

Mestrado Integrado em Bioengenharia

*Expressão de genes de **Aeromonas sp.** e **Ralstonia eutropha** em **Burkholderia sacchari** mutante para a produção do copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato)*

Tese de Mestrado

de

Rafaela Rodrigues Tavares

Desenvolvida no âmbito da disciplina de Dissertação

realizado em

**Laboratório de Bioprodutos, Instituto de Ciências Biomédicas II,
Universidade de São Paulo**

Orientador na USP: **Prof^a. Dr^a. Luiziana Silva**

Orientador na FEUP: **Prof. Dr. Filipe Mergulhão**



julho de 2012

Agradecimentos

À Professora Doutora Luiziana Ferreira da Silva pela orientação e oportunidade de realização do presente projeto, pelo apoio e experiência adquirida.

Ao Professor Filipe Mergulhão pela oportunidade de realização do presente projeto.

Ao Professor Doutor José Gregório Cabrera Gomez pelo apoio e pelos conhecimentos transmitidos.

À Thatiane Mendonça pelo apoio durante a execução do projeto, pelo esclarecimento de dúvidas, pela experiência e pela amizade.

Aos meus colegas de Laboratório Juliano, Gabriela, Liege, Amanda, Kelly, Débora, Lucas, Daniela e Karinna por toda ajuda e paciência.

À minha família e amigos que me ajudaram a finalizar esta etapa da minha vida.

À Fundação de Apoio Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo pelo apoio financeiro (2010/51935-1).

Resumo

A indústria dos plásticos tem crescido nos últimos anos como resultado do aumento da população mundial, acarretando problemas ambientais inerentes à rejeição destes produtos. Neste sentido, torna-se necessário o desenvolvimento e a implementação de plásticos biodegradáveis, nomeadamente polihidroxialcanoatos (PHA), poliésteres acumulados por diversas bactérias. A variabilidade da composição monomérica de PHA determina as suas propriedades mecânicas e permite o seu uso em diversas aplicações. Esta diversidade, entre vários fatores, é controlada pela especificidade da enzima PHA sintase presente no microrganismo.

Neste contexto, com este trabalho pretendia-se criar linhagens recombinantes de *Burkholderia sacchari* que possibilitassem a otimização da produção do copolímero poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato).

Foram construídos recombinantes com genes do operão *pha* de *Aeromonas* sp. e *Ralstonia eutropha*, tendo sido utilizada uma linhagem de *B. sacchari* deficiente no acúmulo de PHA. Os recombinantes foram avaliados através de ensaios de acúmulo com glicose e ácido hexanóico como substratos. A clonagem destes genes possibilitou o restabelecimento da capacidade de síntese de PHA, verificando-se que a linhagem avaliada está mutada na PHA sintase.

Linhagens com o operão de *Aeromonas* sp. e com os genes *phaCJ* (PHA sintase e enoil-CoA hidratase) de *Aeromonas hydrophila* revelaram ser a melhor estratégia quando se pretende frações molares de 3-hidroxi hexanoato superiores (14.09 ± 0.34 e 7.84 ± 0.29 mol% respetivamente). A linhagem com o operão completo foi avaliada em biorreator, tendo-se obtido uma concentração celular de 15.94 g.L^{-1} , com 70.84% de PHA, com uma fração molar de 3-hidroxi hexanoato igual a 22.24 mol%. Por outro lado, a presença apenas do *phaJ* e *phaPC* (PHAsina e PHA sintase) não provocou uma alteração significativa no copolímero formado, comparativamente com a linhagem selvagem.

Os recombinantes com genes de *R. eutropha* demonstraram que a PHA sintase desta bactéria possui uma maior especificidade para monómeros de cadeia média, quando comparada com a da *B. sacchari*, tendo-se verificado um aumento da percentagem molar do monómero 3-hidroxi hexanoato no copolímero (de 1.76 ± 0.34 mol% para 5.34 ± 0.38 mol%).

Palavras-Chave: *Burkholderia sacchari*, poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato), *Aeromonas* sp., *Ralstonia eutropha*, operão *pha*.

Abstract

During the last decades, the plastics industry has grown considerably as a result of the growth of world population, causing major environmental problems inherent to its rejection. Accordingly, it is necessary to develop and implement biodegradable plastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHA), polyesters accumulated by several bacteria. The variability of the monomer composition of PHA determines their mechanical properties and enables its use in several applications. This diversity, among various factors, is controlled by the specificity of the enzyme PHA synthase present in the microorganism.

Therefore, the aim of this study was to create recombinant strains of *Burkholderia sacchari* that would enable the optimization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) production.

Recombinants harbouring genes from *pha* operon of *Aeromonas* sp. and *Ralstonia eutropha* were constructed. It was used an UV mutant strain of *B. sacchari* lacking the ability to accumulate PHA. The recombinants were evaluated in shake flasks under accumulation conditions with glucose and hexanoic acid as substrates. The ability to synthesize PHA was restored in all recombinants, in that it was verified that the mutant strain was affected on the PHA synthase gene.

Strains with the entire operon from *Aeromonas* sp. and the genes *phaCJ* (PHA synthase and enoyl-CoA hydratase) from *Aeromonas hydrophila* revealed to be the best strategy when the objective is to produce copolymers with higher molar fractions of 3-hydroxyhexanoate (14.09 ± 0.34 and 7.84 ± 0.29 mol% respectively). The strain harbouring the whole operon was evaluated in bioreactor, yielding a total cell dry weight of 15.94 g.L^{-1} , containing 70.84% of PHA with a molar fraction of 3-hydroxyhexanoate equal to 22.24 mol%. Moreover, the presence of *phaJ* alone and *phaPC* (PHAsina and PHA synthase) had no significant effect on the copolymer composition, when compared with the wild type strain.

The recombinant strains containing genes from *R. eutropha* shown that PHA synthase of this bacterium has greater specificity for medium chain length monomers when compared to *B. sacchari*, since there was an increase in the molar fraction of 3-hydroxyhexanoate in the copolymer (1.76 ± 0.34 mol% to 5.34 ± 0.38 mol%).

Key words: *Burkholderia sacchari*, poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate), *Aeromonas* sp., *Ralstonia eutropha*, operon *pha*.

Lista de Abreviaturas

- 3HB** – 3-hidroxibutirato.
- 3HD** - 3-hidroxidecanoato.
- 3HDD** – 3-hidroxidodecanoato.
- 3HHp** – 3-hidroxiheptanoato.
- 3HO** - 3-hidroxi octanoato.
- 3HHx** – 3-hidroxi hexanoato.
- ACP** - proteína transportadora de acila, do inglês *Acyl Carrier Protein*.
- Amp^s** – sensibilidade à ampicilina.
- CG** - cromatografia gasosa.
- DO** – densidade ótica.
- FabD** - malonil-CoA-ACP transacilase.
- FabG** - 3-cetoacil-ACP redutase.
- HA** - hidroxialcanoil-CoA.
- HPLC** - cromatografia líquida, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*
- Hx⁻** - ausência de crescimento em ácido hexanóico.
- IPTG** - Isopropil-tio-β-D-galactosídeo.
- Kan^r** – resistência à canamicina.
- Kan^s** – sensibilidade à canamicina.
- LB** - Luria Bertani.
- LCL** - polímeros com monómeros de cadeia longa, do inglês *Long Chain Length*.
- LFM** - Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP.
- MCL** - polímeros com monómeros de cadeia média, do inglês *Medium Chain Length*.
- MM** - meio mineral.
- MSC** - massa seca celular.
- MT** - massa do tubo.
- MTL** - massa do tubo utilizado e do liofilizado obtido.
- P(3HB)** – poli(3-hidroxibutirato).
- P(3HB-co-3HA)** - poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxialcanoato).
- P(3HB-co-3HHx)** – poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi hexanoato).
-

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

P(3HB-co-4HB) - poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato).

P(3HHx) – poli(3-hidroxihexanoato).

PHA – polihidroxialcanoato.

PHA⁺ - acúmulo de PHA.

PHA⁻ - ausência de acúmulo de PHA.

PhaA - β -cetotiolase.

PhaB - acetoacetyl-CoA redutase.

PhaC - PHA sintase.

PhaG - (R)-3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilase.

PhaJ - enoil-CoA hidratase (R) específica.

PhaP – PHAsina.

PhaZ – PHA despolimerase.

Sac⁺ - crescimento em sacarose.

SCL - polímeros com monómeros de cadeia curta, do inglês *Short Chain Length*.

Tc^s – sensibilidade à tetraciclina;

T_G - temperatura de transição vítrea.

T_M – temperatura de fusão.

V - volume de suspensão centrifugada.

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

YafH - acil-CoA desidrogenase.

Índice

Introdução	1
Objetivo.....	4
Estado da Arte	5
Plásticos.....	5
Polihidroxialcanoatos.....	8
P(3HB-co-3HHx)	14
Metabolismo de PHA.....	18
Enzimas envolvidas na síntese de PHA.....	18
Vias metabólicas	20
Processo de Produção de PHA	24
O género <i>Aeromonas</i>	27
<i>Burkholderia sacchari</i>	29
Materiais e Métodos	32
Linhagens Bacterianas e Plasmídeos	32
Construção de Recombinantes	33
Avaliação do Mutante <i>B. sacchari</i> LFM344	35
Ensaio de Acúmulo de PHA.....	35
Metodologias Analíticas.....	36
Resultados e Discussão.....	37
Avaliação da <i>B. sacchari</i> LFM344	38
Clonagem molecular – obtenção de recombinantes.....	39
Ensaio de acúmulo de PHA	44
Conclusões e Perspetivas Futuras	56
Referências Bibliográficas	60
Anexos	i
A – Meios de Cultura.....	i
B – Tampões.....	ii

C – Transformação e Conjugação	iii
D – Determinação de Açúcares e Ácidos Orgânicos.....	iv
E – Determinação de PHA	v
F – Plasmídeos.....	vi
G – Sequenciamento e Alinhamento	vii

Índice de Figuras

No texto principal:

- Figura 1 - Estrutura geral de PHA, n varia de 600 a 35000, R pode possuir até 13 carbonos, ser uma cadeia ramificada, possuir grupos aromáticos, cadeias cíclicas, átomos de cloro, flúor ou azoto R= hidrogénio, poli(3-hidroxi-*propionato*); R= metil, poli(3-hidroxi-*butirato*); R= etil, poli(3-hidroxi-*valerato*); R= propil, poli(3-hidroxi-*hexanoato*); R= pentil, poli(3-hidroxi-*octanoato*); R= nonil, poli(3-hidroxi-*dodecanoato*) (adaptado de Khanna e Srivastava, 2005). 8
- Figura 2 - Representação dos grânulos de PHA presentes em células recombinantes de *R. eutropha* (microscopia de transmissão eletrónica) (adaptado de Sudesh *et al.*, 2000). 9
- Figura 3 - Vias metabólicas para a formação de PHA (Via I – biossíntese a partir de hidratos de carbono; Via II – β -oxidação de ácidos gordos; PhaJ – enoil-CoA hidratase; PhaG - 3-cetoacil-ACP redutase; Via III – síntese *de novo* de ácidos gordos; PhaG - (R)-3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilase; PhaD - malonil-CoA-ACP transacilase) (adaptado de Sudesh *et al.*, 2000; Tsuge, 2002; Luengo *et al.*, 2003). 21
- Figura 4 - Teste de acúmulo para recombinantes de *B. sacchari* LFM344 com genes de *R. eutropha*: *phaC*, *phaCB*, *phaB* e *phaCAB*. Linhagem selvagem, *B. sacchari* LFM101, como controlo positivo. 38
- Figura 5 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8%:1-produto de PCR para o operão de *A. hydrophila*. 39
- Figura 6 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% de clones de *E. coli* XL1Blue abrigando genes de *Aeromonas* TSM81: 1-produto de PCR *phaPCJ*; 2-pBBR1MCS-2; 3- pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*; 4-pBBR1MCS-2::*phaPCJ*; 5-pBBR1MCS-2::*phaPCJ* digerido com *HindIII*; 6-pBBR1MCS-2::*phaPCJ* digerido com *HindIII* e *KpnI*. 41
- Figura 7 – Perfil de migração em gel de agarose 0.8% para os clones de *E. coli* XL1Blue abrigando genes de *A. hydrophila*: 1-pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*; 2 e 3-pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *Sall* e *XbaI*; 4-produto de PCR *phaC*; 5-pBBR1MCS-2::*phaJ* digerido com *Sall*; 6-pBBR1MCS-2::*phaJ* digerido com *Sall* e *EcoRI*; 7-produto de PCR *phaJ*; 8-pBBR1MCS-2::*phaCJ* digerido com *EcoRI*; 9-pBBR1MCS-2::*phaCJ* digerido com *EcoRI* e *Sall*; 10-produto de PCR *phaCJ*; 11-pBBR1MCS-2::*phaPC* digerido com *HindIII*; 12-pBBR1MCS-2::*phaPC* digerido com *HindIII* e *XbaI*; 13-produto de PCR *phaPC*. 41
- Figura 8 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% dos clones de *B. sacchari* com genes de *Aeromonas* TSM81: 1 - produto de PCR operão - controlo positivo; 2 - PCR de clone de *B. sacchari*. 42
- Figura 9 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% dos clones de *B. sacchari* com genes de *A. hydrophila*: 1, 3, 5 e 7 - produtos de PCR de *phaC*, *phaJ*, *phaCJ* e *phaPC* respetivamente - controlos positivos; 2, 4, 6 e 8 - PCR de clone de *B. sacchari* abrigando *phaC*, *phaJ*, *phaCJ* e *phaPC* respetivamente. 43
- Figura 10 - Representação gráfica do PHA total produzido pelos diferentes recombinantes de *B. sacchari*. 48
- Figura 11 - Representação gráfica da percentagem molar de 3HHx obtida para as linhagens recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose e ácido hexanóico. 54

Em anexo:

Figura A 1 - Esquema genérico dos plasmídeos construídos.	vi
Figura A 2 – Resultado do alinhamento da sequência <i>phaPC_forward</i>	vii
Figura A 3 - Resultado do alinhamento da sequência <i>phaPC_reverse</i>	viii
Figura A 4 - Resultado do alinhamento da sequência <i>phaCJ_forward</i>	ix
Figura A 5 - Resultado do alinhamento da sequência <i>phaCJ_reverse</i>	x

Índice de Tabelas

No texto principal:

Tabela 1 - Propriedades físicas e térmicas de polímeros.....	11
Tabela 2 - Resultados obtidos da síntese do copolímero P(3HB-co-3HHx) em diferentes bactérias.	16
Tabela 3 - Classes de PHA sintases (Sudesh <i>et al.</i> , 2000; Rehm, 2003; Ojumu <i>et al.</i> , 2004; Suriyamongkol <i>et al.</i> , 2007; Amara, 2008; Park <i>et al.</i> , 2011).	19
Tabela 4 - Resultados obtidos em estudos envolvendo espécies de <i>Aeromonas</i> ou espécies recombinantes com genes de <i>Aeromonas</i> para a produção de PHA.....	28
Tabela 5 - Bactérias e plasmídeos utilizados no presente trabalho.	32
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos diferentes genes de <i>A. hydrophila</i>	33
Tabela 7 - Ciclos de PCR.	34
Tabela 8 - Resultados de glicose e ácido hexanóico para as diferentes linhagens de <i>B. sacchari</i> para amostras de 0 e 24 horas de ensaio.....	45
Tabela 9 - Produção de PHA por linhagens de <i>B. sacchari</i> recombinantes a partir de glicose e ácido hexanóico.	46

Introdução

A atualidade é caracterizada pelo desenvolvimento e criação de novos produtos e materiais que satisfaçam as novas exigências dos consumidores, considerando os seus impactos na sociedade e ambiente, ou seja, tendo em mente a sustentabilidade. No entanto, o aumento dos aterros sanitários, alterações climáticas devido à presença de gases de efeito de estufa e o uso indiscriminado dos recursos não renováveis são alguns exemplos dos vários desafios que o Homem tem de enfrentar e solucionar. Este processo engloba a tomada de medidas de modificação e otimização de métodos já implementados e o desenvolvimento de novos com vista à redução dos perigos para Homem e ambiente (Madigan *et al.*, 2009).

Neste contexto, a biotecnologia, aliando os microrganismos à realidade atual, tem recebido muita atenção. Os microrganismos têm um papel importante na geração de uma elevada variedade de produtos e apresentam uma grande gama de aplicações em diferentes áreas, particularmente na indústria alimentar e farmacêutica. Além disso, avanços nos processos de produção microbiana têm levado ao desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas para substituir os métodos químicos convencionais (Madigan *et al.*, 2009). A indústria de plásticos é um exemplo onde a biotecnologia tem ganho importância, tanto na criação de novas propriedades como na redução dos impactos negativos que esta indústria acarreta (Shah *et al.*, 2008).

Os plásticos, compostos com elevada importância para as atividades do homem, representam uma elevada percentagem dos resíduos sólidos que ficam acumulados no ambiente (Leejarkpai *et al.*, 2011). A vasta aplicação de plásticos oriundos do petróleo (plásticos sintéticos) não se deve apenas às suas propriedades térmicas e mecânicas, mas principalmente devido à sua estabilidade e durabilidade, o que os torna de difícil degradação. Além disso, alguns são difíceis de reciclar devido ao elevado grau de contaminação biológica. A sua acumulação conduz, portanto, a problemas ambientais e à necessidade de implementação de regulamentos mais rígidos com o intuito de reduzir a quantidade gerada (Khanna e Srivastava, 2005; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009; Leejarkpai *et al.*, 2011).

Neste sentido, nas últimas décadas tem-se apostado na modificação dos plásticos existentes, melhorando a sua degradabilidade, e/ou no desenvolvimento de novos plásticos degradáveis (biodegradação, fotodegradação e degradação térmica), com funções semelhantes aos de origem petroquímica. A produção de plásticos biodegradáveis, ou os chamados bioplásticos, tem sido investigada tanto a partir de fontes naturais renováveis como através de processos microbiológicos (Shah *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2009; Leejarkpai *et al.*, 2011).

A aplicação de plásticos biodegradáveis permite reduzir o impacto destes produtos no ambiente tanto a nível da poluição gerada como a nível das reservas de combustíveis fósseis (Song *et al.*, 2009; Álvarez-Chávez *et al.*, 2012), visto que cerca de 8% destes recursos são usados para a produção de plásticos (Hopewell *et al.*, 2009).

Na última década, alguns plásticos biodegradáveis já foram introduzidos no mercado, tais como o ácido poliláctico, polihidroxialcanoatos, poliésteres alifáticos, entre outros (Shah *et al.*, 2008; Álvarez-Chávez *et al.*, 2012). As suas aplicações englobam fibras, filmes, embalagens, brinquedos e tintas. Contudo, é de salientar que os bioplásticos ainda não são amplamente utilizados devido aos elevados custos de produção, a limitações na performance e à difícil degradação em aterros sanitários (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012).

Dentro dos bioplásticos destacam-se os polihidroxialcanoatos (PHA), um polímero biodegradável, biocompatível e, dependendo da sua estrutura, com características semelhantes a vários polímeros de origem petroquímica, emergindo assim como uma alternativa promissora (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008; Khoo *et al.*, 2010). O interesse nestes compostos é elevado, na medida em que, atualmente, já são aplicados em materiais de embalagem, equipamentos médicos e na agricultura como substituinte de polímeros sintéticos (Shah *et al.*, 2008). Apesar dos elevados custos de produção inerentes ao seu processo de formação, a sua aplicação como item de valor acrescentado, tem sofrido uma expansão significativa. Desta forma, a tendência reside no desenvolvimento de novos processos mais eficientes e rentáveis, quer a nível da sua produção, como a nível da sua purificação e melhoramento das suas propriedades (Keshavarz e Roy, 2010).

PHA são naturalmente sintetizados por várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, já tendo sido identificadas mais de 300 espécies produtoras. Estas incluem *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas putida*, *Pseudomonas oleovorans*), *Bacillus* sp., e *Methylobacterium* sp. (*Methylobacterium extorquens*). A escolha do hospedeiro para produção industrial destes polímeros depende de vários fatores como o custo do meio e a capacidade da célula para usar fontes de carbono baratas, produtividade e qualidade do PHA sintetizado, bem como o processo de *downstream* (Khanna e Srivastava, 2005; Chanprateep, 2010).

Apesar do elevado número de organismos capazes de sintetizar estes polímeros, apenas uma pequena fração é capaz de produzir polímero suficiente para aplicação à escala industrial. Desta forma, várias estratégias têm sido analisadas para o aumento da produtividade destes polímeros, tanto a partir do uso de fontes de carbono baratas, como a partir do desenvolvimento de técnicas de engenharia genética e metabólica na criação de linhagens recombinantes, como por exemplo

Escherichia coli (Park e Lee, 2004; Khanna e Srivastava, 2005; Qiu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Chanprateep, 2010).

A ampla diversidade de monómeros possibilita a formação de vários polímeros com diferentes propriedades físicas, o que permite ultrapassar as limitações inerentes ao polímero mais estudado, o poli(3-hidroxi-*butirato*), P(3HB). PHA constituídos por uma fração de monómeros de cadeias mais longas possuem propriedades elásticas, podendo ser aplicados a uma maior variedade de produtos (Suriyamongkol *et al.*, 2007). Um copolímero que tem recebido mais atenção é o P(3HB-*co-3HHx*), formado por monómeros de 3-hidroxi-*butirato* e 3-hidroxi-*hexanoato*, P(3HHx), como resultado das suas propriedades elastómeras que variam com a percentagem de monómeros 3HHx presente no polímero (Philip *et al.*, 2007). Este copolímero possui várias aplicações médicas e apresenta propriedades mecânicas próximas do polietileno de baixa densidade (Sudesh *et al.*, 2000).

O género *Aeromonas* tem-se destacado na produção deste copolímero, na medida em que vários estudos já se encontram publicados (Doi *et al.*, 1995; Kichise *et al.*, 1999; Taguchi *et al.*, 1999; Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003; Tsuge *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). A bactéria *Aeromonas caviae* demonstrou capacidade de produção de P(3HB-*co-3HHx*) contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx com óleos vegetais ou ácidos gordos como substratos (Doi *et al.*, 1995). Do mesmo modo, a *Aeromonas hydrophila* também evidenciou capacidade para produzir um polímero de composição semelhante (Lee *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001). No entanto, estas bactérias acumulam pouco PHA, pelo que uma estratégia de otimização da produção deste copolímero passa pela clonagem dos genes responsáveis pela biossíntese de PHA presentes neste género em bactérias que manifestem elevada capacidade de acúmulo.

No Brasil, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de estudar a síntese de PHA e assim desenvolver processos mais eficientes e aplicáveis a nível industrial. Várias abordagens têm sido seguidas: identificação e caracterização de bactérias produtoras de PHA (Rodrigues *et al.*, 1995; Gomez *et al.*, 1996; Gomez *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2002); análise do metabolismo de síntese de PHA a partir de diferentes substratos e criação de linhagens recombinantes (Gomez, 2000; Silva *et al.*, 2000; Brämer *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004) e avaliação do processo de produção e *downstream* (Tavares *et al.*, 2004; Kapritchkoff *et al.*, 2006).

Num estudo recente realizado, *Burkholderia sacchari*, uma nova espécie isolada de uma amostra de solo de plantação de cana-de-açúcar, demonstrou capacidade de produção do copolímero P(3HB-*co-3HHx*), contudo, com teores de apenas 2 mol% de 3HHx, a partir de glicose e ácido hexanóico, apesar de acumular grandes quantidades de PHA. Além disso, esta bactéria possibilita o controlo da fração molar de 3HHx a partir da variação da concentração dos

substratos (Mendonça, 2010). Face a estes resultados, o presente trabalho pretende produzir copolímeros de PHA com diferentes teores de 3HHx através da criação de recombinantes de *B. sacchari* com genes de *Aeromonas sp.* envolvidos na síntese de PHA.

Objetivo

O aumento da produção de plásticos como resposta às necessidades da população crescente tem conduzido à sua acumulação, o que acarreta problemas ambientais devido à sua longa durabilidade (Shah *et al.*, 2008).

Neste sentido, a importância do presente trabalho reside no desenvolvimento de linhagens recombinantes com uma maior capacidade para sintetizar o copolímero P(3HB-co-3HHx), um polímero biodegradável. Deste modo, pretendia-se criar linhagens de *B. sacchari* recombinantes e avaliar a sua capacidade para a produção de PHA. Para isso, numa primeira fase, foram aplicadas técnicas de clonagem molecular, tendo-se isolado genes de síntese de PHA de *Aeromonas sp.* e realizado a sua inserção, na forma isolada ou em diferentes combinações, em plasmídeos predefinidos para posterior clonagem por conjugação em *B. sacchari*. A avaliação dos recombinantes foi realizada através de experimentos em frascos agitados, analisando a composição do polímero obtido, bem como a eficiência dos recombinantes na produção do polímero alvo. A escolha dos métodos foi baseada em trabalhos anteriores e métodos padrão existentes na literatura.

Adicionalmente, foram avaliados recombinantes de *B. sacchari* com genes de *R. eutropha* como referência para as linhagens recombinantes com genes de *Aeromonas sp.*.

Seguindo esta estratégia era expectável obter-se recombinantes que produzissem copolímeros com percentagens molar superior a 2 mol%, obtida para a estirpe selvagem (Mendonça, 2010), tal como se verificou em Chee *et al.* (2012) para *Burkholderia sp.*. Na literatura não existem mais trabalhos publicados acerca da produção de P(3HB-co-3HHx) em *Burkholderia sp.* recombinante com genes de *Aeromonas*, na medida em que o presente trabalho evidencia-se não só pela sua vertente sustentável como pela sua inovação.

Estado da Arte

Plásticos

A indústria de plásticos tem sofrido um desenvolvimento considerável desde o aparecimento do primeiro produto em 1839 (Goodyear inventou a borracha vulcanizada). O primeiro produto a entrar no mercado foi o baquelite, um polímero sintético produzido por um químico, em 1907 (Thompson *et al.*, 2009). A partir dessa altura, a produção de plásticos sofreu uma elevada expansão, na medida em que, em 2010, a produção mundial atingiu 265 milhões de toneladas, com um crescimento anual de 5% (PlasticsEurope, 2011). Este grande sucesso resulta das propriedades físicas e químicas dos plásticos que os tornam materiais versáteis e essenciais para a sociedade atual (Amara, 2008; Siracusa *et al.*, 2008; Andrady e Neal, 2009). Porém, por outro lado, representam uma fonte de poluição e contribuem para a diminuição dos recursos não renováveis naturais, a sua principal matéria-prima (Siracusa *et al.*, 2008; Álvarez-Chávez *et al.*, 2012).

Os plásticos são polímeros leves, fortes, resistentes a químicos e à luz, possuem uma razão força-peso elevada e podem ser usados sobre diferentes condições de temperatura, além de apresentarem um custo baixo e a sua produção ser relativamente fácil (Shah *et al.*, 2008; Siracusa *et al.*, 2008; Andrady e Neal, 2009; Hopewell *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2009).

Consequentemente, os plásticos estão presentes em vários aspetos da vida diária, nos transportes, telecomunicações, vestuário, material de embalagem e calçado (Thompson *et al.*, 2009), sendo de realçar a sua aplicação em embalagens de alimentos e água potável, pois além de contribuir para a segurança e saúde do consumidor, possibilita a redução do consumo de energia dos combustíveis fósseis e emissão de CO₂ (Andrady e Neal, 2009; Thompson *et al.*, 2009).

Estes polímeros podem ser formados a partir de qualquer matéria-prima que contenha carbono e hidrogénio, como por exemplo fontes renováveis como açúcar e milho, contudo, hoje em dia, os plásticos são produzidos maioritariamente a partir de combustíveis fósseis (Andrady e Neal, 2009). Os plásticos usados em grande volume (*comodities*), os de origem petroquímica, englobam: o polipropileno, um termoplástico com aplicações na indústria alimentar e embalagem, o polietileno usado na formação de filmes plásticos, o poliestireno utilizado para proteger material eletrónico, o

policloreto de vinila aplicado em edifícios e mobiliário e o polietileno terftalato, entre outros exemplos (Shah *et al.*, 2008; Siracusa *et al.*, 2008; Andrady e Neal, 2009).

Numa perspetiva mais ampla e considerando todos os tipos de plásticos, estes podem ser divididos em diferentes categorias, dependendo das características que apresentam (Andrady e Neal, 2009). Os bioplásticos, por exemplo, são polímeros produzidos a partir de fontes renováveis que, após a sua utilização são biodegradáveis e compostáveis, para depois de degradados serem utilizados como fertilizantes (Shah *et al.*, 2008).

Os bioplásticos podem ser classificados em 4 grupos: os produzidos por organismos (amido, celulose); os formados a partir da polimerização de materiais ou monómeros existentes na natureza (politrimetileno glicol); os que apresentam uma mistura de monómeros com origem em fontes renováveis e compostos petroquímicos e, por último, os produzidos a partir da mistura de materiais renováveis e petroquímicos (amido e álcool polivinil) (Chanprateep, 2010).

No entanto, o produto final, além do polímero, tem, na sua constituição, aditivos para melhorar as características dos materiais. Estes aditivos englobam filtros inorgânicos para reforçar o plástico, estabilizadores térmicos e de UV para prevenir a sua degradação, compostos para retardar ou impedir combustão, entre outros materiais para moldar a imagem e perceção do produto final (corantes, por exemplo) (Siracusa *et al.*, 2008; Andrady e Neal, 2009).

Embora os plásticos representem vários benefícios para a sociedade, a sua produção, uso e rejeição ainda não são efetuados de modo sustentável, representando um problema para a sociedade e meio ambiente (Ren, 2003; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009). Enquanto a durabilidade dos plásticos possibilita a sua aplicação em várias áreas, acarreta igualmente problemas ecológicos quando o material é rejeitado. A sua degradação pode ser biológica (aeróbia ou anaeróbia), dependente da presença de microrganismos, ou ambiental, decorrente de fatores físicos (temperatura, humidade) (Siracusa *et al.*, 2008; Hopewell *et al.*, 2009), demorando meses para plásticos biodegradáveis e períodos mais elevados para plásticos convencionais (Ojumu *et al.*, 2004; Andrady e Neal, 2009). A biodegradação destes compostos é dificultada pelo seu elevado peso molecular e pela ausência de estruturas enzimáticas adequadas para a quebra das estruturas químicas presentes nos polímeros (Shah *et al.*, 2008). A sua acumulação pode levar à contaminação das águas e alguns compostos utilizados na sua

produção podem provocar efeitos adversos na população (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2009). Além disso, a sua combustão produz poluentes tóxicos como dioxinas e furanos (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008).

Deste modo, é necessária a implementação de medidas de prevenção que permitam a redução da quantidade de resíduos que entra nos ecossistemas. A reciclagem é a primeira e mais frequente medida aplicada e, além de diminuir a carga de resíduos, permite a reutilização do material e a redução do consumo da matéria-prima (Ren, 2003; Hopewell *et al.*, 2009). Contudo, a contaminação dos plásticos com alimentos e material biológico torna-se um problema para a reciclagem, tornando-a impraticável em alguns casos e economicamente não viável (Siracusa *et al.*, 2008). Outra abordagem é a substituição dos polímeros convencionais por biodegradáveis (Ren, 2003). Estes últimos, apesar de já serem produzidos à escala industrial, são mais caros e representam apenas cerca de 1% da produção de plásticos. Além disso, a degradação destes plásticos é ainda demorada e pode criar emissões de metano, de modo que o tratamento destes materiais requer um sistema de controlo apropriado (Thompson *et al.*, 2009). A biodegradação é fortemente dependente de fatores como as características do polímero, tipo de microrganismo e o pré-tratamento efetuado (Shah *et al.*, 2008), pelo que a determinação das condições ideais para a biodegradação destes materiais é essencial para o sucesso destes produtos no mercado.

Não obstante, vários investigadores e empresas continuam a apostar no desenvolvimento de bioplásticos de forma que, nos próximos anos, estima-se que estes representem uma maior percentagem do mercado dos plásticos (Siracusa *et al.*, 2008).

Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos são poliésteres produzidos por microrganismos com características biodegradáveis, biocompatíveis e compostáveis. Estes biopolímeros são considerados uma alternativa “verde” aos polímeros provenientes dos combustíveis fósseis. A biossíntese de PHA ocorre, usualmente, em condições de limitação de algum nutriente essencial (N, P, Mg, Fe, entre outros) e na presença de fonte de carbono em excesso, representando uma reserva de carbono e energia para a célula, constituindo até cerca de 80% da massa seca celular (MSC) (Lee *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2003; Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003; Ojumu *et al.*, 2004; Khanna e Srivastava, 2005; Silva *et al.*, 2007; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Verlinden *et al.*, 2007; Chanprateep, 2010; Park *et al.*, 2011). Por outro lado, algumas espécies como *Alcaligenes latus* produzem PHA sob condições não limitantes (Khanna e Srivastava, 2005). Adicionalmente, os polímeros de PHA apresentam funções putativas como interferentes nos canais de cálcio e no transporte de DNA e protetores de degradação de macromoléculas quando se liga a estas (Anderson e Dawes, 1990; Reddy *et al.*, 2003).

Estes compostos são constituídos por ácidos 3-, 4-, 5- e 6-hidroxicarboxílicos com configuração (*R*), onde cada monômero forma uma ligação éster com o grupo hidroxilo de outro monômero. Os polímeros podem possuir cadeias saturadas e insaturadas e alguns apresentam grupos aromáticos e alifáticos (Amara, 2008). O seu peso molecular varia entre 2×10^5 e 3×10^6 daltons, dependendo do tipo de hospedeiro e condições de crescimento (Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Amara, 2008). Na Figura 1 está representada a estrutura geral de um PHA.

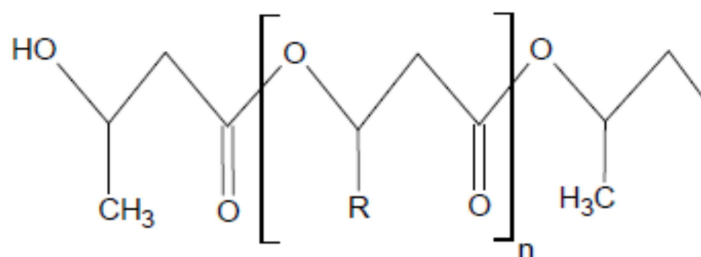


Figura 1 - Estrutura geral de PHA, n varia de 600 a 35000, R pode possuir até 13 carbonos, ser uma cadeia ramificada, possuir grupos aromáticos, cadeias cíclicas, átomos de cloro, flúor ou azoto R= hidrogénio, poli(3-hidroxipropionato); R= metil, poli(3-hidroxibutirato); R= etil, poli(3-hidroxivalerato); R= propil, poli(3-hidroxihexanoato); R= pentil, poli(3-hidroxi octanoato); R= nonil, poli(3-hidroxidodecanoato) (adaptado de Khanna e Srivastava, 2005).

O acúmulo destes compostos nas células ocorre no citoplasma e verifica-se através da formação de grânulos amorfos e insolúveis (Figura 2), com diferentes tamanhos (0.2 a 0.5 μm) e em diferente número de acordo com a espécie produtora (Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Amara, 2008). A polimerização dos intermediários solúveis em compostos insolúveis impede a sua perda e alterações osmóticas e permite a baixa manutenção de fontes de nutrientes (Madison e Huisman, 1999).

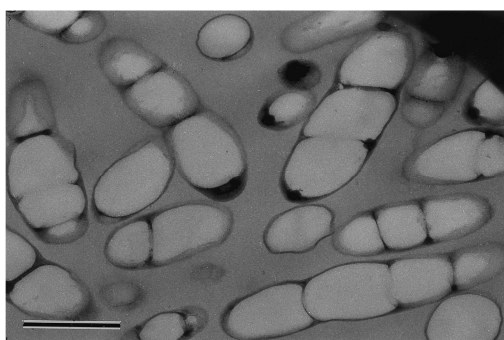


Figura 2 - Representação dos grânulos de PHA presentes em células recombinantes de *R. eutropha* (microscopia de transmissão eletrônica) (adaptado de Sudesh *et al.*, 2000).

Normalmente, estas inclusões são hidrofóbicas com uma membrana de fosfolípidos e apresentam, ao seu redor, proteínas envolvidas no metabolismo de PHA (despolimerases, PHAsinas e PHA sintases) (Sudesh *et al.*, 2000; Luengo *et al.*, 2003; Rehm, 2010). Além disso, a presença de 5 a 10% de água nos grânulos sugere que esta forma pontes de hidrogénio com grupos carbonil, criando pseudo cross-linking entre cadeias de polímeros adjacentes (Sudesh *et al.*, 2000). É de salientar que, após rutura celular e extração do polímero, a sua cristalização ocorre rapidamente através de um mecanismo de nucleação cinética. Isto sugere que a camada de fosfolípidos protege o polímero do contacto com elevadas quantidades de água (Khanna e Srivastava, 2005).

Estes polímeros podem ser termoplásticos ou elastómeros, com temperaturas de fusão entre os 40 e 180°C e cristalinidade entre 30 a 70%, dependendo dos monómeros que os constituem (Siracusa *et al.*, 2008; Rehm, 2010).

O polihidroxibutirato é um dos mais estudados, principalmente devido ao facto de ter sido o primeiro a ser descoberto (Ojumu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011). Nos anos 20, o microbiologista Maurice Lemoigne descobriu este composto em grânulos na bactéria Gram-positiva *Bacillus megaterium* e apenas anos mais tarde foram encontrados outros

polímeros (Lee *et al.*, 1999; Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Philip *et al.*, 2007; Keshavarz e Roy, 2010). A bactéria *R. eutropha*, uma Gram-negativa conhecida pela elevada produtividade em PHA, acumula P(3HB) até cerca de 80% do peso seco celular, a partir de diversas fontes de carbono (açúcares, ácidos orgânicos, óleos vegetais) (Tsuge, 2002; Khanna e Srivastava, 2005).

P(3HB) possui características semelhantes ao polipropileno, no entanto a sua aplicabilidade é restringida às suas propriedades rígidas (alongamento para ruptura de 5%) e à elevada temperatura de fusão (entre os 170 e 180°C). Contudo, a copolimerização de 3HB com outros monómeros possibilita obter polímeros com flexibilidade superior e temperaturas de fusão menores, ou seja, com características mais próximas dos plásticos sintéticos (Ojumu *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2011).

Até hoje, mais de 150 monómeros foram identificados como compostos integrantes da família de PHA, na medida em que estes podem ser divididos em três grupos: polímeros com monómeros de cadeia curta, SLC (do inglês *short chain length*), monómeros de cadeia média, MCL (do inglês *medium chain length*) e monómeros de cadeia longa, LCL (do inglês *long chain length*) (Rehm e Steinbüchel, 2005; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Amara, 2008). Os primeiros constituem polímeros com monómeros com 3 a 5 átomos de carbono e apresentam propriedades termoplásticas semelhantes ao polipropileno. Por outro lado, os polímeros pertencentes ao grupo MCL possuem monómeros com 6 a 14 átomos de carbono e são caracterizados por propriedades elásticas como borrachas e elastómeros (Ojumu *et al.*, 2004; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011). Por último, os monómeros LCL possuem mais de 14 átomos de carbono (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Estes polímeros podem ser sintetizados na forma de homopolímeros, caracterizados pela repetição de apenas uma unidade monomérica, copolímeros, duas unidades, ou mesmo terpolímeros com três unidades monoméricas diferentes. O aumento do peso molecular por incorporação de outros grupos hidroxilo melhora a cristalinidade, rigidez, temperatura de fusão e resistência (Khanna e Srivastava, 2005). Dentro dos copolímeros destacam-se: o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), P(3HB-co-3HV), o poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato), P(3HB-co-4HB), o P(3HB-co-3HHx) e o poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxiálcanoato), P(3HB-co-3HA) (Suriyamongkol *et al.*, 2007; Verlinden *et al.*, 2007; Amara, 2008; Keshavarz e Roy, 2010). A constituição dos copolímeros depende do substrato usado e do tipo de microrganismo que os sintetiza

(Suriyamongkol *et al.*, 2007). Na Tabela 1 são apresentados alguns polímeros de PHA mais importantes no mercado e respectivas propriedades que determinam a sua aplicabilidade.

Tabela 1 - Propriedades físicas e térmicas de polímeros.

Polímero	*T _M (°C)	*T _G (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para rutura (%)	Cristalinidade (%)	Referência
P(3HB)	177	2	43	5	60	Verlinden <i>et al.</i> , 2007
P(3HB-co-10%HV)	150	-	25	20	-	Pradella, 2006
P(3HB-co-20%HV)	145	-1	20	50	56	Verlinden <i>et al.</i> , 2007
P(3HB-co-3% 4HB)	166	-	28	45	-	Khanna e Srivastava, 2005
P(3BH-co-10% 4HB)	159	-	24	242	-	Khanna e Srivastava, 2005
P(3BH-co-64% 4HB)	50	-	17	591	-	Khanna e Srivastava, 2005
P(3HB-co-10%HHx)	127	-1	21	400	34	Verlinden <i>et al.</i> , 2007
P(3HB-co-17%HHx)	120	-2	20	850	-	Pradella, 2006
Polipropileno	176	-10	38	400	50-70	Verlinden <i>et al.</i> , 2007
Poliestireno	110	21	50	-	-	Khanna e Srivastava, 2005
Polietileno tereftalato	262	3400	56	7300	-	Khanna e Srivastava, 2005
Polietileno de baixa densidade	130	-30	10	620	-	Khanna e Srivastava, 2005

*T_M – temperatura de fusão; T_G - temperatura de transição vítrea.

Tal como se pode verificar pela análise da tabela anterior, o copolímero P(3HB-co-3HHx) emerge pelas suas propriedades físicas, uma vez que são semelhantes às dos plásticos formados pelos combustíveis fósseis. Neste sentido, e considerando o objetivo principal do presente trabalho, numa secção posterior será focada a produção deste copolímero, bem como as suas aplicações.

Atualmente, a produção de PHA não se restringe apenas a bactérias, já existem investigações em plantas e leveduras, na medida em que a composição monomérica depende, além do meio de cultura e condições de produção e da recuperação do produto final, também do tipo de hospedeiro (Keshavarz e Roy, 2010). Dentro dos eucariotas, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* já foram avaliadas através da inserção de genes de *R. eutropha* e *Pseudomonas aeruginosa*, respetivamente. Contudo,

estas abordagens apenas permitiram obter baixas concentrações de polímero (Suriyamongkol *et al.*, 2007). Outros estudos mostraram também evidências de produção de PHA em cianobactérias (Tsuge, 2002).

No que diz respeito a plantas transgênicas, devido ao baixo custo de produção, diferentes espécies foram avaliadas: células de tomate, tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), milho, cana-de-açúcar e *Arabidopsis thaliana* demonstraram capacidade para sintetizar PHA, contudo apenas em baixas quantidades (Sudesh *et al.*, 2000; Amara, 2008; Tian *et al.*, 2009). A produção de PHA em plantas resulta em baixos rendimentos e altas concentrações de PHA, entre 10 e 40% (w/w) de peso seco, conduzem à diminuição do crescimento celular (Verlinden *et al.*, 2007).

Relativamente a bactérias, apenas algumas espécies como *R. eutropha*, *A. latus*, *Azotobacter vinelandii*, *P. oleovorans*, *Paracoccus denitrificans*, *Protomonas extorquens*, *Escherichia coli* recombinante (Chanprateep, 2010) e *P. putida* (Cai *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011) são capazes de produzir PHA suficiente para uma produção em grande escala.

Visto a produção de PHA ter como propósito a reserva de nutriente, em situações de limitação de carbono é esperado que os microrganismos degradem os grânulos. Contudo, nem todos os produtores são capazes de degradar os polímeros quando estes estão no ambiente. Esta degradação implica a síntese de hidrolases extracelulares, designadas por despolimerases, capazes de converter os polímeros nos seus monómeros que podem ser transportados através das membranas celulares. Os monómeros são, posteriormente, metabolizados pelas vias de β -oxidação e ciclo de Krebs e são produzidos dióxido de carbono e água, em condições aeróbias e, em condições anaeróbias, dióxido de carbono, água e metano (Anderson e Dawes, 1990; Verlinden *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008).

Deste modo, usualmente a degradação destes polímeros não acarreta a formação de produtos secundários com características nocivas. As despolimerases são ubíquas no ambiente, tendo sido isoladas e purificadas de vários microrganismos presentes em diferentes habitats, nomeadamente *Alcaligenes*, *Comamonas* e *Pseudomonas*. Estas enzimas apresentam o domínio de ligação do substrato (C-terminal) e o domínio catalítico (N-terminal) unidos por uma região *linker* e, tal como as demais hidrolases, o seu domínio catalítico apresenta uma serina (Ser-His-Asp) (Shah *et al.*, 2008). A reação despolimerase-polímero é heterogênea, uma vez que o polímero sólido é insolúvel em

água enquanto as despolimerases são solúveis. Esta reação envolve uma etapa de adsorção da enzima na superfície do polímero e outra etapa que engloba a hidrólise (Khanna e Srivastava, 2005).

Como resultado dos dados apresentados anteriormente, a aplicabilidade destes polímeros já é significativamente reconhecida no mercado. Em 1990, uma empresa britânica, Imperial Chemical Industries, produziu o produto Biopol, constituído por P(3HB-co-3HV) (Verlinden *et al.*, 2007; Shah *et al.*, 2008). Outros produtos de PHA incluem Mirel e Nodax (USA), Biomer (Alemanha), Biocycle (Brasil), BioGreen (Japão) e Degrapol (Itália) e recentemente, em 2010, a Kaneka Corporation lançou um produto sintetizado por células vegetais, com uma capacidade de produção de cerca de 1000 toneladas por ano (Philip *et al.*, 2007; Chanprateep, 2010).

Inicialmente, os polímeros de PHA eram maioritariamente utilizados em materiais de embalagem, já atualmente a sua aplicação engloba uma série de áreas como medicina (produtos cardiovasculares, medicamentos), agricultura, equipamentos biomédicos, materiais higiénicos entre outros (Reddy *et al.*, 2003; Khanna e Srivastava, 2005; Verlinden *et al.*, 2007; Chen, 2009; Keshavarz e Roy, 2010).

Adicionalmente, após o seu uso e posterior descarte, o PHA pode ser transformado em ésteres de metil-hidroxialcanoato e ser aplicado como aditivo de combustíveis, uma vez que as propriedades comburentes deste composto são semelhantes às do etanol (Chen, 2009; Gao *et al.*, 2011).

Numa outra perspetiva, existem alguns estudos que evidenciam o aumento da taxa de sobrevivência de microrganismos quando em condições adversas, aquando da produção de PHA (Chen, 2009). Por exemplo Zhao *et al.* (2007) avaliaram a capacidade de sobrevivência de uma estirpe de *A. hydrophila* 4AK4, produtora de P(3HB-co-3HHx), e da sua mutante incapaz de produzir o polímero, tendo verificado que a primeira possui uma maior resistência a fatores de stress como calor, peróxido de hidrogénio e UV.

P(3HB-co-3HHx)

A presença do monómero 3HHx em polímeros de PHA possibilita a formação de um copolímero com propriedades mecânicas superiores às do P(3HB) (Philip *et al.*, 2007). A presença deste monómero num copolímero com 3HB promove a redução da cristalinidade, da força de tensão e da temperatura de fusão, verificando-se uma maior redução destas propriedades quanto maior são as percentagens de 3HHx. Além disso, a percentagem de alongamento para rutura aumenta consideravelmente, quando comparado ao P3HB, tornando o copolímero mais elástico e flexível (Doi *et al.*, 1995; Sudesh *et al.*, 2000). Doi *et al.* (1995) demonstraram que a temperatura de fusão diminui de 177 para 52°C num copolímero com 25 mol% de 3HHx e o alongamento para rutura aumenta de 6 para 850%.

O copolímero P(3HB-co-3HHx) tem sido usado como material osteosintético para simulação de crescimento de ossos (Wang *et al.*, 2008). Outras aplicações como reparação de nervos danificados e usos terapêuticos e nutricionais têm sido publicadas (Bian *et al.*, 2009). O facto de ser um composto não tóxico e que não provoca reações imunológicas, possibilita a sua aplicação como material de implante, além de promover a ativação dos canais de cálcio e a regeneração de tecidos danificados (Chen e Wu, 2005; Chen, 2009). A sua utilização para a construção de válvulas aórticas híbridas (Wu *et al.*, 2007), moldes para células musculares (Chen *et al.*, 2008) ou tecidos cardiovasculares (Sun *et al.*, 2009) tem sido também reportada na literatura.

No que diz respeito à síntese de P(3HB-co-3HHx) em bactérias, vários estudos foram publicados, tanto utilizando produtores naturais como linhagens recombinantes. Brandl *et al.* (1989) demonstraram o acúmulo de um copolímero com 8.9 mol% de 3HHx em *Rhodospirillum rubrum* selvagem, a partir de ácido hexanóico. Ainda no mesmo ano foi detetada a produção de P(3HB-co-3HHx) contendo 2.2 mol% de 3HHx por *R. eutropha* (Gross *et al.*, 1989; Ulmer *et al.*, 1989). Nos anos seguintes, foi também evidenciada a produção deste copolímero em *Rhodococcus ruber*, *Nocardia corallina*, *B. megaterium* (Haywood *et al.*, 1991; Dennis, 1994), *Comamonas testosteroni*, *Bacillus cereus*, entre outras bactérias (Caballero *et al.*, 1995).

Tal como referido anteriormente, o género *Aeromonas* tem-se destacado pela sua capacidade de produção deste copolímero, na medida em que tem sido amplamente estudado (Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003). Doi *et al.* (1995), após cultivar *A.*

caviae selvagem em diferentes fontes de carbono, determinaram que esta bactéria produz P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo. Em condições anaeróbias e para fontes de carbono com 12 a 18 carbonos, verificou-se a formação deste copolímero com até 25 mol% de 3HHx. Anos mais tarde, Fukui e Doi (1997) avaliaram a complementação de mutantes de *P. putida* e *R. eutropha*, deficientes na capacidade de produção de PHA, com genes de *A. caviae*. Os recombinantes foram capazes de produzir copolímeros P(3HB-co-3HHx) a partir de ácido hexanóico e octanoato.

As estratégias para a síntese de P(3HB-co-3HHx) consistem na sua maioria na construção de recombinantes com genes do género *Aeromonas* e na utilização de ácido láurico como fonte de carbono. Não obstante, a utilização de espécies de *Aeromonas* selvagens possibilita obter polímeros com percentagens molares de 3HHx elevadas (Lee *et al.*, 2000). A introdução ou superexpressão da enzima acil-CoA desidrogenase (YafH) representam igualmente estratégias de otimização (Lu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004a; Lu *et al.*, 2004b; Qiu *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2010). Esta enzima catalisa o passo limitante da β -oxidação de ácidos gordos, ou seja, a formação de enoil-CoA a partir de acil-CoA, e este intermediário, como será explicado numa secção posterior, participa na via de síntese de monómeros de PHA. Assim, a coexpressão desta enzima possibilita o aumento do direccionamento de compostos para a síntese de monómeros de 3HHx (Park *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006).

Na Tabela 2 são apresentados alguns resultados relativos à produção deste copolímero, sendo destacados os mais relevantes, presentes na literatura consultada.

Tabela 2 - Resultados obtidos da síntese do copolímero P(3HB-co-3HHx) em diferentes bactérias.

Bactéria	Fontes de carbono	MSC (g.L ⁻¹)	Produtividade/ Teor em PHA	3HHx (mol%)	Referência
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>A. caviae</i>)	Óleo de milho	3.60	-	5.00	Fukui e Doi, 1998
<i>E. coli</i> recombinante (<i>phaC</i> e <i>phaJ</i> de <i>A. caviae</i>)	Ácido Láurico	-	-	17.00	Fukui <i>et al.</i> , 1999
<i>A. hydrophila</i>	Ácido oleico	95.70	1.01 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	17.00	Lee <i>et al.</i> , 2000
<i>E. coli</i> recombinante (operação <i>pha</i> de <i>Aeromonas</i> e <i>phaB</i> de <i>R. eutropha</i>).	Ácido Láurico	79.00	0.53 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	10.80	Park <i>et al.</i> , 2001
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>ccr</i> de <i>Streptomyces cinnamonensis</i> e <i>phaC</i> e <i>phaJ</i> de <i>A. caviae</i>)	Frutose e L-arabinose como indutor	0.96	-	1.40	Fukui <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> recombinante (superexpressão do gene <i>yafH</i> e <i>phaC</i> e <i>phaJ</i> de <i>A. caviae</i>)	Ácido láurico e ácido acrílico	0.57	8.87 P(3HB-co-3HHx) /MSC (%)	26.05	Lu <i>et al.</i> , 2003
<i>A. hydrophila</i> recombinante (<i>yafH</i> de <i>E. coli</i>)	Ácido láurico	3.17	47.34 PHA/MSC (%)	17.43	Lu <i>et al.</i> , 2004a
<i>E. coli</i> recombinante (coexpressão de <i>yafH</i> e operação <i>pha</i> de <i>A. hydrophila</i> e <i>vgb</i> de <i>Vitreoscilla</i>)	Ácido láurico	2.01	60.73 P(3HB-co-3HHx) /MSC (%)	28.54	Lu <i>et al.</i> , 2004b
<i>A. hydrophila</i> recombinante (operação <i>pha</i> de <i>A. caviae</i>)	Ácido Láurico	4.80	-	34.10	Han <i>et al.</i> , 2004
<i>R. eutropha</i> recombinante e PHA ⁻ (<i>phaC</i> de <i>A. caviae</i>)	Óleo de soja	128.00-138.00	71.00-74.00 PHA/MSC (%)	5.00	Kahar <i>et al.</i> , 2004
<i>A. hydrophila</i> recombinante (superexpressão do operação <i>pha</i> e <i>tesA</i> de <i>E. coli</i>)	Ácido glucónico	2.60	14.7 P(3HB-co-3HHx) /MSC (%)	19.20	Qiu <i>et al.</i> , 2005
<i>P. putida</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>A. hydrophila</i> , <i>phaB</i> de <i>R. eutropha</i> e <i>phaG</i> de <i>P. putida</i>)	Glicose	2.00	18.64 P(3HB-co-3HHx) /MSC (%)	4.60	Qiu <i>et al.</i> , 2005
<i>A. hydrophila</i> recombinante (superexpressão de <i>phaP</i>)	Ácido láurico	5.45	50.74 P(3HB-co-3HHx) /MSC (%)	21.10	Tian <i>et al.</i> , 2005
<i>A. hydrophila</i> recombinante (<i>vgb</i> de <i>Vitreoscilla</i>)	Ácido láurico	50.20	0.67 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	25.10	Qiu <i>et al.</i> , 2006
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>A. caviae</i> com mutação por evolução <i>in vitro</i>)	Óleo de soja	34.80	-	9.90	Mifune <i>et al.</i> , 2010
<i>A. hydrophila</i> recombinante e <i>phaC</i> ⁻ (<i>phaC</i> de <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>fadD</i> de <i>E. coli</i> e <i>fadL</i> de <i>P. putida</i>)	Ácido láurico	3.00	-	94.50	Jian <i>et al.</i> , 2010
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>A. caviae</i>)	Óleo de jatropa	8.00	0,14 g.L ⁻¹ .h ⁻¹	3.00	Ng <i>et al.</i> , 2011

*genes codificantes: *phaC* – PHA sintase; *phaJ* – enoil-CoA hidratase; *phaB* – acetoacetil-CoA redutase; *ccr* – crotonil-CoA redutase; *yafH* – acil-CoA desidrogenase; *vgb* – hemoglobina; *tesA* - tioesterase citosólica I; *phaG* - (R)-3-hidroxiaçil-ACP-CoA transacilase; *phaP* – PHAsina; *fadD* – acil-CoA sintase; *fadL* – proteína transportadora de ácidos gordos.

Numa outra perspectiva, tem sido avaliado o uso de outras vias metabólicas para a síntese de P(3HB-co-3HHx), através da introdução de diferentes genes, como da enzima crotonil-CoA redutase em *R. eutropha* (Fukui *et al.*, 2002) e das enzimas enoil-CoA

hidratase (*R*) e (*S*) em *E. coli* (Sato *et al.*, 2007), ou a eliminação de vias, como por exemplo, a via de formação do ácido acético em *A. hydrophila* (Liu *et al.*, 2011).

Recentemente, também foram avaliados recombinantes de *R. eutropha* com o gene da PHA sintase de *Rhodococcus aetherivorans* e o *phaJ* de *P. aeruginosa*. Foram realizados ensaios em biorreator e, para que a bactéria não perdesse o plasmídeo, foi-lhe retirado um gene necessário ao seu crescimento e clonado no mesmo plasmídeo com os genes exógenos. Estes ensaios foram realizados com óleo de palmeira como fonte de carbono, tendo acumulado PHA correspondente a 66% da massa seca celular com 30 mol% de 3HHx (Budde *et al.*, 2011).

Metabolismo de PHA

A biossíntese de PHA é dependente de vários fatores, principalmente do organismo, das vias metabólicas presentes, da enzima PHA sintase e do substrato fornecido (Rehm, 2003). De uma forma geral, esta ocorre em dois passos: formação de hidroxiaxil-CoA a partir dos substratos presentes no meio e a sua polimerização em PHA. Neste sentido, nesta secção serão descritas as enzimas envolvidas e as respetivas vias metabólicas.

Enzimas envolvidas na síntese de PHA

A PHA sintase (PhaC codificada pelo gene *phaC*) é considerada a enzima mais importante na via de síntese de PHA, pois determina que tipo de polímero será formado pelo microrganismo. Deste modo, várias PHA sintases têm sido estudadas tanto de bactérias Gram-positivas e negativas como de cianobactérias, sendo que cerca de 30 genes que codificam estas proteínas já foram sequenciados (Sudesh *et al.*, 2000; Rehm, 2003; Rehm e Steinbüchel, 2005).

A função desta enzima reside na polimerização dos monómeros hidroxialcanoil-CoA (HA) formados pela célula, o 3-hidroxiaxil-CoA é o substrato mais favorável, mas podem ser incorporados 4-, 5- e 6- hidroxiaxil-CoA. Dependendo do organismo produtor, a PHA sintase poderá apresentar especificidades diferentes. Neste sentido, estas enzimas podem ser divididas em quatro classes de acordo com a sua especificidade e estrutura primária. Na Tabela 3, são apresentadas as respetivas características (Sudesh *et al.*, 2000; Ojumu *et al.*, 2004; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011).

Tabela 3 - Classes de PHA sintases (Sudesh *et al.*, 2000; Rehm, 2003; Ojumu *et al.*, 2004; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Amara, 2008; Park *et al.*, 2011).

Classe	Subunidades	Substrato	Microrganismos
I	PhaC 60-73 kDa	SCL	<i>R. eutropha</i> , <i>A. latus</i>
II	PhaC 60-65 kDa	MCL e algumas espécies também reconhecem substratos SCL	<i>Pseudomonas</i> .
III	PhaC e PhaE 40 kDa cada	SCL e algumas espécies também reconhecem substratos MCL	<i>Allochromatium vinosum</i> ; <i>Thiocystis violácea</i> ; <i>Thiocapsa pfennigii</i> ; <i>Synechocystis sp.</i>
IV	PhaC e PhaR 40 kDa e 22kDa	SCL	<i>Bacillus sp.</i>

As PHA sintases representam um grupo de enzimas com elevada similaridade, tendo em consideração a sua estrutura primária e especificidade pelo substrato (Sudesh *et al.*, 2000; Rehm, 2003).

A enzima β -cetotiolase (EC 2.3.1.9) (PhaA codificada pelo gene *phaA*) intervém igualmente na síntese de PHA e foi estudada desde cedo na bactéria *R. eutropha*, tendo-se verificado a existência de duas subunidades, intituladas A e B, cada uma com diferentes especificidades por substrato. A subunidade A é ativa para substratos com 4 e 5 carbonos, enquanto a B possui especificidade para compostos com até 10 carbonos (Anderson e Dawes, 1990; Braunegg *et al.*, 1998). Adicionalmente, Slater *et al.* (1998) descobriram a existência de mais duas β -cetotiolases em *R. eutropha* codificadas pelos genes *bktB* e *bktC*. Estas enzimas possuem um papel mais importante na síntese de 3-cetovaleril-CoA (produto da condensação de propionil-CoA e acetil-CoA).

A reação de condensação catalisada por esta enzima é fortemente inibida pela presença da coenzima A o que justifica os baixos níveis de produção de PHA durante a fase de crescimento, quando elevadas quantidades de CoASH são libertadas pelo ciclo de Krebs (Anderson e Dawes, 1990; Braunegg *et al.*, 1998; Verlinden *et al.*, 2007). Durante condições de equilíbrio, o acetil-CoA entra no ciclo de Krebs e a CoA resultante inibe a enzima β -cetotiolase e, consequentemente, a síntese de PHA. Na presença de condições de um nutriente limitante e excesso de carbono, a atividade da NADH oxidase diminui e, consequentemente, a quantidade de NADH aumenta. Isto resulta na inibição das enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase e assim no

acúmulo de acetil-CoA e diminuição da inibição da β -cetotiolase por CoA livre (Anderson e Dawes, 1990; Amara, 2008).

A enzima acetoacetil-CoA redutase (EC 1.1.1.36) (PhaB codificada pelo gene *phaB*) pode estar associada a NADH ou NADPH, catalisando diferentes reduções. No primeiro caso, a enzima catalisa a oxidação de substratos com conformação (S) e (R) a acetoacetil-CoA (4 a 10 átomos de carbono), mas na redução inversa apenas forma (S)-hidroxibutiril-CoA. Por outro lado, a reação catalisada pela redutase dependente de NADPH origina isômeros (R) de hidroxiaçil-CoA (4 a 6 átomos de carbono). Assim, apenas a enzima dependente de NADPH participa na via de síntese de PHA, uma vez que a PHA sintase aceita somente monômeros (R) (Braunegg *et al.*, 1998).

Outras enzimas estão igualmente envolvidas no metabolismo de PHA, desempenhando funções importantes para a sua degradação e estabilidade. No caso da bactéria *R. eutropha* estão presentes as enzimas PhaZ e PhaP codificadas pelos genes *phaZ* e *phaP*, respectivamente. A PhaZ é uma despolimerase que na ausência de P(3HB) é produzida na sua forma inativa, requerendo a presença deste composto como ativador. A PhaP é uma PHAsina de baixo peso molecular que promove a produção de PHA através da sua ligação ao grânulo, regulando o seu tamanho, número e razão superfície volume (Sudesh *et al.*, 2000; Luengo *et al.*, 2003).

Vias metabólicas

A produção microbiana de PHA pode ser realizada a partir de diversos substratos, nomeadamente ácidos gordos, alcanos e hidratos de carbono simples. Como resultado desta variedade de fontes de carbono passíveis de serem utilizadas acoplada aos diferentes monômeros de PHA existentes, várias vias metabólicas têm sido descritas. De uma forma geral, a biossíntese de PHA pode ser dividida em dois grupos tendo em consideração os monômeros formados, ou seja, a síntese de monômeros MCL e monômeros SCL (Sudesh *et al.*, 2000). Na Figura 3, estão representadas as diferentes vias metabólicas descritas para a biossíntese de monômeros de PHA.

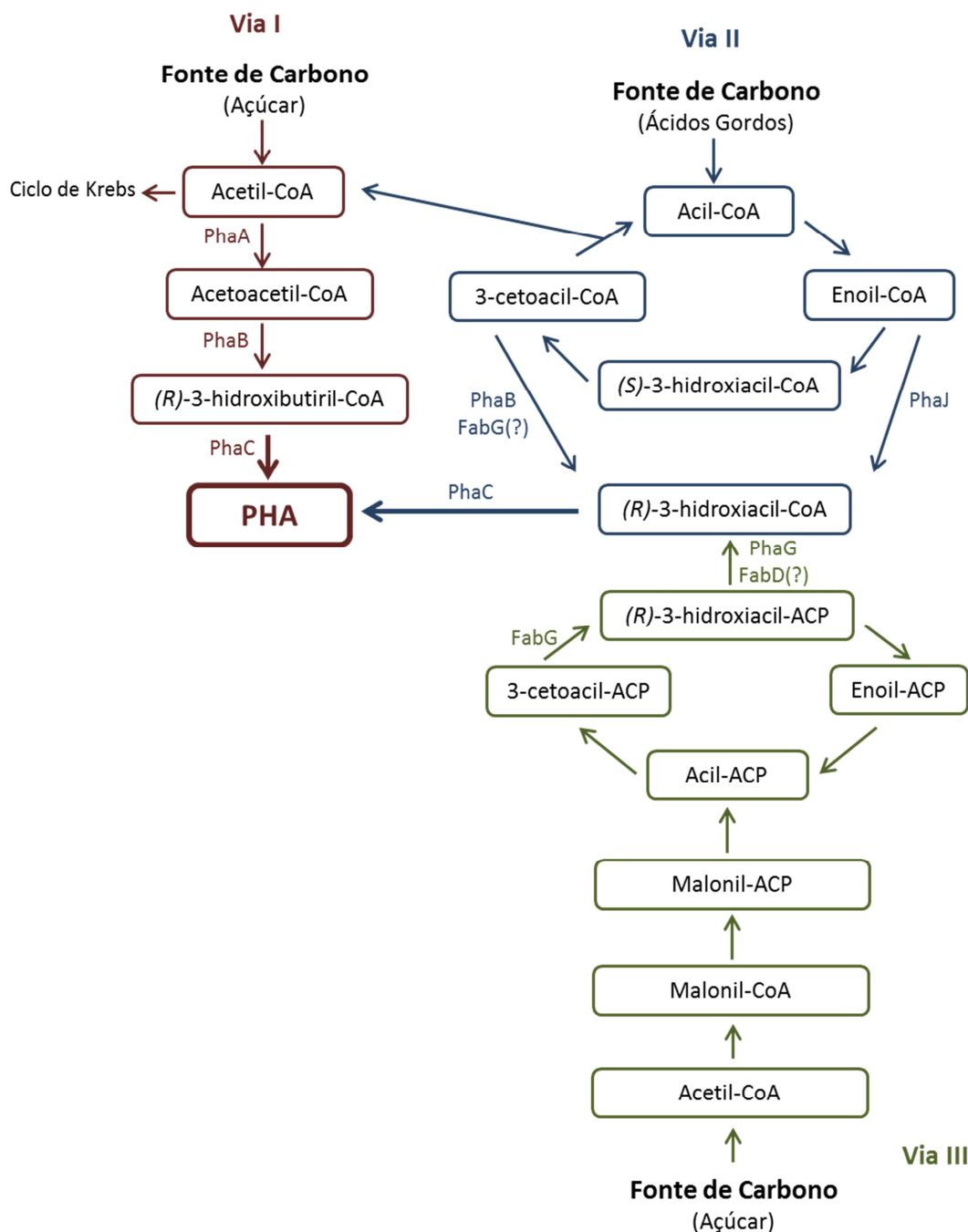


Figura 3 - Vias metabólicas para a formação de PHA (Via I – biossíntese a partir de hidratos de carbono; Via II – β-oxidação de ácidos gordos; PhaJ – enoil-CoA hidratase; FabG - 3-cetoacil-ACP redutase; Via III – síntese *de novo* de ácidos gordos; PhaG - (R)-3-hidroxiaçil-ACP-CoA transacilase; FabD - malonil-CoA-ACP transacilase) (adaptado de Sudesh *et al.*, 2000; Tsuge, 2002; Luengo *et al.*, 2003).

▪ Síntese de monómeros SCL

A síntese de monómeros de cadeia curta é a via mais estudada e mais comum entre espécies. Na bactéria *R. eutropha*, o operão *phaCAB* codifica as enzimas necessárias para a síntese de P(3HB). A enzima β-cetotiolase (codificada pelo gene *phaA*) condensa

duas moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA. Esta reação é dividida em duas etapas: primeiro uma cisteína presente no sítio ativo ataca uma molécula de acetil-S-CoA e, numa segunda fase, outra cisteína desprotona outra molécula de acetil-CoA que é capaz de atacar o intermediário acetil-S-enzima e assim formar o composto acetoacetil-CoA (Madison e Huisman, 1999).

Este composto é posteriormente reduzido a (*R*)-3HB-CoA por uma acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH (codificada pelo gene *phaB*). O passo final consiste na polimerização dos monómeros obtidos pela PHA sintase (codificada pelo gene *phaC*) (Steinbüchel e Schlegel, 1991; Tsuge, 2002; Luengo *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2003; Suriyamongkol *et al.*, 2007; Verlinden *et al.*, 2007). Este último passo requer a ativação do grupo tiol da cisteína, presente na enzima PHA sintase, pela histidina localizada no local ativo. Assim, é possível a formação de um intermediário covalente enzima-substrato através da libertação da CoA após o ataque nucleofílico na ligação tioéster do (*R*)-3-hidroxiacil-CoA. Um resíduo de ácido aspártico da enzima ativa o grupo hidroxilo do substrato que depois ataca a ligação tioéster de outro monómero, promovendo a sua ligação, ou seja, a polimerização. Um novo monómero liga-se à cisteína livre e o processo repete-se (Rehm, 2010). Os oligómeros formam posteriormente micelas e o seu crescimento conduz à formação de grânulos visíveis microscopicamente devido à sua elevada refratividade (Madison e Huisman, 1999).

▪ Síntese de monómeros MCL

A formação de monómeros MCL ocorre a partir de intermediários das vias metabólicas de β -oxidação de ácidos gordos e de biossíntese *de novo* de ácidos gordos, quando as fontes de carbono são ácidos gordos, álcoois e alcanos ou hidratos de carbono, respetivamente (Rehm *et al.*, 1998; Madison e Huisman, 1999; Sudesh *et al.*, 2000; Tsuge, 2002).

Na β -oxidação de ácidos gordos várias vias têm sido propostas para o direcionamento de intermediários para a síntese de PHA, através da catalisação por diferentes enzimas. Por exemplo, no caso do género *Aeromonas*, uma enoil-CoA hidratase (*R*) específica (PhaJ codificada pelo gene *phaJ*), a partir de trans-2-enoil-CoA, forma (*R*)-3HA-CoA que será depois incorporado no polímero crescente pela PHA sintase (Fukui *et al.*, 1998; Sudesh *et al.*, 2000; Tsuge, 2002). Outras enzimas como

epimerases e hidratases são também boas candidatas para a formação de monómeros MCL de intermediários da β -oxidação (Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003).

Do mesmo modo, na via de biossíntese de ácidos gordos, os intermediários (R)-3-hidroxiacil são convertidos de proteína transportadora de acila (ACP, do inglês *Acyl Carrier Protein*) à CoenzimaA pela ação de (R)-3-hidroxiacil-ACP-CoA transacilase (PhaG codificada pelo gene *phaG*) (Rehm *et al.*, 1998; Madison e Huisman, 1999; Sudesh *et al.*, 2000; Tsuge, 2002).

Além disso, em algumas bactérias foram descobertas outras enzimas que também intervêm no suprimento de monómeros para a síntese de PHA. Um exemplo é a enzima 3-cetoacil-ACP redutase (FabG codificada pelo gene *fabG*), que integra a via de síntese de ácidos gordos. Esta enzima utiliza acil-ACP e acil-CoA como substratos para formar monómeros MCL em *E. coli* (Tsuge, 2002). O aumento da expressão da enzima malonil-CoA-ACP transacilase (FabD codificada pelo gene *fabD*) também demonstrou possuir um efeito positivo na biossíntese de PHA (Sudesh *et al.*, 2000).

Esta diversidade de vias e genes envolvidos na síntese de PHA resultam da evolução divergente das espécies. Além das diferentes classes de PHA sintases, em algumas bactérias como *Acinetobacter* sp., *A. latus*, *Pseudomonas acidophila*, e *R. eutropha*, os genes do operão *phaCAB* estão adjacentes no cromossoma, mas não necessariamente na mesma ordem. Por outro lado, em *Paracoccus denitrificans*, *Rhizobium meliloti*, e *Zoogloea ramigera* e outras espécies, o gene *phaC* está separado dos demais (Rehm e Steinbüchel, 2005; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Outras bactérias como *Burkholderia caryophylli*, *P. oleovorans* e *P. aeruginosa*, capazes de formar PHA_{MCL}, possuem um operão *phaC1ZC2D*, onde duas subunidades de PHA sintase estão separadas pelo gene *phaZ*, codificante de uma despolimerase. A enzima codificada pelo gene *phaD* ainda não foi completamente estudada, supondo-se apenas que é necessária para a formação do polímero (Rehm e Steinbüchel, 2005; Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Vários organismos possuem ainda o cluster *phaIF*, a PhaI participa na formação e estabilidade do grânulo e a PhaF na estabilização do grânulo e como regulador (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Processo de Produção de PHA

Como resultado dos elevados custos de produção de PHA (3 a 4 US\$/kg, o que corresponde a 5 a 10 vezes mais o preço dos plásticos de origem petroquímica) (Khanna e Srivastava, 2005; Suriyamongkol *et al.*, 2007), várias estratégias têm sido exploradas de forma a otimizar o processo. Deve-se ter em consideração que a sua otimização requer medidas ao nível do desenvolvimento da espécie e da produção a escala laboratorial, piloto e industrial (Chen, 2009).

Tal como referido anteriormente, a formação de PHA ocorre na presença de condições limitantes, com fase de acúmulo após a fase de crescimento do microrganismo, em laboratório. Desta forma, a produção em biorreator pode ser dividida em duas etapas: a primeira tem como principal objetivo a produção de uma elevada densidade celular (fase de crescimento) e a segunda pretende obter elevadas concentrações de PHA (fase de limitação de nutriente) (Silva *et al.*, 2007; Keshavarz e Roy, 2010). Durante a fase de limitação de nutriente, a concentração de células residual (concentração celular menos a concentração de PHA) permanece quase constante e a concentração celular aumenta apenas devido ao acúmulo intracelular de PHA (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012).

A temperatura do processo, o modo de alimentação, diferentes nutrientes limitantes e várias fontes de carbono têm sido estudados. No que diz respeito à fonte de carbono, fator que torna o processo não rentável economicamente, tem-se procurado estudar substratos mais baratos tais como melaços, soro de leite, trigo, farelo de arroz, amido, lamas ativadas entre outros (Keshavarz e Roy, 2010). No entanto, é de salientar que na maioria dos casos obtêm-se densidades celulares e concentrações de PHA reduzidas (Tian *et al.*, 2009). A determinação das concentrações de substrato adequadas representa igualmente uma medida de otimização (Chanprateep, 2010), além da escolha do substrato adequado ao polímero desejado (Aldor e Keasling, 2003).

Avanços no conhecimento da bioquímica e biologia molecular dos polímeros de PHA, quer a nível da sua biossíntese como a nível da clonagem molecular, possibilitou o desenvolvimento de metodologias recombinantes para a otimização do seu processo de produção (Reddy *et al.*, 2003; Chen, 2009).

Deste modo, várias bactérias recombinantes têm sido avaliadas através de estudos intensivos de engenharia genética e metabólica focando a biossíntese de PHA,

principalmente *R. eutropha*, *P. putida*, *P. oleovorans* e *E. coli* (Aldor e Keasling, 2003). No entanto, um dos obstáculos reside na elevada carga metabólica inerente ao sistema de genes necessário para a biossíntese de PHA, o que conduz à instabilidade do plasmídeo e, em alguns casos, à sua perda (Suriyamongkol *et al.*, 2007).

Não obstante, genes de PHA sintases e outros genes envolvidos na síntese de PHA, de diversas bactérias, foram clonados de modo a obter recombinantes que permitissem atingir uma produção máxima do polímero desejado (Tsuge, 2002). Genes dos produtores naturais como *R. eutropha* e espécies de *Pseudomonas* foram os mais clonados e estudados nas respetivas bactérias e em células de *E. coli* por exemplo (Lee *et al.*, 1999; Amara, 2008). O género *Aeromonas* devido à sua capacidade para formar copolímeros SCL-MCL também se tornou alvo de várias investigações (Amara, 2008) que serão posteriormente detalhadas.

Além da clonagem direta de genes envolvidos na síntese de PHA, outra estratégia de otimização engloba a modificação genética das PHA sintases de forma a aumentar a sua atividade catalítica e a alterar a sua especificidade (Park *et al.*, 2011). Por outro lado, além do supracitado, várias outras estratégias já foram avaliadas: aumento da cópia de determinados genes; deleção de genes; manipulação do metabolismo ou vias de regulação; análise de fluxos metabólicos; análises de *microarrays* e ao nível do processo em biorreator como a introdução de inibidores que maximizem a produção de PHA (Aldor e Keasling, 2003; Amara, 2008). Por exemplo, tiolactomicina, triclosan e cerulenina inibem enzimas envolvidas na via de síntese dos ácidos gordos e o ácido acrílico inibe a enzima β -cetotiolase interveniente na β -oxidação (Amara, 2008).

No que diz respeito às fases seguintes à produção, os polímeros de PHA podem ser detetados por microscopia de transmissão eletrónica devido à sua elevada refratividade ou então revelados através da adição dos corantes Sudan Black B (indica que os grânulos são de natureza líquida) e Nile Blue A (fluorescência laranja). Estes métodos permitem identificar a presença do polímero, contudo a determinação da sua constituição requer processos químicos (Sudesh *et al.*, 2000; Khanna e Srivastava, 2005; Amara, 2008).

Relativamente à recuperação dos PHA, diferentes métodos foram implementados, como por exemplo extração por solvente e rutura celular seguida por um processo aquoso (Luengo *et al.*, 2003; Ojumu *et al.*, 2004; Keshavarz e Roy, 2010). Este processo, apesar de mais seguro e mais barato, provoca a redução do peso molecular do

polímero. A extração por solvente engloba compostos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano (Ojumu *et al.*, 2004). Numa fase inicial, a biomassa é liofilizada e é adicionado clorofórmio e o PHA é precipitado com éter dietil ou acetona (Khanna e Srivastava, 2005).

Adicionalmente, no Brasil, foi proposto um método com base na adição de álcoois superiores ou os seus ésteres. Neste caso, o PHA fica solubilizado na fase orgânica, sendo posteriormente purificado por precipitação, remoção do solvente, concentração por microfiltração e secagem (Silva *et al.*, 2007).

A sua identificação e quantificação pode ser efetuada por técnicas de cromatografia (cromatografia gasosa, CG, cromatografia líquida, HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*). No caso da CG, realiza-se metanólise ou propanólise anteriormente à aplicação da técnica analítica de modo a formar metilésteres ou propilésteres hidroxialcanoatos. O HPLC mede o P(3HB) de acordo com a sua conversão em ácido crotónico e deteção em UV a 210nm (Karr *et al.*, 1983). Outras técnicas como cromatografia iónica (baseada na conversão dos monómeros em ácidos alcanóicos) e determinação enzimática também têm sido implementadas (Khanna e Srivastava, 2005).

Uma desvantagem dos métodos de extração e/ou tratamento para posterior quantificação e concentração do PHA centra-se na toxicidade dos produtos químicos utilizados, entretanto a aplicação de métodos enzimáticos surge como a técnica mais segura, apesar de menos utilizada (Álvarez-Chávez *et al.*, 2012).

O género *Aeromonas*

O género *Aeromonas* é conhecido por possuir a capacidade de produzir copolímeros de 3HB e monómeros MCL, como é o caso do 3HHx, tal como foi descrito anteriormente. Este género é caracterizado por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, com forma de um bacilo e catalase e oxidase positivas (Doi *et al.*, 1995; von Graevenitz, 2007). São normalmente encontradas em água doce, sistemas de distribuição de água potável, solos e não tão predominantemente em peixes, répteis, anfíbios e alguns pássaros. Não são esporulantes e algumas espécies como a *A. hydrophila* e a *Aeromonas salmonicida*, são patogénicas para peixes e para o homem e quando são consumidos água e/ou alimentos contaminados, podem causar diarreia (von Graevenitz, 2007).

Os genes de biossíntese de PHA estão organizados no operão *phaPCJ*, não tendo sido detetada a presença dos genes *phaA* ou *phaB*, na medida em que supõe-se que a formação de monómeros de PHA é conseguida através do direcionamento de intermediários da β -oxidação contendo 4 e 6 carbonos pela enoil-CoA hidratase (Matsuda, 2009).

Várias linhagens recombinantes com genes de *Aeromonas* têm sido construídas com o objetivo de aumentar a produção de determinados polímeros e copolímeros de PHA. Por outro lado, também existem estudos publicados relativos à manipulação das vias metabólicas em *Aeromonas*, quer por técnicas de engenharia genética, quer pela utilização de diferentes substratos. Na Tabela 4, são apresentados alguns dos resultados obtidos por diferentes investigadores para a síntese de polímeros de PHA, além do copolímero P(3HB-co-3HHx) (resultados já apresentados anteriormente).

Tabela 4 - Resultados obtidos em estudos envolvendo espécies de *Aeromonas* ou espécies recombinantes com genes de *Aeromonas* para a produção de PHA.

Bactéria	Fontes de carbono	Polímero	MSC (gL ⁻¹)	PHA (wt%)	Referência
<i>E. coli</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>A. caviae</i> e <i>fabD</i> de <i>Pseudomonas</i> sp.)	Glicose	P(3HB)	2.30	11.40	Taguchi <i>et al.</i> , 1999a
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>phaC</i> e <i>phaJ</i> de <i>A. caviae</i>)	Ácido hexanóico e octanoato	P(3HB-co-3HHx)	3.30	86.00	Kichise <i>et al.</i> , 1999
<i>R. eutropha</i> recombinante (<i>phaC</i> e <i>phaJ</i> de <i>A. caviae</i>)	Pentanoato e nonanoato	P(3HB-co-3HV-co-3HHp)	2.70	86.00	Kichise <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> recombinante (<i>phaC</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. e <i>phaJ</i> mutado de <i>A. caviae</i>)	Ácido láurico	PHA com monómeros de 3HB; 3HHx; 3HO; 3HD; 3HDD	-	22.00	Tsuge <i>et al.</i> , 2003
<i>A. hydrophila</i> recombinante (operação <i>pha</i> de <i>A. caviae</i>)	1,4-butanediol	P(3HB-co-4HB-co-3HHx)	3.26	23.60	Xie e Chen, 2008
<i>A. hydrophila</i> recombinante (<i>vgb</i> de <i>Vitreoscilla</i> e <i>fadD</i> de <i>E. coli</i>)	Ácido undecanóico	P(3HV)	47.12	60.08	Shen <i>et al.</i> , 2009
<i>A. hydrophila</i> recombinante (operação <i>pha</i> de <i>A. caviae</i>)	Ácido láurico e valerato	P(3HB-co-3HV-co-3HHx)	2.41	71.00	Zhang <i>et al.</i> , 2009

*3HHp – hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato.

Estratégias como aumento da expressão de genes, incorporação de genes exógenos em *Aeromonas* (Xie e Chen, 2008; Shen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009), *R. eutropha* (Kichise *et al.*, 1999) e *E. coli* (Taguchi *et al.*, 1999a, b; Tsuge *et al.*, 2003) foram implementadas para o aumento da produção de polímeros de PHA. Adicionalmente, foram realizados estudos do efeito de mutações nos genes de PHA sintase (Amara *et al.*, 2002; Kichise *et al.*, 2002; Tsuge *et al.*, 2007a, b) ou da enoil-CoA hidratase (Tsuge *et al.*, 2003). A aplicação da evolução dirigida de alguns genes de *Aeromonas* tem demonstrado ser uma abordagem promissora, na medida em que permite alterar a especificidade de enzimas, a capacidade de acúmulo de PHA e a massa molar do polímero (Amara *et al.*, 2002; Kichise *et al.*, 2002; Tsuge *et al.*, 2003; Tsuge *et al.*, 2007a; Tsuge *et al.*, 2007b).

Burkholderia sacchari

O género *Burkholderia* representa um grupo com cerca de 40 espécies, com uma dispersão significativa, ocupando diferentes habitats (desde solos contaminados ao trato respiratório humano). A aplicação deste microrganismo é igualmente vasta, uma vez que para algumas espécies tem sido explorada a sua ação como agente de biorremediação de xenobióticos recalcitrantes e como agente promotor de crescimento de vegetais e o seu potencial de controlo biológico de patógenos de plantas. Por outro lado, também já foi reportada a patogenicidade de algumas espécies como resultado do seu envolvimento em infeções humanas, como é o caso da *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei* (Coenye e Vandamme, 2003; Vandamme *et al.*, 2007).

Poucos estudos foram publicados relativamente à avaliação deste género para a produção de PHA. Em 2000, foi publicado um estudo relativamente a *B. cepacia*, onde, através de recombinação homóloga, foi inserido o gene de PHA sintase inativado. O crescimento do mutante em sacarose e glutamato demonstrou a produção de 1% da massa seca celular de polímeros de PHA, levando à conclusão que esta espécie possui pelo menos duas PHA sintases (Rodrigues *et al.*, 2000).

A espécie *Burkholderia caryophylli* também demonstrou capacidade para produzir polímeros de PHA. Esta bactéria apresenta um operão de síntese de PHA semelhante ao presente em espécies de *Pseudomonas* (*phaC1*, *phaC2* e *phaZ*). Estes genes foram clonados em *E. coli*, tendo-se obtido cerca de 1% do polímero com monómeros de 3HHx, 3HO e 3HD e 3% de polímeros com 3HO e 3HD a partir de octanoato e para o gene *phaC1* e decanoato e gene *phaC2*, respetivamente (Hang *et al.*, 2002).

Recentemente, Hsieh *et al.* (2011) estudaram a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) e a sua aplicação em cultura de tecidos. Foi avaliada a espécie *B. cepacia* e a quantidade máxima de polímero obtida variou entre 80 e 90% para uma concentração celular de 1.5 a 4.5 g.L⁻¹ a partir de ácido valérico como única fonte de carbono.

Silva *et al.* (2000) avaliaram mutantes de *Burkholderia sacchari* incapazes de crescer em ácido propiónico como única fonte de carbono, tendo concluído que esta mutação possibilita o aumento da produção de P(3HB-co-3HV), tornando o uso industrial destes mutantes uma estratégia de otimização e redução de custos. Anos mais tarde, foram realizados estudos semelhantes (Brämer *et al.*, 2002; Rocha *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2009), tendo chegado à conclusão que o catabolismo do ácido propiónico é realizado por duas vias metabólicas e que a taxa de produção de

3HV é proporcional à taxa de consumo de ácido propiônico. A utilização destes mutantes possibilitou o aumento da produção do copolímero como resultado do direcionamento do ácido propiônico para a biossíntese de PHA (Rocha *et al.*, 2008).

Burkholderia sacchari é uma espécie relativamente recente cujo nome foi proposto por Bärmer *et al.* (2001) para uma estirpe recuperada de solo de plantação de cana-de-açúcar no Brasil. Esta bactéria Gram-negativa demonstrou capacidade para acumular P(3HB) até 68% da massa seca celular com sacarose como única fonte de carbono e P(3HB-co-3HV) até 65.9% da massa seca celular com glicose e ácido propiônico como fontes de carbono (Brämer *et al.*, 2001).

Este microrganismo apresenta um crescimento ótimo para temperaturas entre 28 e 30°C, é catalase e oxidase positiva e não forma esporos e, como resultado do acúmulo de polímeros de PHA, as colônias formadas são brancas e opacas (Brämer *et al.*, 2001).

Focando apenas a síntese de P(3HB), foram testadas as fontes de carbono xilose e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em *B. cepacia* e *B. sacchari*. Determinou-se que o nutriente limitante que permitia uma maior produtividade em PHA seria o fósforo e o azoto respectivamente, tendo-se obtido um rendimento de 0.22 g.g⁻¹ para ambas as espécies com glicose e xilose como fontes de carbono (Silva *et al.*, 2004).

Numa outra perspectiva, foi também avaliada a influência da expressão do gene que codifica a enzima xilose isomerase (*xyl*) na produção de polihidroxibutirato a partir de xilose em *B. sacchari*. Foi concluído que o aumento da expressão deste gene em estirpes *xyl*⁻ não tem qualquer efeito na síntese de P(3HB), pelo que a atividade desta enzima não é limitante para o uso de xilose (Lopes *et al.*, 2009).

Face aos resultados obtidos para *B. sacchari*, vários estudos foram realizados tendo em consideração diferentes abordagens. Foram construídos e caracterizados mutantes deficientes na síntese de polímeros de PHA (Filipov, 2000); foi avaliada a influência de diversas fontes de carbono na presença de glicose para a produção de biopolímeros, tendo como nutriente limitante o azoto (Buffoni, 2006); a capacidade de produção do copolímero P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanóico foi estudada (Mendonça, 2010) e foi realizada a avaliação do sistema de mobilização de PHA através de análise bioinformática, complementação heteróloga e criação de mutantes por transposição (Castellanos, 2010).

O estudo realizado por Buffoni (2006) demonstrou a capacidade da *B. sacchari* para produzir o copolímero P(3HB-co-3HHx) na presença de glicose e ácido hexanóico,

e, posteriormente, Mendonça (2010) avaliou diferentes estratégias para a confirmação e otimização desta síntese. Este trabalho consistiu no fornecimento de diferentes razões de glicose e ácido hexanóico, tendo-se obtido um polímero com uma fração máxima de 3HHx igual a 2 mol%.

Ao nível de ensaios em biorreator, Pradella *et al.* (2010) estudaram a produção de P(3HB) por uma cultura de elevada densidade de *B. sacchari* num reator *airlift*, em modo *batch* e *fed-batch*. A fonte de carbono utilizada foi sacarose e, no caso da produção em *fed-batch*, o nutriente limitante foi o azoto. Nestas condições, obteve-se uma produtividade de PHA igual a 1.7 g.L⁻¹.h⁻¹.

No que diz respeito a linhagens de *Burkholderia* recombinantes, Lau *et al.* (2010) estudaram a síntese de um novo polímero, 3-hidroxi-4-metilvalerato, em *B. cepacia*, comparando a selvagem e um recombinante com o gene da PHA sintase de *A. caviae*. A introdução do gene exógeno permitiu o aumento da produção deste polímero de 1 para 40% a partir de glicose ou frutose e ácido isocapróico como co-substrato. Isto demonstra que a PHA sintase de *A. caviae* é mais eficiente para a produção deste polímero, tendo-se verificado também a produção de 3HHx, formando um terpolímero.

Num estudo semelhante, Chee *et al.* (2012) avaliaram a produção de polímeros de PHA com o monómero 3HHx a partir de produtos de óleo de palmeira em estirpes recombinantes de *Burkholderia* sp. com gene de PHA sintase de *A. caviae*. Neste caso, foi conseguido um polímero com 1 mol% de 3HHx.

Materiais e Métodos

Linhagens Bacterianas e Plasmídeos

As bactérias utilizadas e os plasmídeos construídos estão descritos na Tabela 5. As novas linhagens recombinantes foram preservadas por suspensão em glicerol (10% w/v) e conservadas a -80°C.

Tabela 5 - Bactérias e plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Bactéria/ Plasmídeo	Características	Referência
<i>B. sacchari</i> LFM101	Linhagem selvagem: Sac ⁺ , PHA ⁺ , Hx ⁺ , Kan ^s , Amp ^s , Tc ^s	Brämer <i>et al.</i> , 2001
<i>B. sacchari</i> LFM936	<i>Burkholderia sacchari</i> LFM101 recombinante com pBBR1MCS-2 vazio; Sac ⁺ , PHA ⁺ , Hx ⁻ , Km ^r .	Mendonça, 2010
<i>B. sacchari</i> LFM344	Linhagem mutante UV incapaz de produzir polímero (PHA).	Oliveira <i>et al.</i> , 1998
<i>Aeromonas</i> sp. (TSM 81)	Isolados produtores de P(3HB-co-3HHx) a partir de óleo de soja.	Matsuda, 2009
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Produtora de P(3HB) a partir de óleo de soja e ácido láurico.	Seshadri <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Tc ^r , lacI ^q ZAM15, Tn10.	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> S17-1	Tc ^s , recA, genes de transferência do plasmídeo RP4 integrados no DNA genômico.	Simon <i>et al.</i> , 1983
pBBR1MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5,144 Kb), Km ^r .	Kovach <i>et al.</i> , 1995
<i>B. sacchari</i> LFM1034	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaPCJ de <i>Aeromonas</i> sp. (TSM81)	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1035	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaC de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1036	<i>B. sacchari</i> LFM101 recombinante com pBBR1MCS-2::phaJ de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1037	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaCJ de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1038	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaPC de <i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1039	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2 vazio	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1040	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaC de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1041	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaCB de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1042	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaCAB de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
<i>B. sacchari</i> LFM1043	<i>B. sacchari</i> LFM344 recombinante com pBBR1MCS-2::phaB de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho

*LFM- Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP; Sac⁺- crescimento em sacarose; PHA⁺- acúmulo de PHA; Hx⁻ - ausência de crescimento em ácido hexanóico; Kan^s – sensibilidade à canamicina; Amp^s – sensibilidade à ampicilina; Tc^s – sensibilidade à tetraciclina; Kan^r – resistência à canamicina.

Construção de Recombinantes

A criação de linhagens recombinantes com genes de *Aeromonas* foi realizada em duas linhagens de *B. sacchari*, LFM101 e LFM344. Os genes foram inseridos no plasmídeo pBBR1MCS-2 (Kovach *et al.*, 1995), aplicando técnicas de clonagem molecular já estabelecidas (Sambrook e Russell, 2001) ou segundo instruções dos fornecedores do material em uso.

Os diferentes genes clonados foram amplificados a partir do DNA genômico de *Aeromonas* sp. (TSM81) e *A. hydrophila*, purificado com o kit DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). A amplificação foi realizada por PCR (Eppendorf) com a DNA polimerase Phusion Hight-Fidelity (Thermo Scientific). Os *primers* desenhados estão apresentados na Tabela 6 e as condições de PCR na Tabela 7. Para *Aeromonas* sp. (TSM81) foram utilizados os *primers* reportados em Lu *et al.* (2004b) (*forward*: 5'-tttggtaccTGGAGACCGATGATGAATATGG (*KpnI*); *reverse*: 5'-acgaagcttTTAAGGCAGCTTGACCACGG (*HindIII*)) e para o desenho de *primers* para a *A. hydrophila* foi utilizada a sequência genômica presente na literatura (Seshadri *et al.*, 2006).

Tabela 6 - *Primers* utilizados para a amplificação dos diferentes genes de *A. hydrophila*.

Gene	Primers	Sequência	%GC	T _m (°C)*	Tamanho do fragmento (pb)
<i>phaC</i>	Forward	5'-atgcgtcgcacATGCTCCGTCACGACAGGCT (local de restrição: <i>Sall</i>)	60.0	67.1	1876
	Reverse	5'-tactctagaACCTCGAAGGGAGGCATGCTC (local de restrição: <i>XbaI</i>)	53.3	64.4	
<i>phaJ</i>	Forward	5'-attagtcgcacCATCCCGAGCGAAGGGCTGGA (local de restrição: <i>Sall</i>)	58.1	67.0	588
	Reverse	5'-tgccaattcTTTGGGGCGCACACCATAGC (local de restrição: <i>EcoRI</i>)	53.3	64.4	
<i>phaCJ</i>	Forward	5'-atgcgtcgcacATGCTCCGTCACGACAGGCT (local de restrição: <i>Sall</i>)	58.1	67.0	2464
	Reverse	5'-tgccaattcTTTGGGGCGCACACCATAGC (local de restrição: <i>EcoRI</i>)	53.3	64.4	
<i>phaPC</i>	Forward	5'-atcgaagcttGCGACCATAGAGCACAGAGGCT (local de restrição: <i>HindIII</i>)	58.1	67.0	2603
	Reverse	5'-tactctagaACCTCGAAGGGAGGCATGCTC (local de restrição: <i>XbaI</i>)	53.3	64.4	

*T_m básica (Wallace *et al.*, 1979)

Tabela 7 - Ciclos de PCR.

	Operão <i>Aeromonas sp.</i>	<i>phaC, phaJ, phaCJ, phaPC</i>
30x	98°C, 5 min	98°C, 6 min
	98°C, 10 s	98°C, 30 s
	61°C, 30 s	60°C, 45 s
	72°C, 2 min 30 s	72°C, 2 min 30 s
	72°C, 6 min	72°C, 10 min

Os *primers* foram desenhados a partir da aplicação do programa *FastPCR* (PrimerDigital). Foram adicionados os respetivos e adequados locais de restrição e algumas bases extra para uma digestão eficiente. Esta construção teve em consideração as características do inserto e do vetor, bem como algumas considerações relativas às suas propriedades (conteúdo em GC, complementaridade e temperatura de fusão).

Esta amplificação foi posteriormente verificada através da aplicação das amostras em gel de agarose 0.8%, em tampão de corrida TAE 1X (60 V, 60 mA, 60 min) (ver Anexo B). No caso do gene da TSM81, foi necessário efetuar uma extração da banda desejada com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Tanto os produtos de PCR como os plasmídeos utilizados ao longo do trabalho foram purificados e extraídos com QIAquick PCR Purification Kit e QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), respetivamente.

Posteriormente, o plasmídeo e os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição adequadas (Fermentas), durante 5 h a 37°C. A ligação foi realizada com a T4 DNA ligase (Fermentas), a 16°C, overnight, seguindo-se a transformação, por choque térmico, em *E. coli* XL1 Blue (Bullock *et al.*, 1987) (5 µL de ligação com 200 µL de células competentes). A seleção de transformantes foi efetuada em meio sólido com canamicina (50 µg.mL⁻¹), XGal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) (50 µL de solução de 2 mg.mL⁻¹) e IPTG (Isopropil-tio-β-D-galactosídeo) (20 µL de solução a 20%), para complementação da β-galactosidase. Foram selecionados os clones de cor branca para a realização de um *PCR screening* (PCR da própria colónia). Para cada transformação, foi feito um controlo para as células competentes, em meio sem antibiótico (viabilidade celular) e meio com antibiótico (teste de sensibilidade).

O plasmídeo dos clones positivos (Anexo F) foi extraído e inserido por transformação em *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983), cujos transformantes foram confirmados por PCR. A introdução do plasmídeo com o gene de interesse em *B. sacchari* foi realizado por conjugação como descrito em Mendonça (2010). A

confirmação da bactéria recombinante resultante foi efetuada por PCR e coloração de Gram (Gram, 1884).

Uma explicação mais detalhada de alguns métodos aplicados pode ser encontrada no Anexo C.

Avaliação do Mutante *B. sacchari* LFM344

No presente trabalho, a maioria dos recombinantes foram obtidos para a linhagem LFM344, uma estirpe que não possui a capacidade de sintetizar PHA. Para verificar em que gene ou genes foi afetada, realizou-se a complementação por conjugação com plasmídeos contendo genes de *R. eutropha* (*phaC*, *phaB*, *phaCB* e *phaCAB*). Após conjugação, avaliou-se a capacidade de acúmulo em meio mineral com canamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e glicose 10 g.L^{-1} , a 30°C durante 5 dias. Como controlo positivo foi utilizada a linhagem selvagem abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2. Este é um teste de opacidade: colónias que contêm PHA tornam-se mais opacas que aquelas que não acumulam polímero.

Ensaios de Acúmulo de PHA

As linhagens bacterianas recombinantes foram cultivadas a 30°C, em meio mineral (MM) (Anexo A), sob agitação a 150 rpm durante 72 horas. Ao MM, limitado em azoto, de forma a obter-se condições propícias ao acúmulo de PHA, foi adicionada glicose, com uma concentração final de 10 g.L^{-1} . A inoculação foi realizada com uma quantidade correspondente a 10% do volume de cultura de 24 h em Luria Bertani (LB). Após 24 h de incubação, foi adicionado ácido hexanóico a uma concentração final igual a 1 g.L^{-1} .

Foram retiradas amostras no tempo inicial e nas 24 e 72 horas de cultivo para análises posteriores (determinação de pH, biomassa, glicose, ácido hexanóico e PHA). Para todos os ensaios foram realizados cultivos em triplicado e ensaios controlo em MM apenas com glicose.

Metodologias Analíticas

Para cada amostra foram retirados 10 mL do cultivo, tendo-se procedido à sua centrifugação (6000 rpm, 4°C, 15 min) (Sorvall, Biofuge Primo R, Thermo Fisher Scientific). O sobrenadante resultante foi utilizado para a determinação de glicose e ácido hexanóico.

O pH foi analisado no sobrenadante num potenciômetro (Tecnal TEC-2) com calibração com padrões de pH de 4.0 e 7.0 a 25°C.

As concentrações de glicose e ácido hexanóico foram determinadas por cromatografia de fase líquida e de fase gasosa através do índice de refração e detecção UV, respetivamente (Gomez *et al.*, 1996).

O *pellet* resultante foi liofilizado (Triad, Labconco) e utilizado para a determinação da massa seca celular, quantidade e composição de PHA. A massa seca celular foi calculada através da Equação 1:

$$MSC = \left(\frac{MTL - MT}{V} \right) \times 1000$$

Equação 1

onde MTL corresponde à massa do tubo utilizado e do liofilizado obtido (g), MT à massa do tubo (g) e V ao volume de suspensão centrifugada (mL)

No que diz respeito à quantidade e composição de PHA, entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram submetidas a propanólise (Riis e Mai, 1988), para posteriormente os propil-ésteres obtidos serem analisados por cromatografia gasosa (Gomez, 2000).

Uma descrição mais pormenorizada dos métodos analíticos utilizados, como o modo de preparação das amostras pode ser encontrada nos Anexos D e E.

Resultados e Discussão

O presente trabalho pode ser dividido em diferentes etapas: obtenção de recombinantes, avaliação da linhagem de *B. sacchari* PHA⁻ e a determinação da quantidade e composição do PHA produzido pelos recombinantes.

Tal como descrito anteriormente, estudos anteriores demonstraram a capacidade da *B. sacchari* para acumular quantidades significativas de PHA (Gomez *et al.*, 1996; Filipov, 2000; Mendonça, 2010) e para produzir o copolímero P(3HB-co-3HHx) a partir de glicose e ácido hexanóico (Mendonça, 2010). Com o propósito de aumentar a percentagem molar de 3HHx no copolímero, foram construídos recombinantes com genes de *Aeromonas* sp. Foi escolhido este género devido à maior especificidade da PHA sintase para monómeros MCL, nomeadamente 3HHx, tal como já foi demonstrado por vários autores (Fukui e Doi, 1998; Kichise *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2000; Fukui *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Tsuge *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2004a; Xie e Chen, 2008; Shen *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

Neste caso particular, foi selecionada uma linhagem incapaz de produzir PHA, devido ao facto da presença simultânea de duas PHA sintase ativas conduzir à formação de grânulos com polímeros com composições diferenciadas em vez da formação de copolímeros P(3HA_{SCL}-co-3HA_{MCL}), tal como já foi demonstrado anteriormente para linhagens recombinantes de *P. oleovorans*, abrigando PHA sintases com diferentes especificidades (Steinbüchel e Lütke-Eversloh, 2003).

Em paralelo, foram igualmente clonados plasmídeos abrigando genes de *R. eutropha* com o objetivo de criar recombinantes para serem avaliados como referência. Com estes recombinantes pretendia-se verificar o restabelecimento da produção de PHA pela linhagem mutante e avaliar a capacidade dos genes de *Aeromonas* por comparação. A *R. eutropha* emerge como uma das bactérias mais estudadas para a produção de PHA, atingindo elevados teores destes polímeros. Relativamente à produção do monómero 3HHx, alguns autores já evidenciaram a sua produção em linhagens de *R. eutropha* selvagem (Gross *et al.*, 1989; Ulmer *et al.*, 1989) e recombinantes (Dennis *et al.*, 1998).

Avaliação da *B. sacchari* LFM344

Uma das linhagens de *B. sacchari* utilizadas no presente trabalho, nomeadamente a LFM344, não possui a capacidade para sintetizar PHA como resultado de uma mutação por UV (Oliveira *et al.*, 1998). Para verificar em que gene ou genes esta bactéria está afetada, ou seja, no operão completo ou apenas em alguns ou um dos seus genes constituintes, foi realizada a complementação heteróloga com genes de *R. eutropha*. Caso apenas o gene *phaC* possibilitasse a formação de PHA significaria que os genes *phaA* e *phaB* não estariam mutados. Por outro lado, se este não fosse suficiente e o *phaCB* fosse, apenas o gene *phaA* estaria afetado. No caso de todo o operão ter sofrido mutação, somente o *phaCAB* possibilitaria a complementação e o restabelecimento da capacidade de produção de PHA.

Como teste preliminar foi realizado um teste de acúmulo em meio sólido, cujo resultado está apresentado na Figura 4.

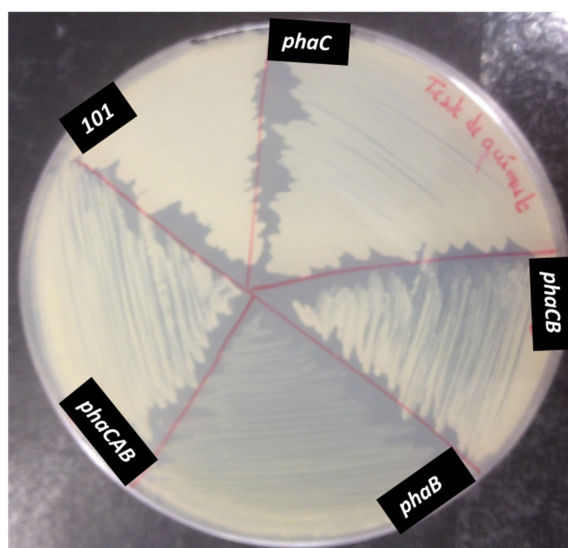


Figura 4 - Teste de acúmulo para recombinantes de *B. sacchari* LFM344 com genes de *R. eutropha*: *phaC*, *phaCB*, *phaB* e *phaCAB*. Linhagem selvagem, *B. sacchari* LFM101, como controlo positivo.

A síntese de PHA resulta em colónias mais opacas e com uma tonalidade mais branca, tal como se pode verificar para a linhagem selvagem. Deste modo, comparando as colónias obtidas para cada recombinante, verifica-se que o *phaC* é suficiente para que a bactéria consiga formar PHA, sendo que apenas a PHA sintase da *B. sacchari* foi afetada pela mutação. Isto sustenta que a *B. sacchari* LFM344 é uma linhagem

adequada para clonagem com genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas*. Ensaios de acúmulo foram realizados para confirmar este teste preliminar.

Clonagem molecular – obtenção de recombinantes

Numa primeira fase, foram desenhados os *primers* para os genes de *A. hydrophila*, englobando o promotor original desta bactéria. Após a determinação do melhor par de *primers*, foram adicionados os locais de restrição, para enzimas que não cortassem o gene em fragmentos e que fossem adequadas à inserção do gene na direção correta, ou seja, na orientação que permitisse a transcrição a partir do promotor *lac* presente no vetor. Optou-se pela utilização de duas enzimas diferentes e não complementares de forma a evitar a recirculação do vetor.

A determinação da temperatura de anelamento para todos os *primers* utilizados foi efetuada através da realização de um PCR com gradiente de temperaturas e posterior avaliação dos resultados em gel de agarose.

Adicionalmente, foram desenhados *primers* para o operon completo da *A. hydrophila* (*primer forward* – 5'- atcgaagcttGCGACCATAGAGCACAGAGGCT com *HindIII* e *primer reverse* – 5' – tgcgaattcTTTTGGGGCGCACACCATAGC com *EcoRI*). A sua amplificação por PCR foi conseguida, tal como se pode verificar pela Figura 5.

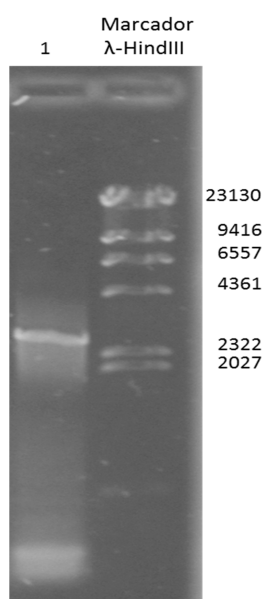


Figura 5 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8%:1-produto de PCR para o operon de *A. hydrophila*.

Contudo, após várias tentativas não foi possível obter clones positivos, no tempo disponível. Foram realizadas várias transformações, com variações no volume da reação de ligação (de 5 para 10 μ L) e no tempo de reação de digestão (de 5 para 7 h), contudo sem sucesso. Para este inserto foram escolhidas duas enzimas de restrição, a *Hind*III e a *Eco*RI, que estão muito próximas no local de restrição múltipla do vetor, o que pode dificultar uma digestão eficiente (Sambrock e Russel, 2001).

Para linhagens de *Aeromonas* isoladas por Matsuda (2009) foram utilizados os *primers* desenhados por Lu *et al.* (2004b). Foi testado um total de 12 linhagens, contudo apenas se conseguiu obter a banda correspondente ao operão *phaPCJ* para a TSM81. Neste caso, segundo Lu *et al.* (2004b), a banda desejada possui um peso molecular de aproximadamente 2700 pb, de acordo com o genoma de *Aeromonas caviae*, genoma que foi utilizado como referência para a construção dos *primers*. Neste caso, foi necessário efetuar uma purificação em gel já que os *primers* utilizados não eram específicos para as linhagens testadas.

A reação de ligação foi realizada, inicialmente, com uma razão inserto:vetor de 1:1 e posteriormente de 3:1, devido aos resultados negativos obtidos após a transformação. O aumento da quantidade de inserto favoreceu a sua ligação no vetor e assim possibilitou a obtenção de clones positivos. Não obstante, várias transformações foram realizadas antes que se conseguisse obter um clone positivo para cada gene ou grupo de genes de interesse.

Tal como referido na secção de Materiais e Métodos, os plasmídeos construídos foram, numa primeira etapa, clonados em *E. coli* XL1Blue para uma seleção mais fácil através da complementação da β -galactosidase (Bullock *et al.*, 1987) além da seleção por resistência à canamicina provida pelo vetor. Os clones brancos obtidos foram sujeitos a um PCR *screening*. Os positivos foram submetidos a um teste com enzimas de restrição, de modo a comparar os fragmentos obtidos com o vetor original digerido e com o produto de PCR do gene em questão. Caso as células tivessem sido transformadas com o produto da ligação, uma digestão simples resultaria no aumento do tamanho do plasmídeo, e uma digestão dupla resultaria em duas bandas, uma correspondente ao vetor vazio e outra ao gene. Nas Figura 6 e Figura 7 são apresentados os resultados obtidos para os clones de *E. coli* XL1Blue com genes de *Aeromonas* sp..

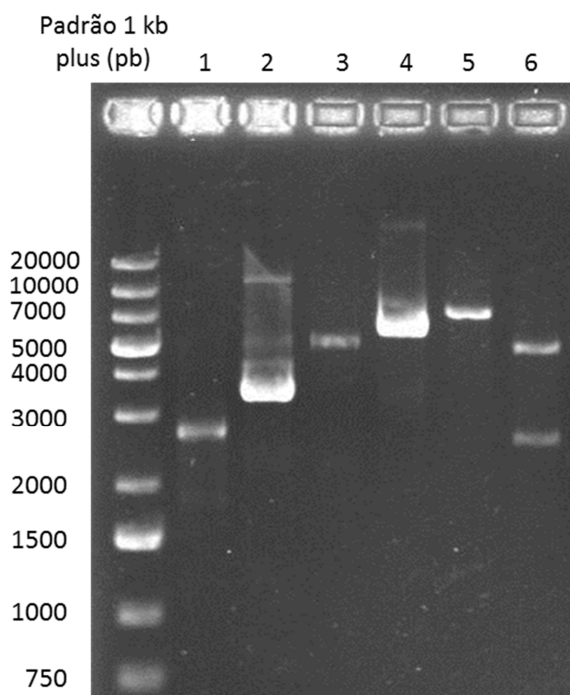


Figura 6 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% de clones de *E. coli* XL1Blue abrigando genes de *Aeromonas* TSM81: 1-produto de PCR *phaPCJ*; 2-pBBR1MCS-2; 3- pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*; 4-pBBR1MCS-2::*phaPCJ*; 5-pBBR1MCS-2::*phaPCJ* digerido com *HindIII*; 6-pBBR1MCS-2::*phaPCJ* digerido com *HindIII* e *KpnI*.

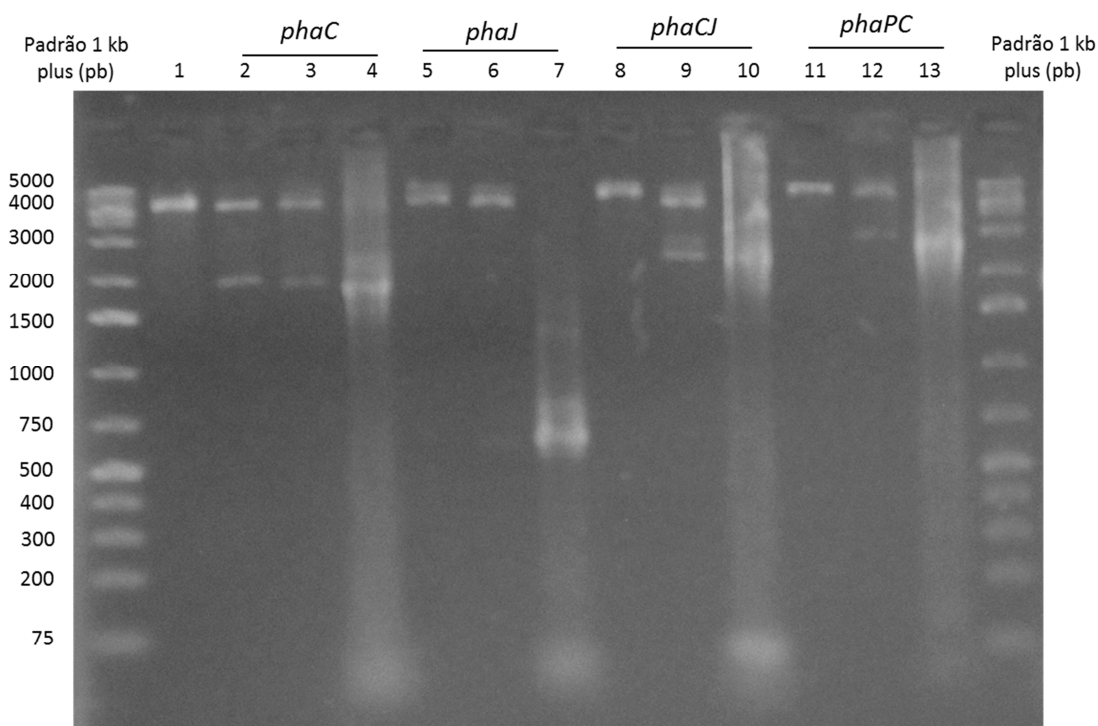


Figura 7 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% para os clones de *E. coli* XL1Blue abrigando genes de *A. hydrophila*: 1-pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*; 2 e 3-pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *Sall* e *XbaI*; 4-produto de PCR *phaC*; 5-pBBR1MCS-2::*phaJ* digerido com *Sall*; 6-pBBR1MCS-2::*phaJ* digerido com *Sall* e *EcoRI*; 7-produto de PCR *phaJ*; 8-pBBR1MCS-2::*phaCJ* digerido com *EcoRI*; 9-pBBR1MCS-2::*phaCJ* digerido com *EcoRI* e *Sall*; 10-produto de PCR *phaCJ*; 11-pBBR1MCS-2::*phaPC* digerido com *HindIII*; 12-pBBR1MCS-2::*phaPC* digerido com *HindIII* e *XbaI*; 13-produto de PCR *phaPC*.

Tal como se pode verificar pela análise da figura anterior, os clones avaliados possuem o vetor com o inserto correspondente ao gene de interesse. Em todos os casos, os produtos de digestão simples formaram bandas com peso molecular superior ao vetor original. A digestão dupla originou duas bandas, uma equivalente ao vetor e outra aos produtos de PCR, tal como se pode comprovar pela comparação das bandas e respetivos pesos moleculares. A banda correspondente ao *phaC* está compreendida entre 1500 pb e 2000 pb e, segundo a sequência disponível na literatura (Seshadri *et al.*, 2006) e os *primers* utilizados, este gene possui 1876 pb, pelo que os resultados estão concordantes com o esperado. O mesmo se verifica para os restantes genes: *phaJ* (588 pb) está entre 500 pb e 700 bp, *phaCJ* (2464 pb) está entre 2000 pb e 3000 pb; *phaPC* (2603) está entre 2000 pb e 3000 pb; operação de *Aeromonas* TSM81 ($\approx$ 2700 pb) está entre 2000 pb e 3000 pb.

A clonagem em *B. sacchari* foi realizada por conjugação e para tal foi necessário uma clonagem prévia em *E. coli* S17-1, uma linhagem criada para conjugação de bactérias Gram-negativas (Simon *et al.*, 1983). O isolamento de colónias de *B. sacchari* foi realizado em meio mineral sólido com sacarose e canamicina e, posteriormente, em meio LB sólido com canamicina. Tanto os clones desta linhagem como os de *B. sacchari* foram confirmados através de um PCR *screening*.

O gene *phaJ* foi clonado em *B. sacchari* LFM101 em vez de na linhagem mutante, uma vez que estando esta afetada na síntese de PHA, a criação de um recombinante sem a PHA sintase ativa não resultaria no acúmulo do polímero. Nas Figura 8 e Figura 9 estão apresentados os resultados obtidos para os recombinantes de *B. sacchari*.

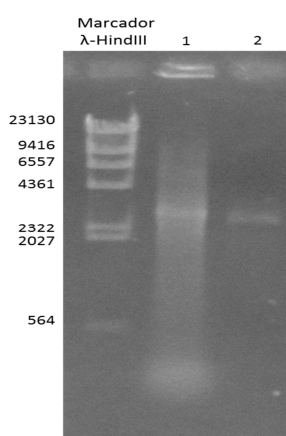


Figura 8 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% dos clones de *B. sacchari* com genes de *Aeromonas* TSM81: 1 - produto de PCR operação - controlo positivo; 2 - PCR de clone de *B. sacchari*.

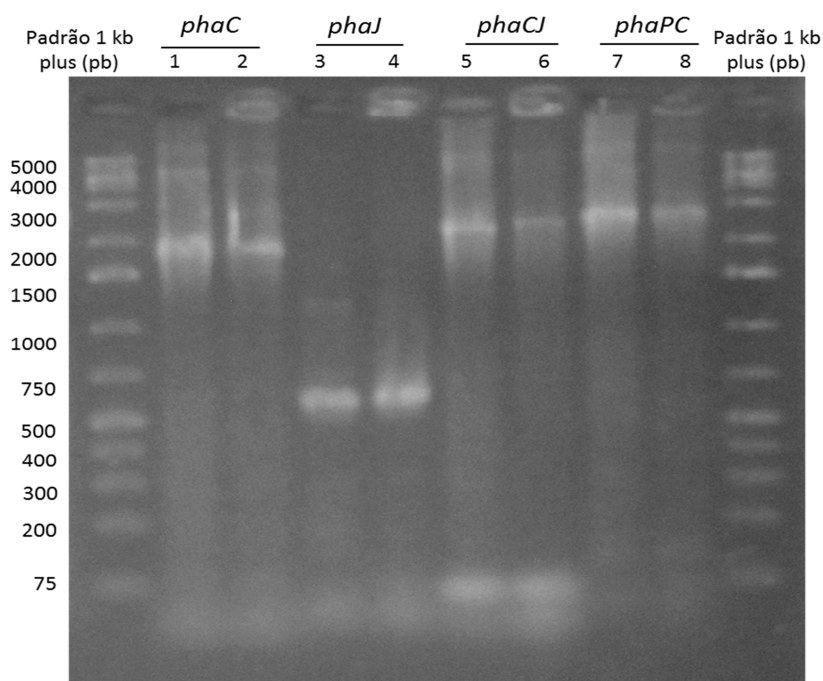


Figura 9 - Perfil de migração em gel de agarose 0.8% dos clones de *B. sacchari* com genes de *A. hydrophila*: 1, 3, 5 e 7 - produtos de PCR de *phaC*, *phaJ*, *phaCJ* e *phaPC* respectivamente - controlos positivos; 2, 4, 6 e 8 - PCR de clone de *B. sacchari* abrigando *phaC*, *phaJ*, *phaCJ* e *phaPC* respectivamente.

Comparando as bandas dos recombinantes com os controlos positivos, pode-se concluir que estes além de possuírem o plasmídeo (comprovado pelo crescimento em canamicina) possuem o gene de interesse. Além dos clones apresentados, foi construída uma linhagem recombinante com o vetor vazio para ser avaliado como controlo. Neste caso, a confirmação do clone restringiu-se apenas à verificação do crescimento em canamicina e à realização de coloração de Gram.

Além disso, foi realizado o sequenciamento dos genes *phaPC* e *phaCJ* de *A. hydrophila* para confirmar a sua presença nos recombinantes. No entanto, este sequenciamento apenas permite obter parte do gene, até cerca de 800 pb no sentido *forward* e no sentido *reverse*. Não obstante, as sequências obtidas são complementares às disponíveis na literatura (Seshadri *et al.*, 2006), tal como se pode verificar pelo emparelhamento apresentado no Anexo G.

No que diz respeito aos recombinantes de *B. sacchari* com genes de *Ralstonia eutropha* (*phaC*, *phaCB*, *phaCAB* e *phaB*), apenas foi efetuada a conjugação uma vez que já se encontravam disponíveis, no Laboratório de Bioprodutos, linhagens de *E. coli* S17-1 com plasmídeos com os genes supracitados. A confirmação destes recombinantes foi realizada apenas através de teste e ensaio de acúmulo. Não foram desenhados *primers* para estes genes, pelo que não foi possível comprovar as novas linhagens por

PCR. A extração dos plasmídeos e subsequente digestão também não foi conseguida, tanto aplicando kits de purificação como utilizando um protocolo de extração manual (Birnboim e Doly, 1979).

Ensaaios de acúmulo de PHA

A avaliação dos recombinantes obtidos foi realizada através de ensaios de acúmulo de PHA, tendo sido analisado o consumo dos substratos glicose e ácido hexanóico e o tipo de polímero produzido. O ensaio foi efetuado na presença de excesso de fonte de carbono e limitação em azoto, condições de cultivo adequadas ao acúmulo do polímero. Nestas condições, a bactéria, numa primeira fase, utiliza as fontes de carbono e o azoto para crescer e, quando o azoto se torna limitante, passa a utilizar a fonte de carbono para acumular polímero. Não obstante, estudos anteriores revelaram que a *B. sacchari* também acumula PHA durante a fase de crescimento (Gomez *et al.*, 1997; Mendonça, 2010).

Foram realizados também ensaios apenas com glicose como fonte de carbono, de forma a verificar se a síntese do monómero 3HHx ocorre apenas na presença do ácido hexanóico, ou se os recombinantes conseguem direcionar outros intermediários do seu metabolismo para esta síntese.

Foi utilizado ácido hexanóico como co-substrato, um ácido gordo de 6 carbonos, por ser utilizado pela bactéria como um dos precursores do monómero 3HHx (Buffoni, 2006; Mendonça, 2010) tal como já foi verificado para outros microrganismos (Brandl *et al.*, 1989; Gross *et al.*, 1989; Ulmer *et al.*, 1989; Haywood *et al.*, 1991; Dennis, 1994). Este ácido foi adicionado após 24 horas de ensaio, ou seja, na fase de limitação de azoto e consequente fase de acúmulo (Mendonça, 2010), de forma a promover o máximo de direcionamento deste substrato para a produção do monómero 3HHx.

No que diz respeito à análise do consumo de glicose e ácido hexanóico, os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados de glicose e ácido hexanóico para as diferentes linhagens de *B. sacchari* para amostras de 0 e 24 horas de ensaio.

	Glicose (g.L ⁻¹)		Ácido hexanóico (g.L ⁻¹)
	T ₀	T ₂₄	T ₂₄
LFM1035 (<i>phaC_{Ah}</i>)	7.88±0.84	3.52±0.38	0.76±0.08
LFM1036 (<i>LFM101 phaJ_{Ah}</i>)	7.10±1.40	5.17±0.42	0.74±0.04
LFM1037 (<i>phaCJ_{Ah}</i>)	7.45±0.38	5.02±0.61	0.81±0.08
LFM1038 (<i>phaPC_{Ah}</i>)	10.95±0.72	1.17±0.30	1.73±0.61
LFM1039 (<i>LFM344 pBBR1MCS-2</i>)	7.91±1.33	3.51±0.60	0.74±0.02
LFM1040 (<i>phaC_{Re}</i>)	12.31±0.60	ND	0.43±0.09
LFM1041 (<i>phaCB_{Re}</i>)	11.80±1.83	ND	1.22±0.08
LFM1042 (<i>phaCAB_{Re}</i>)	12.15±0.99	ND	1.22±0.21
LFM936 (<i>LFM101 pBBR1MCS-2</i>)	ND	ND	1.19±0.15

*ND – não detetável.

Para os açúcares são apresentados os resultados para as amostras do tempo inicial e do tempo correspondente a 24 horas de cultivo e para os ácidos apenas para o momento da sua alimentação. Não são apresentados os dados relativos às amostras de 72 h, uma vez que todas as amostras não apresentavam nem glicose, nem ácido hexanóico em solução. Tal facto já era esperado, pois, após 72 horas de cultivo, as células já consumiram todos os substratos e já entraram na fase estacionária e/ou fase de morte.

Relativamente à glicose, algumas amostras apresentam um valor superior ao esperado (10 g.L⁻¹), outras inferior e algumas amostras nenhuma glicose. Tais resultados devem-se, essencialmente, a erros de pipetagem para o primeiro caso e a erros inerentes a modificações ocorridas durante a manipulação das amostras para as outras situações. Previamente a serem tratadas, as amostras são congeladas, contudo estas sofreram algum descongelamento e posterior congelamento antes de serem processadas, o que pode ter conduzido ao consumo de glicose por alguma contaminação. Deste modo, em algumas amostras não se detetou glicose. Para o caso do recombinante LFM1034 não se detetou nenhum dos substratos em nenhuma amostra.

Na Tabela 9, são apresentados os resultados relativos à massa seca celular e ao polímero produzido.

Tabela 9 - Produção de PHA por linhagens de *B. sacchari* recombinantes a partir de glicose e ácido hexanóico.

Linhagem	Fonte de Carbono	Tempo (h)	MSC (g.L ⁻¹)	pH	PHA (mol%)		PHA (% MSC)
					3HB	3HHx	
<i>LFM1034</i> (<i>phaPCJ_{ATSM81}</i>)	Glicose	24	2.41±0.08	-	100.00±0.00	0.00±0.00	53.59±0.97
		72	3.76±0.85	6.54±0.02	100.00±0.00	0.00±0.00	46.31±5.64
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.39±0.13	-	100.00±0.00	0.00±0.00	52.96±1.20
		72	4.43±0.71	7.05±0.00	85.91±0.34	14.09±0.34	53.54±1.41
<i>LFM1035</i> (<i>phaC_{Ah}</i>)	Glicose	24	2.48±0.16	-	100.00±0.00	0.0±0.000	12.36±1.20
		72	3.05±0.04	6.67±0.03	100.00±0.00	0.00±0.00	23.01±2.83
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.36±0.27	-	100.00±0.00	0.00±0.00	8.32±2.28
		72	3.12±0.05	7.54±0.07	100.00±0.00	0.00±0.00	25.26±9.26
<i>LFM1036</i> (<i>LFM101 phaJ_{Ah}</i>)	Glicose	24	3.73±0.22	-	100.00±0.00	0.00±0.00	54.80±2.59
		72	4.47±0.25	6.69±0.03	100.00±0.00	0.00±0.00	43.82±16.95
	Glicose e ácido hexanóico	24	3.26±0.41	-	100.00±0.00	0.00±0.00	47.41±4.10
		72	3.68±0.26	7.47±0.10	99.28±0.11	0.72±0.11	57.53±2.39
<i>LFM1037</i> (<i>phaCJ_{Ah}</i>)	Glicose	24	3.23±0.35	-	100.00±0.00	0.00±0.00	52.05±4.44
		72	4.18±0.33	6.67±0.02	100.00±0.00	0.00±0.00	54.52±2.14
	Glicose e ácido hexanóico	24	3.92±0.25	-	100.00±0.00	0.00±0.00	54.86±0.40
		72	4.88±0.15	7.47±0.01	92.16±0.29	7.84±0.29	63.27±4.09
<i>LFM1038</i> (<i>phaPC_{Ah}</i>)	Glicose	24	3.22±0.57	-	100.00±0.00	0.00±0.00	66.42±7.86
		72	4.26±0.50	6.67±0.15	100.00±0.00	0.00±0.00	58.55±5.48
	Glicose e ácido hexanóico	24	3.07±0.87	-	100.00±0.00	0.00±0.00	50.85±12.09
		72	4.10±0.49	7.46±0.06	98.12±0.34	1.88±0.34	48.93±8.09
<i>LFM1039</i> (<i>LFM344 pBBR1MCS-2</i>)	Glicose	24	2.11±0.03	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
		72	2.32±0.09	6.67±0.01	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.17±0.09	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
		72	2.18±0.12	7.59±0.18	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
<i>LFM1040</i> (<i>phaC_{Re}</i>)	Glicose	24	3.42±0.44	-	100.00±0.00	0.00±0.00	50.02±19.70
		72	4.24±0.13	6.67±0.01	100.00±0.00	0.00±0.00	51.48±9.68
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.06±0.07	-	100.00±0.00	0.00±0.00	42.92±0.89
		72	3.36±0.31	7.44±0.02	96.47±0.33	3.53±0.33	33.81±1.96
<i>LFM1041</i> (<i>phaCB_{Re}</i>)	Glicose	24	1.76±0.30	-	100.00±0.00	0.00±0.00	3.01±0.43
		72	4.61±0.22	6.65±0.02	100.00±0.00	0.00±0.00	63.87.01±2.22
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.25±0.14	-	100.00±0.00	0.00±0.00	13.12±0.24
		72	4.60±0.06	7.44±0.04	94.66±0.38	5.34±0.38	47.95±0.55
<i>LFM1042</i> (<i>phaCAB_{Re}</i>)	Glicose	24	0.40±0.15	-	100.00±0.00	0.00±0.00	0.40±0.05
		72	5.41±0.31	6.70±0.01	100.00±0.00	0.00±0.00	59.44±2.11
	Glicose e ácido hexanóico	24	0.99±0.06	-	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
		72	2.92±0.13	7.36±0.05	97.42±0.33	2.58±0.33	28.11±3.00
<i>LFM936</i> (<i>LFM101 pBBR1MCS-2</i>)	Glicose	24	-	-	100.00±0.00	0.00±0.00	31.93±16.2
		72	4.21±0.30	6.50±0.05	100.00±0.00	0.00±0.00	49.25±1.00
	Glicose e ácido hexanóico	24	2.80±0.2	-	100.00±0.00	0.00±0.00	50.47±0.62
		72	4.92±0.26	7.48±0.04	98.24±0.34	1.76±0.34	49.05±1.43

Mendonça (2010) avaliou o efeito da modificação das condições de cultivo e acúmulo na capacidade da linhagem selvagem de *B. sacchari* para produzir o copolímero P(3HB-co-3HHx). De acordo com os seus resultados, um aumento na concentração de ácido hexanóico ($>1 \text{ g.L}^{-1}$) resulta num efeito inibitório sobre o crescimento. Utilizando-se a concentração de glicose a 10 g.L^{-1} é observado um aumento nos teores de 3HHx do copolímero, à medida que se aumenta a concentração de ácido hexanóico fornecida. Concentrações maiores de glicose, até 15 g.L^{-1} conduzem a um aumento da produção do polímero.

Considerando as condições avaliadas no presente trabalho, em estudos anteriores a linhagem selvagem de *B. sacchari* demonstrou capacidade para produzir PHA ($39.47 \pm 8.20\%$ MSC) com uma percentagem molar do monómero 3HHx igual a $1.02 \pm 0.30 \text{ mol\%}$, na presença de glicose e ácido hexanóico. Aquando da adição de apenas glicose, a bactéria produziu apenas P(3HB) (Mendonça, 2010).

Relativamente aos controlos avaliados, ou seja, à linhagem selvagem e à linhagem PHA negativa, ambas com o vetor vazio, verifica-se que a presença do plasmídeo não produz qualquer efeito na produção ou ausência de produção do polímero. A linhagem LFM1039 não reestabeleceu a capacidade de produção de PHA e comparando os teores de PHA da LFM936 ($1.76 \pm 0.34 \text{ mol\%}$) com a LFM101, estes não são significativamente diferentes. Todos os recombinantes construídos para a linhagem LFM344 demonstraram a recuperação da capacidade de acúmulo de PHA, confirmando os resultados obtidos pelo teste em meio sólido.

Considerando os resultados em termos do PHA total produzido para todos os recombinantes, na Figura 10 estão representados os dados obtidos sob a forma de gráfico.

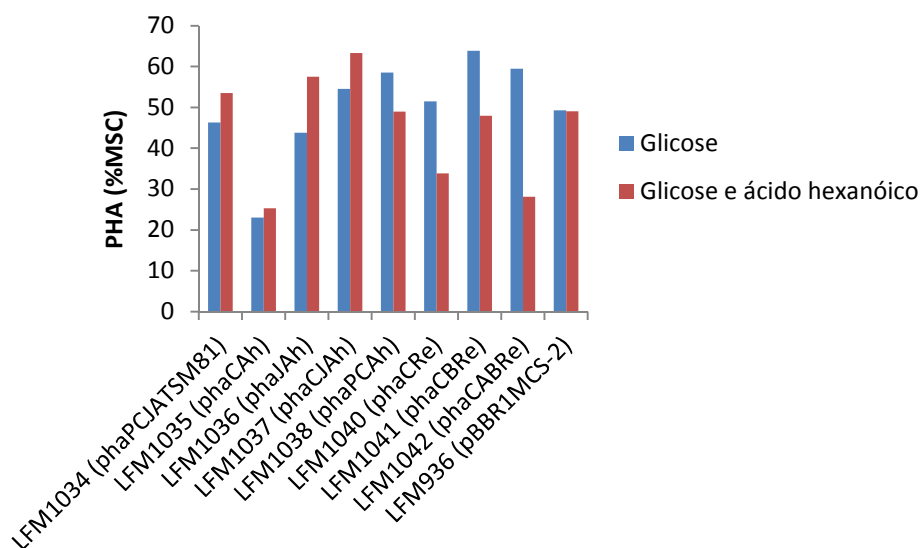


Figura 10 - Representação gráfica do PHA total produzido pelos diferentes recombinantes de *B. sacchari*.

Em alguns casos, verifica-se a diminuição do acúmulo (LFM1042 e LFM1040 na presença de glicose e ácido hexanóico e LFM1035 nas duas situações) e em outros, o aumento (LFM1036, 1037 e 1038). Contudo, este acúmulo depende de outros fatores como o crescimento celular que em alguns casos foi reduzido. Não obstante, pode-se concluir que os plasmídeos clonados não representam uma carga metabólica superior para a célula, já que o crescimento foi comparável com o obtido para a linhagem selvagem. Para a linhagem LFM1035 é necessário realizar um novo ensaio para verificar se o baixo crescimento foi devido a alguma condição adversa no momento da realização do cultivo. A justificativa é plausível já que na presença do gene *phaC* acoplado a outros como o *phaP* e *phaJ* não se verificou nenhuma inibição no crescimento celular.

Comparando com linhagens de *Aeromonas*, tal como esperado, o valor de PHA total obtido é consideravelmente superior o que justifica a construção de recombinantes de *B. sacchari* e não a manipulação de espécies de *Aeromonas* (*Aeromonas* produz pouco PHA quando comparada à *B. sacchari*). No que se refere às linhagens de *R. eutropha*, o valor de PHA total obtido ainda se encontra inferior aos 80% MSC característicos desta espécie (Lee *et al.*, 1999; Kahar *et al.*, 2004), contudo deve-se levar em conta que os resultados apresentados foram obtidos para ensaios em frascos agitados. Em biorreator, onde as condições são controladas, o acúmulo de PHA esperado é superior.

No que diz respeito às linhagens de *Aeromonas*, estudos realizados por Matsuda (2009) evidenciaram a sua capacidade para produção de PHA e do copolímero P(3HB-co-3HHx) com até 13 mol% de 3HHx. A linhagem TSM81 produziu um total de polímero igual a 4.45% MSC com 7.85 mol% de 3HHx, a partir de ácido láurico. Os ensaios realizados com *A. hydrophila* não revelaram a presença do copolímero e a produção de PHA foi relativamente baixa (<2.5% MSC). Esta linhagem demonstrou uma capacidade reduzida para metabolizar óleos vegetais e ácidos gordos, contudo há que ter em atenção que o ensaio realizado resultou num crescimento muito reduzido (<0.3 g.L⁻¹), pelo que em condições de cultivo otimizadas, esta linhagem poderia sintetizar o copolímero, tal como já foi verificado por outros autores para a linhagem selvagem (Lee *et al.*, 2000) e para linhagens recombinantes (Lu *et al.*, 2004a; Han *et al.*, 2004; Qiu *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006; Jian *et al.*, 2010).

Este género possui a capacidade de direccionar intermediários de 6 carbonos da β -oxidação de ácidos gordos para a síntese de PHA a partir de óleos vegetais e ácidos gordos. Contudo, a partir de glicose, apenas produzem P(3HB) ou não produzem qualquer PHA, tal como foi demonstrado para as linhagens utilizadas no presente trabalho. A produção de PHA por este género ocorre apenas a partir de intermediários da β -oxidação de ácidos gordos, não mostrando a capacidade para a utilização de hidratos de carbono para esta síntese (Matsuda, 2009).

No que diz respeito aos ensaios apenas com glicose como fonte de carbono, o polímero formado por todos os recombinantes é composto apenas pelo monómero 3HB. Neste caso, a célula tinha apenas açúcar disponível, pelo que a formação de PHA foi realizada somente através da via de biossíntese a partir de hidratos de carbono. Neste caso, são formados apenas monómeros de cadeia curta.

Relativamente aos recombinantes com genes de *R. eutropha*, todas as combinações de genes clonadas revelaram a formação do copolímero com percentagens molares de 3HHx superiores às obtidas com a linhagem selvagem. A PHA sintase de *R. eutropha* tem uma maior afinidade para monómeros SCL (Tsuge, 2002; Khanna e Srivastava, 2005), contudo, comparando com a de *B. sacchari*, possibilita o direccionamento de uma maior quantidade de intermediários da β -oxidação para a síntese de monómeros MCL, nomeadamente 3HHx. Estes resultados estão de acordo com outros estudos onde linhagens selvagens de *R. eutropha* foram avaliadas para a produção de copolímeros com o monómero 3HHx, tendo-se obtido uma percentagem molar deste monómero

igual a 2.2 mol% (Gross *et al.*, 1989, Ulmer *et al.*, 1989). Contudo, apesar destes recombinantes terem possibilitado obter copolímeros com percentagens de 3HHx superiores à linhagem selvagem, Dennis e colaboradores (1998), através da clonagem dos genes *phaCB* de *R. eutropha* em linhagens de *Klebsiella aerogenes* e *R. eutropha* PHA negativa, conseguiram obter copolímeros com percentagens superiores, 31 e 10 mol% de 3HHx a partir de ácido láurico e ácido hexanóico, respetivamente. Por outro lado, Kahar e o seu grupo (2004) conseguiram a produção do copolímero em linhagens de *R. eutropha* recombinantes apenas com o gene *phaC* de *A. caviae*. A linhagem selvagem não demonstrou capacidade para produzir o copolímero.

Verifica-se que a presença simultânea dos genes *phaC* e *phaB* (LFM1041) de *R. eutropha* resulta num copolímero com uma maior percentagem molar de 3HHx (5.34 ± 0.38 mol%) quando comparado com os demais recombinantes (LFM1040, 3.53 ± 0.33 mol% e LFM1042, 2.58 ± 0.33 mol%) construídos a partir de genes deste microrganismo. Estudos anteriores revelaram que o gene *phaB* catalisa a conversão de intermediários da β -oxidação em (R)-3-hidroxiacil-CoA (Haywood *et al.*, 1988, Dennis *et al.*, 1998), pelo que, na presença de ácido hexanóico, deve catalisar a conversão de 3-cetohexanoil-CoA a (R)-3-hidroxihexanoil-CoA. Pensa-se que a diminuição do nível de expressão do gene *phaA* obriga a via de síntese de PHA a recorrer a intermediários da β -oxidação, favorecendo a tiólise e, conseqüentemente, o acúmulo de acetoacetyl-CoA e 3-cetohexanoil-CoA. Estes compostos são então reduzidos pela PhaB formando os substratos para a síntese do copolímero. Além disso, a ausência do gene *phaA* de *R. eutropha* diminui o fluxo de 3-cetoacetyl-CoA para a síntese de 3HB (Dennis *et al.*, 1998).

O recombinante com apenas o gene *phaB* não foi avaliado em ensaio de acúmulo, uma vez que este não produziria PHA, já que a linhagem mutante está afetada na PhaC. Não obstante, estudos realizados por Mendonça (2010) com linhagens recombinantes com este gene demonstraram que esta clonagem não conduz a um aumento da percentagem de 3HHx. Com os resultados do presente trabalho, verifica-se que o aumento do monómero 3HHx requer a presença das enzimas PhaC e PhaB, podendo-se concluir que a PHA sintase de *R. eutropha* em determinadas condições possui uma maior afinidade para monómeros de 6 carbonos quando comparada com a de *B. sacchari*.

No caso do operão completo de *Aeromonas* sp. TSM81, tal como esperado, a percentagem molar de 3HHx aumentou consideravelmente. A presença dos genes

constituintes do operão possibilitaram o direcionamento de uma maior quantidade de intermediários da β -oxidação para a síntese de PHA. A PhaJ catalisou a conversão de 3-cetohexanoil-CoA a (R)-3-hidroxihexanoil-CoA e, na presença da PHA sintase de *Aeromonas*, que possui uma maior afinidade para monómeros MCL (Fukui e Doi, 1998; Fukui *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Fukui *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003), foi possível a síntese de um copolímero com uma percentagem molar de 3HHx superior (14.09 ± 0.34 mol%), comparado com a linhagem selvagem (Tabela 9). Resultados semelhantes foram obtidos por Park *et al.* (2001) e Lu *et al.* (2004b) para linhagens de *E. coli* recombinantes com o operão de *Aeromonas*, a partir de ácido láurico. No estudo realizado por Lu e o seu grupo (2004b), a percentagem molar de 3HHx obtida foi relativamente elevada (28.54 mol%), uma vez que foram expressos também outros genes, nomeadamente a acil-CoA desidrogenase que permite o aumento do fluxo de enoil-CoA a partir de acil-CoA, um intermediário que participa na via de síntese de monómeros de PHA (Park *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2006).

A clonagem do gene *phaC* de *A. hydrophila* sozinho não resultou na formação do copolímero, apesar de ter sido suficiente para restabelecer a capacidade de acúmulo de PHA. Comparando esta linhagem (LFM1035) com as restantes, verifica-se que o seu crescimento foi mais reduzido, o que se refletiu na quantidade total de PHA produzido ($23.01 \pm 2.83\%$ MSC para ensaio com glicose, $25.26 \pm 9.26\%$ MSC para ensaio com glicose e ácido hexanóico). Deste modo, como a produção foi baixa, a célula pode ter produzido o monómero 3HHx, mas em quantidades não detetadas. Investigações realizadas por Fukui e Doi (1998), Kahar *et al.* (2005), Mifune *et al.* (2010) e Ng *et al.* (2011) revelaram que a presença do gene da PHA sintase de *Aeromonas* permite o acúmulo de polímeros de PHA com monómeros de 3HHx com frações molares até 9.90 mol%. Deste modo, era esperado que a *B. sacchari* LFM1035 (Tabela 9) apresentasse pelo menos alguma produção do copolímero, visto que, de acordo com os ensaios de complementação, apenas o gene *phaC* do hospedeiro sofreu mutação. Assim, para confirmar esta hipótese será necessário repetir o ensaio. Por outro lado, durante a clonagem, o gene *phaC* pode ter sofrido alguma alteração. Para verificar esta situação seria necessário realizar o seu sequenciamento e alinhamento com sequências disponíveis na literatura.

Tal como referido anteriormente, a enzima PhaJ de *Aeromonas* é caracterizada pela conversão de intermediários da β -oxidação (*trans*-2-enoil-CoA) a compostos que podem

ser utilizados na síntese de PHA ((R)-3-hidroxiacil-CoA). Fukui e Doi (1998) demonstraram que a PhaJ de *A. caviae* fornece intermediários de 4 e 6 carbonos à síntese de PHA via oxidação de ácidos gordos e óleos vegetais e várias outras investigações evidenciaram que a presença deste gene promove o aumento da fração molar de 3HHx no copolímero (Fukui *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2001; Fukui *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003). Deste modo, na presença do ácido hexanóico era esperado que a linhagem LFM1036 possibilitasse obter um copolímero com uma percentagem molar de 3HHx superior ao obtido para a linhagem selvagem.

No entanto, de acordo com os resultados obtidos (Tabela 9), não se verifica uma alteração significativa. Tais resultados são semelhantes aos obtidos por Fukui *et al.* (2001) para linhagens de *A. caviae* e por Han *et al.* (2004) para linhagens de *A. hydrophila* quando avaliada a superexpressão do *phaJ*. Para *B. sacchari* os mesmos resultados já tinham sido obtidos por Mendonça (2010) para genes de *P. aeruginosa* codificantes de uma enoil-CoA hidratase. Para ambos os estudos verificou-se um aumento da síntese de PHA, mas não da fração molar de 3HHx, nem do fluxo deste monómero para a síntese de PHA. Estes resultados podem ser explicados pela não expressão do gene ou pela sua expressão na forma de uma proteína inativa. Outra possibilidade remete à PHA sintase da *B. sacchari*, os monómeros de 3HHx podem ser sintetizados, mas esta enzima pode não ser capaz de polimerizá-los completamente, ou por inibição ou pelo facto da sua afinidade ser maior para monómeros de cadeia curta.

Por outro lado, quando os genes *phaC* e *phaJ* são expressos simultaneamente, já se verifica o esperado, o aumento da fração molar de 3HHx (7.84 ± 0.29 mol%). O contrário foi verificado para a linhagem com o gene *phaPC*, a sua expressão não provoca qualquer alteração no rendimento final (1.88 ± 0.34 mol%), possibilitando apenas a formação de um copolímero com características monoméricas semelhantes ao obtido com a linhagem selvagem. Contudo, deve-se levar em conta que o ensaio realizado com este recombinante foi efetuado na presença de uma concentração de ácido hexanóico superior, o que pode ter conduzido a alguma inibição.

Não obstante, estes resultados levam a concluir que a presença do complexo *phaCJ* é necessária para o aumento do direcionamento de intermediários de 6 carbonos da via β -oxidação para a síntese de PHA. Em recombinantes de *E. coli*, abrigando os genes *phaC* e *phaJ* de *A. caviae*, conseguiu-se produzir o copolímero com percentagens de 3HHx iguais a 26.05 mol% (Lu *et al.*, 2003) e 17.00 mol% (Fukui *et al.*, 1999), a partir

de ácido láurico. Além disso, o estudo realizado por Han e colaboradores (2004), no qual foram avaliadas diferentes combinações dos genes do operão *phaPCJ* em *A. hydrophila*, evidenciou que o grupo *phaCJ* possibilita a formação de P(3HB-co-3HHx) com uma fração molar de 3HHx superior (22.7 mol%).

Porém, é de referir que o aumento verificado não foi tão acentuado quanto para a linhagem LFM1034 que abriga o operão completo. Estes resultados poderiam ser indicativos que a presença da PHAsina é importante para a síntese do copolímero. Estudos anteriores demonstraram que esta enzima é responsável pela estabilidade do grânulo e pela regulação do seu tamanho (Sudesh *et al.*, 2000; Luengo *et al.*, 2003). Tian e colaboradores (2005) avaliaram o efeito do aumento do número de cópias do gene *phaP* em *A. hydrophila*, tendo obtido uma fração molar de 3HHx superior à obtida para a linhagem selvagem (de 14 para 21 mol%). Contudo, o peso molecular dos polímeros diminuiu, a superexpressão da PHAsina conduziu ao aumento do número de grânulos, mas à diminuição do seu tamanho. Este grupo concluiu ainda que a PHAsina regula o gene da PHA sintase ao nível da transcrição.

Han *et al.* (2004) sugerem que as interações hidrofóbicas entre a PhaP e os polímeros de PHA crescentes podem conduzir à formação de corpos de inclusão, acelerando o processo de polimerização. Pode-se concluir que a função desta enzima é dependente de vários fatores que nem sempre se conhecem, pelo que a sua função tem que ser estudada mais pormenorizadamente. Não obstante, relativamente ao presente trabalho não se pode afirmar que a presença da PhaP é uma estratégia de otimização da formação de P(3HB-co-3HHx), uma vez que os genes avaliados são de linhagens de *Aeromonas* diferentes. Para que a comparação fosse mais correta seria necessário avaliar uma linhagem com o operão da *A. hydrophila*.

Na Figura 11, estão representados os resultados obtidos tendo em consideração apenas a percentagem molar de 3HHx presente nos copolímeros produzidos.

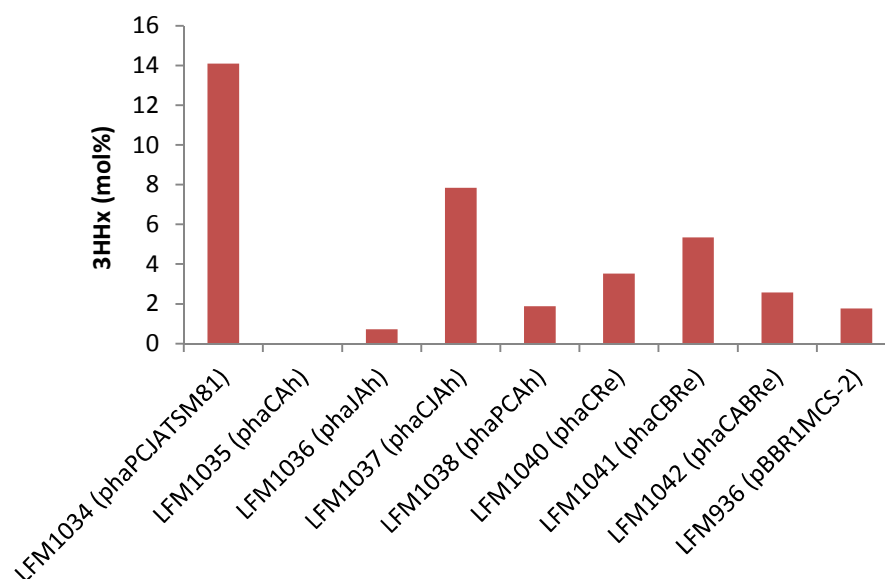


Figura 11 - Representação gráfica da percentagem molar de 3HHx obtida para as linhagens recombinantes de *B. sacchari* a partir de glicose e ácido hexanóico.

Analisando a figura anterior, pode-se concluir que o recombinante que permitiu obter melhores resultados foi o LFM1034, isto é, aquele que contém o operão completo de *Aeromonas* sp., seguindo-se a linhagem LFM1037. Comparando com as linhagens com genes de *R. eutropha*, estas, apesar de possibilitarem frações molares superiores à linhagem selvagem, ficam aquém dos recombinantes com genes de *Aeromonas*. Tal facto é facilmente justificado pela diferença de especificidade das PHA sintases avaliadas, tal como já foi discutido anteriormente. No entanto, algumas investigações anteriores atingiram percentagens molares de 3HHx superiores às obtidas no presente trabalho para outras espécies bacterianas, como *E. coli* (Fukui *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004b).

No que diz respeito a linhagens de *Burkholderia* sp., existem poucos estudos publicados. Lau *et al.* (2010) estudaram a síntese de PHA, em *B. cepacia*, comparando a selvagem e um recombinante com o gene da PHA sintase de *A. caviae*. Contudo, este grupo não tinha como objetivo a produção de P(3HB-co-3HHx). Por outro lado, Chee *et al.* (2012) avaliaram a produção de polímeros de PHA com o monómero 3HHx em *Burkholderia* sp. com gene de PHA sintase de *A. caviae*. Neste caso, foi conseguido um polímero com 1 mol% de 3HHx a partir de óleo de palmeira.

Portanto, os recombinantes construídos possibilitaram obter um copolímero com frações molares de 3HHx superiores àquele produzido pela linhagem selvagem e

bactérias recombinantes avaliadas por outros grupos. No entanto, a produção obtida ainda pode ser otimizada através da aplicação de diferentes estratégias que serão enumeradas na secção seguinte.

Além disso, foi realizado um ensaio em biorreator para a linhagem LFM1034, em meio mineral. Neste experimento, obteve-se uma produção de PHA correspondente a 70.84% MSC com teor de 3HHx igual a 22,24 mol%. O ensaio foi realizado com alimentação de glicose:ácido hexanóico (140:45 g.L⁻¹) com um caudal de alimentação de 4,95 mL.h⁻¹, calculada de maneira a que toda a fonte de carbono fornecida fosse prontamente consumida pelo microrganismo. Este ensaio durou 50.8 horas, tendo-se obtido um crescimento celular igual a 15,94 g.L⁻¹. Num experimento realizado nas mesmas condições para a linhagem selvagem, Mendonça (dados não publicados) obteve uma produção igual a 74,51% MSC de PHA com 0,66 mol% de 3HHx para uma concentração celular igual a 14,40 g.L⁻¹. Estes resultados reforçam as conclusões anteriores de que a presença dos genes de *Aeromonas* promove significativamente a formação de P(3HB-co-3HHx) com frações molares de 3HHx superiores.

Conclusões e Perspetivas Futuras

Investigadores e industriais têm procurado uma alternativa sustentável para substituir os plásticos de origem petroquímica devido aos problemas ambientais que estes acarretam. Os PHA ganharam rapidamente interesse quer na área de investigação quer na indústria, na medida em que a sua versatilidade estrutural e características têm sido exploradas e aplicadas em vários setores (Khanna e Srivastava, 2005). Neste sentido, o presente trabalho tentou responder a esta necessidade através da criação de recombinantes de *B. sacchari* para a produção do copolímero P(3HB-co-3HHx).

Foi utilizada uma linhagem deficiente na capacidade de acúmulo de PHA de forma a evitar a formação de misturas de polímeros com diferentes características. Através de um teste de acúmulo com recombinantes abrigando genes de *R. eutropha* concluiu-se que esta linhagem está afetada por uma mutação no gene da PHA sintase. Deste modo, foi efetuada a clonagem de genes de *Aeromonas* tendo-se obtido recombinantes com diferentes combinações dos genes constituintes do operão *pha*.

Os ensaios realizados permitiram confirmar a capacidade de acúmulo de P(3HB-co-3HHx) por linhagens de *B. sacchari* recombinantes, a partir de glicose e ácido hexanóico. A presença de genes exógenos não representou um aumento da carga metabólica para as células. Como era esperado, os recombinantes produziram um PHA total superior ao verificado para linhagens de *Aeromonas* e próximo ao obtido para linhagens de *R. eutropha*, quando avaliado o recombinante LFM1034 em reator.

A presença do operão completo de *Aeromonas* sp. possibilita a produção de um copolímero com uma fração molar de 3HHx superior (14.09 mol%), seguindo-se a linhagem LFM1037. Comparando com as linhagens com genes de *R. eutropha* e com a linhagem selvagem, a clonagem com genes de *Aeromonas* emerge como a melhor estratégia, como resultado da maior especificidade da PHA sintase deste género para monómeros de cadeia média.

Em suma, no contexto em que foi desenvolvido este trabalho, a clonagem de genes de *R. eutropha* e *Aeromonas* sp. possibilitou obter o copolímero P(3HB-co-3HHx) com diferentes frações molares de 3HHx, superiores à linhagem selvagem e a bactérias do género *Burkholderia* recombinantes avaliadas por outros grupos. Neste sentido, estes resultados são promissores para o desenvolvimento de novos processos para a produção de copolímeros com percentagens molares de 3HHx entre 2 e 22 mol%. A linhagem

LFM1034 avaliada em ensaio em biorreator, apresentou uma elevada percentagem de acúmulo de PHA (70.84% MSC), característica da bactéria *B. sacchari* quando cultivada em maior escala. Nestas condições, obteve-se o copolímero com fração molar de 3HHx mais elevada (22.24 mol%).

Não obstante, diferentes estratégias podem ainda ser avaliadas e implementadas para a otimização da produção deste copolímero, quer ao nível da manipulação genética quer ao nível das condições de cultivo.

Tal como foi referido anteriormente, não foi possível a clonagem do operão completo de *A. hydrophila* para verificar a relevância do gene *phaP*. Deste modo, o aumento do tempo da reação de digestão enzimática para overnight seria uma das estratégias a aplicar para a clonagem deste operão, bem como o aumento da razão inserto:vetor na reação de ligação. Uma alternativa seria realizar uma reação de desfosforilação do vetor, de forma a evitar a sua recirculação e assim promover a sua ligação com o inserto (Sambrock e Russel, 2001).

Neste caso, foi incluído o promotor original do operão, tendo sido clonado sob o controlo do promotor *lac* presente no vetor. Han e colaboradores (2004) avaliaram a influência da presença do promotor original no vetor, tendo verificado que a expressão dos genes é mais significativa quando sob o controlo deste do que do promotor *lac*. Um estudo a realizar seria portanto a avaliação do efeito do promotor de *Aeromonas* em células de *B. sacchari*, tanto sob a influência do promotor *lac* como apenas na presença do promotor original.

Por outro lado, já foi demonstrado que a superexpressão de genes responsáveis pela síntese de PHA através do aumento do número de cópias contribui para o aumento da percentagem molar de 3HHx no copolímero P(3HB-co-3HHx) (Han *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005). Deste modo, uma estratégia de otimização seria a clonagem de plasmídeos com mais do que uma cópia do gene de interesse e a sua avaliação no que diz respeito ao seu efeito na quantidade e composição do polímero formado. Contudo, há que ter em consideração que este incremento pode levar ao aumento da carga metabólica e assim provocar a inibição do crescimento celular.

Relativamente às linhagens de *Aeromonas* testadas, apenas se conseguiu isolar o operão de uma (TSM81). Os *primers* utilizados foram criados tendo como referência apenas a sequência de *A. caviae*, a única linhagem de *Aeromonas* sequenciada até à data. Contudo, atualmente, já existem mais genomas disponíveis na literatura,

nomeadamente o da *A. hydrophila* ATCC 7966 (Seshadri *et al.*, 2006) e *A. salmonicida* (Reith *et al.*, 2008). Deste modo, efetuando o seu alinhamento, foi possível a construção de *primers* degenerados para os genes do operão *pha* (*primer forward* 5'-gcgaagcttACGTGYGTTTGAACAGAGCA com *Hind*III e *primer reverse* 5'-tgccaattcGGCGVKYATTYTAGGCAGTMCR com *Eco*RI). Este par de *primers* pode ser avaliado para as restantes linhagens de *Aeromonas* isoladas por Matsuda (2009) e assim isolar genes de linhagens que tenham apresentado resultados melhores em termos de fração molar de 3HHx como foi o caso da TSM21. Além disso, os *primers* desenhados para a *A. hydrophila* também podem ser testados nestas linhagens.

Noutra perspetiva, o sequenciamento do operão da *Aeromonas* sp. TSM81 e o seu alinhamento com os genomas já disponíveis na literatura, permitiria avaliar o grau de similaridade entre os genes e identificar aminoácidos importantes para a sua função. Deste modo, após a sua identificação, podem-se realizar mutações dirigidas e, assim, obter genes que conferem uma maior capacidade de acúmulo às bactérias que os contêm.

No que diz respeito às condições de cultivo, em trabalhos futuros, sugere-se que seja avaliado o efeito da concentração de ácido hexanóico no crescimento celular e produção do copolímero, sendo uma forma de controlar o tipo de polímero que se pretende obter. Do mesmo modo, a utilização de outros substratos, nomeadamente ácido láurico, ácido butírico e compostos mais baratos como ácido oleico e linoleico devem ser avaliados de forma a verificar a eficiência dos diferentes recombinantes na conversão destes compostos para a síntese de PHA. Estes ácidos são degradados pela célula através da β -oxidação, formando intermediários que podem ser direcionados para a via de síntese de PHA pelas enzimas PhaJ e PhaB de *Aeromonas* e *R. eutropha* respetivamente. No caso dos ácidos láurico, oleico e linoleico, após alguns ciclos da via β -oxidação, formam-se compostos de 6 carbonos que depois podem ser reduzidos e incorporados no polímero e produzir P(3HB-co-3HHx). Adicionalmente, podem ser formados terpolímeros, como resultado da incorporação de diferentes monómeros, como já foi verificado por Tsuge *et al.* (2003) e Zhang *et al.* (2009).

Por outro lado, o ácido butírico é um composto de 4 carbonos, pelo que a formação de monómeros com 6 carbonos requer a condensação de acetil-CoA com butiril-CoA. Fukui e colaboradores (2002) reportaram a capacidade de uma linhagem recombinante de *R. eutropha* incorporar 3-hidroxihexanoil-CoA através desta condensação, catalisada

pela enzima BktB. Mendonça (2010) obteve a formação de P(3HB-co-3HHx), embora em quantidades reduzidas, para a *B. sacchari*, o que é indicativo que esta bactéria é capaz de promover a condensação de acetil-CoA e butiril-CoA. Assim, a presença de uma PHA sintase com maior afinidade por monómeros MCL pode conduzir ao aumento desta reação de condensação e levar a melhores resultados quando é utilizado o ácido butírico como fonte de carbono.

Ainda em relação a ensaios realizados em biorreator, a razão glicose:ácido hexanóico foi fixada num valor, pelo que a sua variação deve também ser avaliada de modo a determinar quais os valores para a produção do polímero com determinadas frações molares de 3HHx, já que esta depende da concentração de ácido hexanóico fornecida.

Assim, para responder às necessidades da sociedade, o PHA tem de ser produzido a baixo custo, na medida em que as linhagens bacterianas, os processos de produção e os substratos utilizados têm de ser desenvolvidos e analisados com vista à otimização desta biossíntese. Neste contexto, são necessárias mais investigações nesta área e o desenvolvimento de novos processos, através da avaliação de diferentes fatores que afetam a produção de PHA, como é o caso do presente trabalho.

Referências Bibliográficas

- Aldor, I. S. , Keasling, J. D. (2003), *Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates*, Curr Opin Biotechnol, **14**(5). 475-483.
- Álvarez-Chávez, C. R., Edwards, S., Moure-Eraso, R. , Geiser, K. (2012), *Sustainability of bio-based plastics: general comparative analysis and recommendations for improvement*, Journal of Cleaner Production, **23**(1). 47-56.
- Amara, A. A. (2008), *Polyhydroxyalkanoates: from Basic Research and Molecular Biology to Application.*, IIUM Engineering Journal, **9**. 37-73.
- Amara, A. A., Steinbüchel, A. , Rehm, B. H. (2002), *In vivo evolution of the Aeromonas punctata polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity*, Appl Microbiol Biotechnol, **59**(4-5). 477-482.
- Anderson, A. J. , Dawes, E. A. (1990), *Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*, Microbiol Rev, **54**(4). 450-472.
- Andrady, A. L. , Neal, M. A. (2009), *Applications and societal benefits of plastics*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **364**(1526). 1977-1984.
- Bian, Y., Wang, Y., Aibaidoula, G., Chen, G., Wu, Q. (2009), *Evaluation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) conduits for peripheral nerve regeneration*, Biomaterials, **30**(2). 217-225.
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979), *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*, Nucleic Acids Res., **7**(6). 1513-1523.
- Brämer, C. O., Silva, L. F., Gomez, J. G., Priefert, H. , Steinbüchel, A. (2002), *Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain Burkholderia sacchari IPT101(T) and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content*, Appl Environ Microbiol, **68**(1). 271-279.
- Brämer, C. O., Vandamme, P., da Silva, L. F., Gomez, J. G. C. , Steinbüchel, A. (2001), *Burkholderia sacchari sp nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil*, International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology, **51**(5). 1709-1713.
- Brandl, H., Knee, E. J., Jr., Fuller, R. C., Gross, R. A. , Lenz, R. W. (1989), *Ability of the phototrophic bacterium Rhodospirillum rubrum to produce various poly (beta-hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters*, Int J Biol Macromol, **11**(1). 49-55.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. , Genser, K. F. (1998), *Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects*, J Biotechnol, **65**(2-3). 127-161.
- Budde, C. F., Riedel, S. L., Willis, L. B., Rha, C. , Sinskey, A. J. (2011), *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered Ralstonia eutropha strains*, Appl Environ Microbiol, **77**(9). 2847-2854.
- Buffoni, E. (2006), *Avaliação da composição de polímeros biodegradáveis produzidos por Burkholderia sacchari a partir de diferentes substratos*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. , Short, J. M. (1987), *XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with Beta-galactosidase selection*, BioTechniques, **5**. 376-378.
- Caballero, K. P., Karel, S. F. , Register, R. A. (1995), *Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers*, Int J Biol Macromol, **17**(2). 86-92.
- Cai, L., Yuan, M. Q., Liu, F., Jian, J. , Chen, G. Q. (2009), *Enhanced production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA) by PHA depolymerase knockout mutant of Pseudomonas putida KT2442*, Bioresour Technol, **100**(7). 2265-2270.
- Castellanos, N. A. M. (2010), *Avaliação do sistema de mobilização de poli-3-hidroxibutirato em Burkholderia sacchari*. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Chanprateep, S. (2010), *Current trends in biodegradable polyhydroxyalkanoates*, J Biosci Bioeng, **110**(6). 621-632.
- Chee, J. Y., Lau, N. S., Samian, M. R., Tsuge, T. , Sudesh, K. (2012), *Expression of Aeromonas caviae polyhydroxyalkanoate synthase gene in Burkholderia sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from palm oil products*, J Appl Microbiol, **112**(1). 45-54.
- Chen, G. Q. (2009), *A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry*, Chem Soc Rev, **38**(8). 2434-2446.
- Chen, G. Q. , Wu, Q. (2005), *The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials*, Biomaterials, **26**(33). 6565-6578.
- Chen, G. Q., Zhang, G., Park, S. J. , Lee, S. Y. (2001), *Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)*, Appl Microbiol Biotechnol, **57**(1-2). 50-55.
- Chen, S., Wang, P. P., Wang, J. P., Chen, G. Q. , Wu, Q. (2008), *Guided growth of smooth muscle cell on poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds with uniaxial microtubular structures*, J Biomed Mater Res A, **86**(3). 849-856.

- Coenye, T. , Vandamme, P. (2003), *Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches*, Environ Microbiol, **5**(9). 719-729.
- Dennis, D. E. (1994), *Expression of polyhydroxyalkanoates in recombinant bacteria*, International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Montreal, Canada.
- Dennis, D., McCoy, M., Stangl, A., Valentin, H. E., Wu, Z. (1998), *Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from Ralstonia eutropha*, Journal of Biotechnology, **64**. 177-186.
- Doi, Y., Kitamura, S. , Abe, H. (1995), *Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)*, Macromolecules, **28**(14). 4822-4828.
- Filipov, M. C. O. (2000), *Obtenção e caracterização de mutantes de Burkholderia sp. IPT 101 deficientes na síntese ou no reconsumo de poli-3-hidroxibutirato - um plástico biodegradável*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Fukui, T., Abe, H. , Doi, Y. (2002), *Engineering of Ralstonia eutropha for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer*, Biomacromolecules, **3**(3). 618-624.
- Fukui, T. , Doi, Y. (1997), *Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of Aeromonas caviae*, J Bacteriol, **179**(15). 4821-4830.
- Fukui, T. , Doi, Y. (1998), *Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by Alcaligenes eutrophus and its recombinant strain*, Appl Microbiol Biotechnol, **49**(3). 333-336.
- Fukui, T., Kichise, T., Iwata, T., Doi, Y. (2001), *Characterization of 13 kDa granule-associated protein in Aeromonas caviae and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria*, Biomacromolecules, **2**(1).148-53.
- Fukui, T., Shiomi, N. , Doi, Y. (1998), *Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by Aeromonas caviae*, J Bacteriol, **180**(3). 667-673.
- Fukui, T., Yokomizo, S., Kobayashi, G. , Doi, Y. (1999), *Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of Aeromonas caviae establishes copolyester biosynthesis pathway in Escherichia coli*, FEMS Microbiol Lett, **170**(1). 69-75.
- Gao, X., Chen, J., Wu, Q. , Chen, G. Q. (2011), *Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels*, Curr Opin Biotechnol, **22**(6). 768-774.
- Gomez, J. G. C. (2000), *Produção por Pseudomonas sp. de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes*. Tese (Doutorado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Gomez, J. G. C., Fontolan, V., Alli, R. C. P., Rodrigues, M. F. A., Bueno Netto, C. L., Silva, L. F., Simões, D. A. (1997), *Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose*, Brazilian Journal of Microbiology, **28**. 43-48.
- Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Netto, C. L. B., Oliveira, M. S. , da Silva, L. F. (1996), *Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid*, Appl Microbiol Biotechnol, **45**(6). 785-791.
- Gomez, J. G. C., Silva-Queiroz, S. R., Silva, L. M. B., Costa, M., Bretas, A. F., Silva, L. F., Taciro, M. K., Pradella, J. G. C., Sanches, R. J., Schemberg, A. C. , Torres, B. B. (2002), *PHA_{MCL} production from renewable substrates*, International Symposium on Biological Polyesters, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany.
- Gram, H. C. (1884), *Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten*, Fortschritte der Medizin, **2**. 185-189.
- Gross, R. A., Brandl, H., Ulmer, H. W., Posada, M. A., Fuller, R. C. , Lenz, R. W. (1989), *The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates)*, Polymer Prepr., **30**. 492-493.
- Han, J., Qiu, Y. Z., Liu, D. C. , Chen, G. Q. (2004), *Engineered Aeromonas hydrophila for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition*, FEMS Microbiol Lett, **239**(1). 195-201.
- Hang, X., Zhang, G., Wang, G., Zhao, X. , Chen, G. Q. (2002), *PCR cloning of polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes from Burkholderia caryophylli and their functional expression in recombinant Escherichia coli*, FEMS Microbiol Lett, **210**(1). 49-54.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Chu, L., Dawes, E. A. (1988), *The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism Alcaligenes eutrophus*, FEMS Microbiology Letters, **52**(3). 259-264.
- Haywood, G. W., Anderson, A. J., Williams, D. R., Dawes, E. A. , Ewing, D. F. (1991), *Accumulation of a poly(hydroxyalkanoate) copolymer containing primarily 3-hydroxyvalerate from simple carbohydrate substrates by Rhodococcus sp. NCIMB 40126*, Int J Biol Macromol, **13**(2). 83-88.
- Hopewell, J., Dvorak, R. , Kosior, E. (2009), *Plastics recycling: challenges and opportunities*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **364**(1526). 2115-2126.
- Hsieh, W., Chen, W. U., Yang, S. , Chou, X. (2011), *3D tissue culture and fermentation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) from Burkholderia cepacia D1*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, **42**(6). 883-888.

- Jian, J., Li, Z. J., Ye, H. M., Yuan, M. Q., Chen, G. Q. (2010), *Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant Aeromonas hydrophila*, *Bioresour Technol*, **101**(15). 6096-6102.
- Karr, D. B., Waters, J. K., Emerich, D. W. (1983), *Analysis of Poly- β -Hydroxybutyrate in Rhizobium japonicum Bacteroids by Ion-Exclusion High-Pressure Liquid Chromatography and UV Detection*, *Appl. Environ. Microbiol*, **46**. 1339-44.
- Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K., Doi, Y. (2004), *High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by Ralstonia eutropha and its recombinant strain*, *Polymer Degradation and Stability*, **83**(1). 79-86.
- Kapritchkoff, F. M., Viotti, A. P., Alli, R. C. P., Zuccolo, M., Pradella, J. G. C., Maiorano, A. E., Miranda, E. A., Bonomi, A. (2006), *Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by Ralstonia eutropha*, *J Biotechnol*, **122**(4). 453-462.
- Keshavarz, T., Roy, I. (2010), *Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda*, *Curr Opin Microbiol*, **13**(3). 321-326.
- Khanna, S., Srivastava, A. K. (2005), *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates*, *Process Biochemistry*, **40**(2). 607-619.
- Khoo, H., Tan, R., Chng, K. (2010), *Environmental impacts of conventional plastic and bio-based carrier bags*, *The International Journal of Life Cycle Assessment*, **15**(3). 284-293.
- Kichise, T., Fukui, T., Yoshida, Y., Doi, Y. (1999), *Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant Ralstonia eutropha and effects of PHA synthase activity on in vivo PHA biosynthesis*, *Int J Biol Macromol*, **25**(1-3). 69-77.
- Kichise, T., Taguchi, S., Doi, Y. (2002), *Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by in vitro evolution of Aeromonas caviae PHA synthase*, *Appl Environ Microbiol*, **68**(5). 2411-2419.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., 2nd, Peterson, K. M. (1995), *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*, *Gene*, **166**(1). 175-176.
- Lau, N. S., Chee, J. Y., Tsuge, T., Sudesh, K. (2010), *Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by Burkholderia sp. USM (JCM15050)*, *Bioresour Technol*.
- Lee, S. H., Oh, D. H., Ahn, W. S., Lee, Y., Choi, J., Lee, S. Y. (2000), *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of Aeromonas hydrophila*, *Biotechnol Bioeng*, **67**(2). 240-244.
- Lee, S. Y., Choi, J., Wong, H. H. (1999), *Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review*, *Int J Biol Macromol*, **25**(1-3). 31-36.
- Leejarkpai, T., Suwanmanee, U., Rudeekit, Y., Mungcharoen, T. (2011), *Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions*, *Waste Manag*, **31**(6). 1153-1161.
- Li, R., Zhang, H., Qi, Q. (2007), *The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli*, *Bioresour Technol*, **98**(12). 2313-2320.
- Li, S. Y., Dong, C. L., Wang, S. Y., Ye, H. M., Chen, G. Q. (2011), *Microbial production of polyhydroxyalkanoate block copolymer by recombinant Pseudomonas putida*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **90**(2). 659-669.
- Liu, F., Jian, J., Shen, X., Chung, A., Chen, J., Chen, G. Q. (2011), *Metabolic engineering of Aeromonas hydrophila 4AK4 for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate*, *Bioresour Technol*, **102**(17). 8123-8129.
- Lopes, M. S. G., Gomez, J. G. C., Silva, L. F. (2009), *Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from Burkholderia sacchari and production of polyhydroxybutyrate from xylose*, *Can J Microbiol*, **55**(8). 1012-1015.
- Lu, X., Zhang, J., Wu, Q., Chen, G. Q. (2003), *Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in E. coli*, *FEMS Microbiol Lett*, **221**(1). 97-101.
- Lu, X. Y., Wu, Q., Chen, G. Q. (2004a), *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in Aeromonas hydrophila CGMCC 0911*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **64**(1). 41-45.
- Lu, X. Y., Wu, Q., Zhang, W. J., Zhang, G., Chen, G. Q. (2004b), *Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from Aeromonas hydrophila and its expression in Escherichia coli*, *Biotechnol Prog*, **20**(5). 1332-1336.
- Luengo, J. M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G., Olivera, E. R. (2003), *Bioplastics from microorganisms*, *Curr Opin Microbiol*, **6**(3). 251-260.
- Madigan, M. T., Mortink, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009), *Brock Biology of Microorganisms*, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, USA.
- Madison, L. L., Huisman, G. W. (1999), *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic*, *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**(1). 21-53.
- Matsuda, T. T. (2010), *Avaliação do potencial de Burkholderia sacchari produzir o copolímero biodegradável poli(hidroxibutirato-co-hidroxihexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Mendonça, T. S. (2009), *Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e*

- média a partir de óleos vegetais. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Mifune, J., Nakamura, S., Fukui, T. (2010), *Engineering of pha operon on Cupriavidus necator chromosome for efficient biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from vegetable oil*, Polymer Degradation and Stability, **95**(8). 1305-1312.
- Ng, K., Wong, Y., Tsuge, T., Sudesh, K. (2011), *Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) copolymers using jatropa oil as the main carbon source*, Process Biochemistry, **46**(8). 1572-1578.
- Ojumu, T. V., Yu, J., Solomon, B. O. (2004). Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer, African Journal of Biotechnology, **3**: 18-24.
- Oliveira, M. C., Anjos, M. D., Silva, L. F., Torres, B. B., Pradella, J. G. C., Gomez, J. G. C. (1998), *Obtenção de mutantes bacterianos deficientes na síntese de poli-3-hidroxibutirato*, Congresso Nacional de Genética, Águas de Lindóia, São Paulo, Brasil.
- Park, S. J., Ahn, W. S., Green, P. R., Lee, S. Y. (2001), *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered Escherichia coli strains*, Biomacromolecules, **2**(1). 248-254.
- Park, S. J., Choi, J., Lee, S. Y. (2005), *Engineering of Escherichia coli fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates*, Enzyme and Microbial Technology, **36**(4). 579-588.
- Park, S. J., Kim, T. W., Kim, M. K., Lee, S. Y., Lim, S. C. (2011), *Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters*, Biotechnol Adv.
- Park, S. J., Lee, S. Y. (2004), *Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered Escherichia coli strains*, Appl Biochem Biotechnol, **113-116**. 335-346.
- Pereira, E. M., Silva-Queiroz, S. R., Cabrera Gomez, J. G., Silva, L. F. (2009), *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, **55**(6). 688-697.
- Philip, S., Keshavarz, T., Roy, I. (2007), *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*, Journal of Chemical Technology & Biotechnology, **82**(3). 233-247.
- PlasticsEurope (2011), *Plastics - the Facts 2011, An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2010*, PlasticsEurope. Belgium.
- Pradella, J. G., Taciro, M. K., Mateus, A. Y. (2010), *High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using Burkholderia sacchari culture in airlift bioreactor*, Bioresour Technol, **101**(21). 8355-8360.
- Pradella, J. G. C. (2006), *Biopolímeros e intermediários químicos*, Relatório Técnico nº84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos Laboratório de Biotecnologia Industrial - LBI/CTPP, São Paulo, Brasil.
- Qiu, Y. Z., Han, J., Chen, G. Q. (2006), *Metabolic engineering of Aeromonas hydrophila for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)*, Appl Microbiol Biotechnol, **69**(5). 537-542.
- Qiu, Y. Z., Han, J., Guo, J. J., Chen, G. Q. (2005), *Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant Aeromonas hydrophila and Pseudomonas putida*, Biotechnol Lett, **27**(18). 1381-1386.
- Reddy, C. S., Ghai, R., Rashmi, Kalia, V. C. (2003), *Polyhydroxyalkanoates: an overview*, Bioresour Technol, **87**(2). 137-146.
- Rehm, B. H. (2003), *Polyester synthases: natural catalysts for plastics*, Biochem J, **376**(Pt 1). 15-33.
- Rehm, B. H., Kruger, N., Steinbüchel, A. (1998), *A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. The PHAG gene from Pseudomonas putida KT2440 encodes a 3-hydroxyacyl-acyl carrier protein-coenzyme a transferase*, J Biol Chem, **273**(37). 24044-24051.
- Rehm, B. H. A. (2010), *Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications*, Nat Rev Micro, **8**(8). 578-592.
- Rehm, B. H. A., Steinbüchel, A. (2005). *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases: The Key Enzymes of PHA Synthesis*. in Biopolymers Online, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Reith, M. E., Singh, R. K., Curtis, B., Boyd, J. M., Bouevitch, A., Kimball, J., Munholland, J., Murphy, C., Sarty, D., Williams, J., Nash, J.H., Johnson, S. C., Brown, L. L. (2008), *The genome of Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida A449: insights into the evolution of a fish pathogen*, BMC Genomics, **9**:427.
- Ren, X. (2003), *Biodegradable plastics: a solution or a challenge?*, Journal of Cleaner Production, **11**(1). 27-40.
- Riis, V., Mai, W. (1988), *Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis*, Journal of Chromatography A, **445**(0). 285-289.
- Rocha, R. C., da Silva, L. F., Taciro, M. K., Pradella, J. G. (2008), *Production of poly(3-hydroxybutyrate- <i>co</i>-3-hydroxyvalerate) P(3HB- <i>co</i>-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by <i>Burkholderia sacchari</i> IPT 189*, World Journal of Microbiology and Biotechnology, **24**(3). 427-431.

- Rocha, R. C. S., Pereira, F. S., Taciro, M. K., Rodrigues, M. F. A., Pradella, J. G. C. (2007), *Controle da biossíntese de poli-hidroxialcanoatos bacterianos através do fluxo de substratos*, Química Nova, **30**, 53-55.
- Rodrigues, M., da Silva, L., Gomez, J., Valentin, H., Steinbüchel, A. (1995), *Biosynthesis of poly (3-hydroxybutyric acid&i>co -3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by&i>Burkholderia* sp, Appl Microbiol Biotechnol, **43**(5), 880-886.
- Rodrigues, M. F. A., Vicente, E. J., Steinbüchel, A. (2000), *Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of Burkholderia cepacia generated by homogenization*, FEMS Microbiol Lett, **193**(1), 179-185.
- Sambrook, J., Russell, D. W. (2001), *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sato, S., Nomura, C. T., Abe, H., Doi, Y., Tsuge, T. (2007), *Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] formation in Escherichia coli from glucose through an enoyl-CoA hydratase-mediated pathway*, J Biosci Bioeng, **103**(1), 38-44.
- Seshadri, R., Joseph, S. W., Chopra, A. K., Sha, J., Shaw, J., Graf, J., Haft, D., Wu, M., Ren, Q., Rosovitz, M. J., Madupu, R., Tallon, L., Kim, M., Jin, S., Vuong, H., Stine, O. C., Ali, A., Horneman, A. J., Heidelberg, J. F. (2006), *Genome sequence of Aeromonas hydrophila ATCC 7966T: jack of all trades*, J Bacteriol, **188**(23), 8272-8282.
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. (2008), *Biological degradation of plastics: a comprehensive review*, Biotechnol Adv, **26**(3), 246-265.
- Shen, X. W., Yang, Y., Jian, J., Wu, Q., Chen, G. Q. (2009), *Production and characterization of homopolymer poly(3-hydroxyvalerate) (PHV) accumulated by wild type and recombinant Aeromonas hydrophila strain 4AK4*, Bioresour Technol, **100**(18), 4296-4299.
- Silva, L. F., Gomez, J. G., Oliveira, M. S., Torres, B. B. (2000), *Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by Burkholderia sp*, J Biotechnol, **76**(2-3), 165-174.
- Silva, L. F., Gomez, J. G. C., Rocha, R. C. S., Taciro, M. K., Pradella, J. G. C. (2007), *Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil*, Química Nova, **30**, 1732-1743.
- Silva, L. F., Taciro, M. K., Michelin, M. E., Carter, J. M., Pradella, J. G. C., Gomez, J. G. C. (2002), *Process development for poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production for sugar cane bagasse hydrolysate*, International Symposium on Biological Polyesters, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany.
- Silva, L. F., Taciro, M. K., Michelin Ramos, M. E., Carter, J. M., Pradella, J. G., Gomez, J. G. (2004), *Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xylose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysate*, J Ind Microbiol Biotechnol, **31**(6), 245-254.
- Simon, R., Priefer, U., Puhler, A. (1983), *A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria*, Nat Biotech, **1**(9), 784-791.
- Siracusa, V., Rocculi, P., Romani, S., Rosa, M. D. (2008), *Biodegradable polymers for food packaging: a review*, Trends in Food Science & Technology, **19**(12), 634-643.
- Slater, S., Houmiel, K. L., Tran, M., Mitsky, T. A., Taylor, N. B., Padgett, S. R., Gruys, K. J. (1998), *Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in Ralstonia eutropha*, J Bacteriol, **180**(8), 1979-1987.
- Song, J. H., Murphy, R. J., Narayan, R., Davies, G. B. (2009), *Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **364**(1526), 2127-2139.
- Steinbüchel, A., Lütke-Eversloh, T. (2003), *Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms*, Biochemical Engineering Journal, **16**(2), 81-96.
- Steinbüchel, A., Schlegel, H. G. (1991), *Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxyalkanoic acid) synthesis in Alcaligenes eutrophus*, Mol Microbiol, **5**(3), 535-542.
- Sudesh, K., Abe, H., Doi, Y. (2000), *Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters*, Progress in Polymer Science, **25**(10), 1503-1555.
- Sun, M., Zhou, P., Pan, L. F., Liu, S., Yang, H. X. (2009), *Enhanced cell affinity of the silk fibroin-modified PHBHHx material*, J Mater Sci Mater Med, **20**(8), 1743-1751.
- Suriyamongkol, P., Weselake, R., Narine, S., Moloney, M., Shah, S. (2007), *Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review*, Biotechnol Adv, **25**(2), 148-175.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., Doi, Y. (1999a), *Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in Escherichia coli HB101 strain*, FEMS Microbiol Lett, **176**(1), 183-190.
- Taguchi, K., Aoyagi, Y., Matsusaki, H., Fukui, T., Doi, Y. (1999b), *Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in Escherichia coli HB101*, Biotechnol Lett, **21**(7), 579-584.
- Tavares, L. Z., da Silva, E. S., da Cruz Pradella, J. G. (2004), *Production of poly(3-hydroxybutyrate) in an airlift bioreactor by Ralstonia eutropha*, Biochemical Engineering Journal, **18**(1), 21-31.

- Thompson, R. C., Moore, C. J., vom Saal, F. S., Swan, S. H. (2009), *Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends*, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **364**(1526). 2153-2166.
- Tian, P., Shang, L., Ren, H., Mi, Y., Fan, D., Jiang, M. (2009). Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates: Current research and development, African journal of biotechnology, **8**: 709-714.
- Tian, S. J., Lai, W. J., Zheng, Z., Wang, H. X., Chen, G. Q. (2005), *Effect of over-expression of phasin gene from Aeromonas hydrophila on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate*, FEMS Microbiol Lett, **244**(1). 19-25.
- Tsuge, T. (2002), *Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates*, J Biosci Bioeng, **94**(6). 579-584.
- Tsuge, T., Hisano, T., Taguchi, S., Doi, Y. (2003), *Alteration of chain length substrate specificity of Aeromonas caviae R-enantiomer-specific enoyl-coenzyme A hydratase through site-directed mutagenesis*, Appl Environ Microbiol, **69**(8). 4830-4836.
- Tsuge, T., Watanabe, S., Sato, S., Hiraishi, T., Abe, H., Doi, Y., Taguchi, S. (2007a), *Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by saturation mutagenesis of Aeromonas caviae PHA synthase*, Macromol Biosci, **7**(6). 846-854.
- Tsuge, T., Watanabe, S., Shimada, D., Abe, H., Doi, Y., Taguchi, S. (2007b), *Combination of N149S and D171G mutations in Aeromonas caviae polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate biosynthesis*, FEMS Microbiol Lett, **277**(2). 217-222.
- Ulmer, H. W., Gross, R. A., Weisbach, P., Fuller, R. C., Lenz, R. W. (1989), *The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate)*, Polymer Prep., **30**. 402-407.
- Vandamme, P., Govan, J., LiPuma, J. (2007). *Diversity and role of Burkholderia spp. in Burkholderia* Molecular Microbiology and Genomics. C. T. V. P. Norfolk, UK., Horizon Bioscience 1-28.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., Radecka, I. (2007), *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates*, J Appl Microbiol, **102**(6). 1437-1449.
- von Graevenitz, A. (2007), *The role of Aeromonas in diarrhea: a review*, Infection, **35**(2). 59-64.
- Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K. (1979), *Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair mismatch*, Nucleic Acids Res, **6**(11). 3543-3557.
- Wang, H. H., Zhou, X. R., Liu, Q., Chen, G. Q. (2011), *Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by Pseudomonas putida*, Appl Microbiol Biotechnol, **89**(5). 1497-1507.
- Wang, Y., Bian, Y., Wu, Q., Chen, G. (2008), *Evaluation of three-dimensional scaffolds prepared from poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for growth of allogeneic chondrocytes for cartilage repair in rabbits*, Biomaterials, **29**(19). 2858-2868.
- Wu, S., Liu, Y. L., Cui, B., Qu, X. H., Chen, G. Q. (2007), *Study on decellularized porcine aortic valve/poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) hybrid heart valve in sheep model*, Artif Organs, **31**(9). 689-697.
- Xie, W. P., Chen, G. Q. (2008), *Production and characterization of terpolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by recombinant Aeromonas hydrophila 4AK4 harboring genes phaPCJ*, Biochemical Engineering Journal, **38**(3). 384-389.
- Zhang, H. F., Ma, L., Wang, Z. H., Chen, G. Q. (2009), *Biosynthesis and characterization of 3-hydroxyalkanoate terpolyesters with adjustable properties by Aeromonas hydrophila*, Biotechnol Bioeng, **104**(3). 582-589.
- Zhao, Y. H., Li, H. M., Qin, L. F., Wang, H. H., Chen, G. Q. (2007), *Disruption of the polyhydroxyalkanoate synthase gene in Aeromonas hydrophila reduces its survival ability under stress conditions*, FEMS Microbiol Lett, **276**(1). 34-41.

Anexos

A – Meios de Cultura

▪ LB

10 g Triptona
5 g Extrato de levedura
10 g NaCl

▪ MM

1 g.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄
1.5 g.L⁻¹ KH₂PO₄
3.5 g.L⁻¹ Na₂HPO₄
1.0 mL.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O 1%
1.0 mL.L⁻¹ MgSO₄.7H₂O Sol. 20%
1.0 mL.L⁻¹ Citrato férrico Amoniacal Sol. 6%
1.0 mL.L⁻¹ Solução de elementos traços

▪ Solução de elementos traços

0.30 g.L⁻¹ H₃BO₃
0.20 g.L⁻¹ CoCl₂.6H₂O
0.10 g.L⁻¹ ZnSO₄.7H₂O
0.03 g.L⁻¹ MnCl₂.4H₂O
0.03 g.L⁻¹ NaMoO₄.2H₂O
0.02 g.L⁻¹ NiCl₂.6H₂O
0.01 g.L⁻¹ CuSO₄.5H₂O

Os meios de cultura sólidos são obtidos através da adição de 15-20 g.L⁻¹ de ágar aos meios líquidos. Após esterilização foi adicionado o antibiótico adequado.

B – Tampões

- **TAE 50X**

0.04 M Tris Base

50 mM EDTA, pH 8

1 M Ácido acético glacial

- **Tampão de Transformação**

10 mM TrisHCl, pH 8.0

50 mM CaCl₂

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

C – Transformação e Conjugação

Numa primeira fase, é necessário construir células competentes. Para isso, células de *E. coli* XL1-Blue e *E. coli* S17-1 foram inoculadas em 25 mL de meio LB líquido com MgCl_2 10M e MgSO_4 10 mM e incubadas a 37°C sob agitação até uma DO_{650} entre 0.3 e 0.5. Após este período, 8 mL de cultura foram centrifugadas (15 min, 4000 rpm, 4°C) (Sorvall, Biofuge Primo R, Thermo Fisher Scientific), em tubos estéreis. O *pellet* obtido foi ressuspensão em 4 mL de tampão de transformação e mantido no gelo durante 15 min e novamente centrifugado sob as mesmas condições.

O *pellet* obtido foi ressuspensão em 1 mL de tampão de transformação e a solução resultante dividida em alíquotas de 200 μL . A cada 200 μL de células foi adicionado 5 μL da reação de ligação. A mistura foi incubada durante 30 min no gelo e submetida a choque térmico durante 2 min a 42°C e imediatamente recolocada no gelo. Posteriormente, adicionou-se 600 μL de meio LB e incubou-se a 37°C durante 1 h. As células foram plaqueadas no meio com o antibiótico adequado, após espalhamento de IPTG e Xgal.

Após seleção do clone positivo, procedeu-se à conjugação para a linhagem de *B. sacchari* (LFM344 ou LFM101). Para isso, uma cultura de *B. sacchari* em MM com glicose 1 g.L^{-1} (MMG1), incubada durante 24 h, foi inoculada em MMG1 sólido com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de canamicina. Células de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo com o gene de interesse foram inoculadas pontualmente com palitos estéreis, incubando-se a 30°C durante 48 h. As colônias de *B. sacchari* foram isoladas através de repicagens sucessivas.

D – Determinação de Açúcares e Ácidos Orgânicos

Numa fase inicial, as amostras foram diluídas e filtradas (Milipore, 0.2 μm). A concentração de glicose foi determinada por cromatografia de fase líquida. O método utilizado foi o seguinte: coluna Aminex- HPX-87H (Biorad); temperatura do detetor-IR (índice de refração) 40°C; vazão da fase móvel-0.3 mL.min⁻¹; temperatura da coluna-30°C.

A concentração de ácido hexanóico foi determinada por cromatografia gasosa, tendo sido adicionado o padrão interno, ácido butírico. Para tal análise foi utilizada a coluna FFAP (30 m, 0.53 mm, 1.33 μm). O método utilizado foi: temperatura do injetor-250°C; temperatura do detetor (FID)-300°C; temperatura inicial da coluna-130°C; velocidade de subida da temperatura-10°C.min⁻¹; temperatura da coluna-185°C; Make-up-27.0 mL.m⁻¹; Vazão da coluna-3.0 mL.m⁻¹; Split-5:1.

E – Determinação de PHA

A quantidade e composição de PHA foram determinadas por CG a partir da detecção de propil-ésteres (RIIS e MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 mg.mL⁻¹) em propanol. Os tubos, após fechados firmemente e homogeneizados vigorosamente, foram mantidos em banho de água a 100°C durante 3 h, com agitação após os primeiros 30 minutos. Posteriormente, procedeu-se ao arrefecimento dos tubos e à separação da fase aquosa da fase orgânica tendo-se adicionado para tal 4 mL de água destilada. À mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo os propil-ésteres. A fase orgânica foi transferida para frascos adequados para leitura no cromatógrafo e o volume de 1 µL foi analisado após fracionamento da amostra (split 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% difenil-95%dimetil-polisiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0.32 mm, espessura do filme 0.25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste-Hélio (0.6 mL.min⁻¹); temperatura do injetor-250°C; temperatura do detetor-300°C; sistema de detecção-ionização de chama (FID). O programa de temperaturas do forno foi o seguinte: 100°C durante 3 min (6°C.min⁻¹), elevação da temperatura até 180°C durante 5 min (6°C.min⁻¹) e até 240°C durante 1 min.

O ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich Chem. CO) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração.

F – Plasmídeos

Na Figura A 1 está apresentado um esquema representativo dos plasmídeos construídos, sendo que a sequência referente a cada gene clonado está referenciada de modo genérico como gene. Foi utilizado o vetor pBBR1MCS-2, um plasmídeo com resistência à canamicina (Km^R), com genes de mobilização (*mob*) e replicação (*rep*) e com um local de restrição múltipla onde o gene de interesse foi inserido sobre o controle do promotor *lac* (Kovach *et al.*, 1995).

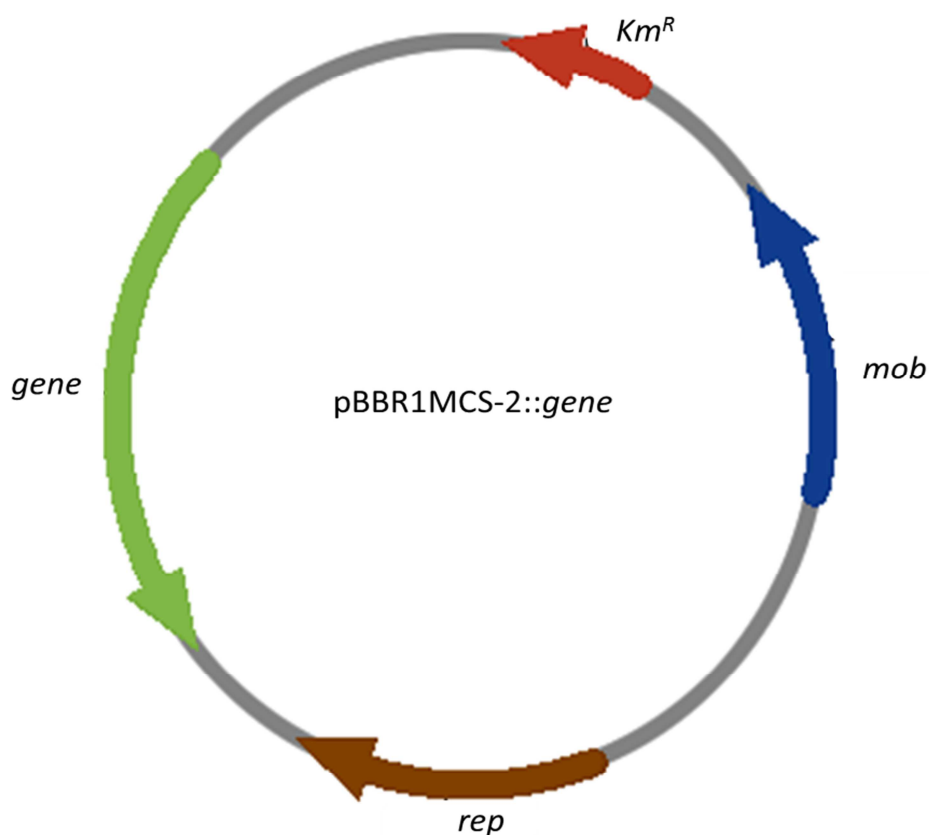


Figura A 1 - Esquema genérico dos plasmídeos construídos.

G – Sequenciamento e Alinhamento

Nas figuras seguintes estão apresentados os resultados obtidos para o alinhamento das sequências resultantes do sequenciamento e a sequência complementar presente na literatura (Serial Cloner).

```

Alignment of Sequence_1: [phaPC_forward.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]
Similarity : 803/913 (87,95 %)

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 CAAGGAAGATGCCAAGCTGCAGACCGGTGAATTGATCCACGTCGGAGAGGGCGAAGACCG 60

Seq_1 1 -----A-g-tttAA---CAT 10
Seq_2 61 GCAGATCGATCCCTTTACCTGACCGGTGCGACCATAGAGCACAGAGGCTCTGGCCCCCT 120

Seq_1 11 G-TCTCTGTGAGGGAGTGCAGATTGACCCC-----GAGAGCTGGACAGGGGTACTGG 62
Seq_2 121 CCACCTGATGGGACGCGGGCAGATTGACGCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGGTACTGG 180

Seq_1 63 CGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGCAAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCA 122
Seq_2 181 CGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGCAAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCA 240

Seq_1 123 TCGATGCATTCTCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCGGCGGCCTGGGAA 182
Seq_2 241 TCGATGCATTCTCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCGGCGGCCTGGGAA 300

Seq_1 183 CGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAACTGGAC 242
Seq_2 301 CGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAACTGGAC 360

Seq_1 243 AGACCAGAATCAATATTTGCCCCAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCAT 302
Seq_2 361 AGACCAGAATCAATATTTGCCCCAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCAT 420

Seq_1 303 TGGTAACACAATGCGCTAAACGTGCGTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGG 362
Seq_2 421 TGGTAACACAATGCGCTAAACGTGCGTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGG 480

Seq_1 363 ATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAAATGGGCCCATCGGCCTTTTGCAATACCTTCTG 422
Seq_2 481 ATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAAATGGGCCCATCGGCCTTTTGCAATACCTTCTG 540

Seq_1 423 CCAACCACGGAGACACGCGATGAATATGGACGTAATCAAGACCTTTACCGAGCAGATGCA 482
Seq_2 541 CCAACCACGGAGACACGCGATGAATATGGACGTAATCAAGACCTTTACCGAGCAGATGCA 600

Seq_1 483 AGGCTTTGCGCGCCCCCTCACCCGTTATAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGAACAGCT 542
Seq_2 601 AGGCTTTGCGCGCCCCCTCACCCGTTATAACCAGCTGCTGGCCAGCAACATCGAACAGCT 660

Seq_1 543 GACCCGGCTACAGTTGGCGTCCGCCAACGCCTATGCCGAGCTGGGACTGAACAGCTGCA 602
Seq_2 661 GACCCGGCTACAGTTGGCGTCCGCCAACGCCTATGCCGAGCTGGGACTGAACAGCTGCA 720

Seq_1 603 GGCCGCCGG-AAGGTGCAGGATGCCCA-AGCCTGGCGGCCCTCGGCACCGTCCAGCTGGA 660
Seq_2 721 GGCCGCCGGCAAGGTGCAGGATGCCCAGAGCCTGGCGGCCCTCGGCACCGTCCAGCTGGA 780

Seq_1 661 GACCGCCAGCCAGCTCTCCCGCCAGATGCTGGACGACATCCAGAAGCTCAACACCTTCG- 719
Seq_2 781 GACCGCCAGCCAGCTCTCCCGCCAGATGCTGGACGACATCCAGAAGCTCAACACCTTCG- 840

Seq_1 720 CCAGCAGTT-AAGGACGACCTCGACGCCCTGGCTGCCGACGGCATCAAAA--GAGACGGG 776
Seq_2 841 CCAGCAGTTCAAGGACGACCTCGACGCCCTGGCTGCCGACGGCATCAAAAAGAGCACGGG 900

```

Figura A 2 - Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_forward*.

Alignment of Sequence_1: [phaPC_reverse.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna]
 Similarity : 872/962 (90,64 %)

```

Seq_1 962 ----- 963
Seq_2 1      CTGTATGAGCTCATTCACTACAGCCCGACCGGAAACGGTGGCCAGGACGCCGGTACTG 60

Seq_1 962 ----- 963
Seq_2 61      ATCGTGCCGCCCTTCATCAACAAGTACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCCCTG 120

Seq_1 962 -----G-TTTACTGTGTGCCTGCGTCGCCCAGGTGAGACGGTT 926
Seq_2 121      GTGGCCTGGCTGGTGGCCAGGCGCAGACGGTGTTCATGATCTCCTGGCGCAACCCGGGT 180

Seq_1 925      TCATGATCTCTGGCCATCAGTCCGGCCAGCCGATCGATTGACGACTACGTGAGACGCGTC 866
Seq_2 181      CCGGCCAGGCCGACATCGATCTCGACGACTACGTGGTGGACGGCGTCATCGCCGCGCTG 240

Seq_1 865      ATCGCGCTGATGCGTGAGCGCCCGCGAGCGGTAGTGAC-GCATCGGCTACTGCATCGGC 807
Seq_2 241      GATGGCGTGGAGGGCGCCACCGCGAGCGGGAAGTGACGGCATCGGCTACTGCATCGGC 300

Seq_1 806      G-TACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAGCAACGGGTT 748
Seq_2 301      GGTACCGCCCTCTCCCTGGCCATGGGCTGGCTGGCTGCCAGGCGCCAGAAGCAACGGGTT 360

Seq_1 747      CGATCCGCCACCCTGTTCAACCAC-TGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGAACTTGGCATT 689
Seq_2 361      CGATCCGCCACCCTGTTCAACCACCTGCTCGACTTCTCCAGCCGGGGAACTTGGCATT 420

Seq_1 688      TTCATCCACGAGCCCATCATTGCGGCGCTGGAAGCCAGAACGAAGCCAAGGGCATCATG 629
Seq_2 421      TTCATCCACGAGCCCATCATTGCGGCGCTGGAAGCCAGAACGAAGCCAAGGGCATCATG 480

Seq_1 628      GACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTGAGCCTGCTGCGGGAGAACAGCCTCTACTGGAAT 569
Seq_2 481      GACGGGCGCCAGCTGGCGGTCTCTTTGAGCCTGCTGCGGGAGAACAGCCTCTACTGGAAT 540

Seq_1 568      TACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGAGAGCCCGGTGGCGTTCGATCTGCTGCACTGG 509
Seq_2 541      TACTACATCGACAGCTACCTCAAGGGGAGAGCCCGGTGGCGTTCGATCTGCTGCACTGG 600

Seq_1 508      AACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTAT 449
Seq_2 601      AACAGCGACAGCACCAACGTGGCGGGCAAGACCCACAGCAGCCTGCTGCGCCGGCTCTAT 660

Seq_1 448      CTGGAGAACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGC 389
Seq_2 661      CTGGAGAACCAGCTGGGGAAGGGGAGCTCAAGATCCGCCACACCCGCATCGATCTCGGC 720

Seq_1 388      AAGGTGAAGACCCCGGTGCTGCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAA 329
Seq_2 721      AAGGTGAAGACCCCGGTGCTGCTGGTCTCGGCCATGGACGATCACATCGCCCTCTGGCAA 780

Seq_1 328      GGGACCTGGCAGGGCATGAAGCTGTTTCGGTGGCGAGCAGCGCTTCATCCTGGCTGAATCG 269
Seq_2 781      GGGACCTGGCAGGGCATGAAGCTGTTTCGGTGGCGAGCAGCGCTTCATCCTGGCTGAATCG 840

Seq_1 268      GGCCACATCGCCGGCATCGTCAATCCGCCGACGCCAACAAAGTACGGCTTCTGGCAGAAC 209
Seq_2 841      GGCCACATCGCCGGCATCGTCAATCCGCCGACGCCAACAAAGTACGGCTTCTGGCAGAAC 900
    
```

Figura A 3 - Resultado do alinhamento da sequência *phaPC_reverse*.

Alignment of Sequence_1: [phaCJ_forward.xdna] with Sequence_2: [A. hydrophila.xdna].
Similarity : 823/939 (87,65 %)

```

Seq_1 1 ----- 0
Seq_2 1 ATCCCCCTGGCTGCCCCGACGGGCAGCCACATCTCCCCATGCTCCGTACGACAGGCTC 60

Seq_1 1 -----AATA-GCGCTTC-TG-AC-GGGAGACATGAGCC-ATCATCTTACGGCCCCGCTGT 49
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 61 GCCCTGCGCCGGGATGGGTGAAGGAGAGAACATGAGCCAATCATCTTACGGCCCCGCTGT 120

Seq_1 50 TCGAGGCCC-GGCCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACCGAGC 108
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 121 TCGAGGCCCTGGCCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACCGAGC 180

Seq_1 109 GCACGGCCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGG 168
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 181 GCACGGCCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGG 240

Seq_1 169 GTAGCCAACAGCCCTGGCAACTGATCAATGCCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCA 228
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 241 GTAGCCAACAGCCCTGGCAACTGATCAATGCCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCA 300

Seq_1 229 AACTGATGCAGCACACCCTGCTCAAAAGCGCAGGCCAGCAGAGCGAACCCTCATCGCTC 288
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 301 AACTGATGCAGCACACCCTGCTCAAAAGCGCAGGCCAGCAGAGCGAACCCTCATCGCTC 360

Seq_1 289 CCGAGCGCAGCGATCGTCGCTTCAAGGCCGACGCTGGAGCGAGCAGCCATTTATGACT 348
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 361 CCGAGCGCAGCGATCGTCGCTTCAAGGCCGACGCTGGAGCGAGCAGCCATTTATGACT 420

Seq_1 349 ACCTCAAACAATCCTATCTGCTGACCGCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGATGCCCTCG 408
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 421 ACCTCAAACAATCCTATCTGCTGACCGCCAAGCACCTGCTGGCTTCAGTGGATGCCCTCG 480

Seq_1 409 AGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGTTTCTTTACCGCCAGTACATCAACG 468
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 481 AGGGAGTGCCCCAGAAGAGCCGGGAGCGGCTGCGTTTCTTTACCGCCAGTACATCAACG 540

Seq_1 469 CCATGGCCCCCAGCAACTTTCTGGCCACCAACCCGAGCTGCTCAAGCTGACCCTGGAGT 528
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 541 CCATGGCCCCCAGCAACTTTCTGGCCACCAACCCGAGCTGCTCAAGCTGACCCTGGAGT 600

Seq_1 529 CTGACGGCCAGAATCTGGTGCGCGGGCTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCG 588
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 601 CTGACGGCCAGAATCTGGTGCGCGGGCTGGCGCTGCTGGCCGAAGATCTCGAGCGCAGCG 660

Seq_1 589 CCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAGTCCGCCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGG 648
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 661 CCGATCAGCTCAACATCCGCCTGACCGACGAGTCCGCCTTTGAGCTGGGGCGGGATCTGG 720

Seq_1 649 CGCTGACGCGGGCCGGGTGGTGACGCGACCGAGCTGTATGAGCTCATTAGTACAGCC 708
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 721 CGCTGACGCGGGCCGGGTGGTGACGCGACCGAGCTGTATGAGCTCATTAGTACAGCC 780

Seq_1 709 CGACCACGGAA-CGGTGGCCAGGACGCGCGGTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACA-GT 766
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 781 CGACCACGGAAACGGTGGCCAGGACGCGCGGTACTGATCGTGCCGCCCTTCATCAACAAGT 840

Seq_1 767 ACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCC----- 798
          |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Seq_2 841 ACTACATCCTGGACATGCGGCCCCAGAACTCCCTGGTGGCCTGGCTGGTCGCCCAGGGCC 900

```

Figura A 4 - Resultado do alinhamento da sequência *phaCJ_forward*.

