

JULIANA CARVALHO DE ARRUDA CAULKINS

Identificação de genes envolvidos na síntese de polihidroxicanoatos em *Burkholderia cepacia* linhagem IPT64

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em Biotecnologia

São Paulo
2008

JULIANA CARVALHO DE ARRUDA CAULKINS

Identificação de genes envolvidos na síntese de polihidroxicanoatos em *Burkholderia cepacia* linhagem IPT64

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de título de doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia
Orientadora: Profa. Dra. Elisabete José Vicente
Co-orientadora: Dra. Maria Filomena de Andrade Rodrigues

São Paulo
2008

RESUMO

ARRUDA-CAULKINS, J. C. de. **Identificação de genes envolvidos na biossíntese de polihidroxicanoatos insaturados em *Burkholderia cepacia* linhagem IPT64.** São Paulo, 2008. 134f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

Os polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados por microrganismos como material de reserva. O conhecimento das vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação dos PHAs é uma importante ferramenta para auxiliar na produção industrial. A linhagem *Burkholderia cepacia* IPT64 é capaz de acumular uma blenda composta de P(3HB) e P(3H4PE) a partir de sacarose. Este trabalho está focado em duas das principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHAs: a β -cetotiolase (*phaA*) e a PHA sintase (*phaC*). A primeira está associada à especificidade pelo substrato, e a segunda é considerada a enzima chave na síntese de PHAs. Neste trabalho a linhagem mutante *phaC* foi avaliada quanto à atividade enzimática de PHB sintase, que se constatou ter sido perdida. A presença de mais de uma tiolase no genoma de *B. cepacia* foi detectada. A inativação do gene *phaA_{Bc}* identificado anteriormente, bloqueou totalmente a síntese de P(3HB), e não promoveu o aumento da quantidade total de polímero. Este resultado indica que a tiolase identificada é responsável direta do acúmulo de P(3HB). Outra indicação é que não há uma competição das vias de síntese dos dois polímeros P(3HB) e P(3H4PE), já que não houve alteração na quantidade de P(3H4PE) acumulado, mesmo quando P(3HB) deixou de ser acumulado.

Palavras chave: *Burkholderia cepacia*; Polihidroxicanoatos; poli3-hidroxi4-pentenoato (P(3H4PE)); Polímero biodegradável; β -cetotiolase; PHA sintase.

ABSTRACT

ARRUDA-CAULKINS, J. C. de. **Identification of genes involved in the biosynthesis of insaturated polyhydroxyalkanoates in *Burkholderia cepacia* IPT64 strain.** São Paulo, 2008. 134p. Ph. D. thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

The polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters accumulated by microorganisms as storage compounds. Knowing the biochemistry pathway and enzymes involved in the biosynthesis and degradation of PHAs is an important tool to help industrial production. The *Burkholderia cepacia* IPT64 strain is able to accumulate a blend of P(3HB) and P(3H4PE) from sucrose. The focus of this work is on the two main enzymes involved in PHA biosynthesis: the β -ketothiolase (*phaA*) and the PHA synthase (*phaC*). The first one is associated with substrate specificity, and the second one is considered the key enzyme in PHA synthesis. In this work a mutant strain *phaC*⁻ was evaluated on its PHB synthase enzymatic activity, that was discovered to have been lost. The presence of other thiolases in the *B. cepacia* genome was detected. The inactivation of *phaA_{Bc}* gene identified previously, blocked totally the P(3HB) synthesis, and didn't increase the polymer content. This result indicates that the identified thiolase is directly responsible for P(3HB) accumulation. Another indication is that the synthesis pathways of the two polymers, P(3HB) and P(3H4PE), don't compete with each other, because the content of P(3H4PE) was not altered, even when the P(3HB) was not accumulated.

Key words: *Burkholderia*; Polyhydroxyalkanoates; poly-3-hydroxy4-pentenoate(P(3H4PE)); β -ketothiolase; PHA synthase; Biodegradable polymer.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos têm papel fundamental na sociedade moderna, podendo ser utilizados de várias formas, devido às suas propriedades como durabilidade, estabilidade e versatilidade (SQUIO e ARAGÃO, 2004; SPINACÉ e De PAOLI, 2005; SHAH et al., 2008).

A durabilidade do plástico, ao mesmo tempo em que o torna um produto atraente para o mercado, é o que o faz indesejável também. Nos últimos anos, vem aumentando a consciência pública sobre os efeitos ambientais negativos dos plásticos derivados de petróleo. Uma das saídas encontradas por muitos países tem sido o desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (REDDY et al., 2003). Dentre os plásticos biodegradáveis se destacam os polihidroxicanoatos (PHAs).

Os PHAs despertam grande interesse devido à sua versatilidade podendo ter propriedades similares aos plásticos convencionais e, também, por poderem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis e resíduos industriais (DIAS et al., 2006; SILVA et al., 2007; VALAPPIL et al., 2007a; FONSECA et al., 2008).

Quimicamente, os PHAs são poliésteres de diferentes hidroxiácidos (HA) que são sintetizados por diversos microrganismos como compostos de reserva de carbono, em forma de grânulos intracelulares, em condições desbalanceadas de crescimento pela limitação de pelo menos um nutriente essencial, e/ou excesso de fonte de carbono (DAWES e SENIOR, 1973; KHANNA e SRIVASTAVA, 2004).

O conhecimento mais aprofundado sobre as vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação destes polímeros vem sendo uma importante ferramenta, para auxiliar a produção industrial de PHAs. A bactéria mais

estudada no acúmulo de PHAs é a *Cupriavidus necator* (anteriormente denominada *Ralstonia eutropha*). A via de síntese de poli-3-hidroxi-butirato (P(3HB)), por *C. necator* ocorre em três etapas catalisadas por 3 enzimas: uma β -cetotiolase (*phaA*); uma acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (*phaB*); e, uma PHA sintase (*phaC*). Esta última enzima é considerada a enzima chave para a síntese de PHAs, pois catalisa a ligação éster da molécula de D(-)-3-hidroxi-butil-CoA à molécula de poliéster já existente (STEINBÜCHEL, 1996; SUDESH et al., 2000; REHM, 2007).

Em um projeto envolvendo a Universidade de São Paulo (USP), o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) e a Cooperativa de produtores de Cana Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (Coopersucar) foram isolados microrganismos capazes de acumular PHAs. Dentre os isolados uma linhagem identificada como *Burkholderia cepacia* (denominada IPT64) mostrou-se promissora, por ser capaz de acumular uma blenda composta de P(3HB) e poli-3-hidroxi-4-pentenoato (P(3H4PE)), quando sacarose é empregada como única fonte de carbono (RODRIGUES, 1995). A insaturação presente em P(3H4PE) permite que este seja submetido a diversas modificações, podendo gerar polímeros com propriedades diferentes, aumentando seu campo de aplicação.

Vários trabalhos envolvendo otimização das condições de cultivo e obtenção de mutantes da linhagem *B. cepacia* IPT64 já foram realizados buscando entender e otimizar a produção do monômero P(3H4PE) (RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al., 2000a e b; PEREIRA, 2003a; SALOMONI, 2005; ROCHA, 2007).

Rodrigues (2000) identificou e clonou genes do operon *phaCAB* da linhagem *B. cepacia* IPT64 e demonstrou que estes apresentam similaridade com genes relacionados à síntese do monômero P(3HB) em *C. necator*. Com a inativação do gene *phaC* (codificador da PHA sintase), foi gerado uma linhagem mutante de *B. cepacia* IPT64 *phaC* negativa (*phaC*⁻) cuja proporção de 3H4PE é aumentada de 5

para 36%. Entretanto, a produção de PHA total sofreu uma diminuição de 92 a 94% no conteúdo (RODRIGUES, 2000; RODRIGUES et al., 2000b). A partir destes dados supõe-se que, nesta bactéria, o acúmulo de P(3H4PE), a partir de sacarose, ocorre por uma via metabólica diferente da via de síntese de P(3HB) contando com o envolvimento de outros genes.

Estudos baseados na variação das condições de cultivo realizados por Pereira (2003a) permitiram obter um aumento da proporção de unidades P(3H4PE) de 5-7% no polímero final produzido. Salomoni (2005) buscou obter mutantes alterados na síntese de P(3H4PE) através de experimentos de mutagenese clássica. Rocha (2007) analisou o conteúdo polimérico produzido pelo mutante IPT64 *phaC*⁻, e constatou que apenas unidades monoméricas de 3H4PE são produzidas, sem ocorrer a polimerização destas.

Na primeira etapa deste trabalho a linhagem IPT64 foi analisada quanto à atividade da enzima PHB sintase, tanto após crescimento em meio basal (caldo nutriente), como após crescimento em meio com condições apropriadas para acúmulo de PHAs (meio mineral com limitação de nitrogênio e excesso de fonte de carbono). Uma vez que o mutante IPT64 *phaC*⁻ continua acumulando unidades monoméricas de PHAs, com um maior conteúdo de unidades de 3H4PE, buscou-se avaliar a atividade da PHB sintase neste mutante.

A segunda etapa deste trabalho foi a análise do gene que codifica a enzima β -cetotilase (*phaA*). Esta enzima participa na primeira etapa da biossíntese de PHAs e apresenta variação de especificidade por substrato. Isto é de fundamental importância na etapa de geração das unidades HA precursoras da síntese de PHAs (PANTAZAKI et al., 2005). A partir dos dados disponíveis dos genomas de diferentes espécies de *Burkholderia* buscou-se realizar um levantamento de todos os genes codificadores de cetotilases que poderiam estar envolvidos com a síntese

de PHAs. E a partir dos dados levantados procurou-se relacionar estes genes encontrados com o acúmulo de HA precursores para a síntese de unidades de 3H4PE em *B. cepacia* IPT64.

A terceira etapa deste trabalho consistiu em obter novos mutantes da linhagem *B. cepacia* IPT64, agora com o gene da cetotilase identificada por Rodrigues (2000) interrompido, gerando assim o mutante IPT64 *phaA*⁻. Este mutante foi analisado quanto à sua capacidade de produção de polímero, procurando avaliar a participação deste gene na síntese das unidades de P(3HB) e de P(3H4PE).

2 REVISÃO DA LITERATURA

O consumo global de plásticos está em torno de 200 milhões de toneladas, com crescimento anual em torno de 5% (SIRACUSA et al., 2008). O plástico no Brasil representa hoje 1,45% do PIB do país. Segundo a Associação Brasileira da Indústria do Plástico (ABIPLAST), o consumo *per capita* no Brasil chegou a 26,93 kg em 2007 (ABIPLAST, 2007). Os principais segmentos do mercado de plástico brasileiro em 2007 são apresentados na figura 1.

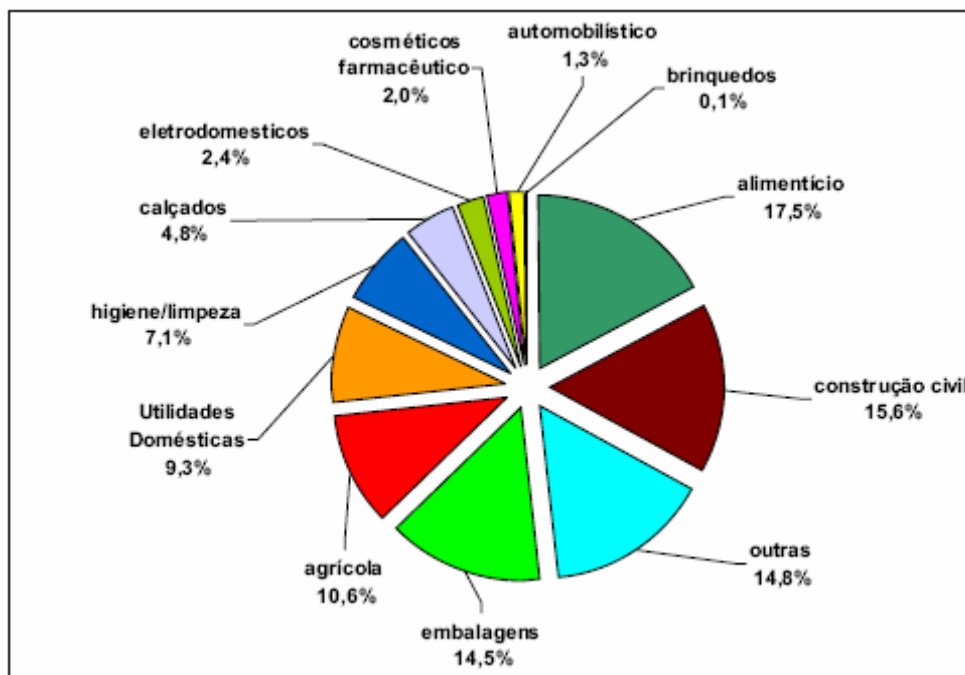


Figura 1 - Segmentação do mercado de transformados plásticos por aplicação (ABIPLAST, 2007).

A maior parte dos plásticos tem sua matéria-prima derivada do petróleo. Então, o aumento do seu consumo indica, também, um consumo maior de petróleo (OKADA, 2002; SHAH et al., 2008).

Os plásticos são considerados grandes vilões ambientais devido à durabilidade, que leva a um longo tempo de degradação. Como estratégias para o tratamento dos resíduos se destacam os aterros sanitários e a reciclagem (MULLER, 2002; SPINACÉ e De PAOLI, 2005). O problema com os aterros é que os plásticos ocupam grande parte do seu volume, interferindo de forma negativa nos processos de compostagem e de estabilização biológica (SPINACÉ e De PAOLI, 2005).

O conceito de reciclagem vem se tornando muito popular em todo o mundo (OKADA, 2002; SHAH et al., 2008). A reciclagem pode ser dividida em três tipos com relação ao processo: a reciclagem mecânica ou física, a reciclagem química e a reciclagem energética. Vários aspectos motivam a reciclagem dos plásticos: a economia de energia, a preservação de fontes esgotáveis de matéria-prima, a redução de custos com a disposição final do resíduo etc. Ainda assim a reciclagem não é considerada uma atividade de alto retorno financeiro (SPINACÉ e De PAOLI, 2005).

Embora tenham ocorrido muitos avanços na área de reciclagem, nem sempre é possível recuperar todo o plástico utilizado (OKADA, 2002). Uma das saídas encontradas tem sido o desenvolvimento de pesquisas buscando polímeros degradáveis ou alteração da estrutura dos polímeros existentes de modo a torná-los ao menos parcialmente degradáveis (CHANDRA e RUSTGI, 1998; OKADA, 2002; SHAH et al., 2008).

Os plásticos podem ser degradados por três tipos de agentes: luz ou radiação de alta energia (fotodegradação), calor e oxigênio (degradação termo-oxidativa) ou degradação microbológica (biodegradação) (SHAH et al., 2008).

Polímeros biodegradáveis são definidos como polímeros que são degradados e catabolizados a dióxido de carbono e água, por microrganismos presentes no meio ambiente (OKADA, 2002). Os polímeros biodegradáveis podem ser divididos em polinucleotídeos, poliamidas, polissacarídeos, poliésteres, polioésteres, polifosfatos, poliisoprenóides e polifenóis (TOKIWA e UGWU, 2007). Dentre os poliésteres biodegradáveis destacam-se os PHAs que são o foco deste trabalho.

2.1 POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Os PHAs constituem uma classe de poliésteres que são sintetizados por muitos dos gêneros bacterianos e por algumas espécies pertencentes às arqueias (LEE, 1996; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; REHM, 2007; VALAPPIL et al., 2007b). Mais de 300 microrganismos produtores de PHAs foram isolados (DIAS et al., 2006). Em condições de limitação de pelo menos um nutriente essencial, e excesso de fonte de carbono, os PHAs se apresentam como compostos de reserva de carbono em forma de grânulos intracelulares (KHANNA e SRIVASTAVA, 2004). A produção de PHAs pode ocorrer tanto na fase exponencial como na fase exponencial tardia, ou mesmo na fase estacionária de crescimento, dependendo do organismo (STUBBE et al., 2005).

A fórmula geral destes polímeros é apresentada na figura 2. A composição da cadeia lateral, radical R, e o valor de n determinam a identidade da unidade monomérica (LEE, 1996). Dependendo da cadeia lateral, os polímeros podem possuir propriedades que vão desde termoplásticos (R=H, CH₃, CH₂CH₃) a elastômeros (R= C₃H₇-C₁₄H₂₉).

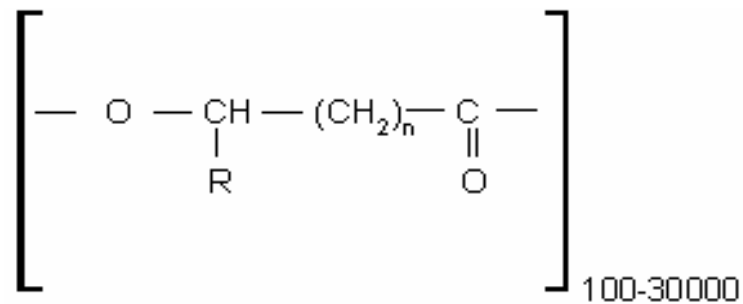


Figura 2 - Estrutura geral dos PHAs.

Os PHAs podem ser classificados em dois grupos: o primeiro é formado por polímeros constituídos por unidades monoméricas de hidroxiácidos (HA) de cinco carbonos ou menos e são denominados PHAs de cadeia lateral curta (PHA_{SCL}); o segundo é formado por polímeros com unidades de HA contendo seis ou mais carbonos, denominado PHAs de cadeia lateral média (PHA_{MCL}) (RAMSAY et al., 1994).

A maioria dos monômeros de PHAs possui o grupo hidroxila na posição 3 (beta), porém já foram identificados PHAs com a hidroxila na posição 4 ou 5. Dentre a grande variedade de ácidos hidroxialcanóicos já detectados como constituintes de PHAs, incluem-se monômeros com cadeias carbônicas saturadas ou insaturadas, halogenadas, ramificadas com grupos substituintes lineares, cíclicos ou aromáticos,

entre outros (FRITZSCHE et al., 1990a, b; LENZ et al., 1990; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

O P(3HB) foi o primeiro PHA descoberto (LEMOIGNE, 1926). Os PHAs mais estudados e melhor caracterizados são o P(3HB) e seu co-polímero o poli(3-hidroxi-butirato-co-valerato) (P(3HB-co-3HV)) (DOI, 1990; KHANNA e SRIVASTAVA, 2004).

A constituição monomérica dos PHAs resultantes depende tanto do substrato utilizado para crescimento, como do microrganismo produtor (REDDY et al., 2003). Nos casos onde os monômeros apresentam estrutura química semelhante ao substrato, ou a algum produto do metabolismo do mesmo, são classificados como biossíntese a partir de substratos relacionados. Existem algumas bactérias capazes de produzir monômeros a partir de substratos simples, como glicose, sacarose e outros ainda de menor valor como, por exemplo, os óleos vegetais. Quando isso ocorre, a biossíntese de PHAs é classificada como biossíntese de PHAs a partir de substratos não relacionados (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995; BRAUNEGG et al., 1998; SUDESH et al., 2000; STEINBÜCHEL e LÜTKE-EVERSLOH, 2003).

2.1.1 PHAs INSATURADOS

A produção de PHAs insaturados é de grande interesse, devido ao seu potencial para modificações químicas (FRITZSCHE et al., 1990a e b; LEE et al., 2001). A reatividade da dupla ligação abre a possibilidade para a introdução de modificações estruturais, com o objetivo de se obter novos polímeros com diferentes propriedades físicas e químicas, aumentando as possibilidades de aplicações destes polímeros. Em geral, a insaturação aparece na cadeia lateral dos PHAs (LEE et al., 2001).

A síntese de PHAs insaturados é reportada, principalmente em microrganismos produtores de PHA_{MCL} cultivados em substrato relacionado (FRITZSCHE et al., 1990a e b; HUISMAN et al., 1991; KIM e CHANG, 1995, 1998; MADISON e HUISMAN, 1999; LEE et al., 2001), apesar de existirem trabalhos de algumas espécies do gênero *Pseudomonas* onde foram obtidos PHAs insaturados a partir de substratos não relacionados como frutose, butirato, acetato etc. (HUISMAN et al., 1991; HUIJBERTS et al., 1992, 1994; De WAARD et al., 1993). A proporção de síntese de monômeros saturados e insaturados por *Pseudomonas* está sujeita a regulação térmica, assim como a composição dos ácidos graxos da membrana lipídica. Em geral, quando cultivados a baixas temperaturas, os microrganismos sintetizam membranas com grandes porções de ácidos graxos insaturados. A presença de ácidos graxos saturados e insaturados nos PHAs está relacionada com a síntese *de novo* e a síntese de PHA. Ambos, a síntese de PHAs e a síntese *de novo* de ácidos graxos, a partir de substratos não relacionados respondem às mudanças na temperatura de cultivo (HUIJBERTS et al., 1992).

Num trabalho de isolamento e seleção realizado no IPT, foram identificadas novas linhagens de *Burkholderia* capazes de acumular PHA. Após análises, foi constatado que um isolado de *B. cepacia* é capaz de acumular uma blenda composta dos homopolímeros P(3HB) e P(3H4PE) (Figura 3) (RODRIGUES et al., 1995; VALENTIN et al., 1999; RODRIGUES, 2000), a partir de substratos não relacionados (RODRIGUES et al., 1995).

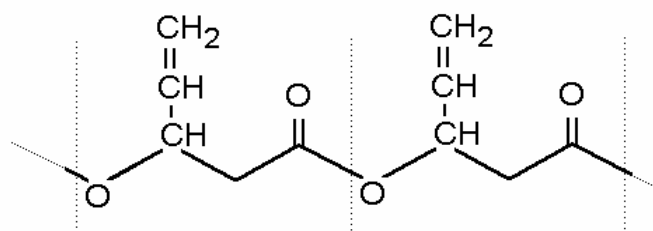


Figura 3 - Fórmula estrutural do polímero P(3H4PE).

A biossíntese de PHAs contendo a unidade insaturada 3H4PE já havia sido observada anteriormente em *Rhodospirillum rubrum*, quando cultivada em ácido 4-pentenóico como substrato precursor (ULMER et al., 1994). A linhagem *Burkholderia cepacia* IPT 64, isolada no Brasil, apresenta a vantagem de poder acumular P(3H4PE) a partir de substratos simples como sacarose, além de ser aeróbia e apresentar um crescimento rápido. Entretanto, o conteúdo de 3H4PE no polímero é baixo (<10%) (RODRIGUES, 2000).

A insaturação do P(3H4PE), devido ao grupo lateral vinil, abre a possibilidade de se inserir várias modificações químicas, incluindo reações cruzadas, funcionalização da dupla ligação (VALENTIN et al., 1999), incorporação de substâncias bioativas, possibilidade de introduzir grupos que resultem em meloramento de propriedades hidrossolúveis, através do aumento do seu caráter hidrofílico (BEAR et al., 1997).

2.1.2 PROPRIEDADES, APLICAÇÕES PRÁTICAS DOS PHAS E SUA PRODUÇÃO INDUSTRIAL

Os PHAs possuem uma grande variedade de propriedades mecânicas que vão do cristalino ao elástico, dependendo da composição monomérica e seu peso

molecular, o que os torna aplicáveis em diversas áreas (KHANNA e SRIVASTAVA, 2004; LEE et al., 2003). Dependendo da propriedade desejada, para as mais variadas aplicações, os PHAs podem ser utilizados na forma de blendas, terem sua superfície modificada ou combinada com outros polímeros, enzimas ou mesmo materiais inorgânicos (CHEN e WU, 2005).

A principal expectativa quanto ao uso dos PHAs é como substituinte dos polímeros derivados de petróleo. Aplicações como embalagens e filmes e seu uso em artigos de higiene como fraldas já foram descritas. As aplicações potenciais na agricultura incluem encapsulação de sementes, encapsulação de fertilizantes para sua liberação lenta etc. (VERLINDEN et al., 2007).

Por serem biodegradáveis, termoprocessáveis e em geral biocompatíveis, os PHAs se tornaram atrativos como biomateriais tanto nos aparatos de medicina convencional, como na engenharia de tecidos. Vários testes em modelos animais têm mostrado que os polímeros da família dos PHAs são compatíveis com uma grande gama de tecidos. Nos últimos anos os PHAs e os compósitos deles derivados estão sendo utilizados no desenvolvimento de aparatos médicos, desde implantes até na liberação controlada de drogas (MARTIN e WILLIANS, 2003; WILLIANS e MARTIN, 2003; VALLAPIL et al., 2006).

Por ser altamente cristalino, o P3HB tem muitas limitações no que diz respeito às suas aplicações. Por outro lado, o copolímero P(3HB-co-3HV) é mais flexível, com uma gama maior de aplicabilidade (STEINBÜCHEL, 1996).

O copolímero P(3HB-co-3HV) foi lançado no mercado sob a marca Biopol™, pela “Imperial Chemical Industries” (ICI), no fim dos anos oitenta. Na metade dos anos noventa, a Monsanto adquiriu os direitos para a comercialização e pesquisa do Biopol™ e seus copolímeros. Em 1998 esta empresa decidiu interromper a linha de

pesquisa e comercialização deste biopolímero. Em 2001, a empresa americana Metabolix Inc. adquiriu os direitos do Biopol™ da Monsanto e está desenvolvendo a produção em larga-escala (McCARTHY, 2003; WILLIAMS e MARTIN, 2003).

Em meados da década de 90, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis empregando matéria-prima renovável pela agricultura, em especial derivados da cana-de-açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pelo IPT, Coopersucar e USP (DIAS, 2008).

Em 1997, foi desenvolvido o projeto de uma unidade piloto de produção em Serrana-SP. Com as alterações introduzidas e os dimensionamentos dos equipamentos das diferentes seções da produção em 2000, a planta foi remodelada e adequada, operando ao fim deste ano com a capacidade de 50 t/ano. A empresa que construiu a planta piloto, e é responsável por sua operação, é a PHB Industrial S/A. Além da planta piloto a empresa é proprietária de uma marca registrada: a “Biocycle”. Praticamente toda a produção é exportada para empresas nos Estados Unidos, no Japão e Alemanha (MOLINARI, 2006).

Uma vantagem do produto nacional é o preço: do quilo do polímero de cana-de-açúcar, cerca de US\$ 5, enquanto o quilo de outros plásticos biodegradáveis provenientes, por exemplo, da beterraba ou do milho, custa US\$ 14 (MOLINARI, 2006). Uma das razões do preço competitivo vem do fato das instalações da fábrica ser totalmente auto-suficientes: a cana fornece a matéria-prima, o açúcar e um álcool especial, chamado superior, usado na etapa final da fabricação. O bagaço de cana é usado para gerar energia elétrica e vapor, necessários ao processo industrial.

A Injecom, empresa paulistana que produz objetos de plástico injetado, começou a comercializar em novembro de 2006 os invólucros de P3HB para mudas. “Votorantim S/A” e “International Papers S/A”, gigantes da indústria de papel e celulose, estão na lista de interessados pelo novo produto (MOLINARI, 2006).

2.2 BIOSÍNTESE DE PHAS

A biossíntese de PHAs é um aspecto amplamente estudado. O conhecimento mais aprofundado sobre as vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação destes polímeros vem sendo uma importante ferramenta para auxiliar a produção industrial de PHAs (STEINBÜCHEL et al., 1992; STEINBÜCHEL, 1996).

Os microrganismos são capazes de produzir monômeros de PHAs a partir de várias fontes de carbono. Muitas vias metabólicas para a geração destes monômeros têm sido propostas. As vias de biossíntese de PHAs são, geralmente, divididas em dois principais grupos, baseado na composição monomérica dos PHAs. Um grupo se refere à síntese de PHA_{SCL} e tem a *Cupriavidus necator* como seu organismo representante. O segundo grupo se refere à síntese de PHA_{MCL} e tem como principais representantes bactérias do gênero *Pseudomonas* com rRNA de homologia do tipo I. A maior parte dos procariotos sintetiza PHB, e os PHA_{MCL} são o segundo tipo de PHAs mais frequentemente detectados (Figura 4). O (R)-3-hidroxiacil-CoA é o substrato para a PHA sintase (codificada por *phaC*) e precursor direto para a biossíntese de PHB (REHM, 2006). Os PHA_{MCL} são sintetizados pela conversão de intermediários do metabolismo de ácidos graxos a (R)-3-hidroxiacil-CoA.

A biossíntese de PHB por *C. necator* envolve a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, catalisada pela enzima β -cetotiolase (codificada por *phaA*) que leva à formação de acetoacetil-CoA. Este, por sua vez, é reduzido a (R)-3-hidroxiacil-CoA, por uma acetoacetil-CoA redutase (R)-específica (codificada por *phaB*) (Figura 4). A posição do carbono oxidado no monômero pode variar, sendo encontrado nos carbonos 3, 4 ou 5, mas o mais comum é no carbono 3. A bactéria que tem a via biossintética de PHA mais bem estudada é *C. necator*. As enzimas envolvidas na biossíntese de PHA desta bactéria foram isoladas e caracterizadas quanto à estrutura e especificidade de substrato (HAYWOOD et al., 1988a e b; REHM e STEINBÜCHEL, 1999).

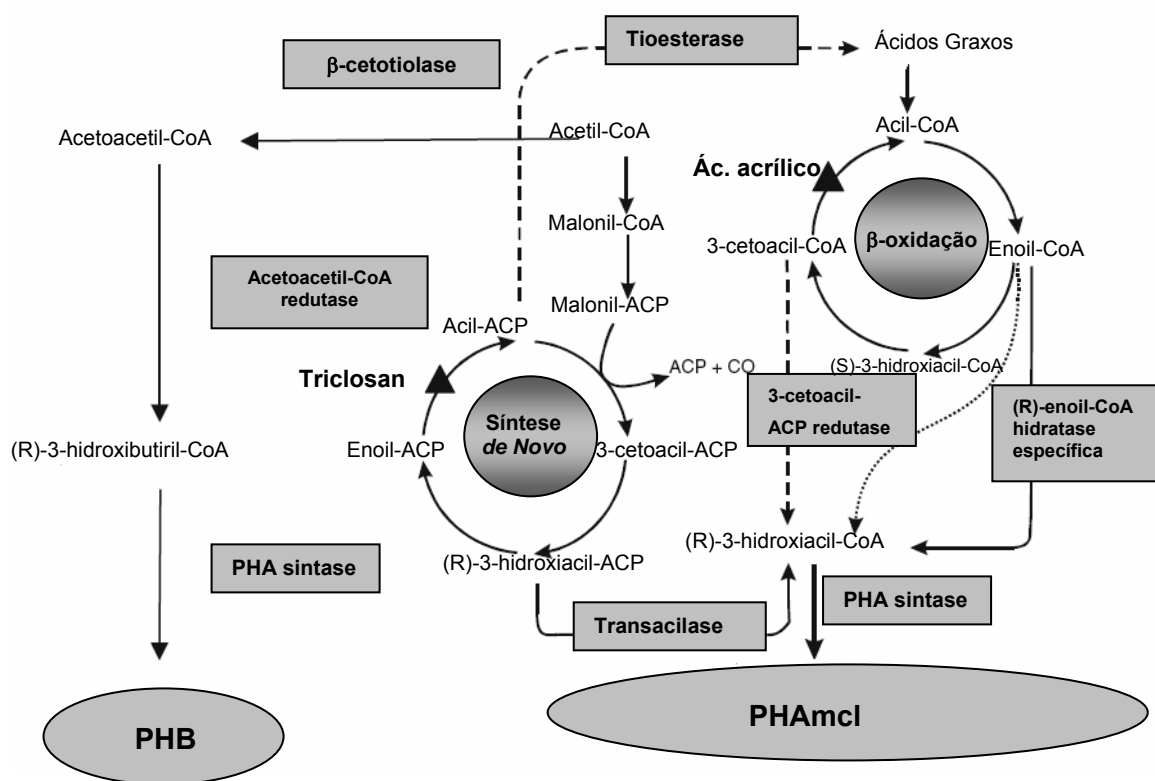


Figura 4 – Rotas metabólicas para a síntese de PHA (adaptado de REHM, 2006).

A variedade de monômeros incorporados pelas bactérias do gênero *Pseudomonas* é muito ampla (SUDESH et al., 2000). Pelo menos duas diferentes rotas metabólicas são descritas para a síntese dos tioésteres 3-hidroxiacil-CoA, que servem de substrato para a PHA sintase: (i) a β -oxidação é a principal via utilizada quando ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono; e, (ii) a síntese *de novo* é a rota principal durante o crescimento em fontes de carbono não relacionadas como carboidratos, que são metabolizadas a acetil-CoA (Figura 4) (SUDESH et al., 2000).

Os genes codificadores das enzimas envolvidas na formação dos PHAs não estão, necessariamente, no mesmo agrupamento genético (“cluster”) e a organização dos genes varia de espécie para espécie (Figura 5) (REDDY et al., 2003).

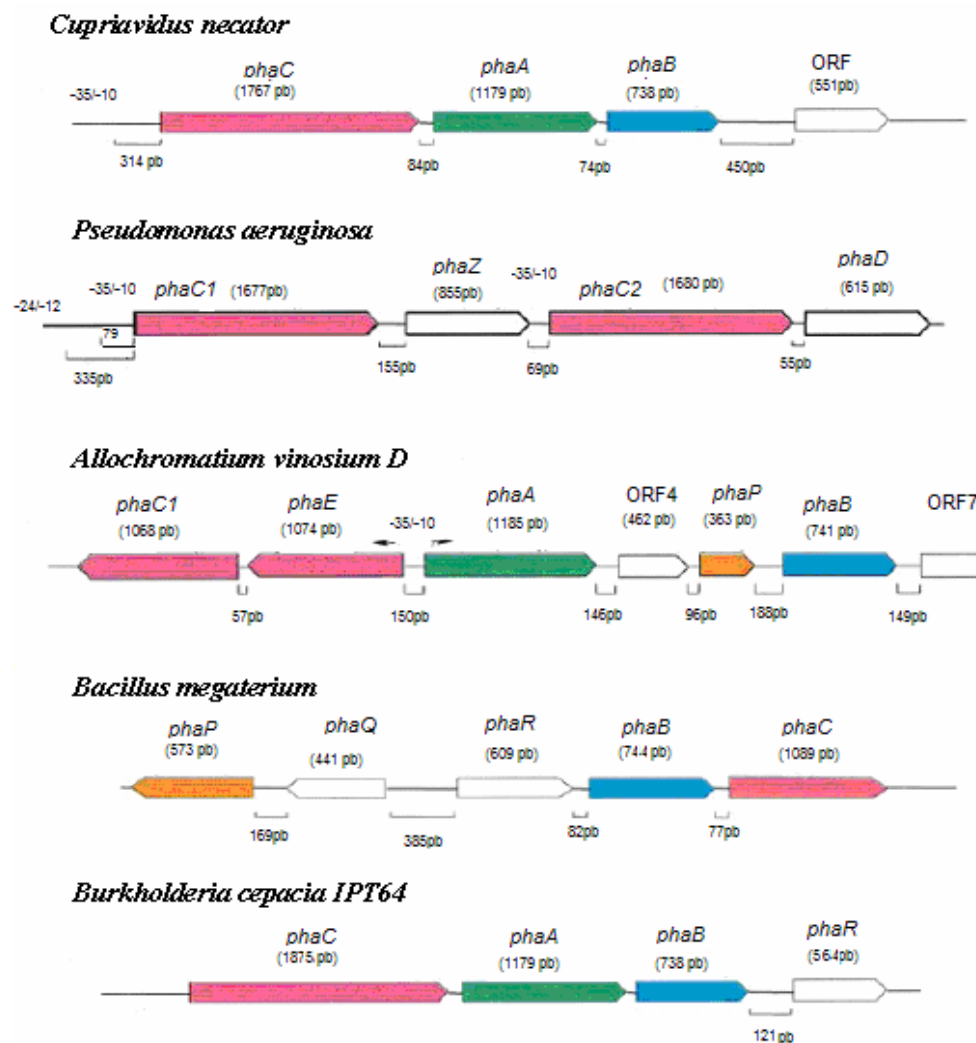


Figura 5 – Organização genética de operons contendo os genes para a síntese de PHA. *PhaC/C1/C2*: PHA sintase; *phaE*, subunidade de PHA sintase; *phaA*, β-cetotiolase; *phaB*, acetoacetil-CoA redutase; *phaR*, regulador de proteína; ORF, “open reading frame” com função desconhecida; *phaZ*, PHA despolimerase; *phaD*, “open reading frame” com função desconhecida (adaptado de REHM, 2003).

2.3 PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA BIOSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE PHAs

2.3.1 β -CETOTIOLASE (PHAA)

As enzimas pertencentes à superfamília tiolase catalisam a formação da ligação carbono-carbono (HAAPALAINEN et al., 2006). Baseado em sua especificidade pelo substrato e função fisiológica, as tiolases podem ser classificadas em dois tipos: as degradativas e as biossintéticas (MODIS, 2000; LIU et al., 2002; PANTAZAKI et al., 2005).

As tiolases do tipo I (degradativas), denominadas de acetil-CoA aciltransferase ou tiolase β -cetoacil-CoA (E.C. 2.3.1.16), apresentam especificidade para substratos de cadeia longa, e estão envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos. As tiolases do tipo II (biossintéticas), denominadas de acetil-CoA acetiltransferase ou tiolase acetoacil-CoA (E.C. 2.3.1.9), apresentam especificidade por acetoacil-CoA, e estão envolvidas em vias biossintéticas como síntese de corpos cetônicos, iniciação da cadeia de isoprenóides e síntese de PHB (LIU et al., 2002). Em geral, as tiolases catalisam a quebra reversível de 3-cetoacil-CoA em acil-CoA e acetil-CoA (Figura 6).



Figura 6 – Reação reversível catalisada pela β -cetotiolase.

As enzimas do tipo II atuam tanto na biossíntese (reação de condensação), como na degradação de P(3HB) (reação de tiólise). A regulação da reação de condensação ocorre pela concentração celular de coenzima A. Assim, altas concentrações de CoA fazem com que a reação ocorra no sentido contrário ao da biossíntese de PHAs (OEDING e SCHLEGEL, 1973; LAFFERTY et al., 1988).

C. necator possui pelo menos três enzimas β -cetotilases diferentes, cujos genes codificadores são designados: *phbA_{Cn}*, *bktB_{Cn}* e *bktC_{Cn}* (SLATER et al., 1997). Quando avaliadas quanto à sua atividade na reação reversa (tiólise), estas enzimas apresentaram especificidades de substrato distintas. A enzima codificada por *phbA_{Cn}* é a mais ativa e exerce um papel importante na biossíntese de P(3HB), limitando-se à produção de acetoacetyl-CoA (HAYWOOD et al., 1988b). Slater e colaboradores (1997) demonstraram que a enzima codificada pelo gene *bktB_{Cn}* exerce um papel importante para a polimerização de unidades monoméricas diferentes de 3HB como, por exemplo, 3HV. Existem indicações que *phbA_{Cn}* e/ou *bktC_{Cn}* formam oligômeros mistos com *bktB_{Cn}*, resultando num amplo espectro de especificidade de substrato (STEINBÜCHEL, 1996; SLATER et al., 1997). No trabalho de seqüenciamento do genoma de *C. necator* H16, foram encontrados 37 genes isólogos de *phaA*, mas as suas especificidades quanto ao substrato não foram avaliadas (POHLMANN et al., 2006).

2.3.2 ACETOACETIL-COA REDUTASE (*PHAB*)

Foram detectadas duas enzimas acetoacetyl-CoA redutases em *C. necator*, uma NADPH⁻ dependente e outra NADH⁻ dependente. Ambas foram estudadas quanto à sua atividade na reação reversa (oxidação), tendo sido demonstrado que a enzima NADPH-dependente catalisa a oxidação de D(-)-3-hidroxiacil-CoA de cadeia com 4 a 6 átomos de carbono. A enzima NADH-dependente é ativa com moléculas de D(-) e L(+) 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta e média (C4 e C10); no entanto, na reação de redução, esta enzima forma apenas moléculas de L(+)-3-hidroxiacil-CoA e, portanto, não participa da via de biossíntese de PHA, uma vez que não forma o substrato da enzima seguinte (STEINBÜCHEL, 1996; SLATER et al., 1997).

2.3.3 PHA SINTASE (PHAC)

A PHA sintase é considerada a enzima chave para o acúmulo de PHA, pois catalisa o passo decisivo da via: a polimerização das unidades. Esta enzima é estereoespecífica para os estereoisômeros R. PHA sintases apresentam um grande espectro de especificidade de substrato, e assim uma grande variedade de monômeros podem ser polimerizados (SUDESH et al., 2000)

Até o presente, as seqüências dos nucleotídeos codificadores de 88 PHA sintases, de 68 bactérias, já foram obtidas. Levando em consideração as estruturas primárias, as quais foram preditas a partir das seqüências dos genes codificadores, as PHA sintases foram classificadas em quatro tipos. Desta forma, a sua especificidade com relação ao substrato também pode ser prevista. Os quatro tipos de PHA sintases estão mostrados na tabela 1 (REHM, 2007).

Tabela 1 -Tipos de PHA sintases bacterianas

Tipo de PHA sintase	Especificidade pelo Substrato	Bactéria representativa
I	3HA _{SCL} -CoA (C3-C5) 4HA _{SCL} -CoA 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA	<i>Cupriavidus necator</i>
II	3HA _{MCL} -CoA (>C5)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
III	3HA _{SCL} -CoA 3HA _{MCL} -CoA (C6-C8) 4HA-CoA, 5HA _{SCL} -CoA	<i>Allocromatium vinosum</i>
IV	3HA _{SCL} -CoA	<i>Bacillus megaterium</i>

Muitos estudos mostram que a enzima PHA sintase encontra-se na superfície dos grânulos de PHAs (Figura 7) (REHM, 2003; STUBBE e TIAN, 2003). O crescimento da cadeia polimérica, que permanece covalentemente ligada à enzima, converte a enzima que é inicialmente solúvel, para uma molécula anfifática. A

molécula anfifática sofre um processo de auto-montagem, que é supostamente similar à formação de uma micela (REHM, 2003).

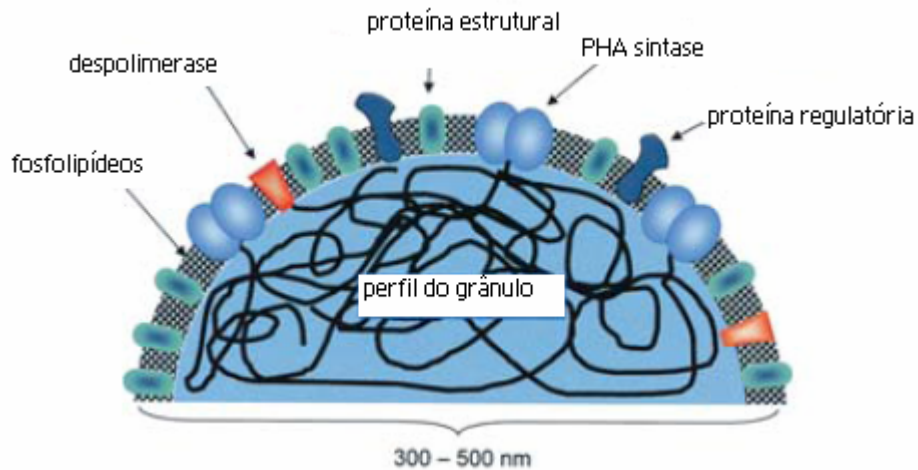


Figura 7 – Representação esquemática de um grânulo de PHA.

2.3.4 PHA DESPOLIMERASE (*PHAZ*)

Bactérias podem possuir polihidroxialcanoato (PHA) despolimerases intra e/ou extracelulares. As extracelulares são as responsáveis pela degradação dos PHAs cristalinos liberados no ambiente (SUDESH et al., 2000). Já as intracelulares estão envolvidas na reutilização interna dos PHAs (STUBBE et al., 2005). O tamanho da cadeia polimérica é quase constante durante a degradação de P(3HB). Isto sugere que a despolimerase intracelular é uma hidrolase do tipo exo, que age na porção carboxi terminal da cadeia polimérica.

O mecanismo de ação da despolimerase intracelular é diferente da extracelular que ataca os PHAs na forma cristalina, devido à natureza amorfa das inclusões intracelulares dos PHAs (SUDESH et al., 2000). Estudos recentes têm demonstrado que a degradação, tanto extra como intracelular dos PHAs é um mecanismo complexo, onde várias despolimerases e outras enzimas, ainda não caracterizadas, são necessárias (LUENGO et al., 2003).

2.3.5 PHASINAS (*PHAP*)

As inclusões intracelulares de PHAs consistem em uma porção hidrofóbica de PHA amorfo, que é cercada por uma membrana fosfolipídica composta por proteínas catabólicas e não-catabólicas. Dentre as proteínas não catabólicas incluem-se um grupo de proteínas denominado PHAsinas (PHAP). O termo “phasing” (PHA-oleosina) foi dado em analogia a uma classe de proteínas anfifáticas chamadas oleosinas (POTTER, STEINBÜCHEL, 2005). PHAsinas são pequenas proteínas hidrofóbicas, que agem como uma barreira entre o citoplasma celular e o polímero, evitando sua interação com outros componentes celulares (ALMEIDA et al., 2007). Elas estão envolvidas na estabilização das inclusões hidrofóbicas de PHAs amorfos, no citoplasma hidrofílico.

A função exata das PHAsinas não está clara, mas tem sido demonstrado que elas afetam o tamanho dos grânulos de PHAs e a quantidade de polímero acumulado (SUDESH et al., 2000; YORK et al., 2001; POTTER e STEINBÜCHEL, 2005; ALMEIDA, 2007). Apesar das similaridades quanto à função e regulação, as PHAsinas de diferentes bactérias não apresentam sequências homólogas (YORK et al., 2001).

2.3.6 ENOIL-COENZIMA A HIDRATASE (R)-ESPECÍFICA (*PHAJ*)

Quando a fonte de carbono é oxidada através da β -oxidação, a enoil-CoA hidratase (R) específica (PHAJ) catalisa a oxidação do enoil-CoA ao (R)-3-hidroxiacil-CoA, para que este possa ser utilizado pela PHA sintase (FUKUI et al. 1976; SUDESH et al., 2000).

Em *Aeromonas caviae*, além de converter crotonil-CoA a (R)-3 hidroxibutiril-CoA, a enoil-CoA hidratase converte pentenoil-CoA e hexenoil-CoA a precursores de PHA (MADISON e HUISMAN, 1999). Quatro tipos de genes *phaJ* foram encontrados no genoma de *P. aeruginosa*. Dos quatro, apenas o produto gênico de *phaJ1_{Pa}* é ativo para a enoil-CoA de cadeia curta (C4 a C6), os outros 3 produtos gênicos de *phaJ* (*phaJ2_{Pa}*, *phaJ3_{Pa}* e *phaJ4_{Pa}*) estão ativos para enoil-CoAs de cadeia longa (C6 a C12). Levando em consideração a distribuição e variação dos genes *phaJ*, podem existir outras enzimas enoil-CoA hidratases (R)-específicas com diferentes propriedades, em comparação com as proteínas PHAJ já identificadas (TSUGE et al., 2003).

2.3.7 TRANSACILASE (PHAG)

A síntese *de novo* é a rota principal durante o crescimento em fontes de carbono não relacionadas como os carboidratos, que são metabolizadas a acetil-CoA. Como os intermediários desta via formam (R)-3-hidroxiacil-ACP (proteína carregadora de grupos acila), uma etapa adicional é necessária para a conversão a (R)-3-hidroxiacil-CoA. Esta etapa é catalisada pela transacilase PHAG. Esta transacilase específica catalisa a transferência do grupo funcional do (R)-3-hidroxiacil-ACP ao CoA (REHM et al., 1998; SUDESH et al., 2000; HOFFMAN et al., 2000).

2.3.8 ACETIL COENZIMA A SINTETASE

Estas enzimas catalisam estéreo-seletivamente a formação da ligação carbono-carbono e são potencialmente eficientes para a síntese de moléculas orgânicas complexas. O ácido acrílico foi caracterizado como sendo um bom substrato para esta enzima (PATEL e WALT,1987).

2.4 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA A CLONAGEM, IDENTIFICAÇÃO E MUTAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA BIOSÍNTESE DE PHAS

Na tabela 2 estão listadas algumas técnicas que costumam ser utilizadas na identificação de genes envolvidos na biossíntese de PHAs. Elas variam na qualidade de resultados e no tempo/estrutura necessário/a para a realização dos procedimentos (REHM e STEINBÜCHEL, 1999). Neste trabalho foram utilizadas as estratégias A, C, D e G descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Estratégias para identificação e clonagem de genes envolvidos na biossíntese de PHAs.

Estratégias	Princípio e método aplicado
A	Análise enzimática
B	Sonda de gene homólogo (hibridização) obtida partir de mutagênese com transposon
C	Sonda de gene heterólogo (hibridização) obtida a partir de fragmentos de DNA de genes conhecidos
D	Conformidade de Oligonucleotídeos (hibridização ou PCR)
E	Oligonucleotídeo delineado com base na sequência N-terminal do aminoácido da enzima
F	Seleção de colônias opacas de microrganismos PHA-negativos que expressam o <i>operon</i> de PHAs heterólogo.
G	Análise da sequência genômica e aplicação da técnica de PCR

FONTE: REHM e STEINBÜCHEL, 1999

2.4.1 ESTUDO DE MUTANTES ALTERADOS NOS GENES DE BIOSÍNTESE DE PHAS

Diversas estratégias para obtenção de mutantes têm sido exploradas para a obtenção de mutantes alterados na síntese de PHAs. Nos estudos de genética clássica, obtenção de mutantes é a chave para identificar genes e entender sua função pela observação da alteração do fenótipo do organismo mutante. Existem trabalhos (STEINBÜCHEL E PIEPER, 1992; VALENTIN et al.,1993; SALOMONI, 2005) onde foram obtidos mutantes, via mutação clássica, alterados na síntese de PHAs.

O isolamento de genes pela técnica do DNA recombinante abriu diferentes abordagens para a mutagênese. Hoje é possível introduzir qualquer alteração (mutação) desejada num gene clonado e determinar o efeito desta modificação, substituindo-se o fragmento de DNA contendo a modificação pelo gene alelo selvagem presente no cromossomo bacteriano.

A introdução de mutação pontual na sequência de DNA que promove a alteração de um resíduo de aminoácido na proteína (também conhecida como

mutação sítio dirigida) envolvida na síntese de PHAs, tem sido bastante explorada (TIAN et al., 2005; ZHENG et al., 2005). Outros tipos de mutações utilizados são a mutagênese randômica, promovida por agentes mutagênicos e/ou promovida por transposons (SIMON et al., 1983; 1AMARA et al., 2002; SOLAIMAN et al., 2003; O'LEARY et al., 2005).

Genes clonados podem ser alterados por muitos procedimentos de mutagênese *in vitro*, que podem levar à introdução de deleções (“knock-out”), inserções (que promovem a interrupção gênica), ou uma simples alteração em um único nucleotídeo (COOPER e HAUSMAN, 2004). No estudo de microrganismos produtores de PHAs, a construção de mutantes “null” contendo deleções (provocadas por “knock-out”) ou inserções (de fragmentos de DNA contendo genes de resistência a antibióticos) em genes envolvidos na biossíntese é uma ferramenta muito utilizada (RODRIGUES et al., 2000b; HANG, et al., 2002; HU et al., 2005). Para a construção destes mutantes primeiramente *in vitro*, é realizada a alteração no gene alvo, e em seguida, esta fusão é introduzida no cromossomo da bactéria, por recombinação homóloga (ÉTIENNE, 2003).

Neste trabalho, dois dos principais genes envolvidos na síntese de PHAs, já clonados e identificados por Rodrigues (2000), foram o foco deste trabalho: *phaA_{BC}* (β -cetotiolase) e *phaC_{BC}* (PHA sintase). A atividade enzimática da enzima PHA sintase foi avaliada tanto em *B. cepacia* IPT64 como na linhagem mutante IPT64 *phaC*, no que diz respeito à sua especificidade.

Ainda, utilizando-se ferramentas de bioinformática, foram buscados genes no genoma seqüenciado de *B. cepacia* AMMD identificados como codificadores de β -cetotiolases biossintéticas, e genes com alta similaridade com a β -cetotiolase já identificada na linhagem IPT64. Esta abordagem permitiu a constatação da existência de vários genes codificadores de tiolases com potencial envolvimento na

síntese de PHAs. O gene *phaA_{Bc}* (codificador de β-cetotiolase já identificado) foi interrompido inserindo-se em seu interior a sequência de DNA *Cm^R*. Este fragmento de DNA foi empregado na transformação genética da linhagem IPT64, obtendo-se um mutante *phaA_{Bc}* “null”. A produção de PHAs foi avaliada. Os resultados sugerem que o gene *phaA_{Bc}* que sofreu o “knock-out” está envolvido com a síntese de unidades HA específicas para a produção de P(3HB), uma vez que a síntese de 3H4PE permanece presente neste novo mutante.

2.5 AS LINHAGENS B. CEPACIA IPT64 E IPT64 PHAC-

A linhagem *Burkholderia cepacia* IPT64 é uma bactéria promissora na síntese de PHAs, pois é capaz de acumular uma blenda de P(3HB) e P(3H4PE) a partir de substratos não relacionados, onde a proporção do monômero 3H4PE é em torno de 1,1% do PHA total acumulado (RODRIGUES, 2000; PEREIRA, 2003; ROCHA, 2007). A insaturação presente no P(3H4PE) permite que este seja submetido a diversas modificações podendo gerar polímeros com propriedades diferentes, aumentando seu campo de aplicação.

Os genes codificadores da via de biossíntese de P(3HB) na linhagem IPT64 foram identificados, clonados, e caracterizados (RODRIGUES, 1995; RODRIGUES et al., 2000a). Dentre os genes identificados, está o que codifica a enzima PHA sintase (*phaC_{Bc}*) com especificidade para polimerização de unidades de 3HB, sendo assim denominada PHB sintase. Rodrigues (2000) gerou um mutante “null” com o gene da PHB sintase interrompido, denominado *phaC*. Este mutante apresentou uma redução de 92 a 94% do conteúdo polimérico total, mas a proporção de unidades 3H4PE aumentou de 5 para 36%, indicando a existência de um outro gene responsável pela formação de unidades de 3H4PE (RODRIGUES, 2000;

RODRIGUES et al., 2000a). A composição monomérica dos PHAs é determinada pela preferência da PHA sintase por um determinado substrato e a disponibilidade do mesmo (GREEN et al., 2002).

Supõem-se que a síntese de P(3H4PE) ocorra por uma via metabólica diferente da usual de P(3HB) onde enzimas com especificidades diferentes estariam envolvidas. Schulz (1983) apresenta duas vias para o metabolismo degradativo do ácido 4-pentenóico em mitocôndria, onde um dos intermediários é uma molécula de 3-hidroxi-4-pentenoil-CoA, que potencialmente poderia ser precursor para a síntese de unidades de 3H4PE (Figura 8).

No metabolismo descrito por Schulz (1983), a molécula 2,4-pentadienoil-CoA pode seguir 2 fluxos: o de maior rendimento, onde a molécula é metabolizada até chegar a propionil-CoA + acetil-CoA; e um outro, de menor rendimento, onde é degradada diretamente via β -oxidação até acril-CoA + acetil-CoA.. Em ensaios enzimáticos *in vitro*, onde o pH é menor que 7, apenas 10% do composto 2,4-pentadienoil-CoA segue a via de β -oxidação, aumentando para 33% quando em pH 7,8 (Schulz, 1983). Esse modelo metabólico explica os resultados obtidos por Salomoni (2005) onde, quando fornecido ácido 4-pentenóico para a linhagem IPT64, obteve-se unidades de 3HB e 3HV, indicando que o ácido foi consumido pela via de maior rendimento

O fato da segunda via ter um baixo rendimento pode ser explicado por diversas razões: a hidratação do 3-hidroxi-4-pentenoil-CoA pela crotonase é termodinamicamente desfavorável; a molécula 3-ceto-4-pentenoil-CoA não é um bom substrato para a 3-cetoacil-CoA tiolase; o composto 3-ceto-4-pentenoil-CoA é um inibidor efetivo da ação da 3-cetoacil-CoA tiolase, tanto no sentido de degradação como no de biossíntese.

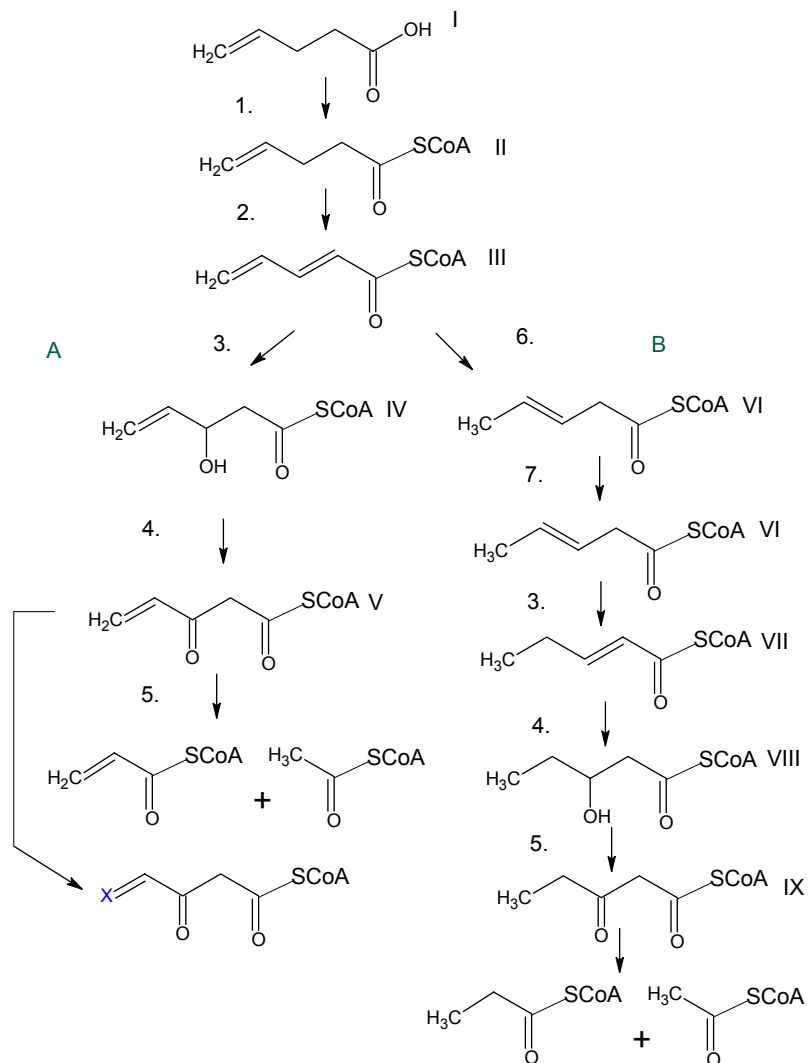


Figura 8 – Via degradativa do ácido 4-pentenóico em mitocôndria. (A) Via de menor rendimento, levando a acrilil-CoA e acetil-CoA. (B) via de maior rendimento, levando a propionil-CoA e acetil-CoA. As enzimas envolvidas na degradação são: (1) acil-CoA sintetase; (2) acil-CoA desidrogenase; (3) crotonase; (4) L-3-hidroxiacil-CoA desidrogenase; (5) 3-cetoacil-CoA tiolase; (6) 2,4-pentadienoil-CoA redutase; (7) *cis*- Δ^3 -*trans*- Δ^2 - enoil-CoA isomerase. (Adaptado de SCHULZ, 1983).

A reação no sentido da biossíntese é a de interesse neste trabalho, pois levaria ao precursor de 3H4PE. Para a reação de biossíntese Schulz (1983) propôs que a formação do complexo enzima-substrato é feita por uma ligação forte do substrato ao sítio ativo da enzima, inibindo a enzima completamente e de maneira irreversível. Essa inibição irreversível pode ser consequência de diferentes reações entre a enzima e o inibidor, como p. ex.: (a) uma ligação covalente entre toda a molécula do inibidor e a enzima; ou, (b) a formação da ligação covalente entre a enzima e o resíduo acrilil derivado do 3-ceto-4-pentenoil-CoA (SCHULZ, 1983).

Alguns trabalhos em biorreatores, onde diferentes condições de cultivo e diferentes substratos foram testados (PEREIRA, 2003; ROCHA, 2007). Conseguiu-se aumentar a proporção do monômero P(3H4PE) em até 1,6% no PHA total acumulado. Já Salomoni (2005), ao fornecer ácido 4-pentenóico à linhagem constatou que este substrato, relacionado à síntese de P(3H4PE) em *R. rubrum* (LENZ et al., 1990; ULMER et al., 1994; BALLISTRERI et al., 1995), não é um precursor direto para a síntese deste polímero em *B. cepacia* IPT64. Salomoni (2003) obteve três mutantes que além de 3HB e 3HV também se mostraram capazes de acumular 3H4PE, a partir do ácido 4-pentenóico.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir:

a) A produção da enzima PHA sintase específica para unidades de 3HB não é expressa na linhagem mutante *B. cepacia* IPT64 *phaC*;

b) No genoma de *B. cepacia* foram encontradas várias sequências de aminoácidos com alta similaridade da enzima β -cetotiolase. Estas proteínas estar envolvidos no acúmulo de unidades não usuais de PHAs;

c) O gene *phaA3*, similar ao gene *bktB* de *C. necator*, encontrado nos genomas de *B. cepacia*, de *B. cenocepacia* e *B. ambifaria* encontra-se a mais de 1 Mb de distância do *operon* identificado como principal na síntese de PHAs nestas bactérias. Nas demais espécies de *Burkholderia*, este gene aparece a cerca de 5 Kb de distanciado principal *operon* de síntese de PHAs, como em *C. necator*;

d) O gene codificante para a proteína PHAsina aparece em um *operon* distinto do identificado como principal de síntese de PHAs nas espécies *B. cepacia*, de *B. cenocepacia* e *B. ambifaria*.

e) Em todos os genomas completos das bactérias do gênero *Burkholderia*, é encontrado, pelo menos, um *operon* claramente envolvido na síntese de PHAs;

f) A inativação do gene *phaA_{BC}* na linhagem IPT64 levou ao total bloqueio da síntese de 3HB, mas monômeros de 3H4PE ainda foram detectados por cromatografia gasosa. Apesar da síntese de unidades 3HB ter sido bloqueada, a síntese de unidades 3H4PE manteve-se presente, embora reduzida. Este dado indica que não há uma ligação direta entre as vias de produção de 3HB e 3H4PE, pois o bloqueio da síntese do primeiro não alterou a síntese do segundo.

REFERÊNCIAS¹

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DO PLÁSTICO ABIPLAST. Perfil da Indústria Brasileira de transformação de material plástico 2007. São Paulo: ABIPLAST, 2007.

ALMEIDA, A.; NIKEL, P.; GIORDANO, A.; MENDEZ, B.; PETTINARI, J. Effect of the granule associated protein phasin (PhaP) on cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) accumulation from glycerol in bioreactor cultures of recombinant *E. coli*. **J. Biotechnol.**, v. 131, n. 2, S167, 2007. Suppl. 1.

AMARA, A.A.; STEINBUCHER, A.; REHM, B.H. *In vivo* evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 4-5, p.477-82, 2002.

ARRUDA-CAULKINS, J. C. ; ROCHA, R.C.S.; PRADELLA, J. G. C.; VICENTE, E.J.; RODRIGUES, M. F. A. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BIOLOGICAL POLYESTERS, 8., 2006, Minneapolis. **Abstracts...** Minnesota: ISBP, 2006.(CD-ROM)

AUSUBEL, E.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1987.

BALLISTRERI, A.; MONTAUDO, G.; IMPALLOMENI, G.; LENZ, R.W.; ULMER, H.W.; FULLER, R.C. Synthesis and characterization of polyesters produced by *Rhodospirillum rubrum* from pentenoic acid. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 28, p. 3664-3671, 1995.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEAR, M.; LÉBOUCHER-DURAND, M.; LANGLOIS, V.; LENZ, R.W.; GOODWIN, S.; GUÉRIN, P. Bacterial poly-3-hydroxyalkanoates with epoxy groups in the side chains. **React. Funct. Polym.**, v. 34, p. 65-77, 1997.

BIRNBOURIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 48-54, 1976.

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

BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M.; SHORT, J.M. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. **J. Biotechnol.**, v. 5, p. 376-379, 1987.

CENTRO BRASIL ARGENTINA DE BIOTECNOLOGIA. **Polímeros Biodegradables Bacterianos Genética y biología molecular**. Realização Centro Argentino Brasileiro de Biotecnologia, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Deutscher Akademischer Austauschdienst, Fac. Ciências Exactas y naturales, Univ. de Buenos Aires. Buenos Aires, 1993.

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. Biodegradable polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 23, n. 7, p. 1273-1335, 1998.

CHEN, G.Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v. 26, p. 6565-6578, 2005.

COOPER, G.M.; HAUSMAN, R.E. **The cell: a molecular approach**. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, 2004.

DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Adv. Microbiol. Physiol.**, v.10, p.135-266, 1973.

De WAARD, P.; VAN DER VAL, H.; HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, G. Heteronuclear NMR analysis of unsaturated fatty acids in poly(3-hydroxyalkanoates): study of beta-oxidation in *Pseudomonas putida*. **J. Biol. Chem.**, v.268, p. 315-319, 1993.

DIAS, J.M.; LEMOS, P.C.; SERAFIM, L.S.; OLIVEIRA, C.; EIROA, M.; ALBUQUERQUE, M.G.; RAMOS, A.M.; OLIVEIRA, R.; REIS, M.A. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: from the substrate to the final product. **Macromol. Biosci.**, v.6, n. 11, p. 885-906, 2006.

DIAS, S. Plásticos biodegradáveis: soluções integradas para a área ambiental. **Rev. Conecta**, p. 72-73, jun., 2008

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

ÉTIENNE, J. **Bioquímica Genética e Biologia Molecular**. 6 ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2003.

FAAN, Y-W; Yu, M.; TSANG, J.S.H. Blue-white selection of regulatory genes that affect the expression of dehalogenase *Iva* of *Burkholderiacepacia* MBA4. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V.76, p.429-437, 2007.

FONSECA, G. G.; ARRUDA-CAULKINS, J.C.; ANTONIO, R. V. Production and characterization of poly-(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* grown on cheap renewable carbon substrates. **Waste Manag. Res.**, v. 26, p. 1-7, 2008

FRITZSCHE, K.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. Bacterial polyesters containing branched poly(b-hydroxyalkanoate) units. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 12, p. 92-101, 1990a.

FRITZSCHE, K.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. Production of unsaturated polyesters by *Pseudomonas oleovorans*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 12, p. 85-91, 1990b.

FUKUI, T.; YOSHIMOTO, A.; MATSUMOTO, M.; HOSOKAWA, S.; SAITO, T.; NISHIKAWA, H.; TOMITA, K. Enzymatic synthesis of poly- β -hydroxybutyrate in *Zoogloea ramigera*. **Arch. Microbiol.**, v. 110, p. 149-156, 1976.

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

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

HAAPALAINEN, A.M.; MERILÄINEN, G.; WIERENGA, R.K. The thiolase superfamily: condensing enzymes with diverse reaction specificities. **Trends Biochem. Sci.**, v. 31, n^o 1, p. 64-71, 2006.

HANG, X.; CHEN, J.; WANG, G.; HONG, K.; CHEN, G.Q.; Polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* YS1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 212, n. 1, p.71-5, 2002

HARRISON, S.T.L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnol. Adv.**, v. 9, p.217-240, 1991.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. Accumulation of polyhydroxyalkanoates by bacteria and the substrate specificities of the biosynthetic enzymes. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 60, p. 1046-1047, 1988a.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 91-96, 1988b.

HOFFMAN, N.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B.H.A. The *Pseudomonas aeruginosa* *phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, p. 253-259, 2000.

HU, F.Q.; YOU, S.; CHEN, G.Q. Synthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (mcl PHA) in type I PHA synthase negative mutant of *Aeromonas hydrophila*. **Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao**, v.21, n.4, p. 524-9, 2005.

HUIJBERTS, G.N.M.; EGGINK, G.; WAARD, P.; HUISMAN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturate and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 536-544, 1992.

HUIJBERTS, G.N.M.; DE RIJK, T.C.; De WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v.176, p. 1661-1666, 1994.

HUISMAN, G.W.; WONINK, E.; MEIMA, E.; KAZEMIER, B.; TERPSTRA, P.; WITHOLT, B.. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas*

oleovorans. Identification and sequences of genes nad function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 2191-2198, 1991.

KALIA, V.C.; LAL, S.; CHEEMA, S. Insight in to the phylogeny of polyhydroxyalkanoate biosynthesis: horizontal gene transfer. **Gene**, v. 389, p. 19-26, 2007.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochem.**, v. 40, n. 2, p.607-619, 2004.

KIM, B.S.; CHANG, H.N. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysates by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnol. Tech.**, v. 9, p. 311-314, 1995.

KIM, B.S.; CHANG, H.N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from starch by *Azotobacter chroococcum*. **Biotechnol. Lett.**, v.20, p. 109-112, 1998.

KOVACH, M.E.; PHILLIPS, R.W; ELZER, P.H.; ROOP, R.M.; PETERSON, K.M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. **Biotechniques**, v. 16, p. 800-802, 1994.

LAFFERTY, R.M.; KORSATKO, B.; KORSATKO, W. Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid. In: RHEM, H.J.; REED, G. (Ed.). **Biotechnology**. Weinheim: VCH., 1988. v. 6b, p.136-176.

LEE, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 49, p. 1-14, 1996.

LEE, H.J.; CHOI, M. H.; KIM, T.U.; YOON, S.C. Accumulation of polyhydroxyalkanoic acid containing large amounts of unsaturated monomers in *Pseudomonas fluorescens* BM07 utilizing saccharides and its inhibition by 2-bromooctanoic acid. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 11, p. 4963–4974, 2001.

LEE, S.Y.; PARK, S.J.; PARK J.P.; LEE, Y.; LEE, S.H. Economic aspects of biopolymer production. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.). **Biopolymers**. Münster: Wiley-VCH, 2003. v.10: General aspects and Special Applications.

LEMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerisation de l'acide β -oxybutyrique. **Bull. Soc. Chim. Biol.**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LENZ, R.W.; KIM, B.W.; ULMER, H.W.; FRITZSCHE, K.; KNEE, E.; FULLER, R.C. Functionalized poly- β -hydroxyalkanoates produced by bacteria. In: DAWES, E.A. (ed) Novel biodegradable microbial polymers. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. p.23-35.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, G. N.; OLIVERA, E.R. Bioplastics from microorganisms. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, p. 251-260, 2003.

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.

MOLINARI, D. PHB industrial. Disponível em <<http://www.inovacao.unicamp.br/pipe/report/061030-phb.shtml>>. Acesso em: 01 jun. 2008.

MARTIN, D.P.; WILLIAMS, S.F. Medical applications of 4-polyhydroxybutirate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochem. Eng. J.**, v.16, n. 2, p. 97-105, 2003.

McCARTHY, A. Metabolix, Inc. and Tepha, Inc.: Bioplastics for industry and medical devices. **Chem. Biol.**, v.10, p. 893-894, 2003.

MULLER, R.J.; KLEEBER, I.; DECKWER, W.D. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. **J. Biotechnol.**, v.86, p. 87-95, 2001.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H.G. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239-248, 1973.

OKADA, M. Chemical syntheses of biodegradable polymers. **Prog. Polym. Sci.**, v. 27, p. 87-133, 2002.

O'LEARY, N.D.; O'CONNOR, K.E.; WARD, P.; GOFF, M.; DOBSON, A.D. Genetic characterization of accumulation of polyhydroxyalkanoate from styrene in *Pseudomonas putida* CA-3. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.71, n. 8, p.4380-7, 2005.

PANTAZAKI, A.A.; IOANNOU, A.K.; KYRIAKIDIS, D.A. Athermostable β -ketothiolase of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in *Thermus thermophilus*: Purification and biochemical properties. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 269, p.27-36, 2005.

PATEL, S.S.; WALT, D.R. Substrate specificity of acetyl Coenzyme A Synthetase. **J. Biol. Chem.**, v. 262, n. 15, p. 7132-7134, 1987.

PEREIRA, F. S. **Melhoramento da produção de poli-3-hidroxi-4-pentenoato (PHPE) por *Burkholderia cepacia* IPT64 a partir de sacarose**. 146 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003a.

PIEPER, U. **Biosynthese eines copolymers aus 3-hydroxybuttersäure und 3-hydroxyvaleriansäure in *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126: physiologische, molekular - genetische und biochemische Untersuchungen**. 180 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia, Universidade de Göttingen), Alemanha, 1993.

POHLMANN, A.; FRICKE, W.F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; EWERING, C.; PÖTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOB, I.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A.; FRIEDRICH, B.; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nat. Biotechnol.**, v. 24, n. 10, p. 1257-1262, 2006.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. **Biomacromolecules**, v.6, p.552-560, 2005.

RAMSAY, J.A.; BERGER, E.; VOYER, R.; CHAVARIER, C.; RAMSAY, B. A. extraction of poly-3-hydroxybutyrate using chlorinated solvents. **Biotechnol. Tech.**, v. 8, p. 589-94, 1994.

RAMSAY, B.A.; SARACOVAN, I.; RAMSAY, J.A.; MARCHESSAULT, R.H. Continuous production of long-side chain poly- ω -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p. 625-629, 1991.

REDDY, C.S.K.; GHAI, R.; RASHMI; KALIA, V.C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresour. Technol.**, v. 87, p. 137-146, 2003.

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

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

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

REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 3-19, 1999.

REHM, B.H.A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 24044-24051, 1998.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly-3-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R.S. **Estudo da biossíntese de poli-3-hidroxi-4-pentenoato em *Burkholderia cepacia***. 94 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RODRIGUES, M.F.A. **Isolamento e Caracterização de bactérias quanto à produção de polihidroxialcanoatos (PHAs) e clonagem dos genes de biossíntese de PHAS de *Burkholderia* sp.** 149 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

RODRIGUES, M.F.A. **Estudo da biossíntese de polihidroxialcanoatos (PHAs) em *Burkholderia cepacia* linhagem IPT64.** 130 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

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

RODRIGUES, M.F.A.; VALENTIN, H.E.; BERGER, P.A.; TRAN, M.; ASRAR, J.; GRUYS, K.J.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate accumulation in *B. cepacia*: a molecular approach to elucidate the genes involved in the formation of two homopolymers consisting of short-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 453-460, 2000a.

RODRIGUES, M.F.A.; VICENTE, E.J.; STEINBÜCHEL, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. **FEMS Microbiol. Lett.**, 2000b.

SALOMONI, R. **Obtenção de mutantes de *Burkholderia cepacia* deficientes no consumo de ácido 4-pentenóico visando a produção de polihidroxialcanoatos insaturados**. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHULZ, H. Metabolism of 4-pentenoic acid and Inhibition of thiolase by Metabolites of 4-pentenoic acid. **Biochemical**, v. 22, p. 1827-1832, 1983.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnol. Adv.**, v.26, p. 246-265, 2008.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S.; ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. **Rev. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 1992.

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

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria, **Biotechnol./Technol.**, v. 1, p. 784-791, 1983.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M. DALLA. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends Food Sci. Technol.**, 2008. In press.

SLATER, S.; HOUMIEL, K.L.; TRAN, M.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, N.B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K.J. Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 1979-1987, 1997.

SOLAIMAN, D.K.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A.. Effect of inactivation of poly(hydroxyalkanoates) depolymerase gene on the properties of

poly(hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas resinovorans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.62, n 5-6, p.536-43. 2003.

SPINACÉ, M. A. da S.; De PAOLI, M. A. A tecnologia da reciclagem de polímeros. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 65-72, 2005.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para a produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) por bactérias. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 615-622, 2004.

STEINBÜCHEL, A. PHB and other Polyhydroxyalkanoic acids. In: REHM, H.J.; REED, G. ROEHR, M. (Ed.). **Products of primary metabolism**. 2nd. Ed. Nova York: Willey: John & Sons, 1996. v.6, p. 405-464.

STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Tibtechnology**, v. 16, p. 419-427, 1998.

STEINBÜCHEL, A.; HUSTEDE, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H.E. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 103, p. 217-230, 1992.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Bioch. Eng. J.**, v. 16, p.81–96, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by mutant of *Alcaligenes eutrophus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.37, p.1-6, 1992.

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

STUBBE, J.; TIAN; J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. **Nat. Prod. Rep**, v. 20, p. 445-457, 2003.

STUBBE, J.; TIAN; J.; HE, A.; SINSKEY, A.J.; LAWRENCE, A.G.;LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: Polyhydroxyalkanoate synthases as a Paradigm. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 74, p. 433-480, 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p.1508-1555, 2000.

TIAN, J.; SINSKEY, A.J.; STUBBE, J., Detection of intermediates from the polymerization reaction catalyzed by a D302A mutant of class III polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase. **Biochemistry**, v. 44, n. 5, p.1495-503, 2005

TOKIWA, Y; UGWU, C.U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. **J. Biotechnol.**, v.132, n.3, p.264-272, 2007.

TSUGE, T.; TAGUCHI, K.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 195-205, 2003.

ULMER, H.W.; GROSS, R.A.; POSADA, M.; WEIBACH, P.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W. Bacterial production of poly (β -hydroxyalkanoates) containing unsaturated repeating units by *Rhodospirillum*. **Macromolecular**, v. 27, p. 1675-1679, 1994.

VALAPPIL, S.P.; MISRA, S.K.; BOCCACCINI, A.R.; ROY, I. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates: an overview of animal testing and in vivo responses. **Expert Rev. Med. Devices**, v.3, p.853-68, 2006

VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.J.; HERNIMAN, J.M.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **J. Biotechnol.**, v.127, p. 475-487, 2007a.

VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.91, p. 1-17, 2007b.

VALENTIN, H.E.; BERGER, P.A.; GRUYS, K.J.; RODRIGUES, M.F.A.; STEINBÜCHEL, A.; TRAN, R.; ASRAR, J. Biosynthesis and characterization of Poly(3-hydroxy-4-pentenoic acid). **Macromolecular**, v. 32, p. 7389-7395, 1999.

VALENTIN, H.E.; SCHÖNEBAUM, A.; STEINBÜCHEL, A. Molar fraction of 4-hydroxyvaleric acid in polyhydroxyalkanoates of *Alcaligenes eutrophus* can be increased by mutagenesis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 1992, Göttingen. **Proceedings ...** Schlegel, H.G. and Steinbüchel, A. (eds.), Alemanha (Göttingen): Gotze- Druck, 1993, p. 404-405.

VALENTIN, H.E.; STEINBÜCHEL, A. Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases structural gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 699-709, 1994.

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

WILLIAMS, S..F.;MARTIN, D.P. Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In: STEINBÜCHEL, A. (Ed.) **Biopolymers**. Münster: Wiley-VCH, 2003. v.4: Polyesters III: Applications and commercial products.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry**. 5th ed. New York: Cambridge University Press, 2001.

YORK, G.M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A.J. New insight into the role of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. **J. Bacteriol.**, v.183, n 7, p. 2394-2397, 2001.

ZHENG, L.Z.; LI, Z.; TIAN, H.L.; LI, M.; CHEN, G.Q. Molecular cloning and functional analysis of (R)-3-hydroxyacyl-acyl carrier protein: coenzyme A transacylase from *Pseudomonas mendocina* LZ. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.252, n. 2, p. 299-307, 2005.