

GUILHERME SANTOS DE OLIVEIRA

Produção e controle da composição monomérica de P3HB-co-3HV por *B. sacchari* recombinante afetada no ciclo do 2-Metilcitrato empregando xilose e propionato.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2020

GUILHERME SANTOS DE OLIVEIRA

Produção e controle da composição monomérica de P3HB-co-3HV por *B. sacchari* recombinante afetada no ciclo do 2-Metilcitrato empregando xilose e propionato.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

Versão original

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)

Santos de Oliveira, Guilherme
Produção e controle da composição monomérica de
P3HB-co-3HV por *B. sacchari* recombinante afetada no
ciclo do 2-Metilcitrato empregando xilose e
propionato. / Guilherme Santos de Oliveira;
orientador Luiziana Ferreira da Silva. -- São
Paulo, 2020.
135 p.

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

1. PHA. 2. P3HB-co-3HV. 3. *Burkholderia*
sacchari. 4. 2-metilcitrato. 5. Xilose. I. Ferreira
da Silva, Luiziana, orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Guilherme Santos de Oliveira

Título da Dissertação: Produção e controle da composição monomérica de P3HB-co-3HV por *B. sacchari* recombinante afetada no ciclo do 2-Metilcitrato empregando xilose e propionato.

Orientador: Luiziana Ferreira da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, 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 1037/2019 referente ao projeto intitulado: "Produção e controle da composição monomérica de P3HB-co-3HV por B. Sacchari recombinante afetada no ciclo de 2-metilcitrato empregando xilose e propionato" sob a responsabilidade de *Guilherme Santos de Oliveira* 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 CEPESH - 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 466/2012.

São Paulo, 03 de setembro de 2019.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. Camila Squarzoni Dale
Coordenadora CEPESH ICB/USP

À minha família que sempre me apoiou

AGRADECIMENTO

Gratidão é um sentimento muito grande para ser expresso em algumas palavras mas espero conseguir representar, mesmo que um pouco, o sentimento a todos que estiveram comigo durante essa jornada.

Agradeço a Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva por ter me dado a oportunidade de fazer parte do grupo de trabalho, me orientando de maneira incrível, aceitando vencer comigo o desafio com o qual cheguei o laboratório. Também agradeço imensamente por todas as oportunidades que tive de melhorar muito como profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez por toda a orientação, conselhos durante o projeto e também ter acreditado em mim, assim como a professora Luiziana fez, para realizar um bom trabalho dentro do prazo que tinha.

A minha mãe, Luciene dos Santos, a qual sem seu esforço ininterrupto eu hoje não seria metade da pessoa e profissional que eu sou. Que sempre acredita ser possível mesmo quando as adversidades dizem o contrário, lutando muito para me dar as oportunidades que nunca teve na vida.

Ao meu pai, Francisco Carlos de Oliveira, que sempre esteve presente na minha vida, fazendo tudo além do seu limite para eu me tornar uma pessoa de bem e trilhar o caminho certo. Você é um espelho para o tipo de homem e pai que eu sempre busquei ser.

Em memória dos meus amados familiares, meu avô, Pedro Alves de Oliveira, e do meu padrinho Pedro Alves de Oliveira Junior, que me apoiaram em todos os meus momentos e que infelizmente o destino os levou durante essa minha jornada, não permitindo estarem aqui para presenciarem essa minha conquista. Vocês nunca sairão da minha memória e seguem colaborando para eu me tornar uma pessoa melhor.

A amiga Claudia Freire por um dos melhores conselhos que eu já recebi, sendo crucial para uma excelente mudança na minha vida.

Agradeço muito ao Pedro Henrique Santos Oliveira cujo apoio nos biorreatores, cromatogramas e outras rotinas do laboratório, foi essencial para realização desse trabalho. Obrigado Pedro, sem sua ajuda e amizade o caminho para realização desse trabalho teria sido muito penoso.

Aos amigos Sofia Alejandra López Chávez e Jefferson Gonçalves Pinheiro Silva que muito me ajudaram durante a realização dos ensaios em biorreatores e durante as várias madrugadas que passamos acordados. Suas amizades são muito importantes para mim.

Agradeço a Dra. Marilda Keico Taciro pela ajuda na análise dos resultados dos biorreatores.

Aos amigos do grupo do laboratório de bioprodutos:

Amanda Flora, Rosmary Rebaza, Edmar Ramos, Jung Park, Aline Lemos que me acolheram muito bem quando cheguei ao grupo.

Melissa Thais, Franz Laurett, Rui Alencar, Raoni Kempfer que passaram a integrar o grupo e se tornaram meus bons amigos.

Aos muitos amigos do laboratório de bacteriologia do Instituto Butantan e do PAP, como Vaniky Duarte, Abraham Omar, Daniella Courrol e muitos outros que faltariam páginas para listar. Muito obrigado por todos os momentos que passamos juntos, sejam os bons ou complicados onde não faltou apoio.

A Carolina Nunes Santos por estar sempre ao meu lado me apoiando, sendo um dos pilares que me ajudaram a seguir com força esse caminho e que passou a estar presente em todos os meus momentos.

A minha tia Bárbara Júlia Menezello Leitão por toda a luz, conselho e companheirismo que me presenteou durante essa minha caminhada.

A minha família e amigos que estiveram comigo em todos os momentos, colaborando para me tornar quem eu sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Na juventude aprendemos, na velhice compreendemos.”

Marie von Ebner-Eschenbach

RESUMO

OLIVEIRA, G. S. **Produção e controle da composição monomérica de P3HB-co-3HV por *B. sacchari* recombinante afetada no ciclo do 2-metilcitrato empregando xilose e propionato.** 2020. 135 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Burkholderia sacchari é uma bactéria isolada de solo, no Brasil, capaz de produzir o copolímero poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV), um copolímero que é biodegradável e biocompatível. Essa produção ocorre quando *B. sacchari* é suprida com açúcares e propionato, estando em meio com carência de algum nutriente essencial (como o nitrogênio). Diversos estudos foram desenvolvidos empregando sacarose ou glicose como fonte de carbono para produzir biopolímeros com esta bactéria. Diante da perspectiva de haver grande disponibilidade de xilose como resíduo da produção de etanol de segunda geração, esse substrato é interessante para geração de novos produtos, dentre os quais, P3HB-co-3HV. Usualmente, propionato fornecido como cosubstrato é convertido a 3HV de modo pouco eficiente pelas bactérias. Para melhorar a eficiência de conversão de propionato a 3HV ($Y_{HV/prp}$), foram construídas linhagens recombinantes afetadas em genes do ciclo do 2 metilcitrato (2MCC), principal via que compete com a biossíntese do polímero. Nesse contexto, este trabalho estudou a produção de P3HB-co-3HV por uma dessas linhagens, em frascos agitados, a partir de xilose (15g/L), frente a diferentes concentrações de propionato (0,1-1,2 g/L). Experimentos em biorreator (3L) foram conduzidos empregando-se uma alimentação com vazão constante (0,15ml/min), de soluções de xilose e propionato, nas proporções de 15:1, 8:1, 6:1, 4:1, 3:1. Avaliou-se o impacto destas diferentes concentrações e proporções sobre a composição monomérica do produto final, esperando-se obter dessa forma um copolímero com diferentes teores de 3HV, de modo a controlar a composição monomérica, essenciais na definição das propriedades e aplicações do copolímero. Foi possível controlar o teor de 3HV no copolímero, tendo-se obtido de 10-40%. Os teores de PHA obtidos em função da biomassa total alcançaram valores de 48%.

Palavras chave: PHA. P3HB-co-3HV. *Burkholderia sacchari*. 2-metilcitrato. Xilose.

ABSTRACT

OLIVEIRA, G. S. **Production and control of the monomeric composition of P3HB-co-3HV by *B. sacchari* recombinant affected in the cycle of 2-methylcitrate employing xylose and propionate.** 2020. 135 p. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Burkholderia sacchari is a soil-isolated bacterium capable of producing the poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) copolymer, a copolymer that is biodegradable and biocompatible. This production occurs when *B. sacchari* is supplied with sugars and propionate, being in the middle lacking some essential nutrients (such as nitrogen). Several studies have been carried out using sucrose or glucose as carbon source to produce biopolymers with this bacterium. In view of the high availability of xylose as a residue from the production of second generation ethanol, this substrate is interesting for the generation of new products, among which, P3HB-co-3HV. Usually, propionate provided as a co-substrate is converted to 3HV inefficiently by the bacteria. To improve the efficiency of conversion of propionate to 3HV ($Y_{HV/prop}$), affected recombinant strains were constructed in 2-methyl-citrate (2MCC) cycle genes, the main route competing with polymer biosynthesis. In this context, this work studied the production of P3HB-co-3HV by xylose (15g / L), in different shake flasks, against different concentrations of propionate (0.1-1 g / L). Experiments in bioreactor (3L) were conducted using a constant flow feed (0.15ml / min) of xylose and propionate solutions, in the ratios of 15: 1, 8: 1, 6: 1, 4: 1, 3: 1. The impact of these different concentrations and proportions on the monomer composition of the final product was evaluated and a copolymer of different 3HV contents was expected to control the monomer composition essential for the definition of properties and applications of the copolymer. The content of 3HV in the copolymer could be controlled to 10-40%. The PHA obtained as a function of the total biomass reached values of 48%.

Key words: PHA. P3HB-co-3HV. Copolymers. *Burkholderia sacchari*. 2-methylcitrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos polihidroxicanoatos (PHA) no seu interior.	25
Figura 2: Fórmula química geral dos PHA.	26
Figura 3: Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano	26
Figura 4: Via metabólica de síntese de PHB a partir de carboidratos	27
Figura 5: Via metabólica de síntese de P3HB-co-3HV a partir de ácido propiônico.....	28
Figura 6: Principais vias descritas para o catabolismo de ácido propiônico.....	35
Figura 7: Via da conversão de 2-metilcitrato no catabolismo de propionato	36
Figura 8: Principais genes do operon prp envolvido no catabolismo de propionato em <i>B.sacchari</i> LFM101	37
Figura 9: Ciclo do ácido 2-metilcítrico (2MCC)	38
Figura 10: O operon prp de <i>Burkholderia sacchari</i>	40
Figura 11: Esquema ilustrando o ensaio de cultivo em frascos agitados para acúmulo de PHA em meio mineral (MM) com xilose e propionato.....	46
Figura 12: Esquema ilustrando o ensaio de cultivo em biorreator para acúmulo de PHA em meio mineral (MM)	47
Figura 13: Nitrogênio consumido pelas duas linhagens testadas, durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA.	51
Figura 14: Xilose presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem selvagem, LFM101.....	52
Figura 15: Xilose presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem mutante, LFM019.....	52
Figura 16: Propionato presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem selvagem, LFM101.....	53
Figura 17: Propionato presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem mutante, LFM019.....	54
Figura 18: Quantidade de massa seca celular, em g/L, gerada nas primeiras 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	56
Figura 19: Porcentagem de PHA na massa seca celular, gerada nas primeiras 24h do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.	56
Figura 20: Quantidade de massa de PHA, em g/L, gerada nas primeiras 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	57

Figura 21: Fator de conversão de xilose em 3HB calculado nas primeiras 24h do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	57
Figura 22: Massa residual, em g/L, gerada nas primeiras 24h do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.	58
Figura 23: Fator de conversão de xilose em massa residual calculado nas primeiras 24h do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	58
Figura 24: Quantidade de propionato consumido no intervalo entre 24 e 72h do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.....	61
Figura 25: Quantidade de massa seca celular, em g/L, gerada ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	61
Figura 26: Porcentagem de PHA contido na massa seca celular gerada ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	62
Figura 27: Porcentagem de 3HB contido na quantidade de PHA gerado ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.....	64
Figura 28: Porcentagem de 3HV contido na quantidade de PHA gerado ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	64
Figura 29: Comparação da composição do copolímero entre a %de 3HB e 3HV presentes ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	65
Figura 30: Massas de PHA geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.....	67
Figura 31: Massas residuais geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens.....	67
Figura 32: Massas de HB geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	68
Figura 33: Massas de HV geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	69
Figura 34: Comparação da composição do P3HB-co-3HV quanto as massas de 3HB e 3HV presentes ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	69
Figura 35: Fator de conversão de xilose em 3HB calculados ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	71
Figura 36: Fator de conversão de propionato em 3HV calculados ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens	72

Figura 37: Comparação do fator de conversão de xilose em 3HB entre 24 e 72h para linhagem selvagem	73
Figura 38: Comparação do fator de conversão de xilose em 3HB entre 24 e 72h para a linhagem mutante	73
Figura 39: Comparação do fator de conversão de xilose em Xr entre 24 e 72h para a linhagem selvagem.....	74
Figura 40: Comparação do fator de conversão de xilose em massa residual entre 24 e 72h para a linhagem mutante.....	74
Figura 41: Comparação da massa seca celular detectadas entre 24 e 72h para a linhagem selvagem.....	75
Figura 42: Comparação da massa seca celular detectadas entre 24 e 72h para a linhagem mutante.....	76
Figura 43: Comparação da porcentagem de PHA na massa seca celular entre 24 e 72h para a linhagem selvagem.....	77
Figura 44: Comparação da porcentagem de PHA na massa seca celular entre 24 e 72h para a linhagem mutante.	77
Figura 45: Comparação da massa de PHA detectada entre 24 e 72h para a linhagem selvagem.....	78
Figura 46: Comparação das massas de PHA detectadas entre 24 e 72h para a linhagem mutante	78
Figura 47: Comparação das massas residuais detectadas entre 24 e 72h para a linhagem selvagem	79
Figura 48: Comparação das massas residuais detectadas entre 24 e 72h para a linhagem mutante	79
Figura 49: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose 0,9g/h.	83
Figura 50: Fonte de carbono presente no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.	84
Figura 51: Fonte de carbono consumida meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.	84
Figura 52: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.....	85

Figura 53: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose 0,9g/h.	86
Figura 54: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	87
Figura 55: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	88
Figura 56: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	88
Figura 57: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	89
Figura 58: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	90
Figura 59: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.	91
Figura 60: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.	93
Figura 61: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.	94
Figura 62: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.	94

Figura 63: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.....	95
Figura 64: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.....	96
Figura 65: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.....	97
Figura 66: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	98
Figura 67: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	99
Figura 68: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	99
Figura 69: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	101
Figura 70: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	102
Figura 71: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.....	103

Figura 72: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	104
Figura 73: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	105
Figura 74: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	105
Figura 75: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	107
Figura 76: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	107
Figura 77: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de PHA sintase.....	29
Tabela 2: Propriedades mecânicas e físicas dos diferentes polímeros.	31
Tabela 3: Linhagens utilizadas neste trabalho..	43
Tabela 4: Média dos resultados obtidos no tempo ensaio em frascos agitados para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores de xilose presente no meio, quantidade de massa seca celular (MSC) obtida, porcentagem de PHA na massa seca, mol% de 3HB, massa PHA, Xr (Massa residual), fatores de conversão de xilose em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e em Xr ($Y_{X/xil}$)	55
Tabela 5: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados (após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores de xilose presente no meio, propionato presente no meio, quantidade de massa seca celular (MSC) obtida, porcentagem de PHA na massa seca (%MSC), porcentagem de 3HB na massa de PHA (3HB mol%) e porcentagem de 3HV na massa de PHA (3HV mol%).	60
Tabela 6: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados (após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores das massas de PHA, massa residual, massa de 3HV e massa de 3HB.....	66
Tabela 7: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados(após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores dos fatores de conversão de propionato em HV ($Y_{HV/Prop}$), fatores de conversão de xilose em HB ($Y_{HB/Xil}$) e fatores de conversão de xilose em massa residual ($Y_{X/Xil}$)	71
Tabela 8: Porcentagem de PHA, 3HBmol%, 3HVmol% e $Y_{HV/prop}$ obtidos por diferentes autores, com fontes de carbono variadas em frascos agitados.	80
Tabela 9: 3HBmol%, 3HVmol% e $Y_{3HV/prop}$ obtidos por diferentes autores, com fontes de carbono, e proporções entre elas, variadas em biorreatores.	116

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 PLÁSTICOS BIODEGRADÁVEIS	24
2.2 POLIHIDROXIALCANOATOS	24
2.3 SÍNTESE DE PHA POR CÉLULAS BACTERIANAS	26
2.3.1 <i>PHA SINTASE</i>	29
2.3.2 <i>SÍNTESE DOS MONÔMEROS DE CADEIA CURTA E MÉDIA</i>	30
2.4 COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA ASSOCIADA ÀS PROPRIEDADES DOS PHA	30
2.5 APLICAÇÕES DO COPOLÍMERO P (3HB-co-3HV).....	31
2.6 USO DA XILOSE PARA PRODUÇÃO DE PHA.....	32
2.7 PROPRIEDADES DO PROPIONATO.	33
2.8 METABOLISMO DO ÁCIDO PROPIONICO.....	34
2.8.1 <i>CATABOLISMO DE PROPIONATO EM BURKHOLDERIA SACCHARI</i>	36
2.9 PRODUÇÃO DE P (3HB-co-3HV) POR B.SACCHARI.	38
2.9.1 <i>OBTENÇÃO MUTANTES POR MUTAÇÃO SÍTIO ESPECÍFICA</i>	40
2.9.2 <i>MELHORIA NA PRODUÇÃO DE HV POR B. SACCHARI RECOMBINANTE</i>	41
3 OBJETIVOS	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS.....	43
4.2 MEIOS DE CULTURA	43
4.2.1 MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS	43
4.2.2 MEIOS DE CULTURA PARA CULTIVOS EM BIORREATORES	44
4.3 EXPERIMENTOS EM FRASCO AGITADOS	45
4.4 EXPERIMENTOS EM BIORREATORES	46
4.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLÍMEROS.....	47
4.6 METODOLOGIAS ANALÍTICAS	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 ENSAIO EM FRASCOS AGITADOS	50

5.1.1 DOSAGENS DE NITROGÊNIO, XILOSE E PROPIONATO.....	50
5.1.2 DOSAGENS DAS FONTES DE CARBONO.....	51
5.2 ACUMULO DE PHA NAS PRIMEIRAS 24 HORAS.....	54
5.3 RESULTADOS AO FINAL DAS 72 HORAS DE ENSAIO.	59
5.3.1 COMPARAÇÃO, ENTRE AS LINHAGENS, DA MSC E PORCENTAGEM DE PHA GERADAS.	59
5.3.2 PORCENTAGEM DE 3HB E 3HV.	62
5.3.4 CÁLCULO DOS $Y_{HB/XIL}$, $Y_{HV/PROP}$ E $Y_{X/XIL}$	70
5.3.5 COMPARAÇÃO DOS TEMPOS 24 E 72 HORAS PARA CADA LINHAGEM.	75
5.4 MODULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DO COPOLÍMERO P3HB-co-3HV PRODUZIDO PELA MUTANTE LFM019 A PARTIR DE XILOSE E PROPIONATO EM BIORREATOR.	81
5.4.1 EXPERIMENTO EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 COM ALIMENTAÇÃO DE XILOSE 0,9G/H.	82
5.4.2 EXPERIMENTO EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 COM ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO COM PROPORÇÃO DE XILOSE E PROPIONATO EM 10:1.	87
5.4.3 EXPERIMENTO EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 COM ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO COM PROPORÇÃO DE XILOSE E PROPIONATO EM 5:1.	92
5.4.4 EXPERIMENTO EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 COM ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO COM PROPORÇÃO DE XILOSE E PROPIONATO EM 3,5:1.	98
5.4.5 EXPERIMENTO EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 COM ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO COM PROPORÇÃO DE XILOSE E PROPIONATO EM 2,5:1.	104
5.4.6 DISCUSSÃO GERAL DOS RESULTADOS OBTIDOS EM BIORREATOR UTILIZANDO <i>B.SACCHARI</i> MUTANTE LFM 019 PARA MODULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO COPOLÍMERO P3HB-co-3HV UTILIZANDO ALIMENTAÇÃO DE SOLUÇÃO COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE XILOSE E PROPIONATO.	110
6 CONCLUSÕES.	116
REFERÊNCIAS.....	119
ANEXO I. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM101 EM FRASCOS AGITADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROPIONATO.....	125
ANEXO II. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM FRASCOS AGITADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROPIONATO.....	126
ANEXO III. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM REATORES AERADOS E AGITADOS MECANICAMENTE, COM XILOSE INICIAL DE 10G/L E SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO A100G/L. VAZÃO CONSTANTE DE 9ML/H.....	127

ANEXO IV. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM REATORES AERADOS E AGITADOS MECANICAMENTE, COM XILOSE INICIAL DE 10G/L E PROPORÇÃO DE XILOSE:PROPIONATO DA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO EM 10:1. VAZÃO CONSTANTE DE 9ML/H.	128
ANEXO V. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM REATORES AERADOS E AGITADOS MECANICAMENTE, COM XILOSE INICIAL DE 10G/L E PROPORÇÃO DE XILOSE:PROPIONATO DA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO EM 5:1. VAZÃO CONSTANTE DE 9ML/H.	130
ANEXO VI. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM REATORES AERADOS E AGITADOS MECANICAMENTE, COM XILOSE INICIAL DE 10G/L E PROPORÇÃO DE XILOSE:PROPIONATO DA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO EM 3,5:1. VAZÃO CONSTANTE DE 9ML/H.	132
ANEXO VII. RESULTADOS OBTIDOS DAS AMOSTRAS RETIRADAS DOS CULTIVOS DE <i>B. SACCHARI</i> LFM019 EM REATORES AERADOS E AGITADOS MECANICAMENTE, COM XILOSE INICIAL DE 10G/L E PROPORÇÃO DE XILOSE:PROPIONATO DA SOLUÇÃO DE ALIMENTAÇÃO EM 2,5:1. VAZÃO CONSTANTE DE 9ML/H.	134

1 INTRODUÇÃO

Muito se fala sobre a necessidade de alterarmos nossos hábitos quanto à produção, uso e descarte de materiais plásticos, tradicionalmente produzidos a partir do petróleo, uma vez que estes causam grande impacto ao ambiente durante todas essas etapas. Recentemente foi reportada a produção de 400 milhões de toneladas de plástico em 2015, dos quais menos de 10% foram reciclados (SOARES, 2017). Materiais plásticos como copos e garrafas podem levar de 200 a mais de 500 anos para serem degradados (GRIPPI, 2001). Além do avanço do preço do barril de petróleo, matéria-prima para produção desses, existe uma necessidade de redução da produção de CO₂, um dos gases de efeito estufa. Desta demanda surge a possibilidade de se utilizar como matérias-primas fontes renováveis (biomassa, resíduos agroindustriais etc.) para a biossíntese de produtos químicos finais e intermediários, que possam ser alternativas ambientalmente corretas aos plásticos de origem petroquímica.

Nesse cenário, surgem como uma das alternativas os polihidroxialcanoatos (PHA), que representam uma larga família de poliésteres armazenados na forma de grânulos intracelulares por algumas espécies de bactérias, que funcionam com reserva de carbono, energia e equivalentes redutores. Estes polímeros despertaram grande interesse há décadas, pois são termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura (BYROM et al., 1990). As propriedades do polímero, bem como suas aplicações, dependem de sua composição monomérica (HOLMES, 1985).

Os poliésteres biodegradáveis da família dos PHA são acumulados, como grânulos intracelulares, por determinadas bactérias, principalmente sob condições desequilibradas de crescimento, quando há excesso de carbono e carência de algum nutriente como nitrogênio, fósforo etc. (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). A síntese de PHA depende de fatores como a rede metabólica utilizada pela bactéria produtora e a fonte de carbono fornecida no momento do acúmulo (REHM, 2003; SILVA et al., 2007). Nesse processo, a PHA sintase é a enzima chave para a biossíntese de PHA, uma vez que sua especificidade pelo substrato definirá a natureza do polímero final. Das classes de PHA sintases já descritas, destacam-se as PHA sintases da classe I, capazes de polimerizar unidades de hidroxiacil-CoA com cadeia curta (3-5 átomos de carbono), gerando o grupo de PHA conhecido

como PHASCL (“short chain length”), que apresenta propriedades termoplásticas. A outra classe de PHA sintase é a classe II, específicas para monômeros de cadeia média (6-14 átomos de carbono), formando o grupo PHAMCL (“medium chain length”), o que lhe confere propriedades como elastômero (SILVA et al., 2007). Essas diferentes características definem diferenças em suas aplicações, o que aumenta o potencial para produzir PHA bacterianos com diferentes composições e propriedades diversas (REHM, 2003; COLLINS, 1999).

Entre os PHASCL, o principal representante é o poli-3-hidroxibutirato (P3HB). P3HB é um homopolímero, composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, cujas propriedades mecânicas limitam suas aplicações, pois se trata de um material quebradiço, de baixo alongamento até a ruptura (SUDESH, 2000). De acordo com a variação na composição monomérica de PHA, são determinadas as suas propriedades mecânicas, o que permitirá seu uso com diferentes aplicações. A combinação de P3HB com 3-hidroxivalerato (3HV), formando o copolímero P3HB-co-3HV, irá aumentar sua maleabilidade e resistência, o que também irá ampliar as possibilidades de sua aplicação (NODA et al., 2005).

Processos de produção do copolímero de modo economicamente viável são conseguidos com o uso de precursores como ácido propiônico, ácido valérico e outros (SILVA et al. 2000; BYROM, 1990).

Foi estudada a produção industrial deste P3HB-co-3HV, utilizando derivados de cana-de-açúcar (sacarose, glicose e frutose) e propionato em trabalhos que selecionaram *Burkholderia sacchari* como uma linhagem bacteriana promissora (GOMEZ et al. 1996; GOMEZ e BUENO-NETTO, 1997; BRÄMER e STEINBÜCHEL 2001; NONATO et al. 2001). No entanto, como em outras bactérias, o propionato é desviado para a síntese de biomassa ou 3HB em vez de 3HV, fato que tem sido atribuído à eficiência do ciclo do ácido 2-metilcítrico (2MCC) para catabolizar este substrato para o piruvato (SILVA et al. 2000, BRÄMER et al., 2002).

Apesar da proposta de várias vias de catabolismo do propionato em bactérias, até agora apenas o 2MCC foi descrito em nível molecular em várias bactérias acumuladoras e não acumuladoras de polihidroxialcanoato (PHA) (HORSWILL e ESCALANTE-SEMERENA, 1997; TEXTOR et al., 1997; LONDON et al., 1999; BRÄMER e STEINBÜCHEL, 2001; BRÄMER et al., 2002; MUÑOZ-ELIAS et al., 2006; PEREIRA et al., 2009). Diante disso, alguns estudos começaram a ser voltados para inativação de genes desta via, visando obter dessa forma linhagens

recombinantes capazes de alcançar a eficiência máxima teórica de produção de 3HV a partir de propionato, tendo sido gerados mutantes que incorporam maiores percentuais de 3HV que a linhagem selvagem (PEREIRA 2003, 2005; PEREIRA et al., 2009).

A primeira evidência do 2MCC em bactérias para catabolizar o propionato veio de uma caracterização genética e bioquímica inicial dos loci *prp* em *Salmonella typhimurium* (HORSWILL e ESCALANTE-SEMERENA, 1997). O papel do *prpC* como o codificador da metilcitrato sintase, uma das principais enzimas no 2MCC, foi estudado em alguns organismos (BRÄMER e STEINBÜCHEL, 2001; CLAES et al. 2002; GRIMEK e ESCALANTE-SEMERENA, 2004; MUÑOZ-ELIAS et al. 2006).

A síntese de 3HB-co-3HV é um sistema apropriado para avaliar a relevância de diferentes vias catabólicas, uma vez que permite a análise quantitativa da conversão de propionato para 3HV. Foram construídos mutantes afetados especificamente no 2MCC, avaliando sua eficiência na conversão de propionato para 3HV mensurando-se sua relevância no catabolismo de propionato em *B. sacchari* e a possibilidade de contribuição de outras vias (PEREIRA et al. 2009). Concluiu-se que a eficiência de conversão de propionato a 3HV ($Y_{HV/prp}$) é dependente da concentração de propionato. Outra conclusão foi que pode haver outras vias catabólicas do propionato em *B. sacchari*. Sob baixas concentrações de propionato, o 2MCC seria mais operativo, mas uma segunda via, que ainda precisa ser elucidada, assumiria mais importância sob maiores concentrações de propionato. (PEREIRA et al. 2009). Entretanto, esses trabalhos utilizaram como fontes de carbono glicose frente a três concentrações de propionato. Outras fontes de carbono e outras concentrações de propionato poderiam proporcionar melhor conhecimento de como modular a composição monomérica do copolímero para testar suas propriedades e aplicações. Com relação a outras fontes de carbono, mais recentemente, com a busca de uso de derivados de biomassa e resíduos agroindustriais para produzir bioprodutos, o uso de xilose, derivada do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, tem sido proposto para o estabelecimento de unidades produtoras de PHA dentro de uma biorrefinaria (SILVA et al., 2014). Neste contexto, esse trabalho pretende introduzir o uso de xilose, combinada a uma faixa maior de concentrações de propionato, visando entender melhor o catabolismo destes substratos e modular o copolímero para ampliar as possibilidades de aplicação, já que suas propriedades são alteradas de acordo com a sua composição.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O PHA tem grande importância para o mundo devido a sua extensa aplicabilidade e principalmente como uma alternativa para que se possa preservar o meio ambiente. Muitos estudos já foram realizados a partir de diferentes aspectos, estando todos descritos na literatura de diversos lugares.

2.1 Plásticos biodegradáveis

A sociedade evoluiu e tornou-se extremamente dependente do plástico devido às suas diversas possibilidades de aplicações e suas características de resistência física, química e biológica (HALDEN, 2010; LEEJARKPAI et al., 2011). Tem sido reportado que anualmente a produção de plásticos ultrapassa os 400 milhões de toneladas, sendo assim uma das maiores aplicações para o petróleo bruto (SOARES, 2017). Apesar das novas tecnologias terem criado novos plásticos com uma grande resistência, ainda assim a maior parte desses produtos é utilizada de maneira descartável, como embalagens de alimentos e materiais médicos (CARLETTO et al., 2011). Com essa maior resistência dos plásticos e o fato de a nossa cultura atualmente ainda não ser de reciclar grandes quantidades de materiais, 9% dos plásticos são reciclados e 12% incinerados. Uma quantidade altíssima desse material é depositada em aterros sanitários e no meio ambiente (devido a descarte incorreto) onde podem levar de 200 a mais de 500 anos para serem degradados (GRIPPI, 2001).

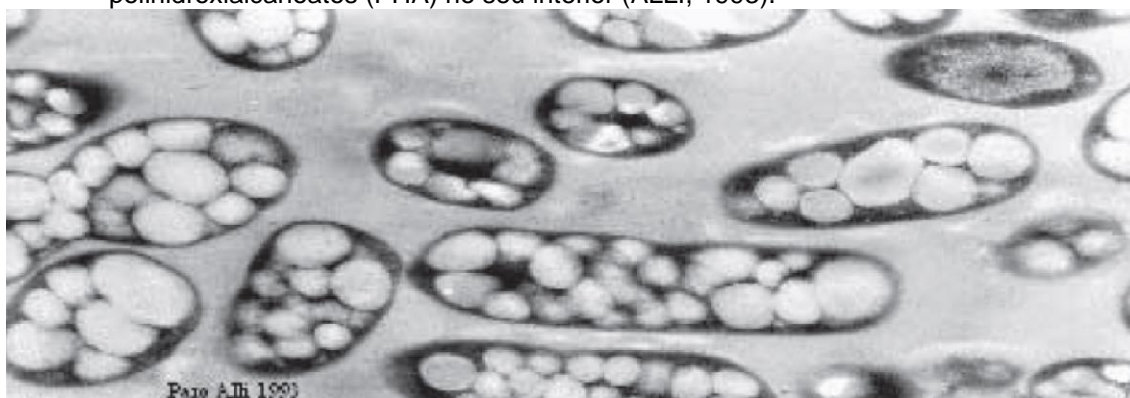
Com esse cenário de grande produção e baixa reciclagem, surge a necessidade de métodos alternativos para reduzir o impacto ambiental causado pelos plásticos de origem petroquímica. Para isso surgem como opção os polímeros biodegradáveis, como os polihidroxicanoatos. Estes se destacam por serem termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis pela agricultura (BYROM, 1990; RAMSAY et al., 1995; NONATO et al., 2001).

2.2 Polihidroxicanoatos

O termo PHA (polihidroxicanoatos) é utilizado para uma família de poliésteres acumulados por diversos microrganismos, na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia e equivalentes redutores (STEINBÜCHEL, 1991;

GOMEZ et al., 1993). Esses grânulos de PHA são sintetizados por bactérias principalmente quando, em um meio nutritivo, ocorre excesso de fonte de carbono disponível e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células como magnésio, nitrogênio, enxofre, fósforo e outros (BRANDL et al. 1990; STEINBÜCHEL et al. 1995). Na figura 1 é possível observar, através de microscopia, esses grânulos acumulados pela bactéria. Quando os elementos essenciais estiverem novamente disponíveis no meio, isso permitirá o crescimento celular e os grânulos acumulados, que podem atingir até 80% da massa seca celular, servirão como fontes de energia, carbono e equivalentes redutores (CHANPRATEEP, 2010; PARK et al., 2012).

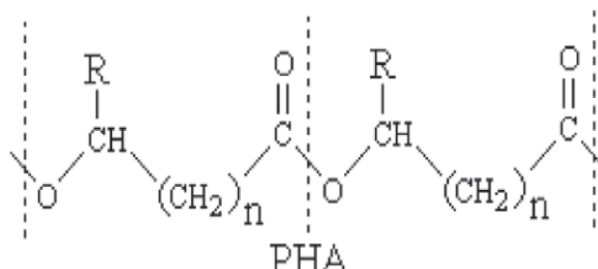
Figura 1: Células bacterianas contendo grânulos de polímero biodegradável, da família dos polihidroxialcanoatos (PHA) no seu interior (ALLI, 1993).



Esse grupo de polímeros foi descoberto pelo microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur de Paris em 1923, que observou a presença de polihidroxibutirato [P(3HB)] em uma bactéria do gênero *Bacillus* (LEMOIGNE, 1926). O conhecimento neste campo expandiu-se grandemente e hoje, vários grupos de pesquisas que estudam aspectos diferentes relacionados ao PHA podem ser encontrados em todo o mundo.

A fórmula química geral dos PHA está representada na figura 2, porém os PHA podem ser divididos em dois grandes grupos sendo eles PHASCL ('short chain length') que possuem monômeros (HASCL) com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e os PHAMCL ('medium chain length') constituídos por monômeros (HAMCL) contendo de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia principal (REHM; STEINBÜCHEL, 2005; SURIYAMONGKOL et al., 2007). Os PHAMCL são caracterizados por suas propriedades elastoméricas enquanto que os PHASCL se apresentam como materiais duros e quebradiços (PARK et al., 2012).

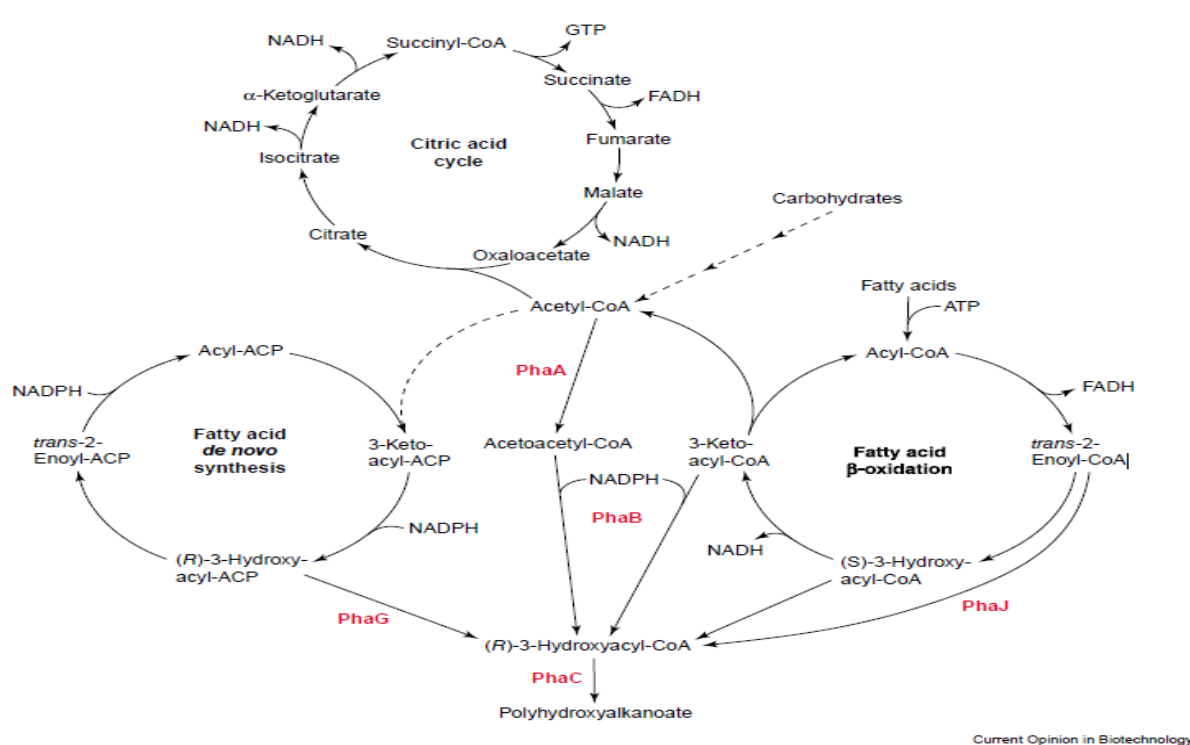
Figura 2: Fórmula química geral dos PHA. N pode variar de 1 a 3. Quando o grupo R for igual a H, CH₃, CH₂CH₃, para n=1, os PHA são classificados como PHA_{SCL} ("short chain length"), ou seja, compostos por monômeros de cadeia curta. Quando R = (CH₂)₂CH₃ a (CH₂)₈CH₃, os monômeros são considerados de cadeia média, constituindo os PHA_{MCL} ("medium chain length") (SILVA,1996).



2.3 Síntese de PHA por células bacterianas

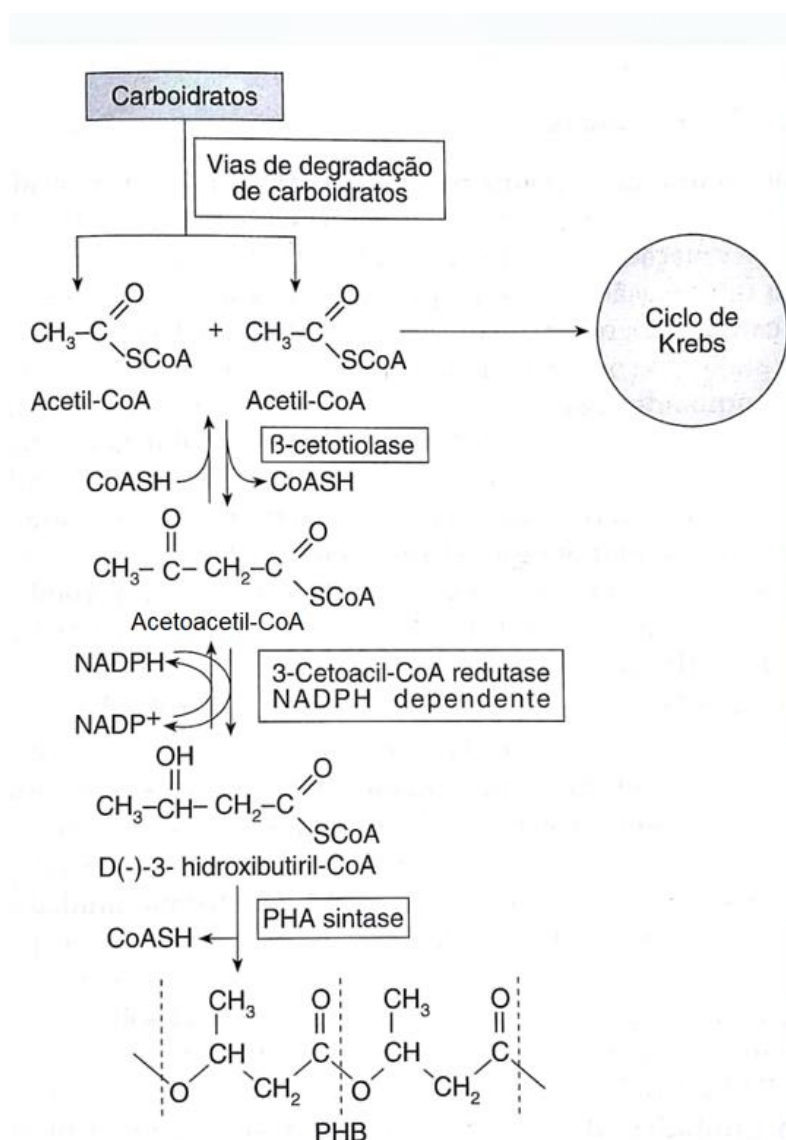
O tipo de enzima PHA sintase bacteriana, a fonte de carbono fornecida na fase de acúmulo e as vias metabólicas presentes na bactéria produtora de PHA são os três fatores principais dos quais a biossíntese de PHA depende. É necessário que sejam geradas moléculas de hidroxiaçil-CoA a partir do substrato, que será então incorporada ao poliéster pela ação da enzima PHA sintase. Para tanto, o substrato fornecido poderá seguir por uma das três vias metabólicas que são a de quebra de carboidratos, quebra de ácidos graxos e biossíntese de novo de ácidos graxos. Essas vias podem ser melhor observadas na figura 3 (ALDOR e KEASLING, 2003).

Figura 3: Biossíntese de PHA no contexto do metabolismo microbiano (ALDOR e KEASLING, 2003).



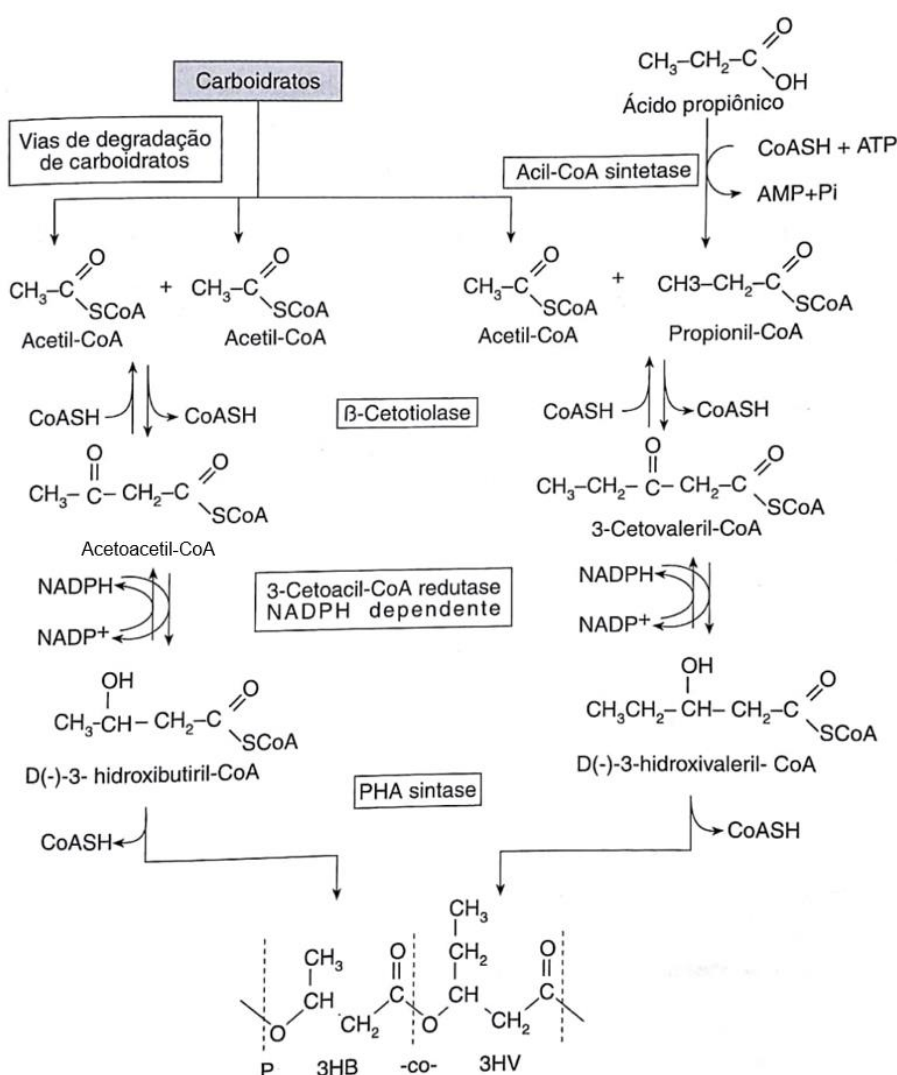
A síntese do homopolímero 3HB pode ocorrer por diferentes vias, à via mais estudada é a encontrada em *Alcaligenes eutrophus*, que será muito semelhante à encontrada em diversas bactérias (GOMEZ e BUENO NETTO, 2001). A síntese ocorrerá a partir de um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo de Krebs, a acetil-CoA. Para isso três enzimas estarão envolvidas (OEDING e SCHLEGEL, 1973; SENIOR e DAWES, 1973). Inicialmente a ação da β -cetotiolase fará a condensação de duas moléculas de acetil-CoA para gerar acetoacetil-CoA. Após isso, essa acetoacetil-CoA será então reduzida, formando D (-) -3-hidroxiacetil-CoA por ação da enzima 3-cetoacetil-CoA redutase NADPH dependente. Cada molécula de D (-) -3-hidroxiacetil-CoA, através da PHA sintase, será finalmente incorporada à cadeia polimérica em crescimento. Na figura 4 estão representadas essas etapas.

Figura 4: Via metabólica de síntese de 3HB a partir de carboidratos (GOMEZ e NETTO, 2001).



Com o fornecimento de um co-substrato, como o propionato, a enzima acil-CoA sintetase irá formar propionil-CoA a partir desse propionato e CoA livre (CoASH). Assim como atua na condensação de duas moléculas acetil-CoA, a enzima β -cetotiolase também poderá catalisar a condensação de uma molécula propionil-CoA e uma molécula de acetil-CoA, formando assim então o 3-cetovaleril-CoA. Assim como a enzima β -cetotiolase, a enzima 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente não é tão específica, podendo reduzir 3-cetoacil-CoA a D (-) -3-hidroxivaleril-CoA. Tal como teve sua ação em D (-) -3-hidroxi butiril-CoA, porém com uma atividade menor, a PHA sintase irá incorporar D (-) -3-hidroxivaleril-CoA à cadeia polimérica em crescimento. A ação das enzimas nas vias de degradação do carboidrato ou do propionato e a incorporação de D (-) -3-hidroxi butiril-CoA e D (-) -3-hidroxivaleril-CoA para formar P3HB-co-3HV estão representadas na figura 5.

Figura 5: Via metabólica de síntese de P3HB-co-3HV a partir de carboidratos e ácido propiônico (GOMEZ e BUENO NETTO, 2001).



Esses hidroxiaçil-CoA que foram produzidos e que serão incorporados ao polímero sofrerão a ação de uma PHA sintase específica, apresentada no item seguinte, que irá usar a transesterificação para catalisar a ligação dos monômeros (REHM, 2003; REHM, 2007; KESSLER, 1999).

2.3.1 PHA sintase

Para a formação de PHA é necessário que ocorra a polimerização de unidades (R) - 3-hidroxiaçil-CoA, o que irá determinar o tipo de polímero formado pelo micro-organismo. Dessa forma, a PHA sintase pode ser considerada a enzima-chave para a formação de PHA, pois irá catalisar esta polimerização (STEINBÜCHEL, 1996).

Essas enzimas são divididas em quatro classes de acordo com a estrutura primária das sequências dos genes codificadores e sua especificidade pelo substrato. Essa classificação pode ser observada na Tabela 1.

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

Tabela 1: Tipos de PHA sintase (PARK et al., 2012; REHM, 2007).

2.3.2 Síntese dos monômeros de cadeia curta e média.

As PHA sintases de classe I serão capazes de polimerizar unidades de hidroxiaçil-CoA com cadeia curta (PHASCL) e as de classe II são específicas para monômeros de cadeia média (PHAMCL) (COLLINS, 1987). Esses dois grupos apresentam diferentes aplicações por possuírem diferentes propriedades, como comentado a seguir.

2.4 Composição monomérica associada às propriedades dos PHA

Uma grande diversidade de monômeros de PHASCL e PHAMCL podem constituir os polihidroxialcanoatos, o que lhes confere diversas características físicas e mecânicas, possibilitando dessa forma uma variedade de aplicações (DOI, 1990).

As propriedades dos homopolímeros podem ser modificadas à medida que são incorporados, por meio de ligações éster, monômeros distintos a ele, conferindo outras propriedades, como uma melhor elasticidade, gerando assim os copolímeros. Um exemplo de homopolímero com cadeia curta (PHASCL) é o poli-3-hidroxibutirato P (3HB), o primeiro PHA descrito. Para melhorar a cristalinidade, temperatura de fusão e resistência do P (3HB), entre outras propriedades, pode-se incorporar outros monômeros, como 3HV (obtido fornecendo-se propionato à bactéria) ou 3HHx (obtido fornecendo-se hexanoato à bactéria), o que gerará copolímeros como o P(3HB-co-3HV) ou P(3HB-co-3HHx), respectivamente (MENDONÇA, 2014). Essa copolimerização do 3HB com outros monômeros irão aumentar a flexibilidade e diminuir as temperaturas de fusão dos polímeros obtidos, o que irá aproximar as características com as dos plásticos de origem petroquímica (OJUMU et al., 2004; PARK et al., 2007).

Para que ocorresse a inserção de monômeros de 3-hidroxivalerato (3HV) ao P (3HB) foram fornecidos glicose e ácido propiônico à bactéria produtora (DOI, 1990). Esse copolímero P(3HB-co-HV) formado irá apresentar uma maior maleabilidade e resistência, atingindo valores de alongamento para ruptura até aproximadamente 100%. Isso irá aumentar sua variedade de aplicações (HOLMES, 1985). Algumas propriedades do P3HB e do P3HB-co-3HV podem ser observadas na tabela 2.

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

Tabela 2: Propriedades mecânicas e físicas dos diferentes polímeros. (MENDONÇA, 2014). 3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; 3HV: 3-hidroxi valerato; HHx: 3-hidroxi hexanoato; HO: 3-hidroxi octanoato; PET: polietileno tereftalato, HDPE: polietileno de alta densidade; LDPE: polietileno de baixa densidade; T_m- temperatura de fusão; T_g: temperatura de transição vítrea.

2.5 Aplicações do copolímero P (3HB-co-3HV)

Quase analogamente aos polímeros derivados do petróleo, as aplicações dos PHA são muito amplas devido à possibilidade de uma diversidade nas combinações monoméricas. Alguns exemplos do seu uso são a produção de tubos de mudas para plantio, brinquedos, produtos farmacêuticos e médicos (fios de sutura, cápsulas de liberação controlada de fármacos e próteses ósseas), embalagens para produtos de higiene, cosméticos entre outras (HOLMES, 1985; ELIGIO et al., 1999; REDDY et al., 2003; VERLINDEN et al., 2007; ROY, 2010).

Nos anos 1990, começou-se a produção de P (3HB-co-3HV) para vendas com o nome comercial de Biopol pela empresa britânica Imperial Chemical Industries

(SHAH et al., 2008). Já no Brasil, a empresa PHB industrial foi quem viabilizou a produção de P (3HB-co-3HV) e P (3HB) em escala piloto (NONATO et al., 2001). Outras empresas também lançaram produtos utilizando PHA ao redor do mundo como a Degrapol, na Itália, a Biomer, na Alemanha, BioGreen e Kaneka Corporation no Japão (PHILIP, 2007; CHANPRATEEP, 2010).

Para cada aplicação do polímero é necessário levar em conta algumas características como as propriedades térmicas, a cristalinidade e o peso molecular (MONTORO et al., 2010). Para a cristalinidade, que pode ser alterada de 30 a 70%, irá influenciar na depender sua constituição monomérica e, para a temperatura de fusão, a variação nesses polímeros pode ser entre 40 e 180°C (REHM, 2010). As características que irão alterar o peso molecular dos PHA serão as condições do cultivo e a espécie bacteriana. Isso fará o peso variar de 2.105 e 3.106 Da (AMARA, 2008; SUDESH, 2000).

2.6 Uso da xilose para produção de PHA

As produções pioneiras de PHA empregavam açúcares, tornando o custo elevado. Já nos anos 1980-90, a produção a partir de açúcares de menor custo foi vislumbrada como alternativa para deduzir os custos de produção. Melaço de beterraba ou de cana, e outros resíduos agroindustriais foram propostos (BYROM, 1980; YAMANE, 1993). No Brasil o uso de sacarose, glicose, frutose e melaço foram extensivamente estudados (SILVA et al., 2007). A cana-de-açúcar tem várias aplicações industriais e seu bagaço pode ser utilizado nas usinas para geração de energia. Mesmo assim há um excesso desse material, que poderia ser utilizado para outros usos não energéticos, como a produção de PHA. Para utilizar o bagaço, a hidrólise ácida é geralmente realizada para liberar açúcares que podem ser usados por microrganismos tal qual a xilose. No entanto, a hidrólise ácida do bagaço de cana gera vários compostos tóxicos e são necessários diversos procedimentos para eliminar esses compostos tóxicos e permitir a utilização de açúcares pelos microrganismos. A hidrólise enzimática tem sido estudada como medida menos agressiva, entretanto ainda não elimina um pré-tratamento ácido (PALMQVIST, 1998; FELIPE et al., 1997, SILVA et al., 2014).

Para reduzir os custos da produção industrial do PHA, tem-se utilizado substratos de baixo custo como materiais lignocelulósicos renováveis. Dessa forma, duas vertentes são adotadas, nas quais hidrolisados hemicelulósicos, como substrato rico

em xilose para a produção de PHA (KEENAN et al. 2004) são utilizados ou hidrolisados celulósicos e hemicelulósicos que geram uma mistura de açúcares incluindo principalmente glicose, xilose e arabinose (SILVA et al., 2004).

A xilose é um dos principais constituintes da matéria-prima em ambas as abordagens e o segundo açúcar mais abundante na natureza. No entanto, sua utilização eficiente apresenta uma barreira técnica para vários bioprocessos (SAHA, 2003), incluindo a produção de etanol (JEFFRIES e JIN, 2004) e a produção de PHA (SILVA et al., 2004). Estudos para produzir P3HB-co-3HV utilizando derivados de cana-de-açúcar e propionato selecionaram *Burkholderia sacchari* como uma linhagem bacteriana promissora e capaz de utilizar xilose (GOMEZ et al., 1996; BRAMER e STEINBÜCHEL, 2001; SILVA et al., 2004). Independente do carboidrato utilizado, para obter o copolímero P(3HB-co-3HV), o fornecimento de um precursor de estrutura química relacionada, como valerato ou propionato, este último de menor preço.

2.7 Propriedades do propionato.

O propionato é um dos mais abundantes ácidos graxos de cadeia curta e é um subproduto comum da fermentação bacteriana. Conseqüentemente, o propionato é produzido em grandes quantidades (50-100 mM) no trato gastrointestinal de mamíferos, por plantas, insetos e microrganismos que utilizam várias vias alternativas para metabolizar o propionato como fonte de carbono. Notavelmente, porém, o propionato (ou um de seus catabólitos derivados) é letalmente tóxico para as células se for permitido acumular. Portanto, é necessário se balancear os efeitos benéficos do catabolismo do propionato (por exemplo, como uma fonte útil de carbono) e a toxicidade do propionato. Propionato tem sido usado como aditivo em alimentos, atuando, em concentrações de 3-5 g/Kg de produto, como antimicrobiano em produtos cárneos e pescados, processados, na indústria de panificação e de queijos (EFSA, 2016).

Para a produção de PHA, mais especificamente de 3HV, o propionato é utilizado como uma fonte de carbono (cofator) em concentrações nas quais ele não se mostra tóxico para a bactéria.

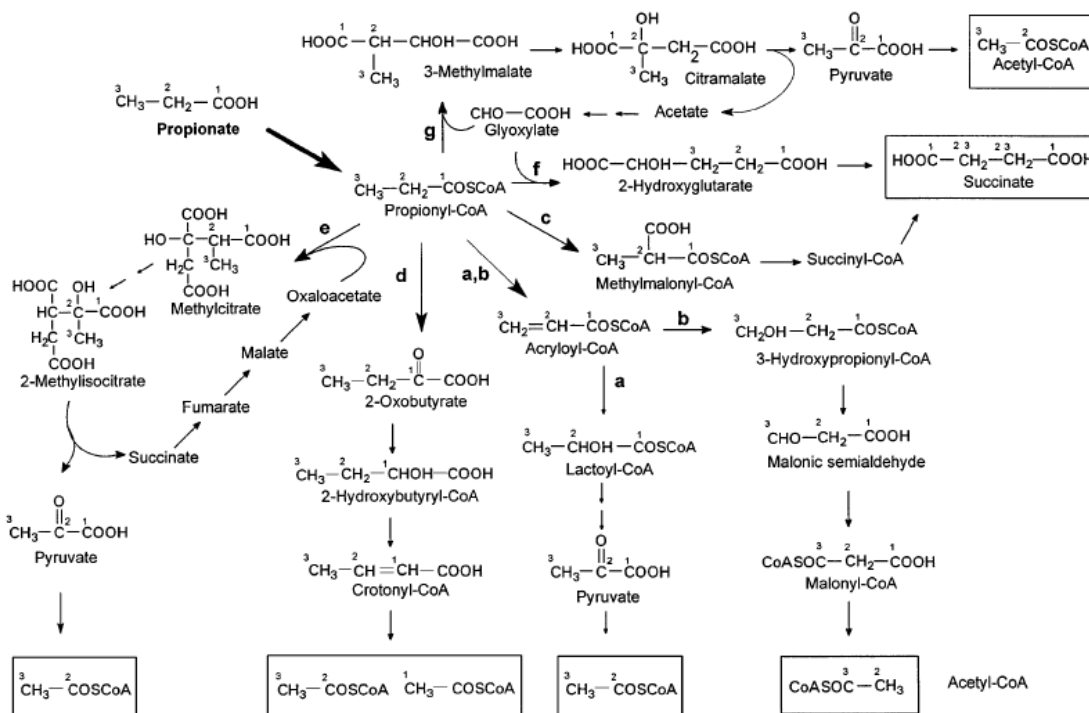
2.8 Metabolismo do ácido propiônico.

Ao longo dos anos, o catabolismo do ácido propiônico tem sido estudado em vários organismos e já foram indicadas ao menos seis vias diferentes para esse catabolismo (HALARNKAR, 1989; TEXTOR et al, 1997).

A ativação de propionato a propionil-CoA é a primeira etapa proposta para o seu catabolismo por qualquer via. Foram publicadas evidências do papel do gene *prpE*, que está no operon *prpBCDE*, na síntese de propionil-CoA em *Salmonella typhimurium*. Quando este gene foi inativado, propionato ainda foi utilizado como fonte de carbono e energia; os mutantes *prpE* que continham acetil-CoA sintetase foram capazes de degradar propionato pelo ciclo da 2-metilcitrato. O operon *prpBCDE* está sob o controle do gene *prpR*, que é um regulador transcricional e necessita de 2 metilcitrato como ativador (HORSWILL e ESCALANTE-SEMERENA, 1999). A síntese de 2-metilcitrato pelo gene *prpC* necessita de propionil-CoA como substrato, porém o nível de propionil-CoA necessita ser aumentado antes que a 2-metilcitrato possa ser sintetizada e a transcrição de *prpBCDE* possa ser ativada. Este gene *prpE* não está presente no operon *prpBCD* de outros organismos como *B. sacchari* (BRÄMER et al., 2002).

A partir da ativação de propionato a propionil-CoA, vários destinos têm sido propostos na literatura para o seu catabolismo (figura 6) e algumas vezes, como ocorre em *B. sacchari*, foi proposto que diferentes vias operariam simultaneamente (LONDON et al., 1999, SILVA et al., 2000, PEREIRA et al., 2009).

Figura 6: Principais vias descritas para o catabolismo de ácido propiônico (TEXTOR et al., 1997).



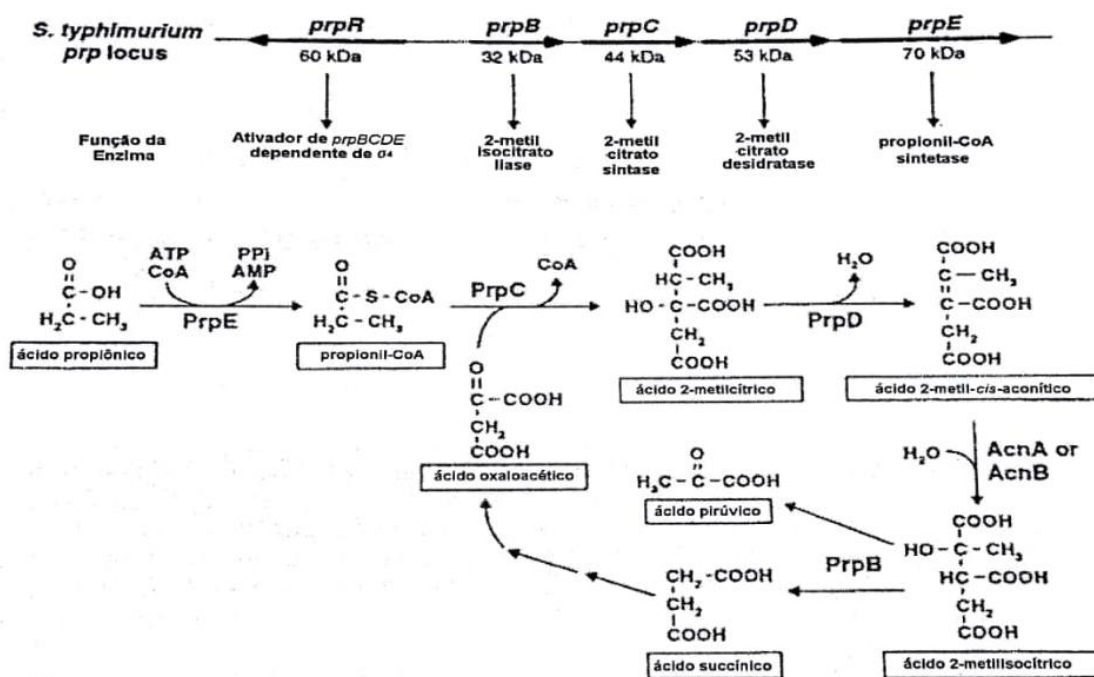
Apenas o ciclo de 2-metilcitrato, descrito em fungos, leveduras e bactérias, possui as bases genéticas bem estabelecidas (TEXTOR et al., 1997). Nas bactérias, os genes que são codificadores das enzimas envolvidas no ciclo 2-metilcitrato estão organizados em um operon *prpBCD*. Nesta via o oxaloacetato é condensado com propionato formando 2-metilcitrato, isso foi descoberto em *Candida lipolytica* (TABUCHI e UCHIYAMA, 1975). Nessa via o propionato é oxidado a piruvato via 2-metilcitrato e suas funções catalíticas são codificadas pelo operon *BCD*.

Inicialmente o propionato será ativado a propionil-CoA pela ação de uma propionil-CoA sintase, que é o gene *prpE*, porém este nem sempre está presente no operon. Essa propionil-CoA será então condensada com oxaloacetato, pela ação da enzima 2-metilcitrato sintase (*prpC*), formando 2-metilcitrato. A enzima 2-metilisocitrato liase (*prpB*) será a responsável por catalisar a clivagem de 2-metilisocitrato em piruvato e succinato (TEXTOR et al., 1997).

Esta via foi descrita em *Ralstonia eutropha* (BRÄMER e STEINBÜCHEL, 2001) e os genes envolvidos no catabolismo de propionato nesta bactéria estão organizados em um operon *prp* que se apresenta na seguinte ordem *prpB*, *prpC*, *acnM*, ORF5, *prpD* onde *acnM* codifica uma enzima com função de 2 metil-cis-aconitato hidratase e *prpD* está envolvida na reação de conversão de 2-metilcitrato para 2-

metilisocitrato. Baseando-se nesses resultados, foi proposto o catabolismo de propionato pelo ciclo de 2-metilcitrato conforme apresentado na figura 7.

Figura 7: Via da conversão de 2-metilcitrato para 2-metilisocitrato no catabolismo de propionato (HORSWILL e ESCALANTE-SEMERENA, 2001).



2.8.1 Catabolismo de propionato em *Burkholderia sacchari*.

Na linhagem isolada e identificada como *B. sacchari* LMG19450, a conversão de propionato em unidades 3HV foi avaliada. De modo similar ao que ocorre em outras bactérias, é restrita a menos de 10% do máximo teórico (GOMEZ et al., 1996). Foram então desenvolvidos mutantes incapazes de crescer em propionato, mas que acumulavam unidades 3HV a partir desse substrato (SILVA, 1998). Foi definido um grupo de mutante afetado na utilização de intermediários da α -oxidação, que atingiram no máximo valores de conversão de propionato a unidades 3HV ($Y_{HV/prop}$) de 0,37 g/g e outro não afetado nessa via que atingiu 0,80 g/g. A soma desses dois resultados corresponde a 1,17 g/g, o que se aproxima muito do rendimento máximo teórico de 1,35 g/g. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que, em *B. sacchari* LMG19450 o ácido propiônico seria consumido por pelo menos três vias, sendo duas de degradação e que competem com a via de síntese de 3HV.

Em outro estudo, foi sugerido que essa bactéria faria o catabolismo do ácido propiônico principalmente pela via de 2-metilcitrato, sob condições de acúmulo de P3HB-co-3HV. Quando essa via se encontra bloqueada, propionil-CoA que seria

destinada a ela, poderia então ser deslocado para a via de síntese de unidades 3-hidroxicinovelato, condensando-se com uma molécula de acetil-CoA, por ação da 3-cetotiolase, para formar 3-cetovaleril-CoA. Isso leva os valores de $Y_{HV/prop}$ subirem de 0,10 g/g na linhagem selvagem para 0,80 g/g no mutante não afetado na α -oxidação (SILVA et al. 2000).

Brämer et al. (2002) demonstraram do ponto de vista molecular a presença do ciclo de 2-metilcitrato em *B. sacchari* IPT101, onde o operon *prp* é composto por quatro genes *prpB*, *prpC*, *acnM* e ORF5(open reading frame), que apresenta homologia com genes dos locus *prp* de muitas bactérias. O gene *prpC* codifica uma 2-metilcitrato sintase, *prpB* codifica uma 2-metilisocitrato liase, e os genes *acnM* e ORF5 são requeridos para conversão de ácido 2-metilcitrato em ácido 2-metilisocitrato, com similaridade ao produto do gene *prpD* em *R.eutropha*. O gene *prpR* está posicionado upstream ao operon, com uma orientação invertida, codificando um regulador transcricional do operon *prp*. Downstream á ORF5 no locus *prp* de *B.sacchari* estão as ORFs adicionais (6, 7,8) com função desconhecida e que não foram encontradas em nenhum outro operon. A seguir, na figura 8, está proposto um conjunto de genes estruturais para o locus *prp* desta linhagem, responsáveis pela funcionalidade do ciclo de 2-metilcitrato.

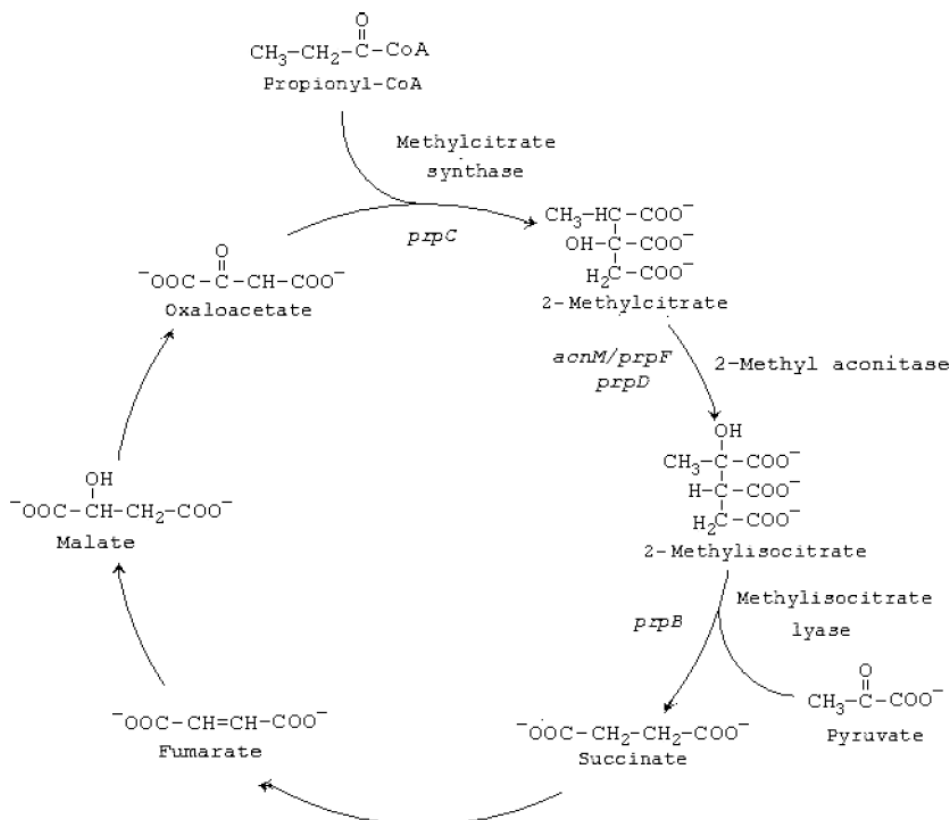
Figura 8: Principais genes do operon *prp* envolvido no catabolismo de propionato em *B.sacchari* LFM101(adaptado de PEREIRA, 2007).



Na produção de PHA utilizando-se carboidratos e propionato, uma possível causa para o baixo rendimento em unidade 3HV em uma bactéria produtora de P3HB-co-3HV é a existência de mais de uma das vias apresentadas atuando simultaneamente. Portanto, para um melhoramento das linhagens com uso industrial na produção deste copolímero, a identificação e bloqueio ou redirecionamento das principais vias do catabolismo de propionato, levaria a esse melhoramento. Ao se analisar os resultados obtidos nos estudos com *B. sacchari* LMG19450, foi sugerido que essa bactéria catabolizaria o ácido propiônico principalmente pelo 2MCC sob condições de acúmulo. Quando esta via for bloqueada, o propionil-CoA, que antes era a ela destinada, poderia entrar na via de síntese de unidades 3-hidroxicinovelato, condensando-se com uma molécula de acetil-CoA, por ação da 3-cetotiolase, para

formar 3-cetovaleril-CoA, o que permitiria aumentar os valores de $Y_{3HV/Prop}$. Na figura 9 podem-se observar as reações, genes e enzimas envolvidos no ciclo do ácido 2-metilcítrico (2MCC) envolvidos no catabolismo do propionato.

Figura 9: Ciclo do ácido 2-metilcítrico (2MCC) (PEREIRA et al., 2009).



2.9 Produção de P (3HB-co-3HV) por *B. sacchari*.

Para a inserção de unidades de 3-hidroxicetovalerato (3HV), que darão origem ao copolímero P3HB-co-3HV, é necessário o uso de precursores, como o ácido propiônico, para melhorar a produção desse copolímero e torná-la economicamente viável (STEINBÜCHEL et al., 1995). É necessário, portanto, que as bactérias consigam crescer em propionato, sem serem negativamente afetadas por ele e capazes de utilizá-lo para acumular o 3HV. Para ter uma melhor conversão deste propionato se faz necessário o uso de mutantes afetados nas vias do metabolismo desse co-substrato. Devido a isso, mutantes *prp* da linhagem de *B. sacchari* LMG19450 foram selecionados para obter uma melhora nessa produção (SILVA, 1998; GOMEZ, 1998). Dois grandes grupos de mutantes *prp* foram identificados: aqueles deficientes na utilização de intermediários da α -oxidação, que consomem todo ácido propiônico suprido, acumulam PHA contendo menos que 30 mol% de

unidades 3HV e atingem fatores de conversão de propionato em unidades 3HV ($Y_{HV/prop}$) da ordem de 0,35 g/g, e outros não afetados na utilização desses intermediários, consomem apenas parte do propionato suprido, acumulam PHA contendo mais que 50 mol% de unidades 3HV e atingiram valores de $Y_{HV/prop}$ da ordem de 0,80 g/g (SILVA et al., 2007).

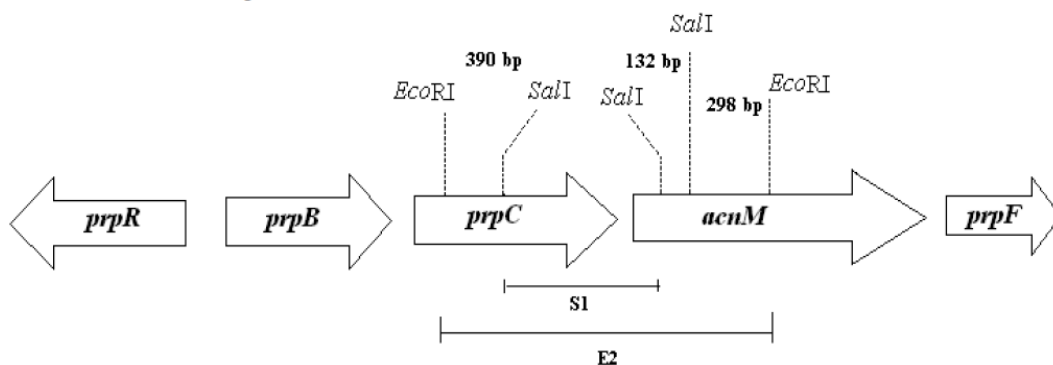
As vias da α -oxidação e o ciclo de 2-metilcitrato (2MCC) em *B. sacchari* quando ativas, competem pelo substrato com a síntese de 3HV (Silva et al., 2000). O valor máximo teórico da conversão de propionato em 3HV foi estimado considerando-se que, para a síntese do copolímero, o propionato entraria na forma de propionil-CoA, a ser condensada com uma molécula de acetil-CoA, oriunda da degradação do carboidrato. Ou seja, cada molécula de propionato seria integralmente incorporada à unidade 3HV em formação, de modo que seriam gerados 1,35 g de 3HV por grama de propionato fornecido (GOMEZ et al., 1996), valor correspondente ao fator de conversão máximo teórico de propionato a 3HV ($Y_{HV/prop}$).

Estudos com um desses mutantes UV de *B. sacchari*, afetado no gene *prpC* mostraram melhora considerável na conversão de propionato para 3HV, sugerindo que o 2MCC operaria sob-baixa concentração de propionato. Com base nesses resultados e para evitar trabalhos com mutante UV, um mutante foi construído onde foi rompido especificamente o operon do 2MCC em *B. sacchari*. A eficiência dos mutantes na conversão de propionato para 3HV foi analisada para avaliar a relevância do 2MCC no catabolismo de propionato em *B. sacchari* e a possibilidade de contribuição de outras vias, melhorando dessa forma a conversão de propionato em 3HV (PEREIRA et al., 2009), como discutido no item a seguir.-.

2.9.1 Obtenção de mutantes por mutação sítio específica.

A linhagem mutante, LFM019, utilizada nesse trabalho foi obtida por Pereira, 2007, através de duas recombinações homólogas realizadas na linhagem selvagem *B. sacchari* LMG19450.

Figura 10: O operon *prp* de *Burkholderia sacchari*. E e S indicam sítios de restrição *EcoRI* e *SalI*, respectivamente, gerando os fragmentos E2 e S1 usados para construir o cassete mutagênico. (PEREIRA et al., 2009).



Os clones recombinantes obtidos não cresceram em propionato e cresceram em meio com canamicina, marca de resistência do plasmídeo. Como o plasmídeo não se replica em *B. sacchari*, concluiu-se ter havido sua inserção no genoma desta bactéria. Dessa forma estes mutantes sofreram um único evento de recombinação ou simples crossing over, havendo necessidade da ocorrência de um segundo evento para a efetiva deleção sítio específica do gene alvo. O rompimento de *acnM* conferiu o fenótipo Prp- aos mutantes (denominados mutantes LFM018).

Para interromper 2MCC através de um segundo evento de recombinação homóloga, o mutante LFM018 foi cultivado em meio mineral contendo sacarose, onde vários clones capazes de crescer em sacarose foram selecionados e posteriormente selecionados para o fenótipo Prp- e Kms. Uma vez que um segundo evento de recombinação na mesma região onde o plasmídeo integrado restauraria o fenótipo de tipo selvagem, os fenótipos de Prp- e Kms indicaram a ruptura de 2MCC (isto é, ruptura simultânea de *prpC* e *acnM*). Um mutante apresentando ruptura simultânea de *prpC* e *acnM*, sendo denominado LFM019. A confirmação da ruptura do *prpC* e *acnM* foi realizada através de uma PCR do DNA genômico, comparando-se as selvagens e as mutantes (PEREIRA et al., 2009).

2.9.2 Melhoria na produção de 3HV por *B. sacchari* recombinante.

Como já mencionado, estudos de um mutante UV de *B. sacchari* afetado no gene *prpC* mostraram melhora considerável na conversão de propionato para 3HV, sugerindo que o 2MCC operaria mais sob-baixa concentração de propionato (SILVA et al. 2000).

Pereira e colaboradores (2009) demonstraram a importância do 2MCC no catabolismo de propionato com a utilização de mutantes afetados em genes desta via. Os resultados obtidos demonstraram que o rendimento da conversão de propionato para 3HV melhorou em concentrações de propionato menores que 1g/L. Isso também colaborou com a hipótese de que uma segunda via catabólica de propionato seria mais operativa em concentrações superiores a 1g/L, possivelmente a α -oxidação. A síntese de P3HB-co-3HV é um sistema apropriado para avaliar a relevância dessas diferentes vias catabólicas, uma vez que permite a análise quantitativa da conversão de propionato para 3HV.

Para investigar isso Pereira 2007, utilizou o mutante obtido após segunda recombinação, que gerou o mutante com ruptura do 2MCC, com uma interrupção e inativação simultânea de *prpC* e *acnM*. Isso levou a aumentos de até 10 vezes nos valores de $Y_{HV/prop}$, em comparação com o tipo selvagem (PEREIRA et al., 2009). Esses ensaios foram realizados utilizando-se glicose (3g/L), e 3 concentrações de propionato (0,25; 0,50; 1 g/L). A partir desses resultados e para corroborar o papel deste operon no catabolismo de propionato em diferentes concentrações, foi proposto o estudo da resposta do mutante LFM 019 ampliando os teores deste precursor de 3HV (0,1; 0,3; 0,7; 0,9; 1,2 g/L). Como substrato principal foi oferecido à xilose (15g/L), pelas razões apresentadas nos itens anteriores.

3 OBJETIVOS

Realizar ensaios utilizando *B. sacchari* afetada na via do 2MCC e a linhagem selvagem para comparação da capacidade de biossíntese de P3HB-co-3HV, verificando o impacto de 5 concentrações de propionato como co-substrato, juntamente com xilose, sobre o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{HV/prop}$).

Modular a composição monomérica do copolímero P3HB-co-3HV, em biorreatores, através do fornecimento de alimentação, em uma vazão específica, de soluções com diferentes proporções de xilose e propionato.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todas as metodologias de cultura de micro-organismos, realização dos experimentos, coleta e processamento de amostras e análise de resultados estão descritas detalhadamente a seguir.

4.1 Micro-organismos utilizados.

As linhagens utilizadas nesse trabalho estão descritas na tabela 3. A preservação das linhagens foram realizadas em suspensão em glicerol (20%) e estocadas em freezer a -80°C.

Bactéria	Características	Origem/Referencia
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	Sac ⁺ , PHA ⁺ , Prp ⁺ , Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	Silva et al. 1998, Brämer et al., 2001
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM019	<i>B.sacchari</i> LFM 101, <i>prpC</i> - <i>acnM</i> - Sac ⁺ , PHA ⁺ , Prp ⁻ , Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	Pereira et al. 2009

Tabela 3: Linhagens utilizadas neste trabalho. LFM- Sigla do grupo 'Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos'; LMG : Laboratory of Microbiology of Ghent, Bélgica, Sac⁺ - crescimento em sacarose; PHA⁺ acúmulo de PHA; Prp⁺- crescimento em ácido propiônico; Kan^S - Sensibilidade a canamicina; Amp^S - sensibilidade a ampicilina; Tc^S - Sensibilidade à tetraciclina.

4.2 Meios de cultura

Todas as soluções e meio de cultura passaram pelo processo de esterilização em autoclave por 20 minutos a 121°C. As vidrarias utilizadas também foram esterilizadas através desse processo. A fonte de carbono foi preparada e esterilizada separadamente do meio mineral, com adição posterior.

Para obtenção de meios sólidos, foi adicionado ágar (15-20g/L) à composição dos meios líquidos abaixo descritos.

4.2.1 Meios de cultura para cultivos em frascos agitados

O cultivo de pré-inoculo foi realizado em Lysogeny Broth (LB) e no ensaio de frascos agitados foi utilizado (MM), cujas composições estão descritas a seguir:

Meio Lysogeny Broth (LB)

(Sambrook *et al.*, 1989)

Triptona (10g/L)

Extrato de levedura (5g/L)

NaCl (5g/L).

Meio Mineral para ensaio em frascos agitados

(ROCHA *et al.*, 2008)

Na₂HPO₄ (3,5g/L)

KH₂PO₄ (1,5g/L)

(NH₄)₂SO₄ (1,0g/L)

MgSO₄. 7H₂O Sol. 20% (1,0mL/L)

CaCl₂. 2 H₂O Sol. 1% (1,0mL/L)

Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% (1,0 mL/L)

Solução de elementos traços (1,0 mL/L)

Solução de elementos traços

H₃BO₃ (0,30 g/L)

CoCl₂. 6H₂O (0,20 g/L)

ZnSO₄. 7H₂O (0,10g/L)

MnCl₂. 4H₂O (0,03g/L)

NaMoO₄ 2H₂O (0,03g/L)

NiCl₂. 6H₂O (0,02g/L)

CuSO₄. 5 H₂O (0,01g/L)

Fontes de carbono

Xilose (10-15g/L).

Propionato de sódio (0,1-1,2g/L)

4.2.2 Meios de cultura para cultivos em biorreatores

O cultivo de pré-inoculo foi realizado em Lysogeny Broth (LB), o inoculo em meio mineral (MM 6/3), que contém o triplo de fonte de nitrogênio, e no biorreator utilizado o meio mineral, cujas composições estão descritas a seguir:

Meio mineral 6/3 para inoculo no biorreator

Na_2HPO_4 (3,5g/L)

KH_2PO_4 (1,5g/L)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,0g/L)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sol. 20% (1,0mL/L)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Sol. 1% (1,0mL/L)

Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% (1,0 mL/L)

Solução de elementos traços (1,0 mL/L)

Meio Mineral para ensaio em biorreator

(Mendonça, 2014)

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3,0g/L)

NaCl (1,0g/L)

KH_2PO_4 (0,8g/L)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sol. 20% (1,5mL/L)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ Sol. 1% (1,0mL/L)

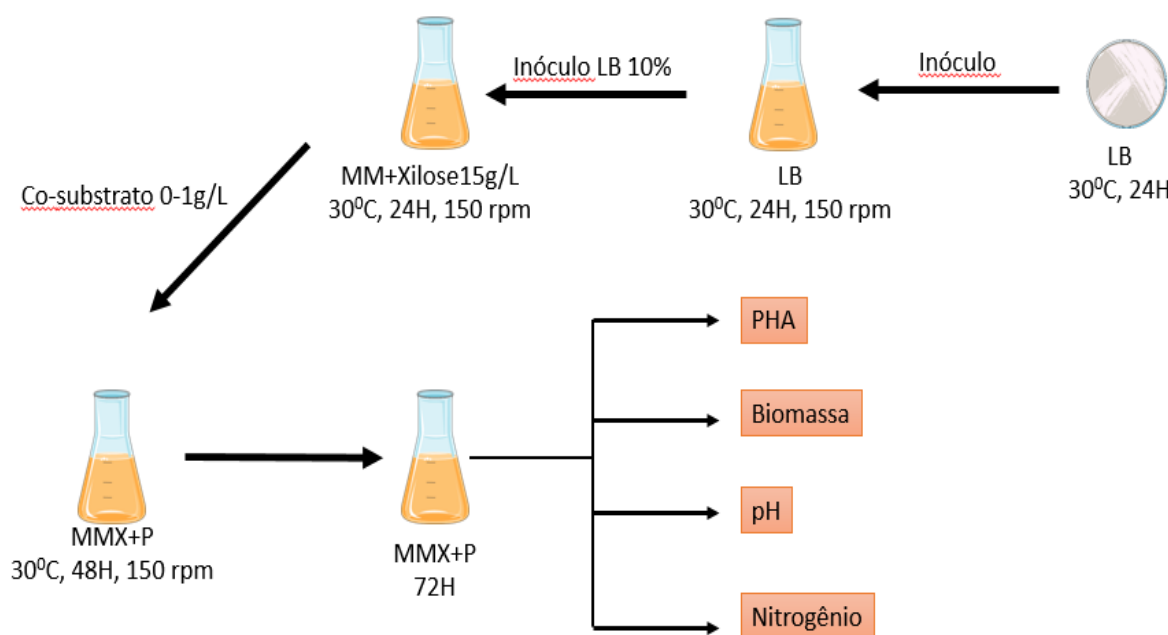
Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% (1,0 mL/L)

Solução de elementos traços (2,0 mL/L)

4.3 Experimentos em frasco agitados

As linhagens selvagens (LFM101) e mutantes (LFM019) foram cultivadas seguindo protocolo padrão, segundo o qual foram inoculadas e incubadas inicialmente em 100mL de meio LB, a 30°C, 150 rpm durante 24h. Após esse período, um volume do cultivo de LB que corresponde a 10% do volume total do meio do ensaio, foi inoculado ao meio MM (ROCHA et al. 2008), que contém uma concentração limitada de nitrogênio (0,4-0,5g/L) e foi adicionada xilose a 15g/L, o que propicia ao acúmulo de PHA. Foram utilizados erlenmeyers de 250mL de capacidade, contendo 50mL de meio. Estas culturas foram incubadas a 30°C, sob agitação de 150 rpm durante 24h. Após esse período, foi adicionado propionato de sódio para se alcançar as maiores massas de 3HV possíveis, em 5 concentrações diferentes: 1,2g/L; 0,90g/L; 0,70g/L; 0,3g/L e 0,1g/L.

Figura 11: Esquema ilustrando o ensaio de cultivo em frascos agitados para acúmulo de PHA em meio mineral (MM) com xilose e propionato (representado pela letra P na imagem).



No tempo inicial, após 24 e 72h de cultivo, foram retiradas amostras para análises posteriores (determinação da biomassa, PHA, propionato, xilose, pH, nitrogênio). Os ensaios foram realizados com cultivos em triplicata.

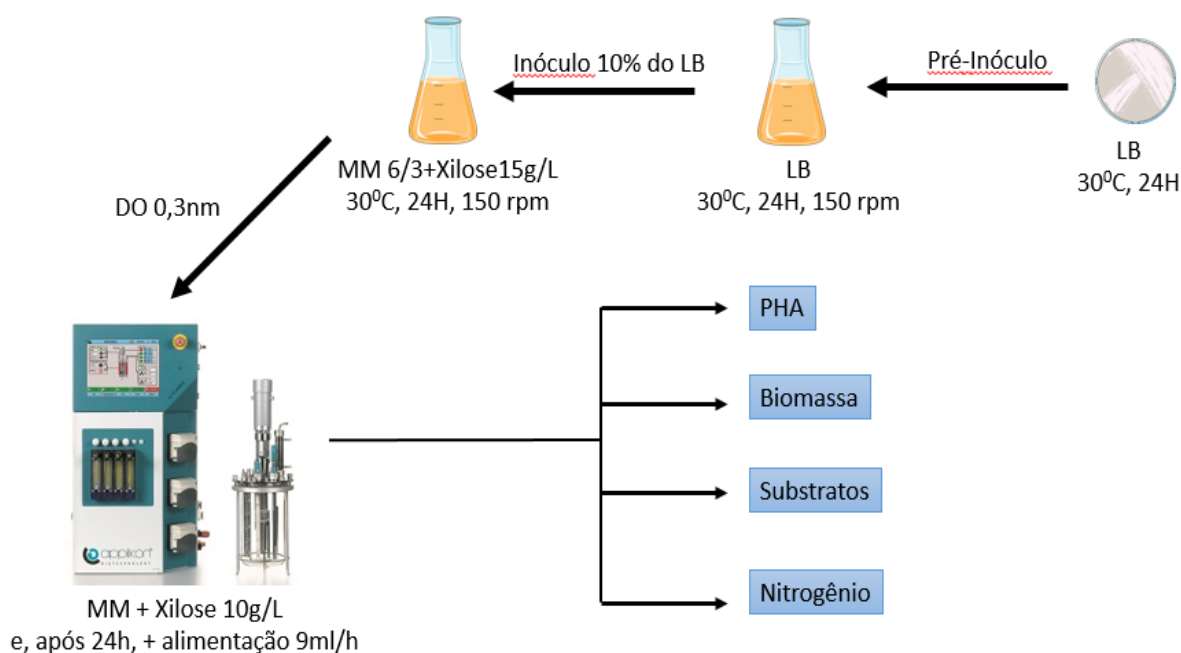
4.4 Experimentos em biorreatores

A linhagem selvagem de *B. sacchari* foi cultivada em biorreator em meio com limitação de nitrogênio, que foi zerado no início da fase de acúmulo. Para se iniciar esse cultivo, foi inicialmente realizado um pré-inóculo em meio LB por 24h, 30°C e 150 RPM. Após esse período foi retirada uma alíquota, equivalente a 10% do inóculo, para ser realizado um inóculo em meio mineral 6/3 balanceado (que possui 3 vezes mais fonte de nitrogênio, visando minimizar o acúmulo de PHA antes de ser inoculado nos biorreatores) contendo 10g/L de xilose, por 24h, 30°C e 150 RPM.

Ao fim desse período foi realizada a medida da densidade ótica do inóculo, permitindo assim, calcular quanto deveria ser retirado deste para ser inoculado no biorreator, de modo que a DO inicial dentro do reator fosse de 0,3nm. Esse volume foi então centrifugado a 7000 RPM, por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em solução salina 0,85%, sendo então inoculado no reator. No reator inicialmente havia 10g/L de xilose, e após o esgotamento desta fonte inicial de

carbono e do nitrogênio, era então ligada à bomba de alimentação em uma vazão de 9mL/h para as soluções com diferentes concentrações de propionato em relação à xilose. Na figura 12 está representado o esquema do ensaio em biorreator.

Figura 12: Esquema ilustrando o ensaio de cultivo em biorreator para acúmulo de PHA em meio mineral (MM) com xilose e propionato sendo alimentados em diferentes proporções.



Em diferentes tempos foram retiradas amostras dos biorreatores para se poder realizar as análises da determinação da biomassa, PHA, propionato, xilose, substratos no meio, nitrogênio.

4.5 Extração e purificação dos polímeros

Uma amostra de 5mL foi retirada da cultura original do ensaio de acúmulo de polímero, ela foi centrifugada no equipamento Sorvall (Biofuge PrimoR) a 10600xg, durante 20 minutos a 4°C. O pellet foi coletado, congelado a -200°C e posteriormente foi liofilizado. A biomassa seca foi pesada usando uma balança analítica (Ohaus Adventurer, Parsippany, New Jersey, EUA) e expressa como CDM (cell dry mass-massa seca celular) em gramas por litro. Dessa biomassa pesada foi então retirada uma quantidade de massa seca que posteriormente foi então submetida à propanólise (RIIS e MAI, 1988). Para a propanólise, entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, onde foram adicionados 1,5 ml de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 1,5 mL de 1,2-dicloroetano

e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 mg/mL) em propanol, que funcionou como padrão interno durante as análises em cromatografia gasosa. Esses tubos foram então levados a banho de água a 100°C por 3 horas. Ao final desse tempo de incubação, foi utilizada água destilada para resfriar os tubos e separar a fase aquosa da fase orgânica. Foi realizada então homogeneização em agitador de tubos por 60 segundos para melhor separação. Essa fase aquosa foi retirada e adicionou-se sulfato de sódio anidro na mistura restante para absorção de água remanescente na fase orgânica, que continha os propil-ésteres. A mistura resultante foi transferida para vials de cromatografia. Foi determinada a composição do PHA dos propil-ésteres, assim obtidos, por cromatografia gasosa.

4.6 Metodologias analíticas

Determinação de carboidratos: A concentração de xilose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um volume de 10 µL de cada amostra foi injetado em um HPLC Dionex (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com uma coluna de separação de açúcar (Biorad HPX-87H). Para detecção, foi utilizado um refratômetro diferencial (Shodex IR-101). A separação ocorreu a 40 ° C com solução de fase móvel de H₂SO₄ (5 mM) a um fluxo de 0,6 mL / min. A curva padrão foi construída usando soluções de xilose contendo até 5 g / L (0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 5,00 g/L).

Determinação de ácidos orgânicos: A concentração de propionato também foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Um volume de 10 µL de cada amostra foi injetado em um HPLC Dionex (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) equipado com uma coluna de separação (Biorad HPX-87H). Para detecção, foi utilizado um refratômetro diferencial (Shodex IR-101). A separação ocorreu a 40 ° C com solução de fase móvel de H₂SO₄ (5 mM) a um fluxo de 0,6 mL / min. A curva padrão foi construída usando soluções de ácido propiônico contendo até 5 g / L (0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00; 5,00 g/L). As determinações de xilose e propionato ocorreram simultaneamente na mesma corrida.

Nitrogênio amoniacal: Um eletrodo de íons (Orion 9512HPBNWP) e um potenciômetro (Thermo Scientific, Orion 4 Star, pH-ISE Benchtop, Singapore) foram utilizados para determinar a concentração de nitrogênio amoniacal. Um volume da amostra (3 ml) foi alcalinizado com uma solução de NaOH a 10M (30µl), ocorrendo

assim a liberação de NH_4 gasoso, devido ao desequilíbrio provocado pelo aumento do pH. Esse gás que foi liberado irá permear a membrana que está no eletrodo e é detectado, gerando então uma leitura em mV (originada pela diferença de potencial).

A curva padrão foi feita utilizando soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contendo 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ppm (partes por milhão) de nitrogênio.

Determinação de massa seca celular (MSC): A biomassa foi determinada por gravimetria, centrifugando-se 5ml do cultivo (10600g, 20 min, 4°C) na centrífuga Sorvall (Biofuge PrimoR). O pellet gerado foi coletado e transferido para um microtubo, (que já havia sido previamente pesado e identificado), onde foi então congelado a -200°C, para poder posteriormente ser liofilizado e, após a liofilização, ser pesado em uma balança analítica (Ohaus Adventurer, Parsippany, New Jersey, EUA) para determinação da massa seca celular descontando-se do peso medido com a massa, o valor anotado anteriormente como sendo somente o do microtubo.

Protocolo de liofilização: O equipamento foi colocado a uma temperatura de -40°C, onde posteriormente foram colocados os microtubos destampados. Após 2,5 horas a bomba de vácuo foi ligada, levando a pressão a baixar até 0,080mBar. Quando alcançada essa pressão, a temperatura foi ajustada para 0°C e deixado overnight. No dia seguinte a temperatura foi ajustada para 30°C e após 3 horas a bomba de vácuo foi desligada. A pressão interna foi retornada as condições ambiente e as amostras retiradas.

Determinação da quantidade e composição de PHA:

Para determinação da quantidade e composição do PHA foi utilizada cromatografia gasosa de propil-ésteres, após protocolo de propanólise (RIIS e MAI, 1988), conforme já descrito. Após isso um volume de 1 μl da amostra foi analisado após fracionamento (split 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95% dimetil-polisiloxane, comprimento 30m, diâmetro de 320mm, espessura do filme 0,25 μm). A análise ocorreu sob as seguintes condições:

Gás de arraste: Hélio (0,6 mL/min); Temperatura do injetor: 250°C; Temperatura do detector: 300°C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID)

Programa de temperaturas do forno: 100°C por 3 minutos (6°C/min), elevação da temperatura até 180°C por 5 minutos (6°C/min) e até 240°C por 1 minuto. O ácido benzoico foi utilizado como padrão interno.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os resultados obtidos nos ensaios, sejam eles em frascos agitados ou em biorreatores, estão demonstrados nesse tópico em forma de gráficos e tabelas.

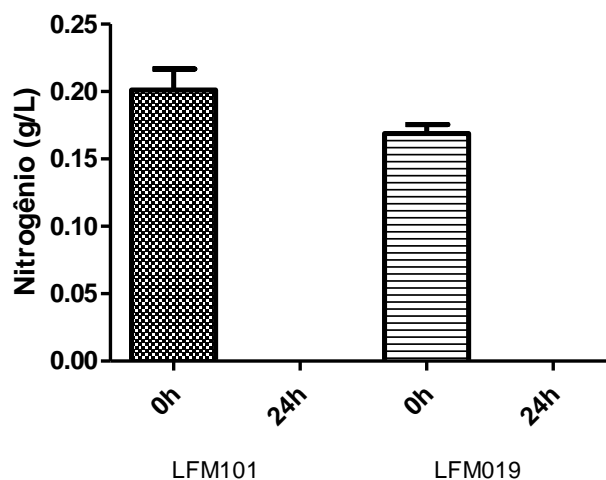
5.1 Ensaio em frascos agitados

Para se conhecer o comportamento da bactéria mutante *B.sacchari* LFM019 no acúmulo de PHA em xilose e propionato, bem como para comparar sua eficiência com a linhagem selvagem, foi realizado ensaio em frascos agitados inicialmente.

5.1.1 Dosagens de nitrogênio, xilose e propionato.

Conforme já mencionado, os poliésteres biodegradáveis da família dos PHA são acumulados, como grânulos intracelulares, por determinadas bactérias, principalmente sob condições desequilibradas de crescimento, quando há excesso de carbono e carência de algum nutriente necessário à multiplicação das células bacterianas, como o nitrogênio (STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995). Perante este fato, os ensaios foram realizados utilizando-se meio mineral contendo uma quantidade limitada de nitrogênio para que, ao final deste, a bactéria desse início ao seu processo de acúmulo. A dosagem desse nitrogênio foi realizada no início do ensaio (tempo 0h), no momento em que o propionato foi adicionado (24h) e ao final do ensaio (72h). O resultado dessa dosagem, para ambas as linhagens trabalhadas, pode ser observado na figura 13. Conforme já esperado, o gráfico mostra que a partir do tempo 24h já não se consegue mais medir nitrogênio, indicando que a bactéria já havia consumido todo o nitrogênio inicialmente disponível, e que, portanto, se encontrava em fase de acúmulo de PHA, já que, simultaneamente, havia carboidrato e propionato disponíveis (concentrações de carboidratos disponíveis para as diferentes linhagens mostrados nas figuras 14, 15,16 e 17).

Figura 13: Nitrogênio presente no meio nos cultivos das duas linhagens testadas, LFM101 e LFM019, durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA. Tempos amostrados em 0, 24 e 72h.



5.1.2 Dosagens das fontes de carbono

Neste trabalho, a fonte de carbono escolhida para ser fornecida a *B. sacchari* foi à xilose, onde a concentração inicial que se buscou fornecer foi de 15g/L. A dosagem de quanto desde açúcar estava disponível para ser utilizado pela bactéria foi dosado por HPLC, conforme descrito no material e métodos. Podem ser observadas as concentrações nos três tempos amostrados (0, 24, 72h) e a velocidade de consumo aproximada. Em ambas as linhagens, a xilose não foi completamente consumida até o tempo de 24 horas conforme esperado e a velocidade de consumo desta entre as linhagens não foi expressamente diferente. Esse consumo está demonstrado na figura 14 para a linhagem selvagem e 15 para linhagem mutante. Dessa forma, o restante de xilose no meio pode ter sido utilizado pela *B. sacchari* para diferentes funções, como será discutido nas próximas análises.

Figura 14: Xilose presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem selvagem, LFM101. Médias dos resultados das triplicatas biológicas, tempos amostrados em 0, 24 e 72h.

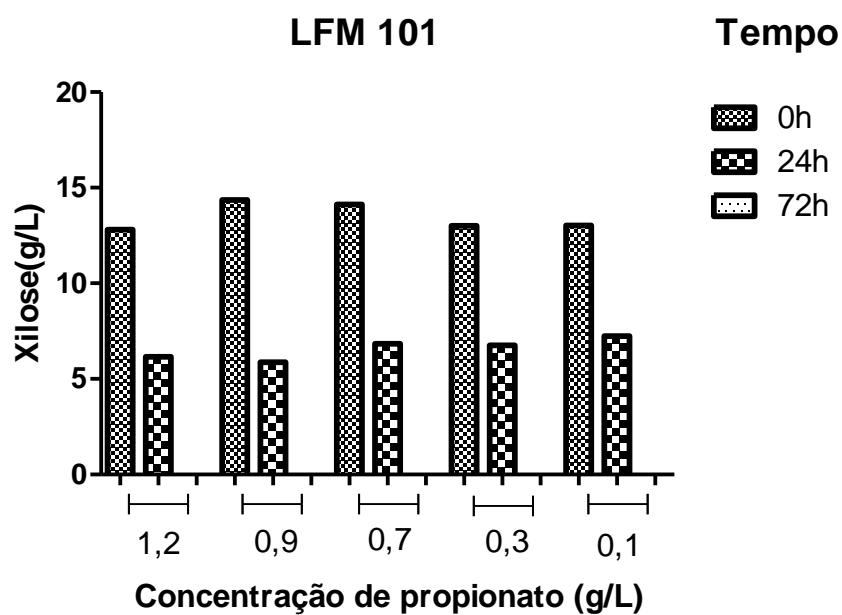
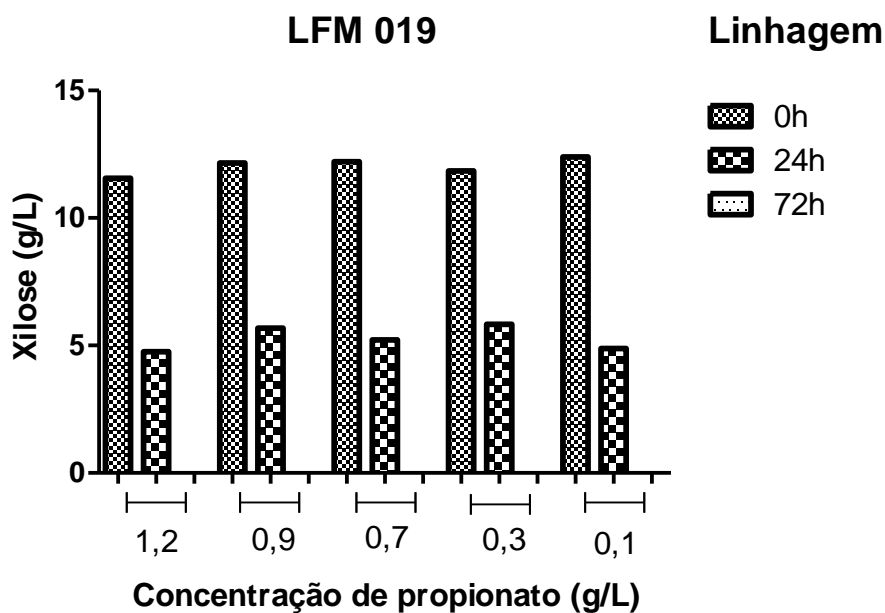


Figura 15: Xilose presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem mutante, LFM019. Médias dos resultados das triplicatas biológicas, tempos amostrados em 0, 24 e 72h.



Conforme mencionado na revisão bibliográfica, para que ocorra uma melhora na maleabilidade do 3HB é necessária à inserção de unidades de 3-hidroxivalerato (3HV), gerando dessa forma o copolímero P3HB-co-3HV. Isso será possível pelo fornecimento de propionato no tempo de 24 horas, quando *B. sacchari* se encontra em fase de acúmulo. Na figura 16, para a linhagem selvagem, e na 17, para a linhagem mutante, estão demonstradas as medições realizadas das concentrações de propionato em dois tempos, 24h no momento do ensaio em que foi adicionado o propionato e 72h sendo o tempo final do ensaio em frascos agitados. Pode-se notar que o propionato foi totalmente consumido em praticamente todas as réplicas de ambas as linhagens, com exceção das concentrações de 0,9 e 1,2g/L na linhagem mutante, em que ainda restou algum propionato no meio. Isso está de acordo com os resultados obtidos por Pereira (2009), embora tenham sido outras as concentrações testadas naquele trabalho, reforçando a hipótese de que uma segunda via, possivelmente a α -oxidação, estaria operante em concentrações maiores de propionato.

Figura 16: Propionato presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem selvagem, LFM101. Médias dos resultados das triplicatas biológicas, tempos amostrados em 24 e 72h.

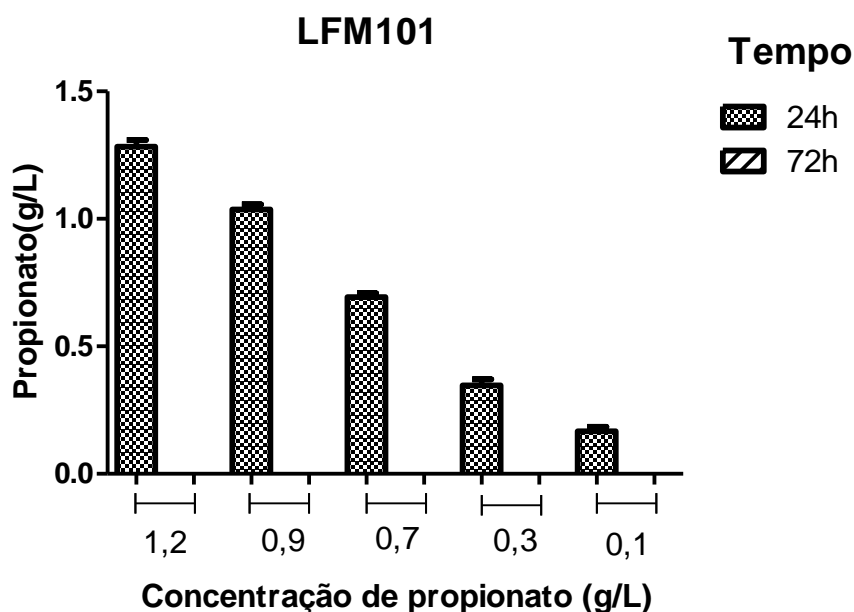
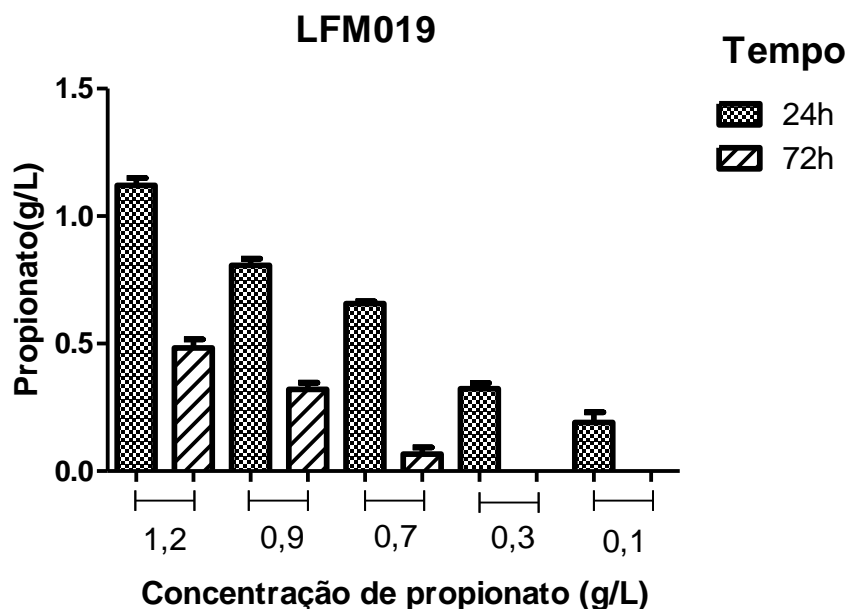


Figura 17: Propionato presente no meio durante o ensaio em frascos agitados para o acúmulo de PHA para a linhagem mutante, LFM019. Médias dos resultados das triplicatas biológicas, tempos amostrados em 24 e 72h.



Todos os valores obtidos durante as amostragens e em todas as réplicas para o ensaio em frascos agitados estão apresentados nas tabelas nos Anexo I para a linhagem selvagem, LFM101 e no Anexo II para a linhagem mutante, LFM019.

5.2 Acúmulo de PHA nas primeiras 24 horas.

Conforme mencionado, a bactéria precisa estar sob duas condições para dar início ao acúmulo de PHA, excesso da fonte de carbono (xilose) e limitação de um nutriente (nitrogênio). Ambos já estão ocorrendo após as primeiras 24 horas de ensaio, quando *B. sacchari* já está acumulando 3-hidroxi-butirato (3HB), que é gerado após o metabolismo do carboidrato e ação da PHA sintase. Na figura 18 podemos observar o quanto de massa seca celular (MSC) foi acumulada nessas primeiras 24 horas, e na figura 19 a porcentagem de PHA que estava contido nessa massa seca celular. Em ambos os gráficos é possível uma comparação nos resultados entre as linhas das duas linhagens estudadas, LFM101 selvagem e LFM019 mutante. Nesses resultados, é possível observar uma pequena quantidade a mais de massa seca celular gerada pela selvagem e um destaque a mais para a porcentagem de PHA dessa massa, acumulada pela selvagem. Nesse tempo de

ensaio, todo o PHA gerado é correspondente ao 3HB, uma vez que o único substrato fornecido foi o açúcar, xilose, como a fonte de carbono. A tabela 4 apresenta os valores utilizados para essa análise.

LFM101		Xilose (g/L)		PHA					
Concentrações	0h	24h	MSC (g/L) 24h	%MSC 24h	3HB (mol%) 24h	Massa PHA (g/L)	Xr. (g/L)	$Y_{HB/xil}$ (g/g)	$Y_{X/xil}$ (g/g)
0,90g/L	14,355	5,875	4,000	40,543	100	1,622	2,378	0,113	0,166
0,70g/L	14,132	6,838	3,933	41,037	100	1,615	2,318	0,114	0,164
0,30g/L	13,010	6,758	4,133	43,413	100	1,793	2,341	0,138	0,181
0,10g/L	13,019	7,237	4,133	43,170	100	1,784	2,349	0,138	0,181
LFM019		Xilose (g/L)		PHA					
Concentrações	0h	24h	MSC (g/L) 24h	%MSC 24h	3HB (mol%) 24h	Massa PHA (g/L)	Massa residual (g/L)	$Y_{HB/xil}$ (g/g)	$Y_{X/xil}$ (g/g)
0,90g/L	12,160	5,676	4,000	35,127	100	1,409	2,591	0,116	0,213
0,70g/L	12,211	5,217	3,667	30,820	100	1,136	2,531	0,093	0,207
0,30g/L	11,838	5,831	3,467	29,243	100	1,021	2,445	0,087	0,207
0,10g/L	12,398	4,882	3,600	33,000	100	1,638	1,962	0,132	0,159

Tabela 4: Média dos resultados obtidos no tempo de 24h durante o ensaio em frascos agitados para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores de xilose presente no meio, quantidade de massa seca celular (MSC) obtida, porcentagem de PHA na massa seca, mol% de 3HB, massa PHA, Xr (Massa residual), fatores de conversão de xilose em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e em Xr ($Y_{X/xil}$)

Figura 18: Quantidade de massa seca celular, em g/L, gerada até a coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

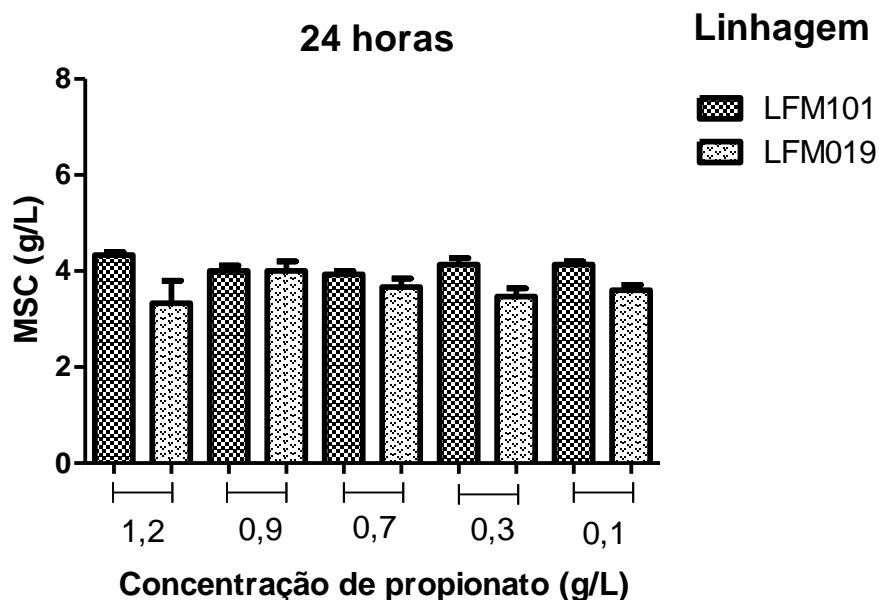
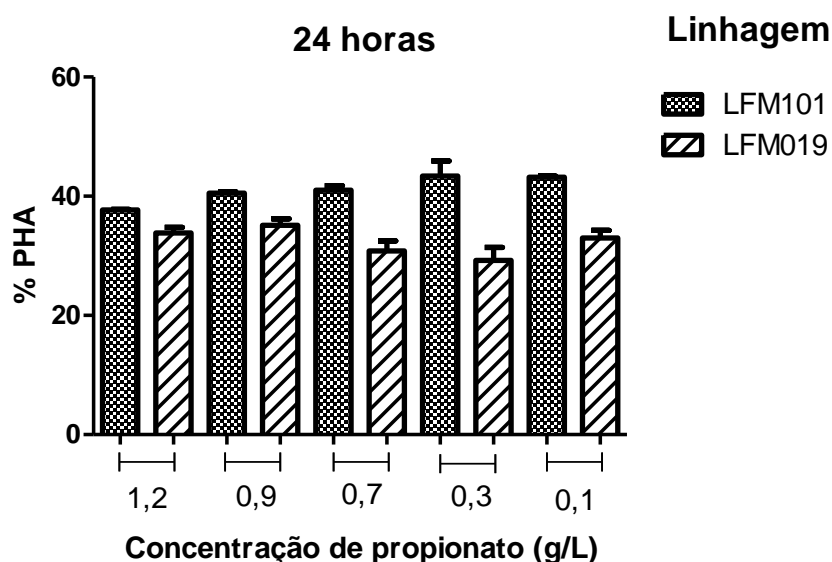


Figura 19: Porcentagem de PHA na massa seca celular, gerado até a coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Essa porcentagem de PHA permite calcular a quantidade de massa (em g/L) de PHA acumulado pela *B. sacchari*, que está representado na figura 20, reproduzindo os melhores resultados da linhagem selvagem, LFM101, em relação a mutante,

LFM019, no acúmulo de PHA e, por consequência, também no fator de conversão de xilose a 3HB ($Y_{HB/xil}$ g/g) que é observado na figura 20.

Figura 20: Quantidade de massa de PHA, em g/L, gerada até a coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

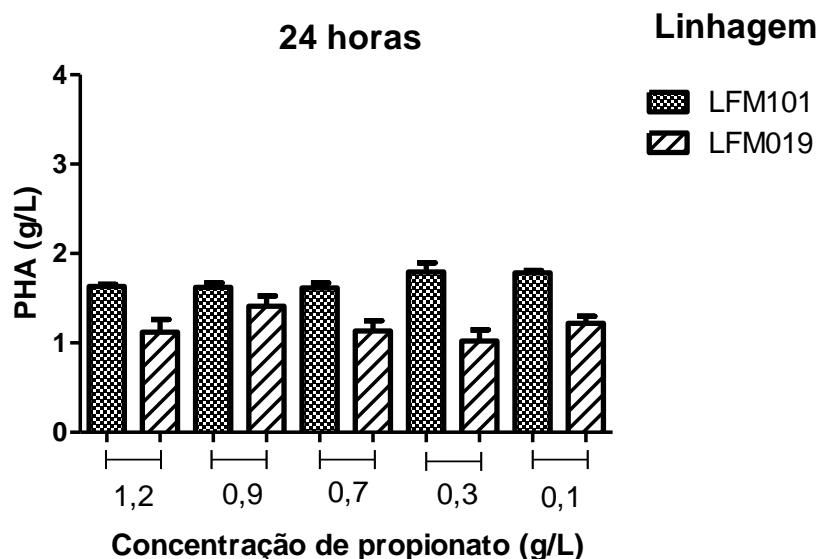
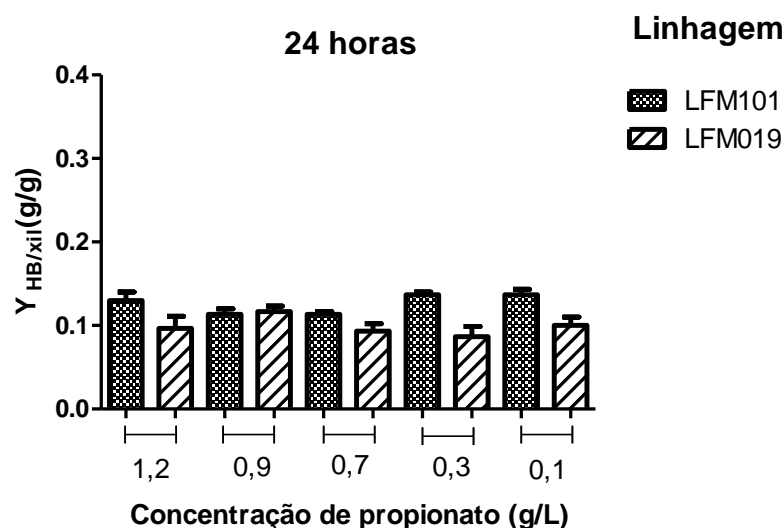


Figura 21: Fator de conversão de xilose em 3HB calculado a partir dos dados obtidos na coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Como demonstrado, nem toda a massa gerada é PHA acumulado. Desta forma, a massa que restou, a massa residual, também pode ser medida para se conhecer o quanto da xilose consumida não foi direcionada para o acúmulo de PHA. Os valores, para o tempo de 24 horas, da massa residual (em g/L) estão expressos na figura 22

e o fator de conversão de xilose a massa residual ($Y_{x/xil}$ g/g) é observado na figura 23 para ambas as linhagens. Em ambas as medições, a linhagem mutante apresentou, em maior parte das concentrações, valores mais altos, pois obteve um menor valor de conversão da xilose a 3HB.

Figura 22: Massa residual, em g/L, gerada até a coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante.

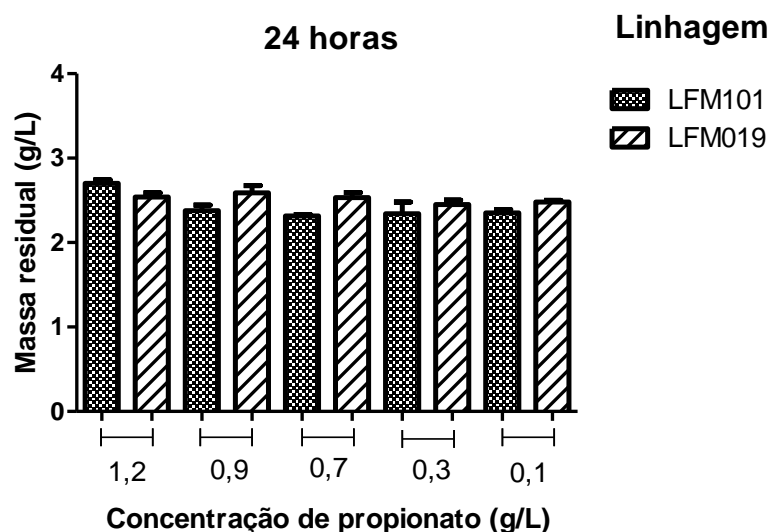
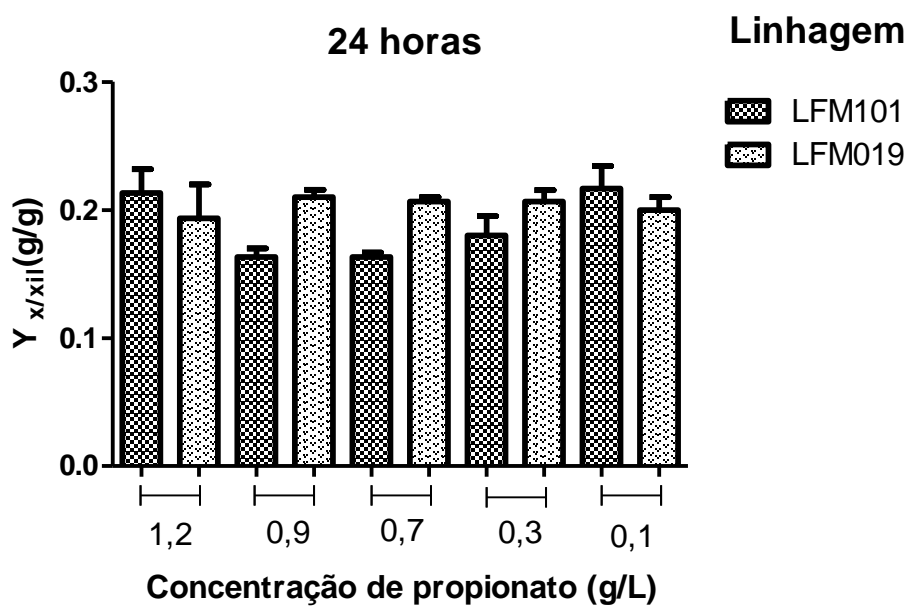


Figura 23: Fator de conversão de xilose em massa residual calculado a partir dos dados obtidos na coleta do primeiro ponto para análise, em 24h, do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante.



5.3 Resultados ao final das 72 horas de ensaio.

No tempo de 24 foram feitas as adições de propionato em diferentes concentrações. Ao final do ensaio, que ocorreu depois de decorridas 72 horas, foi obtido o resultado total dos parâmetros avaliados. Isso permitiu uma comparação completa entre as duas linhagens, selvagem e mutante, bem como entre os tempos de 24 e 72 horas.

5.3.1 Comparação, entre as linhagens, da MSC e porcentagem de PHA geradas.

Após mais 48 horas de ensaio, totalizando 72 horas, *B. sacchari* consumiu toda a xilose e praticamente todo o propionato fornecidos às réplicas, o que está representado na figura 24. Nesse período a xilose restante pode ter sido utilizada para diferentes funções como gerar mais acetil-CoA a ser convertida em 3HB, ser incorporada com propionil-CoA proveniente do propionato consumido, ou para manutenção das funções vitais da célula. O propionato fornecido foi predominantemente direcionado ao acúmulo de 3HV na linhagem mutante, conforme será discutido posteriormente. Perante esses fatos foram realizadas medições, para se verificar o quanto *B. sacchari* gerou de massa seca celular ao final das 72h de ensaio em frascos agitados, podendo ser observado na figura 25, bem como a porcentagem de PHA contida nessa massa seca celular, demonstrada na figura 26. Essas medições foram realizadas para ambas as linhagens, tendo seus resultados obtidos comparados em cada gráfico. Os valores foram verificados quanto a sua relevância estatística através do sistema de teste T, tendo seus resultados expressos na parte superior das barras dos gráficos e sua legenda plotada juntamente com a legenda do gráfico. As médias dos valores utilizados para serem representados nos gráficos estão apresentadas na tabela 5. Para se conhecer a relevância estatística dos resultados obtidos foi aplicado o teste t de Student. Ele avalia essa relevância estatística entre as diferenças encontradas nos ensaios ao se comparar, para uma mesma concentração, a linhagem selvagem com a mutante (teste t não pareado), bem como a evolução na produção entre as 24 e 72h (teste t pareado) (ROSNER, 1998).

Ele tem como produto a medida do valor de p. que indica a probabilidade de a diferença encontrada entre as médias ter sido por acaso. Se esse valor for menor que 5% ($p < 0.05$), é indicativo de que foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa. Dessa forma, o software Prism 5 da empresa GraphPad possibilitou

essas análises, nas quais quanto menor o valor de p., mais significante estatisticamente foi o resultado obtido. Esse software traz a seguinte legenda:

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

*** $p < 0.001$

LFM101	Xilose (g/L)		Propionato (g/L)		PHA			
	0h	72h	Inicial	Final	MSC (g/L)	%MSC	3HB (mol%)	3HV (mol%)
1,20g/L	12,805	0,000	1,280	0,050	5,933	53,810	96,870	3,130
0,90g/L	14,355	0,000	1,034	0,064	6,000	53,797	98,020	1,980
0,70g/L	14,132	0,000	0,690	0,055	6,133	53,820	99,623	0,377
0,30g/L	13,010	0,000	0,343	0,055	6,200	55,560	99,647	0,353
0,10g/L	13,019	0,000	0,166	0,000	6,267	55,420	99,893	0,107
LFM019	Xilose (g/L)		Propionato(g/L)		PHA			
Concen- trações	0h	72h	Inicial	Final	MSC (g/L)	%MSC	3HB (mol%)	3HV (mol%)
1,20g/L	11,558	0,000	1,121	0,482	4,067	31,953	91,810	8,190
0,90g/L	12,160	0,000	0,806	0,320	4,667	36,793	85,930	14,070
0,70g/L	12,211	0,000	0,656	0,067	6,400	45,917	84,297	15,703
0,30g/L	11,838	0,000	0,323	0,000	6,733	51,570	92,880	7,120
0,10g/L	12,398	0,000	0,194	0,000	6,667	50,057	97,807	2,193

Tabela 5: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados (após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores de xilose presente no meio, propionato presente no meio, quantidade de massa seca celular (MSC) obtida, porcentagem de PHA na massa seca (%MSC), porcentagem de 3HB na massa de PHA (3HB mol%) e porcentagem de 3HV na massa de PHA (3HV mol%).

Figura 24: Quantidade de propionato consumido no intervalo de tempo de 48h entre a adição, às 24h de ensaio, até o fim do ensaio em 72h. Os resultados comparam ambas as linhagens, durante o ensaio em frascos agitados para as 5 concentrações de propionato (0,1 a 1,2g/L).

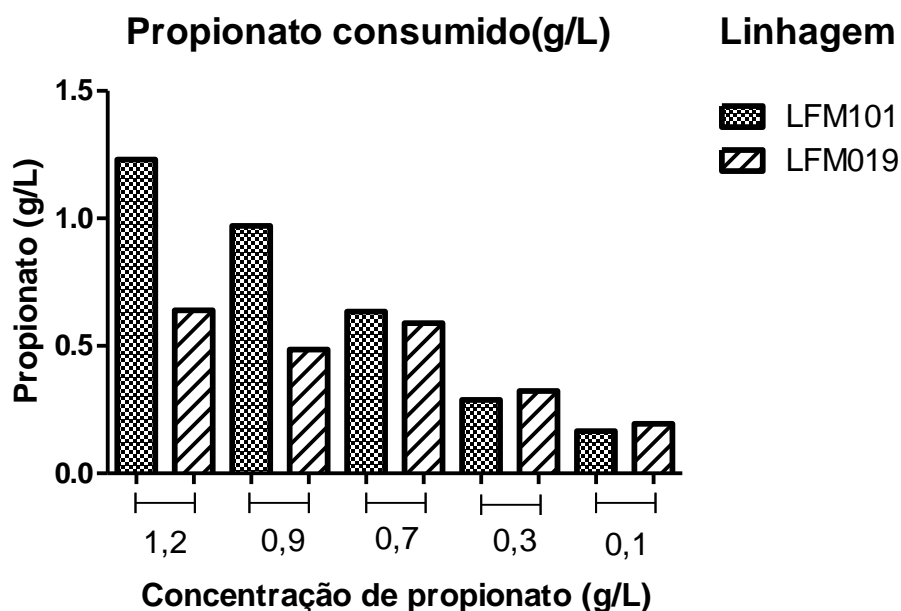


Figura 25: Quantidade de massa seca celular, em g/L, gerada ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.

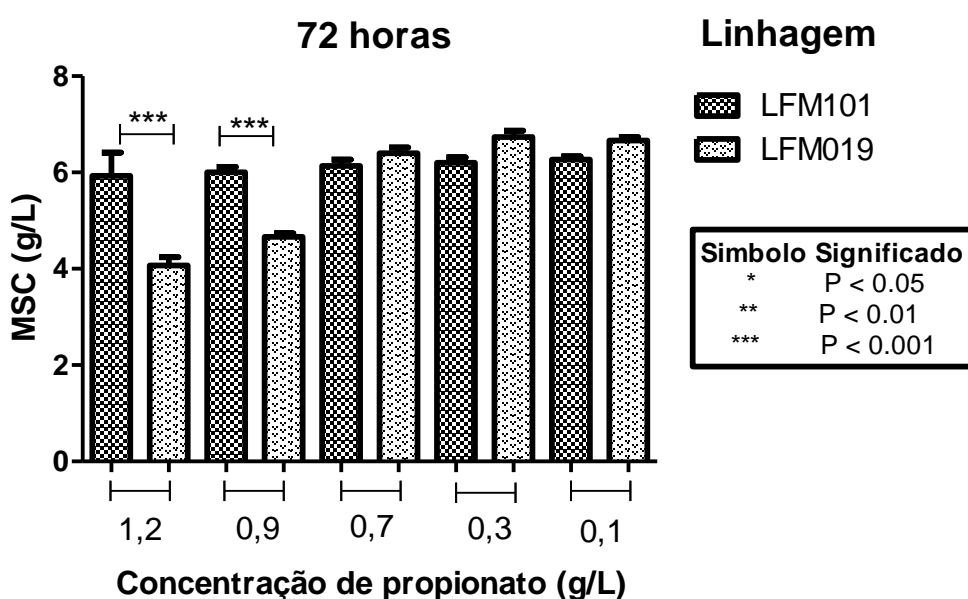
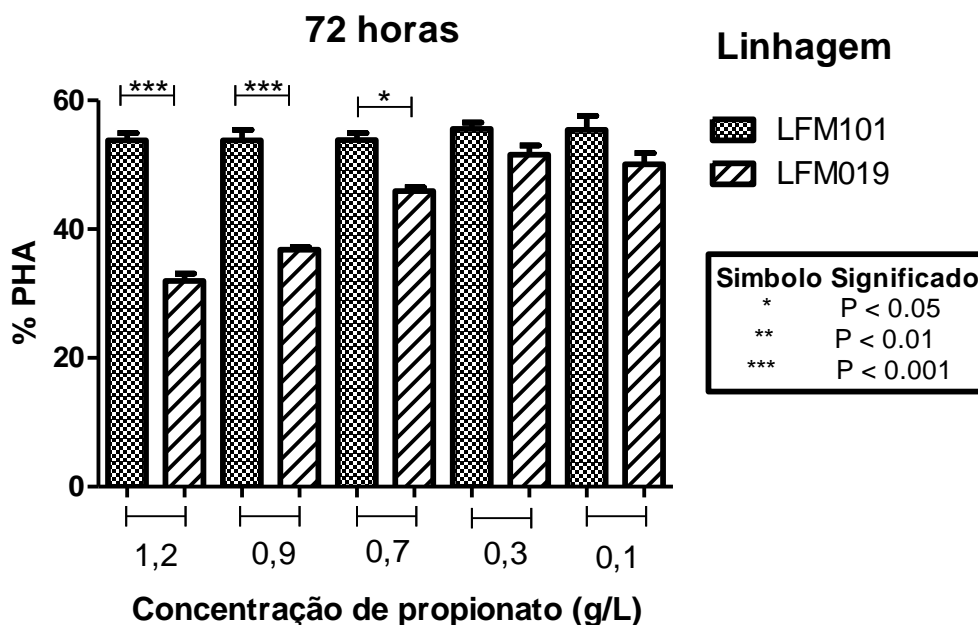


Figura 26: Porcentagem de PHA contido na massa seca celular gerada ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.



A linhagem selvagem apresentou valores mais altos, tanto na quantidade de massa seca celular apresentada, quanto na porcentagem de PHA desta massa, principalmente nas concentrações mais altas de propionato fornecidas. Uma possível explicação para isso é que a linhagem selvagem, LFM101, está tendo o propionato fornecido metabolizado através de outras vias de degradação do propionato, vias essas que não estariam levando ao acúmulo de 3HV. Dessa forma, a linhagem selvagem pode ter utilizado mais acetil-CoA, proveniente da xilose, para promover o acúmulo em maior quantidade de 3HB. Os resultados de massa seca celular obtidos foram melhores que os obtidos por Pereira (2009), porém a quantidade de açúcar fornecido por ela foi menor (5g/L de glicose), o que pode ser a justificativa para isto é a quantidade de acetil-CoA disponível.

5.3.2 Porcentagem de 3HB e 3HV.

O objetivo principal deste conjunto de experimentos foi verificar a quantidade e composição do PHA acumulado por *B. sacchari* ao final do período de ensaio de 72 horas. Desta forma foi realizada a dosagem da quantidade de cada monômero

acumulado (3HB e 3HV) para se conhecer suas proporções no copolímero P3HB-co-3HV, que se buscava gerar.

Ao final deste ensaio as quantidades de 3HB e 3HV geradas praticamente não variaram entre as réplicas, com diferentes doses de propionato fornecido, para a linhagem selvagem. Isso já era esperado e se mostrou condizente com dados obtidos por Silva (1998) e Pereira et al. (2009), mesmo com a utilização de fontes de carbono diferentes, pois esses trabalhos anteriores utilizaram glicose e, neste presente trabalho, foi utilizada como fonte de carbono a xilose. Já na linhagem mutante, a quantidade de 3HB gerada foi pouco menor que a selvagem, porém a porcentagem de 3HV gerada foi bastante superior, principalmente nas concentrações medianas de propionato fornecidas (0,7 e 0,9g/L). Isso é coerente com os resultados obtidos por Pereira e colaboradores (2009), embora as faixas de concentração utilizadas naquele trabalho tenham sido de 0,2, 0,5 e 1g/L de propionato. Naquele trabalho, aumentando-se as concentrações de propiônico também foram aumentadas as porcentagens de 3HV, tal qual observado no presente trabalho. Uma vez que esse mutante (LFM019) se apresenta afetado no ciclo do 2-metilcitrato (2MCC), o direcionamento maior da quantidade de propionil-CoA foi para a síntese de 3-hidroxivalerato (3HV). Essas comparações podem ser observadas na figura 27 quanto à porcentagem de 3HB, na figura 28 as porcentagens 3HV.

Para uma melhor visualização, na figura 29, está representada nos gráficos a quantidade em porcentagem de cada monômero, 3HB e 3HV, correspondentes no total do PHA gerado.

Figura 27: Porcentagem de 3HB contido na quantidade de PHA gerado ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

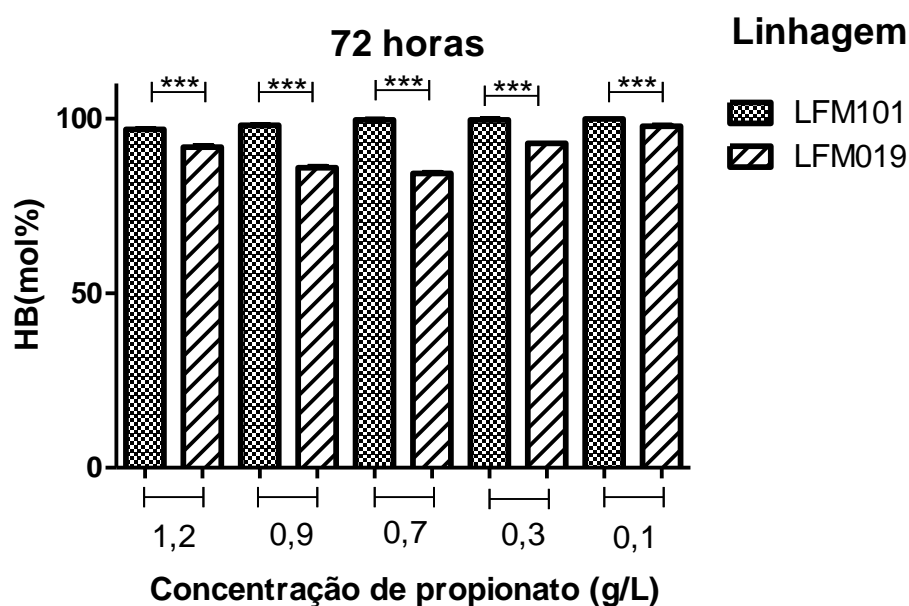


Figura 28: Porcentagem de 3HV contido na quantidade de PHA gerado ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.

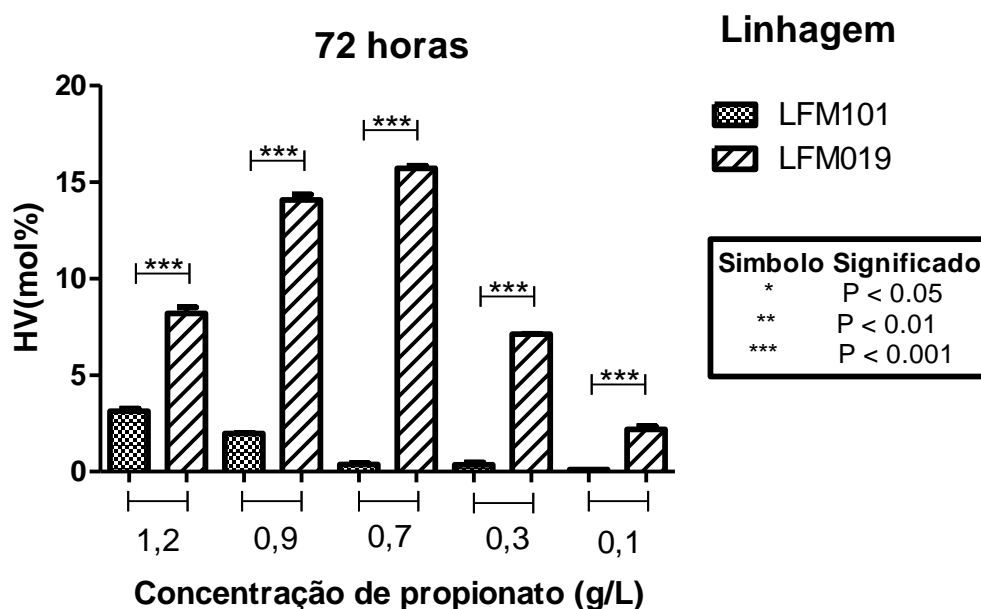
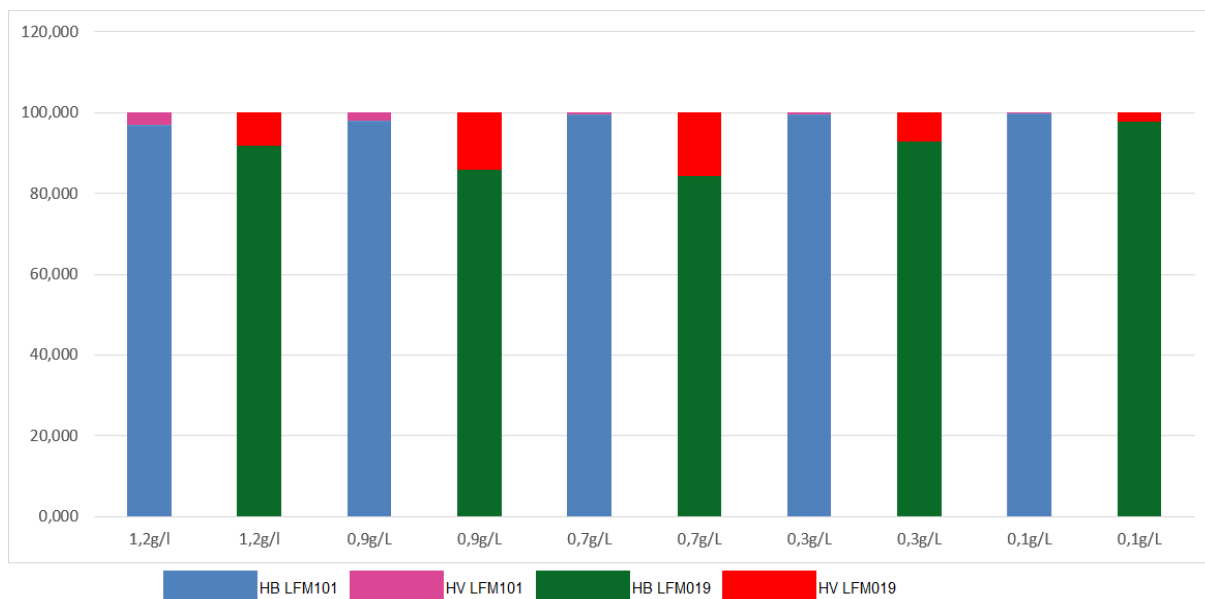


Figura 29: Comparação da composição do P3HB-co-3HV quanto à porcentagem de 3HB e 3HV presentes ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante. Os valores foram obtidos para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



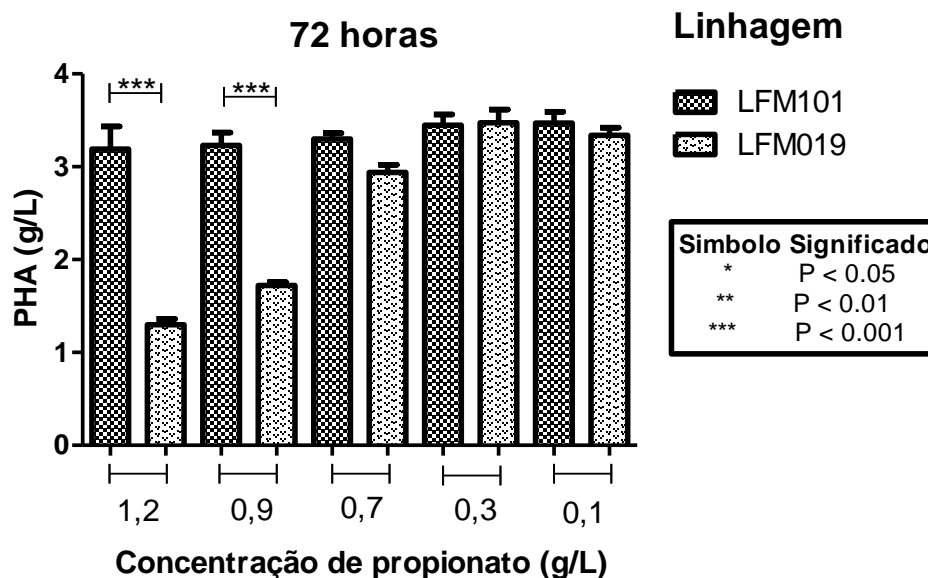
5.3.3 Massas de PHA, residual, 3HB e 3HV obtidas.

A partir da porcentagem de PHA da massa seca celular é possível se chegar ao valor, em g/L, de massa de PHA acumulado pelas linhagens de *B. sacchari*. Isso está demonstrado na figura 30, onde se compara essa massa gerada entre a linhagem selvagem e mutante ao final do ensaio. Da diferença entre a massa seca celular e a massa de PHA podemos obter a massa residual ao final do ensaio, ou seja, o quanto de xilose não foi direcionado para o acúmulo de PHA, mas para massa celular sem polímero. Isso é demonstrado na figura 31. Os valores foram verificados quanto a sua relevância estatística através do sistema de teste T, tendo seus resultados expressos na parte superior das barras dos gráficos e sua legenda plotada juntamente com a legenda do gráfico. As médias dos valores utilizados para serem representados nos gráficos estão apresentadas na tabela 6.

LFM101	PHA				
	Concentrações	Massa PHA (g/L)	Massa residual (g/L)	Massa de 3HV (g/L)	Massa de 3HB (g/L)
	1,20g/L	3,189	2,744	0,099	3,090
	0,90g/L	3,229	2,771	0,064	3,166
	0,70g/L	3,299	2,834	0,012	3,287
	0,30g/L	3,446	2,754	0,012	3,435
	0,10g/L	3,472	2,795	0,004	3,468
LFM019	PHA				
	Concentrações	Massa PHA (g/L)	Massa residual (g/L)	Massa de 3HV (g/L)	Massa de 3HB (g/L)
	1,20g/L	1,298	2,768	0,107	1,192
	0,90g/L	1,717	2,949	0,242	1,476
	0,70g/L	2,940	3,460	0,461	2,478
	0,30g/L	3,474	3,259	0,247	3,227
	0,10g/L	3,335	3,332	0,073	3,261

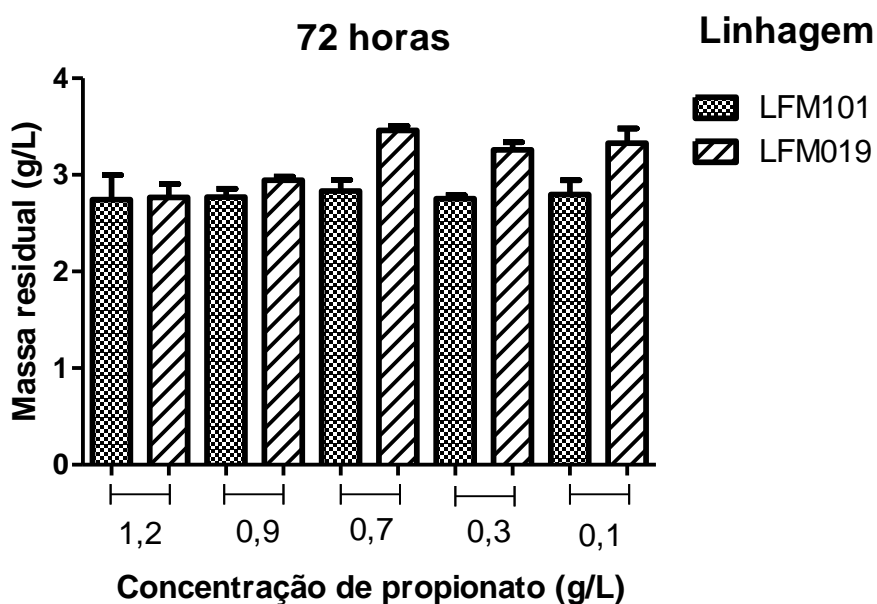
Tabela 6: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados (após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores das massas de PHA, massa residual, massa de 3HV e massa de 3HB.

Figura 30: Massas de PHA geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.



Nas concentrações mais altas de propionato (0,9 e 1,2g/L), os resultados da mutante em acumular PHA, aqui demonstrados como massa em g/L, são inferiores aos da selvagem. Isso possivelmente se deve ao fato de o propionato não estar sendo completamente degradado pelas vias metabólicas da bactéria, e desta forma, o propionato restante no meio de cultura está se mostrando tóxico.

Figura 31: Massas residuais geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Utilizando os valores de mol%, foi possível calcular as massas, em g/L, de 3HB e 3HV para as duas linhagens de *B. sacchari* trabalhadas, LFM101 e LFM019, ao final do ensaio de 72 horas. Esses resultados observados na figura 32 para as massas de 3HV e na figura 33 para as massas de 3HB. Esses resultados são mais uma confirmação da discussão realizada para os dados de mol%, onde doses intermediárias de propionato, na linhagem mutante, se destacam a todas as outras réplicas, tanto de mutante quanto de selvagem.

Na figura 34 temos uma comparação da composição do P3HB-co-3HV quanto às massas de 3HB e 3HV presentes ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens. Isso permite uma melhor visualização dos resultados alcançados e facilita sua compreensão.

Figura 32: Massas de 3HB geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

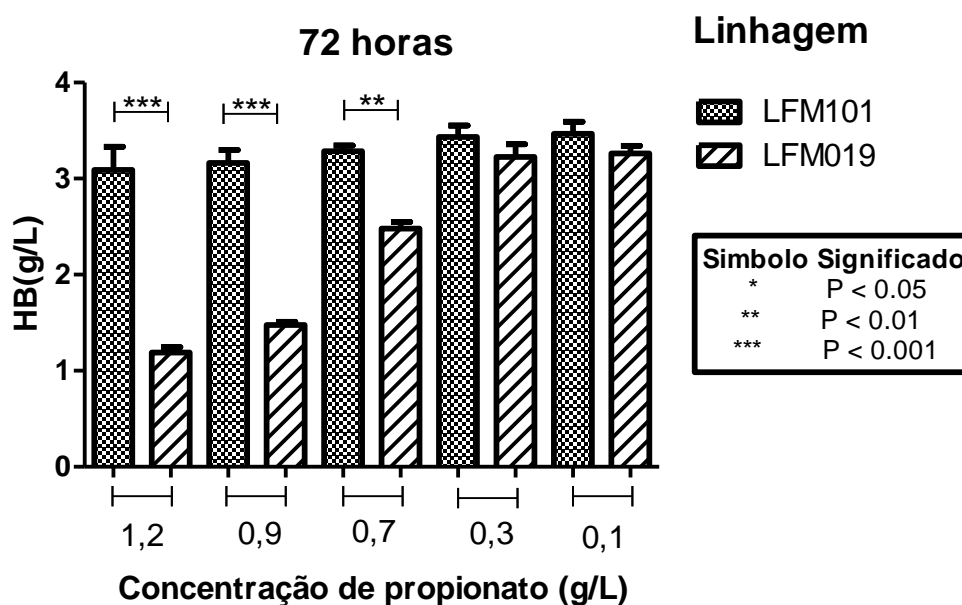


Figura 33: Massas de 3HV geradas ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.

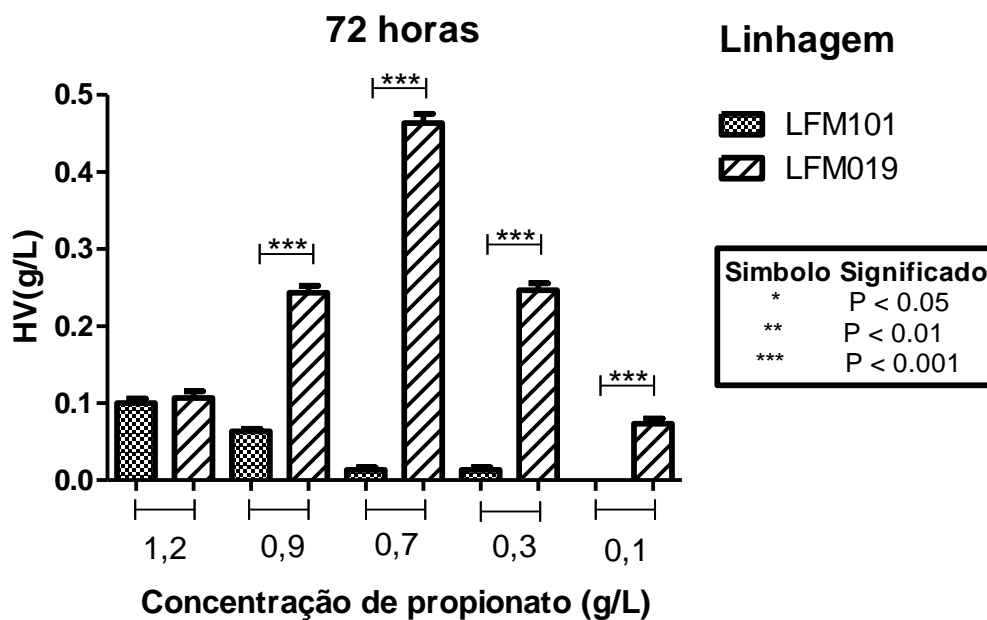
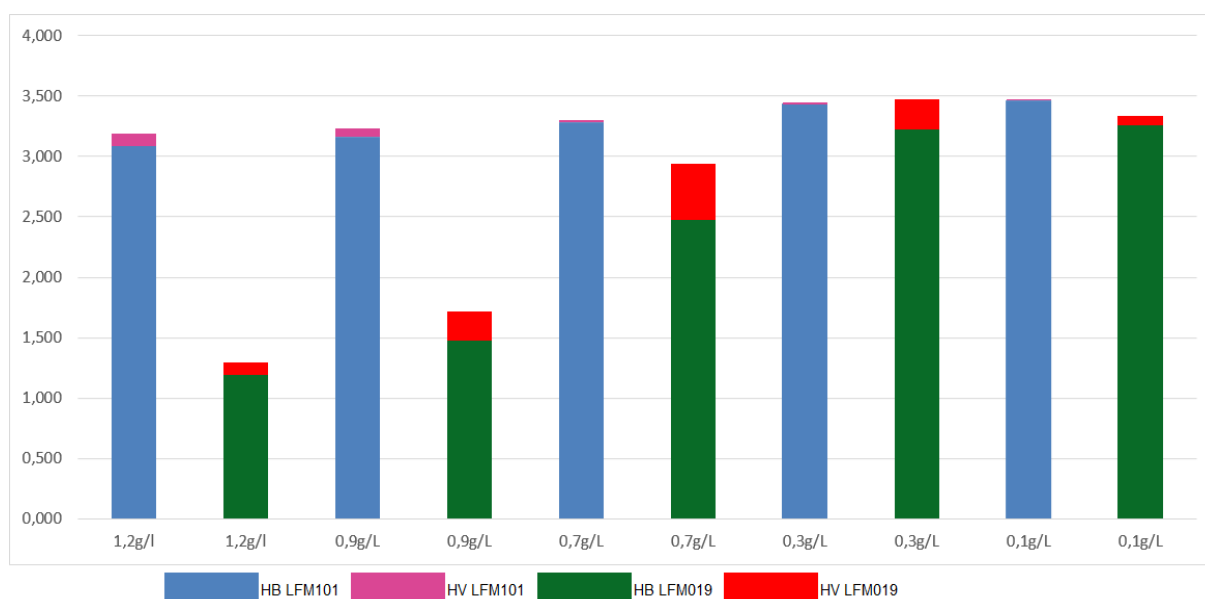


Figura 34: Comparação da composição do P3HB-co-3HV quanto as massas de 3HB e 3HV presentes ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



5.3.4 Cálculo dos $Y_{HB/Xil}$, $Y_{HV/Prop}$ e $Y_{X/Xil}$.

Com as dosagens realizadas da quantidade de 3HB e xilose, bem como de 3HV e propionato, foi possível calcular o $Y_{HB/Xil}$ g/g e o $Y_{HV/Prop}$ g/g, respectivamente. Na linhagem selvagem de *Burkholderia sacchari* (LFM101), os fatores de conversão de propionato a 3HV obtidos na concentração de 1,2g/L estão dentro do esperado, considerando os dados obtidos por Silva (1998) e Pereira e colaboradores (2009). Naqueles trabalhos, para concentrações de propionato de 1g/L os valores de $Y_{HV/Prop}$ g/g apresentados nesses trabalhos foram de 0,10 e 0,11, respectivamente, e os aqui obtidos estão entre 0,07-0,09. A concentração de 0,9g/L ainda não havia sido testada em trabalhos anteriores e os dados aqui apresentados indicam uma alteração não muito significativa quando compara com a concentração de 1,2g/L, tendo seu $Y_{HV/prop}$ 0,06. Houve uma redução no $Y_{HV/prop}$ a partir da concentração de 0,7g/L obtendo-se um valor de 0,2, que foi repetido nas outras duas concentrações menores, 0,3 e 0,1g/L. Essas medições foram realizadas para ambas as linhagens, tendo seus resultados obtidos comparados em cada gráfico. Os resultados do $Y_{HB/Xil}$ g/g estão representados na figura 35 e o $Y_{HV/Prop}$ g/g na figura 36. Os valores foram verificados quanto a sua relevância estatística através do sistema de teste T, tendo seus resultados expressos na parte superior das barras dos gráficos e sua legenda plotada juntamente com a legenda do gráfico. As médias dos valores utilizados para serem representados nos gráficos estão apresentadas na tabela 7.

LFM101	Fatores de conversão		
Concentrações	$Y_{HV/prop}$ (g/g)	$Y_{HB/xil}$ (g/g)	$Y_{X/xil}$ (g/g)
1,20g/L	0,081	0,245	0,217
0,90g/L	0,066	0,221	0,193
0,70g/L	0,020	0,233	0,201
0,30g/L	0,042	0,266	0,212
0,10g/L	0,023	0,267	0,216
LFM019	Fatores de conversão		
Concentrações	$Y_{HV/prop}$ (g/g)	$Y_{HB/xil}$ (g/g)	$Y_{X/xil}$ (g/g)
1,20g/L	0,170	0,103	0,240
0,90g/L	0,500	0,121	0,243
0,70g/L	0,791	0,203	0,284
0,30g/L	0,779	0,273	0,275
0,10g/L	0,420	0,263	0,269

Tabela 7: Média dos resultados obtidos ao final do ensaio em frascos agitados (após 72h de ensaio) para as linhagens selvagem (LFM101) e mutante (LFM019). Valores dos fatores de conversão de propionato em 3HV ($Y_{HV/Prop}$ g/g), fatores de conversão de xilose em 3HB ($Y_{HB/xil}$ g/g) e fatores de conversão de xilose em massa residual ($Y_{X/xil}$ g/g).

Figura 35: Fator de conversão de xilose em 3HB calculados ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos.

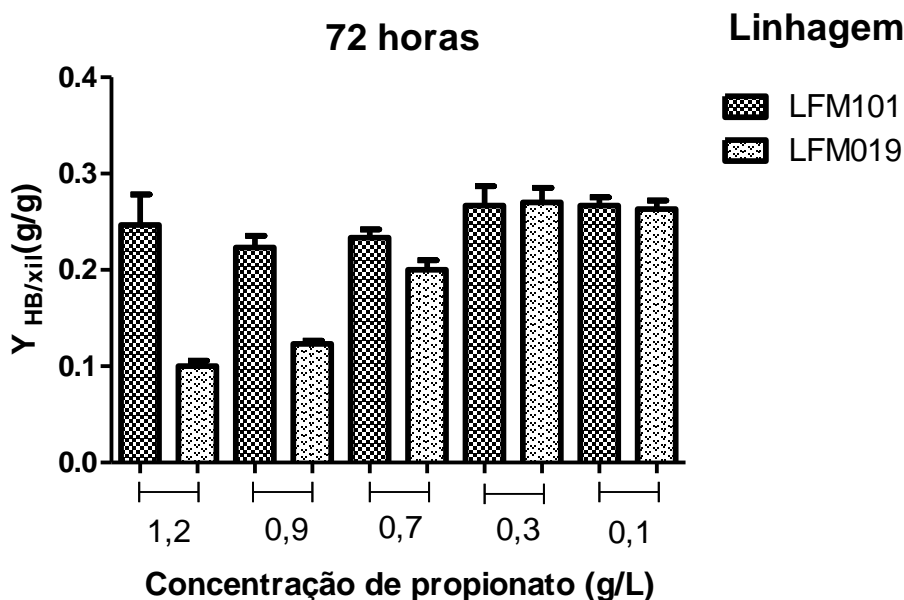
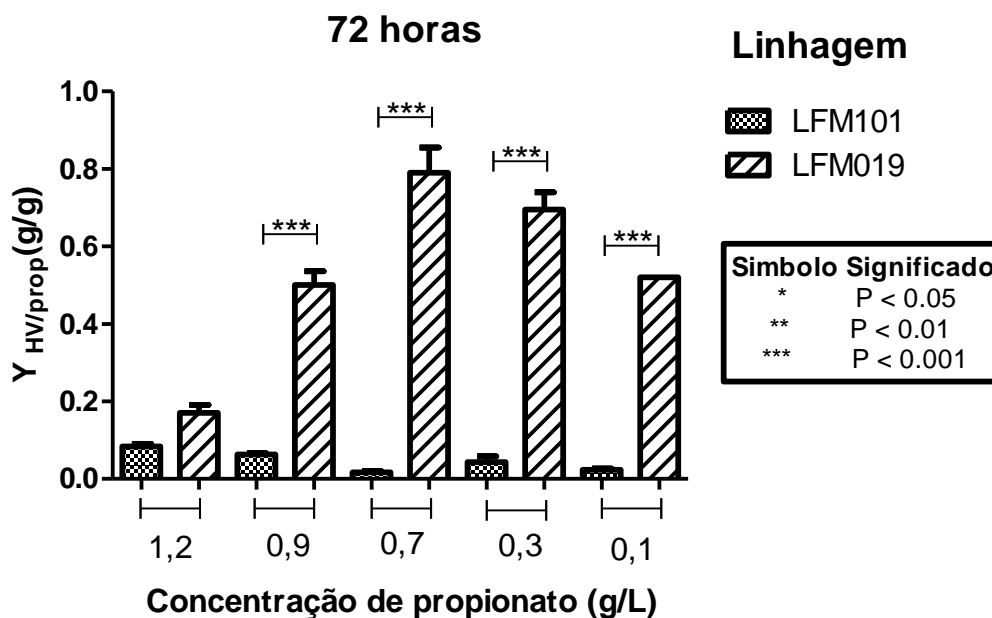


Figura 36: Fator de conversão de propionato em 3HV calculados ao final do ensaio em frascos agitados para ambas as linhagens, selvagem e mutante, comparando os resultados obtidos. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L. A relevância estatística está representada por * de acordo com o valor de P obtido no teste T.



Conforme comentado, para as doses intermediárias de propionato, foram obtidos os melhores resultados do $Y_{HV/Prop}$ g/g, porém não foi alcançado o máximo teórico calculado (GOMEZ et al, 1996) de 1,35g/g. A linhagem selvagem apresentou melhores resultados de $Y_{HB/Xil}$ nas concentrações mais altas de propionato (0,7; 0,9; 1,2g/L), e nas menores (0,1 e 0,3g/L) não houve diferença relevante entre selvagem e mutante. Já nos fatores de conversão $Y_{HV/Prop}$, a mutante foi extremamente superior à selvagem em todas as concentrações, valendo destacar o resultado obtido na concentração de 0,7g/L, que gerou valores de 0,92 g/g, mais próximos do máximo teórico de 1,35 g/g. Em uma visão geral a mutante teve grande melhora na eficiência de converter o propionato em 3HV, uma vez que sua mutação afeta a via do 2 metil citrato, favorecendo a conversão de propionil-CoA em hidroxivalerato.

Além de calcular o $Y_{HB/Xil}$ g/g ao final do ensaio, também foi possível calcular esse valor no tempo de 24 horas, o que permite uma comparação no uso da xilose durante a evolução do ensaio, e dessa forma comparar, entre as linhagens, qual obteve melhor direcionamento desse substrato. Novamente a selvagem apresentando melhores resultados quanto à produção de 3HB, ao longo do ensaio, frente à xilose fornecida.

Os valores dos fatores de conversão de xilose em 3HB calculados podem ser observados na figura 37 para a linhagem selvagem, LFM101, e na figura 38 para a linhagem mutante, LFM019.

Figura 37: Fator de conversão de xilose em 3HB calculados ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

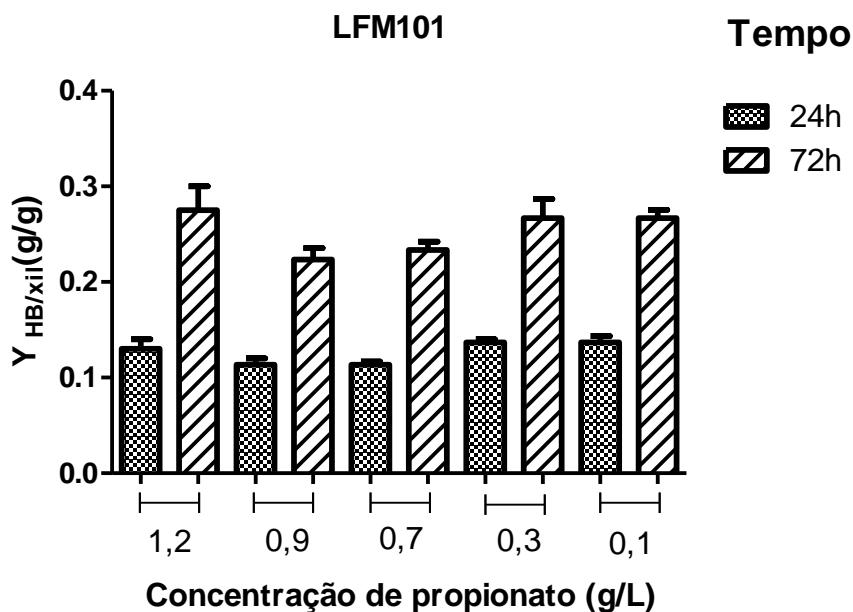
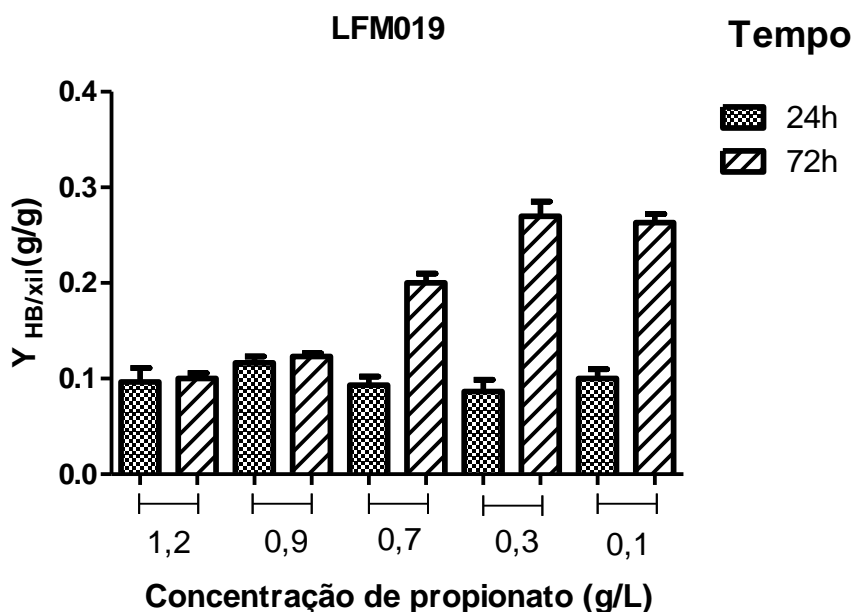


Figura 38: Fator de conversão de xilose em 3HB calculados ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Tal qual foi possível calcular o $Y_{HB/xil}$ g/g nos 2 tempos amostrados, também foi possível realizar com o $Y_{x/xil}$ g/g, para se conhecer o quanto da xilose consumida foi utilizada para o crescimento e manutenção da célula, não tendo sido direcionada para o acúmulo de PHA (massa residual). Essas informações estão apresentadas na figura 39 para a linhagem selvagem, LFM101, e na figura 40 para a linhagem mutante, LFM019.

Figura 39: Fator de conversão de xilose em massa residual calculados ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato.

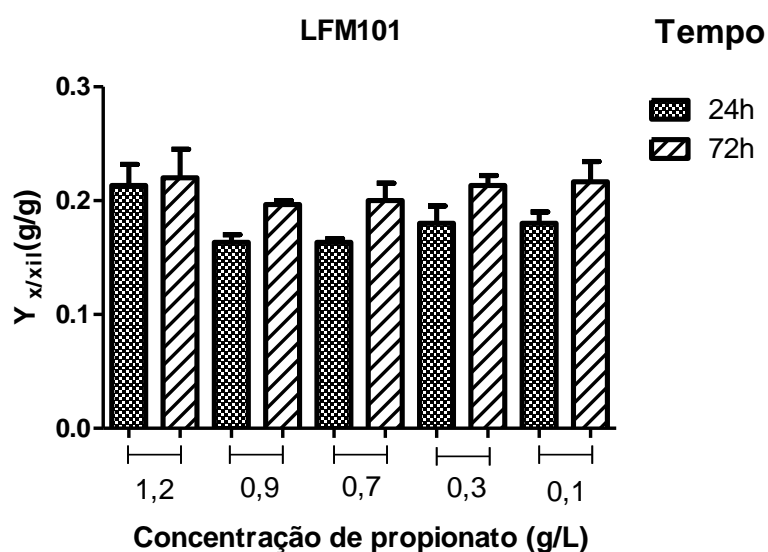
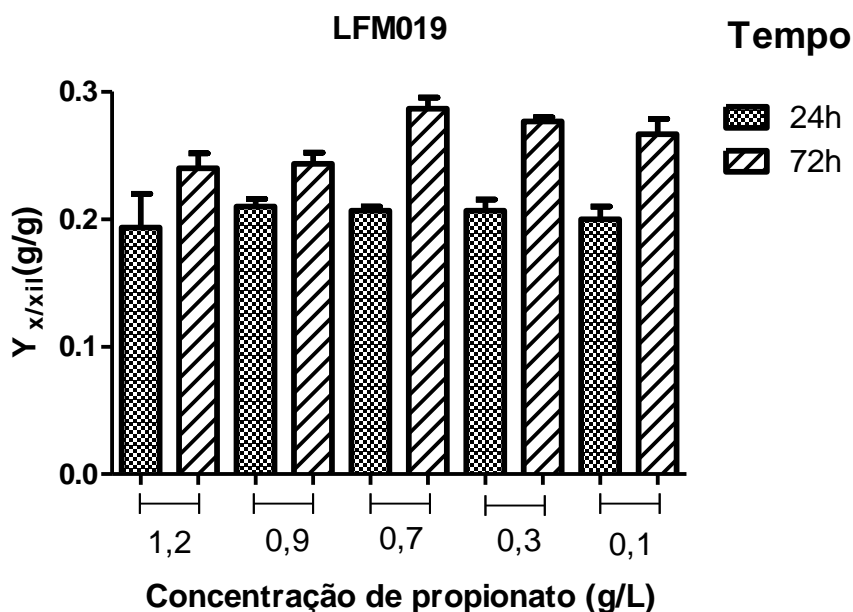


Figura 40: Fator de conversão de xilose em massa residual calculados ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato.



5.3.5 Comparação dos tempos 24 e 72 horas para cada linhagem.

Para melhor visualização da quantidade de massa seca celular gerada no intervalo de 48 horas entre os dois pontos amostrados e a comparação dessa massa entre as linhagens, os valores dessas massas nos tempos de 24 e 72 horas estão comparados na figura 41 para a linhagem selvagem, LFM101, e na figura 42 para a linhagem mutante, LFM019. Em ambas as linhagens houve um aumento considerável na quantidade de massa seca celular, pois além de ainda haver certa quantidade do substrato, a xilose, no meio, houve a adição do co-substrato propionato, o que colaborou para a obtenção desses dados.

Figura 41: Massa seca celular detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

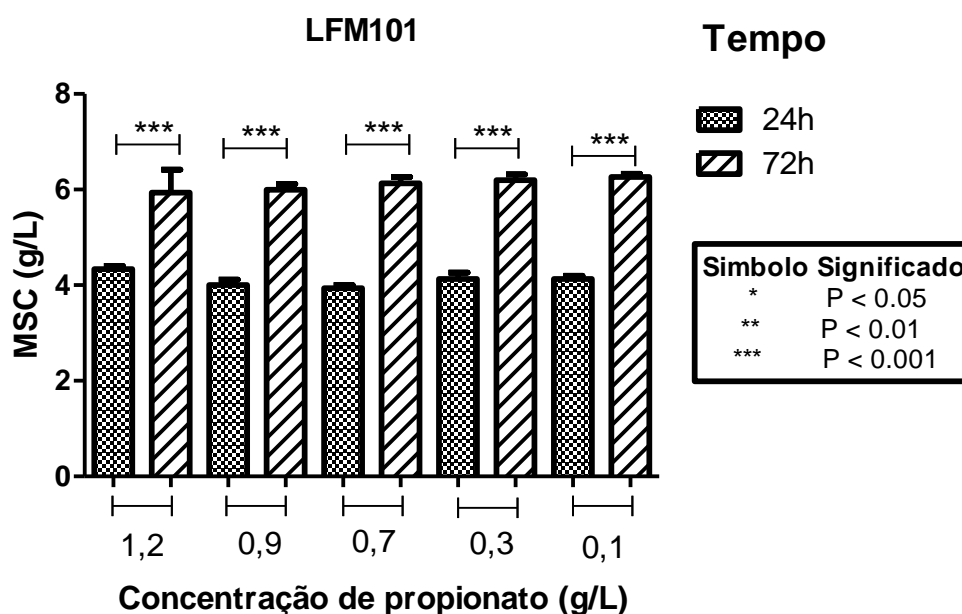
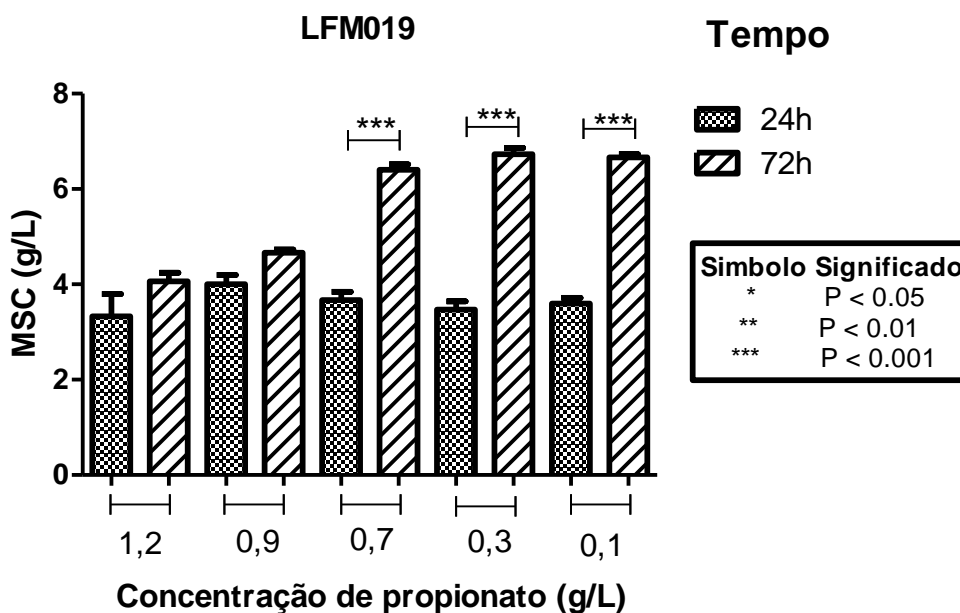


Figura 42: Massa seca celular detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



O mesmo tipo de comparação entre os dois tempos, 24 e 72 horas, também foi realizado para a porcentagem de PHA presente nessa massa seca celular. As figuras 43 e 44 demonstram isso, sendo a figura 43 para a linhagem selvagem, LFM101, e a figura 44 para a linhagem mutante, LFM019.

Aqui os resultados mostram um aumento ocorrendo em todas as diferentes concentrações na linhagem selvagem e nas três concentrações menores da mutante. Já nas concentrações mais altas na mutante, 0,9 e 1,2g/L, a porcentagem de PHA pouco mudou, pois, como dito, o propionato provavelmente estava sendo direcionado para outra via que não era a do 2-metil citrato (2MCC), onde *B. sacchari* apresenta sua mutação e direcionaria melhor o propionato a 3HV. Dessa forma a outra via ativa na degradação do propionato, possivelmente a α -oxidação, estava consumindo o propionil-CoA, não permitindo seu direcionamento para o acúmulo de 3HV. Os resultados obtidos são condizentes com os obtidos por Pereira (2009).

Figura 43: Porcentagem de PHA na massa seca celular detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

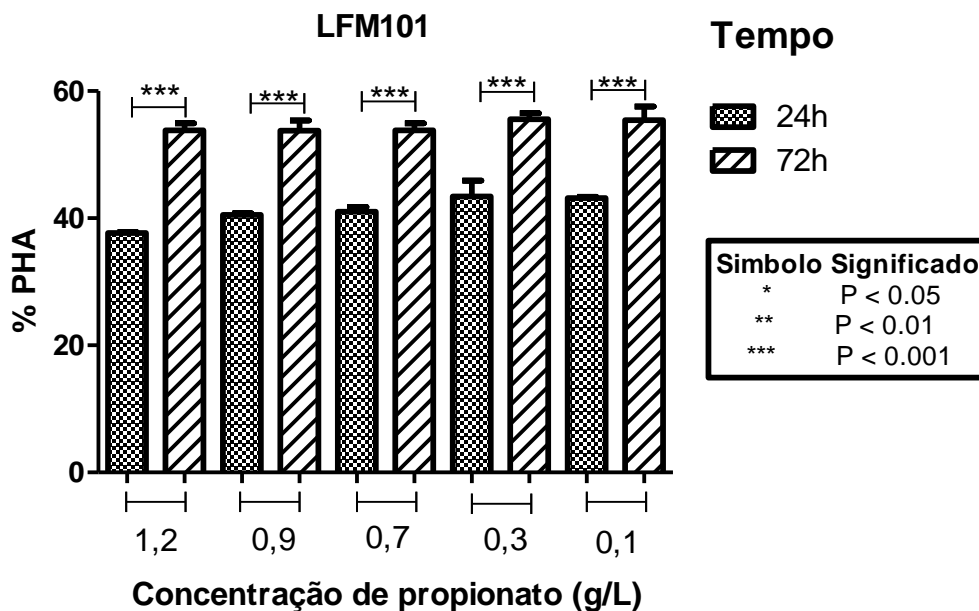
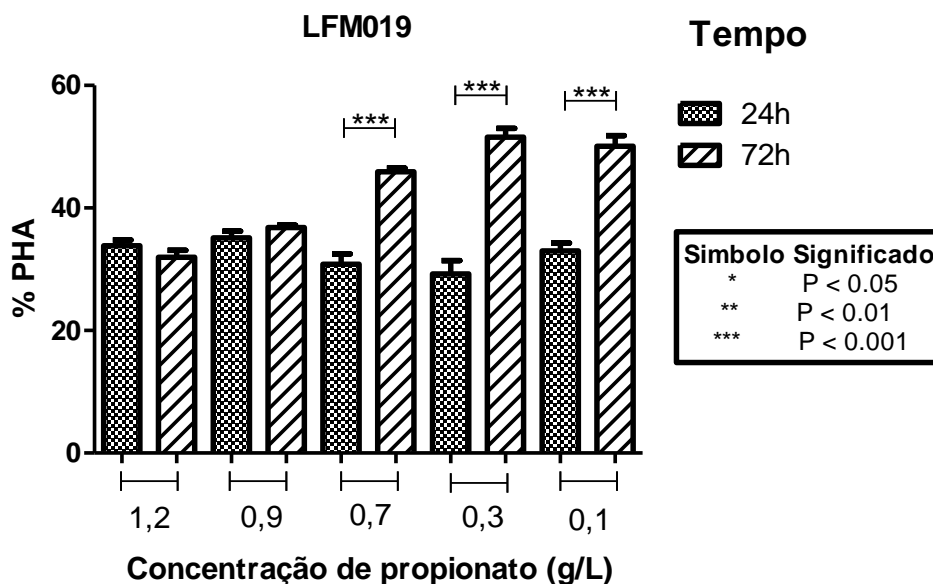


Figura 44: Porcentagem de PHA na massa seca celular detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Para se conhecer o comportamento da linhagem mutante em relação a selvagem, comparações entre elas se fazem necessárias e das modificações ocorridas no intervalo entre o tempo de 24 e 72 horas também. Por isso os gráficos a seguir trazem essas comparações para a quantidade de massa de PHA (g/L) acumulada sendo a figura 45 para a linhagem selvagem, LFM101, e a figura 46 para a linhagem mutante, LFM019.

Figura 45: Massa de PHA detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

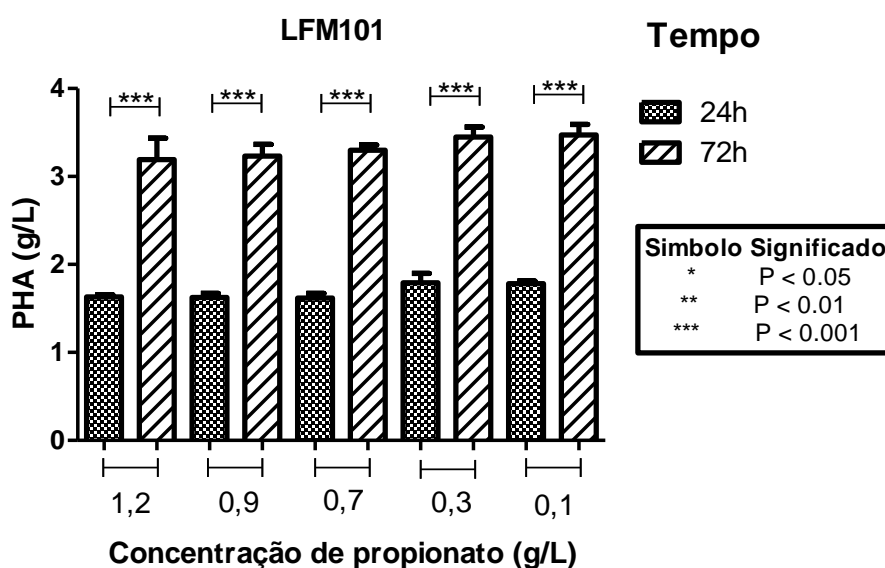
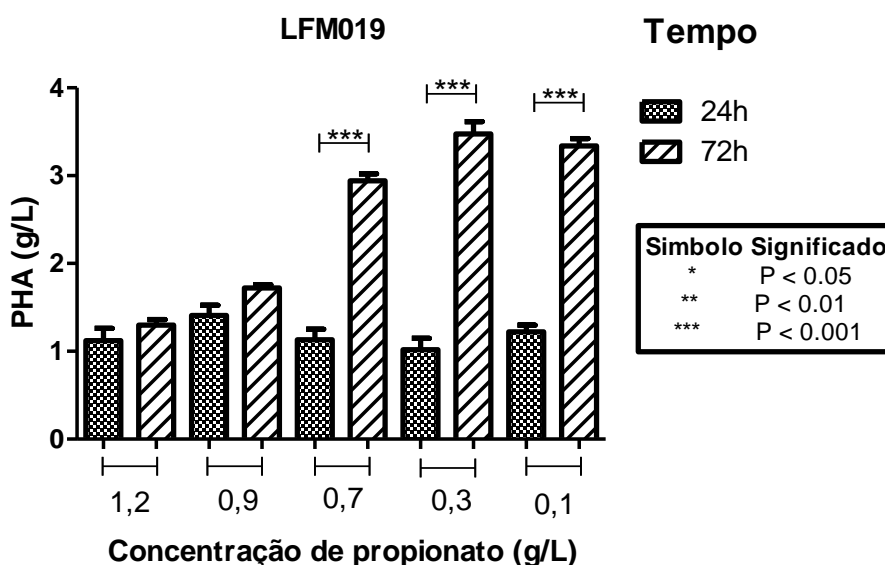


Figura 46: Massas de PHA detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Nas figuras 47 e 48 estão apresentadas as quantidades em g/L de massa residual que foi gerada, podendo ser visualizada na figura 47 os dados obtidos para a linhagem selvagem, LFM101, e na figura 48 os dados obtidos para a linhagem mutante, LFM019.

Figura 47: Massas residuais detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem selvagem, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.

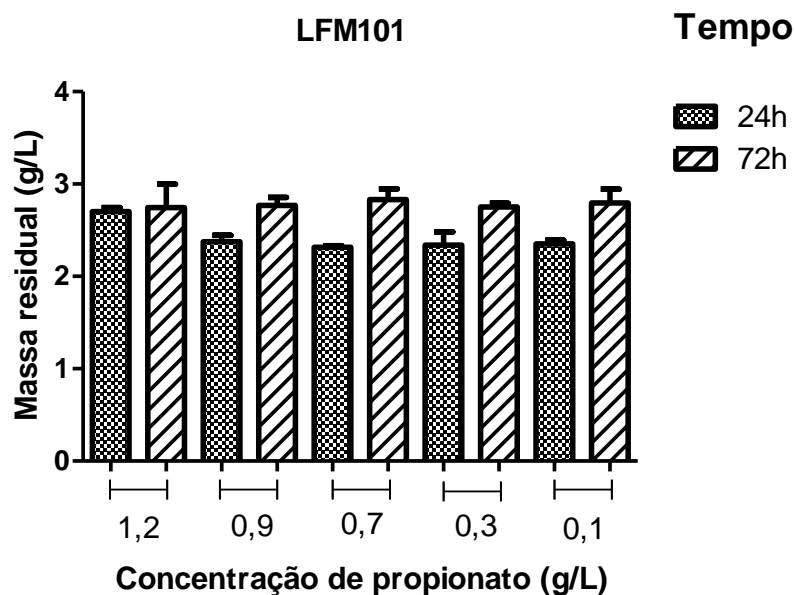
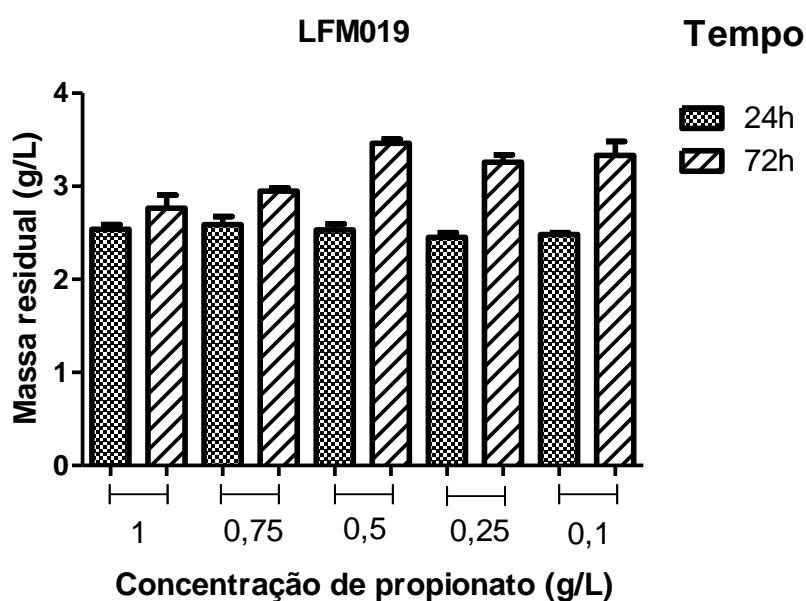


Figura 48: Massas residuais detectadas ao final do ensaio em frascos agitados para a linhagem mutante, comparando os valores obtidos no tempo de 24 e 72h. Os cálculos foram realizados para as 5 concentrações de propionato que variam de 0,1 a 1,2g/L.



Conforme observado nas imagens, em ambas as linhagens ocorreram aumentos expressivos nas massas de PHA geradas no intervalo de 48 horas, com exceção das concentrações mais altas de propionato na mutante, conforme já havia sido observado em gráficos anteriores, pois o propionato está se mostrando tóxico devido sua alta concentração no meio.

A massa residual pouco variou, também sendo condizente com os dados apresentados em gráficos anteriores, pois *B. sacchari* apresenta uma boa conversão dos substratos em PHA quando o nitrogênio já está limitado.

Cepa/mutante	Fonte de carbono	%PHA	3HB mol%	3HV mol%	$Y_{3HV/prop}$	Referência
<i>B. sacchari</i> selvagem	Glicose e ácido propionico	37,58	93,8	6,2	0,1	Silva et al. 2000
<i>B. sacchari</i> selvagem	Glicose e propionato	53,33	96,14	3,86	0,11	Pereira et al. 2009
<i>B. sacchari</i> selvagem	Xilose e propionato	53,79	98,02	1,98	0,1	Presente trabalho
Mutante Prp 189	Glicose e ácido propionico	25,82	44,7	55,3	0,81	Silva et al. 2000
Mutante 2MCC 019	Glicose e propionato	35,2	84,07	15,93	0,56	Pereira et al. 2009
Mutante 2MCC 019	Xilose e propionato	36,79	85,93	14,07	0,5	Presente trabalho

Tabela 8: Porcentagem de PHA, 3HBmol%, 3HVmol% e $Y_{HV/prop}$ obtidos por diferentes autores, com fontes de carbono variadas em frascos agitados.

Na tabela 8, podem-se observar os resultados obtidos em estudos anteriores na produção de PHA, utilizando para isso diferentes linhagens de *B. sacchari* e diferentes fontes de carbono. Os dados obtidos no presente trabalho, e também apresentados na tabela, corroboram com os anteriores e confirmam a linhagem LFM019 como uma mutante promissora para ser utilizada de maneira eficiente na produção e modulação de PHA.

Com esses dados em mãos foi possível conhecer o comportamento dessa linhagem frente à xilose e propionato, estabelecendo assim, a melhor abordagem para cultivar a mesma em biorreatores e qual o limite tolerado por ela de propionato no meio, para conservar a alta eficiência de conversão em 3HV.

5.4 Modulação da composição monomérica do copolímero P3HB-co-3HV produzido pela mutante LFM019 a partir de xilose e propionato em biorreator.

Após realizar os ensaios em frascos agitados foram iniciados estudos em biorreatores aerados e agitados mecanicamente. Conforme já descrito, foram utilizadas diferentes soluções para variar a oferta de substratos a fim de formar copolímeros com diversas composições de 3HB-3HV. Isso foi demonstrado por Pereira et al. (1996), estudando *Ralstonia eutropha* bem como os diferentes níveis de fatores de conversão. A estratégia geral adotada foi fornecer uma quantidade inicial de fonte de carbono, neste trabalho foi utilizada a xilose, para permitir o crescimento e após o fim da fase de crescimento e o esgotamento do nitrogênio, foi iniciada uma alimentação constante com as duas fontes de carbono relacionadas ao acúmulo de 3HB e 3HV (xilose e propionato) para permitir a modulação do PHA durante essa fase de acúmulo.

Cada experimento em biorreator será discutido individualmente quanto os resultados obtidos frente ao objetivo que era buscado em cada um. O final da fase de crescimento era marcado pelo momento no qual foi totalmente consumida a xilose fornecida no início do ensaio, 10g/L ocorrendo também o consumo de todo o nitrogênio. É importante destacar que em todos os ensaios a concentração de carboidratos proveniente da fase de crescimento tinha que estar bem próxima a 0g/L para determinar quando seria iniciada a fase de acúmulo com admissão da solução de alimentação. Devido à limitação de nitrogênio, para *B. sacchari* acumular polihidroxialcanoato, este foi totalmente consumido em tempos muito próximos aos da xilose, marcando assim o início da fase de acúmulo.

Foram realizados experimentos prévios (dados não mostrados) para se determinar a melhor vazão a ser utilizada durante todos os cultivos, garantindo assim uma melhor comparação entre os resultados obtidos, ao se assegurar as mesmas condições de cultivos.

Para esses ensaios em biorreatores se buscou modular a composição do P3HB-co-3HV, através da variação na relação entre as concentrações dos substratos xilose: propionato, que compõem a solução de alimentação da fase de acúmulo, buscando-se alcançar diferentes proporções de 3HV (10, 20, 30 e 40%) nesse copolímero. Além disso, foi realizado um cultivo em biorreator somente com a alimentação de

xilose para se conhecer o comportamento dessa linhagem mutante nesse tipo de cultivo frente a esse carboidrato, uma vez que esta linhagem nunca havia sido cultivada em xilose e/ou em biorreatores.

A cada subtópico discutido, que representa um ensaio realizado em biorreator, para que seja mais bem compreendido, serão inicialmente apresentados os resultados separados em gráficos por objetivo buscado. Ao final de cada tópico será apresentado um compilado dos gráficos para uma melhor visualização do que foi discutido.

Todos os valores obtidos e discutidos estão apresentados integralmente nos anexos III a VII.

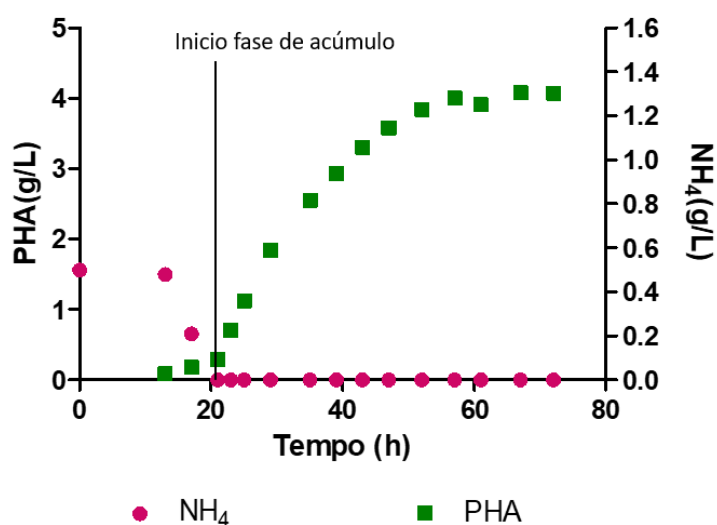
5.4.1 Experimento em biorreator utilizando B.sacchari mutante LFM 019 com alimentação de xilose 0,9g/h.

Após ser criada por Pereira em 2009, essa linha mutante ainda não havia sido testada em biorreator ou com xilose como substrato. Dessa forma, embora tenha havido cultivos com a linhagem selvagem em xilose (Silva et al., 2004, Lopes et al., 2009) não se conhecia seu comportamento nesse tipo de cultivo e optou-se por realizar inicialmente um cultivo em biorreator e, após iniciada a fase de acúmulo, alimentou-se com uma solução de xilose a 100g/L, com uma vazão de 0,15mL/min, levando a uma alimentação constante de xilose de 0,9g/h. Os dados obtidos nesse cultivo têm suas médias apresentadas nos gráficos a seguir e integralmente no anexo III.

Como pode ser observada na Figura 49, a fase de crescimento durou 24h, sendo o seu fim marcado pelo consumo total do nitrogênio no meio, estando assim *B. sacchari* em situação de limitação, fator necessário para o acúmulo expressivo de PHA (Gomez e Bueno Netto, 2001). Com isso pode-se observar as duas fases do ensaio, marcadas pelo crescimento inicial e a fase de acúmulo, e também observar tempo do ensaio em que ocorreu a transição entre as fases. O aumento no acúmulo de PHA também pode ser observado na mesma figura e começa a ocorrer no mesmo momento em que o nitrogênio se encontra limitado, sendo condizente com o esperado. Por ter sido alimentado somente com xilose, todo o PHA formado durante a fase de acúmulo é esperado ser 3HB (Oliveira Filho et al. 2020, Silva et al., 2014). Isto foi confirmado nas análises apresentadas em g/L na figura 49 que mostram que

o teor de 3HB chegou a um valor máximo de aproximadamente 4g/L. A bactéria apresentou velocidades específicas de consumo (μ_S) das fontes de carbono de $0,49h^{-1}$ e produziu polímero a uma velocidade específica (μ_P) de $0,013h^{-1}$. Os fatores de conversão de substrato em produto foram de 0,35 g/g de xilose convertida em Xr (biomassa residual) ($Y_{X/Xil}$), 0,24 g/g xilose convertida em 3HB ($Y_{HB/Xil}$).

Figura 49: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose 0,9g/h.



Com o fim da fase de crescimento e início da fase de acúmulo, a xilose começou a ser alimentada no biorreator através da solução de alimentação contendo xilose a 100g/L, ficando assim uma alimentação fixa de 0,9g/h, baseada na vazão da alimentação de 0,15ml/min. Na figura 50 está demonstrado o quanto de fonte de carbono estava presente no meio durante todo o tempo do cultivo, enquanto que na figura 51 está os valores totais, em g/L, que foram consumidos da fonte carbono, a xilose.

Figura 50: Fonte de carbono presente no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.

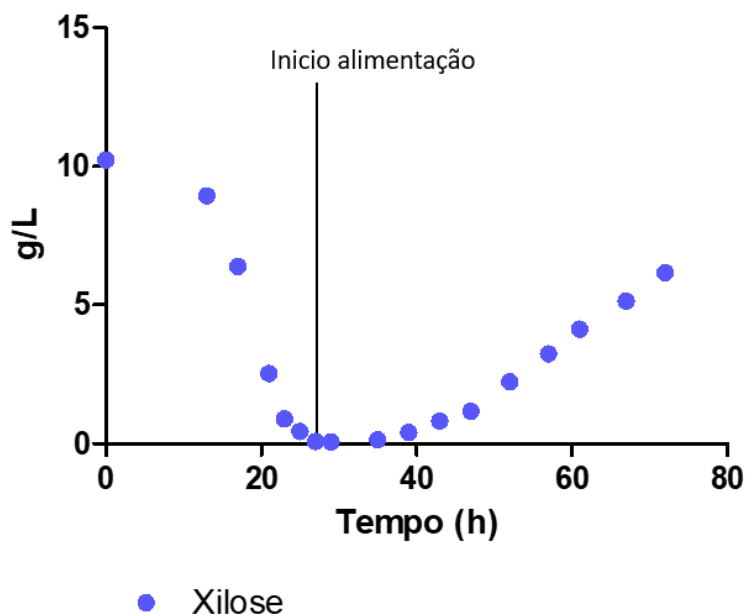
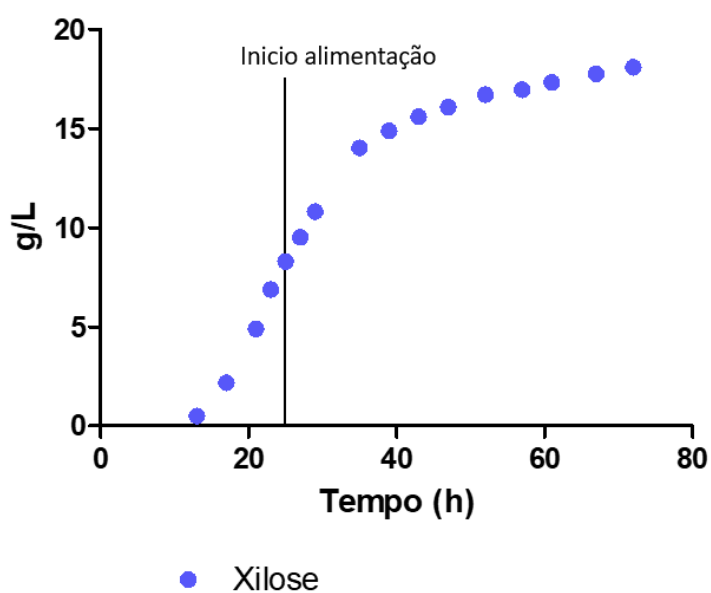


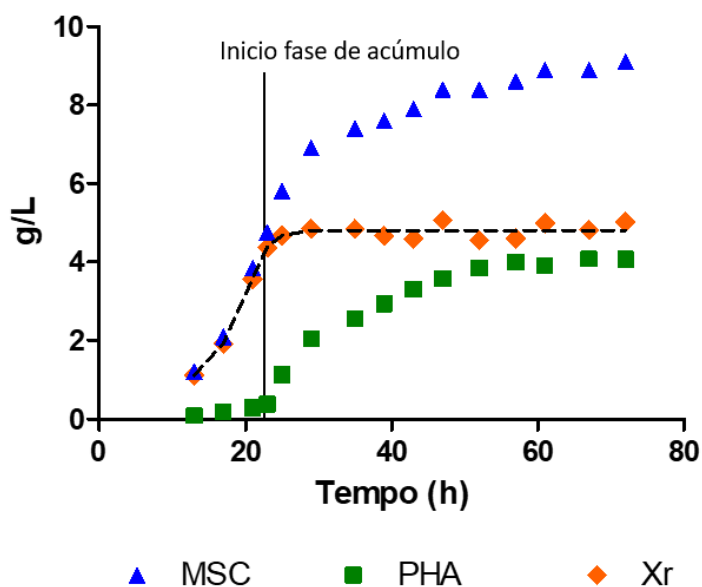
Figura 51: Fonte de carbono consumida meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.



Ao final do ensaio, a biomassa total atingiu 9 g/L, a massa residual chegou a 5g/L, porém esta se estabilizou no início da fase de acúmulo, ficando com valores em torno de 4,8g/L, e a massa total de PHA chegou a valores de 4,1g/L, aumentando consideravelmente desde o início da fase de acúmulo, conforme já discutido, e mantendo-se aumentando durante todo o tempo de cultivo. Portanto, nessa condição de cultivo, foi acumulada uma quantidade de PHA que corresponde a uma porcentagem de 46% da biomassa total alcançada na fase de acúmulo. Essas

informações estão demonstradas na figura 52. Esses valores são compatíveis com valores obtidos com a selvagem por outros autores (Silva et al 2000, Taciro et al. 2007) que obtiveram valores semelhantes.

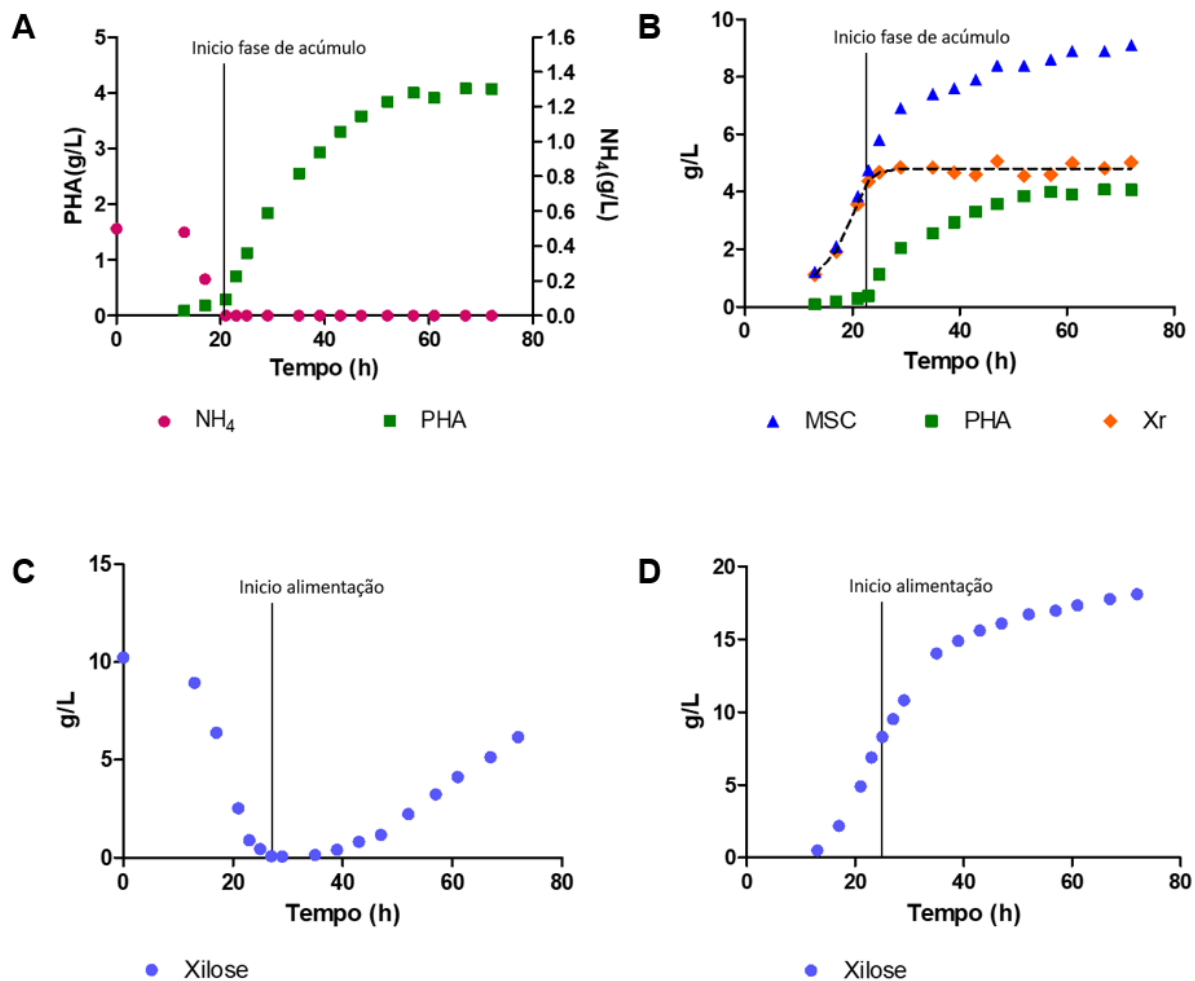
Figura 52: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB a partir de xilose.



Devido ao fato de que neste ensaio a única fonte de carbono disponível para a LFM019 foi xilose, ela acúmulo somente 3HB, portanto, todos os valores apresentados para PHA são representativos também para 3HB.

Como mencionado anteriormente, a figura a seguir traz uma comparação entre todos os gráficos gerados, facilitando assim a comparação e compreensão do que foi discutido individualmente antes.

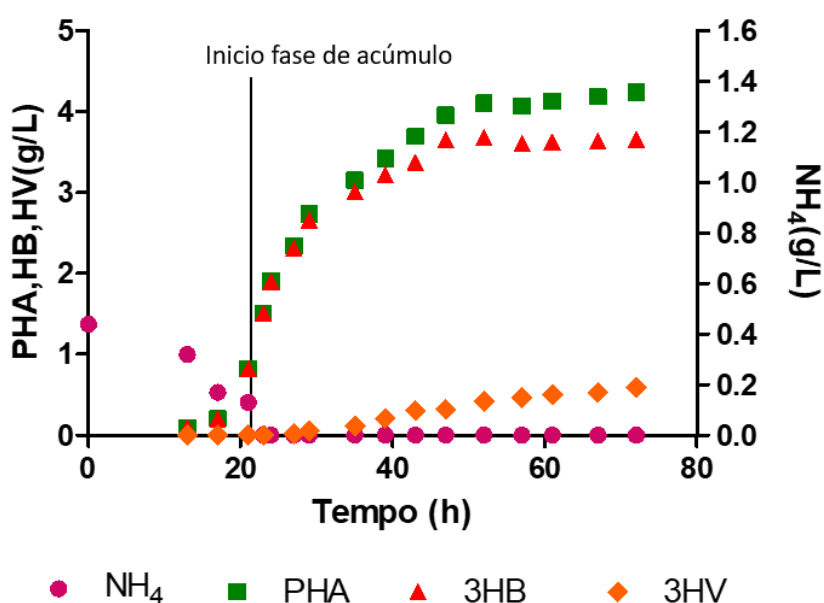
Figura 53: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose 0,9g/h. A- Consumo do NH_4 presente no meio e início do acúmulo de PHA; B- Valores em g/L de MSC, PHA e Xr; C- Fonte de carbono presente no meio; D- Fonte de carbono consumida.



5.4.2 Experimento em biorreator utilizando *B.sacchari* mutante LFM 019 com alimentação de solução com proporção de xilose e propionato em 10:1 mol/mol.

Para esse ensaio foi realizado o cálculo da concentração da solução de alimentação para que a xilose e o propionato estivessem em uma proporção mol/mol de 10:1, buscando assim alcançar um teor de 3HV em relação ao 3HB no copolímero P3HB-co-3HV de 10%. Os dados obtidos nesse cultivo têm suas médias apresentadas nos gráficos a seguir e integralmente no anexo IV.

Figura 54: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.



Como pode ser observada na figura 54, a fase de crescimento deste cultivo também durou 24h, sendo o seu fim marcado pelo consumo total do nitrogênio no meio, onde *B. sacchari* novamente estava em situação de limitação, permitindo assim o acúmulo expressivo de PHA. Com isso pode-se observar as duas fases do ensaio, marcas pelo crescimento inicial e a fase de acúmulo, e também observar tempo do ensaio onde ocorreu a transição entre as fases. Essa mudança de fase está sinalizada no gráfico. Esse aumento no acúmulo de PHA também pode ser observado na mesma figura e começa a ocorrer no mesmo momento em que o nitrogênio se encontra limitado, sendo condizente com o esperado. Nela também estão demonstradas as massas, em g/L, de 3HB e 3HV obtidas durante todo o cultivo. Essas massas alcançaram até 3,93g/L e 0,68g/L respectivamente.

Com o fim da fase de crescimento, e para dar assim início a fase de acúmulo, nas mesmas 24h começou a ser alimentada no biorreator a solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol, onde se buscava atingir 10mol% de 3HV no total do copolímero P3HB-co-3HV. Na figura 55 está demonstrado o quanto de fonte de carbono estava presente no meio durante todo o tempo do cultivo, enquanto que na figura 56 estão os valores totais, em g/L, que foram consumidos de cada uma das fontes de carbono, a xilose e o propionato. Alimentadas com uma solução de xilose a 100g/L e propionato a 6,44g/L, com uma vazão de alimentação de 0,15ml/min.

Figura 55: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.

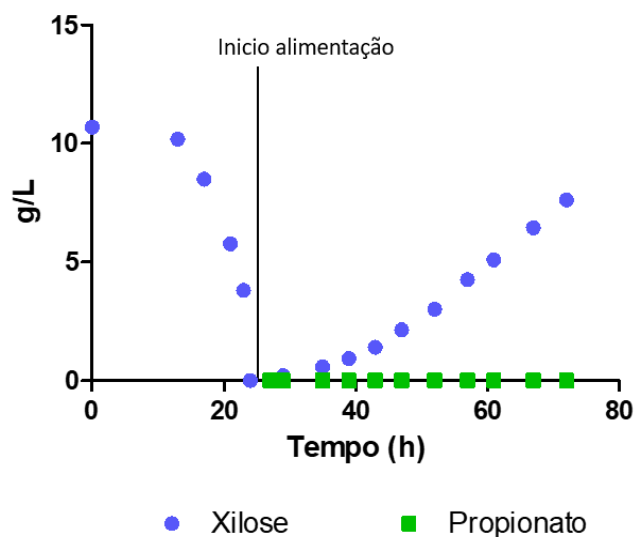
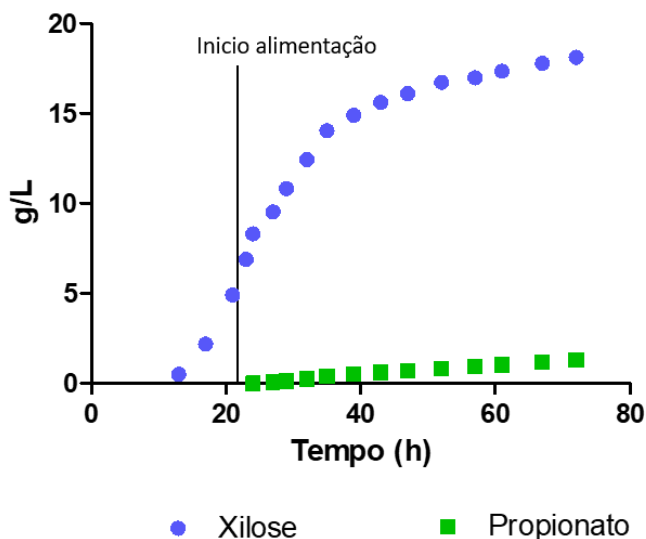


Figura 56: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.



Devido ao fato de a bomba de alimentação estar ligada em uma vazão constante de 9mL/h, estava sendo adicionado ao meio, baseado na concentração da solução de alimentação, 0,9g/h de xilose e 0,072g/h de propionato. Ao longo do ensaio esse valor de xilose se mostrou como sendo muito elevado e, portanto, mais do que a bactéria consegue metabolizar para formar o PHA. Essa xilose começou a sobrar no meio, chegando ao final do ensaio a uma concentração de 7,6g/L, indicando que uma possível vazão menor pouparia recursos em ensaios futuros. Mesmo diante desse fato, o consumo total de xilose foi expressivo, chegando a 18g sendo 8g durante a fase de acúmulo, onde ela foi, em sua maioria, direcionada para o acúmulo de PHA. Ao contrário da xilose, todo o propionato fornecido foi consumido durante o cultivo, não sendo detectado no meio.

A biomassa total atingiu 9 g/L, a massa residual chegou a 5g/L, porém está se estabilizou no início da fase de acúmulo, ficando com valores em torno de 4,6g/L, e a massa total de PHA chegou a valores de 4,2g/L, aumentando consideravelmente desde o início da fase de acúmulo, conforme já discutido, porém também chegando a uma quase estabilidade nas últimas 32h de ensaio. Esses dados estão demonstrados na figura 57. A bactéria apresentou velocidades específicas de consumo (μS) das fontes de carbono de $0,45h^{-1}$ e produziu polímero a uma velocidade específica (μP) de $0,03h^{-1}$.

Figura 57: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.

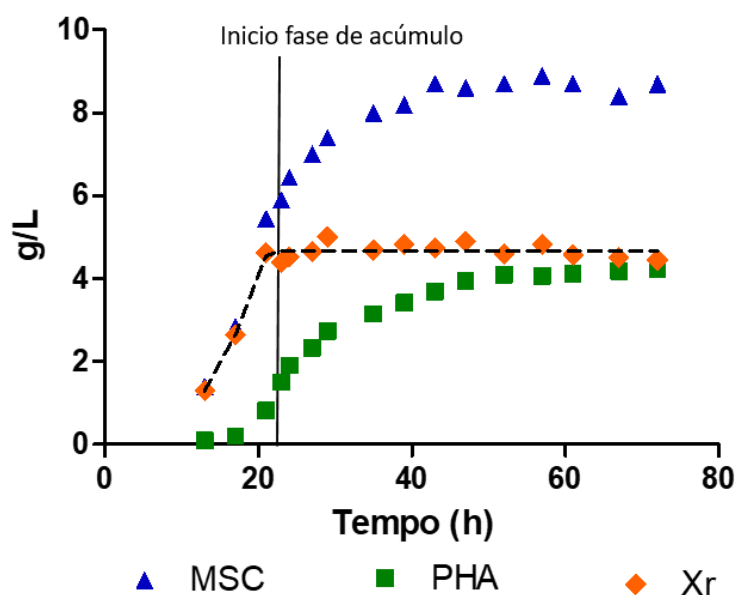
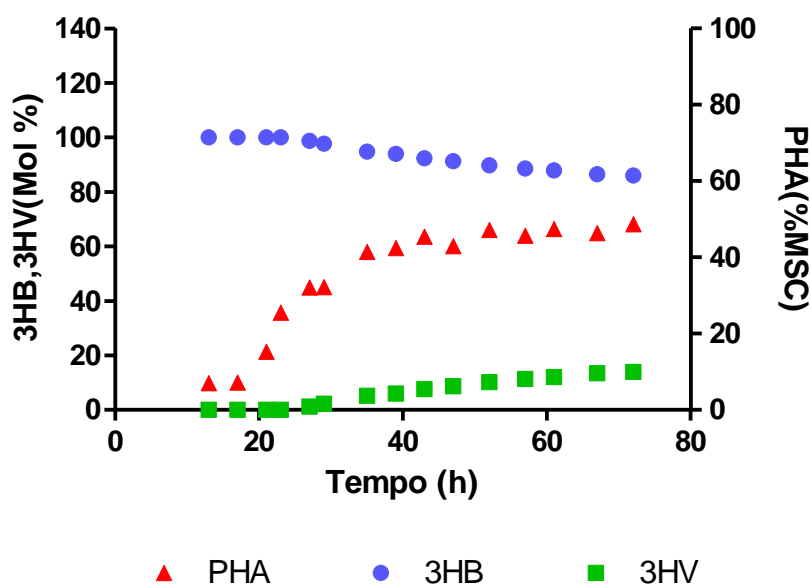


Figura 58: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol.



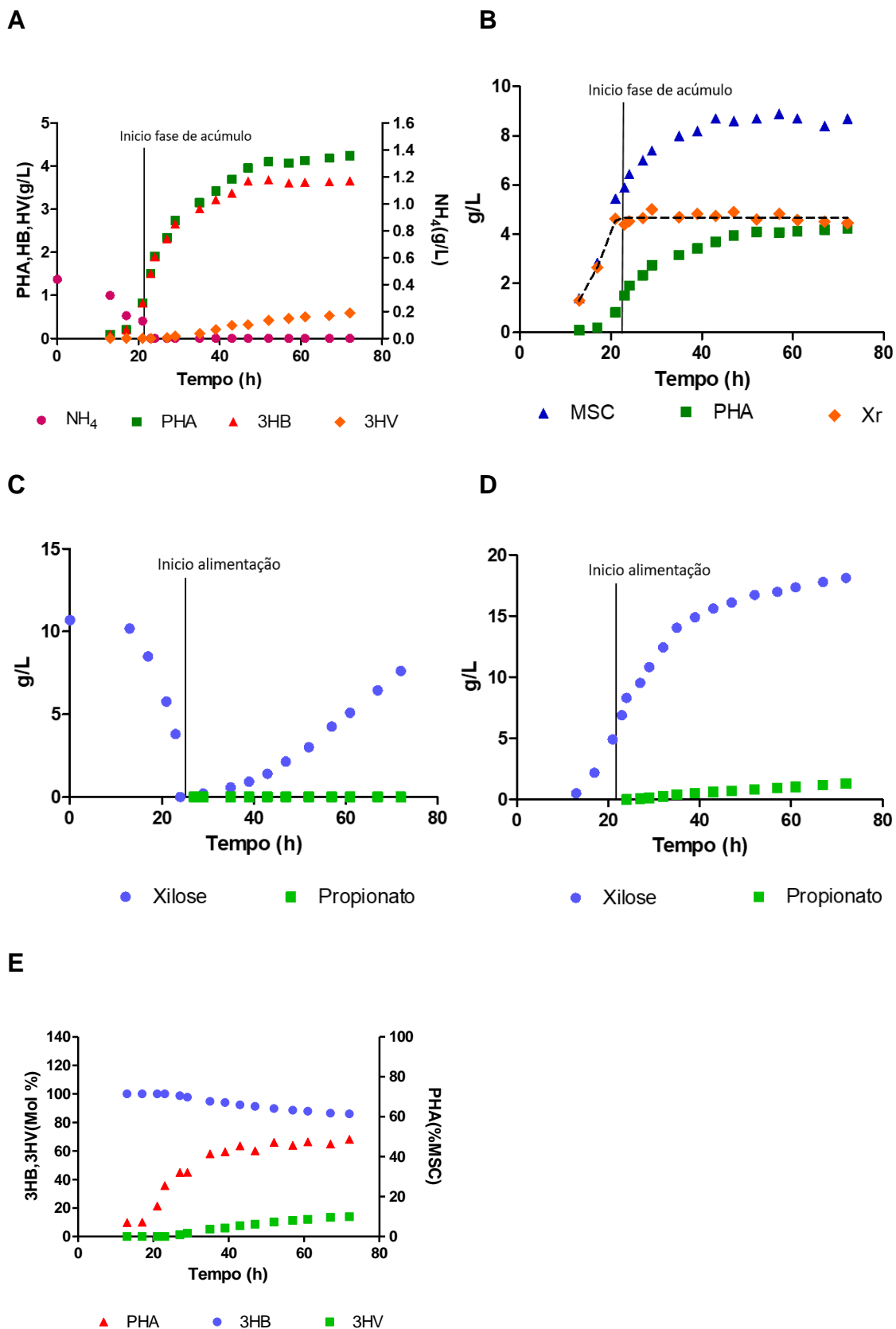
Conforme demonstrado na figura 58, do valor total de biomassa alcançada, até 50% dela é PHA, e deste PHA, foram alcançados os valores de 3HV buscados com a modulação do copolímero P3HB-co-3HV a partir de uma solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol, que era de 10mol%, variando pouco deste valor buscado durante todo o ensaio. A modulação do copolímero através da solução de alimentação foi, portanto, uma técnica eficiente. Isso é condizente com os resultados mostrados por Rocha et al., 2009, que adotou essa mesma estratégia para conseguir modular o PHA acumulado pela *B. sacchari* 189, utilizando para isso sacarose e propionato.

Os fatores de conversão de substrato em produto foram de 0,30 g/g de xilose convertido em X_r (biomassa residual) ($Y_{X/xil}$), 0,20 g/g xilose convertida em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e 0,48 g/g propionato convertido em 3HV, ($Y_{HV/prop}$).

Desta forma podemos observar que o ensaio alcançou o que era esperado, 10mol% de 3HV na modulação do copolímero, mostrando assim que essa linhagem mutante LFM019 é eficiente na conversão de xilose e propionato em P3HB-co-3HV e permite sua modulação ao se variar as proporções dessas fontes de carbono na solução de alimentação da fase de acúmulo.

A figura a seguir traz uma comparação entre todos os gráficos gerados, facilitando assim a comparação e compreensão do que foi discutido individualmente antes.

Figura 59: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 10:1 mol/mol. A- Consumo do NH_4 presente no meio e início do acúmulo de PHA; B- Valores em g/L de MSC, PHA e Xr; C- Fonte de carbono presente no meio; D- Fonte de carbono consumida; E- Porcentagem de PHA da MSC, mol% 3HB e 3HV.

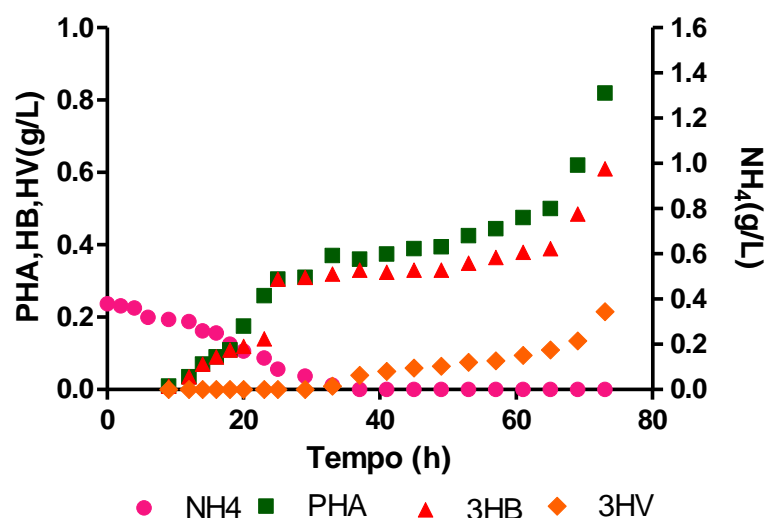


5.4.3 Experimento em biorreator utilizando B.sacchari mutante LFM 019 com alimentação de solução com proporção de xilose e propionato em 5:1mol/mol.

Para esse ensaio foi realizado o cálculo da concentração da solução de alimentação para que a xilose e o propionato estivessem em uma proporção mol/mol de 5:1, buscando assim alcançar um teor de 3HV em relação ao 3HB, no copolímero P3HB-co-3HV, de 20%. Os dados obtidos nesse cultivo têm suas médias apresentadas nos gráficos a seguir e integralmente no anexo V.

Esperava-se que nesse ensaio cuja proporção de xilose:propionato foi de 5:1mol/mol, os resultados estivessem mais próximos dos apresentados por 10:1mol/mol e somente xilose alimentada. Porém, esse cultivo foi duramente afetado pela dificuldade de se controlar o pH. O controle inicial do pH não foi feito de maneira automática como nos demais cultivos, ele foi feito de maneira manual nas primeiras 24h de ensaio. Como esse controle era feito manual, o tempo de resposta entre a mudança de pH no meio e sua correção era muito grande, assim como também as quantidades de ácido a base adicionadas por vez era sempre maior do que se adicionada gradativamente ao longo do tempo de maneira automática. Isso dificultou o controle do meio para torná-lo ideal para um crescimento e acúmulo de PHA de maneira eficiente. Isso será notado devido ao pouco crescimento total do cultivo e das quantidades gerais de massas produzidas serem baixas. Mesmo assim, como será visto posteriormente, esse ensaio ainda pode ser utilizado para mostrar a correta modulação do copolímero, sendo mais uma evidência da eficiência dessa linhagem mutada no ciclo do 2 metilcitrato.

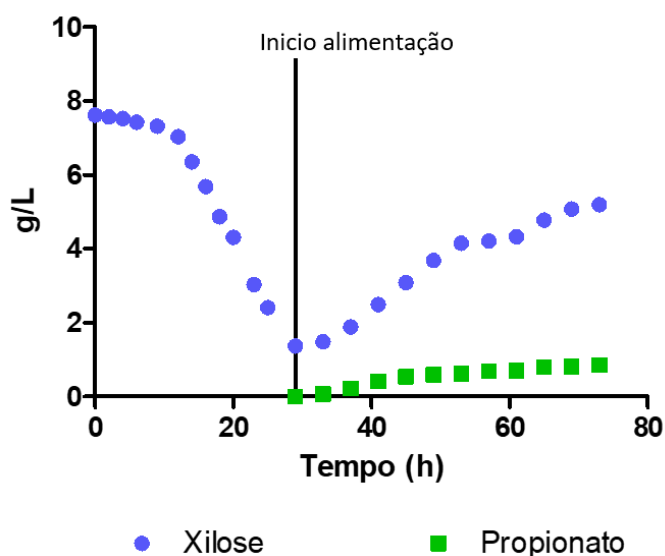
Figura 60: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.



Devido ao problema descrito para controlar o pH, tornou-se difícil demonstrar o momento preciso onde começou a fase de acúmulo. Na figura 60, podemos ver que o tempo necessário para o consumo total do NH_4 foi muito superior aos demais, afetando assim o tempo necessário para bactéria estar com limitação de um nutriente essencial e dessa forma reduzindo o tempo da fase de acúmulo. As quantidades de massa de PHA, 3HB e 3HV em g/L se mantiveram a maior parte do tempo com valores médios de próximos a 0,40; 0,34 e 0,10 respectivamente. Valores estes bem abaixo dos obtidos nos outros cultivos (em média 3,8; 3,3 e 0,3g/L respectivamente).

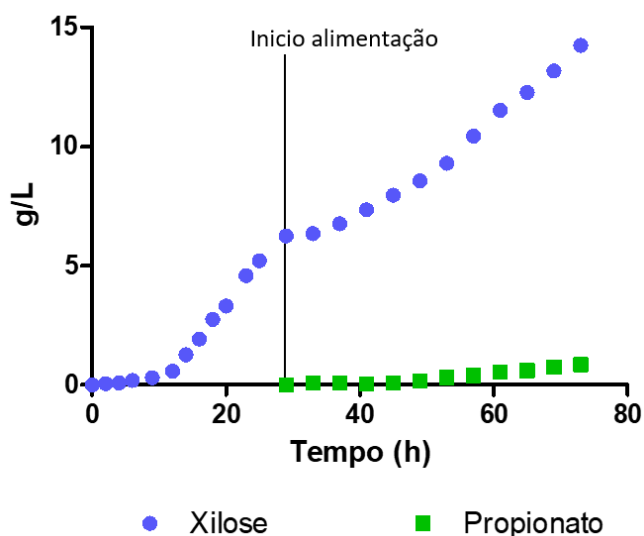
Devido a esses fatores, não foi possível aguardar o consumo total da xilose para essa coincidir com o fim do NH_4 no meio, e com 30h de ensaio foi ligada a alimentação com uma solução de xilose a 100g/L e propionato a 12,87g/L, com uma vazão de alimentação de 0,15ml/min. Isso fez com que a xilose começa-se a sobrar no meio sem que antes tivesse chegado à zero, apresentando um mudança de perfil quanto à xilose presente no meio, onde estava em queda e começou a ter uma elevação. Isso está demonstrado na figura 61.

Figura 61: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.



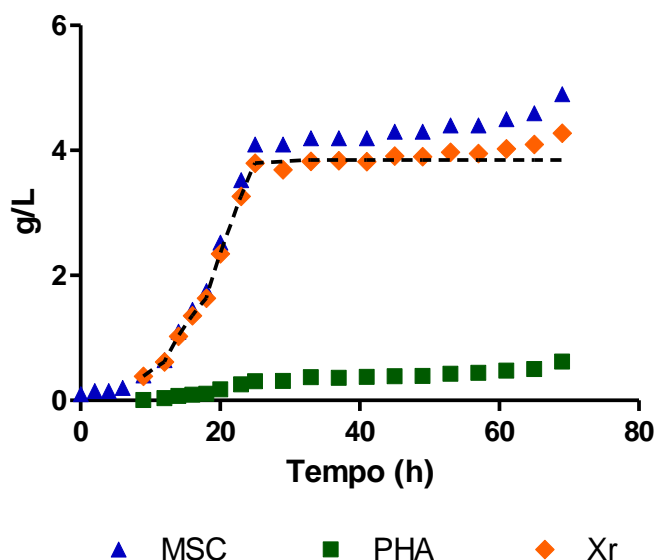
O valor total de xilose consumida não foi alto, como pode ser visto na figura 62, e o propionato consumido também foi baixo, sobrando no meio. Nessa concentração fornecida, e baseando-se nos resultados obtidos em outros cultivos, esperava-se que o propionato tivesse sido totalmente consumido e gerado altas quantidades de 3HV em g/L, uma vez que foi buscado atingir 20mol% de 3HV no total do copolímero P3HB-co-3HV, utilizando para isso uma solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.

Figura 62: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.



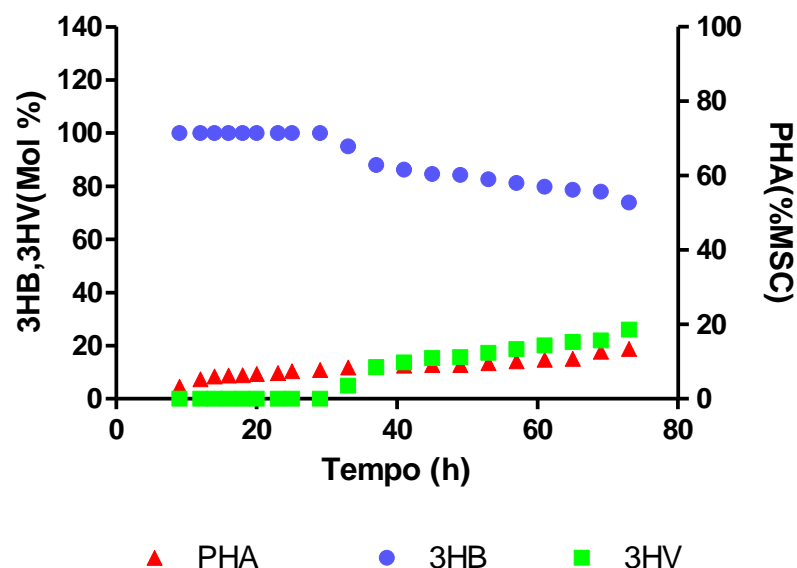
A biomassa total atingiu 5 g/L, a massa residual chegou a 4,6g/L, porém está se estabilizou no início da fase de acúmulo, ficando com valores em torno de 4g/L, e a massa total de PHA chegou a valores de 0,6g/L, todos os valores muito abaixo do comportamento apresentado pela linhagem em outros cultivos devido à falta do correto controle do pH, conforme já discutido previamente. O comportamento desse cultivo, para as massas em g/L, está demonstrado na figura 63.

Figura 63: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.



Conforme demonstrado na figura 64, do valor total de biomassa alcançada, não mais que 20% dela é PHA, novamente um valor bem abaixo dos apresentados em outros cultivos. Porém, mesmo com a falta de controle do pH, ainda foi possível alcançar os valores de 3HV buscados com a modulação do copolímero P3HB-co-3HV a partir de uma solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol, que era de 20mol%, variando pouco deste valor buscado durante o ensaio.

Figura 64: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol.

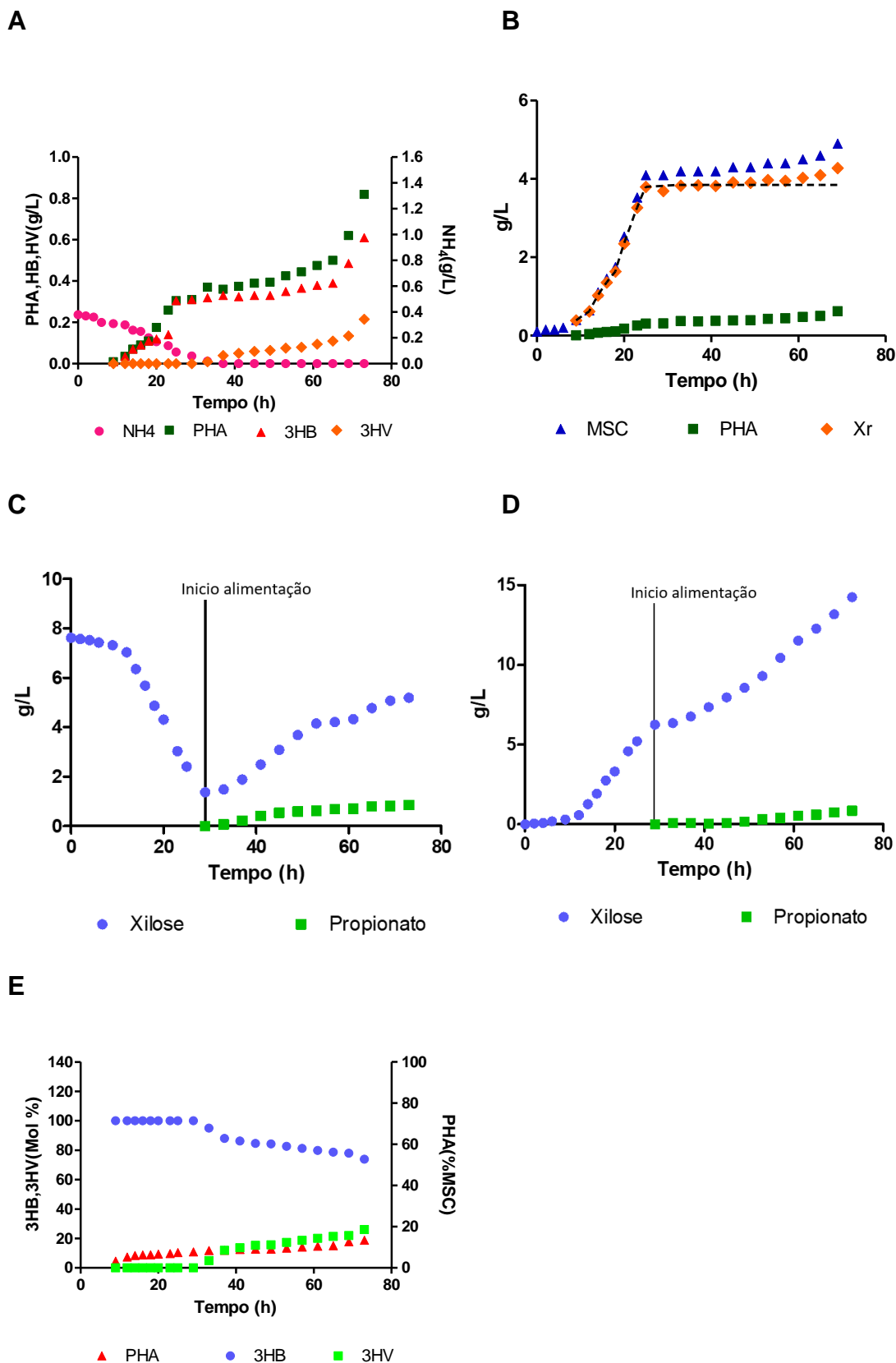


Os fatores de conversão de substrato em produto foram de 1,0 g/g de xilose convertido em X_r (biomassa residual) ($Y_{X/xil}$), 0,04 g/g xilose convertida em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e 0,37 g/g propionato convertido em 3HV, ($Y_{HV/prop}$).

Nota-se, assim, que mesmo com um crescimento, consumo de substrato e acúmulo de PHA afetados, tendo valores muito abaixo do esperado, ainda foi possível uma modulação do copolímero e este serviu como mais um indício de como essa linhagem mutante é eficiente para modulação do P3HB-co-3HV, quando utilizada uma solução de alimentação com diferentes proporções entre os substratos.

Assim como nos resultados dos reatores anteriores, a figura a seguir traz uma comparação entre todos os gráficos gerados, facilitando assim a comparação e compreensão do que foi discutido individualmente antes.

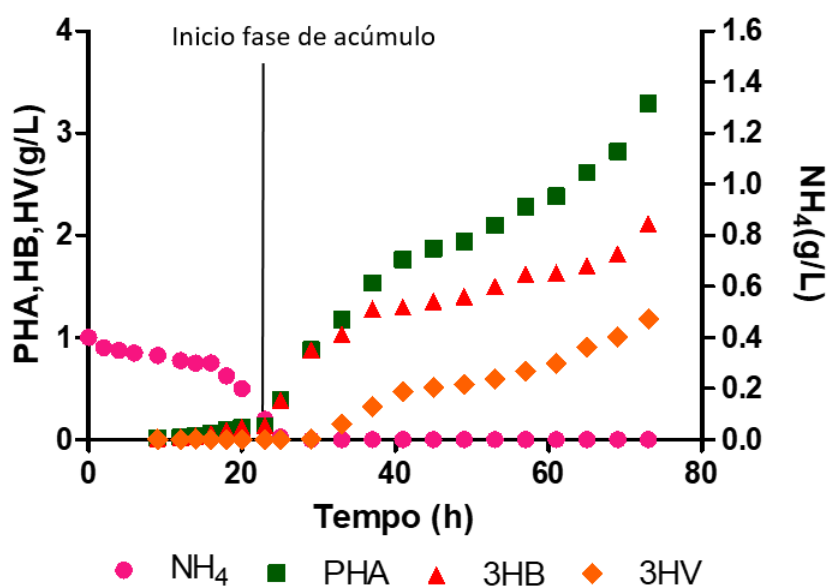
Figura 65: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 5:1 mol/mol. A- Consumo do NH_4 presente no meio e início do acúmulo de PHA; B- Valores em g/L de MSC, PHA e Xr; C- Fonte de carbono presente no meio; D- Fonte de carbono consumida; E- Porcentagem de PHA da MSC, mol% 3HB e 3HV.



5.4.4 Experimento em biorreator utilizando *B.sacchari* mutante LFM 019 com alimentação de solução com proporção de xilose e propionato em 3,5:1mol/mol.

Para esse ensaio foi realizado o cálculo da concentração da solução de alimentação para que a xilose e o propionato estivessem em uma proporção mol/mol de 3,5: 1mol/mol, buscando assim alcançar um teor de 3HV em relação ao 3HB no copolímero P3HB-co-3HV de 30%. Os dados obtidos nesse cultivo têm suas médias apresentadas nos gráficos a seguir e integralmente no anexo VI.

Figura 66: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.



Como pode ser observada na figura 66, a fase de crescimento deste cultivo ficou condizente com os outros cultivos realizados neste trabalho, durando 24h, sendo o seu fim marcado pelo consumo total do nitrogênio no meio, onde *B. sacchari* novamente estava em situação de limitação, permitindo assim o acúmulo expressivo de PHA. Com isso pode-se observar as duas fases do ensaio, marcas pelo crescimento inicial e a fase de acúmulo, e também observar o momento do ensaio onde ocorreu a transição entre as fases. O aumento no acúmulo de PHA pode ser observado na mesma figura e começa a ocorrer no mesmo momento em que o nitrogênio se encontra limitado, sendo condizente com o esperado (Gomez et al., 1996). Nela também estão demonstradas as massas, em g/L, de 3HB e 3HV obtidas durante todo o cultivo. Essas massas alcançaram até 2,19 e 1,23g/L respectivamente.

Com o fim da fase de crescimento, e para dar assim início à fase de acúmulo, no tempo de 24h de cultivo, começou a ser alimentada no biorreator a solução de alimentação contendo xilose a 100g/L e propionato a 19,31g/L, com uma vazão de alimentação de 0,15ml/min, para se alcançar 30mol% de 3HV no total do copolímero P3HB-co-3HV.

Figura 67: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.

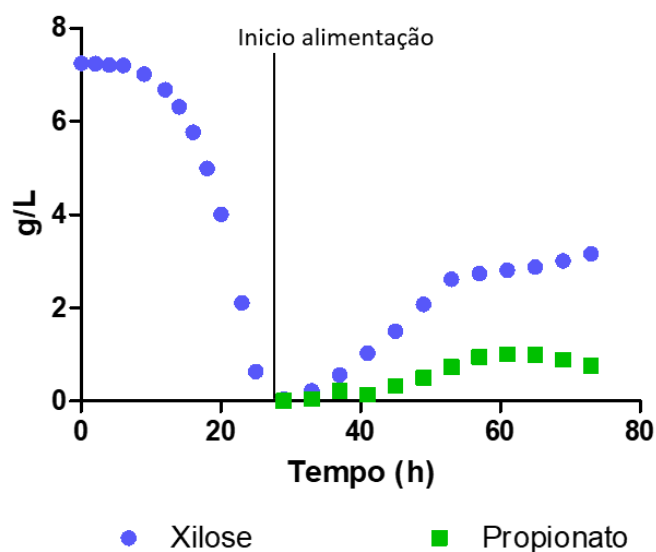
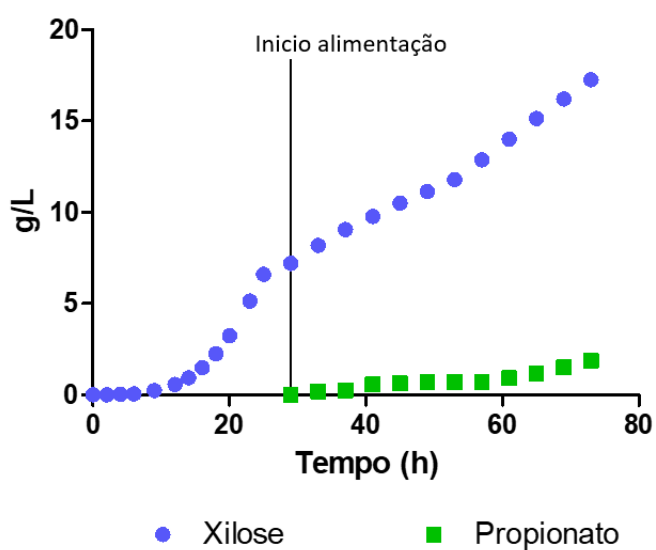


Figura 68: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.

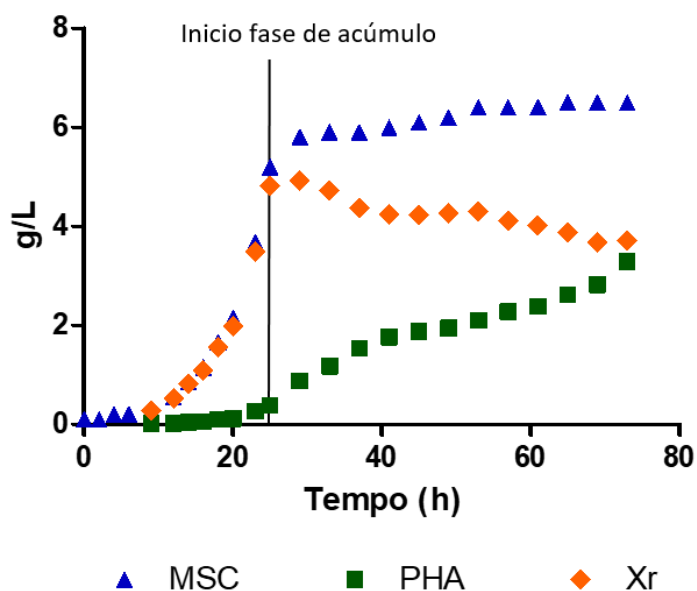


Na figura 67 está demonstrado o quanto da fonte de carbono estava presente no meio durante todo o tempo do cultivo, enquanto que na figura 68 estão os valores totais, em g/L, que foram consumidos de cada uma das fontes de carbono, xilose e propionato.

Devido ao fato de a bomba de alimentação estar ligada em uma vazão constante de 9mL/h, estava sendo adicionado ao meio, baseado na concentração da solução de alimentação, 0,9g/h de xilose e 0,25g/h de propionato. Ao longo do ensaio esse valor de xilose se mostrou como sendo muito elevado e, portanto, mais do que essa linhagem de *B.sacchari* consegue metabolizar para formar o PHA. Essa xilose começou a sobrar no meio, chegando ao final do ensaio a uma concentração de 3,16 g/L. Mesmo diante desse fato, o consumo total de xilose foi expressivo, chegando a 17g sendo 10g durante a fase de acúmulo, onde ela foi em sua maioria direcionada para o acúmulo de PHA. Assim como a xilose, o propionato fornecido também sobrou no meio, porém sendo detectado em valores baixos, longe do limite que foi descrito (Pereira et al., 2009) e do observado neste trabalho durante os ensaios em frascos agitados. Com 60 horas de ensaio a vazão de alimentação foi reduzida para a metade a fim de se evitar um meio com uma concentração muito alta e, portanto, muito tóxica de propionato. Devido a isso, é possível observar, na figura 68, que a partir desse ponto a quantidade de propionato presente no meio começou a apresentar uma leve queda, seguindo reduzindo até o fim do ensaio. Porém, como será visto na sequência, isso não afetou os resultados obtidos nos parâmetros que foram medidos.

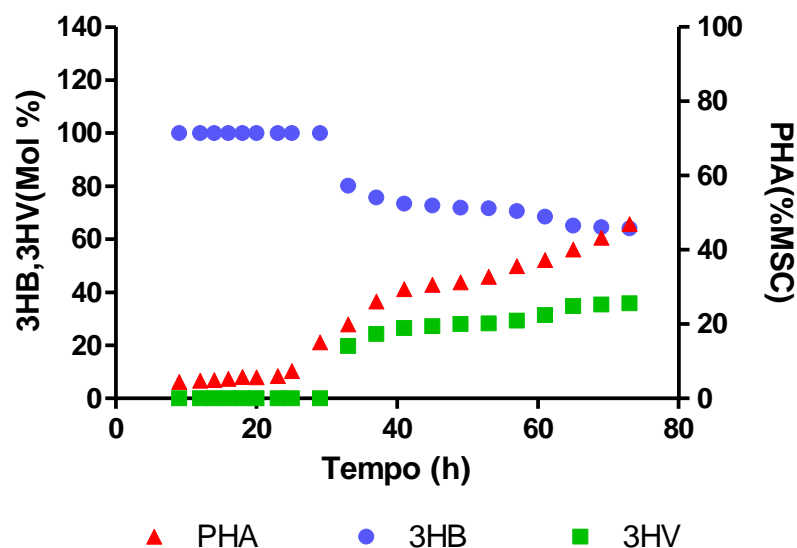
A biomassa total atingiu 7 g/L, ficando praticamente constante durante a fase de acúmulo, a massa residual chegou a 5g/L, porém está apresentou uma leve queda a partir do início da fase de acúmulo, terminando o ensaio com valores de 3,5g/L, e a massa total de PHA chegou a valores de 3,4g/L, aumentando consideravelmente desde o início da fase de acúmulo. Esses valores discutidos podem ser observados na figura 69.

Figura 69: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.



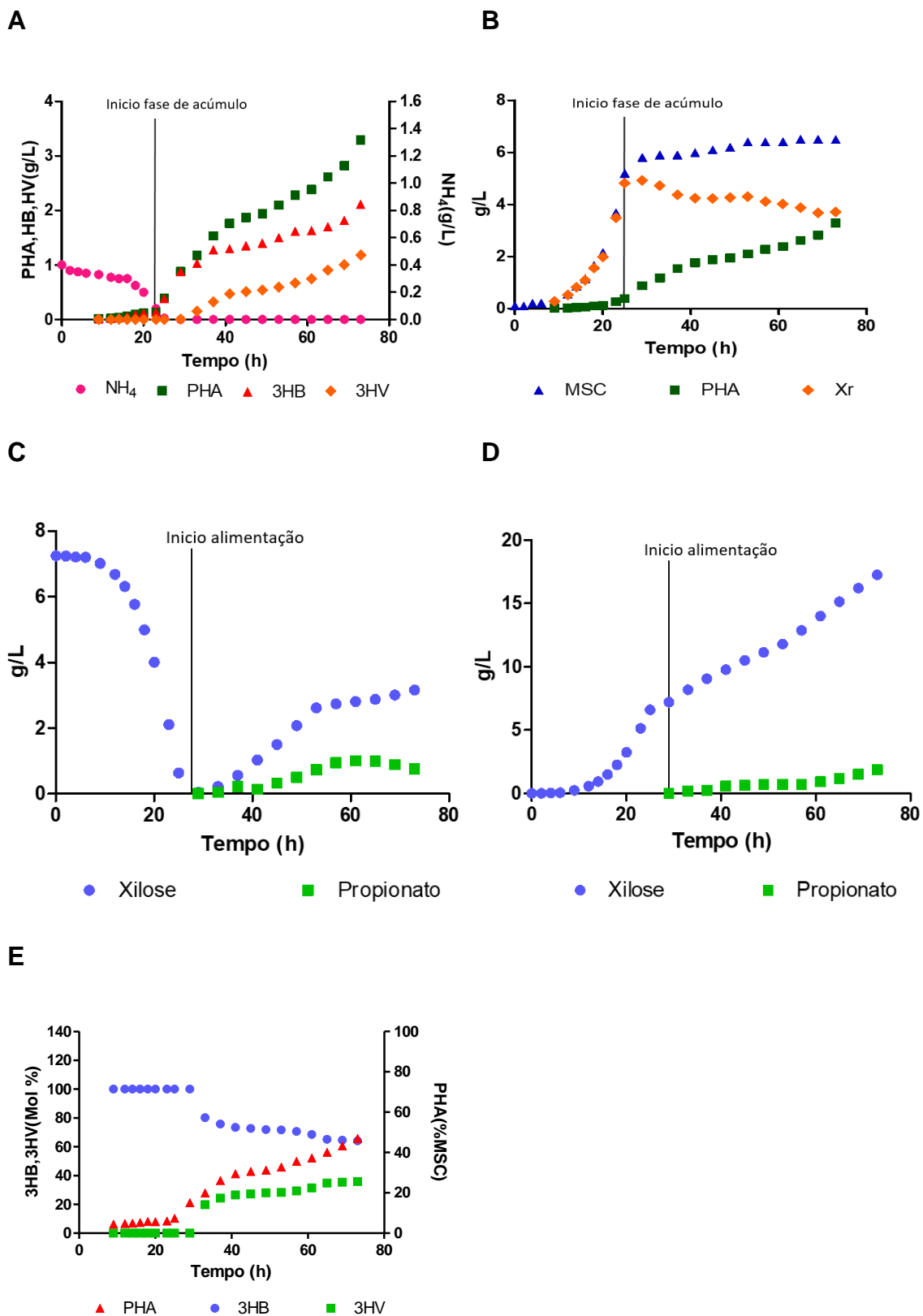
Conforme demonstrado na figura 70, do valor total de biomassa alcançada, até 48% dela é PHA, e deste PHA, foram alcançados os valores de 3HV buscados com a modulação do copolímero P3HB-co-3HV a partir de uma solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol, que era de 30mol%, variando pouco deste valor buscado durante todo o ensaio. A modulação do copolímero através da solução de alimentação foi, portanto, uma técnica eficiente, reproduzível com os resultados anteriores deste trabalho e sendo condizente com os resultados de trabalhos anteriores como os mostrados por Rocha 2009, Silva 1996 e Taciro et al, 2007.

Figura 70: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol.



Os fatores de conversão de substrato em produto foram de 0,54 g/g de xilose convertido em Xr (biomassa residual) ($Y_{xil/Xr}$), 0,12 g/g xilose convertida em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e 0,77 g/g propionato convertido em 3HV, ($Y_{HV/prop}$). Esta linhagem de *B. sacchari*, nas presentes condições de cultivos, obteve velocidades específicas de consumo (μ_S) das fontes de carbono de $0,31h^{-1}$ e produziu polímero a uma velocidade específica (μ_P) de $0,021h^{-1}$. Desta forma podemos observar que o ensaio alcançou o que era esperado, 30mol% de 3HV na modulação do copolímero, mostrando assim que essa linhagem mutante LFM019 é eficiente na conversão de xilose e propionato em P3HB-co-3HV e permite sua modulação ao se variar as proporções dessas fontes de carbono na solução de alimentação da fase de acúmulo. Assim como nos tópicos anteriores, a figura a seguir traz uma comparação entre todos os gráficos gerados para facilitar a comparação e compreensão do que foi discutido individualmente antes.

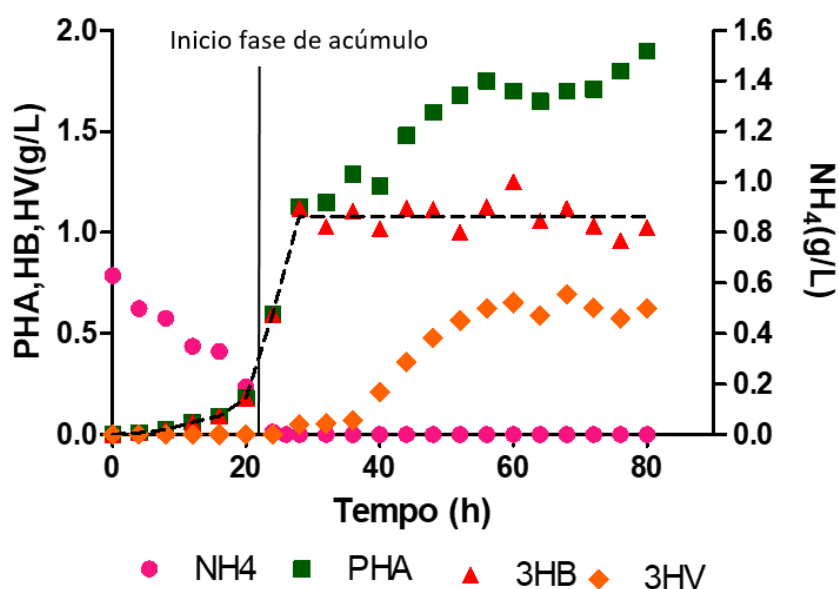
Figura 71: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 3,5:1 mol/mol. A- Consumo do NH_4 presente no meio e início do acúmulo de PHA; B- Valores em g/L de MSC, PHA e Xr; C- Fonte de carbono presente no meio; D- Fonte de carbono consumida; E- Porcentagem de PHA da MSC, mol% 3HB e 3HV.



5.4.5 Experimento em biorreator utilizando *B.sacchari* mutante LFM 019 com alimentação de solução com proporção de xilose e propionato em 2,5:1mol/mol.

Para esse ensaio foi realizado o cálculo da concentração da solução de alimentação para que a xilose e o propionato estivessem em uma proporção mol/mol de 2,5:1mol/mol, buscando assim alcançar um teor de 3HV em relação ao 3HB, no copolímero P3HB-co-3HV, de 40mol%. Os dados obtidos nesse cultivo têm suas médias apresentadas nos gráficos a seguir e integralmente no anexo VII.

Figura 72: Consumo do nitrogênio e produção de PHA (g/L) por LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.



Como pode ser observada na figura 72, a fase de crescimento deste cultivo foi reprodutiva com os demais cultivos, durando 24h, sendo o seu fim marcado pelo consumo total do nitrogênio no meio, onde *B.sacchari* novamente estava em situação de limitação, permitindo assim o acúmulo expressivo de PHA. Com isso pode-se observar as duas fases do ensaio, marcas pelo crescimento inicial e a fase de acúmulo, e também observar o momento do ensaio onde ocorreu a transição entre as fases. O aumento no acúmulo de PHA pode ser observado na mesma figura e começa a ocorrer no momento em que o nitrogênio se encontra limitado, assim como ocorreu nos cultivos anteriores, e sendo condizente com o descrito na literatura (Gomez e Bueno Netto, 2001). Nela também estão demonstradas as massas em g/L de 3HB e 3HV obtidas durante todo o cultivo. Essas massas alcançaram até 1,17g/L e 0,76g/L respectivamente.

Com o fim da fase de crescimento, e para dar assim início à fase de acúmulo, no tempo de 24h de cultivo, começou a ser alimentada no biorreator a solução de alimentação contendo xilose a 100g/L e propionato a 25,75g/L, com uma vazão de alimentação de 0,15ml/min, para se alcançar 40mol% de 3HV no total do copolímero P3HB-co-3HV.

Na figura 73 está demonstrado o quanto da fonte de carbono estava presente no meio durante todo o tempo do cultivo, enquanto que na figura 74 estão demonstrados os valores totais, em g/L, que foram consumidos de cada uma das fontes de carbono, xilose e propionato.

Figura 73: Fontes de carbono, xilose e propionato, presentes no meio durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.

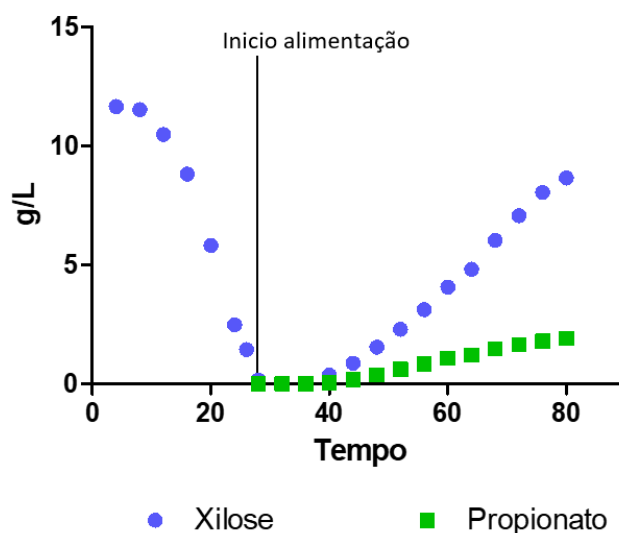
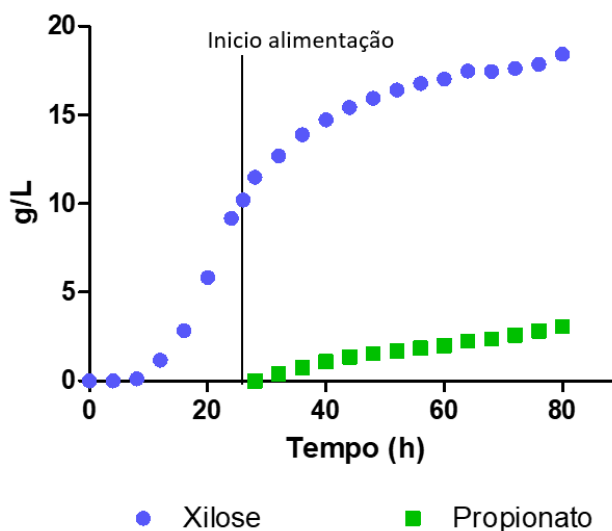


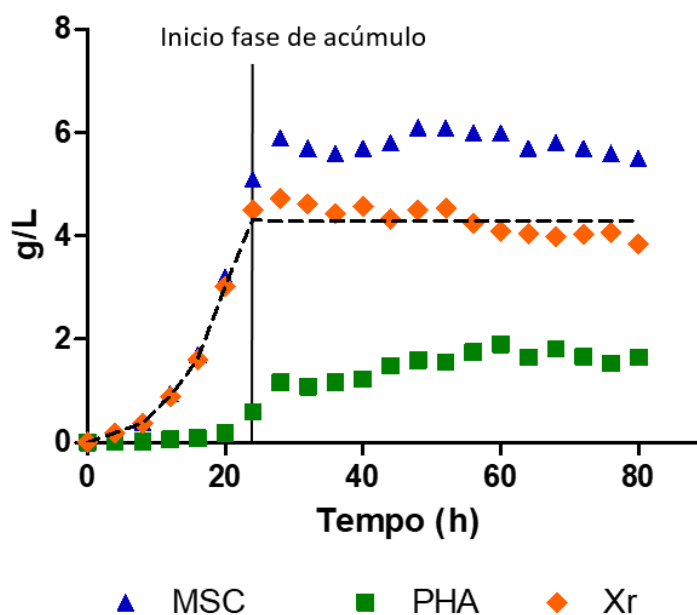
Figura 74: Fontes de carbono, xilose e propionato, consumidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.



Assim como ocorreu em todos os ensaios anteriores, devido ao fato de a bomba de alimentação estar ligada em uma vazão constante de 9mL/h, estava sendo adicionado ao meio, baseado na concentração da solução de alimentação, 0,9g/h de xilose e 0,36g/h de propionato. E novamente esse valor de xilose se mostrou como sendo muito elevado e, portanto, mais do que essa linhagem de *B.sacchari* consegue metabolizar para formar o PHA. Essa xilose começou a sobrar no meio, chegando ao final do ensaio a uma concentração de 8,6g/L, evidenciando que uma vazão menor seria o ideal para poupar recursos em ensaios futuros. Mesmo diante desse fato, o consumo total de xilose foi expressivo, chegando a 18,4g sendo 7g durante a fase de acúmulo, onde ela foi em sua maioria direcionada para o acúmulo de PHA. Assim como a xilose, o propionato fornecido também sobrou no meio sendo detectados valores baixos, fato que também havia ocorrido no ensaio anterior da proporção xilose: propionato em 3,5:1mol/mol. Porém, diferente do cultivo anterior onde com 60 horas de cultivo a vazão de alimentação foi reduzida para a metade a fim de se evitar um meio com uma concentração muito alta e, portanto, muito tóxica de propionato, nesse ensaio a vazão foi mantida constante desde o momento em que foi ligada até o fim do ensaio. Devido a isso, a concentração de propionato no meio chegou até o valor de 1,9g/L, muito próximo do valor tóxico máximo testado por Pereira em 2009 para os cultivos em shaker de 2,0g/L. Por isso alguns dos parâmetros testados podem ter sido minimamente afetados pela alta concentração de propionato no meio, como esperado baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho durante os ensaios em frascos agitados, onde a *B.sacchari* LFM019 apresentou um comportamento de melhores resultados nas concentrações medianas de propionato testadas, e resultados inferiores nas altas concentrações, como em 1,2g/L. Ainda assim, de todo o propionato fornecido ao longo do cultivo, 5g, 3g foram consumidas pela bactéria e direcionadas para o acúmulo de 3HV, permitindo modular o copolímero P3HB-co-3HV.

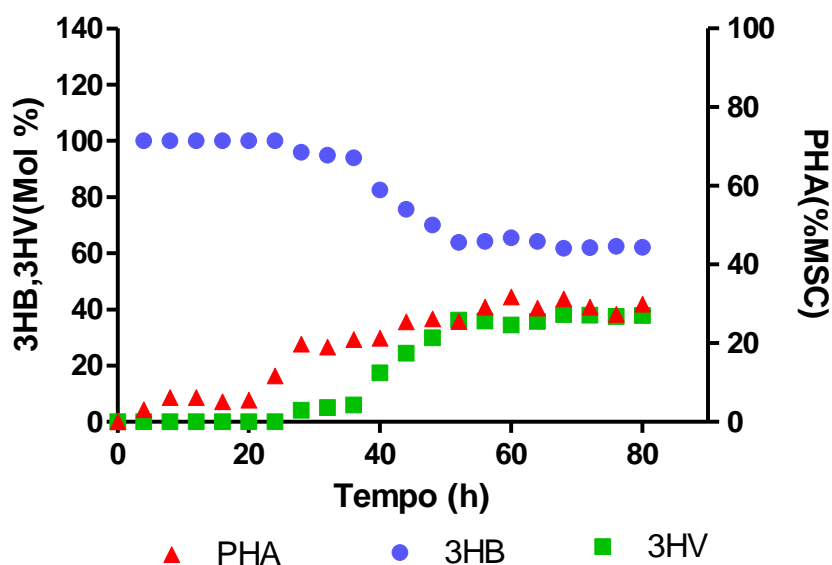
A biomassa total atingiu 6 g/L, a massa residual chegou a 4g/L, porém está se estabilizou no início da fase de acúmulo, ficando com valores em torno de 4,3g/L, e a massa total de PHA chegou a valores de 2,0g/L, aumentando consideravelmente desde o início da fase de acúmulo, conforme já discutido, porém também chegando próximo de se estabilizar nas últimas horas de ensaio. Essas informações estão demonstradas na figura 75.

Figura 75: Valores, em g/L, da biomassa total (MSC), massa de PHA e massa residual (Xr), obtidas durante o cultivo em biorreator da linhagem mutante LFM019 para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.



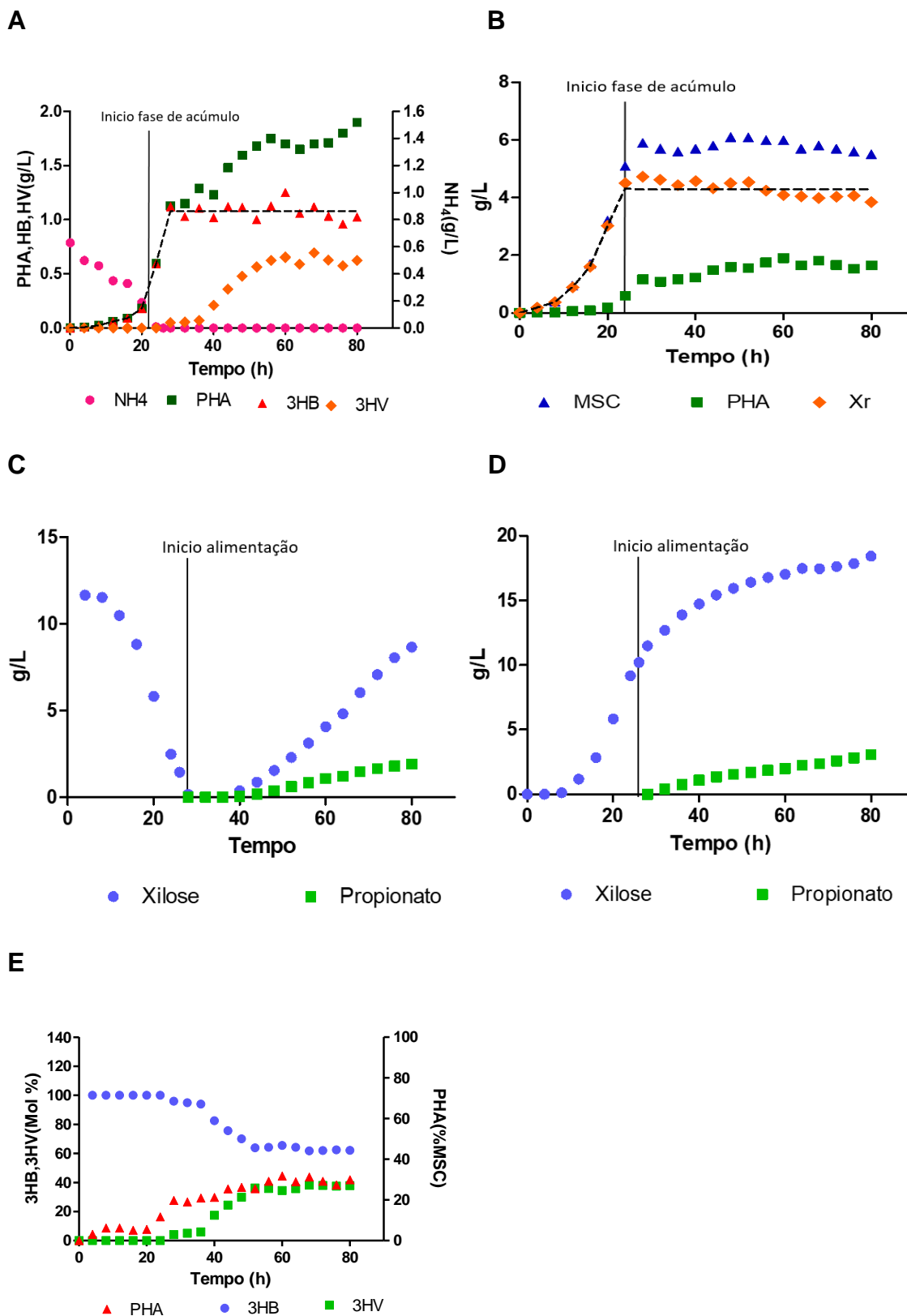
A figura 76 demonstra que, do valor total de biomassa alcançada, até 33% dela é PHA, e deste PHA, foram alcançados os valores de 3HV buscados com a modulação do copolímero P3HB-co-3HV a partir de uma solução de alimentação contendo xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol, que era de 40mol%, variando pouco deste valor buscado durante o ensaio.

Figura 76: Porcentagem de PHA da biomassa total, mol% de 3HB e 3HV gerados pela linhagem mutante LFM019 no cultivo em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol.



Os fatores de conversão de substrato em produto foram de 0,25g/g de xilose convertido em X_r (biomassa residual) ($Y_{X/xil}$), 0,06g/g xilose convertida em 3HB ($Y_{HB/xil}$) e 0,28g/g propionato convertido em 3HV, ($Y_{HV/prop}$). *B.sacchari* LFM019 apresentou velocidades específicas de consumo (μS) das fontes de carbono de $0,49h^{-1}$ e produziu polímero a uma velocidade específica (μP) de $0,09h^{-1}$. Desta forma podemos observar que o ensaio alcançou o que era esperado, 40mol% de 3HV na modulação do copolímero, mostrando assim que essa linhagem mutante LFM019 é eficiente na conversão de xilose e propionato em P3HB-co-3HV e permite sua modulação ao se variar as proporções dessas fontes de carbono na solução de alimentação da fase de acúmulo. Na figura a seguir está presente um compilado de todas as figuras apresentadas para neste tópico, para permitir uma comparação entre todos os gráficos gerados e facilitar a compreensão do que foi discutido individualmente antes.

Figura 77: Compilado dos gráficos representando os resultados do cultivo da linhagem mutante LFM019 em biorreator para a biossíntese de P3HB-co-3HV a partir de xilose e propionato em proporção de 2,5:1 mol/mol. A- Consumo do NH_4 presente no meio e início do acúmulo de PHA; B- Valores em g/L de MSC, PHA e Xr; C- Fonte de carbono presente no meio; D- Fonte de carbono consumida; E- Porcentagem de PHA da MSC, mol% 3HB e 3HV.



5.4.6 *Discussão geral dos resultados obtidos em biorreator utilizando B.sacchari mutante LFM 019 para modulação da composição do copolímero P3HB-co-3HV utilizando alimentação de solução com diferentes proporções de xilose e propionato.*

Para assegurar a reprodutibilidade dos resultados, as condições iniciais do cultivo, para a fase de crescimento, foram idênticas para todos os ensaios. No meio mineral, com todas as condições controladas como pH em 7,0, temperatura a 30°C, aeração e agitação constantes, foi adicionada a xilose em quantidade suficiente para que, no meio dentro do biorreator, esta estivesse a uma concentração de aproximadamente 10g/L, servido assim como fonte inicial de carboidratos a serem utilizados pela *B.sacchari*.

Neste meio mineral, com as condições controladas, foi então realizado o inóculo do cultivo proveniente do meio mineral 6/3, buscando se uma densidade ótica inicial dentro do reator de 0,3 nm. Isso foi marcado como o tempo 0h do cultivo, e nas dez primeiras horas *B.sacchari* se mostrou em uma fase lag, onde a quantidade de xilose consumida foi muito baixa, mostrando que essa ainda não estava crescendo. Após esse período e até um tempo de aproximadamente 26h de ensaio, para a maioria dos cultivos, a xilose inicial foi totalmente consumida por *B.sacchari* em sua fase de crescimento.

Além da formação de unidades de 3HB, um dos constituintes do P3HB-co-3HV, é necessário ainda adicionar ao copolímero unidades de 3HV. Enquanto que para se formarem os monômeros de 3HB é necessário o fornecimento de xilose, ou outro açúcar como fonte de carbono, para se formar unidades de 3-hidroxicvalerato é necessário fornecer a linhagem microbiana estudada um cosubstrato que possui estrutura similar a esse 3HV. Com esse objetivo este trabalho forneceu o propionato de sódio, que é um substrato comumente empregado em processos microbiológicos que buscam a formação de 3HV no P3HB-co-3HV (SILVA et al.2000).

A formação de produto é influenciada com a presença da massa de nitrogênio amoniacal no meio de cultura durante as primeiras horas de acúmulo. Isso é condizente com o relatado por outros autores já mencionados neste trabalho como SILVA et al., 2000 e GOMEZ et al., 1996, que observaram só haver formação de PHA quando *B.sacchari* está limitada em um nutriente essencial ao crescimento. Diante deste fato, a limitação em um destes nutrientes essenciais ao crescimento foi imprescindível para a formação do produto desejado, P3HB-co-3HV, sendo o

nitrogênio então selecionado como o nutriente a ser limitado. Entretanto a linhagem de *B.sacchari* LFM019 possui a capacidade de produzir pequenas quantidades de PHA, composto somente por 3HB uma vez que xilose induz a formação somente deste monômero e está era a única fonte de carbono presente no meio, mesmo durante a fase de crescimento, não sendo maior que 15% da massa de célula total para todas as condições estudadas, podendo esse fato ser observado nas figuras 49,54, 60, 66 e 72 que mostram o acúmulo do PHA nos biorreatores xilose 0,9g/h, xilose e propionato em 10:1, 5:1, 3,5:1 e 2,5:1 mol/mol respectivamente.

O tempo em que o nitrogênio foi totalmente consumido do meio de cultura foi variável com a relação empregada na fase de acúmulo, entre as fontes de carbono, sendo esgotado no mesmo momento em que a xilose também foi. O consumo total do carboidrato inicialmente fornecido, juntamente com o esgotamento do nitrogênio presente no meio, marcou o fim da fase de crescimento e, dessa forma, também marcou o início da fase de acúmulo, momento em que ocorreu o acionamento da bomba da solução de alimentação.

Como mencionado anteriormente nesse trabalho, os pontos que representam o ensaio da proporção xilose:propionato 5:1 estão consideravelmente divergentes dos demais resultados obtidos em outros cultivos e do que se era esperado baseado na literatura. Isso se deve ao fato de que, nesse caso, o controle do pH foi impreciso devido a divergências entre as leituras feitas internamente pelo equipamento de controle de reatores biológicos Applikon Biotecnologia Ez e os obtidos manualmente em pHmetro externo ao biorreator. Nessa situação o controle do pH foi inicialmente feito manualmente, o que não criou o ambiente de pH equilibrado automaticamente em 7,0 pelo equipamento. Isso gerou diferenças nos cultivos, pois o tempo entre a detecção da variação do pH e sua devida correção, criou um meio para crescimento menos equilibrado, sendo assim menos ideal para o um perfeito crescimento da *B. sacchari* LFM019. Porém, mesmo com essa diferença, que não permitiu um cultivo ideal e com a mesma alta produtividade apresentada pelos demais cultivos, os dados obtidos ainda podem ser utilizados para se ter mais perspectivas do comportamento dessa linhagem em cultivos de biorreatores, bem como para demonstrar a importância de um meio de cultura estar com todas as condições ideais para o crescimento e o acúmulo. O que, quando não obedecido, irá reduzir a capacidade de uma grande produção de P3HB-co-3HV, um dos objetivos deste trabalho. Fatos observados na figura 65.

No ensaio onde foi administrado somente xilose durante a fase de acúmulo ou na concentração mais baixa de propionato testada, 10:1mol/mol, a porcentagem de PHA acumulado foi superior aos outros ensaios, alcançando 50% de PHA acumulado. Porém, esse PHA sendo composto apenas de 3HB, ou com uma proporção de 3HV mais baixa, chegando a 10mol%. Esses dados sugerem que ocorre um melhor aproveitamento do espaço intracelular (BRAMER et al. 2001) para a formação do 3HB quando comparado ao copolímero P3HB-co-3HV, pois em todos os ensaios a linhagem utilizada foi à mesma, mas a concentração dos substratos, bem como os produtos gerados foram variados. Essas porcentagens podem ser vistas nas figuras 49,54, 60, 66 e 72 que mostram o acúmulo do PHA nos biorreatores xilose 0,9g/h, xilose e propionato em 10:1, 5:1, 3,5:1 e 2,5:1mol/mol respectivamente.

A partir da porcentagem de PHA da massa seca celular é possível chegar ao valor, em g/L, da massa de PHA acumulada pela linhagem mutante de *B. sacchari*. Nos ensaios onde foi adicionado propionato na solução de alimentação, essa massa de PHA era constituída por 3HB e 3HV em diferentes proporções, de acordo com o objetivo de modulação do copolímero P3HB-co-3HV. As massas de PHA alcançadas foram de 4,06; 4,20; 3,42; 2,11g/L para os reatores xilose 0,9g/h, xilose e propionato em 10:1, 3,5:1 e 2,5:1mol/mol respectivamente.

Com uma vazão constante na bomba de alimentação de $V_{esp} = 9\text{mL/h}$, é possível notar que a xilose sobrava no meio em todos os cultivos, a partir de tempos diferentes e em quantidades diferentes. Isso ocorreu, pois, as soluções de alimentação eram preparadas contendo 100g/L de xilose e todos os ensaios buscaram evitar a limitação de crescimento e do acúmulo de PHA, por falta de substrato. Desta forma, optou-se por vazões maiores, porém sendo preservada a capacidade de modular o P3HB-co-3HV. Para se conhecer a maneira que a linhagem mutante, LFM019, se comporta quando cultivada em biorreatores e também como está consome a xilose foram realizadas medições constantes desses valores em intervalos regulares de tempo.

O tempo necessário para que a quantidade de xilose fosse consumida foi muito próximo em todos os ensaios e tendeu a se estabilizar após 60 horas de cultivo. Dessa forma a *B.sacchari* já estava em fase de acúmulo a aproximadamente 30h de ensaio quando este foi encerrado. Isso está demonstrado nas figuras 53B, 59B,

65B, 71B e 77B, para os ensaios xilose 0,9g/h, xilose e propionato em 10:1, 5:1, 3,5:1 e 2,5:1mol/mol respectivamente.

As variações na relação entre xilose:propionato originou diferentes massas de 3HV no interior das células. Essas diferentes concentrações buscavam modular a composição do P3HB-co-3HV variando a porcentagem de 3HV no copolímero. Através de cálculos de molaridade foi possível projetar as porcentagens de 3HV que seriam obtidas na composição do P3HB-co-3HV, assim como foi realizado por Rocha, 2008. Esses valores calculados buscavam alcançar, através das relações nas concentrações de xilose:propionato, as porcentagens 10, 20, 30 e 40% de 3HV, através de soluções de alimentação com as proporções de 10:1, 5:1, 3,5 e 2,5:1mol/mol, respectivamente. Os valores buscados foram atingidos em praticamente todos os cultivos realizados em biorreatores. Quanto menor a relação empregada entre os substratos, menos porcentagem molar de 3HV no copolímero foi obtida (10:1mol/mol gerou 10%mol de unidade de 3HV), devido a pouca concentração de propionato que estava sendo fornecida durante a alimentação. Já nas relações maiores, e conseqüentemente com uma disponibilidade maior de propionato que é o substrato precursor do 3HV, os valores atingiram até a faixa dos 40%mol de unidades de 3HV (ensaio com a relação em 2,5:1mol/mol), que era o buscado baseando-se nos cálculos prévios ao cultivo. Fatos observados nas figuras 59E, 65E, 71E e 77E, para os ensaios com xilose e propionato em 10:1, 5:1, 3,5:1 e 2,5:1mol/mol respectivamente.

Essa variação e a busca por melhores valores na produção de P3HB-co-3HV, com diferentes porcentagens molares de unidades de 3HV, tem grande importância, pois apresenta uma relevância muito grande do ponto de vista industrial. Essas diferenças de porcentagem irão variar em como esse copolímero é processado, influenciando assim sua temperatura de fusão, alongação, cristalinidade e ponto de ruptura (HOLMES, 1985).

B.sacchari, apresenta uma dependência pelo cosubstrato para dar início à formação de 3HV, uma vez que este só começou a ser acumulado após ser ligada a alimentação. Essa linhagem da *B. sacchari*, LFM019, possui uma mutação que impede o seu crescimento utilizando apenas propionato como única fonte de carbono. Dessa forma, é possível concluir que a maior parte do propionato fornecido e que foi consumido por ela estava sendo direcionado para o acúmulo de 3HV.

Apesar de ser possível observar um bom consumo de propionato por essa linhagem de *B. sacchari* com mutação no 2MCC, a LFM019, este substrato só foi completamente consumido em um dos cultivos realizados, o com proporção xilose:propionato de 10:1 mol/mol, que apresentava a menor proporção entre os dois substratos, de todos os cultivos realizados. Nos demais ensaios em biorreator, o propionato começou a sobrar lentamente no meio pouco tempo após a bomba de alimentação ter sido ligada para introduzir a solução de alimentação no cultivo que estava na fase de acúmulo. Mesmo com essa sobra no meio, somente na maior concentração de xilose:propionato, 2,5:1 mol/mol, a concentração de propionato no meio se aproximou do limite tóxico de 2g/L (PEREIRA, 2009).

O fato de haver restado no meio tanto xilose quanto propionato é um indicativo de que, em um ensaio onde uma vazão menor seja adotada, seria o ideal do ponto de vista de economia dos substratos, porém é necessária cautela para que não falte componentes para a síntese do P3HB-co-3HV.

A massa de células total (MSC) corresponde à massa de célula residual acrescida da massa de polihidroxialcanoato acumulada, uma vez que este produto é intracelular. No ensaio onde a solução de alimentação foi provida somente de xilose ou com a concentração de propionato mais baixa testada, a massa de células foi superior a todos os demais ensaios com a mesma vazão específica de alimentação.

Quanto à massa residual formada, que se trata da quantidade da massa seca celular total que não é massa de PHA, é possível observar que ao se terminar a fase de crescimento a massa residual atingida ficou constante, indicando que na fase de acúmulo, os substratos fornecidos, que foram consumidos pela *B. sacchari*, estão diretamente envolvidos na formação de unidades de 3HB e unidades de 3HV. Esses resultados obtidos são condizentes com dados anteriores já publicados (ROCHA et al., 2008).

Para se conhecer o quanto dos substratos xilose e propionato estão sendo direcionados para o acúmulo de PHA ou para outros componentes da célula, são realizados os cálculos dos fatores de conversão. Esses cálculos foram realizados para todos os pontos coletados durante os cultivos em biorreatores. Para calcular os fatores de conversão de xilose em monômero 3HB ($Y_{HB/Xil}$) foram considerados os valores totais de xilose que havia sido consumida e o total de massa de 3HB obtidos. Esses valores foram maiores nos ensaios onde foi somente alimentada à

xilose ou onde a mesma estava em maior proporção em relação ao cosubstrato propionato.

Foram também calculados os fatores de conversão de propionato em monômero 3HV ($Y_{HV/Prop}$). Para as diferentes concentrações, os valores alcançados foram de 0.52, 0.36, 0.92 e 0.36 para as proporções de xilose:propionato 10:1, 5:1, 3,5:1 e 2,5:1 mol/mol respectivamente. Esses valores alcançaram uma porcentagem de até 70% do valor máximo teórico que poderia ser alcançado e que foi calculado por Gomez et al.1996 (1,35g/g).

Isso serve como mais uma evidência de que, mesmo com uma melhora na produção de 3HV, devido à mutação que essa bactéria apresenta no ciclo do 2-metilcitrato, uma segunda via, possivelmente a α -oxidação, está ativa principalmente em concentrações altas de propionato (Pereira et al, 2009), direcionando uma parte desse propionato consumido para outras funções da célula que não o acúmulo de 3HV.

Sabe-se que parte da xilose consumida não foi direcionada para o acúmulo de PHA e sim para outras funções da célula. Conhecendo essa quantidade de xilose consumida e quanto da massa de célula não é PHA (massa residual), podemos calcular o fator de conversão da xilose nessa massa ($Y_{X/xil}$).

Foi possível observar que esse fator de conversão, no início do ensaio, estava alto e com o passar do tempo de cultivo foi sendo reduzido até se estabilizar no tempo onde terminou a fase de crescimento e foi dado início a fase de acúmulo. Isso é condizente com o esperado, pois *B.sacchari* estava direcionando os substratos fornecidos principalmente para o acúmulo de PHA. *B.sacchari* não estava crescendo e, por tanto, não estava convertendo xilose para gerar mais massa de célula. Esta estava utilizando o que foi consumido, e não direcionado para o acúmulo de 3HB, para manutenção das funções celulares.

Quando comparados os resultados obtidos no presente trabalho com os demonstrados por outros autores, nota-se que os valores obtidos foram próximos dos anteriores, mesmo variando-se as fontes de carbono alimentadas e as linhagens de *B.sacchari*. Essa comparação pode ser feita ao se observar a tabela 9.

Cepa/mutante	Fonte de carbono	Proporções fontes de carbono	3HB mol%	3HV mol%	$Y_{3HV/Prop}$	Referência
<i>B. sacchari</i> selvagem	Glicose e ácido propionico	5:1mol/mol	95,4	4,6	0,05	Gomez et al. 1996
Mutante Prp 189	Sacarose e ácido propionico	10,3:1mol/mol	80,50	19,50	1,20	Silva et al. 2000
Mutante Prp 189	Sacarose e ácido propionico	19:1mol/mol	83,00	17,00	1,15	Rocha et al. 2008
		30:1mol/mol	90,00	10,00	1,27	
		61,5:1mol/mol	93,50	6,50	1,34	
Mutante 2MCC 019	Xilose e propionato de sódio	2,5:1mol/mol	60,76	39,24	0,36	Presente trabalho
		3,5:1mol/mol	68,60	31,40	0,92	
		5:1mol/mol	78,83	21,17	1,08	
		10:1mol/mol	89,67	10,33	0,52	

Tabela 9: 3HBmol%, 3HVmol% e $Y_{3HV/prop}$ obtidos por diferentes autores, com fontes de carbono, e proporções entre elas, variadas em biorreatores.

6 CONCLUSÕES.

Nos ensaios em frascos agitados que tinham como objetivo identificar as melhores concentrações de propionato para a formação de unidade de 3HV no copolímero P3HB-co-3HV, foi mostrado que a concentração intermediária de 0,7g/L de propionato foi a que obteve melhor resultado para formação de PHA. Concentrações menores que essa, apresentaram bons valores de acúmulo de unidade 3HV, porém relativamente menores quando comparadas a melhor eficiência da concentração de 0,7g/L.

Os valores dos cultivos onde a concentração de propionato foi elevada confirmam resultados anteriores que mostram que, devido a sua toxicidade, concentrações elevadas de propionato é inibitório para a *Burkholderia sacchari* LFM019, que apresenta mutação nos genes do ciclo do 2-metilcitrato.

A composição do copolímero P3HB-co-3HV produzido por linhagens recombinantes de *B.sacchari* pode ser modulada pela relação xilose:propionato fornecida. Isso foi confirmado variando-se a concentração das relações de xilose e propionato na solução de alimentação, obtendo-se diferentes porcentagens molar de 3HV (3HV mol%) no copolímero P3HB-co-3HV, diferentes fatores de conversão do propionato em unidades de 3HV ($Y_{HV/prop}$) e diferentes massas de 3HV. Quanto menor a relação xilose:propionato, ou seja, maior a concentração de propionato na solução de alimentação, maior a porcentagem molar de 3HV no P3HB-co-3HV. Inversamente o valor de $Y_{HV/prop}$ aumenta com o aumento da relação xilose:propionato.

As produtividades volumétricas atingidas são promissoras e indicam que processos economicamente viáveis poderão ser realizados com o aumento da densidade celular utilizando essa linhagem de *B.sacchari*. Esse resultado é extremamente importante, visto que a linhagem estudada, LFM019, é produto de um melhoramento genético, que tinha como objetivo melhorar a eficiência no uso do propionato para produção de 3HV e contribuindo assim para a viabilidade econômica do projeto, uma vez que o custo desse substrato é alto e deve ser considerado na produção de P3HB-co-3HV.

A avaliação da eficiência do mutante de *B.sacchari* na conversão de propionato a unidades 3HV mostrou que este ainda não atingiu os valores teóricos máximos, colaborando com a hipótese anteriormente apresentada de que existe uma segunda via do catabolismo de propionato nessa bactéria, cuja atuação é menos relevante, apresentando-se principalmente quando concentrações mais altas de propionato estão presentes no meio.

REFERÊNCIAS

- AMARA, A.A. Polyhydroxyalkanoates: from basic research and molecular biology to application., **IUM Engineering Journal**, v.9, p. 37-73, 2008
- BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G. I. I. L.; BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, F. D.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v.277, p.1453–1474, 1997.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters.**Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** v.41, p.77, 1990,.
- BRÄMER, C.O.; STEINBÜCHEL, A. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. **Microbiology**, v.147, p.2203–2214, 2001.
- BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-metilcitrate pathway involved in the catabolismo f propionate in the polyhydroxyalkanoate producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutante accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate contente. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, p. 271-279, 2002.
- BYROM, D. Em Novel biodegradable microbial polymers; Dawes, E. A., ed.; Kluwer: London, 1990.
- CHANPRATEEP, S.; Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v.110, p.621-632, 2010.
- CLAES, W.A., PÜHLER, A., AND KALINOWSKI, J. Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. **J. Bacteriol** v.184, p.2728–2739, 2002.
- COLE, S. T., BROSCH, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. v.39, p.537–544, 1998.

COLLINS, S. H.; STOWELL, F. D., Carbon substrates in biotechnology; ed.; **Society for General Microbiology**: Washington, DC, no 21, cap. 3, 1987.

Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, MacFarlane GT. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. **Gut** 1987;28:1221–1227.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S.; Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **J Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.18, p.251–254, .1997.

FERNÁNDEZ-BRIERA, A.; GARRIDO-PERTIERRA, A. A degradation pathway of propionate in *Salmonella typhimurium* LT-2. **Biochimie**. v.70, p.757–768, 1988.

GERIKE, U.; DAVID, W. H.; RUSSEL, N. J.; DYALL-SMITH, M. L.; MICHAEL, J. D. Citrate synthase and 2-methylcitrate synthase: structural, functional and evolutionary relationships. **Microbiology**. v.144, p.929–935, 1998.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; SILVA, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; BUENO NETTO, C. L.; Anais do 2º Congresso Brasileiro de Polímeros, São Paulo, Brasil, 1993.

GOMEZ, J.G.C., RODRIGUES, M.F.A., ALLI, R.C.P., TORRES, B.B., BUENO NETTO, C.L., AND 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.

GRIMEK, T.L., AND ESCALANTE-SEMERENA, J.C. The *acnD* genes of *Shewanella oneidensis* and *Vibrio cholerae* encode a new Fe/S-dependent 2-methylcitrate dehydratase enzyme that requires *prpF* function in vivo. **J. Bacteriol.** v.186, p.454–462, 2004.

HALARNKAR, P. P.; BLOMQUIST, G. J. Comparative aspects of propionate metabolism. **Comp. Biochem. Physiol.** v.92, p.227–231, 1989.

HORSWILL, A.R., AND ESCALANTE-SEMERENA, J.C. Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of

activators, and the prpBCDE genes constitute an operon. **J. Bacteriol.** v.179, p.928–940, 1997.

HORSWILL, A.R.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via 2-methylcitrate acid cycle. **J.Bacteriol.** p.5615-5623, 1999.

Horswill AR, Dudding AR, Escalante-Semerena JC. Studies of propionate toxicity in *Salmonella enterica* identify 2-methylcitrate as a potent inhibitor of cell growth. **J Biol Chem** 2001;276:19094– 19101.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentose by yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.63, p.495–509, 2004.

KAWARABAYASI, Y.; HINO, Y.; HORIKAWA, H.; YAMAZAKI, S.; HAIKAWA, Y.; JINNO, K.; TAKAHASHI, M.; AOKI, M. K.; KUBOTA, K.; NAKAMURA, Y.; NOMURA, N.; SAKO, Y.; KIKUCHI, H.; Complete genome sequence of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeon, *Aeropyrum pernix* K1. **DNA Res.** v.6, p.83–101, 1999.

KEENAN, T. M.; TANENBAUM, S. W.; Production and characterization of poly- α -hydroxyalkanoate copolymers from *Burkholderia cepacia* utilizing xylose and levulinic acid. **Biotechnol. Prog.**, v.20, p.1697–1704, 2004.

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

LONDON, R.E.; ALLEN, D.L., GABEL, S.A. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli*. **J.Bacteriol.** v.181, p.3562-3570, 1999.

MIYAKOSHI, S.; UCHIYAMA, H.; SOMEYA, T.; SATOH, T.; TABUCHI, T. Distribution of the methylcitric acid cycle and α -oxidation for propionate in fungi. **Agric. Biol. Chem.** v.51, p.2381–2387, 1987.

MONTORO, S. R.; SHIGUE, C. Y.; SORDI, M. L. T.; SANTOS, A. M.; RÉ, M. I. Estudo cinético da redução da massa molar do poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV). **Polímeros: Ciências e tecnologia**, v. 20, p. 19-24, 2010.

MUÑOZ-ELIAS, E.J., UPTON, A.M., CHERIAN, J., AND MCKINNEY, J.D. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. **Mol. Microbiol.** v.60, p.1109–1122, 2006.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P.E.; ROSSEL, C.E.V Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.57, p. 1-5, 2001.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. β -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H-16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem.J.**, v.134,p.239-248, 1973.

OJUMU, T. V., YU, J., SOLOMON, B. O. Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, **Afri. J.Biotechnol.**, v. 3, p. 18-24, 2004.

PALMQVIST, E. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: inhibition and detoxification. PhD thesis, Lund University, Lund, 1998.

PARK, S. J., KIM, T. W., KIM, M. K., LEE, S. Y., LIM, S. C. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: toward a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnol. Adv.**, v.30, p. 1196-1206, 2012.

PEREIRA, E. M. ;Clonagem de genes do ciclo de 2-metilcitrato e avaliação de estratégias para a obtenção de mutantes prp de *Burkholderia sacchari*, produtora de plástico biodegradávelDissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2003.

PEREIRA, E. M.; GOMEZ, J. G. C.; SILVA, L. F.; Anais do XV Simpósio Nacional de Bioprocessos, Recife, Brasil, 2005.

PEREIRA, E. M.; SILVA-QUEIROZ, S. R.;GOMEZ, J. G. C.;SILVA, F. S. 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.

PHILIP, S., KESHAVARZ, T.,ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.82, p. 233-247, 2007.

PRODROMOU, C.; ARTYMIUK, P. J.; GUEST, J. R.; The aconitase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the aconitase gene and amino acid sequence similarity with mitochondrial aconitases, the iron-responsive-element-binding protein and isopropylmalate isomerases. **Eur. J. Biochem.** v.204, p.599–609; 1992.

PRONK, J. T.; VAN DER LINDEN-BEUMAN, A.; VERDUYN, C.; SCHEFFERS, W. A.; DIJKEN, VAN J. P. Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis. **Microbiology**.v.140, p.717–722, 1994.

RAMSAY, J. A.; ALY HASSAN, M. C.; RAMSAY, B. A.; Hemicellulose as a potential substrate for production of poly(ϵ -hydroxyalkanoates) **Can. J. Microbiol.** v.41, p.262-273, 1995.

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

REHM, B.H.A., STEINBUCHER, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: The key enzymes of PHA synthesis. Biopolymers Online. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaG, p.234-289, 2005.

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

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Microbiol.Biotechnol.** v.30, p.279–291, 2004.

SENIOR,P.J; DAWES, E.A. The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem.J.**, v.134, p.225-238,1973.

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.; Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiencia na producao de P3HB-co-3HV - um plastico biodegradavel. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Brasil, 1998.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B.; Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **J. Biotechnol.** v.76, p.165, 2000.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E. R. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate. *Ind. microbiol. biotechnol.* v.31, p.245–254, 2004.

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

SILVA NETO, J.F.; KOIDE, T.; GOMES, S.L.; MARQUES, M. V. Site-directed gene disruption in *Xylella fastidiosa*. **FEMS Microbiology Letters.** v.210, p.105-110, 2002.

STEINBÜCHEL, A. Em Polyhydroxyalkanoic acids; Byrom, D. ed.; Macmillan Publishers: Basingstoke, 1991.

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

SURIYAMONGKOL, P., WESELAKE, R., NARINE, S., MOLONEY, M., SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants- a review. **Biotechnol. Adv.**, v.25, p. 148-175, 2007.

TEXTOR, S.; WENDISCH, V. F.; DE GRAAF, A. A.; MULLER, U.; LINDER, M. L.; LINDER, D.; BUCKEL, W. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. **Arch. Microbiol.** v.168, p.428–436, 1997.

WEGENER, W. S.; REEVES, H. C.; RABIN, R.; AJL, S. J.; Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids. **Bacteriol. Rev.** v.32, p.1–26, 1968.

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

ANEXO I. Resultados obtidos das amostras retiradas dos cultivos de *B. sacchari* LFM101, em frascos agitados, com diferentes concentrações de propionato.

Concen trações	Répli ca	Nitrogênio(g/L)			pH			Xilose(g/L)			Propionato(g/L)			MSC		PHA			24H			72H							
		0H	24H	72H	0H	24H	72H	0H	24H	72H	Inicial	Final	(g/L) 24H	(g/L) 72H	%MSC 24H	%MSC 72H	3HB (24H)	3HB (72H)	3HV (72H)	Massa PHA (g/L)	Massa residua YH/g/l	YX/g/l	Massa PHA (g/L)	Massa residua HV(g/L)	Massa de HB(g/L)	Massa de HB(g/L)	YHV/pr YH/g/l	YX/g/l	
1,2g/L	1	0,238	0	7,50	6,55	7,11	11,14	4,80	0,00	1,24	0,08	4,4	6,2	37,44	55,68	100	97,11	2,89	1,65	2,75	0,15	0,25	3,45	2,75	0,10	3,35	0,09	0,30	0,25
	2	0,327	0	7,50	6,46	7,15	13,87	7,16	0,00	1,33	0,07	4,4	5,0	37,75	53,99	100	96,69	3,31	1,66	2,74	0,12	0,20	2,70	2,30	0,09	2,61	0,07	0,19	0,17
	3	0,252	0	7,50	6,44	7,15	13,41	6,52	0,00	1,28	0,00	4,2	6,6	37,85	51,76	100	96,81	3,19	1,59	2,61	0,12	0,19	3,42	3,18	0,11	3,31	0,09	0,25	0,24
0,9g/L	1	0,256	0	7,50	6,42	6,89	13,65	4,47	0,00	1,07	0,07	4,0	5,8	40,99	54,02	100	98,05	1,95	1,64	2,36	0,12	0,17	3,13	2,67	0,06	3,07	0,06	0,23	0,20
	2	0,260	0	7,50	6,43	6,91	14,90	7,02	0,00	1,04	0,06	3,8	6,0	40,16	50,92	100	97,96	2,04	1,53	2,27	0,10	0,15	3,06	2,94	0,06	2,99	0,06	0,20	0,20
	3	0,254	0	7,50	6,45	6,86	14,52	6,14	0,00	1,00	0,06	4,2	6,2	40,48	56,45	100	98,05	1,95	1,70	2,50	0,12	0,17	3,50	2,70	0,07	3,43	0,07	0,24	0,19
0,7g/L	1	0,162	0	7,50	6,44	6,83	14,33	6,71	0,00	0,72	0,06	3,8	6,0	39,61	56,01	100	99,52	0,48	1,51	2,29	0,11	0,16	3,36	2,64	0,02	3,34	0,02	0,23	0,18
	2	0,153	0	7,50	6,44	6,75	14,64	NR	0,00	0,67	0,06	4,0	6,0	41,93	53,01	100	99,62	0,38	1,68	2,32	0,11	0,16	3,18	2,82	0,01	3,17	0,02	0,22	0,19
	3	0,227	0	7,50	6,41	6,68	13,43	6,97	0,00	0,69	0,05	4,0	6,4	41,57	52,44	100	99,73	0,27	1,66	2,34	0,12	0,17	3,36	3,04	0,01	3,35	0,01	0,25	0,23
0,3g/L	1	0,135	0	7,50	6,46	6,58	13,18	6,82	0,00	0,34	0,06	4,4	6,4	42,20	56,25	100	99,86	0,14	1,86	2,54	0,14	0,19	3,60	2,80	0,01	3,59	0,02	0,27	0,21
	2	0,168	0	7,50	6,45	6,63	11,85	5,75	0,00	0,39	0,06	4,0	6,2	39,78	56,81	100	99,61	0,39	1,59	2,41	0,13	0,20	3,52	2,68	0,01	3,51	0,04	0,30	0,23
	3	0,152	0	7,50	6,45	6,64	14,00	7,70	0,00	0,31	0,05	4,0	6,0	48,26	53,62	100	99,47	0,53	1,93	2,07	0,14	0,15	3,22	2,78	0,02	3,20	0,07	0,23	0,20
0,1g/L	1	0,130	0	7,50	6,44	6,59	11,91	7,56	0,00	0,20	0,00	4,2	6,2	43,39	52,86	100	99,89	0,11	1,82	2,38	0,15	0,20	3,28	2,92	0,00	3,27	0,02	0,27	0,25
	2	0,142	0	7,50	6,43	6,58	13,96	NR	0,00	0,14	0,00	4,2	6,4	42,76	53,67	100	99,89	0,11	1,80	2,40	0,13	0,17	3,43	2,97	0,00	3,43	0,03	0,25	0,21
	3	0,161	0	7,50	6,44	6,66	13,19	6,91	0,00	0,16	0,00	4,0	6,2	43,36	59,73	100	99,90	0,10	1,73	2,27	0,13	0,17	3,70	2,50	0,00	3,70	0,02	0,28	0,19

Anexo I Cultivos de *B. sacchari* LFM101, em frascos agitados, com diferentes concentrações de propionato.

ANEXO II. Resultados obtidos das amostras retiradas dos cultivos de *B. sacchari* LFM019, em frascos agitados, com diferentes concentrações de propionato.

Concentrações	Repliques	Nitrogênio(g/L)		pH			Xitose(g/L)		Propionato (g/L)		MSC		PHA			24h				72h									
		0h	24h	0h	24h	72h	0h	24h	72h	Inicial	Final	24h	MSC	%MSC	%MSC	3HB	3HB	3HV	Massa	Massa	Massa	de	YHV/p	YHB/xil	YX/xil				
1,2g/L	1	0,138	0	7,50	6,58	7,10	11,48	5,09	0,00	1,06	0,55	2,4	3,8	34,95	33,87	100	91,84	8,16	0,84	1,56	0,07	0,14	1,29	2,51	0,11	1,18	0,20	0,10	0,22
	2	0,170	0	7,50	6,45	7,01	11,38	4,44	0,00	1,15	0,46	3,8	4,4	34,59	32,11	100	91,25	8,75	1,31	2,49	0,12	0,22	1,41	2,99	0,12	1,29	0,18	0,11	0,26
	3	0,148	0	7,50	6,38	7,08	11,81	4,73	0,00	1,15	0,44	3,8	4,0	31,97	29,88	100	92,34	7,66	1,21	2,59	0,10	0,22	1,20	2,80	0,09	1,10	0,13	0,09	0,24
0,9g/L	1	0,190	0	7,50	6,47	6,91	12,22	5,53	0,00	0,86	0,36	3,8	4,6	34,12	36,01	100	85,66	14,34	1,30	2,50	0,11	0,20	1,66	2,94	0,24	1,42	0,48	0,12	0,24
	2	0,137	0	7,50	6,46	6,88	11,81	7,05	0,00	0,78	0,33	3,8	4,8	33,93	37,22	100	85,66	14,34	1,29	2,51	0,11	0,21	1,79	3,01	0,26	1,53	0,57	0,13	0,26
	3	0,172	0	7,50	6,48	6,90	12,45	4,45	0,00	0,78	0,27	4,4	4,6	37,33	37,15	100	86,47	13,53	1,64	2,76	0,13	0,22	1,71	2,89	0,23	1,48	0,45	0,12	0,23
0,7g/L	1	0,160	0	7,50	6,32	7,40	12,76	5,85	0,00	0,66	0,04	4,0	6,2	33,81	44,81	100	84,05	15,95	1,35	2,65	0,11	0,21	2,78	3,42	0,44	2,34	0,71	0,18	0,27
	2	0,144	0	7,50	6,40	6,92	11,89	4,85	0,00	0,67	0,04	3,6	6,4	30,59	46,75	100	84,43	15,57	1,10	2,50	0,09	0,21	2,99	3,41	0,47	2,53	0,74	0,21	0,29
	3	0,124	0	7,50	6,38	6,75	11,98	4,95	0,00	0,64	0,12	3,4	6,6	28,06	46,19	100	84,41	15,59	0,95	2,45	0,08	0,20	3,05	3,55	0,48	2,57	0,92	0,21	0,30
0,3g/L	1	0,168	0	7,50	6,38	6,80	11,48	6,28	0,00	0,34	0,00	3,8	6,6	33,54	52,88	100	92,86	7,14	1,27	2,53	0,11	0,22	3,49	3,11	0,25	3,24	0,74	0,28	0,27
	2	0,187	0	7,50	6,40	6,71	12,22	6,26	0,00	0,35	0,00	3,2	6,6	28,69	48,76	100	92,87	7,13	0,85	2,35	0,07	0,19	3,22	3,38	0,23	2,99	0,65	0,24	0,28
	3	0,186	0	7,50	6,42	6,57	11,81	4,96	0,00	0,28	0,00	3,4	7,0	27,50	53,07	100	92,91	7,09	0,94	2,47	0,08	0,21	3,71	3,29	0,26	3,45	0,95	0,29	0,28
0,1g/L	1	0,198	0	7,50	6,40	6,60	12,76	4,13	0,00	0,15	0,00	3,6	6,6	31,73	51,39	100	97,62	2,38	1,14	2,46	0,09	0,19	3,39	3,21	0,08	3,31	0,52	0,26	0,25
	2	0,204	0	7,50	6,41	6,57	11,98	6,14	0,00	0,15	0,00	3,8	6,6	34,27	52,22	100	97,69	2,31	1,30	2,50	0,11	0,21	3,45	3,15	0,08	3,37	0,52	0,28	0,26
	3	0,206	0	7,50	6,42	6,65	12,45	4,37	0,00	0,27	0,00	3,4	6,8	72,62	46,56	100	98,11	1,89	2,47	0,93	0,20	0,07	3,17	3,63	0,06	3,11	0,22	0,25	0,29

Anexo II: Cultivos de *B. sacchari* LFM019, em frascos agitados, com diferentes concentrações de propionato.

ANEXO III. Resultados obtidos das amostras retiradas dos cultivos de *B. sacchari* LFM019 em reatores aerados e agitados mecanicamente, com xilose inicial de 10g/L e solução de alimentação a 100g/L. Vazão constante de 9mL/h.

Tempo	pH	CO ₂	O ₂	N ₂ (g/L)	Alimentação					PHA													
					Xilose meio (g/L)	xilose const. (g/L)	Xilose alim. (g/L)	Xilose cons. (g/L)	MSCda (g/l)	% da MSCda	3HB (mol%)	Massa PHA (g/L)	Massa resid. (g/L)	Y _{PHA/xil} (g/g)	Y _{PHA} (g/g)	MSC(l) (g/l)	% da MSC (l)	3HB (mol%)	Massa PHA (g/L)	Massa resid. (g/L)	Y _{PHA/xil} (g/g)	Y _{PHA} (g/g)	
0	6,98	0,13	20,89	0,50	10,235	0,000				1,20	7,81	100,00	0,09	1,11	0,07	0,86	1,20	6,42	100,00	0,08	1,12	0,06	0,87
13	6,97	0,59	20,54	0,48	8,945	1,290				2,10	8,57	100,00	0,18	1,92	0,05	0,50	2,10	8,64	100,00	0,18	1,92	0,05	0,50
17	6,95	0,89	20,22	0,21	6,396	3,839				3,90	7,72	100,00	0,30	3,60	0,04	0,47	3,80	7,29	100,00	0,28	3,52	0,04	0,46
21	7,07	1,33	19,79	0,00	2,525	7,710				4,70	7,45	100,00	0,35	4,35	0,04	0,47	4,80	8,63	100,00	0,41	4,39	0,04	0,47
23	7,06	1,58	19,56	0,00	0,893	9,342				5,80	19,74	100,00	1,14	4,66	0,12	0,48	5,80	19,21	100,00	1,11	4,69	0,11	0,48
25	7,02	1,18	20,13	0,00	0,438	9,797																	
27		1,00	20,27		0,082	10,153																	
29	7,01	0,83	20,44	0,00	0,066	10,169	0,000			6,80	30,32	100,00	2,06	4,74	0,20	0,47	7,00	29,16	100,00	2,04	4,96	0,20	0,49
35	7,02	0,62	20,62	0,00	0,148	11,505	1,500			7,40	32,49	100,00	2,40	5,00	0,21	0,43	7,40	36,53	100,00	2,70	4,70	0,23	0,41
39	6,98	0,59	20,63	0,00	0,412	12,441	2,700			7,60	38,79	100,00	2,95	4,65	0,24	0,37	7,60	38,40	100,00	2,92	4,68	0,23	0,38
43	6,98	0,55	20,65	0,00	0,822	13,231	3,900			7,80	42,46	100,00	3,31	4,49	0,25	0,34	8,00	41,22	100,00	3,30	4,70	0,25	0,36
47	6,98	0,49	20,70	0,00	1,168	14,085	5,100			8,40	36,82	100,00	3,09	5,31	0,22	0,38	8,40	42,64	100,00	3,58	4,82	0,25	0,34
52	6,98	0,44	20,75	0,00	2,236	14,517	6,600			8,40	45,64	100,00	3,83	4,57	0,26	0,31	8,40	45,93	100,00	3,86	4,54	0,27	0,31
57	6,98	0,42	20,77	0,00	3,244	15,009	8,100			8,40	47,61	100,00	4,00	4,40	0,27	0,29	8,80	45,43	100,00	4,00	4,80	0,27	0,32
61	6,98	0,40	20,76	0,00	4,137	15,316	9,300			8,80	44,37	100,00	3,90	4,90	0,25	0,32	9,00	43,49	100,00	3,91	5,09	0,26	0,33
67	6,98	0,40	20,75	0,00	5,143	16,110	11,100			8,80	46,60	100,00	4,10	4,70	0,25	0,29	9,00	45,08	100,00	4,06	4,94	0,25	0,31
72	6,97	0,38	20,68	0,00	6,163	16,590	12,600			9,00	45,84	100,00	4,13	4,87	0,25	0,29	9,20	43,74	100,00	4,02	5,18	0,24	0,31

Anexo III: cultivos de *B. sacchari* LFM019 em reatores aerados e agitados mecanicamente, com xilose inicial de 10g/L e solução de alimentação a 100g/L.

ANEXO IV. Resultados obtidos das amostras retiradas dos cultivos de *B. sacchari* LFM019 em reatores aerados e agitados mecanicamente, com xilose inicial de 10g/L e proporção de xilose:propionato da solução de alimentação em 10:1. Vazão constante de 9mL/h. (Primeira réplica).

Tempo	pH	CO ₂	O ₂	N ₂ (g/L)	Alimentação										PHA													
					Xilose meio (g/L)	xilose cons.T. (g/L)	Xilose alim. (g/L)	Xilose cons. (g/L)	Prop. alim. (g/L)	Prop. meio (g/L)	Prop. cons. (g/L)	MSC(a) (g/L)	% da MSC(a)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	Massa PHA (g/L)	Massa resid. (g/L)	Massa de HV (g/L)	Massa de HB (g/L)	Y _{PHV/prop} (g/g)	Y _{PHV} (g/g)	Y _{PHB} (g/g)						
0	6,98	0,14	20,88	0,44	10,689	0,000	0,000	0,000	0,900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,40	8,12	100,00	0,00	0,11	1,29	0,00	0,00	0,11	NR	0,23	2,56
13	6,97	0,86	20,26	0,32	10,187	0,502	2,198	0,000	2,90	0,000	0,000	0,120	7,40	31,84	97,67	2,33	3,48	7,61	100,00	0,00	0,22	2,68	0,00	0,22	0,11	NR	0,10	1,22
17	6,95	1,45	19,63	0,17	8,491	2,198	4,916	0,000	4,80	0,000	0,000	0,120	7,40	31,84	97,67	2,33	3,48	15,88	100,00	0,00	0,76	4,04	0,00	0,76	0,76	NR	0,16	0,82
21	7,07	1,37	19,9	0,13	5,773	4,916	6,888	0,000	5,90	0,000	0,000	0,600	8,80	25,23	100,00	0,00	1,49	25,23	100,00	0,00	1,49	4,41	0,00	1,49	1,49	NR	0,22	0,64
23	7,06	1,14	20,11	0,00	3,801	6,888	8,308	0,000	5,90	0,000	0,000	0,600	8,80	25,23	100,00	0,00	1,49	25,23	100,00	0,00	1,49	4,41	0,00	1,49	1,49	NR	0,22	0,64
24	7,06	0,76	20,47	0,00	0,000	9,525	0,900	0,000	0,000	0,000	0,000	0,072	7,00	33,41	98,63	1,37	2,34	33,41	98,63	1,37	2,34	4,66	0,03	2,31	2,31	0,45	0,24	0,49
27	7,06	0,75	20,48	0,00	0,200	10,828	1,500	1,303	7,40	0,000	0,120	0,120	7,40	31,84	97,67	2,33	2,36	31,84	97,67	2,33	2,36	5,04	0,05	2,30	2,30	0,46	0,21	0,47
29	7,07	0,64	20,59	0,00	0,580	14,041	5,100	4,516	8,00	0,408	0,000	0,408	8,00	43,56	93,88	6,17	3,48	43,56	93,88	6,17	3,48	4,52	0,22	3,27	3,27	0,53	0,23	0,32
35	7,06	0,54	20,63	0,00	0,930	14,896	6,300	5,371	3,60	0,504	0,000	0,504	3,60	43,81	93,58	6,42	1,58	43,81	93,58	6,42	1,58	2,02	0,10	1,48	0,20	0,20	0,10	0,14
39	7,06	0,46	20,72	0,00	1,410	15,611	7,500	6,086	8,80	0,600	0,000	0,600	8,80	44,64	92,64	7,36	3,93	44,64	92,64	7,36	3,93	4,87	0,29	3,64	0,48	0,23	0,31	0,31
43	7,07	0,46	20,72	0,00	2,140	16,085	8,700	6,560	8,60	0,696	0,000	0,696	8,60	43,70	91,15	8,85	3,76	43,70	91,15	8,85	3,76	4,84	0,33	3,43	0,48	0,48	0,21	0,30
47	6,98	0,41	20,75	0,00	3,000	16,723	10,200	7,198	8,60	0,816	0,000	0,816	8,60	48,14	89,67	10,33	4,14	48,14	89,67	10,33	4,14	4,46	0,43	3,71	0,52	0,22	0,27	0,27
52	6,99	0,41	20,75	0,00	4,260	16,970	11,700	7,445	8,80	0,936	0,000	0,936	8,80	44,87	88,92	11,08	3,95	44,87	88,92	11,08	3,95	4,85	0,44	3,51	0,47	0,21	0,29	0,29
57	6,99	0,38	20,76	0,00	5,090	17,337	12,900	7,812	8,80	1,032	0,000	1,032	8,80	47,73	87,65	12,35	4,20	47,73	87,65	12,35	4,20	4,60	0,52	3,68	0,50	0,21	0,27	0,27
61	6,98	0,38	20,73	0,00	6,440	17,781	14,700	8,256	8,20	1,176	0,000	1,176	8,20	48,61	86,03	13,97	3,99	48,61	86,03	13,97	3,99	4,21	0,56	3,43	0,47	0,19	0,24	0,24
67	6,99	0,21	20,74	0,00	7,620	18,108	16,200	8,583	8,40	1,296	0,000	1,296	8,40	46,24	86,87	13,13	3,88	46,24	86,87	13,13	3,88	4,52	0,51	3,37	0,39	0,19	0,25	0,25
72	6,97	0,11	20,82	0,00	7,620	18,108	16,200	8,583	8,40	1,296	0,000	1,296	8,40	46,24	86,87	13,13	3,88	46,24	86,87	13,13	3,88	4,52	0,51	3,37	0,39	0,19	0,25	0,25

Anexo IV: Cultivos de *B. sacchari* LFM019 em reatores aerados e agitados mecanicamente, com proporção de xilose:propionato da solução de alimentação em 10:1. (Primeira réplica).

