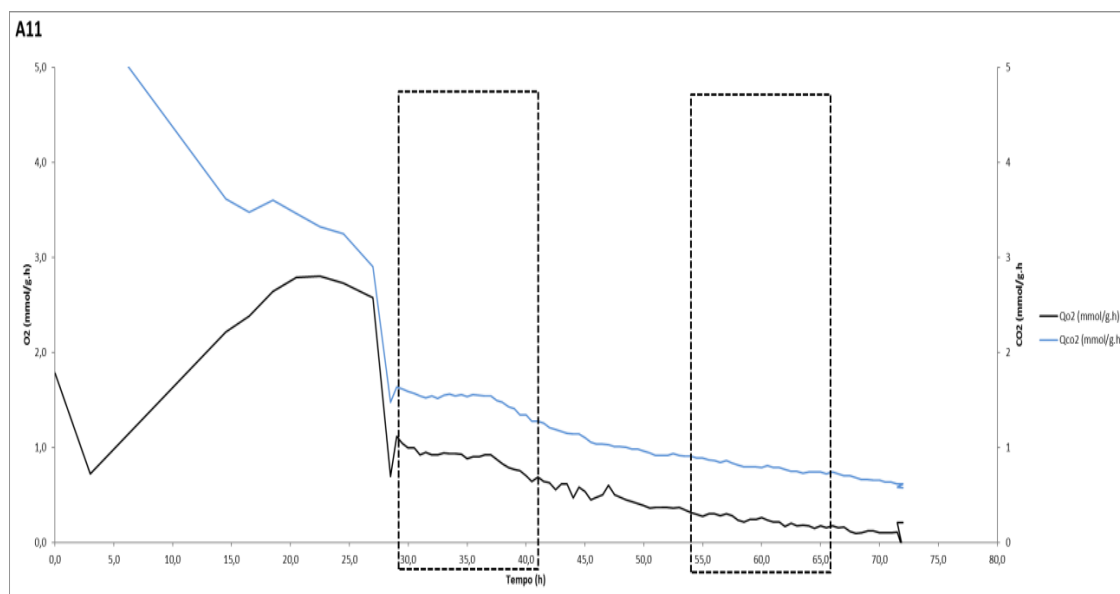


Figura 30: Representação gráfica das velocidades de consumo de O₂ (OUR) e formação de CO₂ (CER) em mmol/L.h. Determinação dos estados pseudo-estacionários através da respiração. Estado pseudo-estacionário definido 29,5h - 38h de cultivo (Fase 1) e 55,5h-67,5h (Fase 2). Consumo médio de O₂ para a Fase 1 igual a 0,93 mmol. g⁻¹.h⁻¹ – Desvio padrão igual a 0,04. Para a Fase 2 o consumo médio de O₂ foi igual a 0,21 mmol. g⁻¹.h⁻¹-Desvio padrão igual a 0,05. Formação de CO₂ para a Fase 1 igual a 1,54 mmol. g⁻¹.h⁻¹- Desvio padrão igual a 0,03. Para a Fase 2 a formação média de CO₂ foi igual a 0,78 mmol. g⁻¹.h⁻¹- Desvio padrão igual a 0,05.

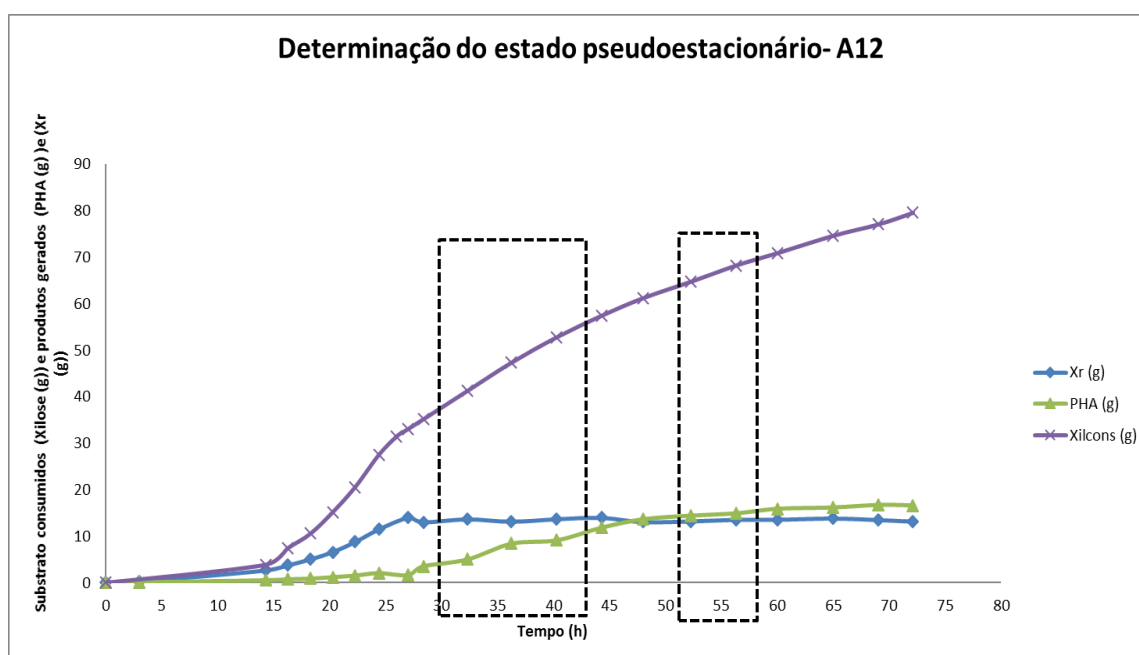


Figura 31: Experimento com *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} (A12) utilizando MM e alimentação de Xilose (98 g.L⁻¹) a uma vazão de alimentação de 4,6 mL.L⁻¹.h⁻¹. Estado pseudo-estacionário definido entre 30h – 40h (Fase 1) e 52h- 58h (Fase 2) de cultivo.

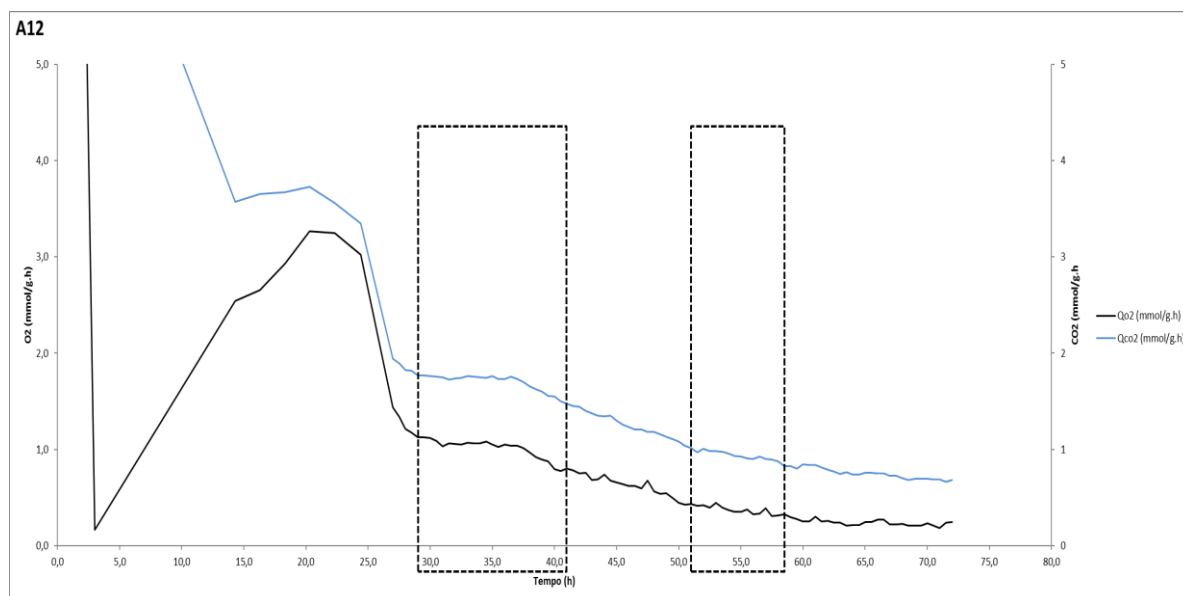


Figura 32: Representação gráfica das velocidades de consumo de O_2 (OUR) e formação de CO_2 (CER) em $mmol/L.h$. Determinação dos estados pseudo-estacionários através da respiração. Estado pseudo-estacionário definido 30h - 40h de cultivo (Fase 1) e 52h-58h (Fase 2). Consumo médio de O_2 para a Fase 1 igual a $1,02 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ – Desvio padrão igual a $0,08$. Para a Fase 2 o consumo médio de O_2 foi igual a $0,37 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ -Desvio padrão igual a $0,04$. Formação de CO_2 para a Fase 1 igual a $1,71 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ - Desvio padrão igual a $0,06$. Para a Fase 2 a formação média de CO_2 foi igual a $0,94 \text{ mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ - Desvio padrão igual a $0,04$.

A partir dos valores médios de biomassa residual (X_r) durante o período considerado como pseudo-estacionário, calculou-se os valores das velocidades específicas de produção de PHA (μ_{3HB} e/ ou μ_{3HHx}) e velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) e/ ou ácido hexanóico (μ_{AHex}). Essas velocidades específicas ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) foram convertidas a velocidades específicas molares ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) utilizando-se as massas molares do substrato consumido (xilose e ácido hexanóico) e dos produtos formados (CO_2 , 3HB e 3HHx). A partir desses valores, foi calculada a fração molar em carbono de cada um dos compostos. Para isso levou-se em consideração a quantidade de carbonos presentes em cada um dos compostos, multiplicando-se essa quantidade de átomos de carbono pelo valor em $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, resultando no valor de C gerado ($\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

O balanço de carbono é utilizado para verificar se todo o substrato consumido teve sua destinação quantificada, ou seja, se o modelo metabólico proposto para AFM contempla as possíveis destinações da fonte de carbono consumida. Caso o balanço de carbono não seja equivalente, o carbono pode estar sendo desviado para a produção de algum outro metabolito, e uma vez que esse não foi identificado e nem declarado nas reações do arquivo de entrada no *Metatool*, a distribuição de fluxos

gerados pelo programa pode não corresponder às condições estudadas. Os valores dos balanços de carbono estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Experimentos em biorreator utilizados para a análise de fluxos metabólicos.

Condição do experimento	Experimento	Fase	μ_{Xil}	μ_{AHex}	μ_{3HB}	μ_{3HHx}	QCO ₂ (mmol/g.h)) Médio*	BC
AC Xilose + ácido Hexanóico	A11	1	0.093	0.008	0.030	0.006	1.5	92.8
		2	0.053	0.008	0.020	0.006	0.8	93.0
AC Xilose	A12	1	0.093	-	0.030	NR	1.7	100.2
		2	0.053	-	0.020	NR	0.9	105.9

Condição do experimento: Ensaio A11 suprido com alimentação contínua de xilose e ácido hexanóico e ensaio A12 suprido com alimentação contínua de xilose durante a fase de acúmulo. Fase 1 do experimento A11 compreendido entre 29,5 a 38 horas e fase 2 entre 55,5 a 67,5 horas. Para o experimento A12 a fase 1 compreende-se entre 30 a 40 horas e a fase 2 entre 52 a 58 horas. μ_{Xil} : Velocidade específica de consumo de xilose. μ_{AHex} : Velocidade específica de consumo de ácido hexanóico. μ_{3HB} : Velocidade específica de produção de 3HB. μ_{3HHx} : Velocidade específica de produção de 3HHx. QCO₂: Velocidade específica de produção de dióxido de carbono médio (mmol.g⁻¹.h⁻¹). BC: Balanço de carbono.

A partir do balanço de carbono obtido dos experimentos A11 e A12 é possível observar um balanço médio de 93% para o ensaio A11 e de 103% para o ensaio A12 (Tabela 16). Esses valores foram considerados bons para a análise, levando-se em conta, um erro padrão de 5% para mais ou para menos no balanço de carbono.

6.2 Geração de modos elementares no *Metatool* para representação das redes metabólicas

Uma rede representativa do metabolismo de *B. sacchari* foi construída considerando dados da literatura (MARZZOCO; TORRES, 2011; WHITE, 2007). O modelo proposto para o metabolismo deste microrganismo está mostrado na Figura 33. As seguintes vias foram consideradas para a esquematização: via de Entner-Doudoroff (ED), via das pentoses (VP), ciclo de Krebs (CK), ciclo do glioxilato, β -oxidação do ácido hexanóico, biossíntese de 3HB a partir de acetil-CoA, frutose 1,6-bisfosfatase (permite gliconeogênese de glicose 6-fosfato através de gliceraldeído-3 fosfato), complexo piruvato desidrogenase, piruvato carboxilase (permite a formação de oxalacetato através de piruvato), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (permite a

formação de fosfoenolpiruvato a partir de oxaloacetato), enoil-CoA hidratase (*R*)-específica, oxidação de FADH₂ ou NADH em cadeia respiratória com O₂ comoceptor final de elétrons, trans hidrogenases de membrana (PNTAB) e solúvel (UDHA) (SAUER et., al 2004).

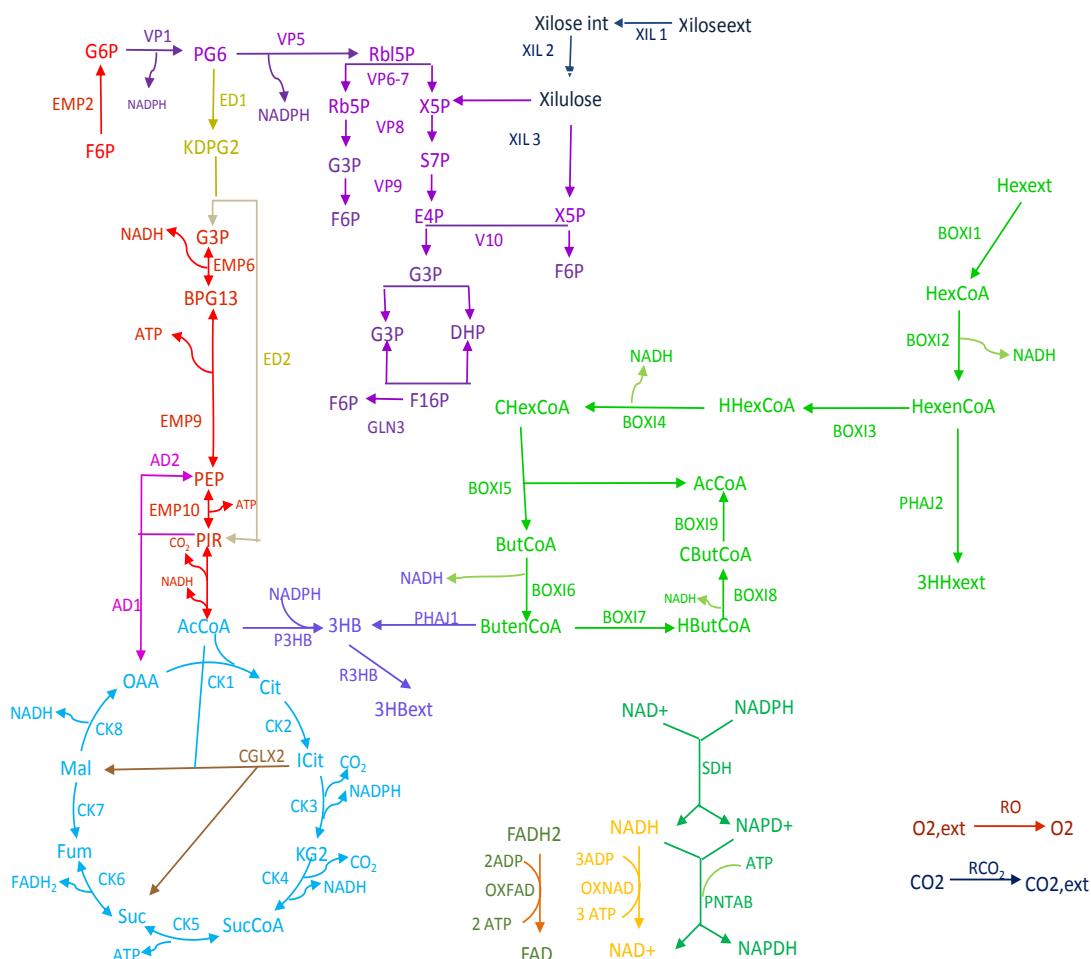


Figura 33: Esquema representativo do modelo proposto para análise de fluxos metabólicos nos cultivos de *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ*_{Asp}.

O *software* gerou 54 modos elementares (ME). Os modos elementares foram analisados e aqueles que não faziam sentido, do ponto de vista metabólico, foram excluídos, restando 51 modos elementares. Os modos elementares restantes foram agrupados em famílias, ou seja, aqueles modos elementares que apresentavam os mesmos coeficientes estequiométricos nas reações globais (Apêndice D). O número de famílias de ME foi igual a 7 para a condição envolvendo apenas o fornecimento de xilose e 24 famílias para a condição envolvendo o fornecimento de xilose e ácido hexanóico.

6.3 Otimização de dados no programa *Matlab* para determinação dos fluxos metabólicos

A partir da função *fmincon* presente no programa *Matlab*, foram calculados os vetores que levariam aos resultados mais próximos dos dados experimentais. Para isso, foi construída uma matriz com um representante de cada uma das famílias de ME. Essa matriz com os ME foi utilizada no *Matlab*, assim como os valores experimentais de cada ensaio e de cada fase dos cultivos estabelecidas como característica de um estado pseudo-estacionário.

Para que os valores sejam obtidos, o *software* trabalha com variáveis principais como o *upper bound* e o *lower bound* que podem ser alterados para que se chegue a um erro (F) mínimo. A tabela 17 apresenta o valor simulado a partir dos dados experimentais obtidos.

Tabela 17: Simulação dos vetores de fluxos metabólicos em diferentes experimentos em biorreator utilizando-se o *MatLab*.

Otimização de dados cultivo A11				
	Estado pseudo-estacionário 1		Estado pseudo-estacionário 2	
	Experimental	Simulado	Experimental	Simulado
Hexext	0.07	0.06	0.07	0.06
Xilext	0.61	0.59	0.35	0.34
CO₂ext	1.54	1.54	0.78	0.78
3HBext	0.34	0.35	0.23	0.23
3HHxext	0.05	0.06	0.05	0.06
F		0.03		0.01
Otimização de dados cultivo A12				
	Estado pseudo-estacionário 1		Estado pseudo-estacionário 2	
	Experimental	Simulado	Experimental	Simulado
Xilose	0.68	0.69	0.35	0.37
CO₂ext	1.71	1.71	0.94	0.94
3HB	0.45	0.44	0.23	0.22
F		0.01		0.02

Hexeext: Ácido hexanóico externo. Xilext: Xilose externa. CO₂ext: Dioxido de carbono externo. 3HBext: 3-Hidroxibutirato externo. 3-HHxext: 3Hidroxihexanoato externo. F: Erro.

A partir do programa também é possível prever as famílias de modos elementares que contribuem para o funcionamento do metabolismo. As famílias de ME que não apresentaram contribuições para o metabolismo foram descartadas, e as famílias restantes foram organizadas em conjuntos. O programa *MatLab* iniciou a

contribuição de 7 famílias de modos elementares para a condição em que *B.sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* foi cultivada em xilose como única fonte de carbono. Para a condição em que *B.sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* foi cultivada com o fornecimento de xilose e ácido hexanóico, o número de famílias de modos elementares contribuindo para o metabolismo foi igual a 8.

6.4 Análise do metabolismo de *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}*

As famílias de modos elementares que contribuem para o metabolismo celular foram organizadas em conjuntos. Ao total foram obtidos 78 conjuntos de rotas metabólicas possíveis que podem ser realizadas por *B. sacchari LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* na condição de limitação em nitrogênio e com o fornecimento de xilose ou xilose e ácido hexanóico em cada estado pseudo-estacionário. Analisaram-se as 78 rotas metabólicas possíveis com o objetivo de se encontrar equivalência entre elas.

Em um primeiro momento observou-se um padrão entre essas rotas. Esses padrões permitiram dividir as 78 possíveis rotas metabólicas em três grupos. Em todos os grupos há ausência de fluxo na reação AD1, durante o primeiro e segundo estado pseudo-estacionário, tanto para a condição com o fornecimento de xilose (Figura 34) ou xilose e ácido hexanóico (Figura 35).

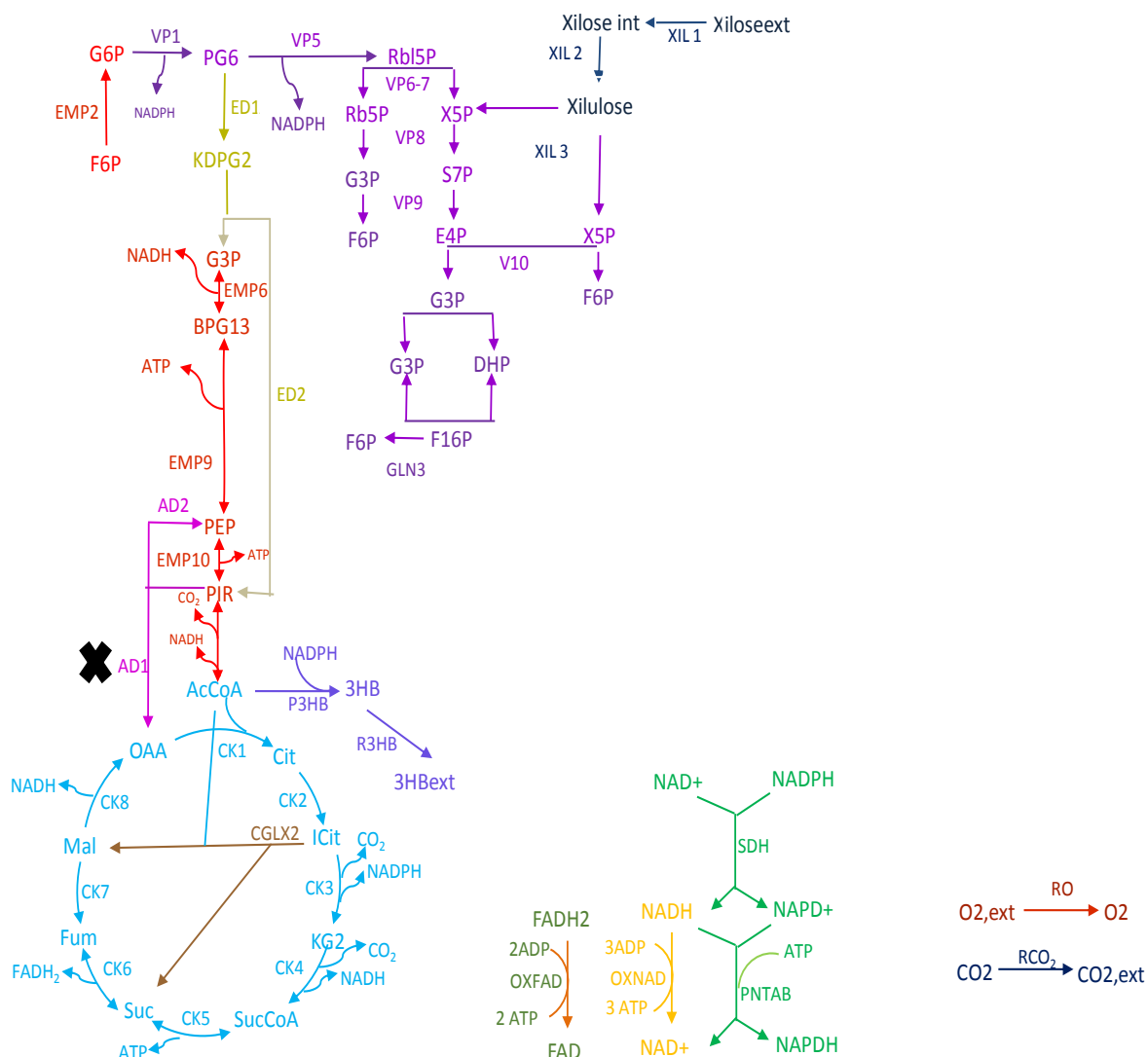


Figura 34: Grupo 1- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e eliminação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação.

Em relação à metabolização do ácido hexanóico, identificou-se que no experimento escolhido para a análise, o único caminho percorrido metabolicamente para converter esse ácido em monômeros de 3HHx são as reações Beta oxidação 1 e 2 (BOX 1 e 2) e PHAJ2. MENDONÇA 2014 ao avaliar o consumo de ácido hexanóico na presença de glicose, identificou que o ácido hexanóico pode contribuir para a síntese de monômeros 3HB. Entretanto, esses resultados não indicam que em presença de xilose o ácido hexanóico é totalmente convertido a monômeros 3HHx. Os resultados apenas indicam que nessa situação de baixa concentração de ácido hexanóico no meio, a célula está utilizando essa fonte de carbono apenas para a

produção de 3HHx. Essa hipótese confirma ao analisar os dados do primeiro estado pseudo-estacionário do experimento A09 (Experimento não utilizado para a AFM). Nesse ensaio, é possível observar a contribuição do ácido hexanóico na síntese de 3HB.

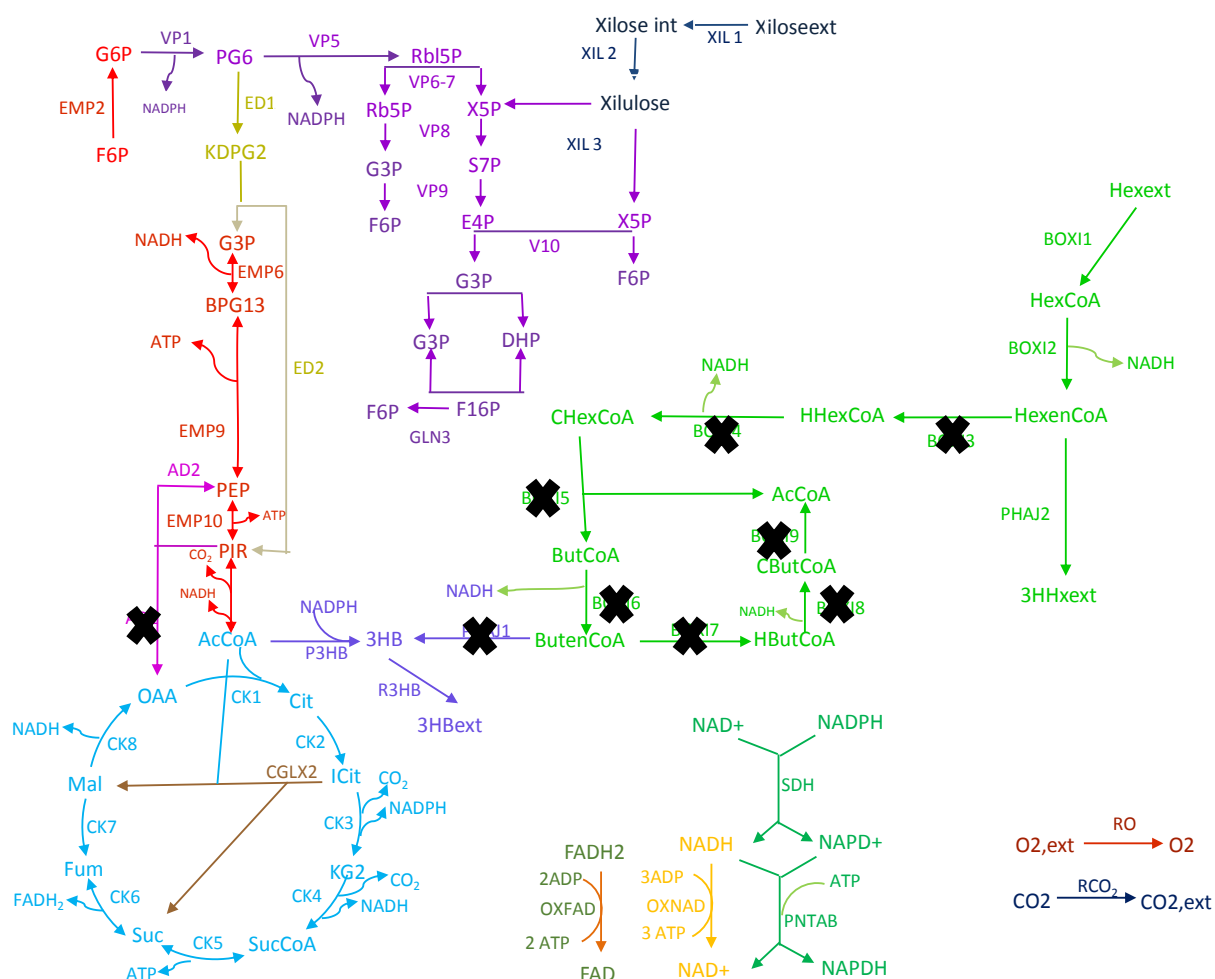


Figura 35: Grupo-1 Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação.

No segundo grupo de rotas metabólicas, há ausência da reação GLN3, no primeiro e segundo estado pseudo-estacionário, tanto para a condição com o fornecimento de xilose (Figura 36) ou xilose e ácido hexanóico (Figura 37). Na reação GLN3, Frutose 1, 6 fosfato (F16P) é convertida a Frutose 6 fosfato (F6P). A F6P produzida nessa etapa sofrerá uma nova reação, sendo convertida em G6P (EMP2). Posteriormente, G6P será convertida a 6-fosfogliconato (PG6) e produzirá NADPH na via das pentoses 1 (VP1). O NADPH é utilizado como poder redutor para a síntese de PHA. Dessa forma, a ausência de fluxo em GLN3 pode indicar uma

deficiência da célula em produzir poder redutor, o que corrobora indicativos anteriores obtidos por LOPES (2010).

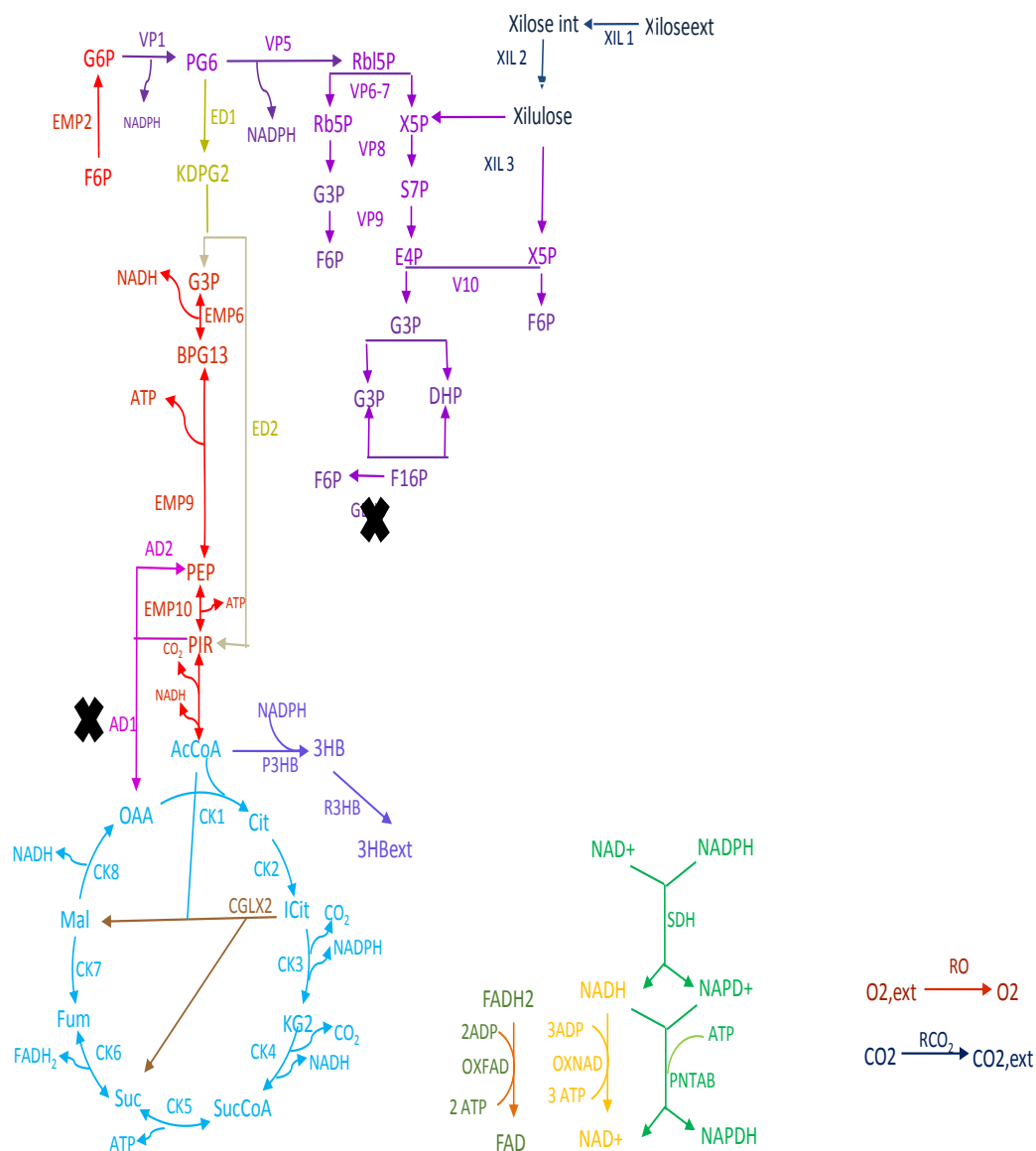


Figura 36: Grupo 2-Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo "X" indica ausência de fluxo na reação.

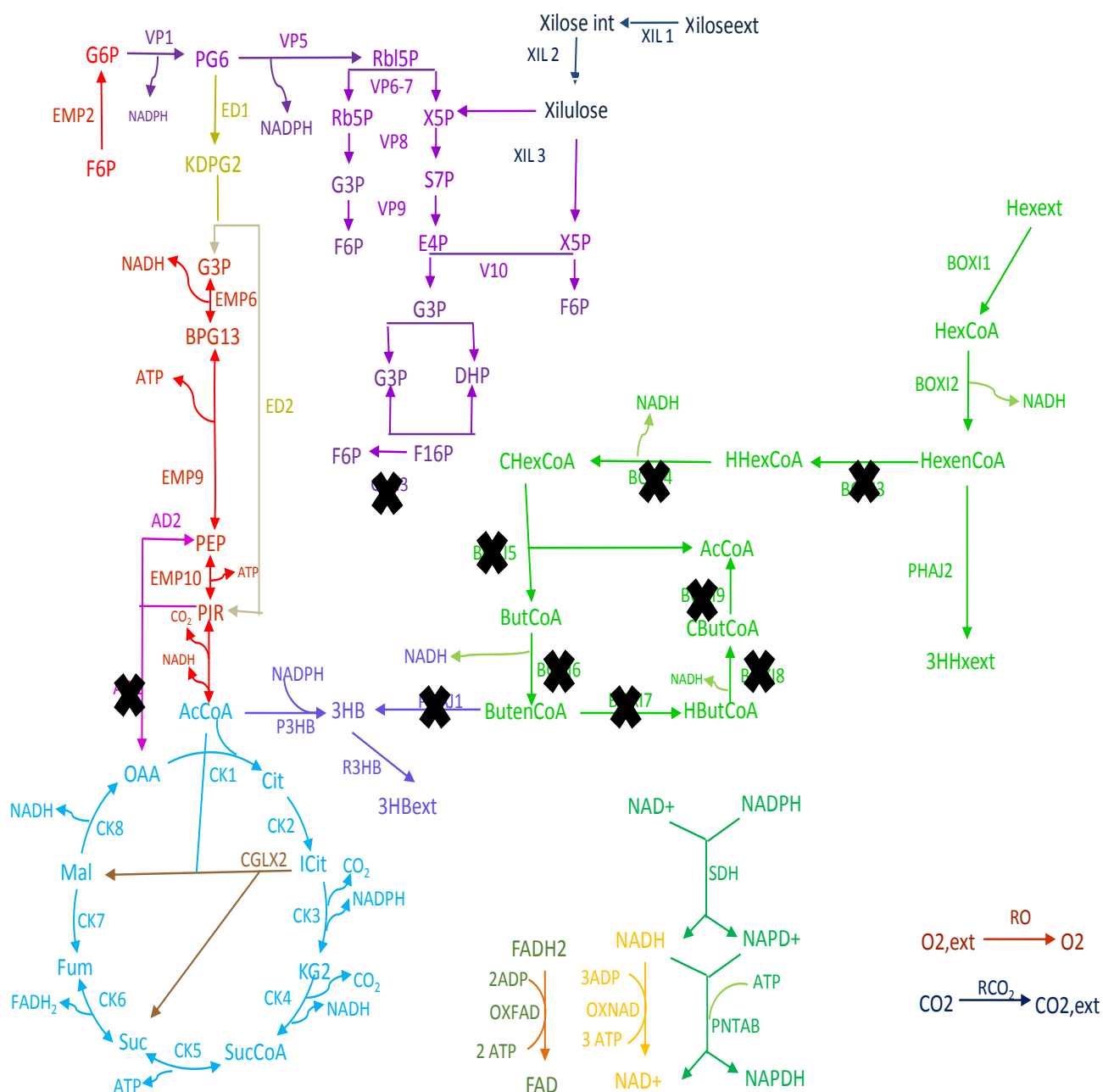


Figura 37: Grupo 2- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo "X" indica ausência de fluxo na reação.

No terceiro grupo de rotas metabólicas, há ausência da reação PNTAB (transidrogenase de nucleotídeo de piridina), no primeiro e segundo estado pseudo-estacionário, tanto para a condição com o fornecimento de xilose (Figura 38) ou xilose e ácido hexanóico (Figura 39). A PNTAB é uma reação que converte NADP em

NADPH através de uma transhidrogenase de membrana (Kämäräinen J; et al. 2017). KABUS et. al 2007 ao estudar o metabolismo de *Corynebacterium glutamicum* na produção de lisina identificou que o maior problema na produção deste metabolito é a deficiência do suprimento de NADPH pela PNTAB. Ao expressar os genes de *E. coli* responsáveis pela síntese desse complexo enzimático, KABUS et. al 2007 obtiveram uma melhora significativa na produção de lisina a partir de diferentes fontes de carbono. Foram observados a partir desses experimentos que a presença da transidrogenase (PNTAB) reduziu levemente o consumo de glicose, enquanto que o consumo de frutose e sacarose foi estimulado. Além disso, foi possível observar uma melhora na síntese de lisina e biomassa em cerca de 30%.

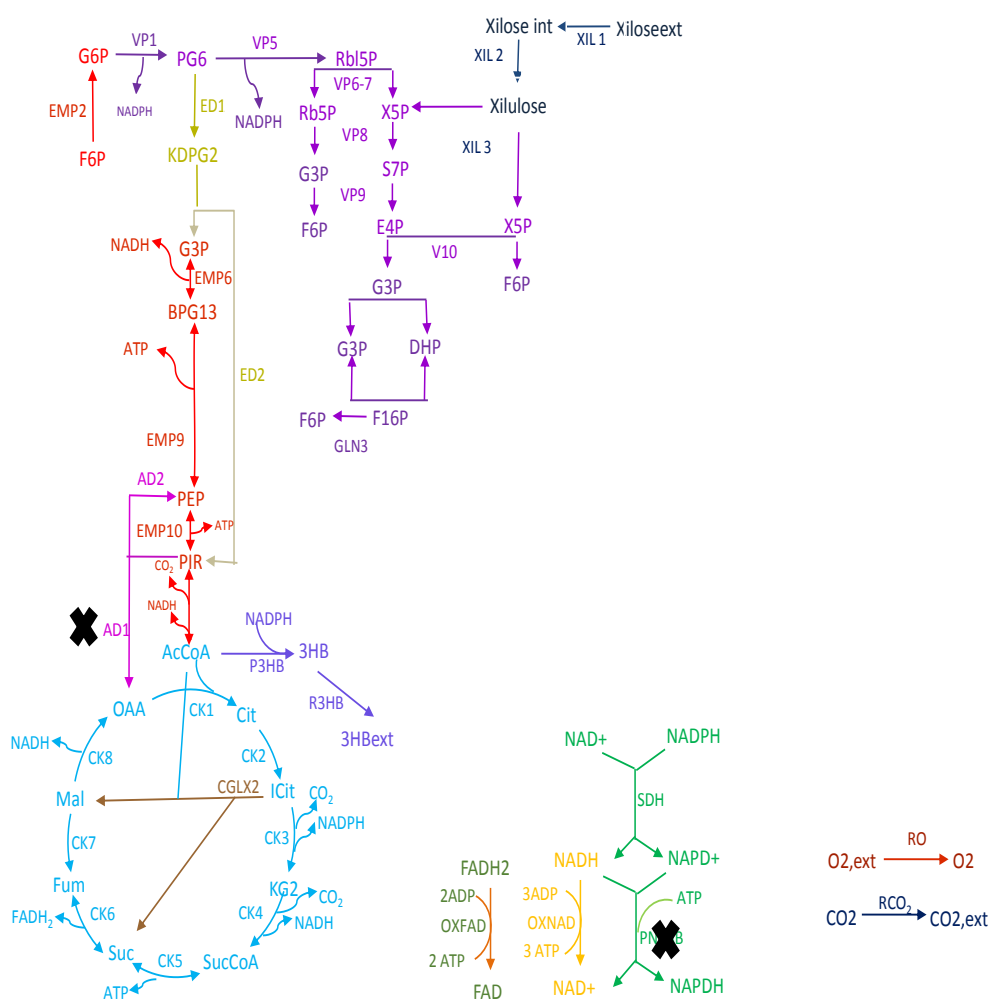


Figura 38: Grupo 3- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo "X" indica ausência de fluxo na reação.

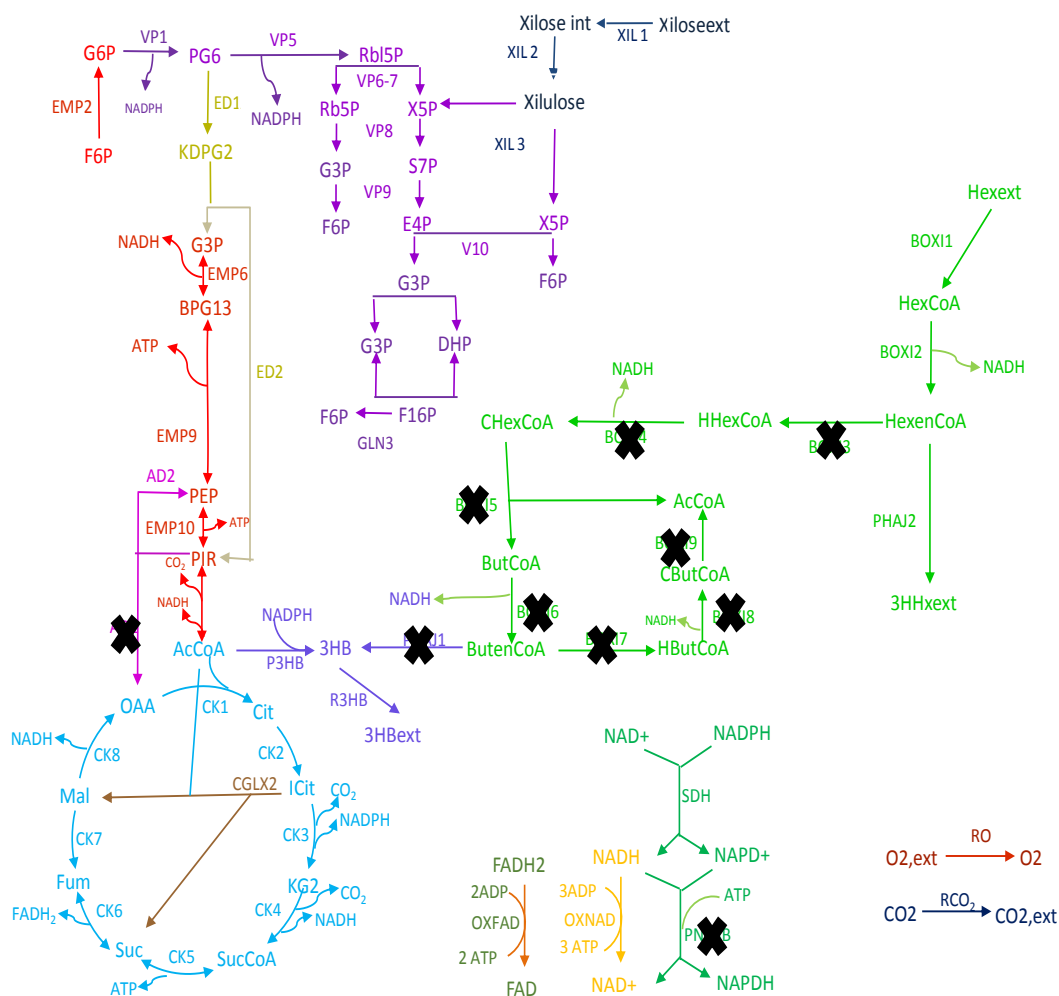


Figura 39: Grupo 3- Representação da distribuição dos fluxos metabólicos em *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* a partir do fornecimento de xilose e ácido hexanóico e limitação no fornecimento de nitrogênio. Estado-pseudo estacionário 1 e 2. O símbolo “X” indica ausência de fluxo na reação.

O rendimento máximo teórico de produção de 3HB a partir de xilose é igual a 0,48 g de 3HB por g de xilose consumida (LOPES 2010). Nos estados pseudo-estacionários considerados neste trabalho, *B. sacchari* LFM344 *pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}* obteve um rendimento de xilose em 3HB igual a 0,36 g.g⁻¹ para o primeiro estado pseudo estacionário e 0,35 g.g⁻¹ para o segundo estado pseudo-estacionário no experimento envolvendo apenas o fornecimento de xilose. No experimento com o fornecimento de xilose e ácido hexanóico esses valores de rendimento estão em 0,34 g.g⁻¹ para o primeiro estado pseudo-estacionário e 0,38 g.g⁻¹ para o segundo estado pseudo-estacionário.

Esses valores indicam que não há uma alteração metabólica significativa da célula para a síntese de 3HB quando há o fornecimento apenas de xilose como fonte de carbono. Entretanto, ao observarem-se as rotas metabólicas da via das pentoses

nos dois períodos pseudo-estacionários, foi detectado um maior fluxo nessa via, em especial nas reações VP1 e VP5, durante o segundo estado pseudo-estacionário (Apêndice E). Nas reações VP1 e VP5 ocorre a produção de NADPH (Apêndice C). Esse aumento de fluxo na via das pentoses durante o segundo estado pseudo-estacionário pode indicar que a célula está despendendo maior esforço metabólico para produzir a mesma quantidade de 3HB.

No experimento com o fornecimento de ácido hexanóico para a produção de copolímero contendo 15 mol% de 3HHx verifica-se uma situação oposta ao verificado no experimento com o fornecimento de xilose como única fonte de carbono. Nessa situação, a via das pentoses tem um maior fluxo metabólico no primeiro estado pseudo-estacionário e um rendimento pouco menor na síntese de 3HB em comparação ao segundo estado pseudo-estacionário. Essa situação pode estar ocorrendo devido à presença do ácido hexanóico. Por estar em uma quantidade menor em relação à xilose e ser mais facilmente metabolizado pela via da β -oxidação, o ácido hexanóico pode estar competindo pelo ATP produzido pela célula. Em presença de xilose e ácido hexanóico, o ATP é requerido pelo ácido hexanóico para ser convertido em HexCoA na reação BOX 1 (Figuras 41,43 e 45 e Apêndice C). Posteriormente, o metabolismo celular realiza a conversão de HexCoA em HexenCoA e reduz NAD em NADH (BOX 2) (Figuras 41,43 e 45 e Apêndice C). Dessa maneira, a célula consegue, ao fazer essa etapa, produzir poder redutor (NADPH) que é requerido para outras reações do metabolismo celular. Para a produção de 3HB a partir de xilose, o metabolismo precisará gastar NADPH, que depende do fluxo na via das pentoses e do funcionamento da transidrogenase de membrana (PNTAB). O funcionamento da PNTAB requer gasto de ATP, assim como a entrada de xilose na célula, que posteriormente ingressará na via das pentoses. A xilose, como discutido anteriormente, está sendo suprida em uma concentração muito maior para a célula. Nessas circunstâncias a quantidade de ATP requerida é muito maior, o que levará a célula no primeiro momento do metabolismo favorecer o consumo de ácido hexanóico.

7 CONCLUSÃO

Ensaio em frascos agitados com recombinantes de *B. sacchari* permitiram verificar o acúmulo de 3HB-co-3HHx a partir de xilose e ácido hexanóico. Os parâmetros experimentais obtidos nesses ensaios para o consumo de ácido hexanóico e síntese de 3HHx foram similares aos valores reportados por MENDONÇA (2014). Em relação aos parâmetros experimentais referentes ao fornecimento de xilose, os valores obtidos foram próximos reportados por LOPES (2010).

Cultivos em biorreator foram realizados com a linhagem selvagem *B. sacchari* LFM 101 e o recombinante *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. Esses ensaios indicaram que entre as limitações avaliadas (fósforo ou nitrogênio), o acúmulo de PHA é mais eficiente quando o cultivo é limitado em nitrogênio, para ambas as linhagens. Em relação à metabolização de xilose e sua conversão em P3HB, a linhagem selvagem se demonstrou mais eficiente.

Ensaio em biorreator com o fornecimento de xilose e ácido hexanóico foram realizados apenas com a linhagem recombinante *B. sacchari* LFM 344pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} com o objetivo de se controlar a composição molar de 3HHx no copolímero total produzido (3HB-co-3HHx). A composição do copolímero (3HB-co-3HHx) produzido pela linhagem recombinante *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp} pode ser modulada pela relação xilose/ácido hexanoico fornecida, atingindo valores iguais a 40 mol % de 3HHx. Esses valores são o dobro dos dados obtidos na literatura, quando glicose e ácido hexanóico são fornecidos. Foram obtidos teores poliméricos (3HB-co-3HHx) entre 51 a 64% % da massa seca celular. Também foram alcançados fatores de conversão de xilose a 3HB (entre 0,26 e 0,40 g.g⁻¹) e ácido hexanóico a 3HHx (entre 0,54 e 0,89 g.g⁻¹).

Foram analisados os períodos pseudo-estacionários de produção de polímeros 3HB e 3HB-co-3HHx, verificando-se um balanço de carbono entre 93 e 105%.

Nos períodos pseudo-estacionários investigados, a eficiência de conversão do ácido hexanoico em 3HHx correspondeu a 90%, isso é relevante, já que a literatura mostra que esses valores estavam anteriormente em torno 50% do máximo teórico para a linhagem *B. sacchari* LFM344 pBBR1MCS-2::phaPCJ_{Asp}. A eficiência de conversão da xilose em monômeros de 3HB variou entre 54 a 83% do máximo teórico. Observou-se menores valores de conversão de xilose em 3HB em copolímeros com frações maiores frações molares de 3HHx.

A partir dos resultados dos dados experimentais e da análise preliminar dos fluxos metabólicos, foi possível obter um bom ajuste ao modelo metabólico proposto (Balanço de carbono entre 93-105%). De acordo com os modelos, para aumentar a conversão de intermediários em 3HB a partir de xilose, haveria necessidade de maiores teores de poder redutor (NADPH). Nesses modelos observa-se que há um fluxo igual a zero na reação catalizada por uma das transidrogenases de membrana (PNTAB). O aumento nesse fluxo poderia ser considerado como uma forma de promover um maior acúmulo, uma hipótese a ser mais bem discutida. Análises futuras e mais aprofundadas sobre o catabolismo de xilose poderão demonstrar alternativas mais eficazes na conversão dessa fonte de carbono em monômeros de 3HB.

REFERÊNCIAS

- Alexandrino, P. M. R., Mendonça, T. T., Bautista, L. P. G., Cherix, J., Lozano-Sakalauskas, G. C., Fujita, A., ... & Gomez, J. G. C. (2015). Draft genome sequence of the polyhydroxyalkanoate-producing bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 isolated from Brazilian sugarcane plantation soil. **Genome Announc.**, 3(3), e00313-15.
- ANDERSON, A. J., & DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological Reviews**, v. 54, n.4, p. 450–472, 1990
- BAJPAI, P. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Biofuel Production. 2016.
- BATISTA, LINDA PRISCILA GUMÀN. Clonagem e super expressão dos genes do catabolismo de xilose em *Burkholderia Sacchari* e avaliação do seu efeito na repressão catabólica e produção de polihidroxitirato a partir de açúcar hemicelulósicos. Tese (Doutorado em Microbiologia). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 2016.
- biodegradable plastics from
bacterial cells <http://www.bioeconomia.mincyt.gob.ar/wp-content/uploads/2014/12/3.-Producción-de-plásticos-biodegradables-a-partir-de-bacterias-L.-Ferreira-Da-Silva.pdf>
- BOCANEGRA, Johanna Katherine et al. Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 6, p. 1336-1347, 2013.
- BRÄMER, C. O. et al. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1709–1713, 2001.
- BRÄMER, C. O. et al. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101T and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 271-279, 2002.

Brandl, Helmut; Gross, R.A., Lenz, R. W. . Plastics from bacteria and for bacteria: poly (β - hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *MicroBiopro.* **Springer Berlin Heidelberg**, 1990; 77-93.

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

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

CARERE, C. R. et al. Third generation biofuels via direct cellulose fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 7, p. 1342–1360, 2008.

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

CHANDRA, R. P. et al. Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 67–93, 2007.

DAHMS, A. S. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 60, n. 4, p. 1433-1439, Oct 1974. ISSN 0006-291X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4423285> >

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

DESVaux, M. *Clostridium cellulolyticum*: Model organism of mesophilic cellulolytic clostridia. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 741–764, 2005.

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

FILHO, EDMAR RAMOS DE OLIVEIRA. Melhoramento da eficiência de conversão de xilose e co-substratos em copolímeros híbridos P (3HB-co-3HAMCL) por *Burkholderia sacchari*. Tese em desenvolvimento. São Paulo. 2017-2021.

Gomez, J. G. C. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de Polihidroxialcanoatos. Tese (Mestrado em Biotecnologia)- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 1994.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 6, p. 785–791, 1996.

GRANSTRÖM, Tom Birger; IZUMORI, Ken; LEISOLA, Matti. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 273, 2007.

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.

HAHN-HAEGERDAL, B., KARHUMAA, K., JEPSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biofuels*, v. 108, p. 147-177, 2007. ISSN 0724- 6145. Disponível em: < ://WOS:000250578300006 >.

HEATHMAN, T. R. J.; WEBB, W. R.; HAN, J.; DAN, Z.; CHEN, G. Q.; FORSYTH, N. R.; EL HAJ, A. J.; ZHANG, Z. R.; SUN, X. Controlled production of poly (3- hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) (PHBHHX) nanoparticles for targeted and sustained drug delivery. **Pharmaceutical Nanotechnology**. DOI 10.1002/jps.24035, 2014.

HÖFFNER, K.; HARWOOD, S.; BARTON, P. A reliable simulator for dynamic flux balance analysis. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 110, n. 3, p. 792-802, 2013. ISSN 1097-0290.

JIANG, G. et al. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. **International Journal of Molecular Sciences**.v. 17, n.7, 2016.

K.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate- Producing *Bacterium Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. **Genome Announcement**. 3(3): 1-2, 2015.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 137-145, 2004.

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.

Kabus, Armin, et al. "Expression of the *Escherichia coli pntAB* genes encoding a membrane-bound transhydrogenase in *Corynebacterium glutamicum* improves L-lysine formation." **Applied microbiology and biotechnology** 75.1 (2007): 47-53.

Kämäräinen, Jari, et al. "Pyridine nucleotide transhydrogenase PntAB is essential for optimal growth and photosynthetic integrity under low-light mixotrophic conditions in *Synechocystis sp. PCC 6803*." **New Phytologist** 214.1 (2017): 194-204.

KICHISE, T., FUKUI, T., YOSHIDA, Y. , DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 69-77, 1999.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2411–2419, maio 2002.

LAFFERTY, R. M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. **Biotechnology**, v. 6, n. 66, p. 135-176, 1988.

LEE, G. N.; NA, J. FUTURE OF MICROBIAL POLYESTERS. **MICROBIAL CELL FACTORIES**, V. 12, P. 1-4. 2013.

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.

LIU, W. et al. Engineering of the xylose metabolic pathway for microbial production of bio-based chemicals. *Sheng wu gong cheng xue bao Chinese journal of biotechnology*, v. 29, n. 8, p. 1161-1172, 2013. ISSN 1000-3061.

LIZARRAGA-VALDERRAMA, L. R.; NIGMATULLIN, R.; TAYLOR, C.; HAYCOCK, J. W.; CLAEYSSENS, F.; KNOWLES, J. C.; ROY, I. Nerve tissue engineering using blends of poly(3- hydroxyalkanoates) for peripheral nerve regeneration. *Eng. Life Sci.*, 15, 612–621, 2015.

LOMAS, A.J., CHEN, G.Q., HAJ, A. J.E., FORSYTH, N.R. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) supports adhesion and migration of mesenchymal stem cells and tenocytes *World J. Stem Cells*, v. 4, p. 94-100, 2012.

Lopes, M.S.G.; Rocha, R. C. S.; Zanotto, S. P.; Gomez, J. G. C.; Silva, L. F. Screening of bacteria to produce polyhydroxyalkanoates from xylose. **World J Micro Biotech**. 2009; v.25, p.1751– 1756.

Lopes, M.S.G.; Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolizado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

LOPES, M. S., GOSSET, G., ROCHA, R. C., GOMEZ, J. G. C., SILVA, L. F. PHB biosynthesis in catabolite repression mutant of *Burkholderia sacchari*. **Curr Microbiol**, v. 63, n. 4, p. 319-326, Oct 2011.

LU, X.; ZHANG, W.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Q. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases from two strains of *Aeromonas hydrophila* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 24, p. 149–155, 2005.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 63, p. 21-53, 1999.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica básica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 3ª ed., 2011. 386 p.

Mendonça, T. T. Avaliação do potencial de *Burkholderia Sacchari* produzir o copolímero biodegradável Poli (3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxihexanoato)[P(3HB-co-3HHx)]. Tese (Mestrado em Microbiologia)-São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

MENDONÇA, THATIANE TEIXEIRA; Cabrera; BUFFONI, Ernesto ; RODRIGUEZ, RUBEN SÁNCHEZ ; SCHRIPSEMA, JAN ; Lopes, Mateus Schreiner Garcez ; Silva, Luiziana Ferreira . Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology (Print) JCR**, v. 1, p. n/a-n/a, 2013.

MENDONÇA, T. T. ESTUDO DE BACTÉRIAS RECOMBINANTES E ANÁLISE DE FLUXOS METABÓLICOS PARA A BIOSÍNTESE DO COPOLÍMERO BIODEGRADÁVEL POLI(3- HIDROXIBUTIRATO-co-3-HIDROXIHEXANOATO) [P(3HB-co-3HHx)]. **Journal of Chemical Information and Modeling**, p. 255, 2014.

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

MENDONÇA, T. T. et al. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 654–663, 2017.

MOŹEJKO-CIESIELSKA, Justyna; POKOJ, Tomasz. Exploring nutrient limitation for polyhydroxyalkanoates synthesis by newly isolated strains of *Aeromonas sp.* using biodiesel-derived glycerol as a substrate. **PeerJ**, v. 6, p. e5838, 2018.

MURUGAN, Paramasivam et al. Production of P (3HB-co-3HHx) with Controlled Compositions by *Recombinant Cupriavidus necator Re2058/pCB113* from Renewable Resources. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 44, n. 9, p. 1234-1241, 2016.

NASCIMENTO, VALKIREA MATOS ; Silva, Luiziana Ferreira ; GOMEZ, José Gregório Cabrera ; FONSECA, GUSTAVO GRACIANO . Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. **Scientia Agricola JCR**, v. 73, p. 429- 433, 2016.

NEIDHARDT, Frederick Carl; INGRAHAM, John L.; SCHAECHTER, Moselio. Physiology of the bacterial cell: a molecular approach. Sunderland, MA: **Sinauer Associates**, 1990.

PAN, W. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759 using a detoxified sugar maple hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 459–469, 2012.

PEREIRA, EM, SILVA-QUEIROZ, SR, GOMEZ, JGC, SILVA, LF .Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*. **Can. J. Microbiol.**, v. 55, p. 688-697, 2009.

PFEIFFER, Thomas et al. METATOOL: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, n.

PRADELHA, F. et al. Flux balance analysis of mixed microbial cultures: application to the production of polyhydroxyalkanoates from complex mixtures of volatile fatty acids. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2, p. 336-345, 2012. ISSN 0168-1656.

QU, X. H.; WU, Q.; LIANG, J.; ZOU, B.; CHEN, G. Q. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells. **Biomaterials**, v. 27, p. 2944–2950, 2006.

RADECKA, I. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**. V. 102, n. 6, P. 1437–1449, 2007

RAICHER, GIL. Análise Econômica da produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir da cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biotecnologia). São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 2010.

RAPOSO, R. S. et al. A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol, and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. **New Biotechnology**. V.34, p. 12-22, 2016

RHEM Bernd, H. A. "Polyester synthases: natural catalysts for plastics." **Biochemical Journal** 376.1 (2003): 15-33.

RHEM,HJ,REED,G.(eds) Biotechnology. **Weinheim:VCH**, 1988; V.6b,p.136-176.

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

ROCHA, Rafael CS et al. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P (3HB- co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 427-431, 2008.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 2003.

Santos, Amélia SF, José Augusto M. Agnelli, and Sati Manrich. "Tendências e desafios da reciclagem de embalagens plásticas." **Polímeros: Ciência e Tec.** 2004;14.5: 307-312.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica. **Editora Blucher**, 2001.

SILVA, S. S. et al. Extração e caracterização de xilanas de sabugos de milho. **Polímeros**, v. 8, n. 2, p. 25–33, 1998.

SILVA, L. F. et al. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 76, n. 2–3, p. 165–174, 2000.

SILVA, L. F. et al. Poly-3-hydroxybutyrate (3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 245–254, 2004.

Silva, L. F.; Gomez, J. G. C. Produção biotecnológica de PoliHidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**. 2007; v. 30, n. 7, p. 1732-1743.

SILVA, L.F. & GOMEZ, J.G.C Processo de obtenção e mutante de *Burkholderia* sp mais eficiente na utilização de propionato para produção de copolímero biodegradável, PI 9806557-2 . . Concedida em 11/2013

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorrefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 71, p. 2 – 7, 2014

SMITH, J.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 41, 2014. ISSN 1472-6750.

SONG, S.; PARK, C. Utilization of d-ribose through d-xylose transporter. **FEMS Microbiology Letters**, v. 163, n. 2, p. 255-261, 1998. ISSN 1574-6968.

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

STEPHANOPOULOS, George; ARISTIDOU, Aristos A.; NIELSEN, Jens. Metabolic engineering: principles and methodologies. **Academicpress**, 1998.

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

TACIRO, Marilda Keico. Processo contínuo de produção de polihidroxicanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TAVARES, RR, MENDONÇA, TT, GOMEZ, JGC, CESPEDES, LG, SILVA, LF. 2012 Expression of *Aeromonas* sp. and *Ralstonia eutropha* Genes in Mutant *Burkholderia sacchari* for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3 Hydroxyhexanoate). International Symposium on Biopolymers ISBP 2012, Cairns, Australia, Abstracts, Oct7-10th , 2012.

VOLOVA, Tatiana G. et al. Synthesis of P (3HB-co-3HHx) copolymers containing high molar fraction of 3-hydroxyhexanoate monomer by *Cupriavidus eutrophus* B10646. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 416-425, 2016.

Wei, Yu-Hong et al. Screening and Evaluation of Polyhydroxybutyrate- Producing Strains from Indigenous Isolate Cupriavidustaiwanensis Strains. **Int journal of Mol Scie.** 2011;V.12,p.

WEIMBERG, R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. J Biol Chem, v. 236, p. 629-635, Mar 1961. ISSN 0021- 9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783864> >.

WEN, Qinxue et al. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p. 1602-1607, 2010.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. New York: Oxford Univerty Press, 3^a ed., 2007. 628 p.

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

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

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.

YOGESH S. et al. Effect of pH and Temperature on Synthesis of Polyhdydroxyalkanoates from Dairy Waste Water. **International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)**, v. 3, p. 1081-1086,2014.

ZHANG, Mengxiao et al. Modification of acetoacetyl-CoA reduction step in *Ralstonia eutropha* for biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from structurally unrelated compounds. **Microbial cell factories**, v. 18, n. 1, p. 147, 2019.

ZHOU, H. et al. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, n. 6, p. 611-622, 2012. ISSN 1096-7176.

APÊNDICE A-

Tabelas de dosagens de substratos iniciais e finais de experimentos em frascos agitados.

Primeiro bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* em MM limitado em nitrogênio e excesso de Xilose e fornecimento de 1 (g.L⁻¹) ácido hexanoico. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Tabela A.1: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o primeiro bloco de experimentos.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	Xilose g/L	Ácido Hexanoico g/L
<i>B. sacchari</i> LFM 101 Xilose+ Ácido hexanoico	0	18,30 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	24	4,25 ± 0,3	0,214 ± 0,1
	72	0,09 ± 0,2	0,09 ± 0,1
<i>B. sacchari</i> LFM 344 Xilose+ Ácido hexanoico	0	12,85 ± 2,2	0,0 ± 0,0
	24	7,21 ± 0,2	0,71 ± 0,8
	72	1,51 ± 0,4	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1034 <i>phaPCJ</i> Asp Xilose+ Ácido hexanoico	0	12,6 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	24	5,64 ± 0,8	0,23 ± 0,1
	72	0,34 ± 0,2	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1038 <i>phaPCA</i> h Xilose+ Ácido hexanoico	0	11,9 ± 2,0	0,0 ± 0,0
	24	4,94 ± 1,3	0,22 ± 0,1
	72	0,11 ± 0,1	0,0 ± 0,0

Segundo bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. sacchari* LFM em MM limitado em nitrogênio e excesso de Xilose e fornecimento de 1 (g.L⁻¹) de ácido hexanoico. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Tabela A.2: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o segundo bloco de experimentos.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	Xilose g/L	Ácido Hexanoico g/L
<i>B. sacchari</i> LFM 101 Xilose+ Ácido hexanoico	0	16,8 ± 0,1	-
	24	4,09 ± 0,1	1,462 ± 0,4
	72	0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 344 Xilose+ Ácido hexanoico	0	16,5 ± 0,0	-
	24	7,76 ± 0,3	1,477 ± 0,4
	72	1,6 ± 0,3	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1037 <i>phaCIAh</i> Xilose+ Ácido hexanoico	0	16,83 ± 0,3	-
	24	5,36 ± 0,3	1,313 ± 0,3
	72	0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1035 <i>phaCAh</i> Xilose+ Ácido hexanoico	0	16,6 ± 0,3	-
	24	11,01 ± 0,3	1,324 ± 0,3
	72	0,58 ± 0,1	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1036 <i>phaIAh</i> Xilose+ Ácido hexanoico	0	16,48 ± 0,2	-
	24	5,07 ± 0,1	1,086 ± 0,2
	72	0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Terceiro bloco de experimentos bloco de experimentos para acúmulo de PHA por linhagens recombinantes de *B. saccharium* MM limitado em nitrogênio e excesso de Xilose e fornecimento de 1 (g.L⁻¹) de ácido hexanoico. Os valores correspondem à média das análises e seu respectivo desvio padrão.

Tabela A.3: Dosagem das fontes de carbono fornecidas durante o terceiro bloco de experimentos.

Linhagem/ condições de cultivo	Tempo (h)	Xilose g/L	Ácido Hexanoico g/L
<i>B. sacchari</i> LFM 101 Xilose+ Ácido hexanoico	0	18,96 ± 0,3	-
	24	9,47 ± 0,7	1,741 ± 0,0
	72	0,52 ± 0,4	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 344 Xilose+ Ácido hexanoico	0	19,55 ± 0,0	-
	24	12,41 ± 0,3	1,468 ± 0,2
	72	5,10 ± 0,3	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1034 <i>phaPCJAsp</i> Xilose+Ácido hexanoico	0	19,66 ± 0,3	-
	24	12,05 ± 0,4	1,358 ± 0,4
	72	0,93 ± 0,7	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1038 <i>phaPCAh</i> Xilose+Ácido hexanoico	0	19,21 ± 0,2	-
	24	12,34 ± 0,3	1,356 ± 0,3
	72	2,21 ± 0,3	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1037 <i>phaCIAh</i> Xilose+Ácido hexanoico	0	20,23 ± 1,6	-
	24	11,29 ± 0,2	1,363 ± 0,0
	72	1,27 ± 0,2	0,0 ± 0,0
<i>B. sacchari</i> LFM 1039 <i>pha Plasmideo</i> <i>Vazio Asp</i> Xilose+ Ácido hexanoico	0	19,06 ± 0,3	-
	24	13,67 ± 0,2	1,498 ±
	72	4,92 ± 0,8	0,0 ± 0,0

APÊNDICE B-

Gráficos utilizados para determinar os parâmetros experimentais dos ensaios em biorreatores A00-A12

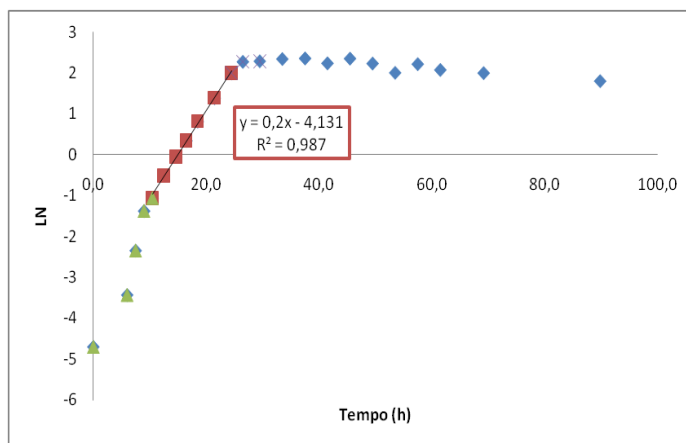


Figura A.1: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) do experimento A00.

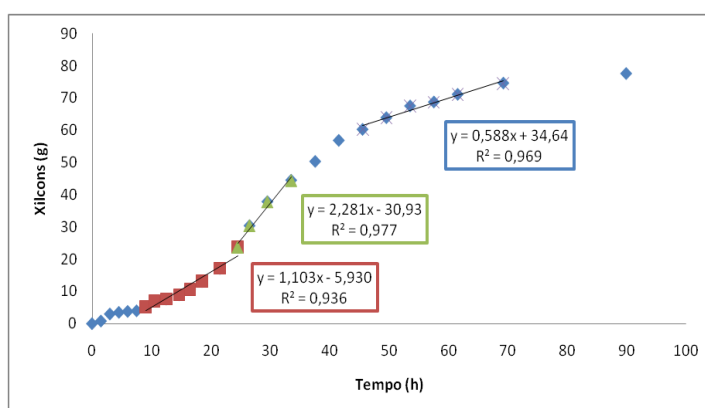


Figura A.2: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A00. Biomassa residual (X_r) considerada: 9,8 g.

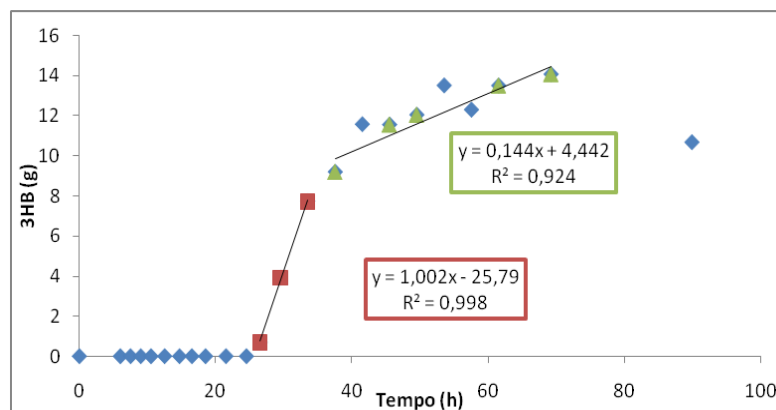


Figura A.3: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A00. Biomassa residual (X_r) considerada: 9,8 g.

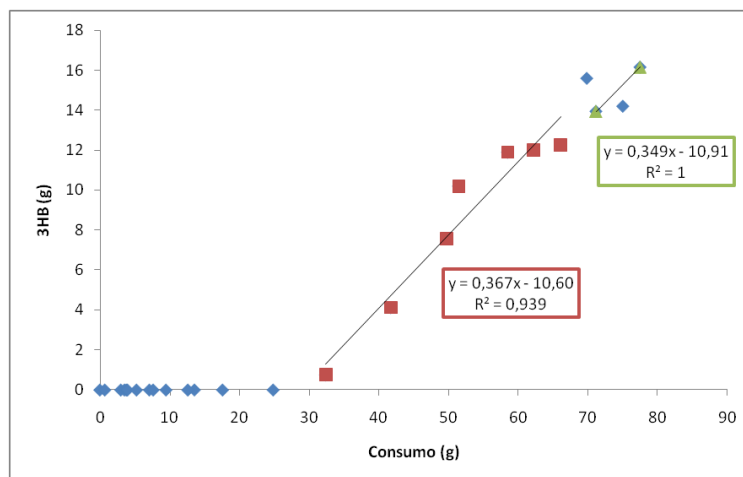


Figura A.4: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A00.

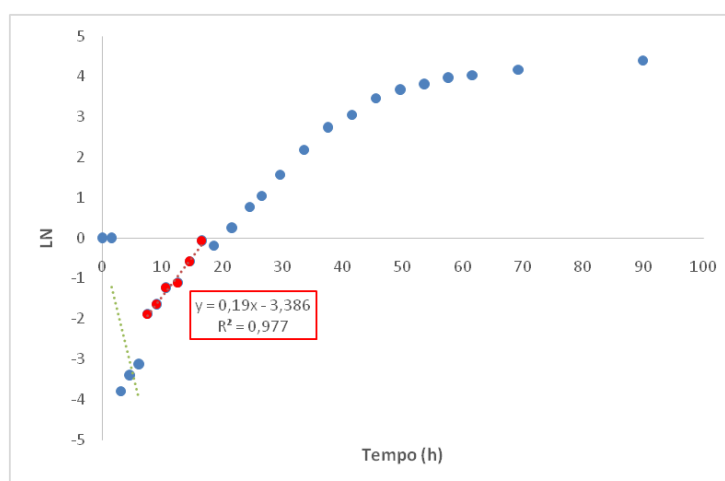


Figura A.5: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max}) do experimento A01.

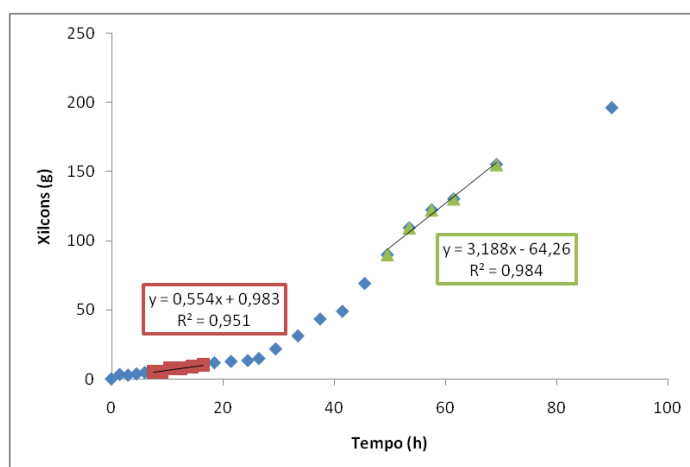


Figura A.6: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A01. Biomassa residual (X_r) considerada: 29,7 g.

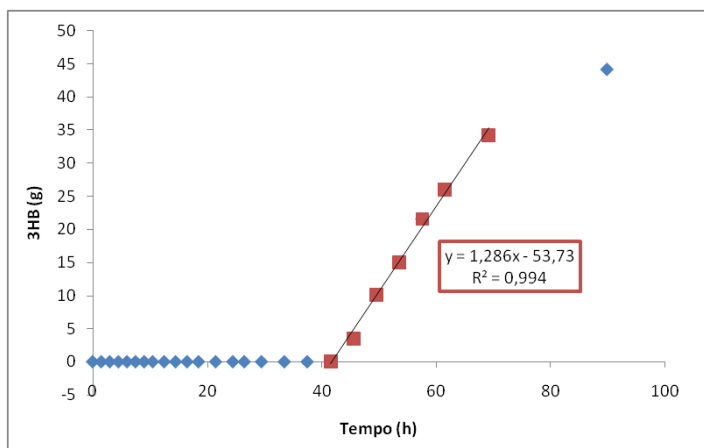


Figura A.7: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A01. Biomassa residual (X_r) considerada: 29,7 g.

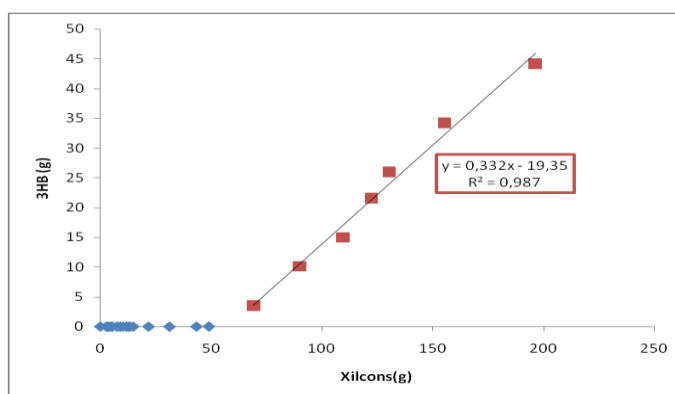


Figura A.8: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A01.

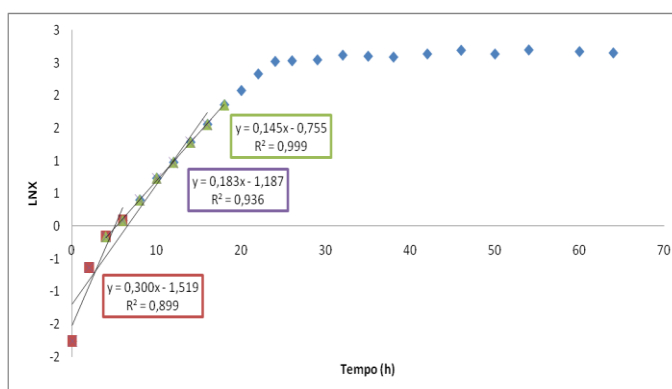


Figura A.9: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A02.

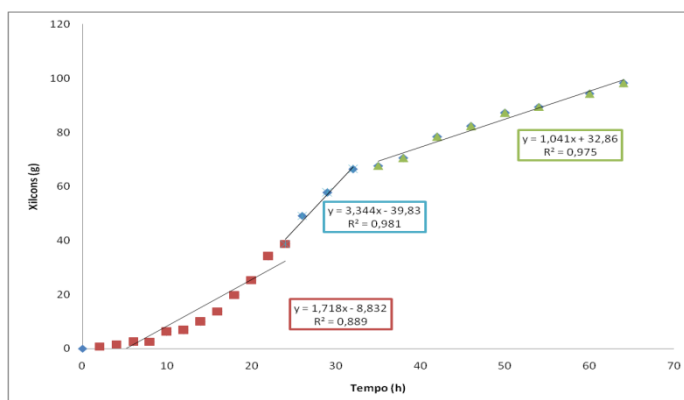


Figura A.10: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A02. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,8 g.

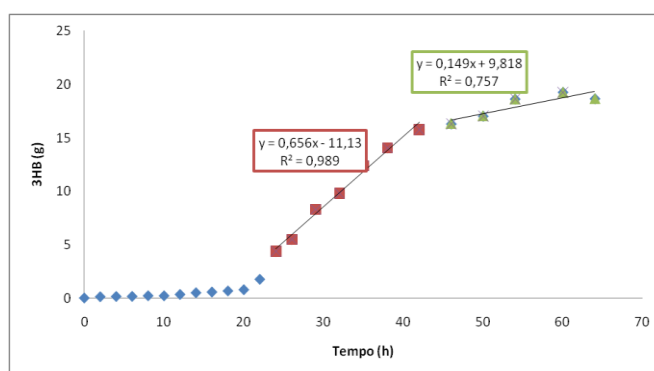


Figura A.11: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A02. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,8 g.

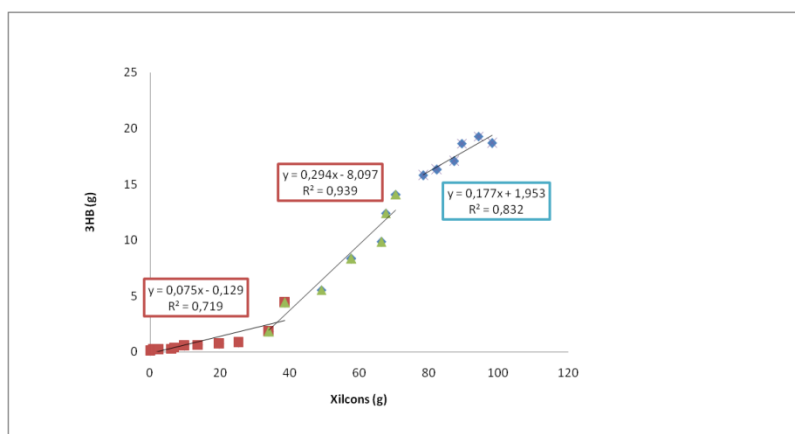


Figura A.12: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A02.

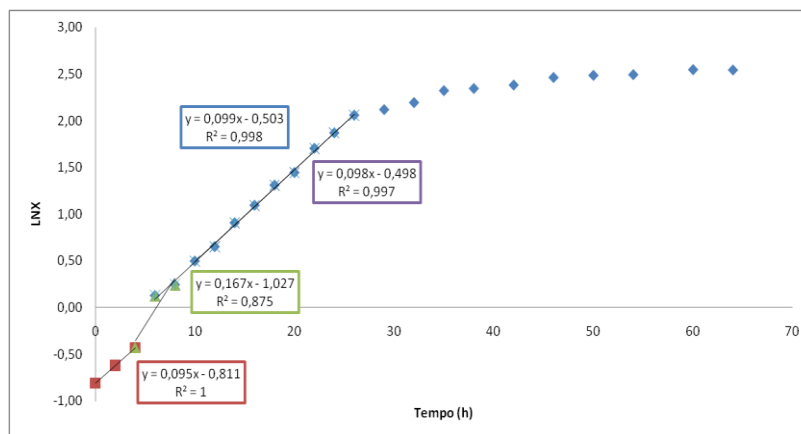


Figura A.13: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxX}) do experimento A03.

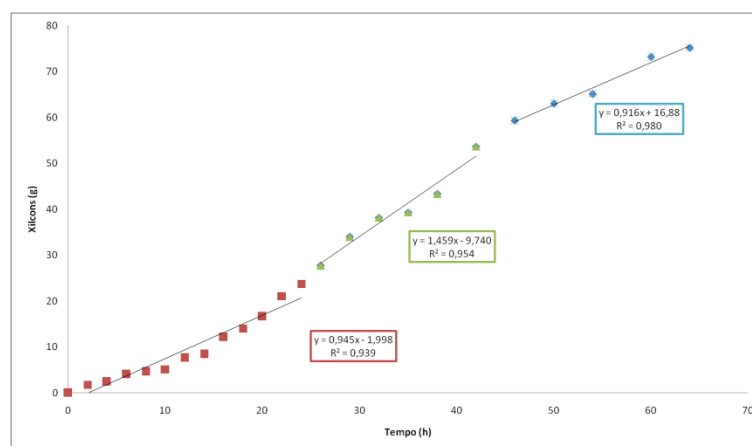


Figura A.14: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A03. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.

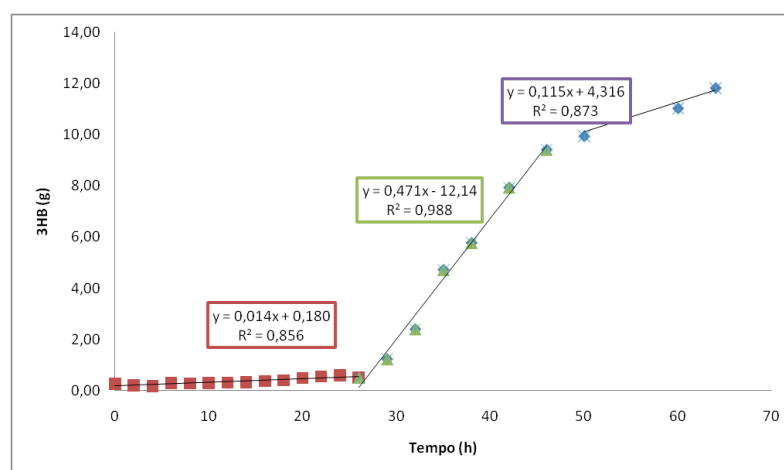


Figura A.15: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A03. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g. .

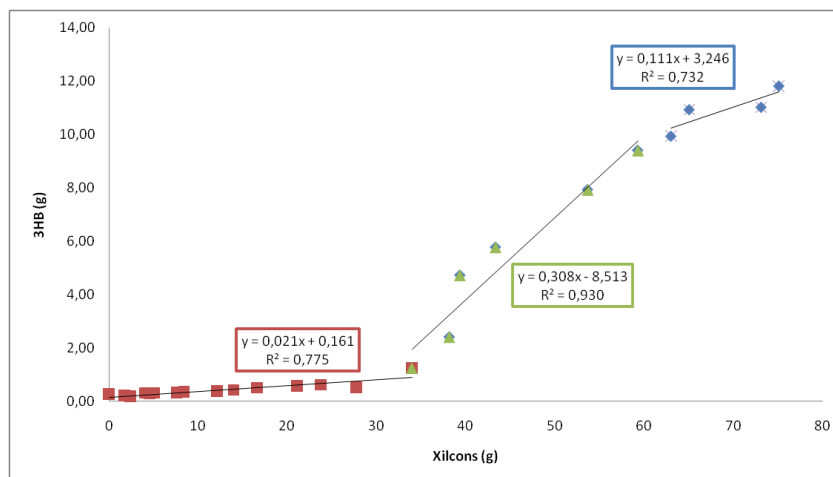


Figura A.16: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xii}$) do experimento A03

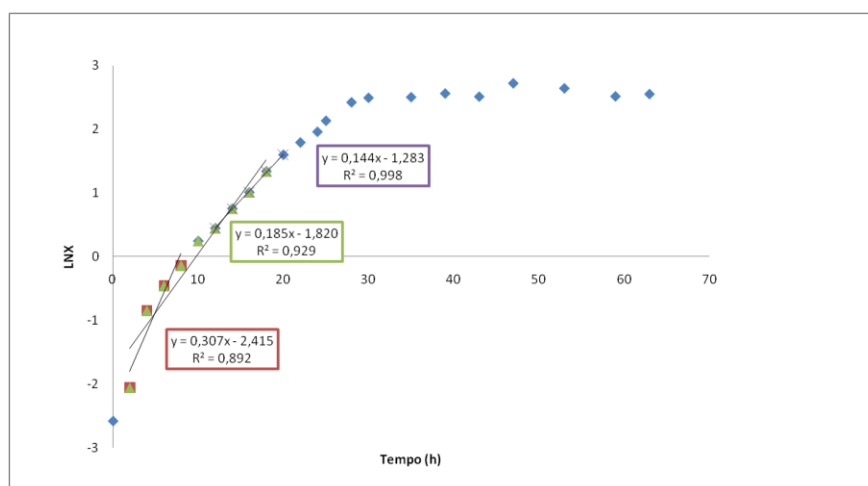


Figura A.17: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxx}) do experimento A04.

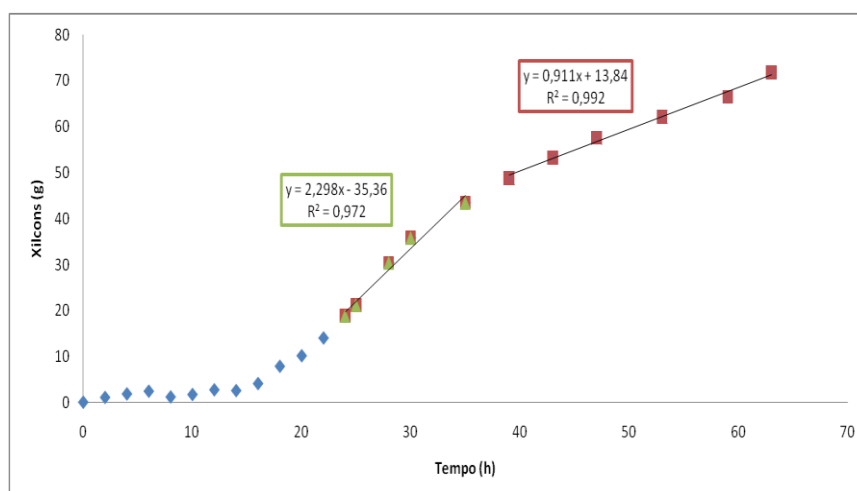


Figura A.18: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xii}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.

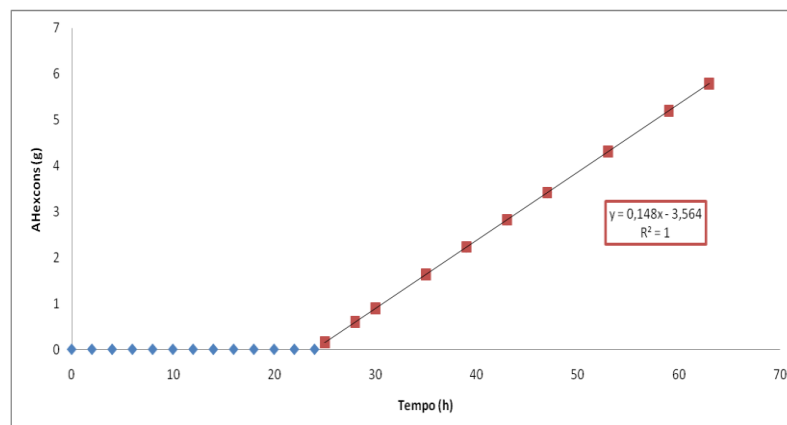


Figura A.19: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.

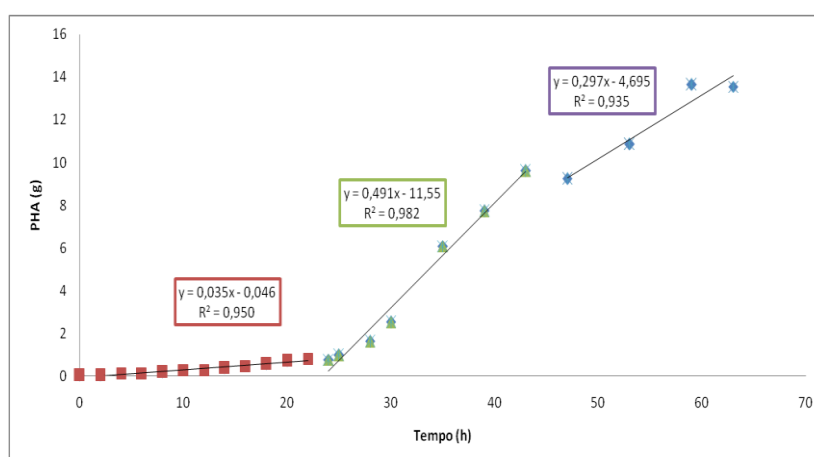


Figura A.20: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.

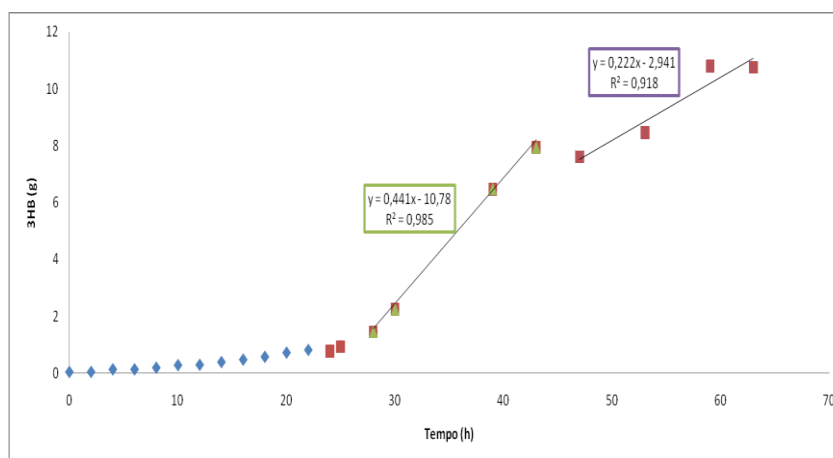


Figura A.21: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.

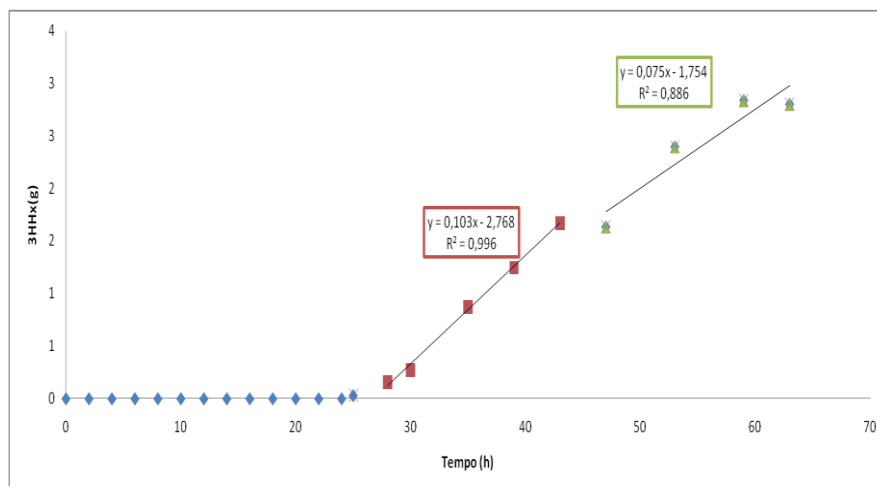


Figura A.22: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A04. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,8 g.

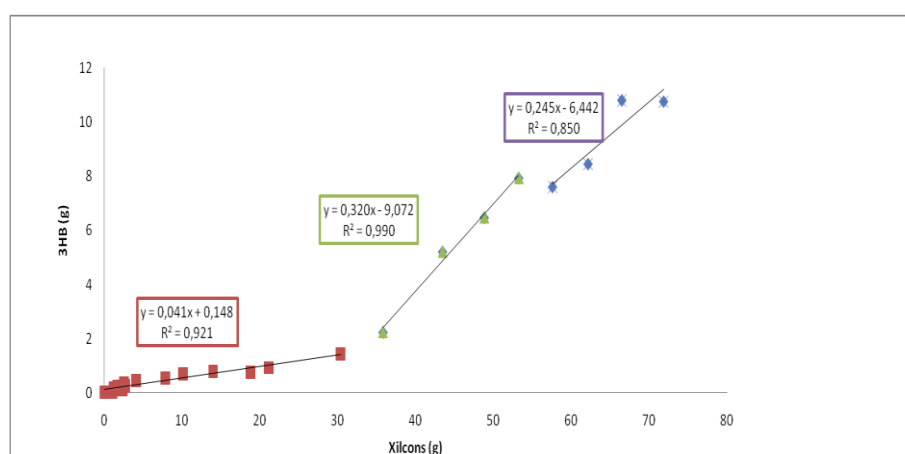


Figura A.23: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A04.

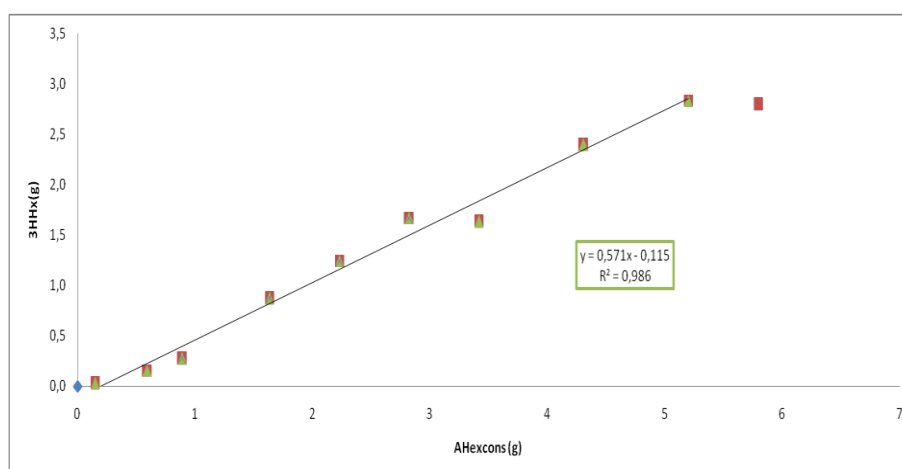


Figura A.24: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A04.

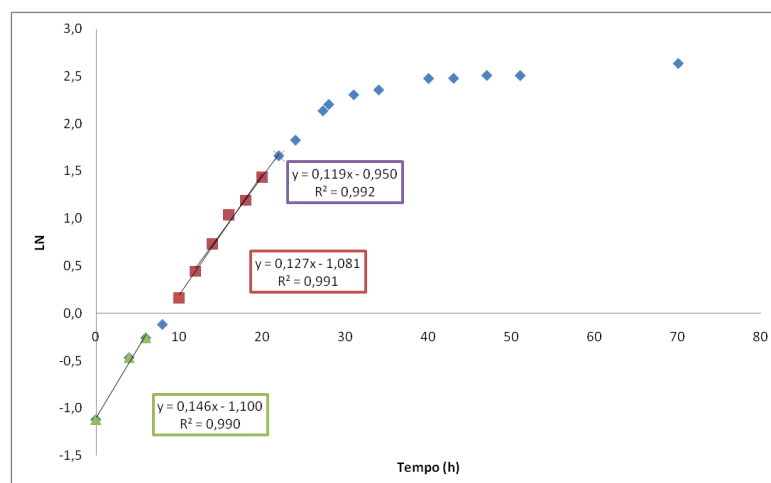


Figura A.25: Determinação da velocidade máxima específica de crescimento (μ_{maxx}) do experimento B05.

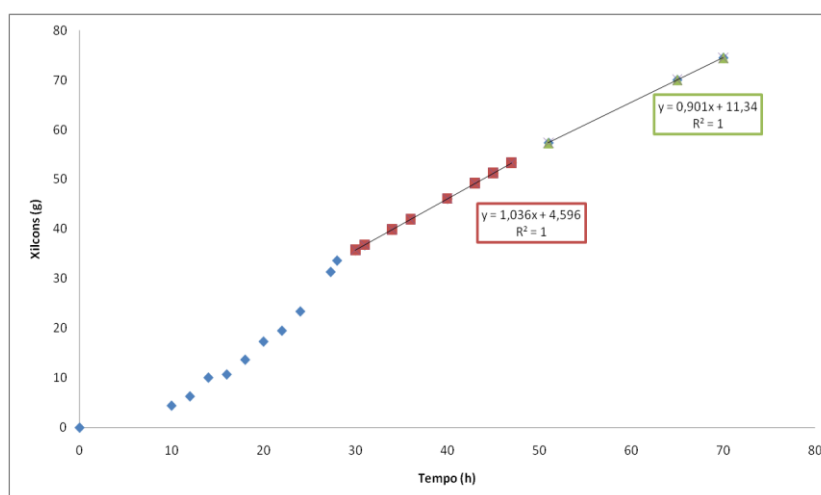


Figura A.26: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento B05. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.

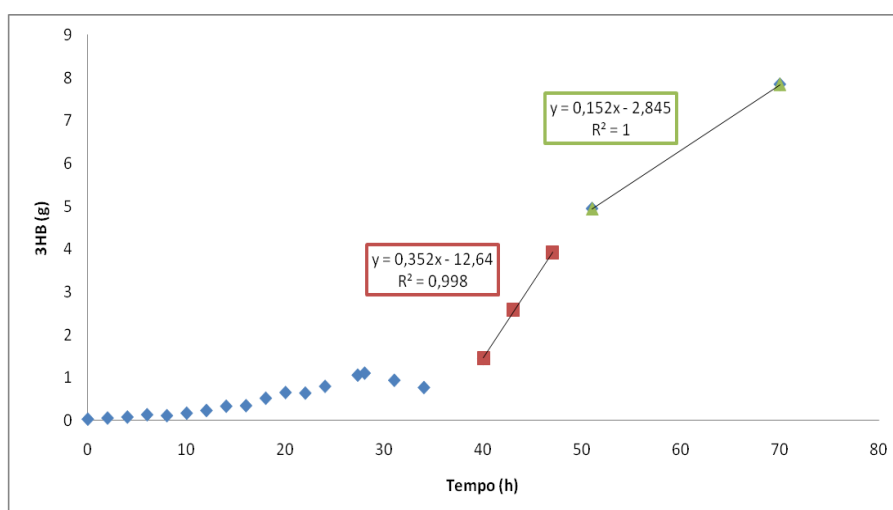


Figura A.27: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento B05. Biomassa residual (X_r) considerada: 11,8 g.

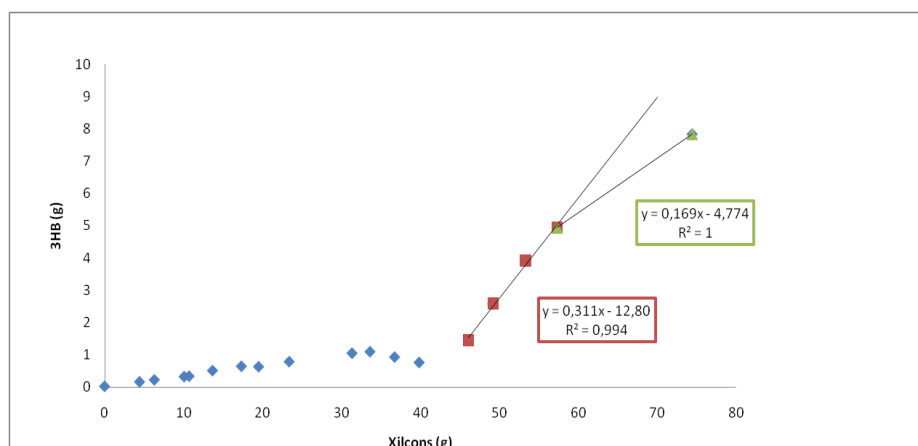


Figura A.28: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento B05.

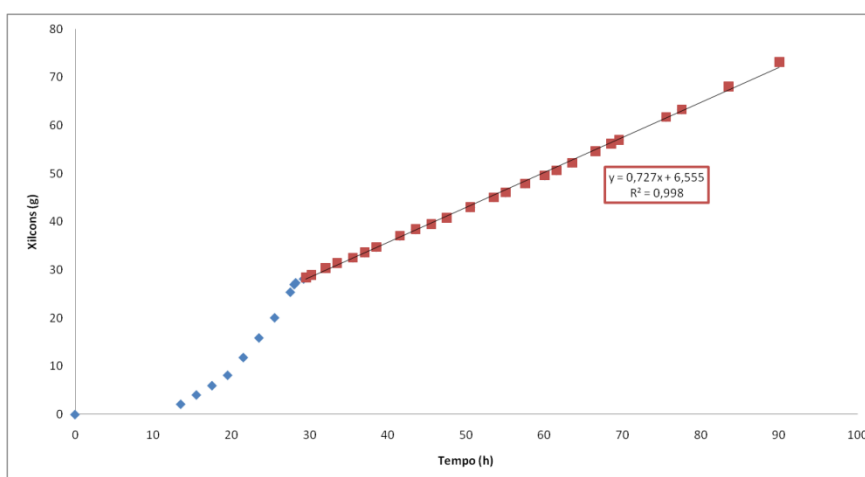


Figura A.29: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A06REP. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,6 g.

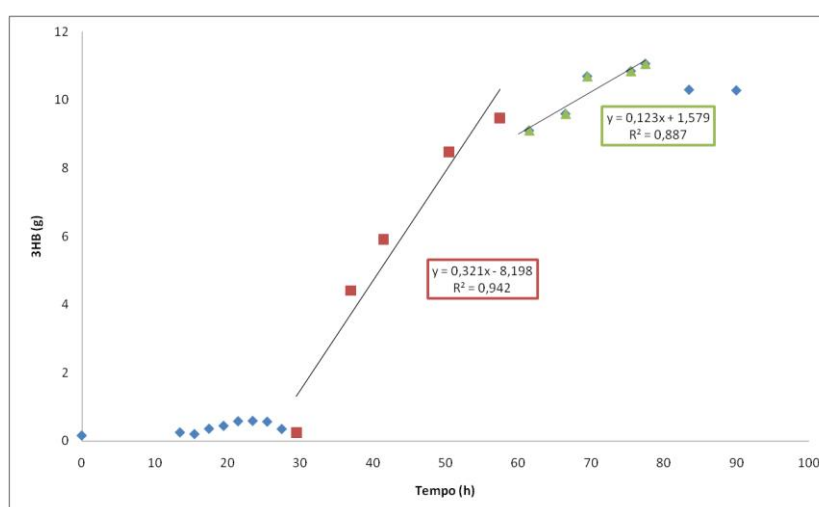


Figura A.30: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A06REP. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,6 g.

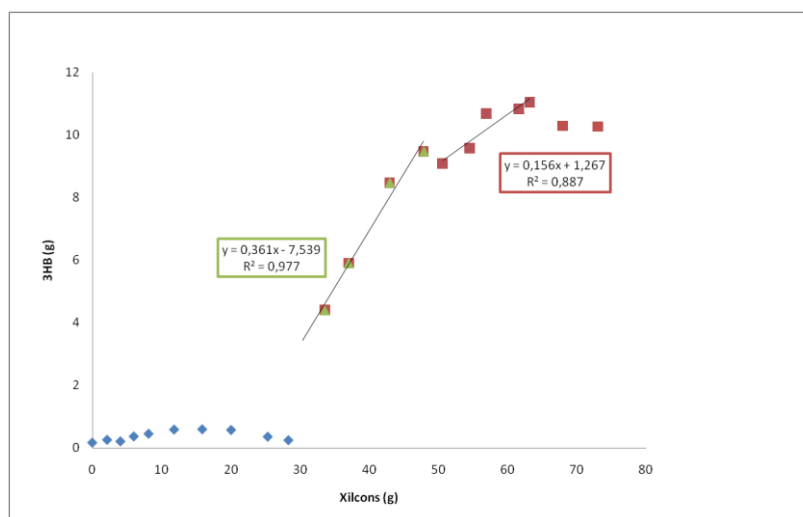


Figura A.31: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A06REP.

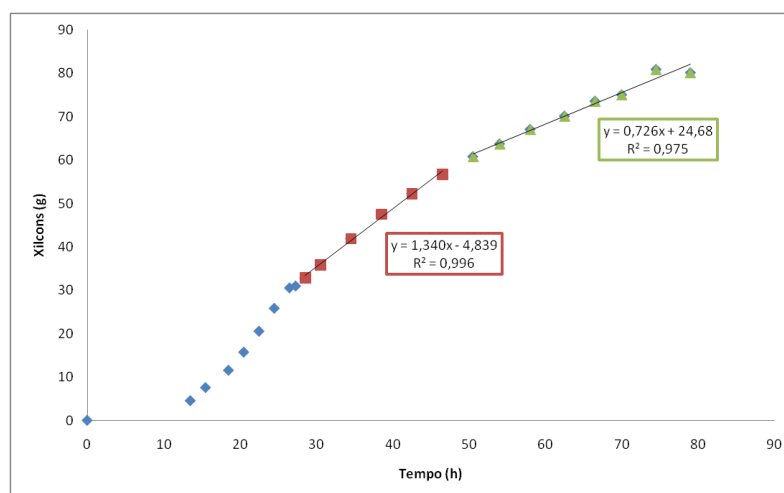


Figura A.32: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.

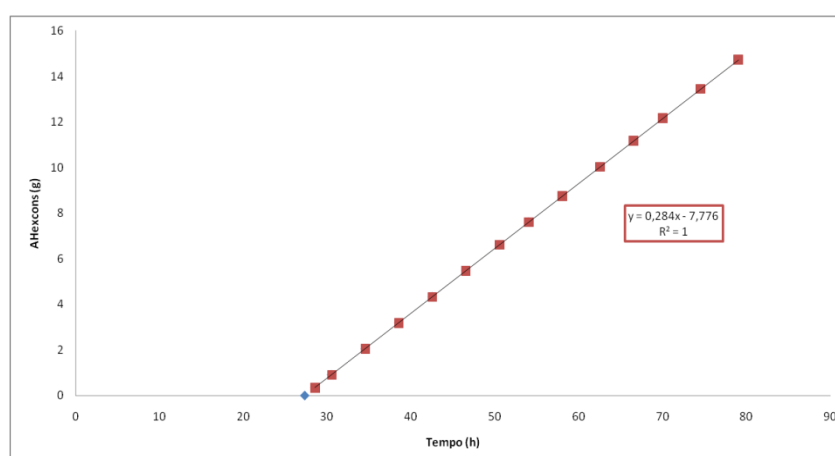


Figura A.33: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.

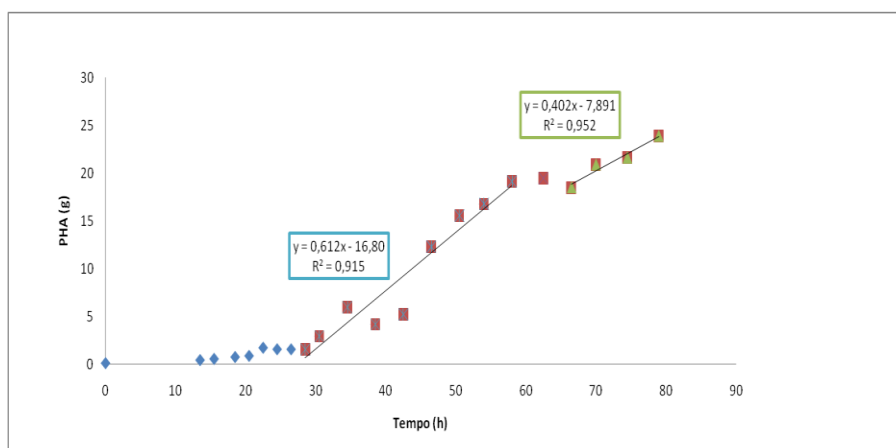


Figura A.34: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.

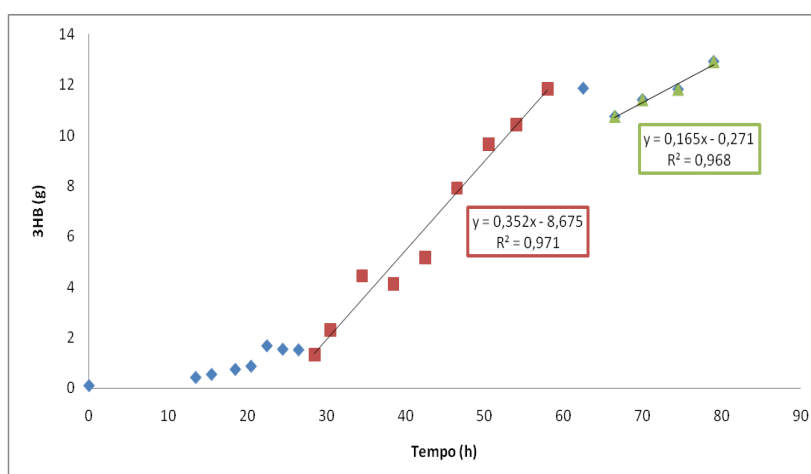


Figura A.35: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.

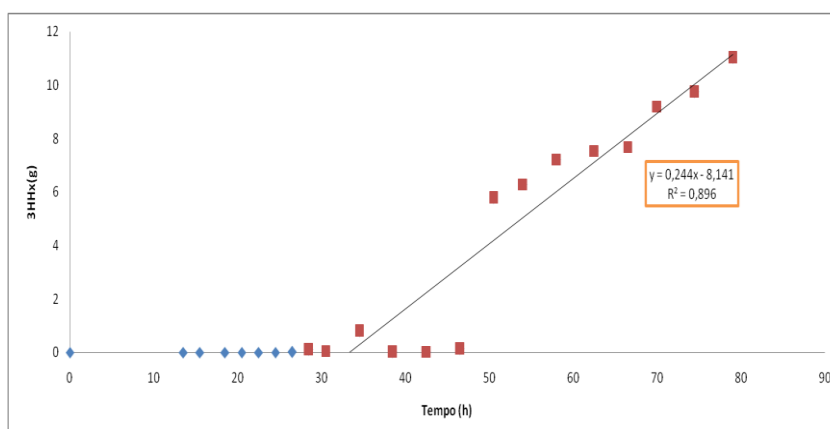


Figura A.36: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A07. Biomassa residual (X_r) considerada: 14,1 g.

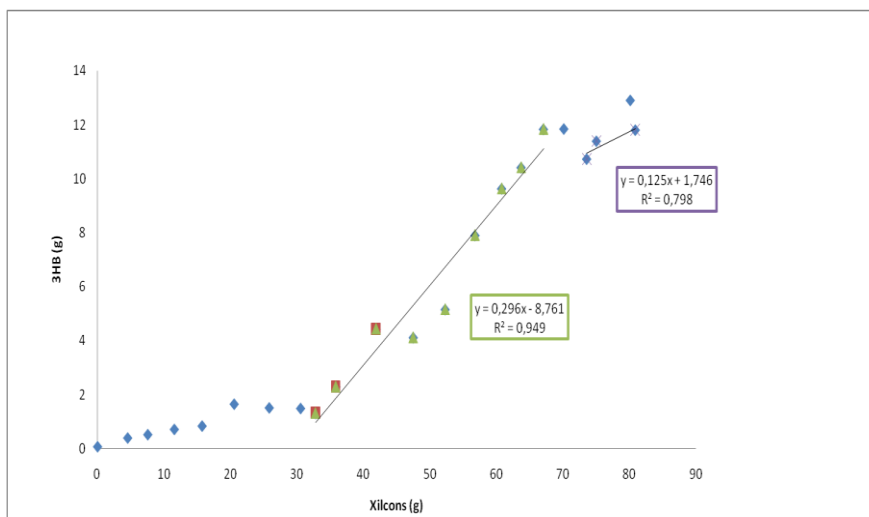


Figura A.37: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A07.

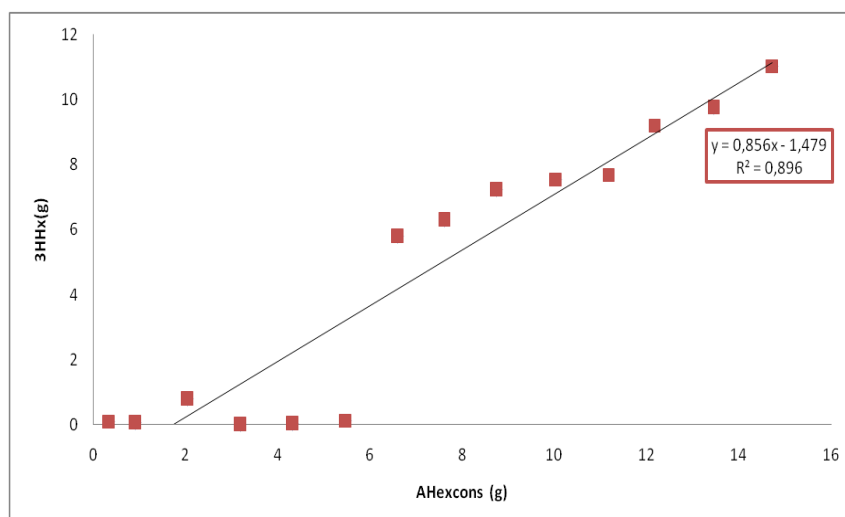


Figura A.38: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A07.

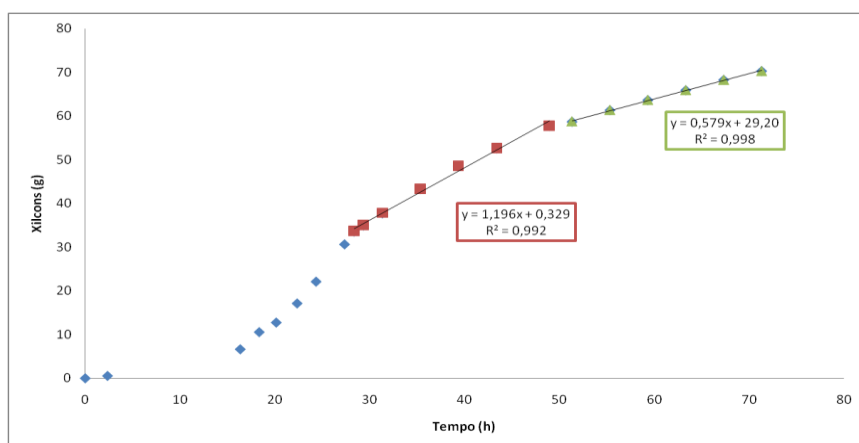


Figura A.39: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

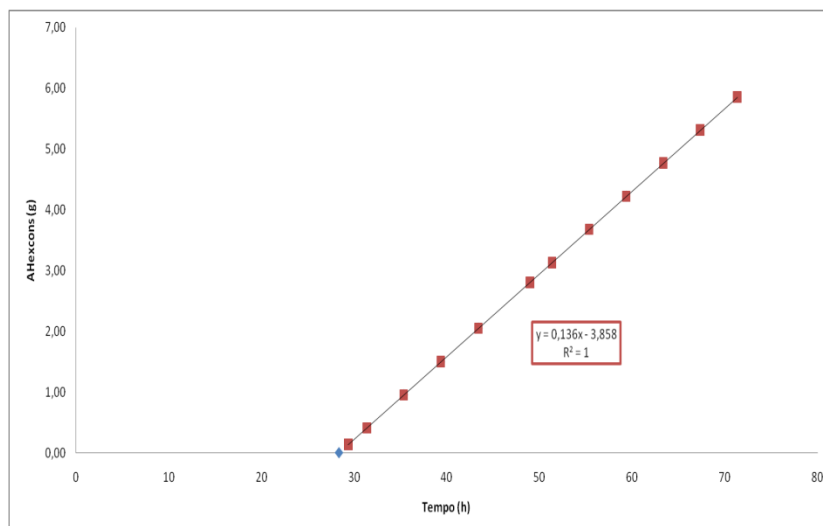


Figura A.40: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

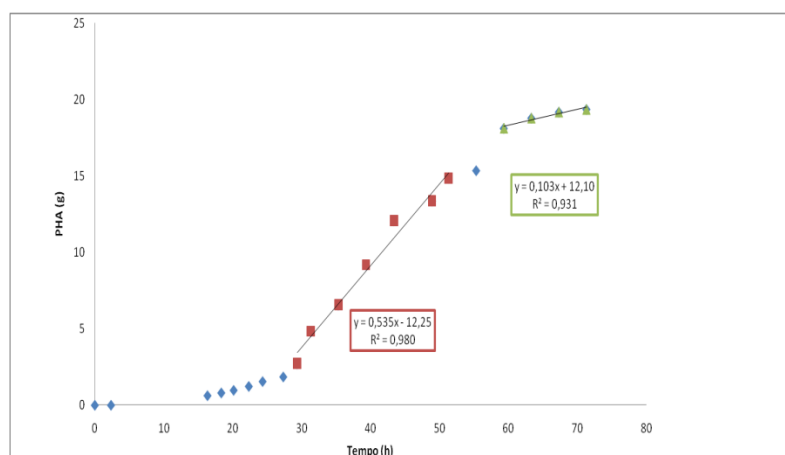


Figura A.41: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

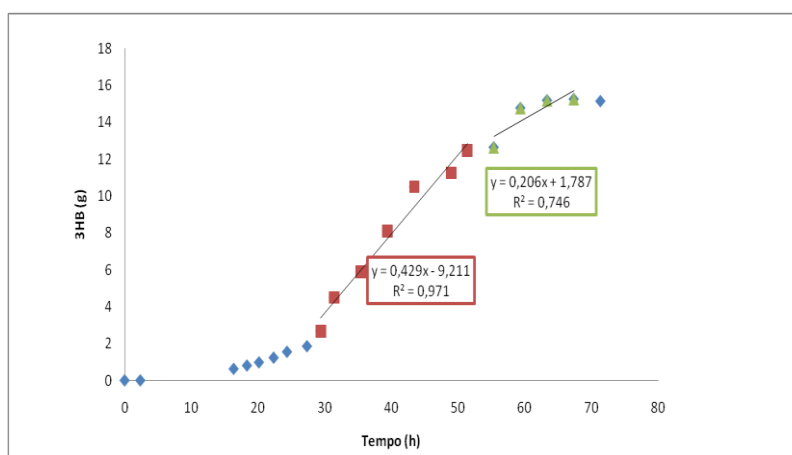


Figura A.42: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

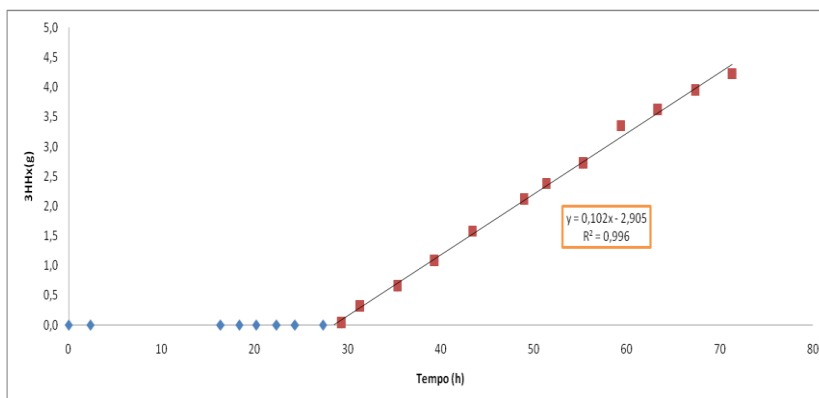


Figura A.43: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A09. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

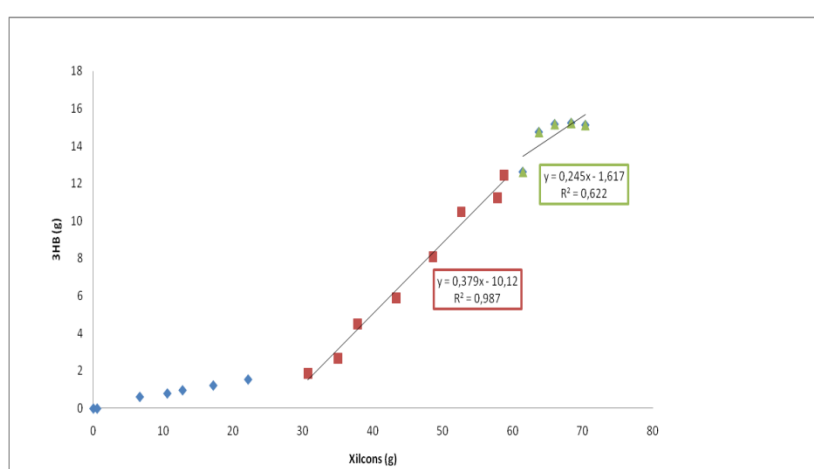


Figura A.44: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A09.

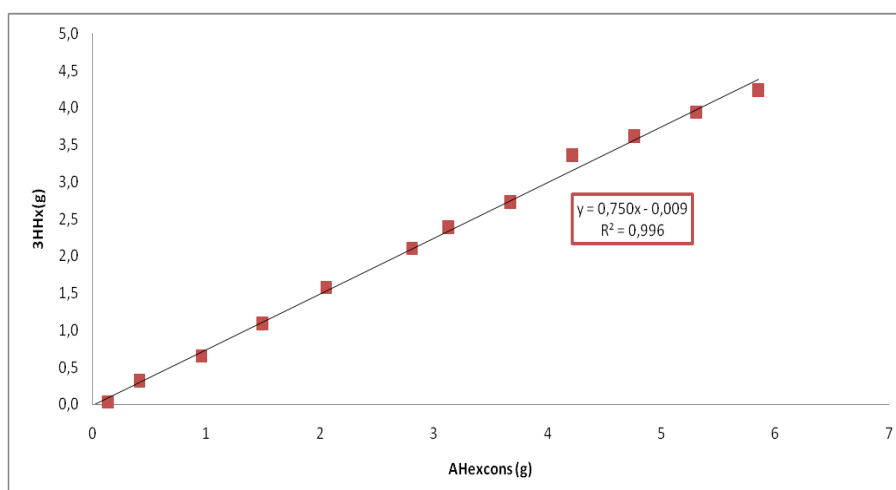


Figura A.45: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A09.

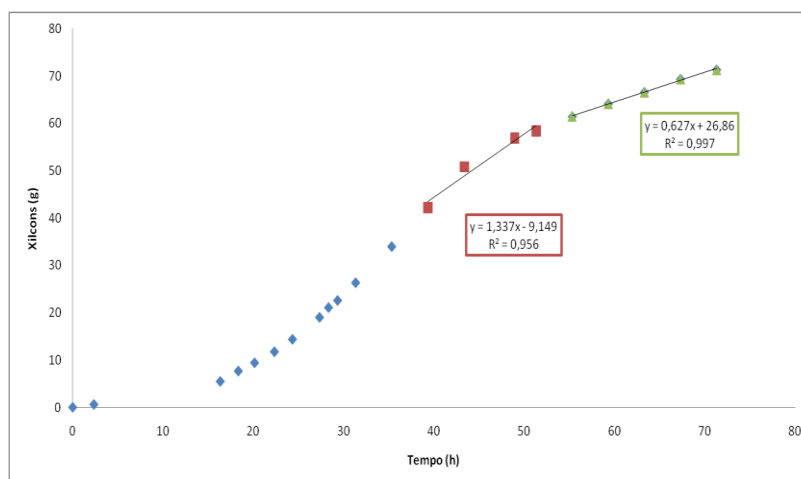


Figura A.46: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

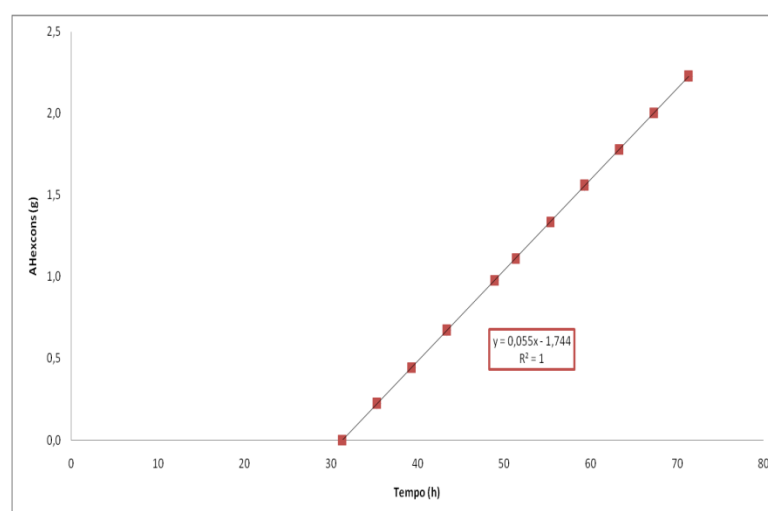


Figura A.47: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

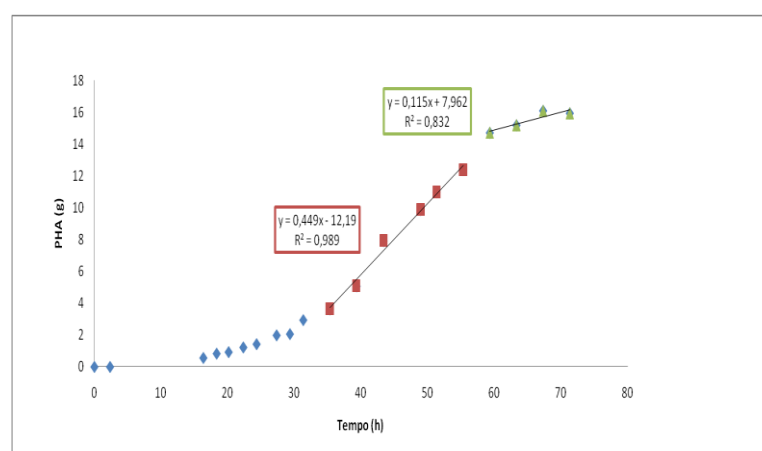


Figura A.48: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

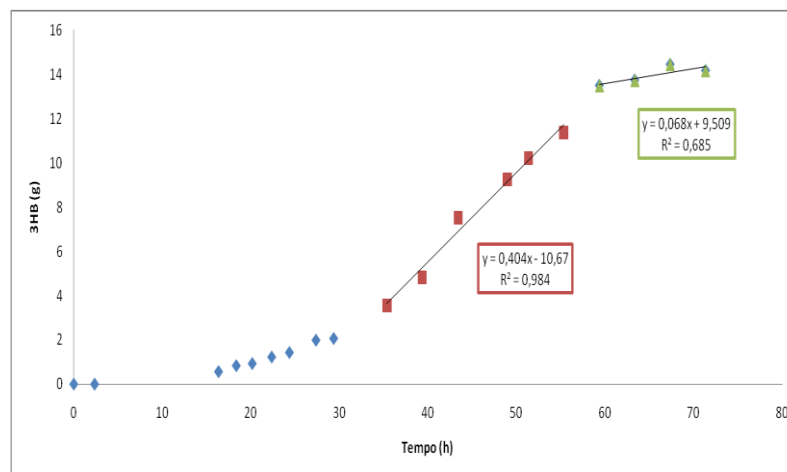


Figura A.49: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

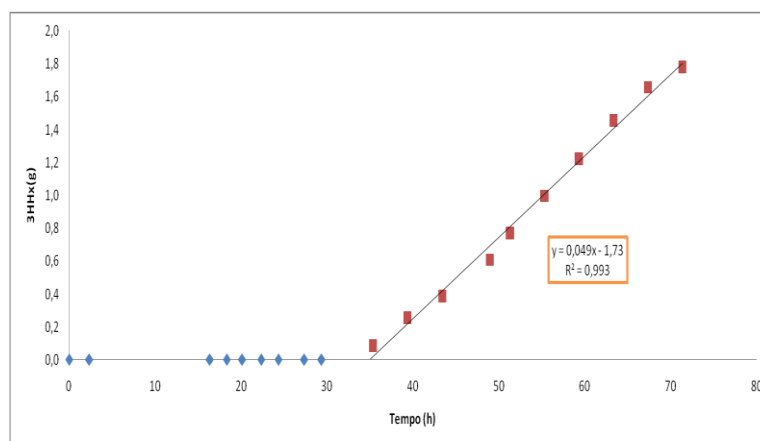


Figura A.50: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A10. Biomassa residual (X_r) considerada: 12,6 g.

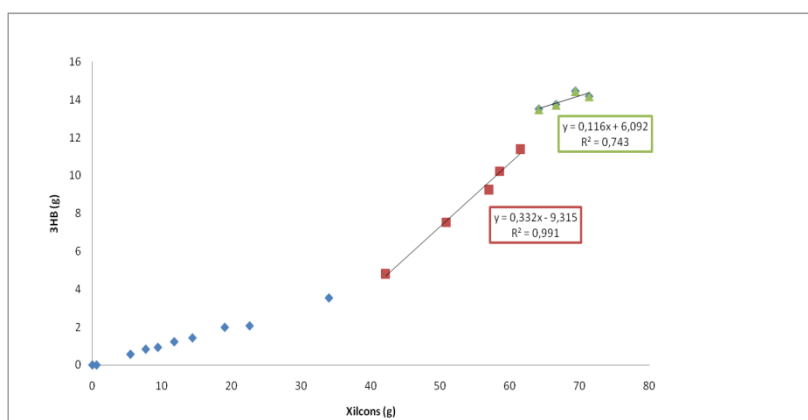


Figura A.51: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{=3HB/xil}$) do experimento A10.

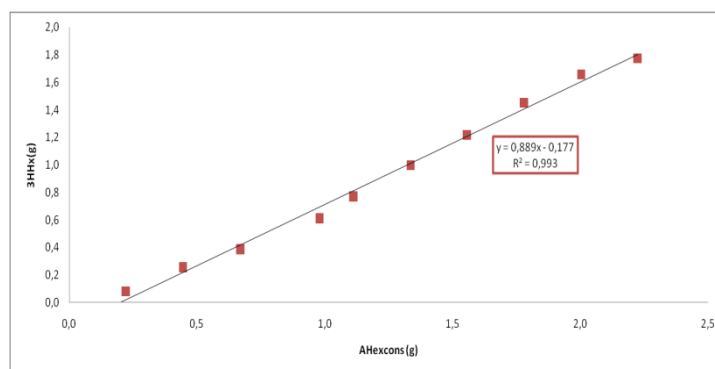


Figura A.52: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A10.

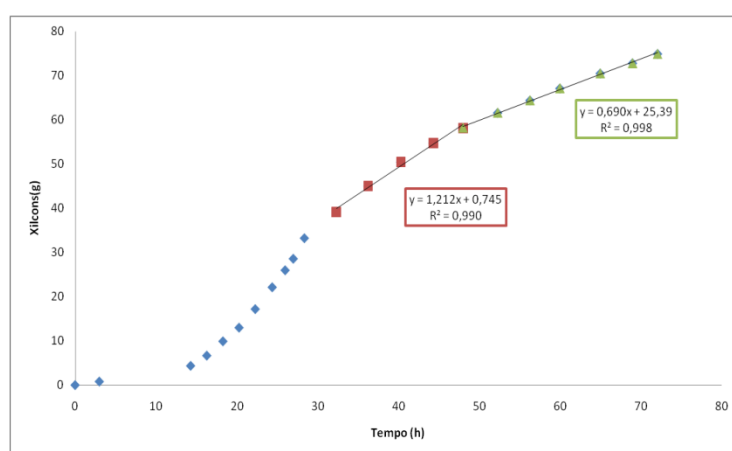


Figura A.53: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{xil}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.

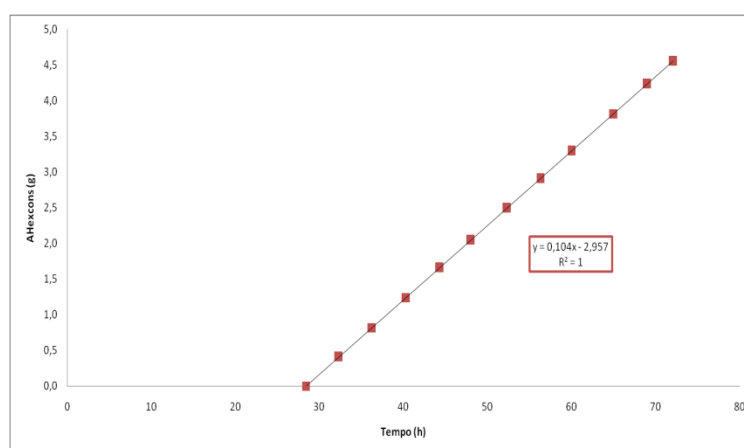


Figura A.54: Avaliação do perfil de consumo de ácido hexanóico para determinação da velocidade específica de consumo de ácido hexanóico (μ_{AHex}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.

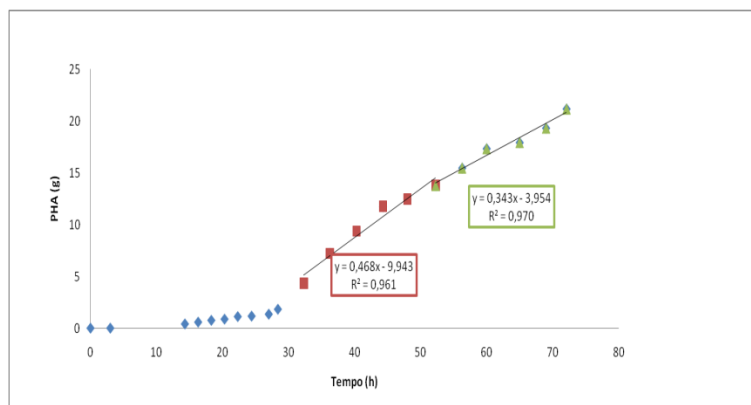


Figura A.55: Avaliação do perfil de produção de copolímero 3HB-co-3HHx para determinação da velocidade específica de produção de PHA (μ_{PHA}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.

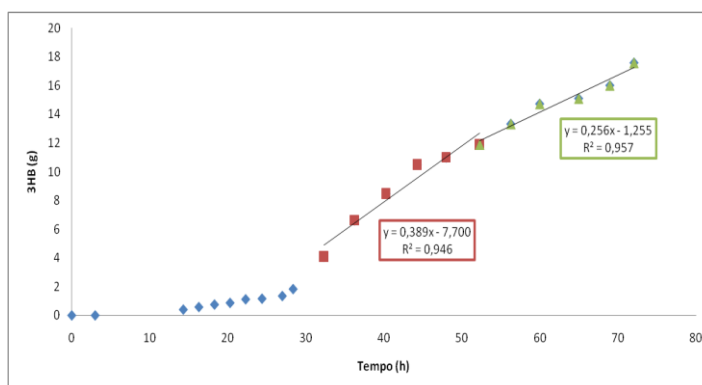


Figura A.56: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.

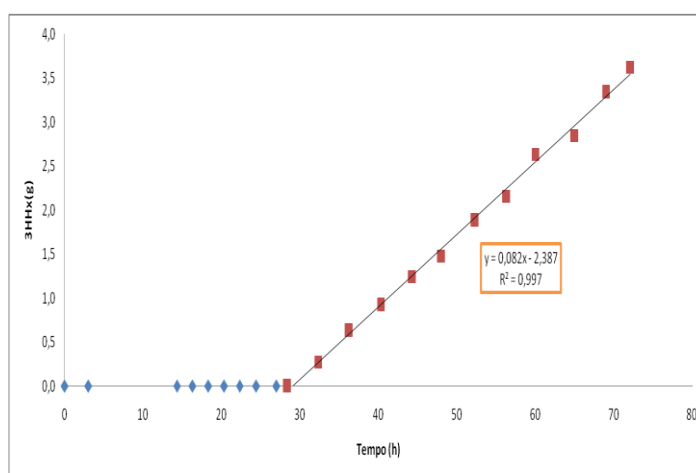


Figura A.57: Avaliação do perfil de produção de 3HHx para determinação da velocidade específica de produção de 3HHx (μ_{3HHx}) do experimento A11. Biomassa residual (X_r) considerada: 13 g.

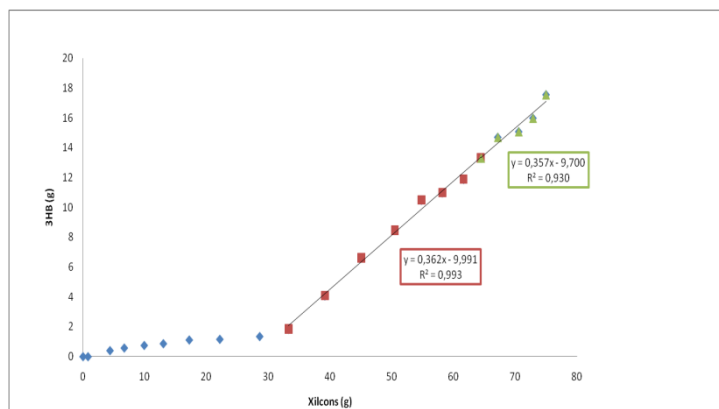


Figura A.58: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/Xil}$) do experimento A11.

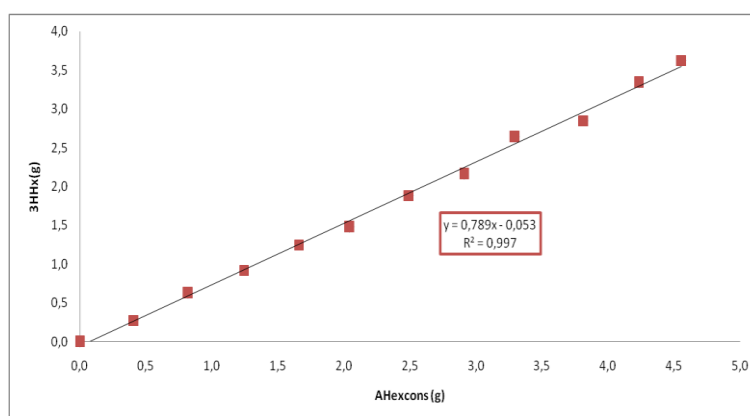


Figura A.59: Determinação dos fatores de conversão de ácido hexanóico em monômeros de 3HHx ($Y_{3HHx/AHex}$) do experimento A11.

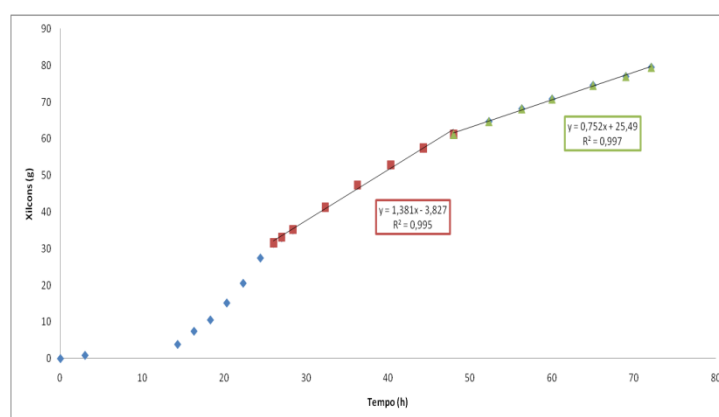


Figura A.60: Avaliação do perfil de consumo de xilose para determinação da velocidade específica de consumo de xilose (μ_{Xil}) do experimento A12. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,5 g.

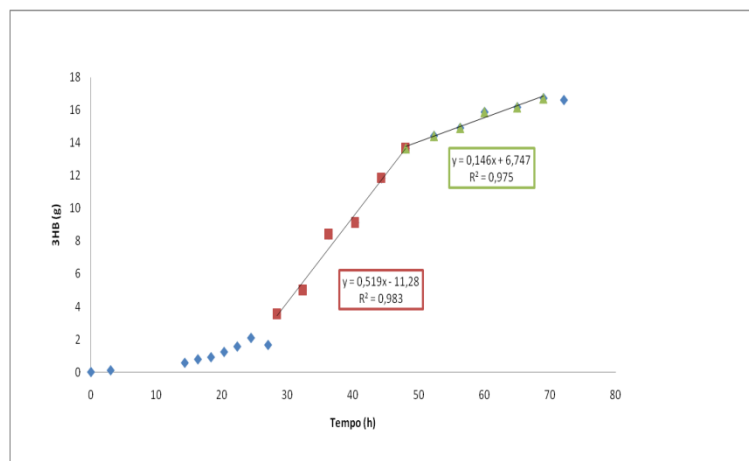


Figura A.61: Avaliação do perfil de produção de 3HB para determinação da velocidade específica de produção de 3HB (μ_{3HB}) do experimento A12. Biomassa residual (X_r) considerada: 13,5 g.

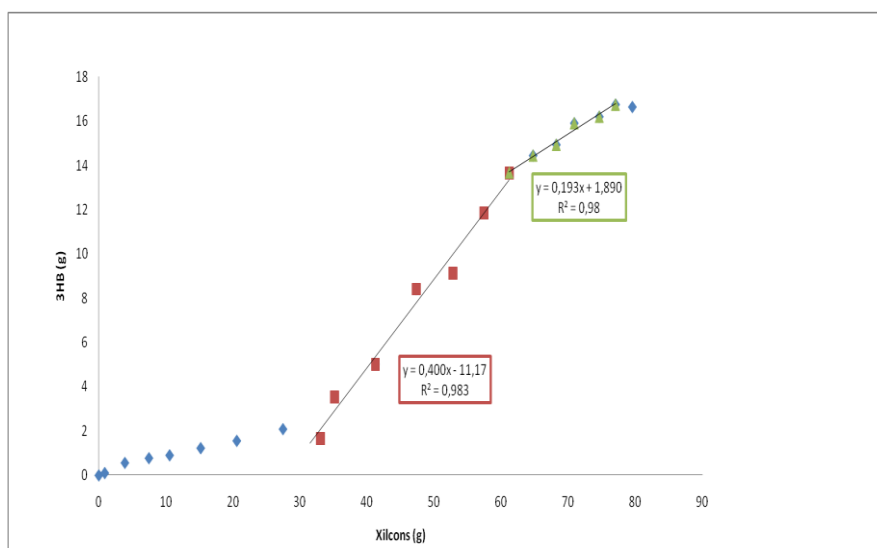


Figura A.62: Determinação dos fatores de conversão de xilose em monômeros de 3HB ($Y_{3HB/xil}$) do experimento A12.

APÊNDICE C-

Arquivo de entrada para o arquivo Metatool.

```

# Biossíntese de 3HB-co-3HHx a partir de xilose e hexanoato.
# considera vias ED, PPP, CK, Glioxilato, anapleróticas e respiração
aeróbia de coenzimas Considerando phaJ como única saída b-oxidação para
PHA.
#
#
#
-ENZREV
EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10
-ENZIRREV
XIL1 XIL2 XIL3 ED1 ED2 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7
CK8 CGLX1 CGLX2 GLN3 AD1 AD2 3HB OXFAD OXNAD BOXI1 BOXI2 BOXI3 BOXI4
BOXI5 BOXI6 BOXI7 BOXI8 BOXI9 PHAJ1 PHAJ2 SDH PNTAB RCO2 R3HB RO
-METINT
XIL XLL G6P KDPG2 NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rb15P
Rb5P X5P S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX
FAD FADH2 NAD NADH CoASH HexCoA HexenCoA HHexCOA CHexCoA ButCoA
ButenCoA HButCoA CButCoA 3HB CO2 O
-METEXT
XILext Hexext Oext ADP ATP CO2ext 3HBext 3HHx
-CAT
XIL1 : XILext + ATP = XIL + ADP .
XIL2 : XIL = XLL .
XIL3 : XLL + ATP = X5P + ADP .
EMP2 : G6P = F6P .
VP1 : G6P + NADP = PG6 + NADPH .
ED1 : PG6 = KDPG2 .
ED2 : KDPG2 = PIR + G3P .
EMP4 : F16P = G3P + DHP .
EMP5 : DHP = G3P .
EMP6 : G3P + NAD = BPG13 + NADH .
EMP7 : BPG13 + ADP = PG3 + ATP .
EMP8 : PG3 = PG2 .
EMP9 : PG2 = PEP .
EMP10 : PEP + ADP = PIR + ATP .
CPD : PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO2 .
VP5 : PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO2 .
VP6 : Rb15P = Rb5P .
VP7 : Rb15P = X5P .
VP8 : Rb5P + X5P = S7P + G3P .
VP9 : G3P + S7P = E4P + F6P .
VP10 : X5P + E4P = F6P + G3P .
CK1 : OAA + AcCoA = Cit + CoASH .
CK2 : Cit = IsoCit .
CK3 : IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO2 .
CK4 : KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO2 .
CK5 : SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH .
CK6 : Suc + FAD = Fum + FADH2 .
CK7 : Fum = Mal .
CK8 : Mal + NAD = OAA + NADH .
CGLX1 : IsoCit = GLX + Suc .
CGLX2 : GLX + AcCoA = Mal + CoASH .
GLN3 : F16P = F6P .
AD1 : PIR + CO2 + ATP = OAA + ADP .

```

AD2 : OAA + ATP = PEP + ADP + CO2 .
3HB : 2 AcCoA + 1 NADPH = 3HB + 2 CoASH + 1 NADP
OXFAD : FADH2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP .
OXNAD : NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP .
BOXI1 : Hexext + 2 ATP + CoASH = HexCoA + 2 ADP .
BOXI2 : HexCoA + NAD = HexenCoA + NADH .
BOXI3 : HexenCoA = HHexCOA .
BOXI4 : HHexCOA + NAD = CHexCoA + NADH .
BOXI5 : CHexCoA + CoASH = ButCoA + AcCoA .
BOXI6 : ButCoA + NAD = ButenCoA + NADH .
BOXI7 : ButenCoA = HButCoA .
BOXI8 : HButCoA + NAD = CButCoA + NADH .
BOXI9 : CButCoA + CoASH = 2 AcCoA .
PHAJ1 : ButenCoA = 3HB + CoASH .
PHAJ2 : HexenCoA = 3HHx + CoASH .
SDH : NADPH + NAD = NADP + NADH .
PNTAB : NADH + ATP + NADP = NAD + ADP + NADPH .
RCO2 : CO2 = CO2ext .
R3HB : 3HB = 3HBext .
RO : Oext = 0 .

APÊNDICE D-

Agrupamentos de modos elementares em famílias. Cada cor representa uma família.

Famílias de xilose

ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
31	0	1	2.5	1.666667	0.833333	0
41	0	1	2.5	1.666667	0.833333	0
42	0	1	2.5	1.666667	0.833333	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
48	0	1	2.636367	1.727275	0.818183	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
47	0	1	3.000008	1.888894	0.777778	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
36	0	1	3.250006	2.000008	0.750002	0
49	0	1	3.250006	2.000008	0.750002	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
44	0	1	4	2.333333	0.666667	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
26	0	1	5.5	3	0.5	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
23	0	1	10	5	0	0
29	0	1	10	5	0	0
30	0	1	10	5	0	0
34	0	1	10	5	0	0
35	0	1	10	5	0	0
39	0	1	10	5	0	0
40	0	1	10	5	0	0
43	0	1	10	5	0	0
45	0	1	10	5	0	0
46	0	1	10	5	0	0
52	0	1	10	5	0	0
53	0	1	10	5	0	0
54	0	1	10	5	0	0

Familias de ácido hexanoico

ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
2	1	0	1	0	0	1
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
3	1	0	2.5	0	1.5	0
4	1	0	2.5	0	1.5	0
17	1	0	2.5	1.5	0	0
18	1	0	2.5	1.5	0	0
11	1	0	3.142857	0.285714	1.428571	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
7	1	0	4	0.666667	1.333333	0
21	1	0	4	0.666667	1.333333	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
12	1	0	4.428562	0.85714	1.285711	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
5	1	0	7	2	1	0
8	1	0	7	2	1	0
9	1	0	7	2	1	0
14	1	0	7	2	1	0
19	1	0	7	2	1	0
22	1	0	7	2	1	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
6	1	0	16	6	0	0
10	1	0	16	6	0	0
15	1	0	16	6	0	0
20	1	0	16	6	0	0

Familias de Xilose e ácido hexanóico

ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
33	0.555556	1	3.888889	1.666667	1.666667	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
51	0.5	1	4.5	2	1.5	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
38	1.16667	1	6.16667	2	2.5	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
32	1.66667	1	6.66667	1.66667	3.33333	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
50	1.5	1	7	2	3	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
28	2.33333	1	11.3333	3	4	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
37	3.5	1	12	2	6	0

ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
27	7	1	23	3	11	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
25	6.66667	1	26.6667	5	10	0
ME	Hexext	Xilext	Oext	CO2ext	3HBext	3HHxext
24	20	1	60	5	30	0

APÊNDICE E-

Fluxo na via das pentoses durante os períodos pseudo-estacionários 1 e 2 a partir do fornecimento de xilose ou xilose e ácido hexanóico.

Fornecimento de xilose como única fonte de carbono														
Rotas metabólicas	1º Estado pseudo-estacionário							2º Estado pseudo-estacionário						
	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10
1	1.744	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.861	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
2	1.379	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.406	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
3	1.379	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.406	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
4	1.541	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.608	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
5	1.338	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.355	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
6	1.561	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.633	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
7	1.379	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.406	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
8	1.216	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.203	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
9	1.338	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.355	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
10	1.216	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.203	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
11	1.257	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.254	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
12	1.379	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.406	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
13	1.257	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.254	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
14	1.592	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.704	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
15	1.226	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.249	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
16	1.226	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.249	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
17	1.389	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.451	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
18	1.186	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.198	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
19	1.409	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.477	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
20	1.226	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.249	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
21	1.064	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.046	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
22	1.186	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.198	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
23	1.064	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.046	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
24	1.105	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.097	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
25	1.226	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.249	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
26	1.105	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.097	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
27	1.611	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.748	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
28	1.245	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.292	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
29	1.245	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.292	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
30	1.408	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.495	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
31	1.205	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.242	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
32	1.428	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.520	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
33	1.245	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.292	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
34	1.083	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.090	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
35	1.205	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.242	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
36	1.083	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.090	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467

37	1.123	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.140	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
38	1.245	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.292	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
39	1.123	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.140	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
40	1.459	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.591	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
41	1.093	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.136	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
42	1.093	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.136	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
43	1.255	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.338	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
44	1.052	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.085	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
45	1.276	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.363	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
46	1.093	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.136	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
47	0.930	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	0.933	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
48	1.052	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.085	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
49	0.930	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	0.933	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
50	0.971	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	0.984	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
51	1.093	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.136	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
52	0.971	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	0.984	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
53	1.633	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.767	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
54	1.267	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.311	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
55	1.267	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.311	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
56	1.430	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.514	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
57	1.227	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.261	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
58	1.450	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.539	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
59	1.267	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.311	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
60	1.105	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.109	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
61	1.227	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.261	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
62	1.105	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.109	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
63	1.146	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.159	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
64	1.267	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.311	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
65	1.146	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.159	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
66	1.481	1.005	0.668	0.337	0.668	0.668	0.668	1.610	1.159	0.720	0.439	0.720	0.720	0.720
67	1.115	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.154	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
68	1.115	0.639	0.546	0.093	0.546	0.546	0.546	1.154	0.703	0.568	0.136	0.568	0.568	0.568
69	1.278	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.357	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
70	1.075	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.104	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
71	1.298	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.382	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
72	1.115	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.154	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
73	0.953	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	0.952	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
74	1.075	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	1.104	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
75	0.953	0.396	0.465	-0.070	0.465	0.465	0.465	0.952	0.400	0.467	-0.067	0.467	0.467	0.467
76	0.993	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.003	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
77	1.115	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.154	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492
78	0.993	0.457	0.486	-0.029	0.486	0.486	0.486	1.003	0.476	0.492	-0.016	0.492	0.492	0.492

Foncimento de xilosee ácido hexanóico como fontes de carbono														
Rotas metabólicas	1º Estado pseudo-estacionário							2º Estado pseudo-estacionário						
	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10
1	1.929	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.552	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578
2	1.421	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.329	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
3	1.421	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.329	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
4	1.647	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.428	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
5	1.364	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.304	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
6	1.675	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.440	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
7	1.421	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.329	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
8	1.195	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.229	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
9	1.364	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.304	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
10	1.195	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.229	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
11	1.251	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.254	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
12	1.421	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.329	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
13	1.251	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.254	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
14	1.794	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.410	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578
15	1.285	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.187	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
16	1.285	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.187	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
17	1.511	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.286	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
18	1.229	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.162	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
19	1.539	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.298	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
20	1.285	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.187	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
21	1.059	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.087	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
22	1.229	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.162	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
23	1.059	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.087	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
24	1.116	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.112	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
25	1.285	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.187	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
26	1.116	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.112	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
27	1.794	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.372	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578
28	1.285	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.148	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
29	1.285	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.148	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
30	1.511	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.248	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
31	1.229	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.124	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
32	1.539	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.260	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
33	1.285	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.148	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
34	1.059	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.049	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
35	1.229	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.124	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
36	1.059	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.049	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
37	1.116	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.074	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
38	1.285	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.148	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
39	1.116	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.074	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
40	1.658	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.230	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578

41	1.149	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.006	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
42	1.149	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.006	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
43	1.375	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.105	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
44	1.093	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.981	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
45	1.404	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.118	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
46	1.149	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.006	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
47	0.923	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.907	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
48	1.093	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.981	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
49	0.923	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.907	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
50	0.980	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	0.932	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
51	1.149	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.006	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
52	0.980	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	0.932	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
53	1.816	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.402	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578
54	1.308	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.178	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
55	1.308	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.178	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
56	1.534	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.278	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
57	1.251	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.154	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
58	1.562	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.290	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
59	1.308	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.178	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
60	1.082	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.079	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
61	1.251	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.154	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
62	1.082	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.079	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
63	1.138	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.104	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
64	1.308	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.178	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
65	1.138	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.104	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
66	1.681	1.233	0.744	0.488	0.744	0.744	0.744	1.260	0.733	0.578	0.155	0.578	0.578	0.578
67	1.172	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.036	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
68	1.172	0.724	0.575	0.149	0.575	0.575	0.575	1.036	0.509	0.503	0.006	0.503	0.503	0.503
69	1.398	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.136	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
70	1.116	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.011	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
71	1.426	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.148	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
72	1.172	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.036	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
73	0.946	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.937	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
74	1.116	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	1.011	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
75	0.946	0.385	0.462	-0.077	0.462	0.462	0.462	0.937	0.360	0.453	-0.093	0.453	0.453	0.453
76	1.003	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	0.962	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
77	1.172	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	1.036	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466
78	1.003	0.470	0.490	-0.020	0.490	0.490	0.490	0.962	0.398	0.466	-0.068	0.466	0.466	0.466

ANEXO A-ARTIGO SUBMETIDO



Investigating nutrient limitation role on improvement of growth and poly-3-hydroxybutyrate accumulation by *Burkholderia sacchari* LMG 19450 from xylose as the sole carbon source

Edmar R Oliveira-Filho¹, Jefferson G P Silva¹, Matheus Arjona de Macedo¹, Marilda K Taciro¹, José Gregório C Gomez¹, Luiziana F Silva^{1*}

¹Institute of Biomedical Sciences, Department of Microbiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

***Corresponding author:** Luiziana Ferreira da Silva, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo. Address: Av Prof Lineu Prestes 1374 Lab 148, 05508-888 Cidade Universitária, São Paulo SP, Brazil. Phone: +55 11 30917730; Fax: +55 11 30917355; e-mail: lukneif@usp.br

Keywords: xylose, *Burkholderia sacchari*, Poly-3-hydroxybutyrate, bioreactors, Biopolymers

Abstract

Burkholderia sacchari LMG19450, a non-model organism and a promising microbial platform, was studied to determine nutrient limitation impact on poly-3-hydroxybutyrate production and bacterial growth from xylose, a major hemicellulosic residue. Nitrogen and phosphorus limitations have been studied in a number of cases to enhance PHA accumulation, but not combining xylose and *B. sacchari*. Within this strategy, it was sought to understand how to control PHA production and even modulate monomer composition. Nitrogen-limited and phosphorus-limited fed-batch experiments in bioreactors were performed to evaluate each one's influence on cell growth and poly-3-hydroxybutyrate production. The mineral medium composition was defined based on yields calculated from typical results so that nitrogen was available during phosphorus limitation and residual phosphorus was available when limiting nitrogen. Sets of experiments were performed so as to promote cell growth in the first stage (supplied with initial xylose 15 g/L), followed by an accumulation phase, where N or P was the limiting nutrient when xylose was fed in pulses to avoid concentrations lower than 5 g/L. N-limited fed-batch specific cell growth (around 0.19 h⁻¹) and substrate consumption (around 0.24 h⁻¹) rates were higher when compared to phosphorus-limited ones. Xylose to PHA conversion factor was similar in both conditions (0.37 g_{P(3HB)}/g_{xy}). We also described *pst* gene cluster in *B. sacchari*, responsible for high-affinity phosphate uptake. Phosphorus consumption kinetics obtained might evidence polyP accumulation. Obtained results were compared with studies with *B. sacchari* and other PHA-producing microorganisms. Since it is the first report of the mentioned kinetic parameters for LMG 19450 growing on xylose solely, our results open exciting perspectives to develop an efficient bioprocess strategy with increased P(3HB) production from xylose or xylose-rich substrates.