

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Estudo da Produção de
Polihidroxialcanoatos (PHAs) por
Chromobacterium violaceum

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Regina Vasconcellos Antônio, Dr^ª.

CRISTHIENE PAIVA ROHDEN VIEGAS

FLORIANÓPOLIS, 2005

**Estudo da Produção de Polihidroxialcanoatos (PHAs) por
*Chromobacterium violaceum***

por

CRISTHIENE PAIVA ROHDEN VIEGAS

Dissertação julgada para a obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos** e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Profa. Regina Vasconcellos Antônio, Dr^a.

Orientadora

Profa. Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dr^a. Sc.

Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a Regina Vasconcellos Antônio (BQA-UFSC) – Presidente

Prof^a. Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão (EQA-UFSC) – Membro Interno

Prof^a. Dr^a. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna (CCS-UFSC) – Membro Externo

Prof. Dr. Jorge Ninow, (EQA-UFSC) - Suplente

Florianópolis, outubro de 2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

A persistência é o caminho do êxito.
Charles Chaplin

Com todo amor e carinho ao meu esposo Fábio,
nossa filhinha Anna Carolina ,
minha mãe Eliane
e meus irmãos Carlos Eduardo e Daniela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Prof^ª.Dr^ª Regina Vasconcellos Antônio por todo o apoio, amizade, companheirismo e orientação oferecidos para a realização deste trabalho.

Às professoras Dr^ª Gláucia Maria Falcão de Aragão e Dr^ª Elenara Senna por aceitarem participar da banca de defesa dessa dissertação.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular Ana Kelly, Danielle, Cauê, Cássila, Duda, Fernanda, Claudimir e Derce pelo apoio, incentivo e companheirismo durante todo o trabalho.

Aos colegas do laboratório ENGEBIO, em especial, Murilo por toda a ajuda na realização das análises cromatográficas.

À minha família que sempre me incentivou e compartilhou comigo todos os momentos para a realização deste trabalho, em especial ao meu esposo e minha mãe, minha eterna gratidão a vocês por todo amor e carinho.

À Deus por ter me dada força e coragem para seguir adiante sempre.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1- O IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO POR MATERIAIS PLÁSTICOS	5
2.2 - POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)	7
2.3 – HISTÓRICO DOS PHAs	11
2.4- APLICAÇÃO DOS PHAs	14
2.5 - MICRORGANISMOS PRODUTORES	15
2.5.1- <i>Azotobacter</i>	16
2.5.2- <i>Alcaligenes</i>	17
2.5.3- <i>Pseudomonas</i>	17
2.5.4- <i>Ralstonia eutropha</i>	18
2.5.5-Produção de PHAs em plantas	19
2.5.6- <i>Escherichia coli recombinante</i> .	20
2.5.7- <i>Chromobacterium violaceum</i>	21
2.6 – DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PHAs	24
2.7 – BIOSÍNTESE DE PHAs	25
2.7.1-Síntese de P [3HB]	25
2.7.2 – Síntese de P[3HB-co-3HV]	26
2.7.3 – Metabolismo e regulação da biossíntese de PHAs	27
2.7.4- Precursores das unidades de 3-hidroxivalerato	28
2.7.4.1- Ácido Propiônico	28
2.7.4.2- Ácido Valérico	29
2.7.5- Outras vias metabólicas	29
2.8- ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE P[3HB-co-3HV]	30
2.8.1- Itaconato	30

2.8.2- Acetato e Ácido Oléico	31
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 –EXPERIMENTOS REALIZADOS	33
3.2- MICRORGANISMO	34
3.3 – MEIOS DE CULTURA	34
3.3.1- Meio Luria Bertani (LB)	34
3.3.2- Meio mineral	34
3.4- PREPARO DO PRÉ INÓCULO DE <i>Chromobacterium violaceum</i>	35
3.5-PREPARO DO INÓCULO	35
3.5.1- Fase de crescimento celular	35
3.5.2- Fase de acúmulo de polímero	36
3.6 – FONTE DE CARBONO	36
3.7- ÁCIDO PROPIONICO	36
3.7.1- Preparo da solução de propionato	36
3.8- PREPARO DA SOLUÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO	36
3.9- INIBIDOR ENZIMÁTICO	37
3.9.1 Preparo da solução de itaconato	37
3.10- SUPLEMENTOS	37
3.10.1- Preparo da solução de acetato	37
3.11- PRODUÇÃO DE P[3HB-co-3HV]	37
3.11.1- Sem adição de suplementos	37
3.11.2- Com a adição de suplementos	38
3.12- INIBIÇÃO QUÍMICA DA ATIVIDADE DA PROPIONIL-CoA CARBOXILASE PELO ÁCIDO ITACÔNICO	38
3.13- DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA	38
3.14- AVALIAÇÃO DO PHA PRODUZIDO	39

CAPÍTULO IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 –EFEITO DA ADIÇÃO DE PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR <i>C. violaceum</i>	41
4.1.1- Efeito da adição de propionato sobre a produção de biomassa por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de fosfato	41
4.1.2- Efeito da adição de propionato sobre a produção de biomassa por <i>Chromobacterium violaceum</i> sob limitação de nitrogênio	42
4.2 – EFEITO DO PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE PHA POR <i>C. violaceum</i>	43
4.2.1- Efeito do propionato sobre a produção de PHA por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de fosfato	44
4.2.2- Efeito do propionato sobre a produção de PHA por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de nitrogênio	45
4.3 – PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACÚMULO DE PHA POR <i>C. violaceum</i> , SOB LIMITAÇÃO DE FOSFATO, EM MEIO SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA, COM E SEM PROPIONATO	47
4.3.1 – Efeito da adição de indutores de incorporação de 3HV sobre a produção de biomassa e acúmulo de PHA, por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de fosfato	48
4.3.1.1- Efeito do ácido oléico	49
4.3.1.2 – Efeito do acetato	49
4.3.1.3 – Efeito do itaconato	50
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	52
CAPÍTULO VI – PERSPECTIVAS	54
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Fluxos de carbono	2
Figura 2.1 – Estrutura geral dos polihidroxicanoatos	8
Figura 2.2 – Síntese de Hidroxiacil-CoA e sua incorporação ao poliéster bacteriano	9
Figura 2.3 – Micrografia eletrônica da <i>Chromobacterium violaceum</i> .	21
Figura 2.4 – Via de biossíntese de P[3HB] em <i>Ralstonia eutropha</i>	26
Figura 2.5 - Via metabólica de síntese de P(3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato	29
Figura 2.6 – Formação endógena de Propionil-CoA em <i>R.eutropha</i>	32
Figura 2.7 - Fórmula estrutural do ácido itacônico	33
Figura 4.1 – Efeito do propionato sobre a produção de PHA, sob limitação de fosfato	48
Figura 4.2 - Efeito do propionato sobre a produção de PHA, sob limitação de nitrogênio	50
Figura 4.3 – Composição do polímero formado em meio suplementado com extrato de levedura, sob limitação de fosfato	53
Figura A1 - Cromatograma do padrão de Poli (3-Hidroxi butirato-co-3 Hidroxivalerato) – Sigma-Aldrich	70
Figura A2 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato.	71
Figura A3 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 5 mM de propionato	72
Figura A4 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 10 mM de propionato.	73
Figura A5 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 15 mM de propionato.	74
Figura A6 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio.	75
Figura A7 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 5 mM de propionato	76
Figura A8 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 10 mM de propionato.	77
Figura A9 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 15 mM de propionato	78
Figura A10 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura.	79
Figura A11 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura e 10mM de propionato.	80
Figura A12 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 1,0 g.L ⁻¹ de ácido oléico.	81
Figura A13 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 10 mM de ácido acético.	82
Figura A14 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 5 mM de itaconato.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 –Propriedades de P[3HB-co-3HV] conforme a incorporação de valerato	11
Tabela 2.2 - Porcentagem de PHA acumulado por alguns microrganismos	16
Tabela 2.3 -Acúmulo de PHAs por <i>C.violaceum</i> DSM30191 em diferentes substratos sob limitação de nitrogênio	23
Tabela 2.4 – Composição do PHA acumulado por <i>C.violaceum</i> DSM30191 sob limitação de nitrogênio	23
Tabela 2.5 – Biodegradação de um filme de P[3HB-co-3HV] em diversos ambientes	24
Tabela 3.1 -Composição do meio Luria Bertani (LB)	36
Tabela 3.2 - Composição do meio mineral sob limitação de nitrogênio	36
Tabela 3.3 -Composição do meio mineral sob limitação de fosfato	36
Tabela 3.4 - Composição do meio mineral sob limitação de fosfato	37
Tabela 3.5 -Composição da solução concentrada de oligo-elementos	37
Tabela 4.1 - Efeito do propionato sobre a produção de biomassa por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de fosfato	45
Tabela 4.2 - Efeito do propionato sobre a produção de biomassa por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de nitrogênio	46
Tabela 4.3 - Efeito do propionato sobre a produção de PHA por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de fosfato	48
Tabela 4.4 - Efeito do propionato sobre a produção de PHA por <i>C. violaceum</i> , sob limitação de nitrogênio	49
Tabela 4.5 – Produção de biomassa e acúmulo de PHA por <i>C.violaceum</i> , sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, com e sem propionato	51
Tabela 4.6 – Produção de biomassa e acúmulo de PHA por <i>C.violaceum</i> , sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura	52

NOMENCLATURA

PHA	Poli-hidroxiálcanoato
P[3HB]	Poli-3-hidroxi-butirato
P [3HB-co-3HV]	Poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato
3HB	3-hidroxi-butirato
3HV	3-hidroxi-valerato
rpm	Rotações por minuto
min	Minuto
PHA _{scl}	Short chain length
PHA _{mcl}	Medium chain length
PHA _{LmL}	Long chain length
ATP	Adenosina trifosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
ATCC	American Type Culture Collection
PCC	Propionil-CoA Carboxilase
Ton	Toneladas

RESUMO

Os polihidroxicanoatos (PHAs) constituem um grupo de poliésteres acumulados por inúmeras bactérias na forma de grânulos intracelulares. Os PHAs podem representar até 80 % da massa celular seca, em algumas bactérias, sob condições desbalanceadas de crescimento. Dentre os PHAs mais estudados, destacam-se o poli-3-hidroxi-butirato (P[3HB]) e o copolímero poli-[3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato] (P[3HB-co-3HV] ou PHBV). Estes são termoplásticos biodegradáveis podendo ser produzidos biotecnologicamente, a partir de fontes renováveis de carbono. Por esta e outras razões, são uma das alternativas para a substituição dos plásticos derivados do petróleo. Contudo, esta aplicação é limitada pelo elevado custo de produção destes biopolímeros. O P[3HB-co-3HV] apresenta propriedades termomecânicas muito interessantes, uma vez que a introdução de unidades de 3-hidroxi-valerato (3HV) reduz a dureza, a cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. O precursor das unidades de 3HV mais empregado é o ácido propiônico. A análise do genoma de *Chromobacterium violaceum* (ATCC 12472) confirmou seu potencial para a produção biotecnológica destes PHAs. Neste estudo, com o objetivo de avaliar a produção de P[3HB-co-3HV] por *C.violaceum*, cultivou-se a linhagem ATCC12472, sob limitação de nitrogênio e fosfato, a partir de glicose (10 g. L⁻¹) e propionato (0 a 15 mM). Estudou-se o efeito da adição de suplementos (acetato e ácido oléico) ou inibidor do metabolismo do propionato (itaconato), visando estabelecer condições nas quais a houvesse maior incorporação de unidades de 3HV, ao copolímero. A quantificação e caracterização dos polímeros foram feitas por cromatografia gasosa. Os resultados obtidos mostraram que sob limitação de fosfato, na presença de glicose e propionato 15 mM, ocorreu a maior incorporação de unidades de 3HV ao copolímero. Nestas condições, observou-se uma produção de 33,6% de P[3HB-co-3HV] na biomassa (0,086 g. L⁻¹), contendo 18,3 mol% de 3HV. Em condições similares, porém sob limitação de nitrogênio,

obteve-se uma produção de 31,6% de P[3HB-co-3HV] na biomassa (0,25 g. L⁻¹), contendo apenas 3,6 mol% de 3HV. A suplementação da cultura, com extrato de levedura, sob limitação de fosfato, na presença de propionato 10 mM aumentou a produção de biomassa (0,16 g. L⁻¹), porém, teve efeito negativo sob a incorporação de 3HV ao copolímero. *C. violaceum* é capaz de produzir P[3HB-co-3HV], mesmo sem adição de um precursor de 3HV, provavelmente a partir de intermediários do metabolismo de aminoácidos. Tanto a suplementação com acetato, quanto com itaconato e ácido oléico, não incrementaram a incorporação de 3HV ao copolímero. Os pHs das culturas, ao final dos cultivos, atingiram valores iguais a 6,0 e 5,0, sob limitação de nitrogênio e fosfato, respectivamente, sugerindo que o decréscimo do efeito tamponante do fosfato, seja responsável pela inibição do crescimento celular, sob limitação do fosfato. Através deste estudo, foram definidas condições de cultivo para *C. violaceum* que permitiram a produção de copolímero com elevado percentual molar de 3HV, o que confere ao polímero características bastante interessantes do ponto de vista biotecnológico.

ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) constitute a group of polyesters accumulated by a number of bacteria growing under unbalanced cultivation conditions. Poly(3-hydroxybutyrate), P[3HB], and poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate), P[3HB-co-3HV], are among the most studied PHAs. These polymers are thermoplastic, biodegradable, and can be biotechnologically produced from renewable carbon sources. They are considered as alternatives to oil derived plastics. Nevertheless, PHA application as plastic material is greatly limited by its elevated production costs. P[3HB-co-3HV] presents some interesting mechanical properties since the introduction of 3-hydroxyvalerate (3HV) units to the polymer reduces hardness, crystallinity and its melting point. Propionic acid is the most widely applied precursor of 3HV unit to be incorporated to P[3HB-co-3HV]. The *Chromobacterium violaceum* genome has confirmed its biotechnological potential PHA production. Aiming to evaluate P[3HB-co-3HV] by *C. violaceum* (ATCC12472), in this work, the bacterium was cultivated in mineral medium, under nitrogen and phosphate limitation, using glucose (10 g.L⁻¹) and propionate (0 to 15 mM), as co-substrate to polymer production. The effects of the culture supplementation (by acetate and oleic acid) were studied as well as an inhibitor of propionate metabolism (itaconate), over the incorporation of 3HV into the copolymer. The produced polymers were characterized qualitatively and quantitatively by gas chromatography. It was shown that under phosphate limitation, in presence of glucose and 15 mM propionate, the highest incorporation of 3HV into copolymer occurred. Under these conditions, *C. violaceum* accumulated 33.6 % of P[3HB-co-3HV] of the biomass (0.086 g. L⁻¹) containing 18.3 mol% 3HV. Under similar conditions and nitrogen limitation it was observed an accumulation of 31.6 % of P[3HB-co-3HV] in the biomass (0.25 g. L⁻¹), containing only 3.6 mol% 3HV. Supplementation of phosphate limited cultures with yeast extract, in presence of 10 mM propionate increased the biomass production (0.16 g. L⁻¹). However a negative effect on 3HV incorporation into copolymer was observed. *C. violaceum* showed to be able to produce P[3HB-co-3HV] even in absence of precursors, probably from amino acids metabolism. Acetate supplementation as well as oleic acid supplementation did not increase the incorporation of 3HV. At the end of cultivations the pHs values reached 6.0 and 5.0, under nitrogen and phosphate limitation, respectively, suggesting that the decrease of growth were caused by the decrease of the buffering effect of high phosphate concentration. This study allowed to establish cultivation condition to production of P[3HB-co-3HV], by *C. violaceum* containing elevated molar fraction of 3HV.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Plásticos são um dos materiais descobertos recentemente que causam grande poluição ambiental. Os plásticos de origem petroquímica são amplamente empregados devido à fácil moldabilidade e à alta resistência química. Devido ao alto peso molecular e à conformação da cadeia carbônica desses polímeros, a ação dos microorganismos no processo degradativo é dificultada, permanecendo no meio ambiente por um longo período de tempo.

A incineração e a reciclagem são métodos utilizados para a solução deste problema. No entanto, ambos custam mais do que a biodegradação (Moore e Saunders, 1997). Estas alternativas não são muito viáveis, visto que o processo de combustão de plásticos é caro e muito perigoso, e a reciclagem torna-se um processo difícil devido à diversidade de plásticos comercializados (Johnstone, 1990).

Consumidores de plásticos têm demonstrado preocupação a respeito do seu acúmulo no meio ambiente e ao impacto ambiental. Indústrias estão ativamente procurando por maneiras de reduzir o uso desnecessário de plásticos como forma de complementar programas de reciclagem ou de reutilização. Outras estão trabalhando em novos materiais ou na modificação de materiais para reduzir o impacto ambiental de plásticos (Luzier, 1992).

Muitos países estão investindo em programas para diminuir o lixo plástico, bem como no desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (Lee, 1996a).

A substituição dos plásticos não biodegradáveis é uma alternativa interessante para este problema ambiental, mas necessita de estudos visando aumentar a produção e reduzir custos de processo.

Os PHAs possuem importantes propriedades que permitem sua aplicação em diversas áreas. São termoplásticos, insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis (Steinbüchel; Eversloh, 2003).

Os PHAs seriam excelentes substitutos dos plásticos convencionais também em aplicações de descartabilidade muito rápida, pois poderiam ser depositados em aterros sanitários, sem causar dificuldades para a degradação de outros materiais constituintes do lixo. No caso da existência de sistemas de coleta seletiva, poderiam ser reunidos ao restante da matéria orgânica e utilizados na produção de fertilizantes (Hänggi, 1995). Como na produção de PHAs são utilizadas matérias-primas derivadas da agricultura e, portanto, rapidamente renováveis, teríamos um sistema cíclico e equilibrado, semelhante aos sistemas naturais.

Figura 1.1 – Fluxos de carbono em um sistema não cíclico, utilizando plásticos originados a partir do petróleo e um sistema cíclico utilizando plásticos gerados a partir de matérias-primas renováveis – Fonte: Gomez et al.; 1996.

PHAs são poliésteres de reservas de carbono e energia produzidos por algumas bactérias quando a fonte de carbono é abundante, e outro nutriente, por exemplo, nitrogênio, fosfato ou oxigênio tornam-se limitantes. Quando a fonte de carbono é exaurida, PHA é utilizado pela bactéria (Kolibachuk et al., 1999).

A produção de PHAs por diversas bactérias é conduzida em duas fases. Uma fase de crescimento celular, sem condição limitante, objetivando a geração de biomassa, e outra, com limitação de algum nutriente, favorecendo o acúmulo de polímero, de acordo com a fonte de carbono oferecida.

A síntese de P[3HB] e de P[3HB-co-3HV] normalmente ocorre quando há excesso de fonte de carbono, energia disponível e limitação de pelo menos um nutriente necessário á multiplicação das células bacterianas (N, P, Mg, Fe,etc) (Brandl et al., 1990).

Polímeros de várias composições são produzidos, dependendo da especificidade ao substrato da *PHA* sintase, da fonte de carbono na qual a bactéria é cultivada, do microrganismo empregado, bem como do caminho metabólico envolvido na utilização da fonte de carbono (Kolibachuk et al., 1999). *C. violaceum* é uma das diversas bactérias capaz de produzir o copolímero P[3HB-co-3HV] a partir de uma fonte de carbono e um precursor de hidroxivalerato (3HV) como o ácido propiônico.

A incorporação de monômeros de valerato ao copolímero resulta na formação de um polímero com características industriais mais interessantes (menos duro e quebradiço, mais facilmente moldado) podendo ser usado para produção de filmes resistentes ao vapor d'água e gases, com propriedades similares ao polipropileno (Marchessault, 1996).

O precursor de valerato mais empregado na produção do copolímero P[3HB-co-3HV] é o ácido propiônico, no entanto, grande parte do ácido propiônico adicionado ao meio não é incorporado na forma de valerato. Parte do ácido é desviada para outras vias metabólicas as quais levam à produção de ATP.

Diversas estratégias metabólicas podem ser empregadas de forma a proporcionar uma maior incorporação de ácido propiônico no polímero na forma de valerato. O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer condições de cultivo adequadas à produção de polihidroxicanoatos por *C. violaceum*, com ênfase na produção de P[3HB-co-3HV], utilizando glicose como substrato e ácido propiônico como precursor das unidades de 3HV. O fato da *C. violaceum* ter seu genoma seqüenciado facilita o conhecimento do seu metabolismo, permitindo assim a indução ou inibição de certas vias metabólicas que favoreçam a produção do polímero.

Objetivo Geral

Estabelecer condições de cultivo adequadas à produção de polihidroxicanoatos por *C. violaceum*, com ênfase na produção de P[3HB-co-3HV].

Objetivos específicos:

- Estudar o efeito da limitação de fosfato e nitrogênio sobre o crescimento de *C. violaceum*;
- Estudar o efeito da adição de propionato sobre o crescimento celular de *C. violaceum*;
- Avaliar a produção do copolímero P[3HB-co-3HV] por *C. violaceum* sob limitação de nitrogênio, e fosfato, utilizando-se glicose como fonte de carbono, e propionato como precursor das unidades de 3HV;
- Avaliar o efeito da adição dos suplementos (extrato de levedura, ácido oléico e acetato) sobre o crescimento celular e a incorporação de unidades de 3HV no copolímero;
- Avaliar o efeito da utilização de um inibidor enzimático do consumo de propionato (ácido itacônico) sobre o crescimento celular e a incorporação de unidades de 3HV no copolímero.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - O IMPACTO AMBIENTAL CAUSADO POR MATERIAIS PLÁSTICOS

Os plásticos têm um papel fundamental na sociedade moderna, onde são utilizados de múltiplas formas. Além disso, têm-se desenvolvido inúmeras aplicações para as quais anteriormente eram utilizados outros materiais, como metais, vidros, madeira, papel, etc. Ou seja, os plásticos possuem não apenas um grande mercado, como também representam um mercado em crescimento (Gomez et al., 1996). A indústria de material plástico, nos Estados Unidos, movimentava sozinha 50 bilhões de dólares por ano e 20 % dos rejeitos são plásticos acumulando 25 milhões de toneladas por ano. Estima-se que sejam produzidos 100 milhões de toneladas de plásticos por ano em todo o mundo.

Devido ao fato de algumas aplicações dos plásticos, por exemplo, em embalagens, serem de descartabilidade muito rápida, associada à grande dificuldade de degradação destes materiais, os plásticos têm despertado grande preocupação ambiental (Schimidell; Vitoratto, 1992).

Como a maior parte do lixo é depositada em aterros sanitários, os plásticos representam um problema onde, devido à lenta degradabilidade, comprometem a circulação de gases e líquidos, e dificultam a degradação de outros materiais descartados (Gomez et al., 1996).

Paralelamente à crescente preocupação com problemas gerados pelo uso de materiais plásticos descartáveis, surgem alternativas visando reduzir este problema; dentre estas alternativas destacam-se: a reciclagem e incineração dos plásticos de origem petroquímica, incorporação de aditivos, visando aumentar a degradabilidade e, ainda, obtenção de novos materiais termoplásticos biodegradáveis (Gomez et al., 1996).

A reciclagem é, sem dúvida, dentre essas alternativas, a que mais tem sido aplicada, embora os custos elevados tenham impedido que a reciclagem de plásticos convencionais atinja níveis compatíveis àqueles do descarte. A incineração, por outro lado, inicialmente foi alvo de grandes críticas, principalmente devido à geração de gases tóxicos. Atualmente, tem-se aplicado a utilização de filtros que permitem minimizar a emissão destes gases, causando assim menos prejuízo ao meio ambiente (Gomez et al., 1996).

Além da dificuldade de degradação dos plásticos convencionais, um segundo problema pode ser citado: a principal matéria-prima utilizada para sua produção constitui-se em um recurso não renovável, o petróleo. Assim, estamos diante de um sistema não cíclico, cujo resultado é o aumento da quantidade de CO₂ na atmosfera (Rabello, 1987).

Algumas formas de aditivação dos plásticos convencionais permitem a obtenção de plásticos fotodegradáveis, ou seja, que se degradam sob a ação de raios ultravioleta. A incorporação de materiais biodegradáveis aos plásticos convencionais é outra forma de aditivação que vem conquistando espaço (Evans; Sikdar, 1990). Dessa forma, permite-se a degradação de pelo menos parte do material descartado e a destruição de sua estrutura, reduzindo-o a partículas menores. O principal material utilizado para este fim é o amido. Diversas empresas têm produzido e comercializado polietileno aditivado com amido (Perrone, 1991).

O desenvolvimento atual tem permitido identificar novos materiais que possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos convencionais, mas que são facilmente degradados pela ação de microrganismos no meio ambiente, os plásticos biodegradáveis. Diversos materiais que reúnem essas duas características (termoplasticidade e biodegradabilidade) têm sido estudados e produzidos comercialmente; dentre estes podemos citar: polilactato, poliglicolato, poli-ε-caprolactona (PCL), álcool polivinílico (PVOH), polihidroxialcanoatos (PHAs) (Perrone, 1991).

2.2 - POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAS)

Dentre os materiais biodegradáveis em desenvolvimento, incluem-se os polihidroxicanoatos - PHAs - que despertam atenção devido às suas propriedades similares aquelas dos plásticos petroquímicos e à sua completa biodegradabilidade. PHAs são poliésteres naturais formados por unidades repetitivas de ácidos hidroxialcanóicos. São produzidos como reserva de carbono e de energia e acumulados no interior das células na forma de grânulos por uma grande variedade de microrganismos, em condições particulares de crescimento, tal como, a imposição da limitação de um nutriente (N, P, Mg, Fe, etc) e a presença de excesso de carbono (Dawes; Senior, 1973).

A estrutura das unidades monoméricas, presentes nos diferentes PHAs depende das espécies bacterianas e da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para o crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (Fuller, 1999). Alguns destes poliésteres têm propriedades físicas similares ao polipropileno, tornando-os uma alternativa aos plásticos convencionais, além de serem, produzidos a partir de fontes renováveis de carbono (Kolibachuk et al., 1999).

Os PHAs constituem uma classe geral de polímeros microbianos (ésteres poliméricos) da qual os mais estudados são o poli-3-hidroxibutirato (P[3HB] ou PHB) e o poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P[3HB-co-3HV] ou PHBV) (Doi, 1990). A estrutura geral da unidade monomérica destes polímeros é apresentada na figura 2.1. A maioria dos PHAs é um poliéster alifático de hidroxíácidos orgânicos. A composição da cadeia lateral ou do radical R e o valor de n determinam a identidade da unidade monomérica (Lee, 1996a).

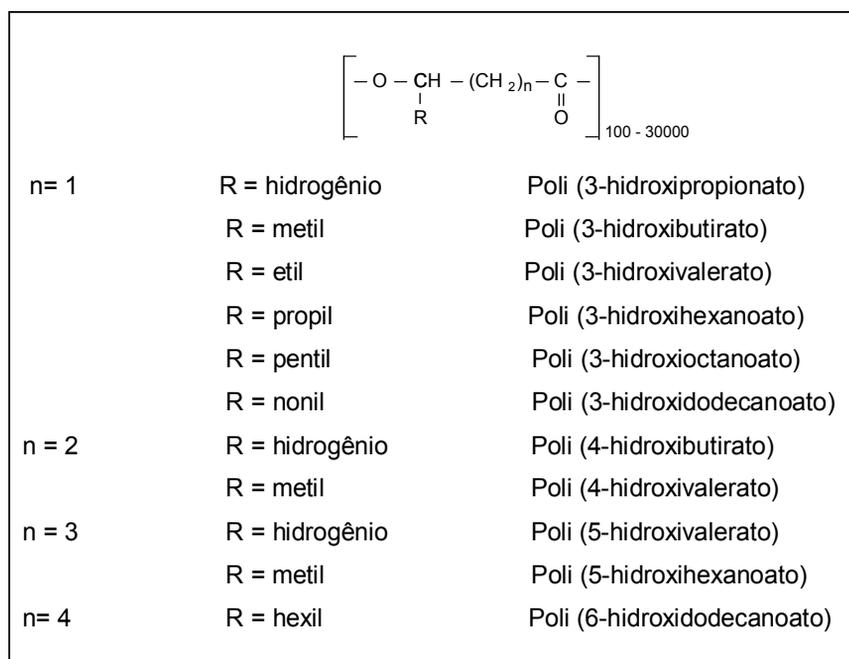


Figura 2.1 – Estrutura geral dos polihidroxiacanoatos. Fonte: Lee, 1996a.

As unidades constituintes de PHAs são divididas em três grandes grupos, com base no comprimento da cadeia monomérica principal; assim, temos os hidroxialcanoatos de cadeia curta (HA_{SCL}), contendo de 3 a 5 átomos de carbono, os hidroxialcanoatos de cadeia média (HA_{MCL}), contendo de 6 a 16 átomos de carbono. O termo hidroxialcanoatos de cadeia longa (HA_{LCL}) refere-se a monômeros com mais de 17 átomos de carbono na cadeia. Entretanto, até o momento, em nenhum PHA, produzido por bactérias, foram identificados monômeros com mais de 16 átomos de carbono (Steinbüchel; Valentin, 1995).

A síntese e incorporação destes monômeros dependem do fornecimento de um substrato adequado que possa ser convertido no hidroxiaçil-CoA (HA-CoA) desejado, através das reações metabólicas existentes na célula bacteriana. Além disso, é necessário que a célula bacteriana contenha uma enzima denominada PHA sintase, que é capaz de incorporar o hidroxiaçil-CoA sintetizado a uma cadeia polimérica, conforme esquematizado na figura 2.2.

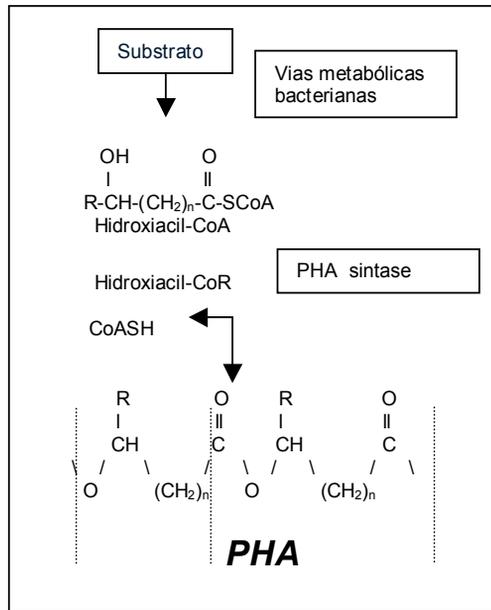


Figura 2.2 – Síntese de hidroxiacil-CoA e sua incorporação ao poliéster bacteriano.

Fonte – Gomez et al., 1996.

Uma classificação preliminar permite separar as bactérias, com relação ao tipo de PHAs acumulado em dois grandes grupos. No primeiro grupo encontram-se as bactérias acumuladoras de PHAs contendo apenas hidroxialcanoatos de cadeia curta (C_3 a C_5), e/ou mais raramente hidroxialcanoatos de cadeia média, (C_6), sendo a principal representante deste grupo a *Ralstonia eutropha*. No segundo grupo estão incluídas as bactérias que incorporam apenas hidroxialcanoatos de cadeia média (C_6 a C_{16}). Deste segundo grupo são representantes as *Pseudomonas*. Essas diferenças parecem ser determinadas essencialmente pelo tipo de PHA sintase presente nessas bactérias, uma vez que a clonagem em *P.oleovorans* dos genes responsáveis pela síntese de PHB em *R.eutropha* determinou, após cultivo em diferentes ácidos orgânicos, a síntese de dois PHAs distintos, um contendo apenas 3HB e outro contendo monômeros de hidroxialcanoatos de cadeia de comprimento médio (Timm; Steinbüchel, 1990).

O P[3HB] apresenta propriedades que, em alguns aspectos, assemelham-se às das do polipropileno, ou seja, a boa processabilidade em equipamentos comumente usados para processamento de poliolefinas e outros plásticos sintéticos, tornando-se adequado para moldagem por injeção, extrusão, indicando que PHAs podem ser adequados para aplicações em várias áreas como substituto parcial dos plásticos sintéticos não biodegradáveis (Steinbüchel; Fuchtenbusch, 1998).

Contudo, o P[3HB-co-3HV] apresenta maior utilidade que o P[3HB] devido às suas propriedades termomecânicas. As unidades repetidas de 3HV na cadeia polimérica reduzem a dureza, a cristalinidade e o ponto de fusão do polímero, aumentando dessa forma, a flexibilidade e elasticidade e, conseqüentemente, sua resistência ao impacto, melhorando sua processabilidade (Byrom, 1987; Weiner, 1997; Du et al., 2001a).

PHB e outros PHAs podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água (e metano sob condições anaeróbias) pelos microrganismos no ambiente (Du et al., 2001b), sendo facilmente degradado no solo (Grothe et al., 1999).

Diferentes unidades monoméricas podem ser identificadas como constituintes de PHAs em várias bactérias, no entanto, poucos polihidroxicanoatos são produzidos em quantidades suficientes para caracterização e desenvolvimento de potenciais aplicações (Lee, 1996a). As variações no tamanho da cadeia polimérica e dos monômeros constituintes ampliam as propriedades dos PHAs e suas potenciais aplicações (Madison; Huisman, 1999). As propriedades físicas e mecânicas dos polihidroxicanoatos, como: elasticidade, rigidez, temperatura de fusão, resistência à extensão, resistência a solventes orgânicos entre outras, estão relacionadas com a composição monomérica dos polímeros (Du; Yu, 2002).

O PHB é um material rígido e quebradiço, o que o caracteriza como um polímero com propriedades elásticas pouco satisfatórias. Por outro lado, polímeros de cadeia média (mcl-PHA) são altamente elásticos. Estudos recentes nesta área vêm desenvolvendo um novo tipo de copolímero, com

unidades monoméricas de cadeia curta e média, a partir de bactérias recombinantes (Tsuge, 2002). Esses polímeros são mais dúcteis e de fácil moldagem quando comparados ao homopolímero PHB.

A incorporação de unidades de valerato (3HV) ao P[3HB] resulta na formação do copolímero P[3HB-co-3HV]. O copolímero apresenta propriedades mais interessantes do ponto de vista comercial (Byrom, 1987), visto que a incorporação de valerato diminui os níveis de cristalinidade e o ponto de fusão do polímero. A incorporação de 3HV entre 17 a 20 % permite a obtenção de um copolímero com melhor flexibilidade e resistência ao impacto (Holmes, 1985).

A tabela 2.1 apresenta algumas propriedades dos copolímeros conforme o índice de incorporação de valerato.

Tabela 2.1- Propriedades de P[3HB-co-3HV] conforme a incorporação de valerato

P(3HB-co-3HV)	Ponto de Fusão (°C)	Rigidez (GPA)	Resistência à pressão (Mpa)	Resistência ao impacto (J/m)
3% mol de HV	170	2,9	38	60
9% mol de HV	162	1,9	37	95
14% mol de HV	150	1,5	35	120
20% mol de HV	145	1,2	32	200
25% mol de HV	137	0,7	30	400
P(3HB)	179	3,5	40	50
Polipropileno	170	1,7	34,5	45
Poliestireno	110	3,1	50	21

Fonte: Adaptado de Lee, 1996b.

2.3 - HISTÓRICO DOS PHAS

O primeiro polihidroxicanoato a ser estudado foi o poli-3-hidroxi-butirato P[3HB], o qual foi descoberto por Lemoigne por volta de 1926. Wallen e Rohdwedder em 1974 observaram a presença de P[3HB] e poli (3-hidroxi-valerato) em águas residuárias, através da extração com clorofórmio (Anderson; Dawes, 1990).

A comercialização do P[3HB], o protótipo da família dos PHAs foi primeiramente feito pela W.R.Grace Co, nos anos 50 (OTA, 1993). Em 1976, a empresa inglesa Zeneca Bio Products, antigamente Imperial Chemical Industrie

(ICI), retomou a avaliação do PHB, objetivando sua produção e comercialização como uma alternativa aos plásticos gerados a partir de matérias-primas derivadas do petróleo. Os primeiros resultados demonstraram que o PHB é um material de dureza elevada e quebradiço, o que restringe suas aplicações. Em 1981 foi depositada uma patente descrevendo um processo, no qual a bactéria aeróbia *R. eutropha* foi utilizada para a produção de copolímeros contendo 3HB e 3HV (Byrom, 1990).

No período de 1982 a 1988, Chemie Linz GmbH em colaboração com a Petroquímica Danubia (PCD) produziu P[3HB] a partir da sucrose como substrato e em 1991 começou a produção piloto de 2 toneladas (Biomer, 2003). No começo dos anos 90, Zeneca UK produziu P[3HB-co-3HV] por fermentação bacteriana usando uma mistura de glicose e ácido propiônico. Naquele tempo, o polímero produzido em planta piloto da Zeneca foi ofertado a U\$ 30/Kg e projetou-se produzir numa planta comercial 5000 ton/ano do material para ser comercializado abaixo de U\$ 8-10/Kg, sendo ainda um preço proibitivo para uma aplicação em grande escala.

Em 1996, Zeneca vendeu seu negócio chamado de Biopol para Monsanto, que continuou as investigações iniciadas pela Zeneca na produção de PHAs em culturas geneticamente modificadas, especialmente na expressão dos genes para síntese de PHAs. Em paralelo, a Monsanto comercializou pequenos volumes produzidos de Biopol P[3HB-co-3HV] por meio de fermentação. Em 1998, a Monsanto cessou suas operações com PHAs (Bohlmann, 2000) e em 2001 vendeu seu Biopol para a US Biotechnology Company Metabolix (Metabolix, 2003). Hoje a Metabolix está produzindo PHAs através de fermentação de açúcar de milho em fermentador comercial de 50 m³. A Metabolix atingiu altas taxas de produção com tempo total de fermentação de menos de 40 h e diz que a meta para uma produção comercialmente viável de PHA está para ser atingida. Em paralelo, Metabolix continua pesquisando e desenvolvendo produções de PHAs em culturas geneticamente modificadas.

Uma companhia não associada em geral com o campo da biotecnologia, Proctor & Gamble (P&G) comprometeu-se com esforços em pesquisa e desenvolvimento para comercializar a Nodax variedades de PHAs (P&G, 2003). P&G patenteou recuperando e processando caminhos para estes polímeros na qual foi licenciado pela Companhia Japonesa Kaneka. A Kaneka está desenvolvendo um processo comercial e espera-se estar produzindo grandes volumes (20.000 ton/ ano ou mais) de P[3HB-co-3HHx] em 2005. Para viabilidade comercial, concentrações de PHA de 60 a 80 g/L devem ser atingidas (P&G, 2001).

Resíduos de alimentos atualmente estão sendo utilizados para a produção de PHAs com altos valores de substratos, como sucrose, óleos vegetais e ácidos graxos. Na teoria, qualquer fonte de carbono pode ser utilizada, incluindo lignina da celulose a partir de produtos da agricultura. Em prática para PLA e outros poliésteres, um maior aperfeiçoamento em rendimentos nas fermentações pela engenharia metabólica de microrganismos, juntamente com avanços em pré-tratamento de resíduos (ex: novos processos enzimáticos) são pré-requisitos para uma mudança na utilização de resíduos.

Em meados da década de 90, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis, empregando matéria-prima renovável, em especial a derivada da cana-de-açúcar, a partir de um projeto cooperativo desenvolvido pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), Copersucar e Universidade de São Paulo. Após um levantamento de oportunidades, foi selecionado um grupo de polímeros da família dos polihidroxicanoatos (PHAs) que podem ser produzidos por bactérias em biorreatores a partir de alguns carboidratos (Silva; Rodrigues; Gomez, 2001).

2.4 - APLICAÇÕES DOS PHAS

Devido às suas características físico-químicas de moldabilidade e terpolimerismo, o P[3HB] e principalmente o P[3HB-co-3HV], foram inicialmente usados na manufatura de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis, bem como, sacos de proteção para plantas. Além disso, filmes de PHAs podem ser aplicados em papelão para formar uma película impermeável e produzir um material composto completamente biodegradável, o que é uma alternativa aos materiais compostos não biodegradáveis preparados a partir de, por exemplo, papelão mais polietileno ou alumínio (Steinbüchel; Fächtenbusch, 1998).

Os PHAs também têm suas aplicações na área médica, tais como materiais osteossintéticos e suturas cirúrgicas. Por sua biocompatibilidade, estes biopolímeros podem ser aplicados como matriz de materiais para a liberação lenta de fármacos, hormônios, herbicidas, inseticidas e fragrâncias para indústrias farmacêuticas e de alimentos. As aplicações médicas e farmacêuticas do P [3HB] são, todavia, restritas devido à sua biodegradação muito lenta e elevada estabilidade hidrolítica em tecidos estéreis.

Os PHAs têm sido utilizados também no desenvolvimento de materiais aplicados à área médica relacionada ao tratamento de doenças cardiovasculares. O P[3HB] está sendo empregado em sutura do pericárdio em cirurgias cardiovasculares sem formação de adesões entre o coração e o esterno, com sucesso (Reddy et al., 2003).

A aplicação de PHAs em substituição aos plásticos de origem petroquímica ainda não é muito viável economicamente, devido ao custo elevado de produção, a partir de substratos carbônicos comuns. O uso de plantas transgênicas seria uma opção para se diminuir o custo de produção, visto que produziriam alta biomassa com alto conteúdo de PHAs. Contudo, na área médica é interessante o uso de PHAs, visto que este nicho de mercado não consome o biopolímero em larga escala e o preço não é um fator limitante, como na indústria de plásticos em geral.

Tem sido estudado o uso de PHAs como matéria-prima para a produção de tintas (Steinbüchel; Fächtenbusch, 1998).

Em suma, inúmeros materiais biodegradáveis termoprocessáveis têm sido produzidos, com propriedades físicas e degradativas as quais podem ser alteradas através da variação das frações molares de determinadas unidades monoméricas em copolímeros de PHAs. A composição destes copolímeros depende tanto da fonte de carbono a partir do qual são sintetizadas, assim como do microrganismo produtor. Certamente estes copolímeros são um grupo de materiais promissor, pois possuem características particulares interessantes a cada uma das prováveis aplicações. (Sasikala; Ramana, 1996).

2.5 - MICRORGANISMOS PRODUTORES

Os microrganismos capazes de acumular PHAs são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram -negativas (Byrom, 1987), que podem ser encontradas na natureza, isto é, no solo, água do mar, efluentes, etc. A seleção do microrganismo e do substrato tem grande influência no custo de fabricação do PHA (Anderson; Dawes, 1990). É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (Ramsay, 1994a). O elevado custo de produção de PHA se deve, em grande parte, ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero.

Este critério elimina da seleção todas as bactérias Gram-positivas e aquelas que não são capazes de acumular porcentagens elevadas de polímero (Ramsay et al., 1990). A tabela 2.2 apresenta a porcentagem de PHA que alguns microrganismos podem acumular.

Tabela 2.2 - Porcentagem de PHA acumulado por alguns microrganismos

Microrganismo	% de acúmulo
<i>Ralstonia eutropha</i>	96
<i>Azospirillum</i>	75
<i>Azotobacter</i>	73
<i>Baggiatoa</i>	57
<i>Leptothrix</i>	67
<i>Methylocystis</i>	70
<i>Pseudomonas</i>	67
<i>Rhizobium</i>	57
<i>Rhodobacter</i>	80

Fonte: Rediff Home Page

Alguns dos microrganismos principais produtores de PHAs são: *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Escherichia coli*. Estas bactérias são divididas em dois grupos, baseados na dependência de limitação de nutrientes para a produção de biopolímeros. O primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes para a produção de PHAs e o segundo grupo acumula PHAs já durante a fase de crescimento. Dentre as citadas, pertencem ao segundo grupo somente *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante (Lee, 1996a). As demais acumulam polímero apenas sob limitação de nitrogênio, fosfato, enxofre, oxigênio, etc.

2.5.1 – Azotobacter

Azotobacter sp foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial de P[3HB] por ser capaz de utilizar sacarose e glicose como substrato. Entretanto, ela foi rejeitada por produzir, paralelamente ao P[3HB], um polissacarídeo (alginato), tornando o processo de difícil controle (Byrom, 1987). Para tentar melhores condições de produção, Page e Knosp (1989) estudaram uma cepa mutante de *Azotobacter vinelandii* capaz de acumular quantidades de P[3HB] superiores a 75 % de sua massa seca, com um fator de conversão de glicose em polímero de 0,33 g. g⁻¹. Após estabelecer que o valerato era o

melhor precursor de 3HV, Page (1992) usou sais em combinação com melaço de beterraba para produzir P[3HB-co-3HV] a partir desta cepa mutante de *Azotobacter vinelandii*. Os autores concluíram que a capacidade desta cepa de utilizar melaço de beterraba como fonte de carbono reduziria à metade o custo de produção de PHAs formados a partir da glicose. Contudo, observaram que a produtividade obtida ainda era inferior se comparado com o que se consegue usando *Ralstonia eutropha* (Ryu et al., 1997).

2.5.2-Alcaligenes

Alcaligenes latus sintetiza PHA associada ao crescimento. No entanto esta cepa é capaz de acumular quantidades maiores de PHA em condições de limitação de algum nutriente (Choi e Lee, 1999). É relatado que a indústria austríaca Chemie Linz GmbH produziu até 1000 Kg/ semana de PHB a partir de sacarose, utilizando *A. latus* como microrganismo produtor (Madson and Huisman, 1999). Uma desvantagem na utilização deste microrganismo é sua sensibilidade aos precursores utilizados na produção de P[3HB-co-3HV] (Ramsay et al., 1990).

2.5.3 – Pseudomonas

As bactérias deste gênero podem produzir tanto polihidroxialcanoatos de cadeia lateral média (PHA_{MSC}) quanto de cadeia lateral longa (PHA_{LCL}) (De Smet et al., 1983; Preusting et al., 1991; Fuller et al., 1988). As PHA sintases de *Pseudomonas* apresentam especificidade por hidroxiacil-CoA (HA-CoA) de cadeia média (HA_{MCL}-CoA) e estes substratos podem ser produzidos a partir da beta-oxidação de ácidos graxos de cadeias longas ou médias. Sendo assim estes ácidos graxos são os substratos para a biossíntese de PHAs nestas bactérias.

Vários substratos de baixo custo têm sido testados para produção de PHAs por *Pseudomonas*, entre estas, sebo de origem animal. O sebo é composto de uma mistura de triacilgliceróis, contendo principalmente os ácidos

oléico, esteárico e palmítico, como seus componentes graxos, representado substratos interessantes para a produção de PHAs por este gênero de bactéria (Madson and Huisman, 1999). Contudo, a maioria das *Pseudomonas* estudada não possuem atividade de lipase. Apenas *Pseudomonas resinovorans*, possui esta atividade, sendo capaz de acumular até 15% do seu peso seco em PHA, a partir deste substrato (Cromwick; Lenz, 1996).

Tem sido descrito que algumas cepas de *Pseudomonas* acumulam copolímeros constituídos de 3-hidroxi-butarato e de ácidos 3-hidroxi-alcanoicos de cadeia média (Lee, 1995). É sugerido que PHA_{SCL} e PHA_{MCL} são exclusivos sendo cada um provavelmente devido à especificidade da PHA sintase pelo substrato. Assim, um organismo que sintetiza PHAs contendo ambos polímeros de cadeia curta e média é notável, podendo ser capaz de produzir copolímeros com propriedades interessantes.

2.5.4 - *Ralstonia eutropha*

A *R.eutropha* é um dos microrganismos mais estudados e aplicados para produção de PHAs. Diferentemente de *A. latus*, esta bactéria só inicia o acúmulo de PHA a partir do final da fase exponencial de crescimento. *R. eutropha* foi o organismo escolhido pela ICI (Imperial Chemical Industries) para o desenvolvimento da produção industrial do P[3HB-co-3HV]. Este microrganismo foi escolhido porque cresce bem em meio mínimo, a 30°C, em várias fontes renováveis de carbono, exceto em glicose, e é capaz de acumular até 80 % de seu peso seco em polímero. Mutantes capazes da utilização de glicose foram selecionados e utilizados para produzir 300 toneladas/ ano de P[3HB-co-3HV] (Byrom, 1992). A produção de polímero por *R.eutropha* é realizada em duas fases, uma fase inicial de crescimento não limitado visando à produção de massa celular, seguida de uma fase limitada em algum nutriente, exceto carbono, com acúmulo de polímero (Byrom, 1987).

Industrialmente, a *R.eutropha* é uma bactéria amplamente empregada para produção de PHAs, em especial P[3HB] e P[3HB-co-3HV] (Lee et al., 1999). Na produção de copolímero, ácido propiônico é adicionado no meio durante a fase de acúmulo e a proporção de valerato incorporada depende da razão de alimentação ácido propiônico / açúcar. Essa bactéria também é capaz de acumular polímero contendo monômeros de 4-hidroxi-butarato (4HB) e 5-hidroxi-valerato (5HV), conforme o substrato utilizado (Anderson e Dawes 1990).

2.5.5- Produção de PHAs em plantas

Recentemente estudos variados estão sendo realizados a fim de se implementar a produção de P[3HB] em plantas. A produção de PHA em escala agrônômica aumentaria a síntese dos biopolímeros para milhões de toneladas sendo infinitamente vantajosa quando se compara à produção por processo fermentativo. Potencialmente os PHAs poderiam ser produzidos a um custo de U\$\$ 0,20 a 0,50 /Kg, caso fossem sintetizados por plantas a uma porcentagem variando entre 20 a 40 % de seu peso seco, podendo competir com os plásticos oriundos do petróleo (Reddy et al., 2003).

Inúmeras dificuldades são encontradas ao tentar-se expressar os genes da biossíntese de PHB em plantas porque, ao contrário das células procarióticas, as eucarióticas são altamente compartimentalizadas e os genes a serem expressos devem ser direcionados a uma organela na qual a concentração de acetil- CoA seja elevada, mas possa ser utilizada sem comprometer o crescimento da planta. Além disso, alguns estudos mostraram que o acúmulo do polímero em determinados compartimentos, por exemplo, no núcleo, parece ter inibido o crescimento de vegetal.

As plantas oleaginosas são interessantes para a síntese de PHAs, visto que o PHB e o óleo são derivados da acetil-CoA. Estratégias utilizando engenharia metabólica podem ser empregadas para deslocar a acetil-CoA apenas para a produção de PHB, diminuindo a proporção de óleo. Outras plantas testadas

para produção de PHAs são *Gossypium hirsutum* (algodão) e *Zea mays* (milho). Empresas como Monsanto (USA) e Zeneca (UK) estão investindo em estudos para produção de PHAs a partir de plantas, como soja (Reddy, 2003).

2.5.6- *Escherichia coli* recombinante

Cepas de *Escherichia coli* abrigando os genes de biossíntese de PHAs de *Ralstonia eutropha* são empregados com frequência para a produção de P[3HB] com alto conteúdo de polímero e alta produtividade. Diversos plasmídios foram desenvolvidos a fim de se produzir PHA em *E. coli* (Lee, 1996 a).

A produção de P[3HB-co-3HV] por *E. coli* recombinante é considerada difícil visto que essa bactéria não utiliza o ácido propiônico com eficiência. Entretanto, estudos recentes empregando cepas mutantes de *E. coli* ou ácido acético e oléico como indutor na cultura têm sido bem sucedidos.

E. coli é capaz de utilizar diversas fontes de carbono, incluindo glicose, sacarose, lactose e xilose. Isso representa uma redução potencial no custo de produção de PHAs pela utilização de substratos baratos, como: melão, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (Lee e Chang, 1995).

A bactéria *E. coli* apresenta como vantagens o rápido crescimento celular a altas temperaturas, a ausência de despolimerases e a fácil lise celular. O custo da extração dos grânulos de PHA é menor à medida que as células são facilmente lisadas (Steinbüchel e Schlegel, 1991; Wang e Bakken, 1998; Madison e Huisman, 1999).

Uma outra vantagem da *E. coli* é o fato desta bactéria ter seu genoma e fisiologias bem caracterizadas. Isso oferece vantagens para manipulação genética e desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica.

O custo da produção de PHA usando a cepa produtora natural *R. eutropha* é de U\$\$ 16/Kg. Alguns estudos mostram que utilizando *E. coli* recombinante o custo de produção pode ser reduzido para U\$\$ 4/ Kg. Sendo assim, o emprego de *E. coli* recombinante pode ser considerado promissor para se minimizar custos na produção de PHA (Lee, 1996 a).

2.5.7 - *Chromobacterium violaceum*

A presença de *Chromobacterium violaceum* no Brasil foi relatada no ano de 1976, quase um século depois de sua descoberta por Boisbaudran em 1882. Foram coletadas amostras de água da estação de tratamento na cidade de Manaus para análise bacteriológica, e os resultados indicaram a presença de colônias bacterianas violetas. Foi a primeira vez que se isolou e estudou este microrganismo no Brasil (Caldas, 1977; Caldas et al., 1978).

No ano de 2000, devido ao seu potencial biotecnológico, a bactéria *C.violaceum*, foi escolhida pelo Ministério das Ciências e Tecnologia (MCT) para ser o primeiro microrganismo a ter o seu genoma completamente seqüenciado por uma rede nacional de seqüenciamento, compreendendo 25 laboratórios seqüenciadores, um centro de bioinformática e 3 laboratórios coordenadores distribuídos por todo o Brasil. A seqüência completa do seu genoma foi finalizada e publicada em 2002 (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

A produção de polihidroxicanoatos é uma característica importante observada em culturas de *C.violaceum* (Kolibachuk et al., 1999).

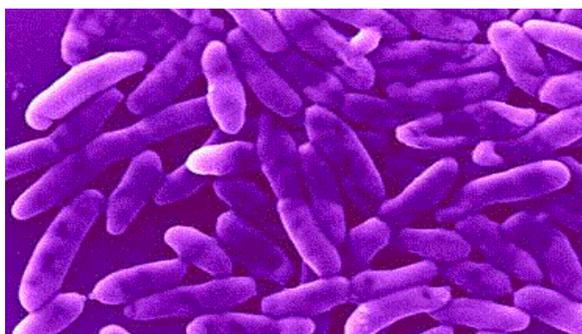


Figura 2.3 – Micrografia eletrônica da *Chromobacterium violaceum*. Disponível em www.unb.br/acswweb/imagens/bactéria1.jpg, acesso em 17 janeiro de 2003.

Pode-se citar mais alguns aspectos do potencial biotecnológico da *C.violaceum* como a síntese de outros polihidroxicanoatos de cadeia curta, na qual representam alternativas para plásticos derivados da petroquímica,

hidrólise de filmes plásticos, produção do pigmento violaceína que possui atividade antiviral e antimicrobiana (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

Steinbüchel e colaboradores (1993) relataram que *C.violaceum* DSM 30191 e outras duas cepas desta espécie mostraram-se capazes de sintetizar e acumular o homopolímero de ácido 3- hidroxivalérico (3HV) acima de 65% da massa celular seca durante o cultivo em culturas de batelada alimentada com ácido valérico como única fonte de carbono e limitação da fonte de nitrogênio. A partir de frutose, gluconato, propionato ou hexanoato, o homopolímero de 3- hidroxibutirato (3HB) foi acumulado.

Embora esta bactéria seja capaz de utilizar ácido valérico como única fonte de carbono para o crescimento, a partir da degradação do valerato a intermediários do metabolismo central do carbono, por exemplo, acetil-CoA, este não resulta na incorporação de 3HB. Entretanto, desde que poli [3HB] foi sintetizado a partir de outras fontes de carbono, como gluconato, a especificidade da PHA sintase da *C.violaceum* não é restrita ao uso de 3- hidroxivaleril-CoA como substrato, mas parece assemelhar-se a *Ralstonia eutropha* (Haywood et al, 1989).

Em estudos posteriores, Kolibachuk et al, (1999) clonaram e sequenciaram os genes codificadores da beta cetotiolase e PHA sintase de *C. violaceum* (DSM30191). A expressão heteróloga dos genes clonados e inseridos em *E. coli* recombinante, não resultou no acúmulo de polímero.

Os estudos sobre a produção de PHAs por *C. violaceum* a partir de diferentes fontes de carbono, sob limitação de nitrogênio, realizados por Kolibachuk et al (1999) e por Steinbuchel et al (1993), apresentam alguns resultados discrepantes quanto à incorporação de unidades de valerato, ao copolímero P[3HB-co-3HV], quando ácido valérico e frutose são uma das únicas fonte de carbono, sob limitação de nitrogênio. As tabelas 2.3 e 2.4 apresentam os resultados obtidos por cada autor.

Tabela 2.3 -Acúmulo de PHAs por *C.violaceum* DSM 30191 em diferentes substratos sob limitação de nitrogênio.

Composição do polímero (mol %)				
Fonte de carbono	%PHA	3HB	3HV	3HC
Glicose	38	98	2	Tr ^b
Frutose	26	92	8	Tr
Gluconato	2	100		
Ácido butírico	Tr	100		
Ácido valérico	28	12	88	
Ácido hexanóico	9	68	32	Tr
Ácido heptanóico	15	5	95	Tr
Ácido octanóico	4	78	22	
Ácido nonanóico	22	10	90	
Ácido decanóico	14	90	9	Tr
Ácido mirístico	41	97	3	Tr
Ácido palmítico	41	99	Tr	Tr
Ácido esteárico	50	99	1	Tr

Tr^b= traços, menos que 0,45 mol % ; Tr= traços

(Fonte : KOLIBACHUK et al.; 1999).

Tabela 2.4 -Composição do PHA acumulado por *C.violaceum* DSM30191 sob limitação de nitrogênio.

Composição do polímero (mol %)			
Fonte de carbono	PHA (%)	3HB	3HV
Frutose	10,5	100	Nd
Gluconato	20,1	100	Nd
Propionato	1,2	100	Nd
Valerato	43,8	Nd	100
Hexanoato	16,3	100	Nd
Heptanoato	Nd	-	-
Octanoato	Nd	-	-
4-hidroxibutirato	Nd	-	-
4-hidroxivalerato	Nd	-	-

Nd-não detectável (fonte: Steinbüchel et al., 1993).

De qualquer modo, estes resultados indicam que a especificidade da PHA sintase de *C.violaceum* pelo substrato é provavelmente restrita a hidroxiacil-CoAs de cadeia curta.(3HA_{SCL}), similar a sintase de *R. eutropha*.

2.6 - DEGRADAÇÃO INTRACELULAR DE PHAS

Uma importante característica dos PHAs é sua biodegradabilidade. Na natureza, vários microrganismos são hábeis para degradar PHAs pelo uso de *PHA hidrolases* e *PHA despolimerases*. As atividades destas enzimas podem variar e dependem da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), as dimensões das amostras e das condições ambientais. O tempo de degradação de um produto formado, por exemplo, por P[3HB] é da ordem de poucos meses (digestão anaeróbica) há anos (água do mar) (Madison e Huisman, 1999).

A degradação enzimática do polímero é uma reação heterogênea que envolve duas etapas: adsorção e hidrólise. A etapa inicial consiste na adsorção da enzima na superfície do polímero, a etapa subsequente consiste na hidrólise das cadeias poliméricas pelo sítio ativo das enzimas (Sudesh et al., 2000).

A degradação de P[3HB] e P[3HB-co-3HV] ocorre em sistemas aeróbios e anaeróbios, sendo que em ambientes aeróbios os produtos finais da degradação são dióxido de carbono, água e húmus. Em condições anaeróbias, metano também é produzido (Luzier, 1992).

A velocidade de biodegradação dos polímeros depende de fatores como: área superficial, atividade microbiana, ambiente disponível, pH, temperatura, nível de mistura e presença de outros materiais nutrientes (Sudesh et al., 2000).

A tabela abaixo apresenta o tempo necessário para a degradação completa de um filme de 1 mm de P[3HB-co-3HV] em diferentes ambientes.

Tabela 2.5- Biodegradação de um filme de P[3HB-co-3HV] em diversos ambientes.

Ambiente	Número de semanas necessárias para 100% de perda de massa
Ambiente anaeróbio	6
Sedimentos estuários	40
Ambiente aeróbio	60
Solo	75
Água do mar	350

Fonte: Luzier, 1992.

A degradação microbiana de PHAs no solo é favorecida com o aumento da temperatura, sendo que o copolímero P[3HB-co-3HV] tende a degradar mais rapidamente do que o homopolímero P[3HB] (Mergaert et al., 1993).

A degradação intracelular de P[3HB] é efetuada através de uma seqüência de reações envolvendo, nesta ordem, PHA despolimerase, D(-)-3-hidroxi-butilirato desidrogenase e acetoacetil sintetase para formar ácido D-3-hidroxi-butilírico e acetil-CoA (Doi, 1990, Jendrossek et al., 1996). O acetoacetil-CoA é um intermediário comum para as vias de síntese e degradação de P[3HB]. Doi et al (1992) estudaram a cinética de acúmulo e degradação de P[3HB] em *R. eutropha* e descobriram que a degradação do polímero é dez vezes mais lenta que a sua síntese. A degradação de polímero é controlada pela inibição da 3-hidroxi-butilirato desidrogenase pelo acetoacetato e o NADPH (Byrom, 1987).

2.7 - BIOSÍNTESE DE PHAS

A biossíntese de PHAs depende da capacidade metabólica da célula bacteriana em sintetizar hidroxiacil-CoA a partir do substrato, bem como da presença de uma *PHA* sintase que permita a incorporação do monômero ao poliéster, o que pode ser observado na figura 2.4 que ilustra a via metabólica de síntese de PHB a partir de carboidratos.

2.7.1 – Síntese de P[3HB]

Dentre todos os PHAs, o melhor estudado tem sido o P[3HB], principalmente por ter sido o primeiro a ser descoberto por Lemoigne em 1926. Na síntese de PHB a partir de acetil-CoA estão envolvidas três enzimas distintas. A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil - CoA formando acetoacetil-CoA, catalisada pela β -cetotiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação é uma redução de acetoacetil-CoA a hidroxibutiliril-CoA, catalisada pela acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH (codificada pelo gene *phbB*). A última reação é a polimerização dos monômeros de hidroxibutiliril-CoA no P[3HB], catalisada pela PHA sintase (codificada pelo gene *phbC*) (Madison e Huisman, 1999).

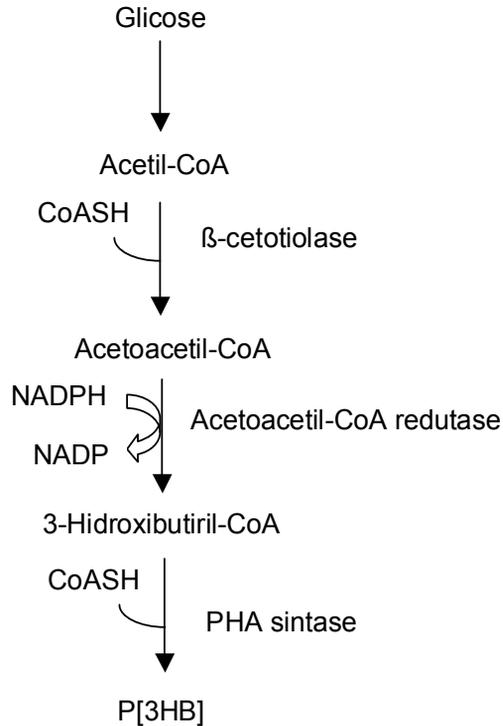


Figura 2.4- Via de biossíntese de P[3HB] . Fonte: Madison e Huisman, 1999.

2.7.2- Síntese de P[3HB-co-3HV]

A via metabólica de síntese de P[3HB-co-3HV] a partir de carboidratos e ácido propiônico está representada na figura 2.5. O primeiro passo consiste na formação de propionil-CoA a partir do ácido propiônico e CoA livre (CoASH), em uma reação catalisada pela enzima acil-CoA sintetase. A enzima *β-cetotiolase* não catalisa apenas a condensação de duas moléculas acetil-CoA, mas também pode catalisar a condensação de uma molécula propionil-CoA e uma molécula acetil-CoA, formando assim, o esqueleto de 5 carbonos, 3-cetovaleril-CoA. A enzima *3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente*, também não é específica e pode catalisar a redução de 3-cetovaleril-CoA a D(-)-3-hidroxiacetil-CoA. As unidades D(-)-3-hidroxiacetil-CoA também funcionam como substrato para ação da enzima *PHA sintase*, embora esta enzima tenha atividade específica muito maior com unidades D(-) 3-hidroxiacetil-CoA em *R. eutropha*. Haywood et al demonstraram que *in vitro* a

atividade da enzima *PHA sintase* de *R. eutropha* para monômeros de D(-) -3-hidroxicetovaleril -CoA corresponde a apenas 7,5 % da atividade desta mesma enzima para monômeros D(-)-3-hidroxiacetil-CoA.

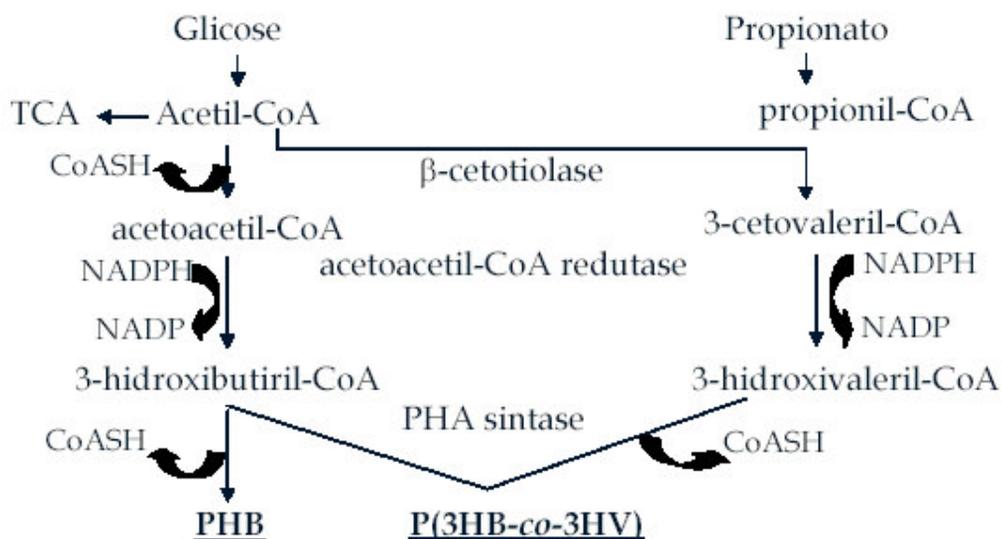


Figura 2.5- Via metabólica de síntese de P[3HB-co-3HV] a partir de glicose e propionato. Fonte – Doi, 1990.

2.7.3- Metabolismo e regulação da biossíntese de PHAs

A regulação do metabolismo de PHAs ocorre em diferentes níveis: (I) ativação da expressão dos genes *phaABC*, devido a um sinal ambiental específico, como o esgotamento de nutrientes; (II) ativação da enzima PHA sintase por intermediários específicos do metabolismo; (III) inibição de enzimas metabólicas que competem pelos intermediários da biossíntese do polímero, elevando, assim, os níveis destes intermediários e conseqüentemente o acúmulo de PHA; ou (IV) a combinação destes fatores.

2.7.4 -Precusores das unidades de 3-hidrovalerato

2.7.4.1 -Ácido propiônico

O ácido propiônico é o precursor de valerato mais empregado na biossíntese de P[3HB-co-3HV], porém este precursor apresenta algumas desvantagens. Uma primeira desvantagem é o fato do ácido propiônico ser mais caro que outras fontes de carbono, como a glicose, por exemplo. Uma outra desvantagem está relacionada a sua toxicidade, razão pela qual esse ácido é empregado na conservação de alimentos (Steinbüchel e Eversloh, 2003).

Grande parte do ácido propiônico, adicionado no meio de cultura, não é convertida a monômeros de valerato, visto que esse ácido é catabolizado a ácido pirúvico ou succinil-CoA, os quais são compostos intermediários do metabolismo central.

A observação de que uma importante parcela de ácido propiônico fornecido é drenada para a formação de energia ou para a síntese de unidades de HB, é de grande importância sob o ponto de vista industrial, uma vez que ácido propiônico é um substrato relativamente caro para a produção de PHAs. Constatações dessa baixa eficiência na conversão de ácido propiônico em unidades de HV têm levado ao desenvolvimento de programas para a obtenção de mutantes mais eficientes nesta conversão.

Muitas espécies de bactérias são conhecidas por acumularem P[3HB-co-3HV], quando ácido propiônico está presente no meio. Porém o crescimento de algumas bactérias é inibido por 0,1% (p/p) deste ácido (Byrom, 1987). A fração de 3HV no polímero é determinada através da razão entre a concentração de glicose e ácido propiônico na fase de acúmulo do polímero. Este conteúdo de 3HV pode ser regulado através da alteração de níveis de propionato/ ácido propiônico no meio, resultando em uma série de diferentes termoplásticos com vários graus de flexibilidade (Doi et al., 1988). Assim para aumentar o conteúdo em 3HV no copolímero, o qual é importante para melhorar o processamento do polímero, são necessários controles precisos de alimentação deste substrato (Park et al., 1994).

2.7.4.2- Ácido valérico

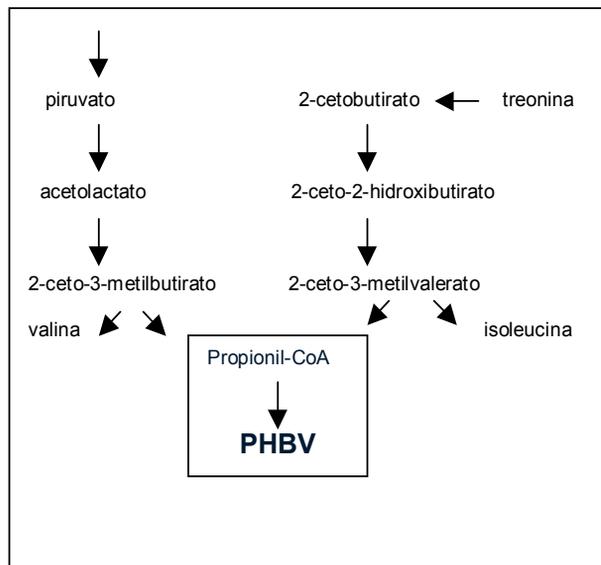
Tem-se demonstrado que a síntese e incorporação de monômeros 3HV em PHAs pode ser obtida a partir de outras substâncias que funcionam como precursores. Doi et al (1988) demonstraram que *R.eutropha* é capaz de produzir PHAs contendo uma grande fração de unidades de 3HV (80 - 90mol %), se suprida com ácido valérico como única fonte de carbono.

2.7.5- Outras vias metabólicas

Em concentrações elevadas, os ácidos propiônico e valérico são tóxicos para muitos microrganismos. Alternativamente têm sido estudadas formas de introduzir os monômeros de valerato ao polímero. O propionil-CoA é um intermediário nas vias de degradação de ácidos graxos de número ímpar de carbono, bem como dos aminoácidos treonina, valina e isoleucina (Madson and Huisman, 1999).

O Metabolismo de ácidos graxos de número ímpar de carbono produz ao final da beta oxidação uma molécula de propionil-CoA, o qual pode ser incorporado ao copolímero.

O catabolismo de treonina através da atividade das enzimas treonina desidratase converte este aminoácido em amônio mais 2-oxobutirato. Este intermediário pode ser posteriormente descarboxilado produzindo propionil-CoA, o qual por atividade da β -cetotilase se condensa a acetil-CoA, produzindo as unidades de 3 hidroxivaleril- CoA para ser introduzida ao copolímero. É uma das vias propostas para a produção de unidades de 3HV. Conforme mostrado na figura 2.6 alguns estudos relatam que mutantes de *R. eutropha* sem a atividade de treonina desidratase, super produzem a enzima acetolactato sintase e secreta valina, leucina e isoleucina. Sob limitação de nitrogênio, ocorre neste mutante, uma superprodução de intermediários da biossíntese destes aminoácidos, 2-ceto-metilvalerato e 2-ceto-isovalerato, os quais são degradados a propionil-CoA. Como consequência este mutante é capaz de incorporar até 7 mol% de unidades de 3HV, no copolímero



Sob limitação de nitrogênio

Figura 2.6 - Formação endógena de propionil-CoA em *R. eutropha* R₃ na qual alterou o metabolismo de aminoácidos de cadeia lateral ramificada. Este mutante superproduz acetolactato sintase aproximadamente 15 vezes para compensar uma deficiência em treonina desidratase. O acúmulo endógeno de propionil-CoA sob condições de limitação de nitrogênio permite esta cepa produzir P[3HB-co-3HV] sem suplementação do meio de crescimento com propionato ou outros co-substratos. – Fonte : Madson and Huisman, 1999).

2.8- ESTRATÉGIAS PARA PRODUÇÃO DE P[3HB-co-3HV]

2.8.1 -Itaconato

Conforme já citado, para a biossíntese do copolímero, faz-se necessário à utilização de um precursor, como o ácido propiônico. Contudo, grande parte do ácido propiônico adicionado ao meio é utilizado para a produção de energia.

Recentemente foi descrito que o itaconato, o qual é um inibidor potente da enzima isocitrato liase (ciclo do glioxilato), mostrou-se um inibidor da assimilação de acetato e do propionato em *Rhodospirillum rubrum*, sem atividade de isocitrato liase. Foi mostrado que o itaconato inibiu a enzima propionil-CoA carboxilase (PCC) (Berg, et al., 2002). A enzima Propionil-CoA

Carboxilase (PCC) catalisa a conversão do propionil a metilmalonil-CoA de acordo com a reação abaixo:



O metilmalonil-CoA, assim produzido, pode ser convertido a succinato, sendo então consumido pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Esta via seria a responsável pelo consumo indesejado de propionato para a produção de energia e biomassa, tornando-o menos disponível para a produção de P[3HB-co-3HV].

Desta forma, acredita-se que a adição de itaconato na fase de acúmulo de biopolímero, em culturas contendo propionato como precursor das unidades de 3HV, possa proporcionar menor consumo por vias metabólicas que não a de biossíntese de P[3HB-co-3HV].

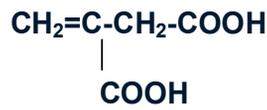


Figura 2.7 – Fórmula estrutural do ácido itacônico

2.8.2 -Acetato e Ácido Oléico

Yim e colaboradores, 1995, observaram que a adição de ácido acético em culturas de *E.coli* recombinante resulta em uma redução da velocidade de crescimento bacteriano e um aumento no acúmulo de P[3HB-co-3HV] na presença de concentrações de até 50 mM de ácido acético e que este aumento era dependente da concentração de ácido adicionado no início do cultivo. Estes autores sugerem que a adição de ácido acético diminuiria a entrada de acetil-CoA no ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Como consequência, uma quantidade maior de acetil-CoA seria direcionada para a biossíntese de PHA (Yim, et al., 1995).

Choi and Lee, 1999 aplicaram como uma estratégia de aumentar a captação e incorporação de ácido propiônico e conseqüentemente de unidades de 3HV ao copolímero P[3HB-co-3HV], por *E. coli* recombinante, não apenas a adição de ácido acético (10 mM) à cultura, mas também ácido oléico (1 g.L⁻¹). Estes autores observaram que com a suplementação das culturas com estes ácidos, a concentração de PHA produzidos se elevou de 88 g. L⁻¹ para 158 g. L⁻¹ de P[3HB-co-3HV], no entanto, que a fração molar de 3HV no copolímero diminui de 15, 3 mol% para 10, 6 mol%. Por esta razão, a adição destes ácidos parece ter efeito promissor sobre o aumento do acúmulo de polímero em outras bactérias.

Capítulo 3

MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os procedimentos adotados para a realização dos experimentos, bem como os equipamentos utilizados e as técnicas necessárias para a produção de PHA's.

3.1- EXPERIMENTOS REALIZADOS

A condução dos experimentos foi realizada nas seguintes etapas:

1ª etapa: produção de biomassa e acúmulo de P[3HB] e P [3HB-co-3HV] sob limitação de nitrogênio e limitação de fosfato, usando glicose como fonte de carbono e ácido propiônico como precursor de valerato;

2ª etapa: adição de suplementos (acetato e ácido oléico) visando avaliar o efeito sobre a incorporação de valerato em meio suplementado com extrato de levedura;

3ª etapa: inibição química da atividade de propionil-CoA carboxilase pelo itaconato em meio suplementado com extrato de levedura.

3.2- MICRORGANISMO

A bactéria utilizada para os cultivos foi *Chromobacterium violaceum* ATCC12472.

3.3- MEIOS DE CULTURA

3.3.1- Meio Luria Bertani (LB)

Para preparação do pré-inóculo e estocagem da bactéria, foi utilizado o meio Luria Bertani (LB), cuja composição é dada na tabela abaixo:

Tabela 3. 1- Composição do meio Luria Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989).

Componentes	Concentração (g.L ⁻¹)
Triptona	10,0
Extrato de Levedura	5,0
Cloreto de Sódio	5,0

pH 7,0

3.3.2- Meio Mineral

Para os cultivos, preparou-se o meio mineral cujas composições são dadas na tabela abaixo:

Tabela 3.2 – Composição do meio mineral sob limitação de nitrogênio (adaptado de Chen et al., 2001).

Reagente	Sem condição limitante	Com limitação de N ₂
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	6,7 g.L ⁻¹	6,7g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1,0 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
Oligo-elementos *	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹

* A composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na tabela 3.5.

Tabela 3.3 - Composição do meio mineral sob limitação de fosfato (adaptado de Chen et al., 2001).

Reagente	Sem condição limitante	Com limitação de Fosfato
Na ₂ HPO ₄ . 7H ₂ O	6,7 g.L ⁻¹	0,38g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹	0,07g.L ⁻¹
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,0 g.L ⁻¹	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	2 g.L ⁻¹
Oligo-elementos *	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹

*A composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na tabela 3.5.

Tabela 3.4 - Composição do meio mineral sob limitação de fosfato, proposto por Chen et al., (2001).

Reagente	Sem condição limitante	Com limitação de Fosfato
Na ₂ HPO ₄	3,53 g.L ⁻¹	0,2 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g.L ⁻¹	2,0 g.L ⁻¹
Extrato de levedura	0,5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
Oligo-elementos *	1 mL.L ⁻¹	1 mL.L ⁻¹

* A composição da solução concentrada de oligo-elementos é dada na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Composição da solução concentrada de oligo-elementos

Elemento	Concentração (g.L ⁻¹)
H ₃ BO ₃	0,3
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,03
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01

O pH dos meios (com e sem condições limitantes) foi ajustado até 7,0 com NaOH 10 N e em seguida esterilizados separadamente durante 15 minutos, a 121° C e 1atm.

3.4- PREPARO DO PRÉ INÓCULO DE *C. VIOLACEUM*

Utilizou-se um erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB e adicionou-se 250 µL de cultura estoque. A cultura foi incubada a 30 °C, em agitador orbital, a 150 rpm, durante 24 h.

3.5 - PREPARO DO INÓCULO

3.5.1 - Fase de crescimento celular

O inóculo foi preparado a partir de 0,1 mL (100 µL) do pré-inóculo (correspondendo a 1 % do volume total), sendo transferido para um frasco contendo 10 mL de meio mineral, acrescido de uma solução de glicose na concentração de 10 g.L⁻¹ e sulfato de magnésio na concentração de 0,49 g.L⁻¹.

O inóculo foi cultivado em frascos agitados de 125 mL (volume de trabalho de 10 mL), por 24 h, a 150 rpm e 30° C.

3.5.2 – Fase de acúmulo do polímero

Os cultivos seguintes foram realizados em frascos aletados de 500 mL, com um volume de trabalho de 100 mL, em meio mineral, sob condições limitantes, por 48 horas, sob as mesmas condições de temperatura e agitação. A inoculação foi feita a 10 % de seu volume final, a partir do meio anteriormente cultivado, acrescido de glicose e sulfato de magnésio nas mesmas concentrações.

3.6- FONTE DE CARBONO

Como fonte de carbono utilizou-se glicose a qual foi adicionada ao meio mineral para obtenção da concentração final de 10 g.L^{-1} . A solução estoque de glicose adicionada ao meio foi previamente preparada na conc. 250 g.L^{-1} e esterilizada separadamente em autoclave a 121°C , 1 atm e 15 minutos.

3.7 – ÁCIDO PROPIÔNICO

O ácido propiônico foi o precursor de valerato empregado nos cultivos para produção de P[3HB-co-3HV]. As concentrações de propionato empregadas inicialmente nos cultivos foram 5, 10 e 15 mM.

3.7.1 – Preparo da solução de propionato

Preparou-se uma solução estoque de propionato com concentração 1 M e neutralizou-se com NaOH 10N. Em seguida, esterilizou-se em autoclave a 121°C , 15 minutos e 1 atm.

3.8 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO

Preparou-se uma solução estoque de Sulfato de Magnésio com concentração $24,6 \text{ g.L}^{-1}$. Em seguida, esterilizou-se em autoclave a 121°C , 15 minutos e 1 atm. Esta solução foi então adicionada ao meio mineral na concentração $0,49 \text{ g.L}^{-1}$.

3.9 – INIBIDOR ENZIMÁTICO

O ácido Itacônico (Sigma 129204) foi empregado nos estudos de inibição enzimática da PCC, responsável pelo catabolismo do ácido propiônico. A concentração de Itaconato utilizada nos cultivos para produção de PHAs foi de 5 mM.

3.9.1 – Preparo da solução de Itaconato

Preparou-se uma solução estoque de Itaconato com concentração 0,5 M e neutralizou-se com NaOH 10 N. Em seguida, esterilizou-se a solução em autoclave a 121° C, 15 minutos e 1 atm.

3.10 – SUPLEMENTOS

Com o objetivo de avaliar-se o efeito da adição de suplementos sobre a incorporação de valerato no copolímero, foi empregado ácido acético ou ácido oléico nas respectivas concentrações: 10 mM e 1g.L⁻¹. Estes suplementos foram adicionados ao meio mineral em diferentes experimentos.

3.10.1 – Preparo da solução de Acetato

Preparou-se uma solução estoque de acetato com concentração 1 M e neutralizou-se com NaOH 10 N. Em seguida, esterilizou-se a solução em autoclave, a 121 °C, 15 minutos e 1 atm.

3.11 - PRODUÇÃO DE P[3HB-co-3HV]

3.11.1 – Sem adição de suplementos

Nestes cultivos sob limitação de nitrogênio ou fosfato, na fase de acúmulo de polímero, adicionou-se uma solução de ácido propiônico (precursor de valerato empregado) nas concentrações 5, 10 e 15 mM, previamente preparado (solução neutra de propionato).

3.11.2 – Com a utilização de suplementos

Para se estudar o efeito da suplementação da cultura sobre a produção de PHAs, utilizou-se o meio mineral descrito nas tabelas 3.4 e 3.5, com limitação de fosfato e extrato de levedura, contendo glicose 10 g.L^{-1} e ácido propiônico 10 mM (solução neutra de propionato) como precursor de valerato.

Aos frascos aletados contendo o meio descrito foram adicionados um dos seguintes suplementos: acetato 10 mM , ácido oléico $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ e itaconato 5 mM , na fase de acúmulo de polímero.

Dez mililitros do inóculo preparado conforme descrito em 3.11.1 foram adicionados aos frascos contendo os meios suplementados e cultivados por 48 horas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 150 rpm .

3.12 – INIBIÇÃO QUÍMICA DA ATIVIDADE DA PROPIONIL-COA CARBOXILASE PELO ÁCIDO ITACÔNICO

Com o objetivo de inibir a atividade da enzima propionil-CoA carboxilase, adicionou-se ao meio (fase de acúmulo de polímero) itaconato na concentração 5 mM , sendo mantidas as demais condições de tempo, temperatura e agitação.

3.13 – DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

Após o cultivo, a massa celular seca foi avaliada por gravimetria, através da pesagem da massa celular produzida após uma centrifugação a 8000 rpm e $4 \text{ }^\circ\text{C}$, durante 10 minutos em centrífuga Hitachi modelo HIMAC CR 20B2 e secagem dos precipitados obtidos em estufa a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 horas ou peso constante.

3.14- AVALIAÇÃO DO PHA PRODUZIDO

A porcentagem de acúmulo de PHA, bem como sua caracterização, foram feitas por cromatografia gasosa conforme método descrito por Braunegg et al., 1978.

Pesou-se aproximadamente 50 mg de massa celular seca em um tubo de ensaio com tampa rosqueada e adicionou-se 1 mL de uma solução contendo H_2SO_4 15 %, 85 % de metanol e ácido benzóico na concentração de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, como padrão interno, e 1 mL de clorofórmio. A suspensão foi aquecida em banho de óleo, a 100°C durante 4 horas, sendo que durante a 1ª hora de aquecimento a mistura foi agitada durante alguns segundos e depois devolvida ao aquecimento. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, adicionou-se 0,5 mL de água destilada às amostras, agitou-se vigorosamente e deixou-se decantar. A fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma micropipeta e levada para análise em cromatógrafo gasoso CG 90, equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio) pertencente ao laboratório ENGEBIO.

A coluna utilizada no cromatógrafo é de sílica fundida (0,53 mm X 30 m), modelo Supercowax-10. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 20 mL.min^{-1} e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram respectivamente de 90°C , 230°C e 110°C . O volume injetado foi de $1 \mu\text{L}$.

Foram submetidos também a metanolização os padrões: P[3HB-co-3HV] 88 mol % HB e 12 mol% HV e P[3HB] (Sigma – Aldrich) com massa variando entre 1,0 g a 10 mg.

A curva padrão está representada no anexo 1.

A figura abaixo sintetiza todas as etapas realizadas para a produção de PHAs por *C.violaceum*, conforme descrito anteriormente.

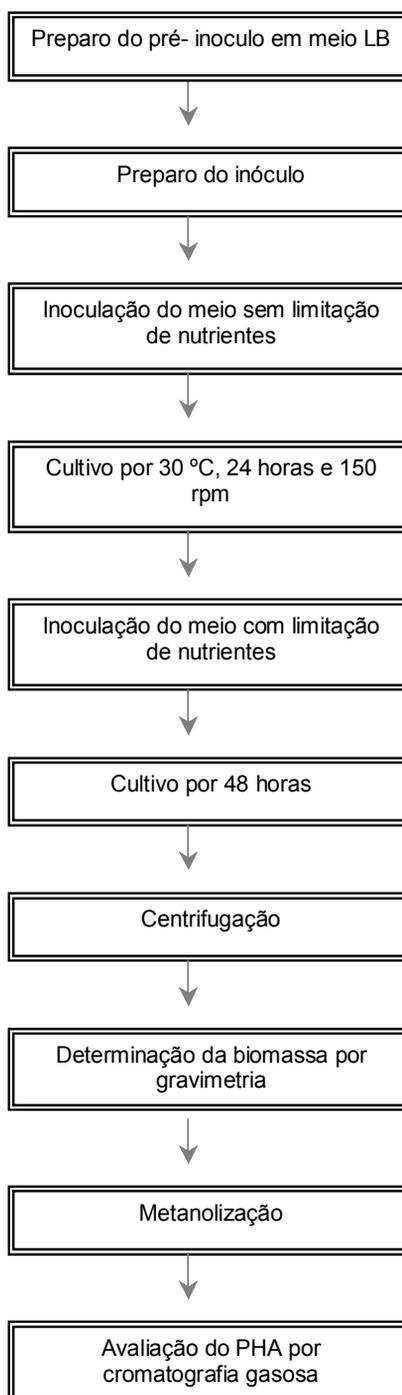


Figura 3.1– Etapas da produção de PHAs por *C.violaceum*

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – EFEITO DA ADIÇÃO DE PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE BIOMASSA POR *C. VIOLACEUM*

Sabe-se que propionato é um inibidor do crescimento bacteriano. Contudo, este co-substrato é um dos precursores mais utilizados para a incorporação de unidades de 3-hidroxicvalerato (3HV) aos copolímeros de P[3HB-co-3HV]. Uma vez que um dos objetivos deste trabalho foi estudar condições de produção deste copolímero por *C. violaceum*, realizaram-se ensaios, nos quais a concentração de propionato foi variada, visando definir uma concentração deste co-substrato, na qual a inibição do crescimento fosse a mínima e a incorporação de unidades de 3HV ao copolímero fosse a máxima possível.

Duas condições de cultivo foram utilizadas nestes experimentos: uma na qual o nutriente limitante foi o fosfato e outra na qual nitrogênio foi limitante.

4.1.1 - Efeito da adição de propionato sobre a produção de biomassa por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato

Na tabela 4.1, são apresentadas as produções de biomassa (massa celular seca) produzida, quando *C. violaceum* foi cultivada em meio mineral (descrito na tabela 3.3) na presença de glicose 10 g.L^{-1} , sob limitação de fosfato e com a adição de propionato de sódio nas concentrações de 5, 10 e 15 mM.

Os resultados obtidos mostram que quando comparada com o cultivo na ausência de propionato, a adição de 5 e 10 mM de propionato produz um aumento na biomassa de 13 e 61 %, respectivamente, enquanto na concentração de 15 mM observou-se uma inibição na biomassa de 17%.

Tabela 4.1 – Efeito do propionato sobre a produção de biomassa por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato

Propionato (mM)	Biomassa (g.L⁻¹)	Varição da Produção de Biomassa (%)
0	0,1035	0
5	0,1175	13
10	0,1665	61
15	0,0860	-17*

Os cultivos foram realizados em meio mineral conforme descrito na tabela 3.3, com adição de glicose 10 g.L⁻¹, sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas.

*Valores negativos significam inibição.

4.1.2 - Efeito da adição de propionato sobre a produção de biomassa por *C. violaceum*, sob limitação de nitrogênio

Sob limitação de nitrogênio, a adição de propionato ao meio de cultivo teve um efeito ligeiramente diferente do anterior, sobre a produção de biomassa por *C. violaceum*. Pelos resultados apresentados na Tabela 4.2, observa-se que a produção de biomassa é significativamente superior àquela obtida sob limitação de fosfato, sendo igual a 0,543 g.L⁻¹, na ausência do propionato. Contudo, embora a adição de 5 mM de propionato tenha proporcionado um aumento de 8,3% na biomassa produzida, a elevação da concentração deste co-substrato, para 10 e 15 mM, levou a uma inibição de 5,5 % e 53,6%, sobre a biomassa.

Tabela 4.2 – Efeito do propionato sobre a produção de biomassa por *C. violaceum*, sob limitação de nitrogênio

Propionato (mM)	Biomassa (g.L⁻¹)	Varição da Produção de Biomassa (%)
0	0,543	0
5	0,588	8,3
10	0,513	-5,5*
15	0,252	-53,6*

Os cultivos foram realizados em meio mineral conforme descrito na tabela 3.2, com adição de glicose 10 g.L⁻¹, sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas.

*Valores negativos significam inibição.

Levando-se em conta que os PHAs são armazenados intracelularmente, o crescimento bacteriano exerce grande influência na produtividade dos biopolímeros. Assim, baseado nos primeiros resultados obtidos (vide tabelas 4.1 e 4.2), escolheu-se trabalhar com a concentração de 10 mM de propionato para dar prosseguimento aos estudos, onde a bactéria alcançou crescimento celular igual a 0,1665 g.L⁻¹, sob limitação de fosfato. Quando cultivada sob limitação de nitrogênio e 10 mM de propionato, a produção de biomassa foi de 0,513 g.L⁻¹. Embora não seja o crescimento máximo, esta concentração de propionato foi a que apresentou a maior incorporação de valerato, sob limitação de fosfato, como será discutido a seguir.

4.2. – EFEITO DO PROPIONATO SOBRE A PRODUÇÃO DE PHA POR *C. VIOLACEUM*

Embora trabalhos anteriores tenham relatado que *C. violaceum* é capaz da produção do copolímero P[3HB-co-3HV] e mesmo do homopolímero de valerato, P[3HV], sob limitação de nitrogênio, os autores utilizaram como substrato, para a incorporação de unidades de 3HV ao copolímero, o ácido valérico (Steinbuchel et al., 1993).

O ácido valérico é um composto de difícil manipulação, pelo seu odor extremamente desagradável, além de ser mais caro que o ácido propiônico. Assim, como comentado anteriormente, foram realizados ensaios utilizando-se o propionato como precursor de unidades de valerato, também objetivando avaliar seu efeito sobre a incorporação de unidades de 3HV, sobre PHAs produzidos por *C. violaceum*.

Para esta avaliação, as duas condições experimentais descritas abaixo foram aplicadas: limitação de fosfato e limitação de nitrogênio.

4.2.1 – Efeito do propionato sobre a produção de PHA por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato.

Na Tabela 4.3, são apresentadas as porcentagens de acúmulo de PHA, bem como sua composição, na presença de propionato de sódio nas concentrações de 0, 5, 10 e 15 mM e glicose 10 g.L⁻¹. Os resultados apresentados mostram que a adição de propionato aos meios de cultivo, tem um efeito positivo sobre o acúmulo de PHA nas três concentrações testadas, tendo-se observado aumento no acúmulo de 72, 118 e 65 % com relação à ausência de propionato. É interessante notar que, sob limitação de fosfato, mesmo sem adição de propionato, observa-se que o PHA produzido (P[3HB-co-3HV]) contém 7% de 3HV. Este resultado sugere que, nestas condições, algum outro intermediário do metabolismo pode ser utilizado como precursor de 3HV.

A incorporação de unidades de 3HV, aumentou com o aumento da concentração de propionato e embora o maior acúmulo de PHA tenha sido obtido na presença de propionato 10 mM, a maior incorporação de unidades de 3HV, ao polímero foi obtida na concentração de 15 mM.

É importante ressaltar, porém, que 15 mM de propionato causou uma inibição de 17% sobre a produção de biomassa (Tabela 4.1).

Considerando-se ainda a baixa produção de biomassa, sob limitação de fosfato, a utilização de 10 mM de propionato foi a mais interessante, tanto com respeito à produção de biomassa quanto à incorporação de unidades de 3HV ao polímero.

Tabela 4.3- Efeito do propionato sobre a produção de PHA por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato

Propionato (mM)	PHA (% da biomassa)	3HB (mol %)	3HV (mol %)
0	20,27	93	7,0
5	34,98	89	11
10	44,20	86	14
15	33,56	81,6	18,4

Os cultivos foram realizados em meio mineral conforme descrito na tabela 3.3, com adição de glicose 10 g.L^{-1} , sob agitação de 150 rpm, a 30°C , por 48 horas.

4.2.2 – Efeito do propionato sobre a produção de PHA por *C. violaceum*, sob limitação de nitrogênio

O efeito do propionato sobre o acúmulo de PHAs, por *C. violaceum*, sob limitação de nitrogênio, é bastante diferente daquele observado para a limitação de fosfato. Como se observa na Tabela 4.4, *C. violaceum* acumulou 44, 5% de PHA, contendo 2,5 mol% de 3HV, no copolímero, na ausência de propionato. A observação de que este acúmulo de 3HV é maior sob limitação de fosfato do que sob limitação de nitrogênio sugere que propionil-CoA pode estar sendo produzido a partir do metabolismo de aminoácidos. A adição de propionato na concentração de 5 mM levou a um ligeiro aumento no acúmulo de PHA. Porém, neste caso, o polímero constituiu-se exclusivamente de PHB, onde nenhuma incorporação de unidades de 3HV foi observada.

Este resultado, mais o aumento produzido na biomassa (Tabela 4.2), sugerem que o propionato tem efeito positivo sobre a produção de biomassa, bem como, sobre o acúmulo de PHA, porém, ao contrário do que se esperava, não contribuiu para o aumento da incorporação de unidades de 3HV. O aumento da concentração de propionato, sob limitação de nitrogênio, para 10 e 15 mM, proporcionou decréscimo, no acúmulo de PHA. Porém na concentração de 10 mM, este efeito foi bastante reduzido além de proporcionar uma maior incorporação de unidades de 3HV (5,3 mol%).

Tabela 4.4 - Efeito do propionato sobre a produção de PHA por *C. violaceum*, sob limitação de nitrogênio

Propionato (mM)	PHA (% da biomassa)	3HB (mol %)	3HV (mol %)
0	44,54	97,5	2,5
5	47,95	100	-
10	42,67	94,7	5,3
15	31,60	96,4	3,6

Os cultivos foram realizados em meio mineral conforme descrito na tabela 3.2, com adição de glicose 10 g.L^{-1} , sob agitação de 150 rpm, a 30°C , por 48 horas.

Os resultados apresentados indicaram que, embora se tenha uma redução na biomassa, a incorporação de unidades de 3HV, ao copolímero P[3HB-co-3HV] por *C. violaceum*, é favorecida pelo cultivo sob limitação de fosfato. Deste modo, procurou-se definir condições experimentais que favorecessem o aumento na produção de biomassa, além do aumento na incorporação de unidades de 3HV, ao polímero.

Uma vez que na literatura tem-se sugerido que adição de extrato de levedura como suplemento aos meios de cultivo, com limitação de fosfato, poderiam aumentar a produção de biomassa (Chen et al., 2001), foram estudados os efeitos da adição deste suplemento ao meio de cultivo.

4.3 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA E ACÚMULO DE PHA, POR *C. VIOLACEUM*, SOB LIMITAÇÃO DE FOSFATO, EM MEIO SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA, COM E SEM PROPIONATO.

Na tabela 4.5, é apresentado o efeito da suplementação do meio mineral, com extrato de levedura (0,5 g.L⁻¹), quando *C. violaceum* foi cultivada sob limitação de fosfato, na presença e na ausência de propionato. Observa-se que de fato a suplementação da cultura com extrato de levedura teve um efeito significativo sob a produção de biomassa, elevando-a de 0,103 g.L⁻¹ (Tabela 4.1) para 0,8 g.L⁻¹ na ausência de ácido propiônico. Nestas condições houve um acúmulo de 47,29% de PHA, com 1% de incorporação de unidades 3HV ao biopolímero. A adição de propionato 10 mM, ao meio de cultivo, reverteu o efeito positivo da suplementação com extrato de levedura, sobre a produção de biomassa, a qual diminuiu de 0,8 g.L⁻¹, para 0,16 g.L⁻¹. Mesmo quando comparado com meio de cultivo sem suplementação (Tabela 4.1), esta suplementação não favoreceu a produção de biomassa que praticamente permaneceu a mesma (0,160 ou 0,166 g. L⁻¹). Contudo nesta condição houve um aumento no acúmulo de PHA de 44% para 57,6 % , porém com decréscimo na incorporação de unidades 3HV (14 % para 1,4 %).

Tabela 4.5 – Produção de biomassa e acúmulo de PHA, por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, com e sem propionato.

Condição	Biomassa (g.L⁻¹)	PHA (% da biomassa)	3HB (mol%)	3HV (mol%)
Sem propionato	0,80	47,29	98,9	1,09
Propionato 10 mM	0,160	57,65	98,6	1,4

Os cultivos foram realizados em meio mineral descrito na tabela 3.4, com adição de glicose 10 g.L⁻¹, sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas.

4.3.1- Efeito da adição de indutores de incorporação de 3HV sobre a produção de biomassa e acúmulo de PHA, por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato

Têm-se realizado estudo de diversos compostos com efeitos positivos, quer sobre o acúmulo de PHAs quer sobre a incorporação de unidades 3HV no copolímero.

A utilização de ácidos graxos como suplementos nutricionais na produção de PHAs é uma opção na busca de uma redução de custos e aumento de produtividade. Tem-se mostrado que *Ralstonia eutropha* pode metabolizar ácidos graxos e convertê-los em acetil-CoA, o qual pode ser utilizado na via de biossíntese de P[3HB] (Fukui e Doi, 1998).

Além disso, em alguns trabalhos foi demonstrado que a suplementação de culturas de *Ralstonia eutropha* com ácido oléico na fase de acúmulo de PHA, levou a um aumento na produção do polímero (Marangoni et al; 2000).

Tabela 4.6 – Produção de biomassa e acúmulo de PHA, por *C. violaceum*, sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura.

Suplemento	Biomassa (g.L⁻¹)	PHA (% da biomassa)	3HB (mol%)	3HV (mol%)
Propionato 10 mM	0,160	57,65	98,6	1,4
Ácido oléico + propionato 10mM	0,086	49,67	98,33	1,66
Acetato + propionato 10mM	0,1647	76,03	98,90	1,09
Itaconato + propionato 10mM	0,1645	40,91	95,89	4,10

Os cultivos foram realizados em meio mineral conforme descrito na tabela 3.4, com a adição de glicose 10 g.L⁻¹ e propionato 10 mM, sob agitação de 150 rpm, a 30°C, por 48 horas. A concentração de ácido oléico, acetato e itaconato, nos meios de cultivo, foram, respectivamente, iguais a 1,0 g.L⁻¹, 10 mM e 5 mM.

4.3.1.1-Efeito do ácido oléico

Observa-se na tabela 4.6, que a adição de ácido oléico ao meio de cultivo, ao contrário de resultados obtidos em estudos prévios conduzidos com *R.eutropha* por outros autores (Fukui e Doi, 1998), levou a uma diminuição (de 0,16 para 0,086 g.L-1) significativa da biomassa produzida pela bactéria. Do mesmo modo, estes resultados diferem dos apresentados por Choi e Lee (1999), que demonstraram que o ácido oléico como suplemento nutricional em culturas de *E coli* aumentou o acúmulo do polímero. Assim como Marangoni et al., 2000 observaram aumento de 10 % no acúmulo de PHA em culturas de *R.eutropha* suplementadas com ácido oléico. Neste estudo, o acúmulo de PHA diminuiu de 57,6 % para 49,6% (Tabelas 4.6) quando a cultura de *C. violaceum* foi suplementada com ácido oléico.

Nestas condições, a suplementação com ácido oléico não teve efeito sobre a incorporação de unidades de 3HV no copolímero quando comparada com o mesmo meio sem suplementação.

4.3.1.2-Efeito do acetato

Sabe-se que os mecanismos de absorção e degradação do ácido propiônico são semelhantes aos mecanismos de degradação e absorção de ácido acético. Lee e Choi (1999) avaliaram a produção de P[3HB-co-HV] por *Escherichia coli* recombinante utilizando ácido acético como indutor da incorporação de 3HV e obtiveram um aumento de 6,6 % na incorporação de 3-hidroxivalerato.

Com o objetivo de aumentar o acúmulo de P[3HB-co-HV] bem como a incorporação de 3HV no copolímero, foi utilizado nesse estudo ácido acético na concentração de 10mM (acetato de sódio). Na tabela 4.6 são apresentados os resultados obtidos nos experimentos com a utilização de acetato sem a adição de qualquer outro suplemento.

A utilização de acetato como suplemento aumentou em 31 % o polímero acumulado e a massa celular acumulada em 3 %, porém não mostrou efeito sobre a incorporação de unidades de 3HV.

4.3.1.3-Efeito do itaconato

O itaconato é um forte inibidor do ciclo do glioxilato, característico de bactéria, e tem a função de metabolizar acetato, quando este é a única fonte de carbono disponível para o crescimento celular. Este composto inibe a enzima isocitrato liase que tem papel fundamental no ciclo do glioxilato, visto que esta cliva o isocitrato em glioxilato e succinato.

Macfadden e colaboradores (1977) relataram que o itaconato reprime o crescimento bacteriano quando a ação catalisadora da isocitrato liase é obrigatória para o crescimento; um exemplo disso seria quando acetato é utilizado como única fonte de carbono. Porém, quando outras fontes de carbono estão presentes, a atividade da isocitrato liase não é requerida e o itaconato não é capaz de interferir no crescimento bacteriano.

Berg e colaboradores (2002) avaliaram a assimilação de propionato e acetato em *Rhodospirillum rubrum* utilizando diferentes concentrações de itaconato (0,5; 1,0; 1,5; 10 e 20 mM) com o objetivo de verificar a ação inibitória do mesmo na atividade da enzima propionil- CoA carboxilase.

Visando avaliar-se o crescimento da *C.violaceum* frente ao itaconato, empregou-se a concentração de 5 mM de itaconato, pois baseado em experimentos já realizados previamente com a bactéria *E coli* JM 101, esta concentração foi a que menos exerceu influência sobre o crescimento celular.

O itaconato foi utilizado como uma estratégia metabólica para favorecer a incorporação de valerato a partir do ácido propiônico, uma vez que a principal enzima do catabolismo do ácido propiônico vai estar inativa ou inibida. A via catabólica do ácido propiônico compete com a via de biossíntese de PHAs pelo ácido adicionado no meio de cultivo.

Realizaram-se experimentos utilizando-se itaconato sem o emprego de outros suplementos. A tabela 4.6 mostra os resultados obtidos nos experimentos.

Observou-se que com a utilização do itaconato houve uma maior obtenção de massa celular (3%), e um aumento na incorporação de valerato em torno de 52%.

Os resultados obtidos estão de acordo com Macfadden e colaboradores (1977) que relataram que o itaconato não reprime o crescimento bacteriano quando a ação catalisadora da isocitrato liase não é obrigatória para o crescimento, ou seja, quando se tem outra fonte de carbono além do acetato, como no caso de *C. violaceum*.

Com relação ao polímero, obteve-se resultados inéditos no que diz respeito à incorporação de unidades de HV, em torno de 4 %, utilizando-se itaconato como estratégia para inibição da Propionil-CoA carboxilase.

4.4 – VARIAÇÃO DOS VALORES DE pH DAS CULTURAS VERIFICADOS AO FINAL DOS CULTIVOS

A tabela abaixo mostra os valores de pH medidos ao final dos cultivos, sob diferentes condições.

Tabela 4.7 – Valores de pH medidos ao final dos cultivos

Condição	Limitação de N₂	Limitação de fosfato	Limit. de fosf em meio suplementado com ext de levedura
Sem propionato	6,0	4,0	-
5 mM propionato	6,0	5,0	-
10 mM propionato	6,0	5,0	6,0
15 mM propionato	6,0	5,0	-
Ác. oléico + prop. 10mM			6,0
Acetato + prop. 10mM			6,0
Itaconato + prop. 10mM			6,0

Obs: o pH inicial dos meios foi ajustado até 7,0 com NaOH 10 N.

Estes valores sugerem que o decréscimo do efeito tamponante do fosfato seja responsável pela inibição do crescimento celular observado nos cultivos sob limitação de fosfato.

Capítulo 5

CONCLUSÕES

De acordo com os experimentos realizados, pode-se concluir que:

- A adição de 10mM de propionato ao meio de cultivo com limitação de fosfato propiciou um estímulo na produção de biomassa de até 61 % quando comparado com o cultivo na ausência de propionato;
- A adição de propionato ao meio de cultivo com limitação de nitrogênio levou a uma maior produção de biomassa quando comparada com àquela obtida sob limitação de fosfato;
- A concentração de 5 mM de propionato proporcionou um estímulo de 8,3 % na biomassa produzida, quando comparada com a ausência de propionato no meio, porém uma elevação na concentração deste co-substrato para 10 mM e 15 mM ocasionou uma inibição sobre a produção de biomassa. Desta forma, a linhagem de *C.violaceum* empregada mostrou-se sensível ao propionato em concentrações superiores a 5 mM;
- A adição de propionato, sob limitação de fosfato, mostrou um efeito positivo sobre o acúmulo de PHA nas três concentrações testadas (5,10 e 15 mM), tendo um aumento no acúmulo de PHA de até 118% com relação à ausência de propionato;
- Mesmo sem a adição de propionato, observou-se que o copolímero (P[3HV-co-3HV]) contém 7 % de 3HV, o que sugere que algum outro intermediário do metabolismo possa ter sido utilizado como precursor de unidades de 3HV;
- A concentração de 10 mM de propionato mostrou-se a mais interessante, tanto com respeito à produção de biomassa quanto à incorporação de unidades de 3HV ao polímero;

- Propionato (5mM) adicionado ao meio com limitação de nitrogênio mostrou um efeito positivo sobre a produção de biomassa, bem como sobre o acúmulo de PHA, porém ao contrário do que se esperava, não contribuiu para o aumento na incorporação de unidades de 3HV;
- Observou-se que embora se tenha uma redução na biomassa, a incorporação de unidades de HV ao copolímero por *C.violaceum* foi favorecida pelo cultivo sob limitação de fosfato;
- A suplementação da cultura (sob limitação de fosfato) com extrato de levedura teve um efeito significativo sobre a produção de biomassa quando comparada com a ausência de suplementação;
- A adição de 10mM de propionato ao meio reverteu o efeito positivo da suplementação sobre a produção de biomassa, no entanto proporcionou um aumento no acúmulo de PHA, porém com decréscimo na incorporação de unidades de 3HV;
- A adição de ácido oléico ao meio de cultivo suplementado com extrato de levedura levou a uma diminuição da biomassa produzida bem como no acúmulo de PHA;
- A suplementação com ácido oléico não teve efeito sobre a incorporação de unidades de 3HV no copolímero quando comparado com o meio sem suplementação;
- A utilização de acetato como suplemento mostrou um aumento na biomassa bem como no acúmulo de polímero, porém não houve efeito sobre a incorporação de unidades de HV;
- A utilização de itaconato em meio suplementado com extrato de levedura mostrou uma maior obtenção de massa celular e um aumento na incorporação de valerato, estando de acordo com os resultados obtidos em outros estudos, ou seja, o itaconato não reprime o crescimento bacteriano. Assim foi possível verificar o efeito da estratégia metabólica para favorecer a incorporação de HV a partir do ácido propiônico.

Capítulo 6

PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados e conclusões obtidas nesse estudo, pode-se sugerir alguns trabalhos futuros como:

- Estudar o efeito dos aminoácidos treonina, leucina valina e isoleucina utilizando-se como substrato carbônico apenas glicose, sobre a incorporação de unidades de 3HV, uma vez que *C. violaceum* é capaz da sua incorporação, mesmo na ausência de propionato.
- Estudar a possibilidade de produção de PHA por *C. violaceum* a partir de substratos de baixo custo, ainda que ricos em nitrogênio, uma vez que a limitação de fosfato, favorece a produção de copolímero. Um exemplo seria quitina, uma vez que *C. violaceum* produz quitinases extracelulares.
- Desenvolver estratégias de produção de poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) buscando melhorar a incorporação de unidades de 3HV ao polímero;
- Testar o uso de concentrações maiores de ácido acético como suplemento em culturas suplementadas com extrato de levedura objetivando aumentar a incorporação de 3HV;
- Testar o uso de ácido acético como suplemento em culturas sem o extrato de levedura para verificar seu efeito na produção de biomassa e na incorporação de 3HV;
- Testar o uso de outros suplementos como azeite de oliva na produção de biomassa e incorporação de unidades de 3HV.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANDERSON AJ; HAYWOOD GW; DAWES EA. Biosynthesis and compositions of bacterial poly (hydroxyalkanoates). **International Journal of Biological Macromolecules** v 12, p. 102-105, 1990a.

BERG, I. A.; FILATOVA, L.V; IVANOVSKY, R.N. Inhibition of acetate and propionate assimilation by itaconate via propionyl-CoA carboxylase in isocitrate lyase-negative purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **FEMS Microbiology Letters**, V.216, p. 49-54, 2002.

Biomer (2003): Website of Biomer, Krailling, Germany. <http://www.biomer.de>. Accessed 12 August 2003.

BOHLMANN, G., YOSHIDA, Y . CEH Marketing Research Report
Biodegradable Polymers. **Chemical Economics Handbook-SRI**
International. p.19,2000.

BRANDL, H.; GROSS. R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. Plastics from and for bacteria: poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**. v. 41, p.77-93, 1990.

BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability, **PNAS**, v.100, n.20, p.11660-11665, 2003.

- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R.M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly- β -hydroxybutiric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**. v.6, p. 29-37, 1978.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms; technology and economics. **Trends in Biotechnology**, v 5; p. 246-250, 1987
- BYROM, D; DAWES, E.A. Industrial production of copolymer from *Ralstonia eutropha*. **Novel biodegradable microbial polymers**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p.113-117, 1990.
- BYROM, D. Production of poly- β -hydroxybutyrate: poly- β -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, v.103, p.247-250, 1992.
- CALDAS, L.R. Photochemistry and photobiology in a virgin land, **Photochem. Photobiol.** v.26, p.1-2, 1977.
- CALDAS, L. R.; LEITÃO A. A.C.; SANTOS, S. M. and TYRRELL, R.M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein, **Intern. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol. Acad.Brasil. Cienc.** Rio de Janeiro, p. 121-132,1978.
- CHEN, G, Q; ZHANG, G; PARK S.J; LEE S.Y. Industrial scale production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v 57, p. 50-55, 2001.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V.51, p. 13-21, 1999.

- CHOI, J.; LEE, S.Y. High-level production of Poly (3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65: 4363–4368, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S.Y. Efficient and economical recovery of poly (3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 62, p.546-553, 1999b.
- CROMWICK, AM; FOGLIA, T., Lenz, RW. The microbial production of poly (3-hydroxyalkanoates) from tallow. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 46, p. 464 – 469, 1996.
- DAWES, E.A; SENIOR, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v.10, p. 135-266, 1973.
- De SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT B.; DAWES E.A. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal of Bacteriology**. 56: 3354-3359, 1983.
- DOI, Y.; TAMAKI, .A; KUNIOKA, M.; SOGA, K. Biosynthesis of an unusual copolyester (10 mol % 3-hydroxybutyrate and 90 mol % 3-hydroxyvalerate units) in *Ralstonia eutropha* from pentanoic acid. **Journal of Chemistry Society - Chemistry Communication**, vol.21, p. 1635-1636,1987.
- DOI, Y.; TAMAKI, A.; KUNIOKA, M.; SOGA, K. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Ralstonia eutropha* from butyric and pentanoic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 28: 330 - 334, 1988.

- DOI, Y.; KANESAMA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v.23, 26-311, 1990.
- DOI, Y. **Microbial Polyesters**. ed., v. New York: VCH Publishers, Inc., 1990a.
- DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KIM, J.H; LEBEAULT, J.M Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Reviews**. 103: 103- 108, 1992.
- DU, G.C.; CHEN, J.; YU, J.; LUN, S. Feeding strategy of propionic acid for production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v.8,p. 200-205, 2001a.
- DU et al., Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88,P.59-65, 2001b.
- DU, G.; YU, J. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: Mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation. **Process Biochemistry**, v.38, p. 325-332,2002.
- EVANS, J.D.; SIKDAR, S.K. **Biodegradable plastics: An idea whose time has come?** CHEMTECH, Janeiro, 1990.
- FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 333 – 336, 1998.
- FULLER, CR; BRANDL, H; GROSS, R.A; LENZ R.W. *Pseudomonas oleovorans* as a source of Poly (β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental microbiology**. 54: 1977-1982, 1988.

- FULLER, R.C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p.21-29, 1999.
- GOMEZ, J.G.C.et al. Evaluation of soil gram negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 45, p. 785- 791, 1996.
- GROTHER E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly (β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microbial Technology**, v. 25, p.132-141, 1999.
- HÄNGGI, U.J. Requirements on bacterial polyesters as future substitute for conventional plastics for consumer goods. **FEMS Microbiology Reviews**, vol.16, p. 213-220, 1995.
- HAYWOOD, et al. Characterization of two 3-ketothiolases processing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoates synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, 52, 91-96, 1988a.
- HAYWOOD, et al. The role of NADH and NADPH linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Ralstonia eutropha*. **FEMS Microbiology Letters**, 52, 91-96, 1988b.
- HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. The importance of PHB-synthase specificity in polyhydroxyalkanoates synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **Fems Microbiology Letters**, vol.57, p. 1-6, 1989.
- HOLMES, P.A Applications of PHB - a microbiologically produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v.16, p.32-36, 1985.
- JENDROSSEK D.; SCHIRMER A.; SCHLEGEL, H.G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 46: 451-463, 1996.

- JOHNSTONE, B. A throw away answer. **Far Eastern Econ.** v. 174, p.62-63, 1990.
- KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (*phaC*) gene from *Chromobacterium violaceum*, **Applied Environmental Microbiology**, v.65, p. 3561-3565, 1999.
- LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 52, p. 27-85, 1995.
- LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Elsevier Science**, v.14, 1996a.
- LEE, S.Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p.1-14, 1996b.
- LEE, S.Y.; CHOI, J. High level production of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant E.coli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.
- LUZIER, W.D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p.839- 842, 1992.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n ° 1, p.1092-2172, 1999.
- MARANGONI, C.; FURIGO Jr. A; ARAGÃO. M. F (2000), Oleic acid improves poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production by *R.eutropha* in inverted sugar and propionic acid. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1635-1638.

MARANGONI, C. **Estudo de Estratégias de Produção de Poli (3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis, 2000. 191p. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina.

MARCHESSAULT, R. H. Tender morsels for bacteria: recent developments in microbial polyesters. **Trends Polymer**, v.4, p. 163-168, 1996.

MERGAERT, J. et al. Microbial degradation of poly (3-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n 10, p. 3233- 3238, 1993.

Metabolix (2002). Website of Metabolix Inc., Cambridge MA, U.S.
<http://www.metabolix.com>.

MOORE, G.F.; SAUNDERS, S.M.; **Advances in Biodegradable Polymers.** Rapra Review Report n ° 98, 1997.

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

OTA U.S. Congress, Office of Technology Assessment: Biopolymers: Making Materials Nature's Way - Background Paper OTA-BP-E-102. Washington, DC U.S. Government Printing Office. (1993).

PAGE, W.J.; KNOSP, O. Hyperproduction of poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *azotobacter vinelandii* UWD. **Applied and Environmental Microbiology**, 55(6): 1334-1339, 1989.

- PAGE, W.L. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* in media containing sugars and complex nitrogen sources. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 38: 117-121, 1992.
- PARK, Y.H.; LEE, I.Y.L.; KIM, M.K.; CHANG, H.N. Effects of propionate on accumulation of poly - β - hydroxybutyrate -co-hydroxyvalerate and excretion of pyruvate in *Ralstonia eutropha*. **Biotechnology letters**, v.16: 611-616, 1994.
- PARK, S. J., CHOI, J. e LEE, S. Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 36, p. 579-588, 2005.
- PERRONE, C. Biodegradabilidad: Siempre de moda. **Tecnología del plástico**, vol 49,p.14-21,1991.
- PREUSTING H., KINGMA J., WITHOLT B., Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two- liquid- phase cultures. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.13: 770-780, 1991.
- P&G -Procter & Gamble Licenses Innovative Application Technology of Biodegradable Plastics to Kaneka Corporation.
www.nodax.com/news101501.htm.2001.
- P&G -Personal communication with Norma McDonald, Isoa Noda and Karuna Narasimhan of the Procter and Gamble Company, OH, USA. 4 June 2003.
- RABELLO, A.L. **Efeito estufa**. *Ciência Hoje*, vol 5, n.29,p.50-55,1987.
- RAMSAY, B.A; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBÉ, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. Production of poly (β -hydroxybutiric-co- β -hydroxyvaleric) acids. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 56, p.2093- 2098, 1990.

RAMSAY, B.A Physiological factors affecting PHA production. **Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (Proceedings)**, p.9-17, Austria, 1994a.

REDIFF HOME PAGE: [http//members.rediff.com](http://members.rediff.com)

REHM, B. H.A.; STEINBUHEL A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, 3-19,1999.

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

RYU, H.W.; HAHN, S.K.; CHANG, Y.K.; CHANG, H.N. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55: 28-32, 1997.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2 ed, 1989.

SASIKALA, C.; RAMANA, C.V. Biodegradable polyesters. **Advances in Applied Microbiology**. 42: 97-218,1996.

SCHIMIDELL, W,;VITORATTO,E. **O desafio do lixo urbano**. Revista Politécnica, Vol.204/205, p.40-42, 1992.

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

SILVA,L.; RODRIGUES,M.F.; GOMEZ,J.G. Biodiversidade brasileira é fonte de microorganismos produtores de plásticos e elastômeros biodegradáveis.

Disponível em:

<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio15.htm>, 2001.

SQUIO, C. R.; FERREIRA, C.M.; ARAGÃO, G.M.F. Utilização de ácidos linoleico e oléico como suplementos nutricionais aumenta a produção de poli (3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) por *R.eutropha*. Anais do VIII Encontro Regional Sul de Tecnologia de Alimentos - Curitiba-PR, 2003.

STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Physiology and molecular genetics of poly (β -hydroxyalkanoic acid). Synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 535-542,1991.

STEINBÜCHEL, A; PIEPER, U. Production of a copolymer of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37: 1- 6, 1992.

STEINBÜCHEL, A.; DEBZI, E.; MARCHESSAULT, H.R.; TIMM, A. Synthesis and production of poly (3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol 39, p. 443-449, 1993.

STEINBÜCHEL, A; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 128, p.219-228, 1995.

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

- STEINBÜCHEL, A.; EVERSLOH, T.L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v.16, p.81-96, 2003.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v.25, p 1503-1555, 2000.
- TIMM, A; STEINBÜCHEL, A Formation of blends of various poly (3-hydroxyalkanoic acids) by recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol.33, p.296-301,1990.
- TSUGE, T. Review: Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.94, n.6, p.579-584, 2002.
- WANG, J.G.; BAKKEN, L.R. Screening of soil bacteria for poly-beta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation, **Microb. Ecol.**, v. 35, p. 94-104, 1998.
- WEINER, R.M. Biopolymer from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.390-394, 1997.
- YIM, K.S.; LEE, S.Y.; CHANG, H. N. Effect of acetic acid n poly- (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *Escherichia Coli*. **Journal of Chemical Engineering**, v 12: 264-268, 1995.

ANEXOS

Anexo 1

Cromatograma do padrão de Poli (3-Hidroxi butirato-co-3 Hidroxivalerato) – Sigma-Aldrich

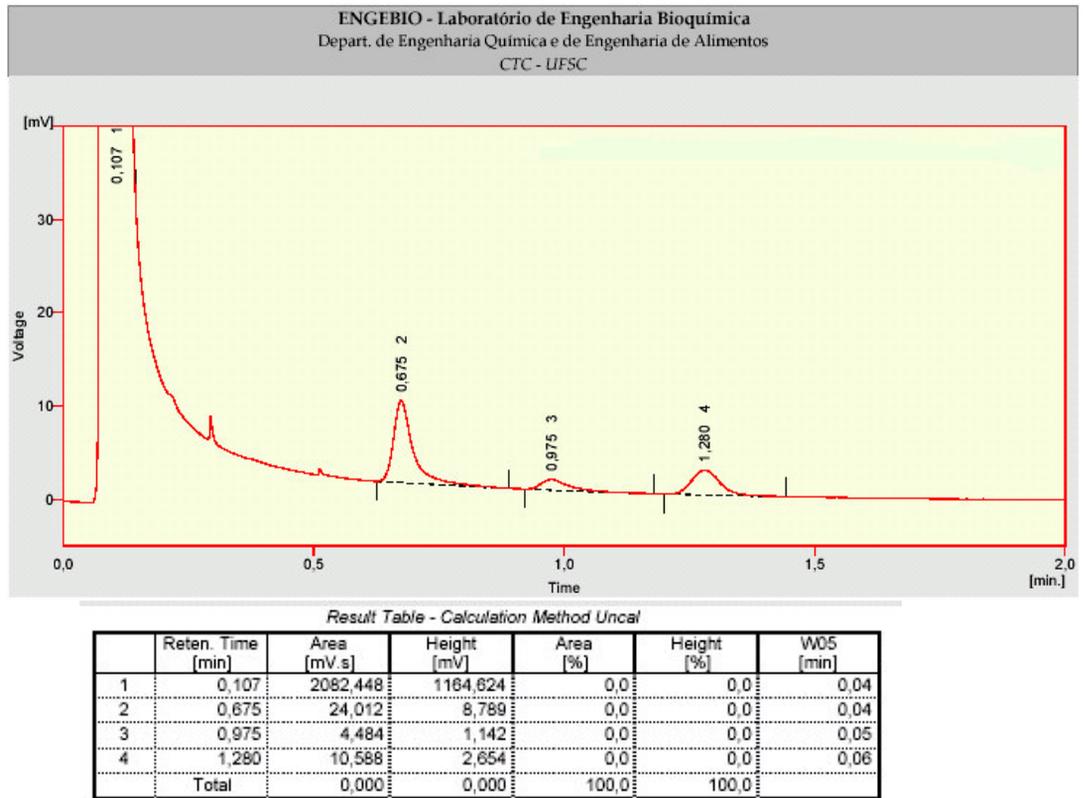
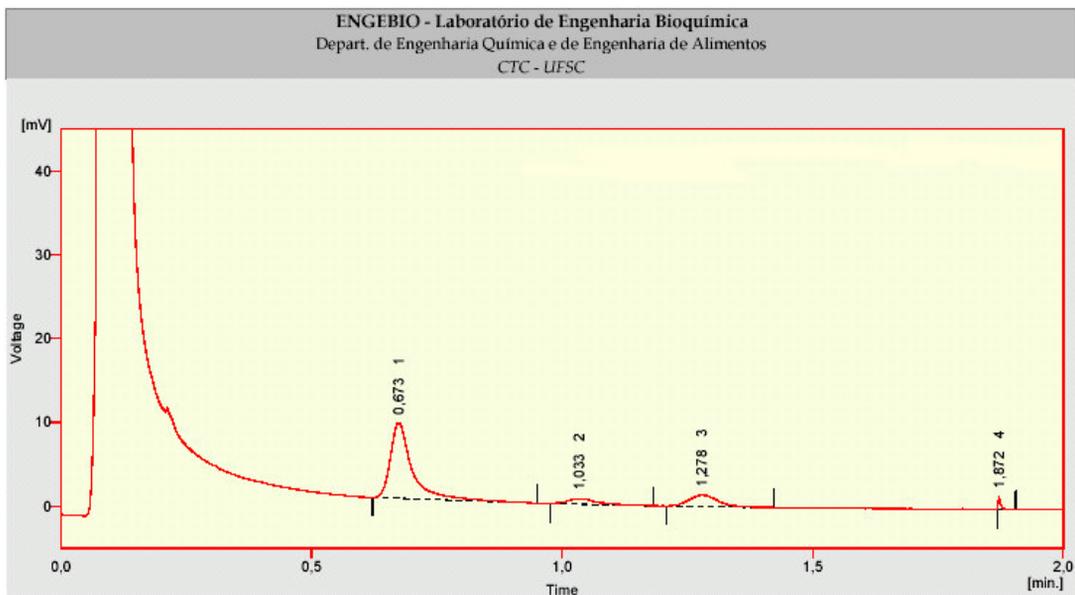


Figura A1 - Cromatograma do padrão de P[3HB-co-3HV] – Sigma-Aldrich

Anexo 2

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato.



Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0,673	27,275	9,032	75,9	71,5	0,04
2	1,033	2,640	0,657	7,3	5,2	0,06
3	1,278	5,523	1,382	15,4	10,9	0,06
4	1,872	0,511	1,559	1,4	12,3	0,01
	Total	35,949	12,631	100,0	100,0	

Figura A2 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato.

Anexo 3

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 5 mM de propionato.

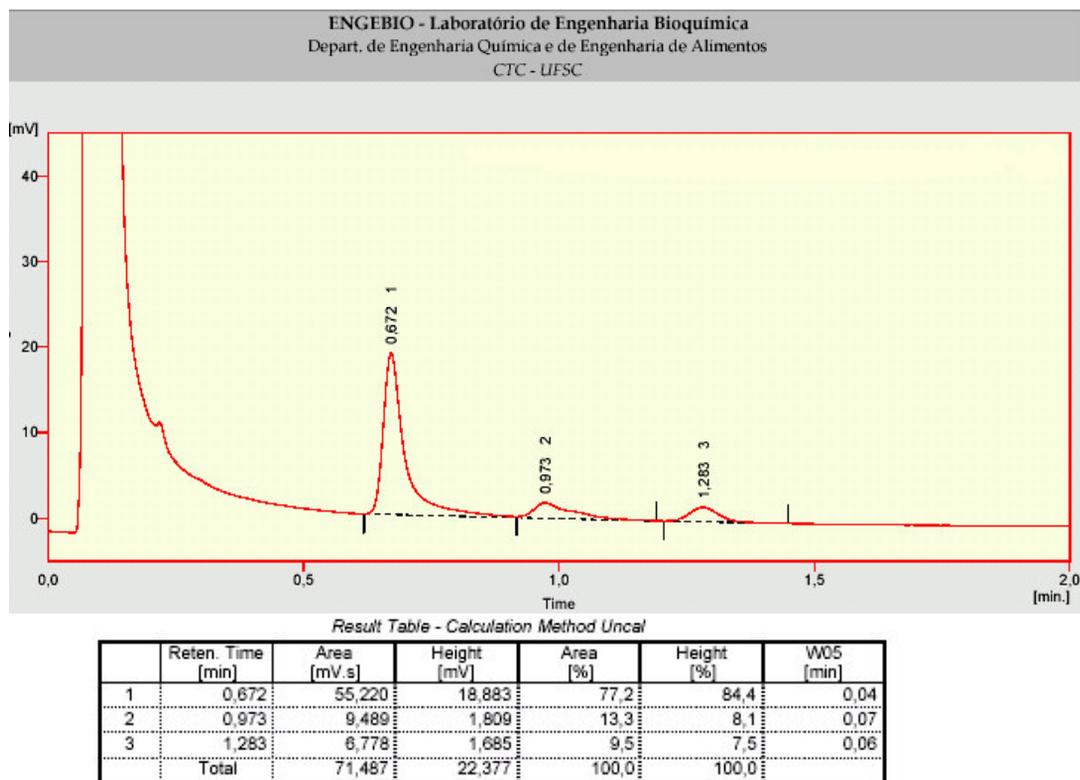


Figura A3 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 5 mM de propionato.

Anexo 4

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 10 mM de propionato.

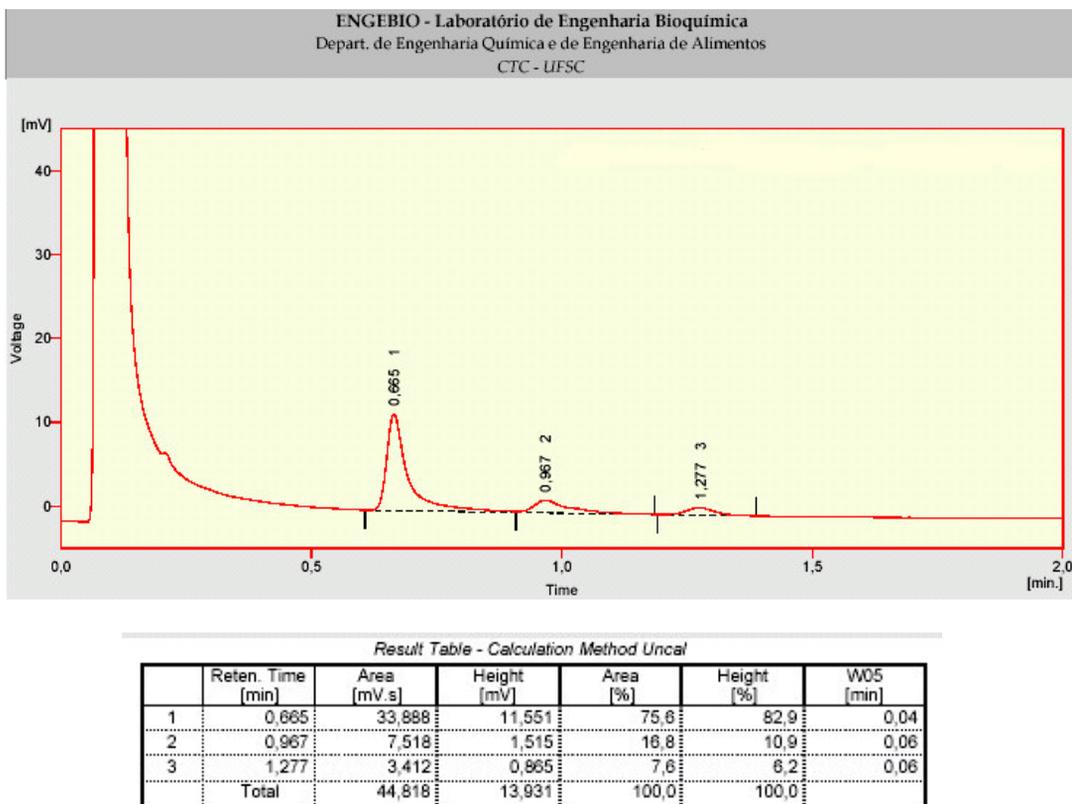
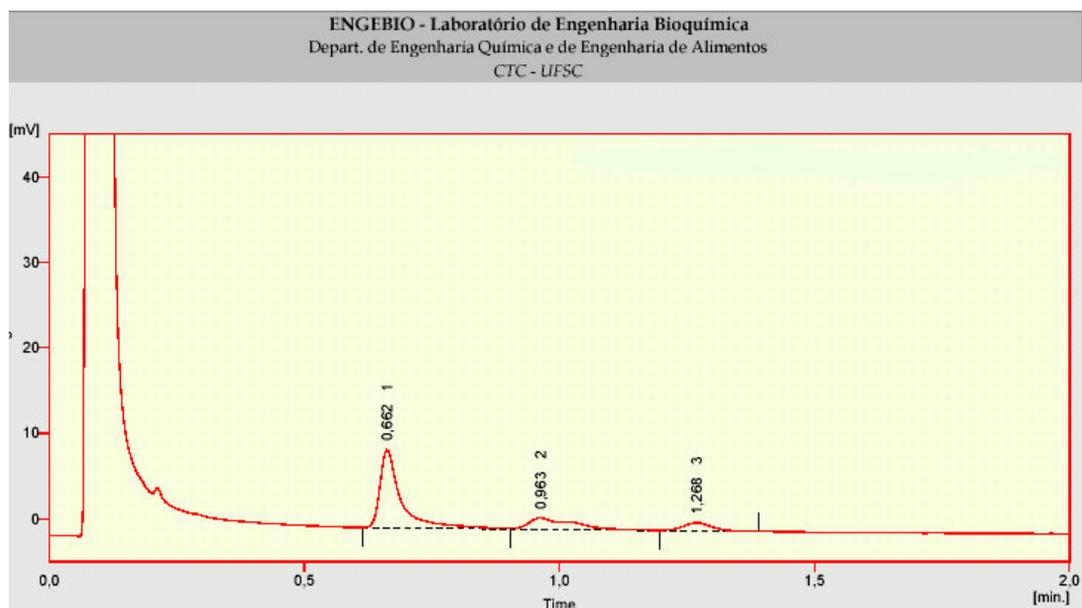


Figura A4 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 10 mM de propionato

Anexo 5

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 15 mM de propionato.



Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0.662	26,231	9,109	68,9	79,9	0,04
2	0.963	8,118	1,343	21,3	11,8	0,10
3	1.268	3,713	0,943	9,8	8,3	0,06
	Total	38,062	11,395	100,0	100,0	

Figura A5 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato e 15 mM de propionato.

Anexo 6

Cromatograma do cultivo sob limitação de nitrogênio.

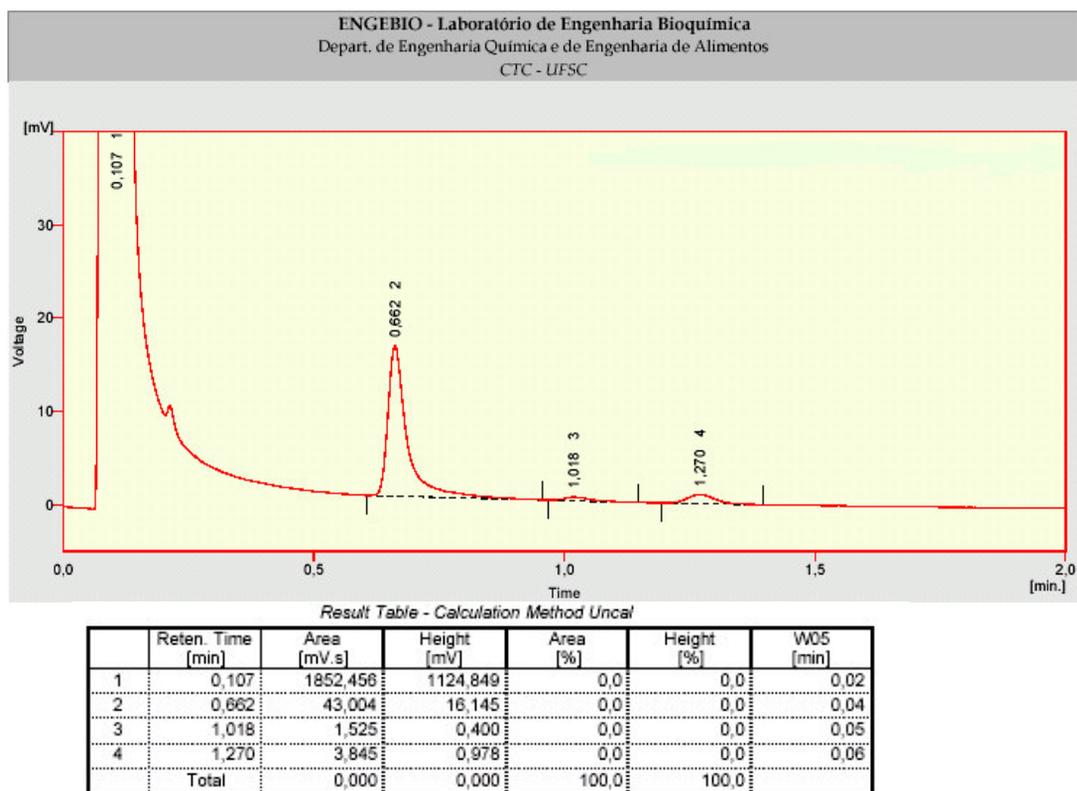


Figura A6 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio.

Anexo 7

Cromatograma do cultivo sob limitação de nitrogênio e 5 mM de propionato.

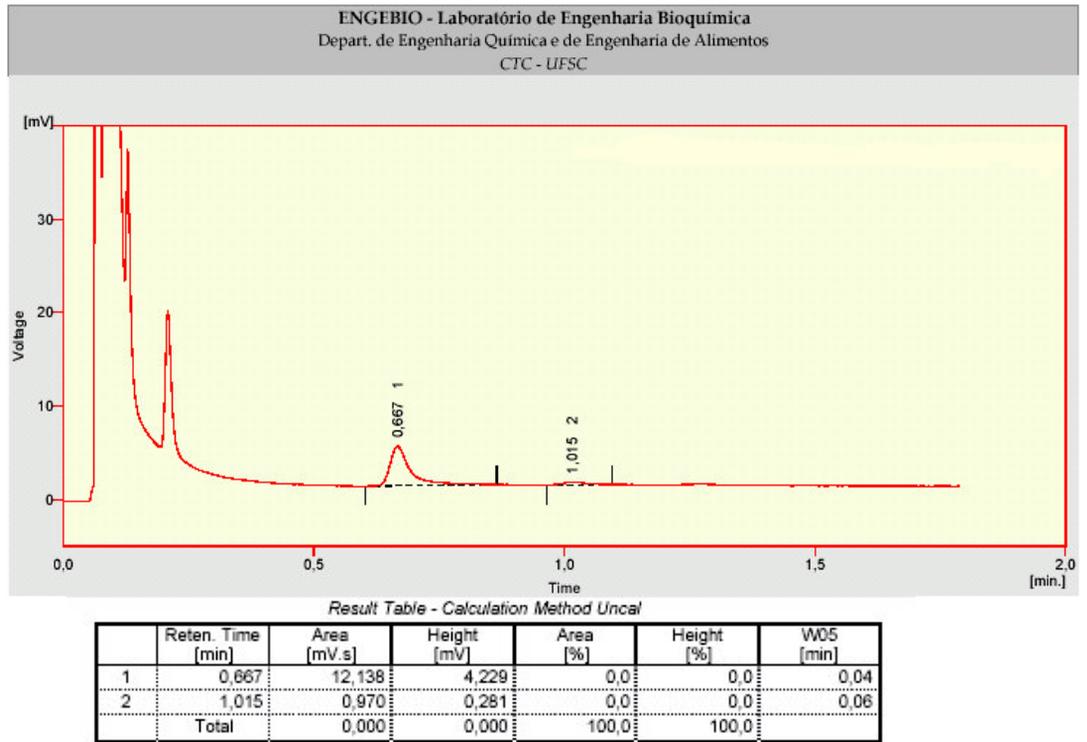
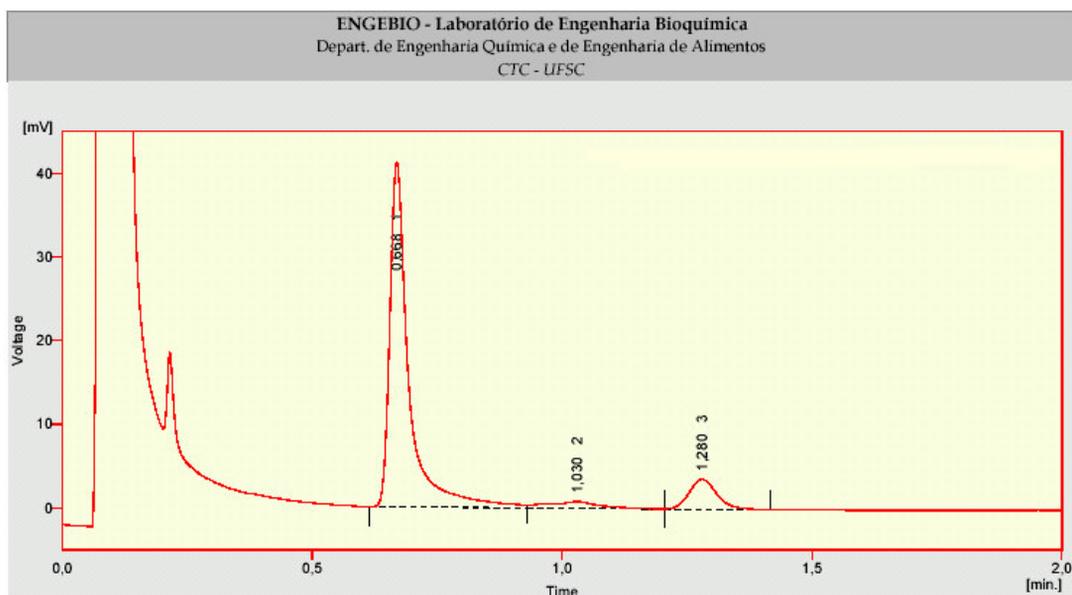


Figura A7- Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 5 mM de propionato.

Anexo 8

Cromatograma do cultivo sob limitação de nitrogênio e 10 mM de propionato.



Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0,668	109,365	41,164	84,9	90,4	0,04
2	1,030	5,697	0,802	4,4	1,8	0,13
3	1,280	13,756	3,570	10,7	7,8	0,06
Total		128,818	45,535	100,0	100,0	

Figura A8 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 10 mM de propionato.

Anexo 9

Cromatograma do cultivo sob limitação de nitrogênio e 15 mM de propionato.

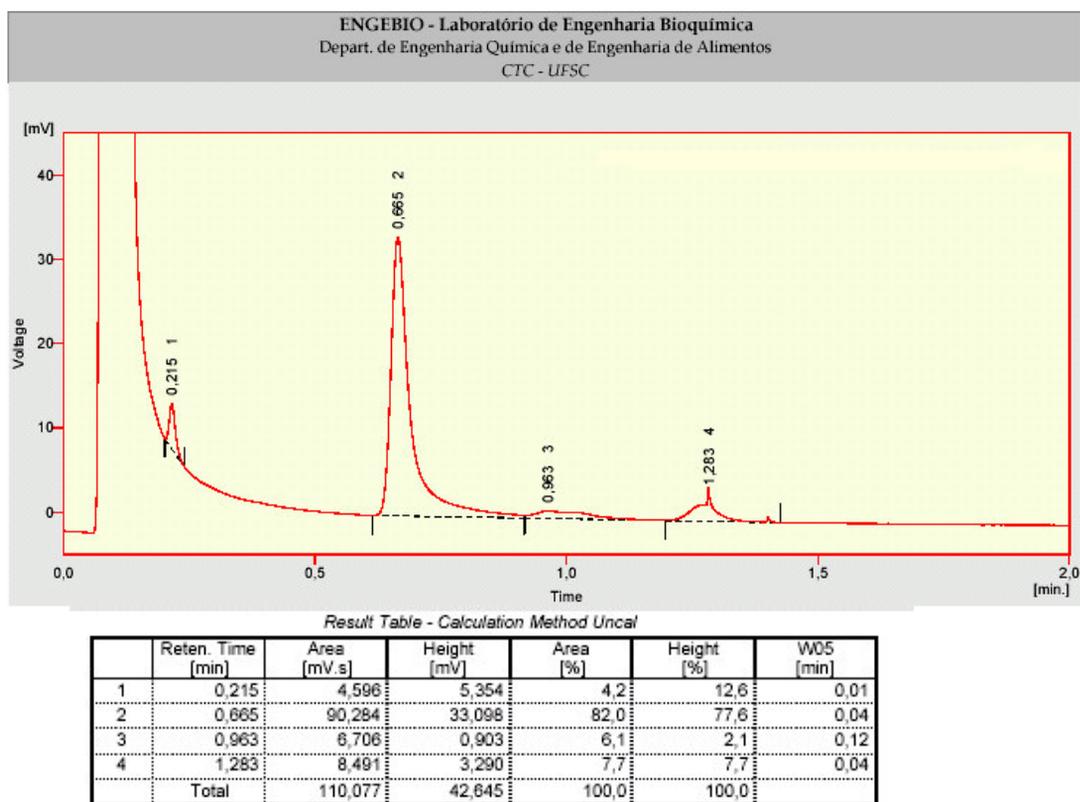
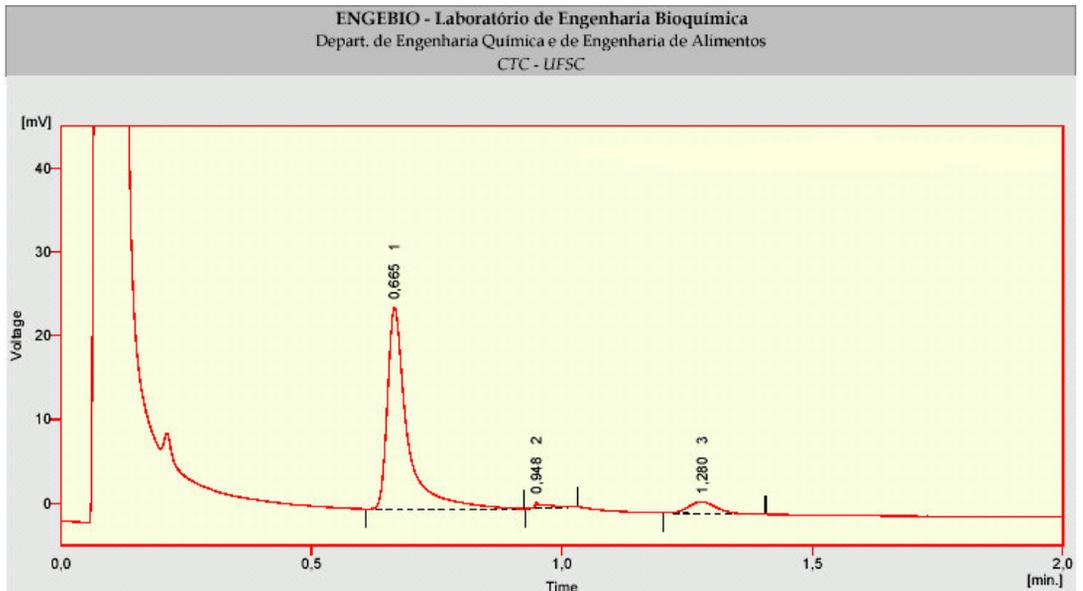


Figura A9 - Cromatograma do cultivo sob limitação nitrogênio e 15 mM de propionato.

Anexo 10

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura.



Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0,665	66,592	23,968	91,1	91,7	0,04
2	0,948	1,088	0,775	1,5	3,0	0,01
3	1,280	5,422	1,393	7,4	5,3	0,06
Total		73,082	26,136	100,0	100,0	

Figura A10 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura.

Anexo 11

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura e 10mM de propionato.

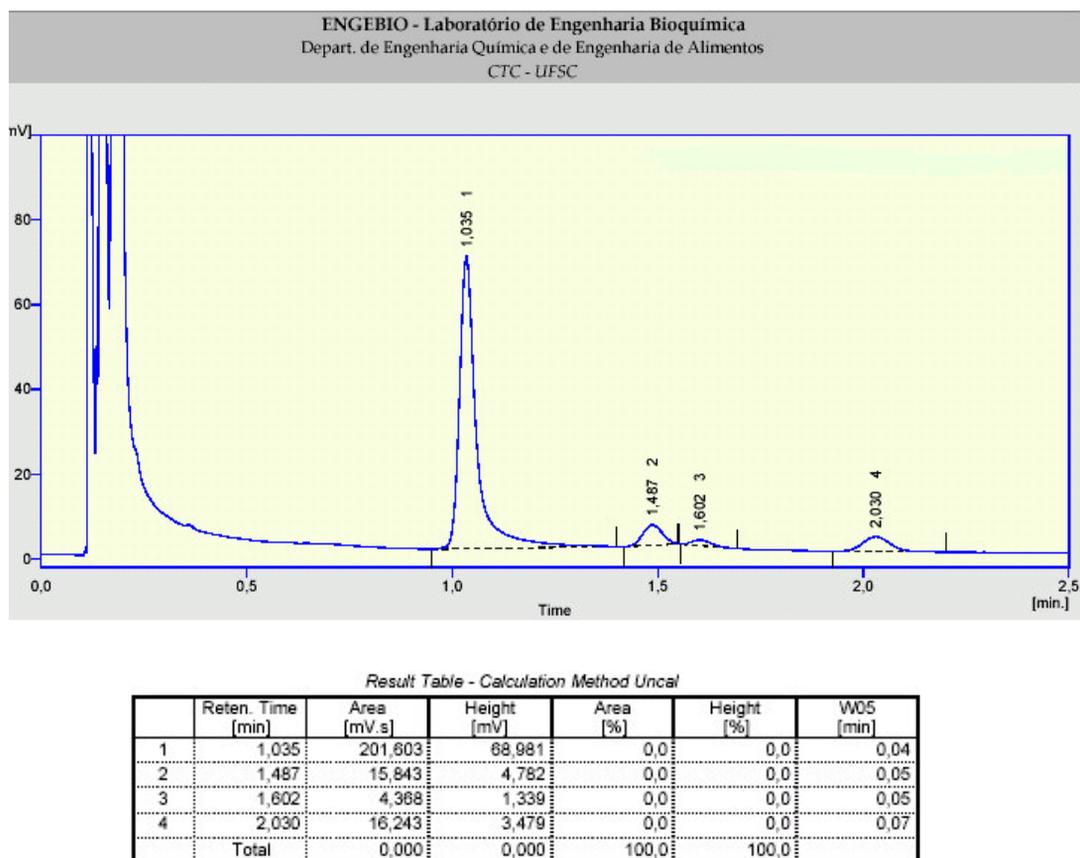
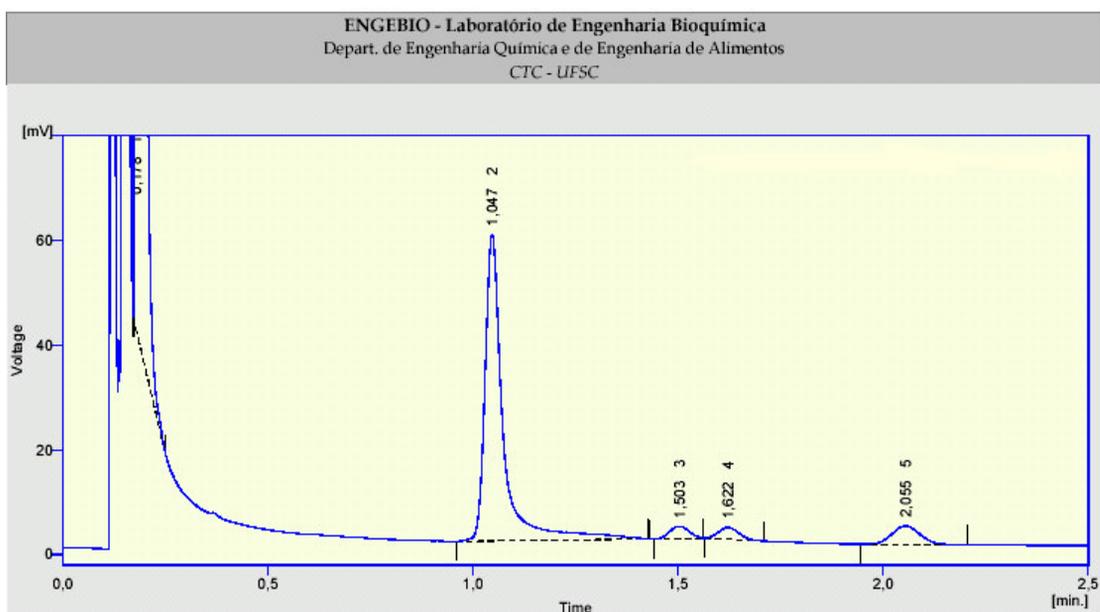


Figura A11- Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura e 10mM de propionato.

Anexo 12

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 1,0 g.L⁻¹ de ácido oléico.



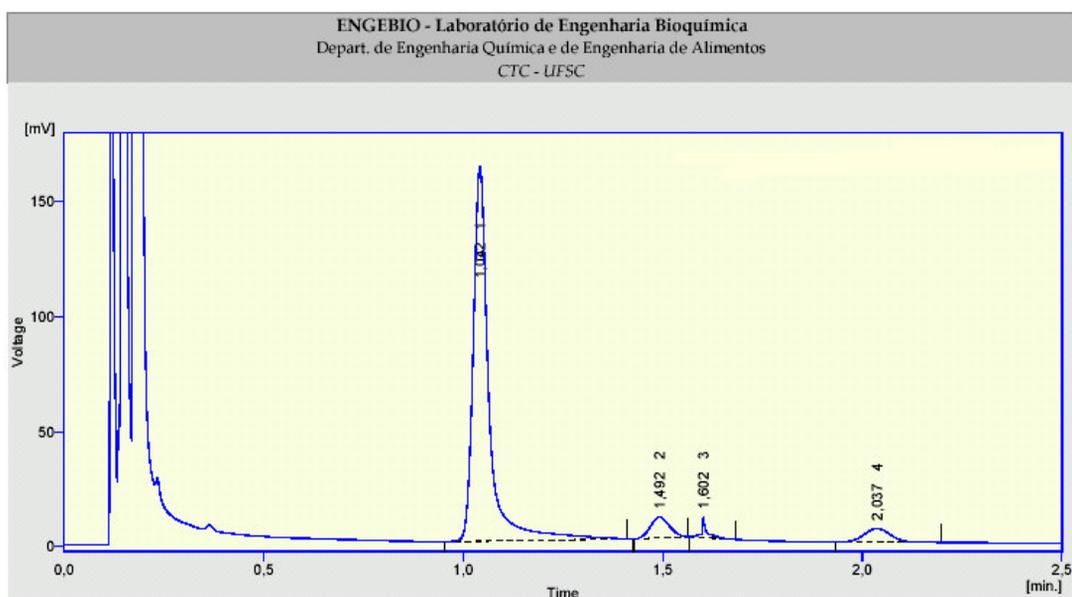
Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	0,178	1782,801	1206,885	0,0	0,0	0,03
2	1,047	181,884	58,567	0,0	0,0	0,04
3	1,503	7,553	2,323	0,0	0,0	0,06
4	1,622	7,891	2,257	0,0	0,0	0,06
5	2,055	16,861	3,516	0,0	0,0	0,08
Total		0,000	0,000	100,0	100,0	

Figura A12 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 1,0 g.L⁻¹ de ácido oléico.

Anexo 13

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 10 mM de ácido acético.



Result Table - Calculation Method Uncal

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]
1	1,042	448,776	163,152	0,0	0,0	0,04
2	1,492	29,633	9,020	0,0	0,0	0,05
3	1,602	7,484	9,021	0,0	0,0	0,01
4	2,037	27,208	5,916	0,0	0,0	0,07
Total		0,000	0,000	100,0	100,0	

Figura A13 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 10 mM de ácido acético.

Anexo 14

Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 5 mM de itaconato.

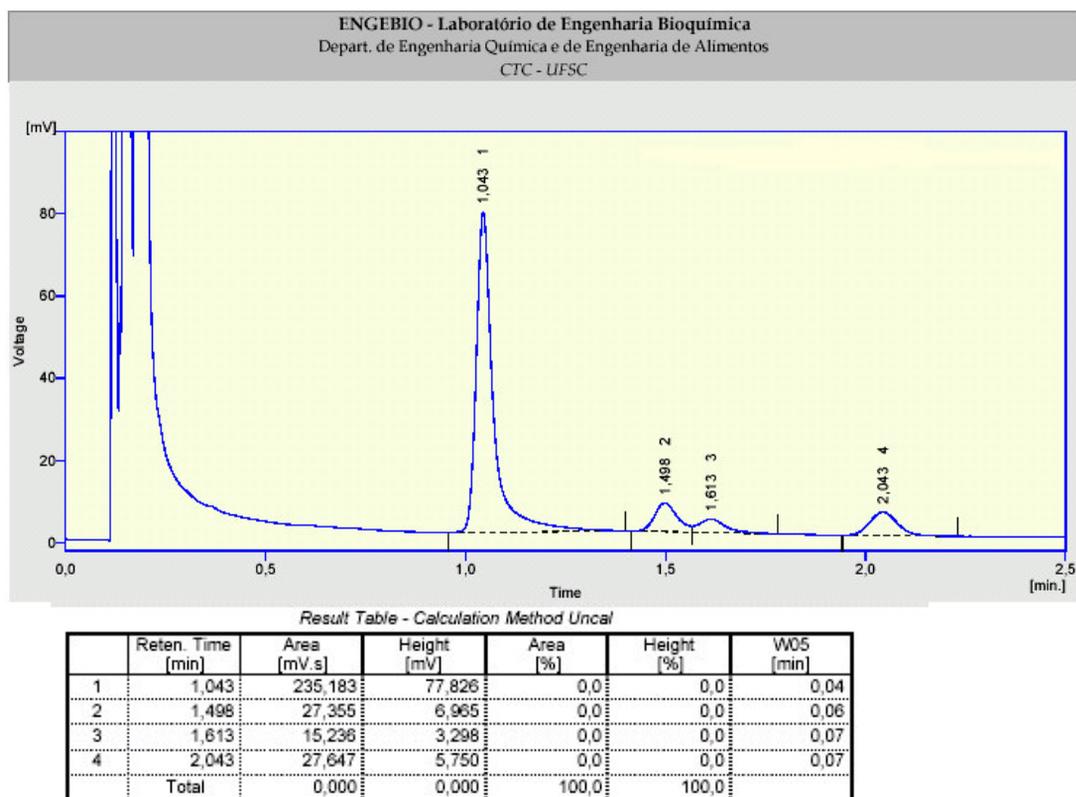


Figura A14 - Cromatograma do cultivo sob limitação de fosfato, em meio suplementado com extrato de levedura, 10mM de propionato e 5 mM de itaconato.

Anexo 15 – Cálculo dos % de PHA acumulado e % HB e HV incorporados ao polímero, conforme tabelas 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6.

Padrão : conforme cromatograma

Área do pico HB/ área do pico de ácido benzóico = x

Área do pico HV/ área do pico ácido benzóico= y

Amostra: conforme cromatograma

Área do pico HB/ área do pico de ácido benzóico= A

Área do pico HV/ área do pico ácido benzóico= B

Então:

X ----- 88 % HB presente no padrão (mg)

A-----Z mg de HB presente na amostra

y-----12 % HV presente no padrão (mg)

B----- W mg de HV presente na amostra

Peso da amostra usada para a realização da cromatografia gasosa= D

D (mg)---- 100% de polímero

Z (mg) ----E %

E= % de HB na massa celular

D (mg)---- 100% de polímero

W (mg) -----F%

F= % de HV na massa celular

% total de PHA na biomassa = E+F

H-----100 % de polímero

E-----G

G = % HB no polímero

H-----100% de polímero

F-----L

L = % HV no polímero