

**CRISTHIANE LEITE KRUEGER**

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Bacillus* PRODUTORAS DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DE MANDIOCA**

**FLORIANÓPOLIS – SC  
2009**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

**SELEÇÃO DE LINHAGENS DE *Bacillus* PRODUTORAS DE  
POLIHIDROXIALCANOATOS A PARTIR DE RESÍDUO DO  
PROCESSAMENTO DE MANDIOCA**

Dissertação submetida ao  
Curso de Pós-Graduação  
em Engenharia de  
Alimentos da Universidade  
Federal de Santa Catarina  
para obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia de  
Alimentos.

*Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr. Regina Vasconcellos Antônio*  
*Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. André Oliveira de Souza Lima*

**CRISTHIANE LEITE KRUEGER**

Florianópolis, 20 de março de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Biologia Molecular, Biotecnologia Básica e Microbiologia Aplicada do Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar, da Universidade do Vale do Itajaí – Itajaí, SC.

Tudo que sou é reflexo  
de duas vidas de  
dedicação, incentivo e  
amor: a vida de meus  
pais!

## AGRADECIMENTOS

---

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por eu poder conquistar mais este objetivo, por me dar força e garra quando era disso que eu precisava.

Agradeço imensamente aos professores Regina e André, pela oportunidade, pela orientação, pela dedicação, pela paciência, pelo empenho e o amor em trabalhar com ensino e pesquisa. Posso dizer, realmente, que vocês são exemplos de bons profissionais, e que conquistaram minha admiração e meu carinho.

Agradeço ao professor Marcus Adonai e sua equipe de pesquisa, que trabalharam para o desenvolvimento da coleção de microrganismos do laboratório, e ao professor Carlos Renato Rambo, pela análise de caracterização do polímero.

Ao professores que aceitaram participar da defesa desta dissertação, professora Gláucia e professor Pessatti, obrigada por fazerem parte deste trabalho, enriquecendo-o. É um agradecimento especial ao prof. Pessatti, que me acompanha há algum tempo, por quem tenho uma admiração enorme.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de estudo, e ao CNPq e a Indústria Corn Products pelo apoio financeiro.

Aos amigos do laboratório, meu especial carinho, Amanda, Ida, Angélica, Felipe, Clederson, Thiago, Sara, Carlos, pelo apoio e companheirismo durante os experimentos. Um “valeu” super especial aos amigos que conquistei durante este tempo, Rossana, Bianca, Andréia... tenho certeza de que estive em companhia de pessoas muito especiais.

Agora gostaria de agradecer àquelas pessoas que me apoiaram não só neste momento, mas sempre... Um muito obrigado todo especial aos meus pais, a estas “pessoinhas” que me acompanharam, deram-me todo carinho possível, e incentivaram-me para que eu estivesse concluindo mais esta etapa na minha vida.

Ao meu irmão, à minha vó e meu vô (*in memoriam*), que sempre de perto me apoiaram e incentivaram-me. E a toda a minha família e meus amigos, que me acompanharam durante todo este tempo. Agradeço também a alguém muito especial, ao meu namorado Marcelo, por seu companheirismo, seu carinho, sua atenção, seu amor e sua força, que sempre me apoiaram muito.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, deste trabalho e deste momento, e que, de alguma forma, me fizeram crescer como profissional e ser humano.

Frente aos problemas ocasionados pelo uso dos plásticos de origem petroquímica, surgiu a necessidade de se buscarem alternativas para substituição deste material. Apresentam-se como solução os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, que são polímeros com as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais e rapidamente biodegradados quando descartados no ambiente. Dentre eles, estão os polihidroxialcanoatos (PHAs), poliésteres compostos por monômeros de ácidos 3-hidroxialcanóicos, os quais são acumulados intracelularmente por bactérias, como reserva de carbono e/ou energia, sob limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento, e o polímero mais estudado atualmente é o P(3HB) - poli(3-hidroxitirato). Entretanto, o custo de produção de PHAs é um dos responsáveis pela limitação de sua produção e comercialização. A utilização de substratos de baixo custo se torna um fator importante para a redução do custo de produção, além da busca e obtenção de linhagens eficientes na conversão do substrato em polímero. O objetivo deste trabalho foi selecionar, numa coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada - UNIVALI/SC, uma linhagem bacteriana capaz de produzir PHA a partir de resíduo do processamento de mandioca. Inicialmente, 72 isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* de 21 espécies diferentes foram cultivados em meio com limitação de fósforo e 20g/L de resíduo industrial oriundo do processamento de mandioca, rico em amido e açúcares redutores. Foram avaliados o crescimento dos microrganismos em meio com substrato amiláceo (técnica de MTT), sua capacidade de secretar enzimas no meio (avaliação de degradação de amido) e a produção de PHA (cultivo com corante vermelho do Nilo e observação em microscópio de epifluorescência). Finalmente foram selecionados 4 isolados: LAMA073, LAMA095, LAMA262 e LAMA265, classificados por métodos moleculares como *Bacillus megaterium*, os quais foram capazes de produzir P(3HB) a partir do resíduo amiláceo. O resíduo industrial utilizado mostrou-se, portanto, um substrato carbônico aplicável à produção de compostos de maior valor agregado, como P(3HB). Os isolados LAMA073, LAMA095, LAMA262 e LAMA265 acumularam 13,04% (p/p), 23,88% (p/p), 5,92% (p/p), e 25,00% (p/p) de P(3HB), respectivamente, a partir de 20% de resíduo hidrolisado adicionado ao meio. Quando adicionado resíduo hidrolisado na concentração de 40%, os isolados LAMA073 e LAMA095 apresentaram aumento na produção de P(3HB), para 30,45% (p/p) e 29,78% (p/p),

respectivamente. A espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), das amostras de PHAs produzidos, mostraram bandas características da presença de P(3HB), confirmando a produção deste polímero pelos microrganismos. Portanto, os isolados identificados e caracterizados apresentam potencial para a produção de P(3HB) em substrato de baixo custo, sendo um próximo passo avaliá-los em uma escala superior de produção, bem como em outros resíduos amiláceos.

There are many problems caused by use of petrochemical plastics, then it is necessary to find alternatives to replace this material. A solution for this problem is the use of biodegradable plastic, or bioplastics, which are polymers with desirable properties of conventional plastics, and they are rapidly biodegraded in the environment when they are discarded. Among the biodegradable plastics, there are the polyhydroxyalkanoates (PHAs), polyester containing hydroxyalkanoic acid monomers. They are accumulated intracellularly by bacteria as carbon or energy reserves, when there is a limitation of an essential nutrient, and P(3HB) – poly(3-hydroxybutyrate) is the most studied polymer nowadays. However, the use of PHA is limited due to its high cost production. The use of low cost by-products becomes the main factor for the reduction of production cost, besides that it is also necessary to obtain strains for efficient substrate conversion into polymer. The objective of this work was to select a bacterial strain capable of producing PHA from cassava by-products as carbon source. First screening was conducted with 72 strains from culture collection of the Applied Microbiology Laboratory (UNIVALI/SC/Brazil), covering three genera (*Bacillus*, *Geobacillus* and *Paenibacillus*) and 21 different species, which were cultivated in Minimal Medium (MM) with limited phosphate and 20g/L of cassava by-product. It was evaluated microorganisms growth (measuring respiration by MTT assay) in medium with starchy substrate, their ability to secrete enzymes (starch degradation) and PHA production (Nile red dye assay and observation in epifluorescence microscope). Finally 4 isolates were selected: LAMA073, LAMA095, LAMA262 and LAMA265, classified by molecular methods (16S rRNA sequencing) as *Bacillus megaterium*, which were capable of producing P(3HB) from cassava processing by-products as a sole carbon source. Strains LAMA073, LAMA095, LAMA262 and LAMA265 were able to produce 13,04% of P(3HB) (w/w), 23,88% (w/w), 5,92% (w/w) and 25,00% (w/w) respectively, when cultivated in MM supplemented with 20% of hydrolyzed cassava by-product. However, when 40% of hydrolyzed cassava by-product was used, higher P(3HB) percentage, 30,45% and 29,78% (w/w), was observed for LAMA073 and LAMA095, respectively. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) showed characteristic bands of P(3HB) presence, confirming polymer production by microorganisms. Therefore, the identified and characterized strains have potential to produce P(3HB) in low-cost

substrate, and a next study would be evaluate them on a higher scale of production, as well as production in others starchy waste.

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>4</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
3.1. <i>Polihidroxicanoatos.....</i>	5
3.1.1. Histórico.....	5
3.1.2. Características e propriedades.....	6
3.1.3. Microrganismos produtores.....	11
3.1.3.1. <i>Bacillus.....</i>	14
3.1.4. Biossíntese.....	16
3.1.5. Biodegradabilidade.....	21
3.1.6. Produção Industrial.....	22
3.1.7. Aplicações.....	25
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1. <i>Meios de cultura empregados.....</i>	27
4.2. <i>Coleção de microrganismos avaliada.....</i>	28
4.3. <i>Seleção dos microrganismos degradadores de amido.....</i>	31
4.4. <i>Caracterização do resíduo empregado como fonte de carbono.....</i>	32
4.4.1. Métodos Analíticos.....	32
4.4.1.1. Determinação de açúcares redutores.....	32
4.4.1.2. Determinação de açúcares redutores presentes em forma de amido.....	33
4.4.1.3. Determinação de proteínas.....	33
4.4.1.4. Determinação de nitrogênio total.....	33
4.5. <i>Condições de cultivo para a produção, extração e caracterização dos PHAs produzidos.....</i>	34
4.5.1. Hidrólise do resíduo.....	34
4.6. <i>Métodos Analíticos.....</i>	35
4.6.1. Determinação do índice enzimático.....	35
4.6.2. Determinação do crescimento bacteriano.....	36
4.6.2.1. Determinação do crescimento bacteriano em resíduo hidrolisado.....	36
4.6.3. Determinação de PHA.....	37

4.6.4. Análise dos Dados.....	37
4.7. Avaliação da produção de PHA por microscopia de epifluorescência.....	38
4.8. Extração e Caracterização do PHA.....	38
4.8.1. Extração do PHA.....	38
4.8.2. Caracterização do PHA.....	39
4.8.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	39
4.9. Caracterização molecular dos microrganismos isolados.....	39
4.9.1. Extração de DNA.....	39
4.9.2. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR.....	40
4.9.3. Sequenciamento do DNA.....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1. Caracterização do resíduo.....	42
5.2. Seleção de microrganismos degradadores de amido.....	43
5.3. Avaliação quantitativa dos microrganismos selecionados.....	47
5.3.1. Determinação do índice enzimático.....	47
5.3.2. Determinação do crescimento bacteriano.....	49
5.4. Avaliação da Produção de PHA.....	52
5.5. Caracterização dos filmes de PHB.....	63
5.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	63
5.6. Caracterização molecular dos isolados selecionados.....	65
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>69</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1.** Estrutura geral dos polihidroxicanoatos (LEE, 1996a).....7
- Figura 2.** Metabolismo em crescimento balanceado e em condição de limitação de nutriente e excesso de carbono (Adaptado de BYROM, 1987).....17
- Figura 3.** Via de biossíntese de poli(3-hidroxi butirato) (MADISON e HUISMAN, 1999).....18
- Figura 4.** Via de biossíntese de PHB e de PHBV a partir de glicose e propionato (DOI et al., 1990).....20
- Figura 5.** Isolados bacterianos crescidos em meio mínimo (M9) com 5g/L do resíduo do processamento de mandioca como única fonte de carbono, após 24 horas de cultivo.....46
- Figura 6.** Colônias de *B. ehimensis* LAMA190 (A) e *B. subtilis* LAMA023 (B) e os halos de degradação do amido, revelados por solução de iodo.....47
- Figura 7.** Índice enzimático (relação halo enzimático/diâmetro colônia) dos isolados selecionados, cultivados em meio M9, contendo 5g/L de resíduo. Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e os isolados indicados com mesma letra não são diferentes ao nível de 5% de significância. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.....48
- Figura 8.** Crescimento celular dos isolados em meio contendo resíduo bruto, por meio da técnica de redução de MTT, expresso como absorbância  $ABS_{540nm}$ . Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e os indicados com mesma letra não são diferentes ao nível de 5% de significância. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.....50
- Figura 9.** Crescimento do isolado LAMA 262 em meio com resíduo bruto e hidrolisado por meio da técnica de MTT, expresso como  $ABS_{540nm}$ , em que RB = resíduo bruto e RH = resíduo hidrolisado. Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e as

barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.....51

**Figura 10.** Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) liberada nos diferentes tratamentos (1 a 8) para hidrólise do resíduo do processamento de mandioca. As identificações “a”, “b”, “c” e “d” indicam a comparação estatística entre os tratamentos (teste de Tukey).....53

**Figura 11.** Crescimento celular (redução de MTT ABS<sub>540nm</sub>) dos isolados LAMA262 e LAMA268 cultivados em glicose ou resíduo amiláceo hidrolisado, após 48 horas de cultivo a 37°C. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.....54

**Figura 12.** Acúmulo de PHA observado sob microscópio de epifluorescência. A) LAMA262 cultivado com glicose; B) LAMA262 cultivado com resíduo; C) LAMA268 cultivado com glicose; D) LAMA268 cultivado com resíduo.....56

**Figura 13.** Acúmulo de PHA dos isolados cultivados com resíduo observado sob microscópio de epifluorescência. A) LAMA 095; B) LAMA 073; C) LAMA 262; D) LAMA 265.....59

**Figura 14.** Espectro de FTIR para o polímero produzido pelo isolado LAMA095 - *B. megaterium*.....64

**Figura 15.** Espectro de FTIR para o polímero produzido pelo isolado LAMA265 - *B. megaterium*.....64

**Figura 16.** A árvore filogenética, construída por meio do Programa MEGA4, apresenta os isolados selecionados no trabalho e os microrganismos com 99% de identidade selecionados a partir do GenBank. No eixo x, encontra-se uma escala de identidade de nucleotídeos, sendo que a distância é a proporção (p) de nucleotídeos diferentes comparando-se duas sequências, e é obtido pela divisão do número de nucleotídeos diferentes pelo número total de nucleotídeos comparados. Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de *Bootstrap*, em 100 réplicas.....67

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Comparação das propriedades físicas de alguns polihidroxialcanoatos e do polipropileno .....	10
<b>Tabela 2.</b> Acúmulo de PHA por alguns microrganismos, sua fonte de carbono e a composição do polímero.....	12
<b>Tabela 3.</b> Acúmulo de PHA por alguns <i>Bacillus</i> .....	15
<b>Tabela 4.</b> Características dos diferentes tipos de PHB polimerase.....	19
<b>Tabela 5.</b> Biodegradação de um filme de P(3HB-co-3HV) (80% HB/20% HV).....	22
<b>Tabela 6.</b> Efeito do custo do substrato e do rendimento de P(3HB) no custo de produção.....	24
<b>Tabela 7.</b> Elementos constituintes do meio M9 (g/L).....	27
<b>Tabela 8.</b> Elementos constituintes do meio LB (g/L).....	27
<b>Tabela 9.</b> Elementos constituintes do meio descrito por Ramsay e colaboradores (1990) (g/L).....	28
<b>Tabela 10.</b> Microrganismos avaliados da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada/UNIVALI.....	29
<b>Tabela 11.</b> Avaliação do crescimento dos isolados ambientais, após 48 horas de cultivo em meio M9 a 37°C, contendo 5g/L de amido puro.....	44
<b>Tabela 12.</b> Microrganismos selecionados após avaliação do crescimento, em meio M9 a 37°C, contendo 5g/L de amido puro, em 24 horas.....	45
<b>Tabela 13.</b> Isolados crescidos em meio limitado com glicose como fonte de carbono e corante vermelho do Nilo a 37°C.....	57

**Tabela 14.** Isolados crescidos em meio limitado com 20% de resíduo hidrolisado como fonte de carbono e corante vermelho do Nilo.....58

**Tabela 15.** Biomassa produzida, quantidade de P(3HB) nas células e porcentagem de recuperação do polímero dos isolados cultivados em meio limitado com 20% de resíduo hidrolisado (v/v), e em 20g/L de glicose por 48h a 37°C.....60

**Tabela 16.** Biomassa produzida, quantidade de P(3HB) nas células e porcentagem de recuperação do polímero dos isolados cultivados em meio limitado com 40% de resíduo hidrolisado (v/v), por 48h a 37°C.....62

**Tabela 17.** Identidade entre as sequências dos isolados selecionados e o banco de dados GenBank (NCBI).....66

## NOMENCLATURA

---

ABS	Absorbância (ou Densidade Ótica – DO)
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
BSA	Soro Albumina Bovina
CTC	Cobre-tartarato-carbonato
DMP	2,6 Dimetilfenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
rRNA	RNA ribossomal
DNS	Ácido 3-5 dinitrosalicílico
FTIR	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
HAS	Ácidos Hidroxialcanóicos
kDa	Kilo Daltons
LB	Meio Luria-Bertani
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P(3HB)	Poli(3-hidroxiбутирато)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -3-hidroxi valerato)
P(3HB- <i>co</i> -4HB)	Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -4-hidroxi бутирато)
P(3HHx) - <i>co</i> -P(3HO)	Poli(3- hidroxi hexanoato- <i>co</i> -3-hidroxi octanoato)
P(3HV)	Poli(3-hidroxi valerato)
PBS	Tampão fosfato-salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHA	Polihidroxi alcanoato
PHA <sub>LCL</sub>	Polihidroxi alcanoato de cadeia lateral longa
PHA <sub>MCL</sub>	Polihidroxi alcanoato de cadeia lateral média
PHA <sub>SCL</sub>	Polihidroxi alcanoato de cadeia lateral curta
PHB	Polihidroxi бутирато
PHBHHx	Poli(3-hidroxi бутирато- <i>co</i> -3-hidroxi hexanoato)
PHBV	Poli(3-hidroxi бутирато- <i>co</i> -3-hidroxi valerato)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TE	Tampão Tris-HCl 1M, pH 7,5
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Termogravimetria

---

## 1. INTRODUÇÃO

Há muito tempo os materiais plásticos se tornaram parte importante em nosso dia-a-dia, pelas suas características de versatilidade, força, durabilidade, resistência à degradação. Desta forma, tornaram-se essenciais para quase todas as indústrias, as quais trocaram vidro e papel nas embalagens pelo plástico. No entanto, estas propriedades consideradas desejáveis agora são consideradas preocupantes, e o acúmulo de plásticos no ambiente tornou-se um problema mundial (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

O aumento da produção de lixo aparece como uma das principais consequências do crescimento populacional e econômico, cujo índice é alarmante: o Brasil produz diariamente em média 240 mil toneladas de lixo, sendo que 88% são destinados a aterros e lixões (IBGE, 2003).

A presença de plástico de origem petroquímica representa um grave problema, uma vez que permanece no meio ambiente por um longo período de tempo, devido ao alto peso molecular e à conformação da cadeia carbônica desses polímeros, o que dificulta a ação dos microrganismos no processo degradativo. Além disso, devido à lenta degradação, comprometem a circulação de gases e líquidos, dificultam a degradação de outros constituintes do lixo, e retardam a estabilização das áreas dos aterros (MOORE e SAUNDERS, 1997; GOMEZ e BUENO NETTO, 1997).

Soluções para o gerenciamento do descarte de plásticos incluem incineração, reciclagem e bio ou fotodegradação. Entretanto, incineração e reciclagem apresentam alguns problemas associados, como o fato de a incineração ser perigosa, pelos compostos formados, além de possuir custo elevado, e a reciclagem, além de ser um processo demorado, pode ser limitado pela presença de pigmentos e revestimentos dos plásticos. Neste contexto, os plásticos biodegradáveis oferecem a melhor solução para a manutenção da qualidade do ambiente (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Os materiais plásticos biodegradáveis, então, devem possuir propriedades físico-químicas desejáveis dos plásticos convencionais, serem produzidos a partir de fontes renováveis de carbono e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente. Os plásticos biodegradáveis, ou bioplásticos, são polímeros que se degradam ao ataque microbiano em curto espaço de tempo, sob condições apropriadas do ambiente (PIEMOLINI, 2004).

Nota-se o grande interesse da população mundial quanto ao desenvolvimento destes polímeros quando se observa o aumento no número de publicações e patentes sobre este assunto nos últimos 25 anos, passando de isoladas publicações em 1982 para aproximadamente 100 publicações e 40 patentes em 2004 (JACQUEL et al, 2008).

Dentre os biopolímeros em desenvolvimento, estão os polihidroxialcanoatos (PHAs), os quais são acumulados intracelularmente por bactérias produtoras, como reserva de carbono e/ou energia, na maioria das vezes, sob limitação de um nutriente essencial ao seu crescimento, como nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio. São considerados uma importante alternativa aos materiais plásticos convencionais (LEE et al., 1999).

Quimicamente, os PHAs são ésteres poliméricos de hidroxiácidos. Devido às suas características físicas e químicas, apresentam aplicações amplas tanto como matéria plástica convencional, como na medicina, para fabricação de materiais de sutura e prótese óssea, na indústria farmacêutica, para a produção de cápsulas para a liberação controlada de fármacos, e, na indústria de alimentos, como embalagens (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998). Dentre os PHAs, poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB)] é o polímero mais estudado, produzido naturalmente na presença de excesso de carbono por diversas bactérias como grânulos de reserva de energia e poder redutor (KHARDENAVIS et al., 2007).

Entretanto, o custo de produção de P(3HB) é cerca de nove vezes maior em comparação aos plásticos sintéticos, já que envolve produção de biomassa com fontes de carbono muitas vezes de valor elevado, o que limita a produção deste biopolímero e sua substituição em relação aos produtos normalmente comercializados (KHARDENAVIS et al., 2007). Desta forma, a redução dos custos de produção depende da obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, da utilização de substratos de baixo custo, do desenvolvimento de processos de extração-purificação a fim de tornar os custos de recuperação do polímero os menores possíveis (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Neste contexto, dentre os substratos de baixo custo, destacam-se os substratos amiláceos, disponíveis em grandes quantidades, e que constituem componentes importantes de resíduos de inúmeras indústrias (CEREDA, 1997). A mandioca se destaca no Brasil pela sua alta produção e pela existência de diversas indústrias de processamento. Desta forma, são necessários estudos para definição de destino apropriado para os resíduos produzidos, os quais podem constituir fonte

rica para produção de compostos de maior valor agregado, como é o caso dos PHAs.

É necessário explorar também os microrganismos do ambiente, e dentre os quais estão os *Bacillus*, os quais apresentam vantagens como o curto tempo de geração e por ser bom “hospedeiro” para expressão de genes heterólogos. Estas bactérias podem crescer facilmente até alcançar uma alta densidade celular, utilizando fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, além de serem capazes de secretar grande quantidade de enzimas (LAW et al., 2003).

### 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral a seleção de uma linhagem bacteriana (*Bacillus*) capaz de produzir polihidroxialcanoatos (PHA) a partir de resíduo do processamento de mandioca.

Os objetivos específicos foram:

- selecionar dentre isolados ambientais de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* (disponíveis na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade do Vale do Itajaí - UNIVALI) aqueles capazes de crescer em meio contendo amido, como única fonte de carbono;
- dentre os isolados amilolíticos, avaliar a produção de biomassa a partir de substrato amiláceo;
- selecionar os isolados que produzem naturalmente PHA usando o substrato amiláceo como única fonte de carbono;
- avaliar as bactérias selecionadas quanto à produção de PHA em substrato amiláceo, comparativamente à produção a partir de glicose;
- caracterizar os polímeros produzidos, quanto à composição;
- caracterizar molecularmente os microrganismos selecionados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Polihidroxialcanoatos

##### 3.1.1. Histórico

Lemoigne, no Instituto Pasteur, em 1925, foi o primeiro pesquisador a descrever o bioplástico, identificado como poli(3-hidroxi-butilato), sendo então marcada a descoberta do PHB, extraído de *Bacillus megaterium*. Esta primeira observação foi praticamente esquecida até meados da década de 70, quando, devido à crise do petróleo, foi criado um movimento científico que visava descobrir fontes alternativas de combustíveis, e, com isso, colocou-se em destaque o tema (LUENGO et al., 2003). Em 1973, foram iniciados os estudos de análise do controle metabólico, e em 1974 Wallen e Rohwedder identificaram outros monômeros além do ácido 3-hidroxi-butírico, como poli(3-hidroxi-valerato) em águas residuárias (ANDERSON e DAWES, 1990).

Em 1976, a empresa Imperial Chemical Industries iniciou a avaliação do PHB, objetivando sua produção e comercialização, porém os primeiros resultados demonstraram que era um material de dureza elevada e quebradiço. Assim, em 1980, foi depositada a patente descrevendo o processo de produção Biopol® (copolímero PHBV), a partir da bactéria *Cupriavidus necator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*). E em 1990, foi lançado o primeiro produto comercial baseado em PHAs; era um frasco de shampoo da Wella, na Alemanha (BYROM, 1992; BRAUNEGG et al., 1998). Entre 1982 e 1988, as empresas Chemie Linz e Petroquímica Danúbia produziram PHB a partir de sacarose, e em 1991 iniciou-se a produção piloto de 2 toneladas/ano (BIOMER, 2009).

Em 1992, teve início no Brasil o desenvolvimento de tecnologia para produção de bioplásticos empregando matéria-prima de baixo custo, como a cana-de-açúcar, por meio da parceria entre COPERSUCAR, Instituto de Pesquisas Tecnológicas e Universidade de São Paulo (VASCONCELOS, 2002). Em 1996, a empresa Monsanto adquiriu o processo de produção do BIOPOL®, focando suas investigações em culturas geneticamente modificadas, e, em 2001, o processo BIOPOL® foi vendido para a US Biotechnology Company Metabolix, empresa que comercializa e investe em pesquisas para

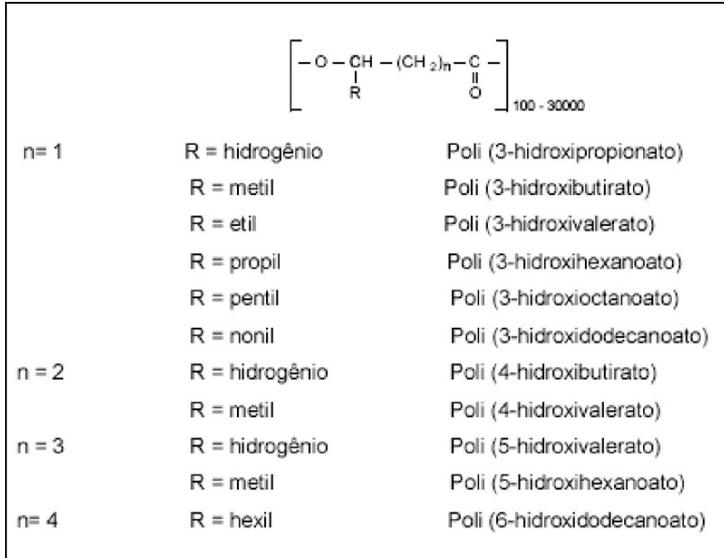
produção de bioplástico a partir de fontes renováveis de carbono (METABOLIX, 2009).

Em 2000, a empresa brasileira PHB Industrial S.A. começou a produção em maior escala do bioplástico, denominado BioCycle®, o qual é produzido a partir de sacarose extraída da cana-de-açúcar. Os estudos de fermentação para a produção de polímero iniciaram-se em 1992, e em 1995 foi implantada uma planta piloto para testar a rota de produção desenvolvida em laboratório, com capacidade de 5 toneladas/ano. Já em 2000, a estrutura foi adequada para produção de 50 toneladas/ano, e a próxima etapa da empresa é o desenvolvimento e implantação de uma planta comercial de produção com capacidade de 30.000 toneladas/ano (PHB INDUSTRIAL, 2009).

### 3.1.2. Características e propriedades

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros acumulados intracelularmente por microrganismos em forma de grânulos, os quais constituem reserva de carbono e energia para estas células; usualmente, são sintetizados mediante limitação de um nutriente essencial ao crescimento bacteriano, como nitrogênio, fósforo e/ou oxigênio, e o excesso de carbono no meio onde o microrganismo se desenvolve. Estes polímeros possuem propriedades similares a vários termoplásticos sintéticos, como o polipropileno, podendo, desta forma, substituí-lo, além do que são completamente degradados à água e dióxido de carbono, sob condições aeróbias, e a metano sob condições anaeróbias, por microrganismos presentes no solo, mar, lagos e esgoto (LEE et al., 1999; REDDY et al., 2003; STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998).

Os PHAs são poliésteres compostos por monômeros de ácidos 3-hidroxialcanóicos. A Figura 1 apresenta a estrutura química geral de unidade monomérica de PHA, sendo os diferentes polímeros e copolímeros representados pelos diferentes tipos de radical R e número de “n”.



**Figura 1.** Estrutura geral dos polihidroxi alcanoatos (LEE, 1996a).

O radical R pode variar de um único átomo de H até tridecila ( $C_{13}$ ), podem conter insaturações, grupos aromáticos ou ainda ligações a elementos como flúor, cloro e cromo. Os PHAs possuem cadeias lineares, sendo que a polimerização acontece devido à ligação entre o grupamento carboxila de um monômero e o grupamento hidroxila de outro monômero, formando, então, o poliéster (MADISON e HUISMAN, 1999; LUENGO et al., 2003).

Os PHAs são polímeros que apresentam  $10^3$  a  $10^4$  monômeros, acumulados na forma de inclusões, com diâmetro variando entre 0,2 e 0,7  $\mu\text{m}$ , as quais são sintetizadas e armazenadas por bactérias gram-positivas e gram-negativas (MADISON e HUISMAN, 1999). Os grânulos acumulados pelas bactérias são envoltos por uma camada fosfolipídica, por polimerases, depolimerases e proteínas citosólicas não específicas. Embora a função da monocamada fosfolipídica ainda não esteja clara, supõe-se que ela seja necessária para evitar o contato dos PHAs com a água, evitando assim a formação de grânulos com uma forma cristalina mais estável, o que impediria a sua degradação posterior pelas depolimerases (LUENGO et al., 2003). As depolimerases são responsáveis pela degradação do polímero para a sua utilização como fonte de energia, e, após extraído com solventes orgânicos, o polímero

se torna altamente cristalino, e então as depolimerases ficam inativas (YOO et al., 1997; STUBBE et al., 2005).

PHAs são divididos em três grupos de acordo com o comprimento da cadeia da unidade monomérica principal: i) polihidroxialcanoatos de cadeia curta (PHA<sub>SCL</sub> – short chain length PHA), unidades monoméricas contendo de 3 a 5 átomos de carbono; ii) polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA<sub>MCL</sub> – medium chain length PHA), contendo de 6 a 14 átomos de carbono; iii) polihidroxialcanoatos de cadeia longa (PHA<sub>LCL</sub> – long chain length PHA), com mais de 14 átomos de carbono. PHA<sub>MCL</sub> possuem características próximas dos termoplásticos, enquanto que as características dos PHA<sub>SCL</sub> aproximam-se às dos polímeros termofixos (TIMM e STEINBÜCHEL, 1990; MADISON e HUISMAN, 1999).

As diferenças entre os polímeros dependem da bactéria utilizada, dos substratos e suplementos fornecidos e das condições de cultivo, o que explica uma grande variedade de poliésteres que pode ser sintetizada com diferentes composições poliméricas. Mais de 150 diferentes tipos de ácidos hidroxialcanóicos (HAs), naturais e sintéticos, foram caracterizados como constituintes dos PHAs. Desta forma, a variação do comprimento, da composição e a habilidade de modificar os substituintes da cadeia lateral são a base para a diversidade de PHAs existentes, permitindo uma extensa gama de aplicações. No entanto, poucos PHAs são produzidos em quantidades suficientes para caracterização e desenvolvimento de aplicações (LEE, 1996a; REHM, 2003; STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003; GURIEFF e LANT, 2007).

O primeiro PHA descrito, sendo o mais estudado e melhor caracterizado, é o poli(3-hidroxibutirato) [P(3HB) ou PHB]. O homopolímero PHB é um poliéster largamente encontrado devido ao grande número de bactérias, tanto gram positivas bem como gram negativas, produtoras deste polímero, o qual pode ser produzido a partir de fontes simples de carbono, como sacarose, glicose e frutose. Entretanto, o PHB é um material rígido e quebradiço. Por isso, várias pesquisas concentram-se em estabelecer condições ótimas e de baixo custo para a produção de copolímeros, como P[3HB-*co*-3HV] - poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato). O P[3HB-*co*-3HV] é um copolímero que apresenta, além das unidades de HB, unidades repetidas de 3HV. A introdução de unidades de HV reduz a dureza, cristalinidade e o ponto de fusão do copolímero, comparativamente ao homopolímero, o que lhe confere aumento da flexibilidade e elasticidade (LEE et al., 1999; DU et al., 2001; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

As propriedades dos PHAs estão diretamente relacionadas à composição química, à estrutura e peso molecular do polímero, e estas propriedades ao tipo de microrganismo produtor, bem como ao substrato carbônico fornecido e às condições de cultivo. Alguns destes aspectos serão tratados mais adiante, neste trabalho.

Os PHAs são termoplásticos que apresentam alto grau de polimerização, são altamente cristalinos, opticamente ativos e insolúveis em água, o que lhes confere propriedades plásticas que se comparam às dos plásticos derivados do petróleo. Suas propriedades físicas estão associadas ao tamanho das cadeias laterais do monômero, sendo que PHASCL são frequentemente rígidos e quebradiços, enquanto PHAMCL são elastoméricos (REDDY et al., 2003; SOLAIMAN et al., 2008). A massa molecular dos PHAs pode variar de 50 a 1000 kDa (MADISON e HUISMAN, 1999).

Considerando o PHB, este possui propriedades mecânicas desejáveis, tais como elevada cristalinidade (55–80%), resistência à mistura, resistência à água, pureza óptica, boa estabilidade à radiação ultravioleta, barreira à permeabilidade de gases, biocompatibilidade, alta regularidade da cadeia carbônica e elevada massa molecular. Entretanto, é um material quebradiço devido a sua baixa estabilidade térmica e por ser um material rígido. Por isso, os processos de produção de copolímeros têm sido de grande interesse. Os copolímeros mais estudados têm sido os que possuem unidades como 3-hidroxiбутirato e 3-hidroxi valerato (PHBV), 3-hidroxiбутirato e 3-hidroxi hexanoato (PHBHHx) e 3-hidroxi бутirato e 4-hidroxi бутirato [P(3HB-co-4HB)]. Estes copolímeros apresentam biodegradabilidade e biocompatibilidade, possuindo propriedades mecânicas melhores do que as do PHB, como pode ser observado na Tabela 1, em que o copolímero torna-se mais flexível e resistente com a incorporação de 3HV (LEE, 1996a; MADISON e HUISMAN, 1999; SUDESH et al., 2000; OJUMU et al., 2004).

A introdução de unidades de ácido 3-hidroxi alérico (3HV) e 4-hidroxi бутírico (4HB) ao P(3HB) torna o copolímero mais flexível, moldável e menos cristalino, possuindo menor ponto de fusão e maior processabilidade do que o P(3HB) (MADISON e HUISMAN, 1999).

**Tabela 1.** Comparação das propriedades físicas de alguns polihidroxialcanoatos e do polipropileno .

<b>Polímeros</b>	<b>Temp. fusão (°C)</b>	<b>Temp. transição vítrea (°C)</b>	<b>Cristalinidade (%)</b>	<b>Alongamento (%)</b>
<b>P(3HB)</b>	177	2	70	5
<b>P(3HB-co-3HV) 80% HB/20% HV</b>	145	-1	56	50
<b>P(3HB-co-4HB) 84% 3HB/16% 4HB</b>	150	-7	45	444
<b>Polipropileno</b>	176	-10	60	400

Fonte: Madison e Huisman, 1999

O ponto de fusão do P(3HB), 177°C, indica baixa estabilidade, pois o polímero se decompõe a aproximadamente 200°C, temperatura próxima à sua temperatura de fusão (SUDESH et al., 2000).

A temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) está associada à região amorfa dos polímeros e representa a temperatura em que a mobilidade das cadeias moleculares se torna restrita pela coesão intermolecular. Em temperaturas acima de T<sub>g</sub>, as cadeias poliméricas podem adquirir suficiente mobilidade para dar início ao processo de cristalização. Abaixo de T<sub>g</sub>, o material não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra, assim desaparece a mobilidade das cadeias macromoleculares e o material torna-se rígido. Portanto, os polímeros elastoméricos são aqueles com T<sub>g</sub> abaixo da temperatura ambiente (CANEVAROLO, 2002; SOUZA et al., 2004). A incorporação de unidades de valerato ao copolímero diminui a temperatura de transição vítrea, permitindo um maior deslocamento das cadeias a temperaturas mais baixas, tornando o material mais flexível.

O aumento da cristalinidade está associado a um maior aumento da organização das cadeias dos polímeros, ocasionando aumento de propriedades de densidade, rigidez, estabilidade dimensional, resistência química e resistência à abrasão. A cristalinidade é dependente de

características como peso molecular, em que cadeias de baixo peso molecular favorecem uma maior cristalinidade; polímeros capazes de formar ligações intermoleculares distribuídas ao longo da cadeia favorecem um maior grau de cristalinidade; homopolímeros possuem maiores condições de formar uma estrutura mais cristalina do que copolímeros randômicos, já que os copolímeros possuem uma distribuição não uniforme de forças intermoleculares (MARQUES et al., 2002).

O alongamento dos polímeros se refere à sua flexibilidade, desta forma, quanto menor a porcentagem de alongamento, mais quebradiço é o material, apresentando baixa resistência à tração. Nota-se um alongamento baixo do polímero P(3HB), o que é aumentado com a formação de copolímeros, chegando-se próximo às características do polipropileno quando há a incorporação de unidades de ácido 4-hidroxibutírico (4HB) (MADISON e HUISMAN, 1999).

### 3.1.3. Microrganismos produtores

Como citado anteriormente, uma grande variedade de microrganismos é capaz de produzir e acumular PHAs intracelularmente. Produzem PHAs tanto bactérias gram positivas quanto gram negativas presentes no solo, água e efluentes. No entanto, a produção de PHAs só se torna economicamente viável quando ocorre em quantidades suficientes para caracterização e desenvolvimento de suas aplicações (ANDERSON e DAWES, 1990; GURIEFF e LANT, 2007).

A produção industrial de polihidroxialcanoatos requer a utilização de bactérias que tenham elevada velocidade específica de crescimento, que possam ser cultivadas utilizando substratos de baixo custo e que acumulem alta concentração de polímeros em um período relativamente curto de tempo. Desta forma, o microrganismo deve acumular pelo menos 50% de sua massa celular em polímero (RAMSAY, 1994).

Os microrganismos produtores de PHAs são divididos em dois grupos, baseados nas condições de cultura: os dependentes e os não dependentes de limitação de nutrientes para a indução da produção do polímero. Em ambos os grupos, excesso de carbono é necessário. A grande maioria dos microrganismos estudados pertence ao grupo dependente de limitação de nutriente (p.e. nitrogênio, fósforo, oxigênio,

enxofre) para acúmulo de PHA, sendo exemplos destes *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* e *Chromobacterium violaceum*. Pertencentes ao outro grupo, citam-se *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante, os quais acumulam polímeros durante o seu crescimento, não necessitando de limitação nutricional (LEE, 1996b).

Dos microrganismos estudados, capazes de sintetizar biopolímeros, apenas alguns, atualmente, são considerados potenciais para a produção em escala industrial, como *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, *Pseudomonas oleovorans* e linhagens recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes* (LEE, 1996b).

Na Tabela 2 são apresentados alguns microrganismos, a quantidade de PHA acumulada por eles, dependendo da fonte de carbono, e sua composição química.

**Tabela 2.** Acúmulo de PHA por alguns microrganismos, sua fonte de carbono e a composição do polímero.

Microrganismo	Fonte de Carbono	PHA	Conteúdo de PHA (%)
<i>Alcaligenes latus</i>	Sacarose	P(3HB)	50
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Glicose	P(3HB)	79,8
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Ácido valérico	P(3HV)	62
<i>Cupriavidus necator</i>	Glicose	P(3HB)	76
	CO <sub>2</sub>	P(3HB)	67,8
	Hidrolisado de mandioca	P(3HB)	57,5
	Glicose+ácido propiônico	P(3HB)- co- P(3HV)	74
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	n-Octanoato	P(3HO)	65
	n-Octanoato	P(3HHx)- co-(3HO)	25
<i>Escherichia coli</i> recombinante	Glicose	P(3HB)	80,1
<i>Klebsiella aerogenes</i> recombinante	Melaço	P(3HB)	65

Fonte: Adaptado de LEE, 1996b.

*Cupriavidus necator* tem sido o microrganismo mais estudado e utilizado na produção industrial de PHA, já que apresenta elevados valores de rendimento e velocidade de produção. Além disso, *C. necator* cresce bem em meios mínimos, em várias fontes renováveis de carbono, e acumula até 80% de seu peso seco em polímero. Industrialmente, *C. necator* é amplamente utilizado para produção de PHA, em especial P[3HB-co-3HV], em que é adicionado ao meio, durante a fase de acúmulo, ácido propiônico, e a proporção de valerato incorporada é dependente da razão de alimentação ácido propiônico/açúcar (ANDERSON e DAWES, 1990; BYROM, 1992; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Outra bactéria de destaque é a *Azotobacter*, que foi o primeiro microrganismo a ser utilizado na síntese industrial de P(3HB), a partir de sacarose e glicose, porém foi descartado pelo fato de produzir paralelamente um polissacarídeo, dificultando o controle do processo e a extração do polímero (BYROM, 1987).

Já *Alcaligenes latus* é um microrganismo capaz de sintetizar PHA durante a sua fase de crescimento, o que o torna interessante; no entanto, quando existe alguma limitação de nutriente, esta produção é aumentada. Uma desvantagem é a sua sensibilidade aos precursores utilizados na produção de copolímeros (CHOI e LEE, 1999a; RAMSAY et al., 1990).

*Pseudomonas oleovorans* é capaz de sintetizar tanto PHAs de cadeia média (PHAMCL) quanto de cadeia longa (PHALCL), acumulando uma quantidade elevada de polímeros. As PHA sintases deste microrganismo apresentam especificidade por hidroxiaxil-CoA de cadeia média, e estes substratos podem ser produzidos a partir da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (LEE, 1996a; COLIN et al., 2008).

Um microrganismo que também desperta grande interesse devido ao seu potencial biotecnológico é *Chromobacterium violaceum*, em especial no Brasil, onde foi realizado o sequenciamento do seu genoma, por um consórcio de laboratórios. Destaca-se também por ser capaz de sintetizar o homopolímero de 3-hidroxivalerato (polihidroxivalerato ou PHV), quando cultivado na presença de valerato como única fonte de carbono, e concentrações limitantes de nitrogênio, bem como produz outros tipos de PHAs (STEINBÜCHEL et al., 1993; BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

Outro microrganismo também com grande potencial é *Escherichia coli* recombinante, bactéria que tem seu genoma e fisiologia bem caracterizados, o que facilita sua manipulação genética e

desenvolvimento de estratégias de engenharia metabólica. Existem trabalhos com *E. coli* recombinante contendo genes para a biossíntese de PHA de *C. necator*, sendo capaz de acumular alto conteúdo de polímero, sem necessidade de limitação nutricional, durante seu crescimento (LEE, 1996a; LI et al., 2007; FONSECA, 2003).

### 3.1.3.1. *Bacillus*

Dentre os microrganismos produtores de PHA, existem também os *Bacillus*, encontrados comumente no ambiente, porém, diante da variedade de espécies existentes, ainda são pouco explorados. *Bacillus* apresentam características desejáveis para a produção de PHA, como o curto tempo de geração, crescem facilmente até alcançar uma alta densidade celular, utilizam fontes de carbono e nitrogênio de baixo custo, são capazes de secretar grande quantidade de enzimas, e são bons “hospedeiros” para expressão de genes heterólogos (LAW et al., 2003).

Membros do gênero *Bacillus*, assim como vários outros microrganismos produtores de PHA, produzem também copolímeros contendo unidades de 3HB e 3HV, quando cultivadas em substratos como ácido propiônico. Na Tabela 3 são apresentadas algumas espécies de *Bacillus* estudadas quanto à sua capacidade de acumular PHA.

A síntese de PHB por *Bacillus cereus* linhagem T inicia-se após o término da fase logarítmica, atingindo o acúmulo máximo até a formação do esporo, e ocorre degradação durante o processo de esporulação (VALAPPIL et al., 2007b). Já em *B. megaterium*, durante a fase estacionária, os grânulos de polímeros decaem em tamanho e número por célula (MCCOOL et al., 1996). Slepecky e Law (1961) verificaram as condições e a relação entre a produção de polímero e a formação de esporos em duas linhagens da bactéria *B. megaterium*, sendo uma formadora de esporo e outra que não esporula (*B. megaterium* KM). Quando a linhagem que esporula é cultivada em meio que favorece a formação de polímero, não há praticamente formação de esporo, e a produção e utilização do polímero seguem a cinética similar da linhagem que não forma esporos, porém com rendimento menor. Em meio favorável à formação de esporos, menor quantidade de polímero é produzida e uma rápida utilização deste polímero precede a esporulação.

**Tabela 3.** Acúmulo de PHA por alguns *Bacillus*.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Unidades Monoméricas</b>	<b>Conteúdo de PHA (%)</b>
<i>Bacillus sp.</i> JMa5	Melaço	3HB	35
<i>B. circulans</i>	Acetato	3HB	43,7
DSM1529	Ácido propiônico	3HB, 3HV	6,8
<i>B. sphaericus</i>	Sacarose	3HB	30,2
<i>B. brevis</i>	Sacarose	3HB	32,1
<i>B. licheniformis</i>	Acetato	3HB	25,8
DSM394	Ácido propiônico	3HB, 3HV	6,2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Acetato	3HB	17,0
DSM7	Ácido propiônico	3HB, 3HV	5,1
<i>B. laterosporus</i>	Acetato	3HB	29,5
DSM335	Ácido propiônico	3HB, 3HV	5,0
<i>B. macerans</i>	Acetato	3HB	40,5
DSM7068	Ácido propiônico	3HB, 3HV	4,7
<i>B. subtilis</i> DSM10	Acetato	3HB	33,5
	Ácido valérico	3HB, 3HV	6,6
<i>B. thuringiensis</i>	Acetato	3HB	47,6
DSM2046	Ácido propiônico	3HB, 3HV	7,2
<i>B. mycoides</i>	Acetato	3HB	44,7
DSM2048	Ácido propiônico	3HB, 3HV	7,5
<i>B. mycoides</i>	Sacarose	3HB	69,4
RLJB107			
<i>B. megaterium</i>	Acetato	3HB	47,2
DSM90	Ácido propiônico	3HB, 3HV	8,2
<i>B. cereus</i> DSM31	Acetato	3HB	41,4
	Ácido propiônico	3HB, 3HV	7,3
<i>B. cereus</i>	Hexanoato	3HB, 3HHx	2,2
ATCC14579			

Fonte: Adaptado de VALAPPIL et al., 2007a.

Informações genéticas de *B. megaterium* têm sido utilizadas para o desenvolvimento de uma linhagem capaz de autorromper-se, em resposta à exaustão de substrato, durante a produção de PHB (HORI et al., 2002). Além disso, genes de *B. megaterium*, para a produção de PHB, estão sendo inseridos com sucesso em *B. subtilis* (LAW et al., 2003).

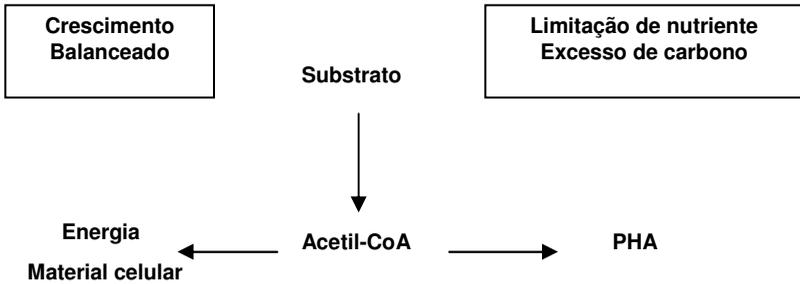
Sabe-se que um dos fatores limitantes para a comercialização de PHA é o custo do substrato para sua produção, por isso é possível observar inúmeras pesquisas com a utilização de substratos de baixo custo, como é o caso do uso de melão de cana para a produção de P(3HB) por *B. megaterium*, apresentando um rendimento de 46,2% de P(3HB) sobre o peso seco da biomassa (GOUDA et al., 2001).

Omar e colaboradores (2001) cultivaram *B. megaterium* utilizando como fonte de carbono xarope de tâmaras e melão de beterraba, e obtiveram um acúmulo de 52% e 50%, respectivamente. Além disso, verificaram que o acúmulo de P(3HB) neste microrganismo está associado ao crescimento celular.

Já *Bacillus sp.* JMa5 cultivado em melão acumulou 35% de P(3HB) sobre o peso seco (WU et al., 2001). Borah e colaboradores (2002) estudaram a influência das condições nutricionais e do ambiente para o acúmulo de P(3HB) em *B. mycoides*, o que indicou que sacarose, extrato de carne e sulfato de amônio são elementos importantes para o crescimento e acúmulo de polímero, obtendo rendimento de 69,4% de P(3HB) sobre o peso seco da biomassa. *B. cereus* acumulou 40,3% de polímero (75% de 3HB e 25% de 4HB) quando crescido em meio com frutose (VALAPPIL et al., 2007c).

### 3.1.4. Biossíntese

O metabolismo dos microrganismos é direcionado, principalmente, de acordo com o meio em que são cultivados. Considerando um crescimento balanceado, o microrganismo utilizará o substrato como fonte de energia e/ou para manutenção/formação de material celular; já quando existe limitação de nutriente essencial e excesso de carbono no meio, o substrato carbônico é utilizado para formação de biopolímeros, estocados como reserva de energia para a célula (Figura 2).



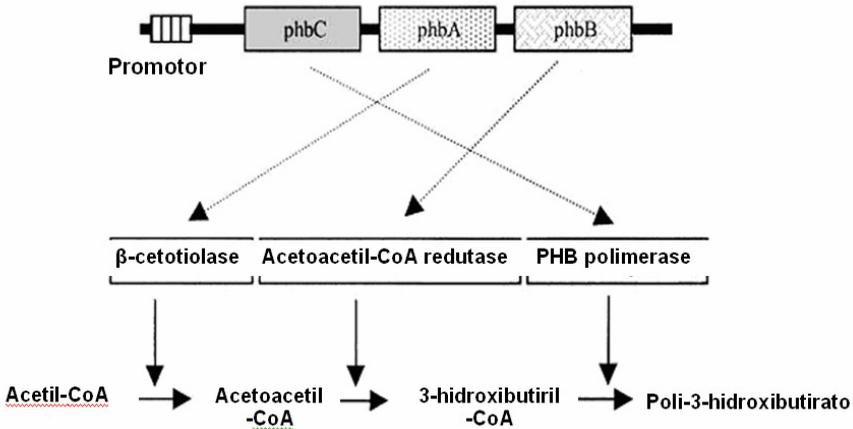
**Figura 2.** Metabolismo em crescimento balanceado e em condição de limitação de nutriente e excesso de carbono (Adaptado de BYROM, 1987).

A via de biossíntese de P(3HB) consiste em três reações catalisadas enzimaticamente (Figura 3). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil coenzima-A (acetil-CoA) em acetoacetil-CoA, catalisada pela enzima  $\beta$ -cetotiolase (codificada pelo gene *phbA*). A segunda reação é a redução de acetoacetil-CoA para hidroxibutiril-CoA, catalisada por uma enzima NADPH-dependente: acetoacetil-CoA redutase (codificada pelo gene *phbB*). E finalmente, monômeros de hidroxibutiril-CoA são polimerizados em P(3HB) pela PHB polimerase, codificada pelo gene *phbC* (REDDY et al., 2003).

O mecanismo de ação da enzima  $\beta$ -cetotiolase envolve duas reações parciais, em que dois resíduos de cisteína fazem parte do sítio ativo da enzima e são responsáveis pela ligação da primeira molécula de acetil-CoA à enzima e pela ativação de uma segunda molécula de acetil-CoA, ocorrendo a condensação e formação de acetoacetil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999). A enzima acetoacetil-CoA redutase catalisa a redução de acetil-CoA para D(-)3-hidroxiacil-CoA, e, apesar de existirem dois tipos, apenas aquela que é dependente de NADPH é envolvida na síntese de polímero, pois ela é ativa somente com substratos de cadeia C<sub>4</sub> a C<sub>6</sub> D(-)3-hidroxiacil-CoA (STEINBÜCHEL et al, 1993).

A PHB polimerase é considerada a enzima chave para o acúmulo de P(3HB), pois catalisa o passo principal da via, a polimerização de unidades D(-)-3-hidroxiacil-CoA, formando o polímero. As PHB polimerases são classificadas em 4 tipos de acordo com a especificidade ao substrato e a composição das subunidades

enzimáticas. Na Tabela 4 são apresentadas as diferentes PHB polimerase.



**Figura 3.** Via de biossíntese de poli(3-hidroxi-butarato) (MADISON e HUISMAN, 1999).

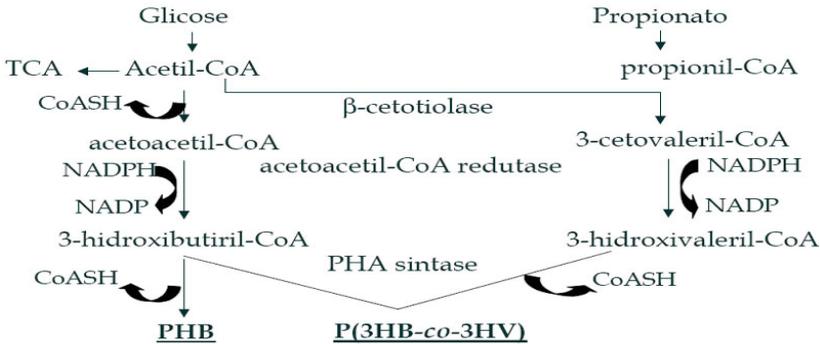
Grande parte dos microrganismos utiliza a via descrita anteriormente (Figura 3) para síntese de P(3HB), no entanto alguns, como é o caso de *P. aeruginosa*, utilizam o metabolismo dos ácidos graxos para a síntese de PHAs, via  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos ou metabolismo *de novo* de ácidos graxos, a partir dos quais os hidroxialcanoatos intermediários são utilizados como substrato pela PHB polimerase (STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003).

Os genes de biossíntese de PHAs são arranjados em vários clusters em diferentes bactérias. Entretanto, apesar das sequências das enzimas serem bastante conservadas entre as espécies, o número de genes envolvidos e a disposição dos mesmos nos grupos de genes envolvidos diferem significativamente; por exemplo, em *C. necator* o grupo de genes codificantes das três enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB) formam um *operon* (como representado na Figura 3), porém em outros microrganismos podem estar dispersos pelo genoma, como em *C. violaceum*, em que os genes *phaC* (PHA sintase) e *phaA* ( $\beta$ -cetotiolase) pertencem a um *operon*, e o gene *phaB* (acetoacetil-CoA redutase) ocorre isoladamente no genoma (MADISON e HUISMAN, 1999; REHM e STEINBÜCHEL, 1999; KOLIBACHUK et al., 1999).

**Tabela 4.** Características dos diferentes tipos de PHB polimerase.

<b>Tipo de PHB polimerase</b>	<b>Subunidades</b>	<b>Substrato</b>	<b>Exemplos de microrganismos</b>	<b>Referência</b>
I	PhaC (61-73KDa)	Monômeros de cadeia curta (C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> )	<i>C. necator</i>	SLATER et al., 1988
II	PhaC (61-73KDa)	Monômeros de cadeia média (C <sub>6</sub> -C <sub>14</sub> )	<i>P. oleovorans</i> e <i>P. aeruginosa</i>	HUISMAN et al., 1991
III	PhaC (40KDa) PhaE (40KDa)	Monômeros de cadeia curta (C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> )	<i>Allochromatium vinosum</i> e <i>Thiocapsa violacae</i>	LIEBERGSELL et al., 2000
IV	PhaC (40KDa) PhaR (20KDa)	Monômeros de cadeia curta (C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub> )	<i>Bacillus megaterium</i>	MCCOOL e CANNON, 2001

A PHB polimerase (*phbC*) é capaz de incorporar diversos precursores de cadeia curta, como por exemplo, 3-hidroxiacetil-CoA, 3-hidroxiisovaleril-CoA, 3-hidroxiisobutiril-CoA, bem como 4-hidroxiacetil-CoA. Quando o tipo de substrato utilizado permite ao metabolismo a formação de 3-hidroxiisovaleril-CoA, tem-se a formação do copolímero PHBV (Figura 4). A fração de 3HB e 3HV no copolímero pode ser manipulada alterando a concentração de propionato ou de glicose no meio de cultura (LI et al., 2007).



**Figura 4.** Via de biossíntese de PHB e de PHBV a partir de glicose e propionato (DOI et al., 1990).

Em geral, a regulação do metabolismo de PHA ocorre com a ativação da expressão dos genes *phaABC*, devido a um sinal específico, como o esgotamento de nutrientes, levando à ativação da enzima PHA sintase e à inibição de enzimas das vias metabólicas que competem pelos intermediários da biossíntese do polímero (LUENGO et al., 2003).

Alta concentração de acetil-CoA é necessária para que ocorra a síntese de P(3HB), por outro lado, a alta concentração de coenzima (CoA) livre, liberada quando o acetil-CoA entra no Ciclo de Krebs (TCA), inibe a ação da 3-β-cetotiolase, inibindo a síntese do polímero. A síntese é estimulada também pela alta concentração de NADPH e pela alta razão NADPH/NADP, obtidas em condições de limitação de nutrientes (LEE e CHANG, 1995). A limitação nutricional de oxigênio aumenta a relação NADH/NAD<sup>+</sup> por não existir o aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, levando à formação de P(3HB). Sob limitação de nitrogênio, as células não produzem mais proteínas e ocorre acúmulo de ATP, provocando diminuição da fosforilação oxidativa e acúmulo das coenzimas reduzidas (NADH), que leva à formação de P(3HB), cuja via metabólica reoxida estas coenzimas (DAWES e SENIOR, 1973). Já o fosfato é um componente vital para muitas estruturas celulares como ácidos nucleicos e fosfolipídeos, além de estar envolvido na energética celular (ASENJO et al., 1995).

### 3.1.5. Biodegradabilidade

Microrganismos como bactérias e fungos estão envolvidos no processo de degradação tanto de bioplásticos como plásticos sintéticos. A biodegradação ocorre em diferentes condições do ambiente, de acordo com suas características, e cada microrganismo capaz de degradar materiais difere um do outro, devido às suas condições ótimas de crescimento no ambiente (LUCAS et al., 2008; SHAH et al., 2008).

O processo de biodegradação é dependente de diferentes fatores, tais como: características dos polímeros, tipo de microrganismo degradador, existência de algum pré-tratamento do polímero e condições ambientais. As características dos polímeros como mobilidade, cristalinidade, peso molecular, tipo dos grupos funcionais presentes na estrutura, e presença de aditivos afetam diretamente a degradação (ARTHAM e DOBLE, 2008; GU et al., 2003).

Vários microrganismos são hábeis para degradar PHAs por meio da produção de enzimas com atividades de PHA hidrolases e PHA depolimerases. A degradação enzimática do polímero é uma reação heterogênea que envolve duas etapas, a adsorção e a hidrólise. A etapa inicial consiste na adsorção da enzima à superfície do polímero, e a etapa subsequente consiste na hidrólise das cadeias poliméricas, realizada no sítio ativo das enzimas (SUDESH et al., 2000; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Em geral, um aumento no peso molecular resulta no declínio da biodegradabilidade do polímero pelos microrganismos. Polímeros com alto peso molecular resultam em diminuição da solubilidade, tornando-os desfavoráveis ao ataque microbiano, pois a bactéria deverá hidrolisar o polímero a oligômeros ou monômeros que serão assimilados através da membrana celular e, então, degradados por enzimas intracelulares. Durante a degradação, enzimas extracelulares produzidas pelos microrganismos primeiramente quebram os polímeros complexos formando moléculas menores, para que, então, possam ser transportados pela membrana semi-permeável, e utilizados como fonte de carbono e energia (DOI et al., 1990; GU et al., 2003).

Os grupos de microrganismos dominantes e as vias de degradação são frequentemente determinadas pelas condições do ambiente. Quando  $O_2$  está disponível, microrganismos aeróbios são os responsáveis pela degradação dos materiais, com formação de biomassa,  $CO_2$  e  $H_2O$  como produtos finais. Por outro lado, em condições anaeróbias, a degradação ocorrerá por conta dos microrganismos

anaeróbios, e os produtos serão biomassa, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O (BARLAZ et al., 1989).

Na tabela 5 é apresentado o tempo necessário para a degradação completa de um filme de 1mm de P[3HB-co-3HV] em diferentes ambientes.

**Tabela 5.** Biodegradação de um filme de P(3HB-co-3HV) (80% HB/20% HV).

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

Fonte: Luzier, 1992

### 3.1.6. Produção Industrial

Embora sejam apresentadas todas as vantagens de utilização dos bioplásticos, o acesso a estes ainda é muito restrito, especialmente devido ao seu elevado custo quando comparado aos plásticos convencionais, e a grande maioria dos consumidores não está disposta a pagar valores elevados em prol da biodegradabilidade e sustentabilidade dos produtos. Desta forma, é de extrema importância a redução dos custos de produção.

Os fatores que influenciam diretamente nos custos de produção são: uso de linhagens eficientes, a produtividade, a conversão de substrato em produto, o conteúdo total de polímero acumulado, a complexidade da tecnologia empregada, o capital investido na planta de produção, o processo de extração e o custo do substrato (CHOI e LEE, 1999b).

A produtividade é definida como a quantidade de PHA produzida por unidade de volume em uma unidade de tempo, e avaliações econômicas mostram que o aumento da produtividade provoca uma redução dos custos de capital fixo direto, mão-de-obra e equipamentos. Já o conteúdo de PHA acumulado afeta fortemente a eficiência do processo de recuperação, pois quanto maior o conteúdo de polímero,

menor é a quantidade utilizada do produto de digestão para separar os grânulos de PHA de células, além de que baixo conteúdo de PHA leva à grande quantidade de substrato desviado para outros materiais celulares e vias metabólicas (CHOI e LEE, 1999b).

Outro ponto importante para os custos de produção é a extração do polímero. Para a extração, é necessário um processo de quebra da célula e solubilização dos outros materiais celulares que não o PHA para obtenção de polímeros puros. A maioria dos processos de extração utiliza solventes orgânicos como clorofórmio, carbonato de propileno e dicloroetano, e, como são necessárias grandes quantidades destes solventes, tem-se um aumento do custo e geram-se danos ao meio ambiente. Pode-se também fazer uso de hipoclorito de sódio, no entanto ocorre degradação de P(3HB), podendo resultar em 50% de redução da massa molar, embora o uso de surfactantes reduza significativamente esta degradação (LEE, 1996a). Outros métodos envolvem o uso de enzimas, que, embora eficientes, resultam na elevação do custo (CHOI e LEE, 1999b).

É importante, ainda, a obtenção de linhagens altamente eficientes na conversão dos substratos no produto desejado, por isso são necessários estudos para exploração de microrganismos produtores de PHA, e estudos de bioquímica e biologia molecular para biossíntese do polímero, além da clonagem de genes de síntese de PHA, permitindo o desenvolvimento de bactérias recombinantes com capacidade superior de produção (KHANNA e SRIVASTAVA, 2005; KHARDENAVIS et al., 2007).

Provavelmente, o ponto mais crítico para o custo do processo de produção de polímeros é o custo do substrato utilizado, podendo atingir até 40% do custo total. Por isso, existem diversos estudos a fim de explorar e otimizar a produção de PHAs a partir de fontes renováveis de carbono de baixo custo (LEE et al., 1999).

Na Tabela 6 é apresentada uma comparação entre alguns substratos, o seu valor e o rendimento de P(3HB), indicando o impacto da escolha do substrato no custo final de produção do polímero.

Produtos como melão de cana e beterraba, soro de leite, óleos vegetais, hidrolisados de amido e bagaço de maçã são vistos como excelentes substratos pelo seu baixo custo, sendo, na maioria das vezes, resíduos de indústrias. Sua utilização como matéria-prima para outros processos contribui, então, com o meio ambiente. Entretanto, a utilização de tais substratos pode levar à diminuição do conteúdo de polímero acumulado e da produtividade, quando comparado à utilização

de carbono purificado. Este problema tem sido objeto de inúmeros estudos (LEE, 1996b).

**Tabela 6.** Efeito do custo do substrato e do rendimento de P(3HB) no custo de produção.

<b>Substrato</b>	<b>Valor do substrato (US\$/Kg)</b>	<b>Rendimento (g polímero/g substrato)</b>	<b>Custo de produção (US\$/Kg P(3HB))</b>
<b>Glicose</b>	0,493	0,381	1,30
<b>Sacarose</b>	0,290	0,40	0,72
<b>Metanol</b>	0,180	0,43	0,42
<b>Ácido acético</b>	0,595	0,38	1,56
<b>Etanol</b>	0,502	0,50	1,00
<b>Melaço de cana</b>	0,220	0,42	0,22
<b>Soro de queijo</b>	0,071	0,33	0,22
<b>Hidrolisado de hemicelulose</b>	0,069	0,20	0,34

Fonte: MADISON e HUISMAN, 1999

Dentre os substratos de baixo custo, pode-se destacar o resíduo amiláceo, que é uma fonte de carbono disponível em grandes quantidades, e que são os principais componentes da demanda bioquímica de oxigênio de efluentes de indústrias têxteis, fermentativas e de alimentos e bebidas (CEREDA e WOSIACKI, 2002). Alguns microrganismos não possuem a capacidade de assimilar o amido diretamente, por isso é necessária a hidrólise à glicose antes do processo fermentativo (KIM, 2000).

Dentre produtos amiláceos, a mandioca se destaca por ser de grande relevância econômica como principal fonte de carboidratos para milhões de pessoas, e o Brasil possui aproximadamente dois milhões de hectares, destacando-se como um dos maiores produtores mundiais, com produção de 23 milhões de toneladas de raízes frescas de mandioca. Concentram-se no país diversas empresas de processamento de mandioca, e conseqüentemente são geradas também grandes quantidade de resíduo durante o processo (CEREDA, 1997; VIEIRA, 2005).

Uma alternativa proposta também para a redução de custos para produção de biopolímeros é o uso de culturas mistas, como lodo ativado, permitindo reduzir gastos com esterilização, equipamentos, mecanismos de controle e fontes de carbono. Estes processos encontram-se em fase de otimização (PIJUAN et al., 2009, HARDING et al., 2007).

### 3.1.7. Aplicações

Inúmeras aplicações estão sendo descritas para os bioplásticos desde que foi lançado o primeiro produto industrial Biopol® pela Imperial Chemical Industries em 1980. Inicialmente eles eram utilizados para a manufatura de garrafas, fibras, filmes e diversos produtos de interesse agrícola e de embalagens. Atualmente existe uma expansão crescente do uso destes polímeros, visto que são biodegradáveis e biocompatíveis, não causando efeitos tóxicos no hospedeiro, o que os coloca em uma posição de vantagem em relação aos produtos sintéticos convencionais (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; LUENGO, 2003).

Filmes de PHA podem ser aplicados em papel ou papelão formando uma película impermeável, em substituição ao papelão com polietileno ou alumínio, e também como utensílios, produtos de higiene, frascos para cosméticos e copos (STEINBÜCHEL e FÜCHTENBUSCH, 1998; KHANNA e SRIVASTAVA, 2005).

Por serem polímeros biocompatíveis e não tóxicos, podendo ser facilmente absorvidos e metabolizados pelo organismo, os PHAs têm demonstrado uma larga aplicabilidade também na área médica, como matéria-prima para a fabricação de materiais utilizados em intervenções cirúrgicas e outros procedimentos, incluindo próteses ósseas, substratos para o desenvolvimento celular *in vitro* e *in vivo*, além de fios de sutura, reparo de cartilagem articular e material para reconstituição de vasos sanguíneos (HASIRCI et al., 2001; CHEN e WU, 2005). Recentemente, TephaFLEX®, uma sutura reabsorvível baseada no poli(4-hidroxibutirato), foi aprovada pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) para aplicações clínicas (LI et al., 2008).

Os PHAs podem atuar também como carreadores biodegradáveis para liberação gradual de diversos fármacos, medicamentos, hormônios, inseticidas e herbicidas. A utilização de PHAs para liberação gradual de antibióticos, por exemplo, é particularmente útil no controle de infecções e formação

de biofilmes que podem ocorrer em implantes de próteses (HASIRCI et al., 2001; REDDY et al., 2003).

É possível notar que o uso de embalagens de alimentos feitas com plásticos de origem petroquímica continua em ascensão, devido ao seu baixo custo e características desejáveis, como flexibilidade, barreira para O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, entre outras. No entanto, despertou-se a atenção para o fato de que estas embalagens não podem ser totalmente recicladas e/ou biodegradadas, além de que são facilmente contaminadas por microrganismos, por isso a reciclagem, muitas vezes, é impraticável e não é economicamente conveniente. Desta forma, o uso de plásticos biodegradáveis se torna a solução também para estes problemas (SIRACUSA et al., 2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Meios de cultura empregados

Para realização dos experimentos, foi utilizado, nos primeiros ensaios de seleção dos microrganismos, o meio M9 – Sais Mínimos (Sigma) (Tabela 7), apenas para avaliar o crescimento dos isolados em meio com amido (5g/L) e resíduo do processamento de mandioca (5g/L). Nos demais ensaios, foram utilizadas duas pré-culturas, uma em sequência da outra, sendo a primeira em meio Luria-Bertani (LB) (Tabela 8) e a segunda em meio descrito por Ramsay e colaboradores (1990), sem limitação de nutrientes, e com 20g/L de resíduo de mandioca, e este mesmo meio, agora limitado, foi utilizado como meio para os ensaios de produção de PHA. Na Tabela 9 é apresentada a constituição do meio descrito por Ramsay e colaboradores (1990).

**Tabela 7.** Elementos constituintes do meio M9 (g/L).

<b>Elementos</b>	<b>g/L</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	6,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
NaCl	0,5
NH <sub>4</sub> Cl	1,0

**Tabela 8.** Elementos constituintes do meio LB (g/L).

<b>Elementos</b>	<b>g/L</b>
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10

**Tabela 9.** Elementos constituintes do meio descrito por Ramsay e colaboradores (1990) (g/L).

<b>Meio sem limitação (pré-cultura):</b>	
<b>Elementos</b>	<b>g/L</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	6,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,01
Citrato de amônio ferroso	0,06
Elementos traços	1 mL
<b>Meio limitado:</b>	
<b>Elementos</b>	<b>g/L</b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	2,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,83g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,01
Citrato de amônio ferroso	0,06
Elementos traços	1 MI
<b>Elementos traços:</b>	
<b>Elementos</b>	<b>g/L</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,2
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,1
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,03
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,03
NiCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,02
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,01

#### 4.2. Coleção de microrganismos avaliada

Os microrganismos avaliados foram provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA) da Universidade do

Vale do Itajaí (UNIVALI), partindo-se de 72 isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* pertencentes a 21 espécies diferentes (Tabela 10). Os microrganismos foram identificados em Trabalhos de Conclusão de Curso da Graduação em Ciências Biológicas, sob orientação do prof. Marcus Adonai Castro da Silva.

**Tabela 10.** Microrganismos avaliados da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada/UNIVALI.

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
LAMA002	<i>Bacillus cereus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA032	<i>Bacillus cereus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA055	<i>Bacillus cereus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA100	<i>Bacillus cereus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA102	<i>Bacillus cereus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA113	<i>Bacillus cereus</i>	RIBEIRO, 2007
LAMA135	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA142	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA159	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA167	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA169	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA174	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA176	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA180	<i>Bacillus cereus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA258	<i>Bacillus cereus</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA260	<i>Bacillus cereus</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA091	<i>Bacillus ehimensis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA190	<i>Bacillus ehimensis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA031	<i>Bacillus firmus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA018	<i>Bacillus licheniformis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA020	<i>Bacillus licheniformis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA062	<i>Bacillus licheniformis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA084	<i>Bacillus licheniformis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA259	<i>Bacillus licheniformis</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA252	<i>Bacillus megaterium</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA075	<i>Bacillus mycoides</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA076	<i>Bacillus mycoides</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA157	<i>Bacillus mycoides</i> <i>/pseudomycoides</i>	PEREIRA, 2005

(Continuação Tabela 10)

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
LAMA054	<i>Bacillus racemilacticus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA083	<i>Bacillus racemilacticus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA086	<i>Bacillus racemilacticus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA092	<i>Bacillus racemilacticus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA090	<i>Bacillus simplex</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA156	<i>Bacillus smithii</i>	PEREIRA, 2005
LAMA023	<i>Bacillus subtilis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA095	<i>Bacillus megaterium</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA146	<i>Bacillus subtilis</i>	PEREIRA, 2005
LAMA148	<i>Bacillus thuringiensis</i>	PEREIRA, 2005
LAMA098	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA099	<i>Geobacillus kaustophilus</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA139	<i>Paenibacillus apiarius</i>	PEREIRA, 2005
LAMA149	<i>Paenibacillus apiarius</i>	PEREIRA, 2005
LAMA151	<i>Paenibacillus apiarius</i>	PEREIRA, 2005
LAMA181	<i>Paenibacillus borealis</i>	PEREIRA, 2005
LAMA186	<i>Paenibacillus borealis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA262	<i>Bacillus megaterium</i>	KITAMURA, 2007
LAMA272	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA273	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA274	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	KITAMURA, 2007
CARLOS 32	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA073	<i>Bacillus megaterium</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA094	<i>Paenibacillus koreensis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA097	<i>Paenibacillus koreensis</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA261	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA263	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA264	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA265	<i>Bacillus megaterium</i>	KITAMURA, 2007
LAMA266	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
CARLOS 10	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA268	<i>Paenibacillus macquarensis</i>	KITAMURA, 2007
LAMA051	<i>Paenibacillus pallidus</i>	WEINGARTNER, 2005
CARLOS 12	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KITAMURA, 2007
LAMA015	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	WEINGARTNER, 2005

(Continuação Tabela 10)

<b>Código</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
LAMA050	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA138	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	PEREIRA, 2005
LAMA184	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	WEINGARTNER, 2005
LAMA133	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA136	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA140	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	PEREIRA, 2005
LAMA254	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA255	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	OLIVEIRA, 2007
LAMA256	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	OLIVEIRA, 2007

Estes microrganismos foram isolados de amostras ambientais e classificados por meio de análises de suas características morfológicas, de crescimento e bioquímicas, utilizando-se os métodos descritos por Claus e Berkeley (1989). No total foram avaliadas 24 características sendo estas: coloração de gram, produção de catalase e citocromo oxidase, motilidade e diâmetro celular, morfologia e posição do esporo, distensão da célula durante a esporulação, produção de ácido a partir da glicose, frutose, manitol, maltose e xilose, utilização do citrato, produção de acetoina pelo teste de Voges-Proskauer, hidrólise do amido, da caseína, da uréia e da gelatina, crescimento em anaerobiose, a 20 °C e a 50 °C, e redução do nitrato. A Tabela A.1 dos Anexos apresenta os isolados e informações sobre onde foram coletados e a partir de qual amostra.

### **4.3. Seleção dos microrganismos degradadores de amido**

Inicialmente, todos os microrganismos foram repicados em meio M9 (Sais Mínimos) sólido, contendo 5g/L de amido solúvel puro, como única fonte de carbono. As placas foram incubadas a 37°C, por 48h, e os isolados avaliados quanto ao seu crescimento comparativamente, sendo classificados em (1) sem crescimento, (2) pouco crescimento e (3) bom crescimento.

Após 48h de cultivo, os microrganismos classificados com pouco e bom crescimento foram novamente plaqueados em meio agar-M9, tendo-se, agora, uma cultura nova, já que os microrganismos da coleção não haviam sido repicados rotineiramente. Os isolados foram incubados

a 37°C por 24h, e fez-se novamente uma análise comparativa de crescimento, selecionando aqueles com crescimento vigoroso.

Em seguida, procedeu-se o cultivo dos isolados selecionados em meio M9 com 5g/L de resíduo de processamento da mandioca, por 24h, analisando novamente seu crescimento, sendo selecionados, para os estudos de produção de biopolímeros, aqueles que cresceram bem neste resíduo.

#### ***4.4. Caracterização do resíduo empregado como fonte de carbono***

O resíduo utilizado como fonte de carbono para cultivo dos microrganismos foi cedido pela Indústria Corn Products do Brasil. Tratava-se de resíduo sólido do processamento de mandioca, de cor marrom, que foi batido em liquidificador por 10 minutos para cortá-lo em partes pequenas e facilitar a incorporação no meio de cultura. Para as análises de caracterização do resíduo, foi preparada uma solução pesando-se 2g de resíduo, adicionando-os a 100mL de água destilada, seguido de agitação.

#### **4.4.1. Métodos Analíticos**

##### **4.4.1.1. Determinação de açúcares redutores**

A determinação de açúcares presentes no resíduo foi realizada pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959), o qual se baseia na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico, pelo açúcar, a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de uma coloração avermelhada, a qual foi lida em espectrofotômetro CECIL CE1020 a 540nm. Para a determinação da concentração de açúcares, foi utilizada uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0 a 3g/L (Figura A.1 dos Anexos). Recolheu-se uma alíquota de 400 µl da solução com o resíduo (previamente diluído), à qual se adicionaram 400 µl de DNS, deixando em banho-maria, em ebulição, por 5 minutos. A amostra foi resfriada em banho de gelo e adicionada de 4mL de água destilada. Após 15 minutos para estabilização da temperatura, a amostra foi lida em espectrofotômetro a 540nm.

### **4.4.1.2. Determinação de açúcares redutores presentes em forma de amido**

A determinação de açúcares redutores presentes na amostra em forma de amido foi realizada por meio da hidrólise ácida do resíduo a 2% (p/v) (HCl 10%), na proporção 1:10 (ácido:solução de resíduo), com aquecimento a 100°C por 2,5h. Após resfriamento, filtrou-se, para retirada dos sólidos em suspensão. Posteriormente, foi realizada a determinação de açúcares liberados, através do método DNS (descrito anteriormente) (OLIVEIRA et al, 2007; DALCANTON, 2006).

### **4.4.1.3. Determinação de proteínas**

Foi utilizado o método de Peterson (1977) (Lowry modificado) para a determinação de proteínas do resíduo. Este método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm. São utilizados, então, dois reagentes: Reagente de Lowry (solução composta por cobre-tartarato-carbonato, detergente dodecil sulfato de sódio 10% e NaOH 1N) e Reagente de Folin-Ciocalteu. Foi utilizada uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) nas concentrações de 10 a 100µg/mL (Figura A.2 dos Anexos). Seguiu-se o seguinte procedimento: à alíquota de 100µl da solução com o resíduo (como preparada para a determinação de açúcares) foram adicionados 400µl do Reativo de Lowry. Após agitação, seguida de repouso, por 10 minutos, foram adicionados 200µl do Reagente de Folin, novamente agitada e deixada em repouso, por 20 minutos. Em seguida, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 750 nm.

### **4.4.1.4. Determinação de nitrogênio total**

A determinação de nitrogênio total do resíduo foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Koroleff (1976), utilizando-se kit comercial Spectroquant (Merck) – Nitrogen Total Cells Test, que consiste na oxidação de compostos nitrogenados orgânicos e inorgânicos em nitrato, pelo tratamento com um agente oxidante em um termoreator. Em solução acidificada com ácido sulfúrico e fosfórico, o nitrato formado reage com 2,6 dimetilfenol (DMP), produzindo 4-nitro-

2,6 dimetilfenol, que é determinado espectrofotometricamente. Para tanto, uma alíquota de 1 mL da solução do resíduo foi utilizada para o procedimento descrito no kit, em que a amostra foi oxidada em presença do agente oxidante quando incubada por 1h a 120°C, e, em seguida, após resfriada, foi adicionada a uma solução acidificada com ácido sulfúrico e fosfórico. Após agitação e 10 minutos em repouso, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro.

### ***4.5. Condições de cultivo para a produção, extração e caracterização dos PHAs produzidos***

Para os ensaios de produção de PHA, foram utilizadas duas pré-culturas, uma seguida da outra; os isolados foram cultivados primeiramente em 5 mL de meio LB por um período de 24h a 37°C, em agitador orbital Tecnal TE-420, com agitação de 150rpm. A segunda pré-cultura foi realizada em 50 mL de meio descrito por RAMSAY e colaboradores (1990), sem limitação de nutrientes, com 20g/L de resíduo, também por 24h. Em seguida, 10% (v/v) do pré-inóculo foi transferido para 300 mL de meio agora com limitação de nutriente e 20g/L de resíduo, e cultivados por 48h.

Para os ensaios de determinação e extração de PHA, em que foi utilizada massa celular seca, as culturas foram centrifugadas em tubos Falcon por 10 minutos a 1800g, em centrífuga Eppendorf 5810R, e congeladas em freezer. Posteriormente, foram colocadas em liofilizador Jouan LP3 por 5 horas e, em seguida, mantidas em freezer (-20°C) para posterior análise. Os testes para determinação do PHA produzido, por meio de metanólise e análise em cromatografia gasosa, foram realizados com três repetições de cultura para cada microrganismo, e as células liofilizadas foram misturadas em mesma proporção para se proceder a metanólise e posterior leitura em cromatógrafo gasoso, assim o resultado apresentado foi uma média das três culturas.

#### **4.5.1. Hidrólise do resíduo**

Partindo-se das metodologias propostas por Oliveira e colaboradores (2007), Dalcanton (2006) e Law e colaboradores (2003) para hidrólise ácida de resíduos amiláceos, foram criadas variações para avaliação do melhor método considerando a quantidade de açúcar

liberado, por meio do teste de DNS, quantidade de ácido (na proporção 1:10 - ácido:solução de resíduo) e de resíduo utilizadas. Foram testadas oito condições de hidrólise:

1. 15 minutos em autoclave (121°C) + solução de 10% HCl + 200g/L de resíduo
2. 30 minutos em autoclave (121°C) + solução de 10% HCl + 100g/L de resíduo
3. 30 minutos em autoclave (121°C) + solução de 10% HCl + 200g/L de resíduo
4. 30 minutos em autoclave (121°C) + solução de 10% HCl + 300g/L de resíduo
5. 30 minutos em autoclave (121°C) + solução de 5% HCl + 200g/L de resíduo
6. 30 minutos em autoclave (121°C) + solução de 15% HCl + 200g/L de resíduo
7. 30 minutos em banho-maria (100°C) + solução de 10% HCl + 200g/L de resíduo
8. 60 minutos em banho-maria (100°C) + solução de 10% HCl + 200g/L de resíduo

O resultado de quantidade de açúcar liberado em cada tratamento, e o tratamento escolhido estão apresentados em resultados e discussão.

### ***4.6. Métodos Analíticos***

#### **4.6.1. Determinação do índice enzimático**

Os microrganismos selecionados anteriormente como degradadores de amido e capazes de crescer no resíduo, foram inoculados em meio M9 com 5g/L de resíduo, em 4 pontos por placa, e cultivados a 37°C por 24h. Em seguida, as placas foram coradas com solução de iodo, evidenciando-se o amido no meio. Foram medidos os diâmetros da colônia e do halo de degradação do amido das quatro repetições, e calculado o índice enzimático por meio da razão entre a média do diâmetro do halo e da colônia. Desta forma, foi possível avaliar a capacidade dos microrganismos de degradar o amido presente no meio para sua utilização como fonte de carbono.

### 4.6.2. Determinação do crescimento bacteriano

Para determinação do crescimento bacteriano, tendo em vista a influência do resíduo, com sólidos suspensos, além de sua coloração amarronzada, foi realizado o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina). O teste do MTT é utilizado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, é reduzido, pela succinato desidrogenase, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan), que, quando dissolvido, adquire coloração violácea, avaliada por espectrofotometria (FRESHNEY, 2005).

Inicialmente foi realizado um teste preliminar para determinação de qual deveria ser a diluição das amostras para que fosse permitida a leitura, bem como o tempo de exposição ao MTT. Em seguida, os isolados foram cultivados como descrito no item 4.5. A cultura dos isolados foi diluída 1:6 com o meio sem limitação e sem resíduo em placa de 96 poços, adicionados a cada poço 10 $\mu$ l de MTT (5mg/mL diluído em tampão PBS), e incubada a 37°C por 1h. Foram adicionados 100 $\mu$ l de detergente SDS 10% em HCl 0,01N e incubado no escuro por 18h, para posterior leitura em espectrofotômetro (leitor de microplaca Tecan - GENios) em 540nm. Como amostra controle, foi feito o procedimento com apenas o meio de diluição e também com uma solução de resíduo sem células, diluída na mesma concentração com meio sem limitação. Os testes foram realizados com 6 repetições.

#### 4.6.2.1. Determinação do crescimento bacteriano em resíduo hidrolisado

Para hidrólise do resíduo, foi preparada uma solução de 200g/L de resíduo em água destilada, e em seguida foi realizado o procedimento para hidrólise ácida, em que foi utilizado HCl 10%, na proporção 1:10 (ácido:solução de resíduo), com aquecimento a 100°C por 2,5h. Após resfriamento, o pH foi ajustado com NaOH 1M, e filtrou-se para retirada dos sólidos em suspensão (OLIVEIRA et al, 2007; DALCANTON, 2006). Foi adicionado ao meio de cultura, 2% do resíduo hidrolisado (v/v), e determinado o crescimento dos microrganismos por meio da técnica de MTT.

### 4.6.3. Determinação de PHA

A porcentagem de acúmulo de PHA foi determinada por cromatografia gasosa conforme método descrito por Braunegg e colaboradores (1978), com modificações propostas por Brandl e colaboradores (1988).

Após cultivo em meio líquido (descrito no item 4.5), a cultura foi centrifugada e as células liofilizadas. Pesou-se aproximadamente 50 mg de massa celular seca em um microtubo e adicionou-se 1 mL de metanol acidificado ( $H_2SO_4$  15% e 85% de metanol) com ácido benzóico na concentração de 0,4 g/L, como padrão interno, e agitou-se, transferindo a mistura para um tubo de ensaio com tampa rosqueada. Ao tubo, adicionou-se 1 mL de clorofórmio e a suspensão foi aquecida a 100°C durante 3 horas, sendo que, após 1 hora de aquecimento, a mistura foi agitada durante alguns segundos e depois devolvida ao aquecimento. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionou-se 1 mL de água destilada, agitou-se vigorosamente e deixou-se decantar. A fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa.

A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando Cromatógrafo Gasoso CG90, equipado com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio). A coluna utilizada no cromatógrafo é de sílica fundida (0,53mm x 30m), modelo Supercowax-10. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio a 20 mL.min<sup>-1</sup> e as temperaturas de injeção, detecção e coluna foram, respectivamente, 90°C, 230°C e 110°C, e o volume injetado foi de 1 ul.

Como controle, foi submetido também à metanolização o padrão externo P[3HB] (PHB Industrial) com massa variando entre 5 e 25 mg. A curva padrão foi estabelecida através da relação das áreas de P(3HB)/padrão interno pela massa de polímero (Figura A.3 dos Anexos).

### 4.6.4. Análise dos Dados

Os dados obtidos foram comparados entre os isolados estudados por meio de análise de variância (ANOVA) e do teste de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o software Statística versão 6.0.

### **4.7. Avaliação da produção de PHA por microscopia de epifluorescência**

Os isolados foram avaliados quanto à produção de PHA utilizando-se o método proposto por Delegau e colaboradores (1995). Para isto, os isolados foram cultivados em 50 ml de meio líquido, com limitação de fósforo (RAMSAY et al, 1990), contendo 20g/L de glicose ou 20g/L de resíduo e o corante vermelho do Nilo (0,5µg/mL, dissolvido em dimetilsulfóxido – DMSO). Após 48h de cultivo, as células foram observadas sob microscópio de epifluorescência Olympus BX40, com fluorescência de excitação e emissão em 543 e 598nm, respectivamente, e aumento de 1000x. O corante vermelho do Nilo é capaz de marcar com fluorescência os grânulos de PHA.

### **4.8. Extração e Caracterização do PHA**

#### **4.8.1. Extração do PHA**

A extração foi realizada segundo o método desenvolvido por Shishatskaya e Volova (2004). Aproximadamente cinco gramas de biomassa seca, macerada e triturada, foram colocadas em um balão de fundo redondo com aproximadamente 250 ml de etanol 46% (v/v) contendo 0,7 g/L de KOH. A solução foi aquecida até o ponto de ebulição por aproximadamente 40 minutos em um condensador. Após resfriado, o sobrenadante foi removido por centrifugação (1800g por 10 minutos), e 250 ml de etanol 96% (v/v) foram adicionados ao precipitado para lavagem. A solução foi novamente centrifugada para retirada do líquido de lavagem. O precipitado foi transferido para um balão de fundo redondo, ao qual foram adicionados 250 ml de clorofórmio. A solução foi aquecida até o ponto de ebulição em um condensador por 40 minutos. Após resfriada à temperatura ambiente, a solução foi filtrada com algodão para retirada do material sólido. Ao filtrado foi acrescentado aproximadamente três vezes o seu volume de etanol 96% (v/v) e colocado em geladeira por 24 horas. A mistura foi filtrada, deixando o papel filtro secar durante dois dias. O polímero foi obtido por raspagem do papel filtro.

### 4.8.2. Caracterização do PHA

#### 4.8.2.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) permite analisar os compostos presentes na estrutura dos polímeros e a interação entre eles. Exceto para isômeros ópticos, não se conhecem compostos com um mesmo espectro (GRAF et al., 1987). A Espectroscopia por Reflexão Interna (FTIR-ATR) é utilizada devido à baixa transmissão (opacidade) dos biopolímeros. A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando equipamento Perkim Elmer no intervalo de 4.000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  pela técnica de reflectância difusa.

### 4.9. Caracterização molecular dos microrganismos isolados

#### 4.9.1. Extração de DNA

Os isolados selecionados foram cultivados em 5 mL de meio LB, por 24 horas. Foram recolhidas alíquotas de 4 mL do caldo de cultivo e centrifugadas por 2 minutos a 14000g, em centrífuga Eppendorf - mini spin. O precipitado foi ressuscitado em 500 $\mu\text{L}$  de TE (10mL de Tris-HCl 1M, pH 7,5; 2mL de EDTA 0,5M, pH 8; 1000mL de água destilada) e centrifugado novamente, por 2 minutos a 14000g. O precipitado foi novamente ressuscitado em 500 $\mu\text{L}$  de TE, ao qual foram adicionados 30 $\mu\text{L}$  de SDS 10%, aproximadamente 500mg de pérolas de vidro (2mm de diâmetro) e agitada em amalgamador Vibramat por 1 minuto, para o rompimento das células. A esta suspensão celular foram adicionados 500 $\mu\text{L}$  de fenol puro, e centrifugou-se a 14000g por 10 minutos. A fase aquosa foi coletada, adicionados 400 $\mu\text{L}$  de clorofane (25 fenol : 24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado a 14000g por 5 minutos. A fase aquosa foi coletada novamente, adicionados 400  $\mu\text{L}$  de clorofil (24 clorofórmio : 1 álcool isoamílico), homogeneizado e centrifugado por 5 minutos. A fase superior foi coletada, e 0,1 volume de NaCl (5M) e 0,6 volume de isopropanol foram adicionados, incubando-se à temperatura ambiente por 5 minutos. Esta solução foi centrifugada por 10 minutos. O

precipitado foi lavado com etanol 70% e seco a 37°C por 15 minutos. O DNA foi ressuspenso em 50 µL de água Milli-Q e a sua integridade foi verificada correndo 5 µL em gel de agarose (0,8%) (TEIXEIRA et al, 2007).

### 4.9.2. Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

Para realização do sequenciamento, o DNA extraído foi submetido à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação do segmento do gene 16S rRNA, utilizando-se um par de iniciadores descritos por Hiraishi (1992) (16S-F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG, e 16S-R: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA). A reação de PCR foi realizada em termociclador Eppendorf – Mastercycler Gradient, e constituiu-se de 50 µL contendo 1x tampão da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada iniciador, 2mM de cloreto de magnésio, 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen), 50ng de DNA genômico, sendo o volume final ajustado com água ultrapura. O programa utilizado para a reação de PCR foi de 94°C por 240s, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 50 °C por 30s e 72°C por 30s; por fim, extensão a 72°C por 360s.

### 4.9.3. Sequenciamento do DNA

Para caracterização molecular dos isolados e confirmação de suas espécies, os produtos de amplificação 16S rRNA foram sequenciados em empresa especializada Macrogen (Seoul, Coréia), utilizando-se protocolos padrão com corante terminador e sequenciador capilar (ABI3730XL, *Applied Biosystems*, CA). Para isso, os produtos de PCR foram clonados em plasmídeo utilizando o Kit *InsTAclone™ PCR Cloning* (Fermentas, MD), e o plasmídeo recombinante foi inserido em célula competente *E. coli* DH10B por choque elétrico (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). As células transformadas foram inoculadas em meio LB sólido suplementado de ampicilina (100µg/mL) e X-gal (0,02mg/mL 5-bromo-4-cloro-3-indolil b-D-galactopiranoside, Invitrogen - CA). Colônias brancas de clones transformados foram recuperadas e cultivadas em meio LB com ampicilina, a 37°C, 150rpm, por 20h, e o

vetor foi isolado por meio do Kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen, CA). O plasmídeo foi sequenciado utilizando-se os iniciadores universais M13 (M13-F: GCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA, e M13-R: GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG) e o iniciador interno 16S rRNA (GGATGACAGTACCTGAAGAATAAGCAC).

Para verificação das sequências, estas primeiramente foram avaliadas no programa ContigExpress (NTI Vector) para eliminação das regiões de baixa qualidade de sequenciamento. No site NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), foi utilizada a ferramenta VecScreen para identificar as regiões da sequência referentes ao vetor, a fim de eliminá-las. Por fim, a homologia das sequências de 16S rRNA foi determinada pela sua comparação com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI), pelo método BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990). A árvore filogenética foi construída utilizando o Programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1. Caracterização do resíduo

A produção de PHA por microrganismos depende das condições de cultivo e dos substratos e suplementos fornecidos. Grande parte dos microrganismos, dentre eles os *Bacillus*, necessitam de limitação de algum nutriente essencial assim como excesso de carbono no meio em que se desenvolvem, para que, então, haja regulação de seu metabolismo e inicie o processo de absorção de carbono e acúmulo do mesmo em forma de grânulos como reserva de energia (LEE, 1996a; LUENGO et al., 2003).

Como fonte de carbono para os microrganismos, foi utilizado neste trabalho o resíduo do processamento de mandioca produzido pela indústria Corn Products do Brasil.

Conhecidamente amiláceo, o resíduo do processamento de mandioca, utilizado no trabalho, foi primeiramente caracterizado, a partir de uma solução de 20g/L de resíduo, tendo em sua composição 16g/L de amido (80%), 1,31g/L de açúcares redutores (6,56%), 0,22g/L de proteínas totais (1,12%) e 0,07g/L de nitrogênio (0,36%).

Os elevados teores de amido e de açúcares redutores presentes neste resíduo são, a princípio, motivos de preocupação, caso se deseje descartá-lo. O amido, a principal fonte de carbono presente no resíduo, é constituído de amilose e amilopectina. Estes polissacarídeos, fontes de carbono ricos em energia, são facilmente metabolizados por microrganismos presentes no ambiente. Estes microrganismos são capazes de produzir e excretar enzimas amilolíticas que hidrolisam os polissacarídeos até suas unidades monoméricas, as quais são transportadas para o interior da célula microbiana e utilizadas para seus processos metabólicos de produção de energia e crescimento celular (PELCZAR et al., 1998). O descarte destes polissacarídeos em solos, ou ainda em corpos d'água, constitui-se um problema ambiental sério, uma vez que esta elevada concentração de matéria orgânica favorece o crescimento de microrganismos aeróbios que acabam por esgotar o oxigênio desses ambientes, levando à morte outros organismos que demandem oxigênio, causando desequilíbrio ambiental. Assim, dar a este resíduo, energeticamente rico, um destino que não seja o descarte no ambiente, e sim seu aproveitamento para a produção biotecnológica

de produtos de algum valor agregado, é de grande importância ambiental e econômica.

O elevado teor de matéria orgânica torna este material aplicável à produção biotecnológica de biocombustíveis ou ainda compostos de maior valor agregado, como é o caso dos biopolímeros. Particularmente neste estudo, foi testada sua aplicação como fonte de substrato carbônico para a produção de PHAs.

### ***5.2. Seleção de microrganismos degradadores de amido***

Dado o conteúdo de amido presente no resíduo do processamento de mandioca utilizado neste estudo, seu aproveitamento para o crescimento celular e para produção de PHA deve envolver dois processos biológicos principais: degradação até suas unidades monoméricas, a glicose, e a conversão desta em biopolímero. Havia, portanto, a necessidade da escolha de um microrganismo capaz de realizar ambos os processos descritos. Assim, a etapa subsequente deste trabalho foi o de selecionar dentre 72 isolados de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* pertencentes a 21 espécies diferentes, todos isolados ambientais pertencentes a uma coleção depositada no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA) da Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), aqueles capazes de crescer em amido solúvel e consequentemente hidrolisá-lo. Cada um dos isolados, descritos na Tabela 10, foram avaliados quanto à sua capacidade de crescer em substrato de amido solúvel.

Inoculados em meio de cultura com amido como única fonte de carbono, das 72 bactérias testadas, 55 foram capazes de crescer em meio contendo amido como única fonte de carbono. Contudo, este crescimento foi variável e empiricamente classificado como sendo pouco ou bom crescimento, como apresentado na Tabela 11. Na Figura 5, é mostrada uma cultura na qual se pode observar o que se considerou pouco e bom crescimento bacteriano, neste estudo. Dentre os microrganismos listados, destacaram-se os isolados de *Bacillus megaterium*, os quais apresentaram colônias significativamente maiores que os demais isolados analisados.

**Tabela 11.** Avaliação do crescimento dos isolados ambientais, após 48 horas de cultivo em meio M9 a 37°C, contendo 5g/L de amido puro.

<b>Código</b>	<b>Avaliação do crescimento</b>	<b>Código</b>	<b>Avaliação do crescimento</b>
LAMA002	Pouco	LAMA148	Pouco
LAMA032	Pouco	LAMA098	Pouco
LAMA055	Pouco	LAMA139	Bom
LAMA100	Pouco	LAMA149	Pouco
LAMA102	Pouco	LAMA151	Pouco
LAMA135	Bom	LAMA181	Pouco
LAMA159	Pouco	LAMA262	Bom
LAMA167	Pouco	LAMA272	Bom
LAMA169	Pouco	LAMA273	Bom
LAMA176	Pouco	LAMA274	Bom
LAMA180	Pouco	CARLOS32	Bom
LAMA258	Pouco	LAMA073	Bom
LAMA091	Pouco	LAMA094	Pouco
LAMA190	Bom	LAMA097	Pouco
LAMA031	Pouco	LAMA261	Bom
LAMA018	Bom	LAMA263	Bom
LAMA020	Bom	LAMA265	Bom
LAMA062	Pouco	LAMA266	Pouco
LAMA084	Pouco	CARLOS10	Bom
LAMA252	Bom	LAMA268	Bom
LAMA075	Pouco	LAMA015	Pouco
LAMA076	Pouco	LAMA050	Pouco
LAMA157	Pouco	LAMA138	Bom
LAMA086	Pouco	LAMA133	Pouco
LAMA156	Pouco	LAMA136	Bom
LAMA023	Bom	LAMA140	Pouco
LAMA095	Bom	LAMA254	Pouco
		LAMA255	Bom

Uma das características desejáveis para a produção biotecnológica de PHAs é que os microrganismos empregados tenham elevada velocidade específica de crescimento, além de poderem ser

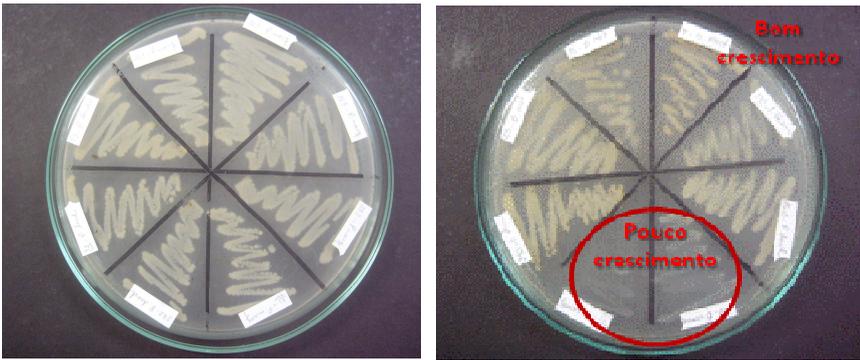
cultivados utilizando substratos de baixo custo (RAMSAY, 1994). Assim, com o objetivo de selecionar as bactérias que apresentassem o menor tempo de geração, procedeu-se um segundo cultivo idêntico ao primeiro, utilizando-se os 55 isolados previamente selecionados (descritos na Tabela 11), para se avaliar os que seriam capazes de apresentar um crescimento vigoroso em 24 horas de cultivo. Na Tabela 12 é apresentada a relação dos 16 isolados selecionados, segundo este critério.

**Tabela 12.** Microrganismos selecionados após avaliação do crescimento, em meio M9 a 37°C, contendo 5g/L de amido puro, em 24 horas.

<b>Código</b>	<b>Isolado</b>
LAMA190	<i>Bacillus ehimensis</i>
LAMA023	<i>Bacillus subtilis</i>
LAMA073	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA095	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA262	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA265	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA098	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
LAMA272	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
LAMA273	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
Carlos 32	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
LAMA261	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA263	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
Carlos 10	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA268	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA133	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA055	<i>Bacillus cereus</i>

Os isolados selecionados (Tabela 12) foram capazes de crescer em meio M9, contendo como única fonte de carbono amido puro solúvel (grau analítico). Finalmente, nesta etapa de seleção dos isolados amilolíticos, foi empregado o resíduo amiláceo industrial previamente caracterizado, como única fonte de carbono. Dos 16 isolados com

crescimento vigoroso em 24 horas, no amido puro, 14 apresentaram bom crescimento também no resíduo, no mesmo período de incubação (Figura 5). Na Figura 5, é possível observar dois isolados marcados com um círculo: um isolado praticamente sem crescimento – *B. cereus* LAMA055 – e outro com pouco crescimento – *P. dendritiformis* LAMA273 – os quais foram descartados para os próximos testes. Na etapa posterior, foram feitos ensaios utilizando o resíduo amiláceo, como única fonte de carbono.



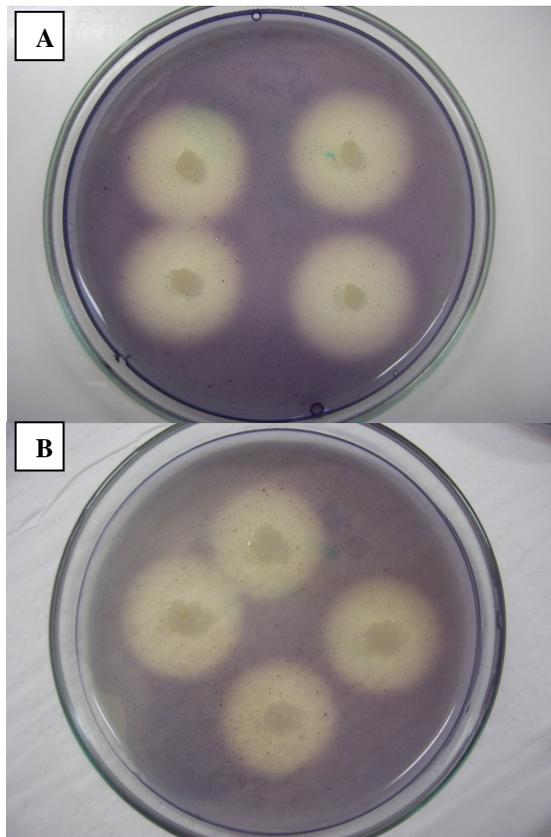
**Figura 5.** Isolados bacterianos crescidos em meio mínimo (M9) com 5g/L do resíduo do processamento de mandioca como única fonte de carbono, após 24 horas de cultivo.

Com estes resultados, observa-se que o resíduo, de fato, pode ser utilizado como substrato carbônico, necessário ao crescimento bacteriano, e que, para a maioria das bactérias testadas, não causou inibição de crescimento dos microrganismos. De qualquer modo, houve, para dois dos isolados testados, uma provável inibição de crescimento, que pode ter sido causada por uma diferença da atividade amilolítica apresentada por estes dois isolados, quer seja pela especificidade das enzimas pelo substrato amiláceo, ou pela acessibilidade das enzimas ao substrato, aos grânulos de amido presentes no resíduo.

### 5.3. Avaliação quantitativa dos microrganismos selecionados

#### 5.3.1. Determinação do índice enzimático

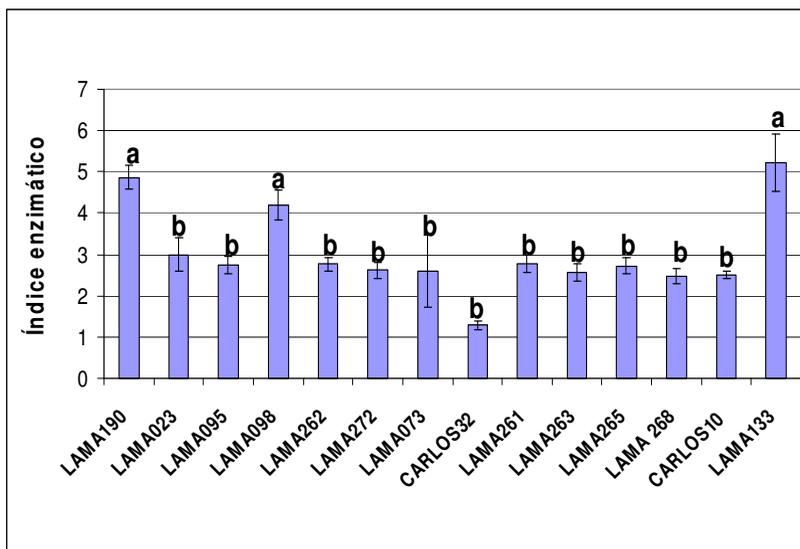
Tendo em vista que muitos microrganismos não são capazes de hidrolisar o resíduo para o seu consumo em forma de açúcar, foram realizados testes para observação do índice enzimático, analisando a atividade das enzimas amilolíticas, e este índice é determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Figura 6).



**Figura 6.** Colônias de *B. ehimensis* LAMA190 (A) e *B. subtilis* LAMA023 (B) e os halos de degradação do amido, revelados por solução de iodo.

A partir dos halos de degradação de amido formados (Figura 6), foi determinado o índice enzimático, e observam-se os resultados de dois isolados: *B. ehimensis* LAMA190 apresentou colônias de  $5,5\text{mm} \pm 0,3\text{mm}$  de diâmetro e halo de degradação de  $26,1\text{mm} \pm 0,7\text{mm}$ , com índice enzimático de  $4,74 \pm 0,28$ ; já *B. subtilis* LAMA023 apresentou colônias de  $10,5\text{mm} \pm 2,5\text{mm}$  de diâmetro e halo de degradação de  $31,2\text{mm} \pm 2,2\text{mm}$ , com índice enzimático de  $2,97 \pm 0,39$ .

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente, sendo significativa a variação entre os tratamentos, e foi realizada análise de contraste de médias por meio do teste de Tukey, em que os isolados indicados com mesma letra não são diferentes ao nível de 5% de significância. Não existiram muitas diferenças entre os isolados, porém puderam ser destacados os microrganismos *B. ehimensis* (LAMA190), *G. kaustophilus* (LAMA098) e *P. thiaminolyticus* (LAMA133), os quais apresentaram colônias pequenas, mas grande excreção de enzimas. Os resultados apontam a capacidade de todos os isolados em secretar enzimas amilolíticas no meio, degradando o amido para o consumo de açúcares para seu crescimento (Figura 7).



**Figura 7.** Índice enzimático (relação halo enzimático/diâmetro colônia) dos isolados selecionados, cultivados em meio M9, contendo 5g/L de resíduo. Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e os isolados indicados com mesma letra não são diferentes ao

nível de 5% de significância. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.

A principal função das enzimas extracelulares é a de executar as alterações necessárias à captação dos nutrientes para o interior das células. As hidrolases compreendem as enzimas amilolíticas, que hidrolisam as moléculas de amido em produtos, como dextrinas, e pequenos polímeros compostos por unidades de glicose. Conforme o seu modo de ação, as enzimas amilolíticas podem ser divididas em duas grandes categorias: as endoamilases e exoamilases. As endoamilases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4, de uma maneira aleatória, no interior da molécula de amido. Sua ação resulta na formação de oligossacarídeos ramificados e lineares de vários comprimentos de cadeias. Por outro lado, as exoamilases hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não redutora das mesmas, resultando em produtos finais pequenos (PELCZAR et al., 1998; GUPTA et al., 2003).

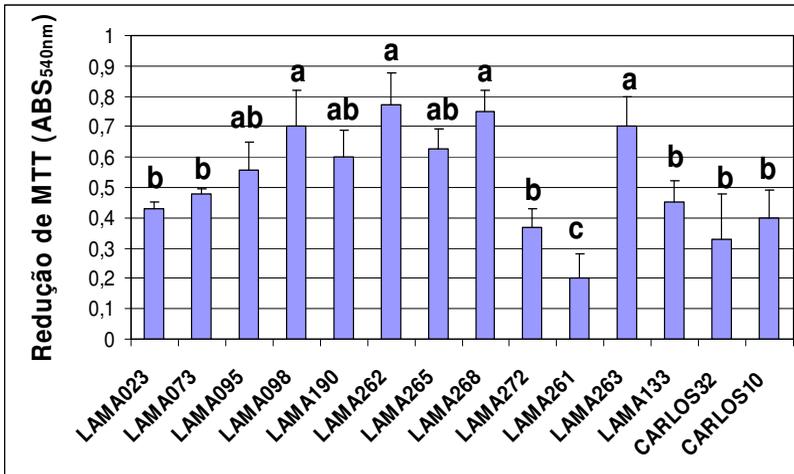
Observou-se que os isolados selecionados apresentam grande potencial para a produção de enzimas, e indústrias de biotecnologia vêm explorando intensamente esta produção por microrganismos, principalmente de amilases, já que apresentam um amplo campo de aplicações na indústria de alimentos, em cervejarias e bebidas fermentadas, em cereais para alimentação infantil, ração animal, indústrias de papel e celulose, têxtil, de detergentes, química e farmacêutica. Entre as  $\alpha$ -amilases bacterianas mais importantes industrialmente, estão as secretadas pelo gênero *Bacillus*, destacando-se as amilases ativas em altas temperaturas produzidas por *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. licheniformis* (GUPTA et al., 2003; SCHALLMEY et al., 2004). Além disso, pode ser interessante também o aproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes alternativas de substratos para produção de enzimas, pois contêm quantidades residuais de amido suficientes para este fim, e representam uma fonte de baixo valor comercial, principalmente quando se visa à produção de enzimas em larga escala (BOCCHINI et al., 2005).

### 5.3.2. Determinação do crescimento bacteriano

Para comparação do crescimento bacteriano, primeiramente foi testada a determinação da densidade celular por meio da absorbância da

cultura, em espectrofotômetro (a unidade é a densidade óptica), e por meio do peso seco das células. No entanto, o resíduo influenciou nestes dois parâmetros, já que sua coloração marrom e alguns sólidos em suspensão interferiram na leitura de absorbância, assim como estes sólidos interferiram na medida do peso seco. E por mais que tenha sido utilizada uma amostra controle, composta apenas de resíduo, a qual foi exposta às mesmas leituras, e o seu valor subtraído das amostras analisadas, não foi possível quantificar o consumo do substrato pelos microrganismos diante destas variáveis coloração e peso dos sólidos em suspensão.

Desta forma, buscou-se outra técnica que pudesse minimizar o erro. Foi utilizada, então, a técnica do MTT, a partir da qual se determinam as células vivas, por meio da respiração celular (FRESHNEY, 2005). O teste piloto apontou crescimento mensurável em 1h de exposição ao MTT (dados não apresentados). As amostras foram preparadas em diluição de 1:6 com meio de cultura sem limitação de nutriente e sem resíduo, como descrito em material e métodos 4.6.2. Na Figura 8, apresenta-se a comparação entre o crescimento dos isolados, expressa como absorbância a 540nm ( $ABS_{540nm}$ ), crescidos em meio mineral (Ramsay) contendo resíduo bruto do processamento de mandioca, como fonte de carbono.

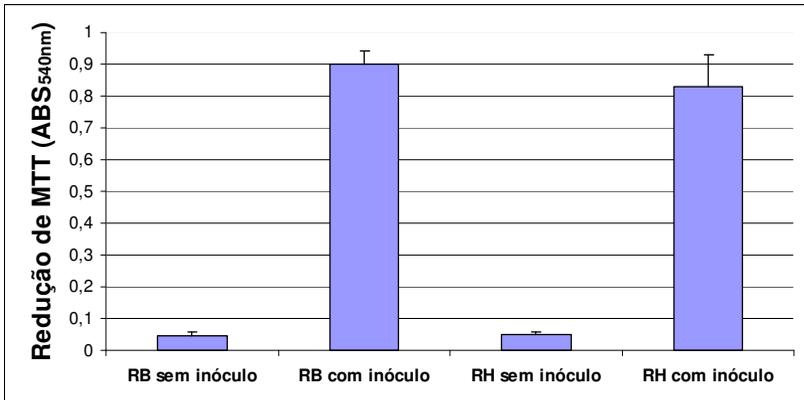


**Figura 8.** Crescimento celular dos isolados em meio contendo resíduo bruto, por meio da técnica de redução de MTT, expresso como absorbância  $ABS_{540nm}$ . Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e os indicados com mesma letra não são diferentes

ao nível de 5% de significância. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.

A partir dos resultados obtidos (Figura 8), é possível inferir que, em geral, os isolados tiveram bom crescimento em meio limitado adicionado do resíduo, destacando-se apenas o isolado LAMA261, que obteve a menor concentração celular quando comparado com os demais microrganismos.

Paralelamente, selecionou-se, de forma empírica, o isolado LAMA262, o qual foi inoculado em meio com resíduo bruto e resíduo hidrolisado (hidrólise ácida – metodologia descrita em 4.6.2.1), a fim de comparar o seu crescimento nas duas apresentações do resíduo. Como observado na Figura 9, não existiu diferença significativa no crescimento do microrganismo com o resíduo bruto ou hidrolisado; logo, os testes seguiram com utilização do resíduo bruto, o que também minimiza custos para a produção do polímero. Este fato reafirma a capacidade dos microrganismos de secretar enzimas amilolíticas no meio, observado nos testes de determinação dos índices enzimáticos.

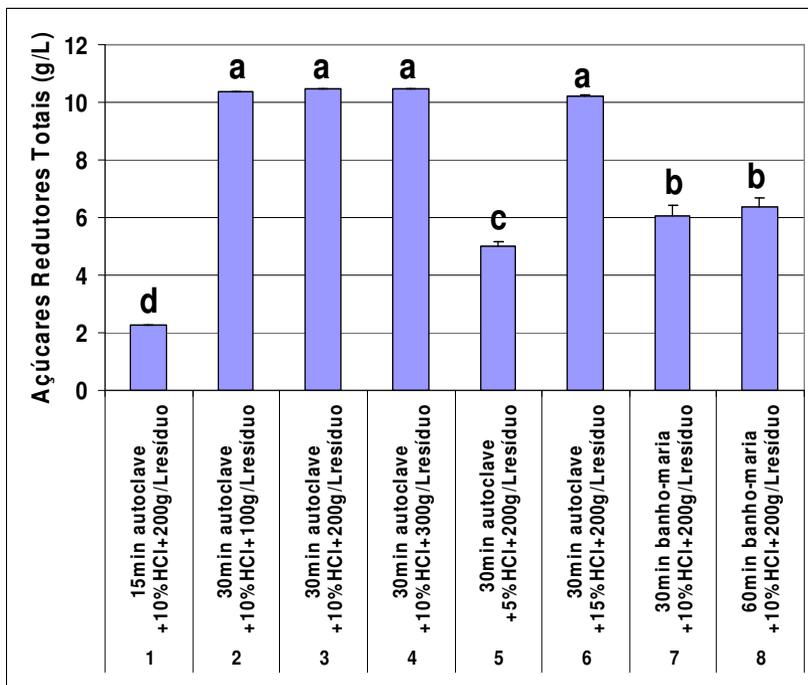


**Figura 9.** Crescimento do isolado LAMA 262 em meio com resíduo bruto e hidrolisado por meio da técnica de redução de MTT, expresso como ABS<sub>540nm</sub>, em que RB = resíduo bruto e RH = resíduo hidrolisado. Os isolados foram comparados estatisticamente pelo teste de Tukey, e as barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.

### 5.4. Avaliação da Produção de PHA

Com o objetivo de avaliar a produção de PHA, dois microrganismos – LAMA262 e LAMA268 – foram escolhidos empiricamente dentre os 14 isolados que apresentaram bom crescimento, ou seja, os 14 microrganismos com crescimento superior aos demais da coleção, e foram cultivados em meio mineral (Ramsay), com limitação de fósforo, utilizando-se como fonte de carbono 20g/L de glicose ou 20g/L de resíduo bruto, ambos com adição do corante vermelho do Nilo, evidenciando as grânulos de PHA das bactérias produtoras. Como controle positivo, foi utilizada uma linhagem de *E. coli* (DH10B) transformada com o plasmídeo pRLC2 (BRESSAN, 2007), contendo os genes necessários à produção de PHA, e sabidamente produtora do polímero.

Após cultivo nas condições descritas acima, a observação em microscópio de epifluorescência, que permite a visualização dos microrganismos contendo polímero intracelular, mostrou que os isolados cresceram bem tanto em glicose como no resíduo bruto, porém não foram capazes de produzir PHA quando o resíduo bruto foi utilizado como única fonte de carbono. Frente a estes resultados, procedeu-se a hidrólise ácida do resíduo, visando tornar o açúcar prontamente utilizável, e então facilitar o acesso dos microrganismos ao substrato e, conseqüentemente, o acúmulo de polímero a partir deste. Encontram-se na literatura diversos trabalhos nos quais foram utilizados resíduos ricos em amido e que, previamente à adição no meio de cultivo, foram hidrolisados, como de Dalcanton (2006) e Rodrigues (2005), que utilizaram uma solução simulando resíduo de indústria de arroz para produção de PHA por *R. eutropha*; Law e colaboradores (2003) utilizaram resíduo de malte de cervejaria para produção de PHA por *B. subtilis* recombinante. Para este trabalho, foram testadas oito condições de hidrólise (material e métodos 4.5.1).

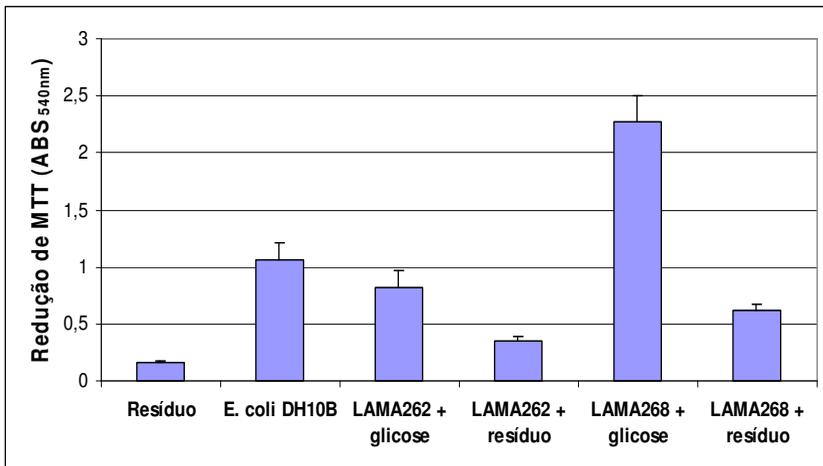


**Figura 10.** Quantidade de açúcares redutores totais (g/L) liberada nos diferentes tratamentos (1 a 8) para hidrólise do resíduo do processamento de mandioca. As identificações “a”, “b”, “c” e “d” indicam a comparação estatística entre os tratamentos (teste de Tukey).

Os tratamentos realizados com 30 minutos de aquecimento em autoclave (121°C) foram os mais eficientes para a hidrólise do amido, sendo que a hidrólise por 30 minutos em solução de HCl 10% (v/v) foi a que proporcionou melhores resultados. Embora a solução de HCl 15% também tenha gerado resultado satisfatório, porém analisando-se custos e impactos ambientais, optou-se pela menor concentração. Quanto à quantidade do resíduo, notou-se que utilizando tanto 100, 200 ou 300g/L os resultados foram iguais estatisticamente, cerca de 10g/L de açúcar liberado, e então se fez a opção por 200g/L, já que se tem o resíduo disponível em grandes quantidades, e a concentração de açúcar liberado foi maior (10,5g/L), apesar de não haver diferença estatística. O tratamento para a hidrólise de amido escolhido foi de 30 minutos em autoclave, 200g/L de resíduo em solução de HCl 10% (na proporção

1:10 - ácido:solução de resíduo em água destilada), sendo depois ajustado o pH e adicionado ao meio.

Novamente os microrganismos foram inoculados em meio Ramsay limitado e 20g/L de glicose, e em meio limitado e resíduo, agora hidrolisado, na concentração de 2% (volume de hidrolisado/volume de meio), com adição do corante vermelho do Nilo, e, como controle positivo, foi utilizada uma linhagem de *E.coli* (DH10B) transformada com o plasmídio pRLC2. Após 48h de cultivo, alíquotas dos meios foram retiradas para teste de MTT (Figura 11) e visualização em microscópio de epifluorescência para observação dos grânulos de PHA intracelulares (Figura 12). Observa-se na Figura 11 que os isolados cultivados em glicose tiveram um crescimento superior, ou seja, detectou-se um maior número de células ativas, uma vez que o MTT determina respiração celular, do que aqueles cultivados com resíduo.



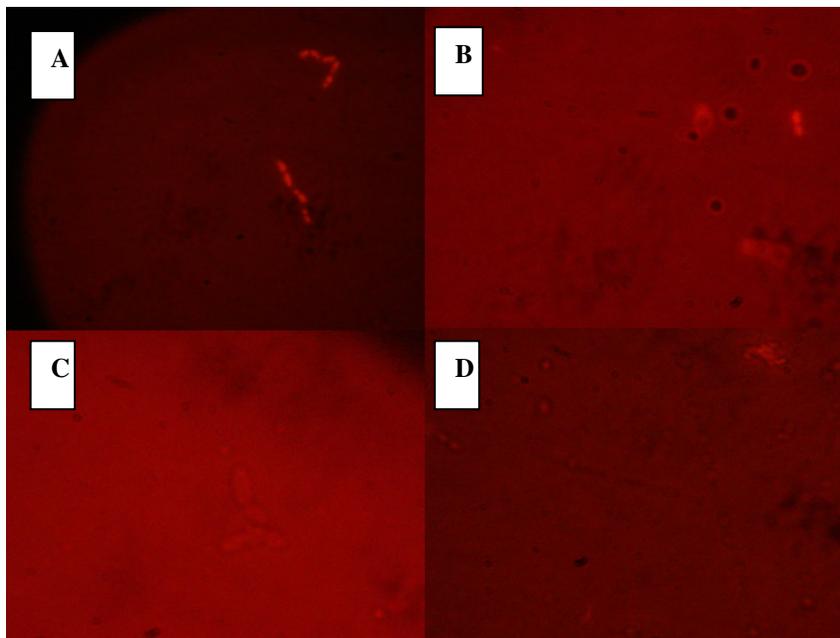
**Figura 11.** Crescimento celular (redução de MTT ABS<sub>540nm</sub>) dos isolados LAMA262 e LAMA268 cultivados em glicose ou resíduo amiláceo hidrolisado, após 48 horas de cultivo a 37°C. As barras verticais nas colunas se referem ao desvio padrão das médias das amostras.

Quanto à visualização destas células em microscópio de epifluorescência (Figura 12), o isolado LAMA 268 não apresentou fluorescência, indicativa de acúmulo de PHA, como observado no controle positivo. Já o isolado LAMA 262 apresentou pontos de

fluorescência referentes aos grânulos de PHA presentes dentro das células. Nota-se que a quantidade de grânulos é maior nos isolados cultivados com glicose, no entanto observa-se também naqueles cultivados com resíduo. Pode-se justificar a menor quantidade quando cultivado em resíduo devido ao menor número de células ativas, indicado pelo teste de MTT (Figura 11). De qualquer forma, nota-se a capacidade deste isolado em produzir PHA em presença do resíduo como fonte de carbono.

A fluorescência emitida pelo uso do corante vermelho do Nilo proporciona um fácil e rápido “rastreamento” para identificar microrganismos produtores de PHAs, e pode ser utilizado para isolar potenciais linhagens produtoras do polímero de amostras do ambiente (BERLANGA et al., 2006). Spiekermann e colaboradores (1999), Rehm e colaboradores (2002) e Berlanga e colaboradores (2006) utilizaram o corante vermelho do Nilo para seleção de microrganismos com intensa fluorescência, indicativa da produção de polímero. Assim como o corante vermelho do Nilo, o corante azul do Nilo também é utilizado em trabalho devido à sua capacidade de corar os grânulos de PHA (ANTUNES, 2006).

Em seguida, tendo definidas as condições de cultivo e de análise, todos os 14 isolados previamente selecionados foram inoculados em meio limitado com glicose 20g/L e vermelho do Nilo, e 48h depois foram observados em microscópio de epifluorescência para visualização dos grânulos de PHA. A Tabela 13 apresenta os diferentes isolados e algumas de suas características. Entre os isolados crescidos em glicose, podem-se destacar LAMA073, LAMA262 e LAMA265, que apresentaram alta fluorescência dos grânulos quando observados em microscópio de epifluorescência. Dos 14 microrganismos selecionados em etapas posteriores, 3 deles não cresceram quando realizado este teste em glicose, por isso não foram incluídos na tabela a seguir.



**Figura 12.** Acúmulo de PHA observado sob microscópio de epifluorescência. A) LAMA262 cultivado com glicose; B) LAMA262 cultivado com resíduo; C) LAMA268 cultivado com glicose; D) LAMA268 cultivado com resíduo.

Os isolados que cresceram e produziram PHA significativamente em glicose, assim como aqueles que não cresceram em glicose, foram testados em meio limitado e resíduo hidrolisado, adicionado agora na concentração de 20% (volume de hidrolisado/volume de meio), equivalente a 2g/L de açúcares redutores, tendo em vista o menor crescimento dos microrganismos em meio com 2% de resíduo hidrolisado em relação àqueles cultivados em 20g/L de glicose (teste MTT), e após 48h foram observados em microscópio de epifluorescência para visualização dos grânulos de PHA. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 13.** Isolados crescidos em meio limitado com glicose como fonte de carbono e corante vermelho do Nilo a 37°C.

<b>Isolados</b>	<b>Quantidade de células</b>	<b>Tamanho das células</b>	<b>Grânulos de PHA</b>	<b>Intensidade Fluorescência</b>
<i>B. ehimensis</i> – LAMA 190	Muitas	Pequenas	-	-
<i>G. kaustophilus</i> – LAMA 098	Muitas	Grandes	Pouco/Pequenos	Baixa
<i>P. dendritiformis</i> – LAMA 272	Poucas	Grandes	Maioria das células/Pequenos	Média
<i>B. megaterium</i> – LAMA 073	Poucas	Grandes	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>P. dendritiformis</i> – CARLOS 32	Poucas	Muitas rompidas	Maioria das células/Pequenos	Média
<i>B. megaterium</i> – LAMA 262	Poucas	Grandes	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>P. macquariensis</i> – LAMA 261	Poucas	Grandes	Maioria das células/Pequenos	Média
<i>P. macquariensis</i> – LAMA 263	Poucas	Pequenas	Algumas células/Pequenos	Alguns claros, outros mais intensos
<i>B. megaterium</i> – LAMA 265	Muitas	Grandes	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>P. macquariensis</i> – CARLOS 10	Poucas	Pequenas	Algumas células/Pequenos	Baixa
<i>P. macquariensis</i> – LAMA 268	Muitas	Pequenas	-	-

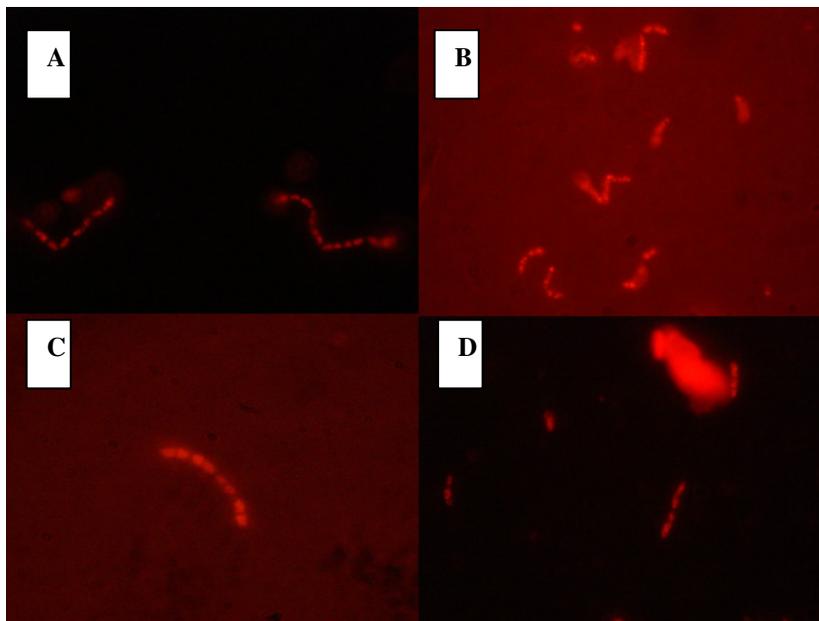
**Tabela 14.** Isolados crescidos em meio limitado com 20% de resíduo hidrolisado como fonte de carbono e corante vermelho do Nilo.

Isolados	Quantidade de células	Tamanho das células	Grânulos de PHA	Intensidade Fluorescência
<i>B. megaterium</i> – LAMA 095	Poucas	Pequenas	Algumas células/ Bem definidos	Média
<i>B. subtilis</i> – LAMA 023	Muitas	Pequenas	-	-
<i>G. kaustophilus</i> – LAMA 098	Muitas	Grandes	-	-
<i>B. megaterium</i> – LAMA 073	Muitas	Pequenas	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>B. megaterium</i> – LAMA 262	Muitas	Grandes	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>B. megaterium</i> – LAMA 265	Poucas	Grandes	Maioria das células/ Bem definidos	Alta
<i>P. thiaminolyticus</i> – LAMA 133	Poucas	Grandes	Poucas células/ Poucos e pequenos	Média

Desta forma, observa-se que os isolados LAMA095, LAMA073, LAMA262 e LAMA265 são produtores naturais de PHA quando cultivados em meio limitado com resíduo do processamento de mandioca como única fonte de carbono (Figura 13). Estes dados reforçam os estudos de produção de PHA por *B. megaterium* (MCCOOL et al., 1996; LUVIZETTO, 2007; KULPRECHA et al., 2009), indicando sua capacidade de produção também a partir deste resíduo.

Apesar de o descobrimento dos PHAs ter iniciado há alguns anos em cultivos com *B. megaterium*, aos poucos este foi deixado de lado em detrimento de outras bactérias, talvez pelo fato da energia requerida para esporulação vir do consumo do polímero e da fonte de carbono e nutrientes do meio, ao passo que outras só consomem o polímero na

falta de fonte de carbono (WU et al., 2001). Entretanto, esta bactéria é encontrada em abundância em solos e água, e possui uma grande vantagem por crescer em diferentes fontes de carbono e também ser capaz de produzir biopolímero utilizando resíduos agroindustriais (GOUDA et al., 2001; LAW et al., 2003).



**Figura 13.** Acúmulo de PHA dos isolados cultivados com resíduo observado sob microscópio de epifluorescência. A) LAMA 095; B) LAMA 073; C) LAMA 262; D) LAMA 265.

Para os testes seguintes, foram selecionados os isolados LAMA073, LAMA095, LAMA262 e LAMA265, que apresentaram produção significativa de PHA quando cultivados em meio com 20% de resíduo hidrolisado (v/v), e foram cultivados também os mesmos isolados em 20g/L de glicose. As culturas liofilizadas destes isolados sofreram, então, metanólise para determinação de PHA das células. O PHA solúvel em clorofórmio foi dosado em cromatografia gasosa, utilizando-se como padrão interno o ácido benzóico. A Figura A.4 dos Anexos apresenta o exemplo de um cromatograma obtido a partir da análise em cromatografia gasosa. A Tabela 15 apresenta a biomassa produzida, a quantidade de P(3HB) nas células e a porcentagem de

## Resultados e Discussão

recuperação do polímero em relação ao peso seco. Com o uso do resíduo hidrolisado, não apresentando mais sólidos em suspensão, a biomassa foi determinada pelo peso seco da cultura, que foi centrifugada e liofilizada de acordo com metodologia apresentada anteriormente (4.5).

**Tabela 15.** Biomassa produzida, quantidade de P(3HB) nas células e porcentagem de recuperação do polímero dos isolados cultivados em meio limitado com 20% de resíduo hidrolisado (v/v), e em 20g/L de glicose por 48h a 37°C.

Isolado	Substrato	Biomassa (g/L)*	P(3HB) (g/L)	P(3HB) (%)**
LAMA073	Glicose	1,74± 0,4	0,73	41,95
	Resíduo	2,07± 0,9	0,27	13,04
LAMA095	Glicose	1,37± 0,5	0,33	24,09
	Resíduo	4,48± 0,5	1,07	23,88
LAMA262	Glicose	1,58± 0,6	0,34	21,51
	Resíduo	1,69± 0,3	0,10	5,92
LAMA265	Glicose	1,55± 0,7	0,49	31,61
	Resíduo	1,40± 0,7	0,35	25,00

\*Determinado como descrito em material e métodos (4.5), para determinação de PHA, em que foram feitas três repetições de cultura para cada microrganismo, e as células liofilizadas foram misturadas para se fazer a leitura, assim o resultado apresentado foi uma média das três culturas.

\*\*% P(3HB) = (g de P(3HB)/g de biomassa) x 100

Na Tabela 15, é indicado que alguns isolados apresentaram maior biomassa quando cultivados em resíduo, como é o caso de LAMA073 e LAMA095. Entretanto, LAMA073 e LAMA262 produziram maiores quantidades de P(3HB) quando cultivados em glicose, com aumento de P(3HB) em relação ao peso seco das células de 28,91% (p/p) e 15,19% (p/p) respectivamente, quando comparados ao cultivo em resíduo, sendo que, para LAMA073, em glicose obteve-se uma biomassa de 1,74±0,4g/L e foram acumulados 41,95% de P(3HB) (p/p), e em resíduo, foi obtida biomassa de 2,07±0,9g/L e acumulados 13,04% de P(3HB) (p/p); para LAMA262, em glicose obteve-se uma biomassa de 1,58±0,6g/L e foram acumulados 21,51% de P(3HB) (p/p), e em resíduo, biomassa de 1,69±0,3g/L e acumulados 5,92% de P(3HB) (p/p).

Já o isolado LAMA265 apresentou um aumento de apenas 6,61% (p/p) na quantidade de P(3HB) nas células com cultivo em glicose, obtendo-se em resíduo uma biomassa de  $1,40 \pm 0,7 \text{g/L}$ , com acúmulo de 25% de P(3HB) (p/p). É possível destacar o isolado LAMA095, que apresentou maior biomassa quando cultivado em resíduo e, conseqüentemente, maior quantidade de P(3HB); no entanto, analisando-se as proporções, de acordo com a porcentagem de P(3HB) nas células, esta é bastante semelhante comparando-se as duas fontes de carbono (24,09% para cultivo em glicose, e 23,88% em resíduo).

Observadas as porcentagens de P(3HB) sobre o peso seco das células dos isolados selecionados no trabalho, estas podem ser comparadas com dados da literatura. Quanto à produção em resíduo industrial, Dalcanton (2006) alcançou rendimento de 35% (p/p) de PHB nas células, quando cultivado *Ralstonia eutropha* em resíduo de processamento de arroz. *E. coli* recombinante apresentou 34,78% de PHB em relação à sua massa seca quando cultivado em hidrolisado de amido de milho (FONSECA, 2003). Zhang e colaboradores (1994) examinaram linhagens de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* para a formação de P(3HB) em melação, que custa de 33 a 50% menos do que glicose, e as linhagens de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* recombinantes, carregando o locus de *phb* em um plasmídio, crescido em meio mínimo com 6% de melação de cana-de-açúcar, acumularam P(3HB) a aproximadamente  $3 \text{g/L}$ , correspondendo a 45% (p/p) da massa celular seca. Quando cultivada *R. eutropha* em extrato aquoso de bagaço de maçã, Rodrigues (2005) obteve 14% de PHB em meio sem suplementação de óleo, 34% de PHB em meio suplementado com ácido oléico e 22% quando suplementado com óleo de soja.

Comparam-se também as porcentagens obtidas no trabalho com estudos realizados com *Bacillus*, em que *B. megaterium* foi capaz de produzir P(3HB) utilizando melação de cana como fonte de carbono, rico em sacarose, apresentando um rendimento de 46,2% (p/p) de P(3HB) sobre o peso seco da célula (GOUDA et al., 2001). Omar e colaboradores (2001) cultivaram *B. megaterium* utilizando como fonte de carbono xarope de tâmaras e melação de beterraba, e obtiveram um acúmulo de 52% e 50% (p/p), respectivamente. Law e colaboradores (2003) realizaram ensaios para construção de *B. subtilis* recombinante, cultivando-o em meio com resíduo de malte para produção de PHA, e alcançaram uma produção de 15,32% (p/p) do peso seco das células. Kulprecha e colaboradores (2009) obtiveram uma produção de 61,62% de PHB (p/p) cultivando *B. megaterium* BA-019 por apenas 12h, quando aumentada a concentração do substrato melação de cana para

400g/L. E *B. megaterium* CQPBA036-07 DMP01 cultivado em 50g/L de sacarose obteve 75% de PHB (p/p) (LUVIZETTO, 2007).

Diante dos dados apresentados, observa-se que a produção de PHB obtida neste trabalho se assemelha com outros dados da literatura, e que existem diversos estudos sobre a produção de P(3HB) por meio de fontes de carbono de baixo custo por produtores naturais e recombinantes de P(3HB). Todavia, a concentração de P(3HB) e o conteúdo de P(3HB) obtidos são consideravelmente mais baixos do que aqueles obtidos usando substratos purificados de carbono, como é o caso de *Cupriavidus necator* cultivado em glicose, que pode alcançar mais de 80% de sua massa celular seca em polímero (BYROM, 1987). Conseqüentemente, mais estratégias eficientes de cultivo devem ser desenvolvidas para uma produção eficiente de P(3HB) a partir de fontes de carbono de baixo custo. E se resíduos industriais puderem ser usados como substratos para a produção de P(3HB), vantagens combinadas para a redução de custos e obtenção de produtos de valor agregado podem ser alcançados (KIM e CHANG, 1995; LEE, 1996b).

A fim de melhorar a produção de PHB, aumentou-se a quantidade de resíduo hidrolisado de 20% para 40% (v/v), equivalente a um aumento de 2g/L para 4g/L de açúcar redutor, sendo realizada novamente a cultura em meio com limitação de fósforo por 48h a 37°C, em três repetições (Tabela 16).

**Tabela 16.** Biomassa produzida, quantidade de P(3HB) nas células e porcentagem de recuperação do polímero dos isolados cultivados em meio limitado com 40% de resíduo hidrolisado (v/v), por 48h a 37°C.

Isolado	Substrato	Biomassa (g/L)*	P(3HB) (g/L)	P(3HB) (%)**
LAMA073	Resíduo	3,35 ± 0,7	1,02	30,45
LAMA095	Resíduo	4,97 ± 0,9	1,48	29,78
LAMA262	Resíduo	3,36 ± 0,8	0,19	5,65
LAMA265	Resíduo	2,92 ± 0,5	0,52	17,81

\*Determinado como descrito em material e métodos (4.5), para determinação de PHA, em que foram feitas três repetições de cultura para cada microrganismo, e as células liofilizadas foram misturadas para se fazer a leitura, assim o resultado apresentado foi uma média das três culturas.

\*\*% P(3HB) = (g de P(3HB))/g de biomassa) x 100

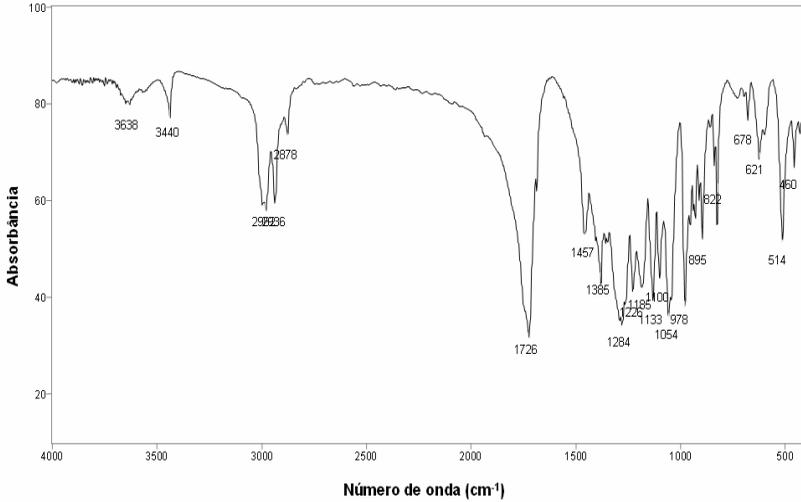
De acordo com os dados das Tabelas 15 e 16, observa-se que o aumento da quantidade de resíduo no meio de cultivo apresentou um aumento de 38% de biomassa para o isolado LAMA073, 49% para LAMA262 e 52% (p/p) para LAMA265, e o isolado LAMA095 apresentou 10% de aumento. Com o aumento da biomassa produzida, consequentemente obteve-se um aumento do P(3HB) produzido, no entanto este aumento não foi significativo para todos os isolados quando observada a quantidade de polímero em relação à biomassa. Obteve-se um incremento na produção para o isolado LAMA073, em que a porcentagem de polímero nas células aumentou de 13,04% para 30,45% (p/p), indicando uma produção cerca de 57% maior de polímero quando utilizado 40% de resíduo hidrolisado (v/v) no meio de cultura. O isolado LAMA095 obteve um incremento de aproximadamente 20% de polímero. Já os isolados LAMA262 e LAMA265 apresentaram uma diminuição de produção de polímero quando aumentada a quantidade de resíduo. Entretanto, destaca-se que a quantidade de resíduo utilizada ainda se encontra bastante abaixo do que é utilizado de glicose, podendo gerar resultados mais significativos se a quantidade fosse equivalente.

É possível observar que, embora pertençam à mesma espécie, os isolados de *B. megaterium* apresentam atividades diferentes, inerentes a cada microrganismo em questão, devido à diversidade da espécie, ou também podem estar relacionadas à amostra, ao local em que foram coletados e à data da coleta.

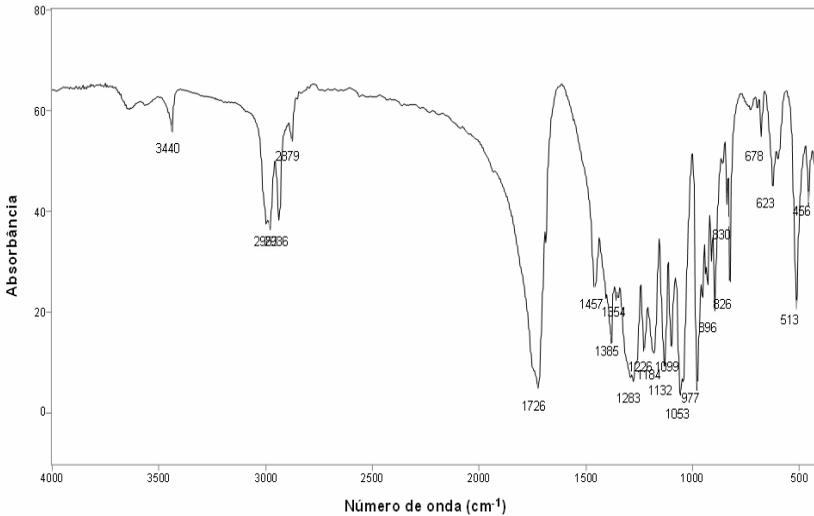
### **5.5. Caracterização dos filmes de PHB**

#### **5.5.1. Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

Visando caracterizar o tipo de PHA produzido por duas das linhagens a partir das quais se obteve a maior produção de PHB, utilizando-se 20% de resíduo hidrolisado como fonte de carbono, o polímero produzido foi extraído da biomassa seca como descrito em material e métodos (4.8.1). Os filmes obtidos foram analisados por espectrofotometria FTIR. Os espectros de infravermelho (FTIR) dos PHA purificados, produzidos pelos isolados LAMA095 e LAMA265, estão apresentados nas Figuras 14 e 15, respectivamente.



**Figura 14.** Espectro de FTIR para o polímero produzido pelo isolado LAMA095 - *B. megaterium*.



**Figura 15.** Espectro de FTIR para o polímero produzido pelo isolado LAMA265 - *B. megaterium*.

Em ambas as análises, observam-se as principais bandas características da presença do polímero P(3HB): intensa banda a 1726 cm<sup>-1</sup>, devido aos estiramentos das carbonilas das ligações éster; várias

bandas de intensidade variável, entre 1450 e 1000  $\text{cm}^{-1}$ , devido às deformações dos grupos metila ( $\text{CH}_3$ ) e metileno ( $\text{CH}_2$ ) e aos estiramentos C-O-C. Estes dados estão de acordo com os reportados na literatura por Kansiz e colaboradores (2000) para FTIR de PHB produzido por *E. coli* recombinante, por Garcia (2006) para FTIR de PHB produzido por *Ralstonia eutropha*, e por Carminatti (2008) para FTIR de PHB produzido por *Chromobacterium violaceum*, e, portanto, confirmam a produção do polímero pelos isolados testados.

### 5.6. Caracterização molecular dos isolados selecionados

As análises dos segmentos 16S rRNA sequenciados dos 4 isolados selecionados apontam grande identidade destas com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI). Este resultado contribuiu para a confirmação das espécies, pois, por meio dos testes morfológicos, de crescimento e bioquímicos, os microrganismos foram identificados como *B. megaterium* atípicos, uma vez que a maioria dos testes confirmava esta espécie, porém algumas características (produção de catalase, distensão da célula durante a esporulação, produção de acetoína, hidrólise de gelatina e crescimento em anaerobiose) se apresentaram fora do padrão para a espécie. Na Tabela A.2 dos Anexos é apresentada a sequência de nucleotídeos de cada isolado. E os resultados das análises são apresentados na Tabela 17.

Foram apresentadas na tabela as indicações do banco de dados que obtiveram 99% de identidade com os segmentos 16S rRNA sequenciados. Os segmentos dos isolados LAMA073, LAMA095 e LAMA262 obtiveram o mesmo grau de similaridade com os mesmos segmentos das espécies do banco de dados, por isso foram apresentados juntos na tabela, tendo 1544 nucleotídeos analisados. Quanto ao isolado LAMA265, foi sequenciada parte do segmento de interesse, tendo 968 nucleotídeos analisados, por isso apresentou padrão de semelhança com o banco de dados levemente diferente dos demais segmentos analisados, e, como não apresentou o mesmo número de nucleotídeos, não foi comparado com os demais na árvore filogenética.

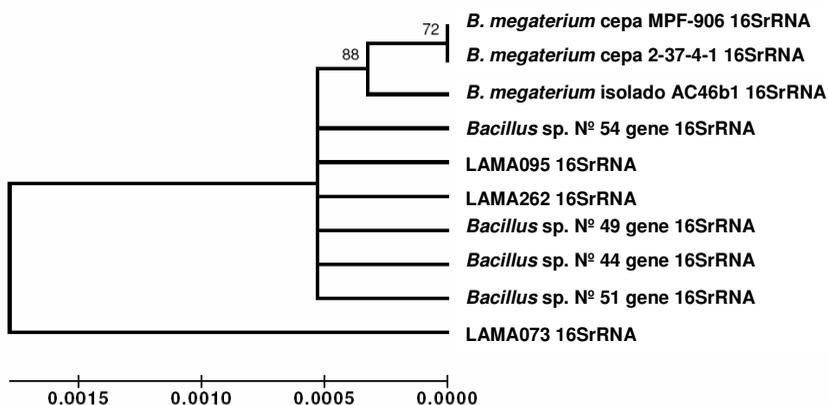
**Tabela 17.** Identidade entre as sequências dos isolados selecionados e o banco de dados GenBank (NCBI).

Isolado	GenBank – NCBI				
	Espécie	Gene sequenciado	Acesso	Identidade (%)	Nucleotídeos idênticos *
LAMA 073	<i>Bacillus</i> sp. N° 49	16S rRNA	AB066347.1	99%	1538/1542
	<i>Bacillus</i> sp. N° 54	16S rRNA	AB066345.1	99%	1538/1542
	<i>Bacillus</i> sp. N° 44	16S rRNA	AB066339.1	99%	1536/1542
	<i>Bacillus megaterium</i> cepa MPF-906	16S rRNA	DQ660362.1	99%	1537/1544
	<i>Bacillus megaterium</i> cepa 2-37-4-1	16S rRNA	DQ267829.1	99%	1537/1544
	<i>Bacillus</i> sp. N° 51	16S rRNA	AB066344.1	99%	1532/1536
	<i>Bacillus megaterium</i> isolado AC46b1	16S rRNA	AJ717381.1	99%	1532/1538
LAMA 095	<i>Bacillus megaterium</i> plasmídio pBM400	Sequência completa	AF142677.4	99%	1535/1544
	<i>Bacillus</i> sp. N° 49	16S rRNA	AB066347.1	99%	966/968
	<i>Bacillus</i> sp. N° 54	16S rRNA	AB066345.1	99%	966/968
	<i>Bacillus megaterium</i> cepa MPF-906	16S rRNA	DQ660362.1	99%	966/968
	<i>Bacillus megaterium</i> cepa 2-37-4-1	16S rRNA	DQ267829.1	99%	966/968
LAMA 262					
LAMA 265					

<i>Bacillus megaterium</i> isolado AC46b1	16S rRNA	AJ717381.1	99%	966/968
<i>Bacillus megaterium</i> plasmídio pBM400	Sequência completa	AF142677.4	99%	966/968

\* Número de nucleotídeos idênticos em relação ao número total de nucleotídeos comparados.

Os resultados, portanto, apontam que os isolados selecionados realmente pertencem à espécie *Bacillus megaterium*, microrganismo conhecidamente produtor de PHA em condições de excesso de carbono no ambiente e limitação de nutriente. Na Figura 16, é apresentado o resultado da análise filogenética dos 3 isolados selecionados no trabalho e 7 acessos do banco de dados GenBank (NCBI).



**Figura 16.** A árvore filogenética, construída por meio do Programa MEGA4, apresenta os isolados selecionados no trabalho e os microrganismos com 99% de identidade selecionados a partir do GenBank. No eixo x, encontra-se uma escala de identidade de nucleotídeos, sendo que a distância é a proporção (p) de nucleotídeos diferentes comparando-se duas sequências, e é obtido pela divisão do número de nucleotídeos diferentes pelo número total de nucleotídeos comparados. Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de *Bootstrap*, em 100 réplicas.

A árvore filogenética representa as relações evolutivas entre grupos de organismos, e pode ser utilizada em diversas aplicações da biologia molecular. Uma árvore filogenética é composta de nós internos, que representam as unidades ancestrais, e nós terminais, que são as unidades taxonômicas operacionais (neste caso o segmento sequenciado das espécies), além de ramos, que representam o número de mudanças que ocorrem em relação ao último nó (FUTUYMA, 1992). Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de *Bootstrap*, cujo cálculo permite a obtenção de um parâmetro que reflita a robustez da análise filogenética produzida. O *Bootstrap* consiste no número de ocorrências deste nó interno em 100 réplicas, e é gerado a partir da criação de vários conjuntos de sequências (NEI e KUMAR, 2000).

A árvore indica maior proximidade dos isolados LAMA095 e LAMA262, os quais se encontram mais afastados de LAMA073, que apresenta 0,25% de diferença em relação aos demais microrganismos considerados, porém todos apresentam grande identidade entre si e com as indicações do banco de dados (99%). No entanto, existem diferenças entre os isolados para a produção de polímero, e estas podem estar relacionadas à diversidade da espécie, à amostra, ao local e à data em que foram coletados os microrganismos, o que influencia sua atividade.

### 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo geral a seleção de uma linhagem bacteriana capaz de produzir polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de um resíduo do processamento de mandioca, partindo-se de 72 isolados ambientais de *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Geobacillus* disponíveis na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada/UNIVALI.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível concluir que:

- O resíduo do processamento de mandioca utilizado neste trabalho apresenta elevados teores de amido e de açúcares redutores, o que o torna aplicável ao crescimento de microrganismos, capazes da excreção de enzimas amilolíticas, bem como pode constituir um substrato carbônico adequado à produção de compostos de maior valor agregado, como é o caso dos PHAs.
- Dentre os 72 isolados estudados, 16 foram selecionados por apresentarem um bom crescimento em substrato amiláceo, como única fonte de carbono e, destes, 14 isolados foram capazes de apresentar colônias vigorosas quando cultivados no resíduo do processamento de mandioca, indicando que o resíduo não causou inibição do crescimento dos microrganismos selecionados.
- Todos os 14 isolados selecionados apresentaram capacidade de secretar enzimas amilolíticas no meio, as quais são capazes de hidrolisar amido até suas unidades monoméricas, que foram utilizadas para o seu crescimento.
- Embora os isolados tenham crescido no meio contendo o resíduo bruto do processamento de mandioca, estes foram capazes de produzir PHA apenas quando o resíduo previamente hidrolisado foi adicionado ao meio.
- Entre os isolados crescidos em glicose, LAMA073, LAMA262 e LAMA265 apresentaram, quando observados em microscópio de epifluorescência, elevada fluorescência indicando a presença dos grânulos intracelulares de PHA, os quais eram bem definidos e estavam presentes na maioria das células.
- Os isolados LAMA073, LAMA095, LAMA262 e LAMA265, todos *Bacillus megaterium*, são capazes de produzir P(3HB) quando cultivados em meio limitado com resíduo hidrolisado

do processamento de mandioca – substrato de baixo custo – como única fonte de carbono.

- A espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) mostrou bandas características da presença de P(3HB), confirmando que o polímero quantificado por cromatografia gasosa é P(3HB).
- O sequenciamento do segmento 16S rRNA dos isolados selecionados mostrou que estes pertencem à mesma espécie, e apesar de todos serem *Bacillus megaterium*, apresentaram rendimentos diferentes na produção de PHA, o que reflete a diversidade desta espécie.

### 7. PERSPECTIVAS

Baseados nos resultados apresentados, sugerem-se alguns estudos:

- Avaliar o efeito da concentração do resíduo do processamento de mandioca, do nutriente limitante, da suplementação do meio e da adição de co-substratos sobre o crescimento e produção de PHA, pelas linhagens selecionadas.
- Realizar testes para modificar geneticamente os isolados selecionados com inserção de genes para síntese de PHA, a fim de ampliar a produção do polímero.
- Avaliar o cultivo dos isolados selecionados em uma escala superior para produção de PHAs.
- Avaliar a produção de PHA pelos isolados selecionados utilizando-se outros resíduos amiláceos.

### 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, 215, p.403-410, 1990.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Review**, 54, p. 450-72, 1990.

ANTUNES, A. A. **Chromobacterium violaceum: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato**. 2006. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ARTHAM T.; DOBLE M. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. **Macromolecular Bioscience**, 8, p. 14–24, 2008.

ASENJO, J.A.; SCHMIDT, A.S.; ANDERSON, P.R.; ANDREWS, B.A. Effects of single nutrient limitation on Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate molecular weight distribution in *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology and Bioengineering**, 46, p.497-502, 1995.

BARLAZ, M.A.; HAM, R.K.; SCHAEFER, D.M. Mass-balance analysis of anaerobically decomposed refuse. **Journal of Environmental Engineering**, 115, p. 1088–1102, 1989.

BERLANGA, M.; MONTERO, M. T.; BORREL, J. F.; GUERRERO, R. Rapid spectrofluorometric screening of polyhydroxyalkanoate-producing bacteria from microbial mats. **International Microbiology**, 9, p. 95-102, 2006.

BIOMER – BIODEGRADABLE POLYESTERS. Disponível em: <http://www.biomer.de/IndexE.html>. Acesso em 05 de janeiro de 2009.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; GOMES, E.; SILVA, R. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for

xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, 40, p. 3653-3659, 2005.

BORAH, B.; THAKUR, P.S.; NIGAM, J.N. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-beta-hydroxybutyrate in *Bacillus mycoides* RLJ B-017. **Journal of Applied Microbiology**, 92, p. 776-783, 2002.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(Beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, 54, p. 1977-1982, 1988.

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

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. Rapid Gas-Chromatographic Method for Determination of Poly-Beta-Hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 6, p. 29-37, 1978.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100, 20, SEP 30, p. 11660-11665, 2003.

BRESSAN, C. R. **Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BYROM, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, 103, p. 247-250, 1992.

BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economics. **Tibtech**, 5, p. 246-250, 1987.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. São Paulo: ArtLiber Editora. 2002. 183 p.

CARMINATTI, C. A. **Copolímeros de 3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato (PHBV) produzidos por *Chromobacterium violaceum***. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CEREDA, M.P. Caracterização, uso e tratamento de resíduos da industrialização da mandioca. In: **Resíduos da industrialização da mandioca no Brasil**. São Paulo: Paulicéia, 1997. p. 11-50.

CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G. Valorização de resíduos do processamento de mandioca. **Agrarian Science and Engineering**. 8, p. 27-43, 2002.

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

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**, 62, p. 546-53, 1999a.

CHOI, J.; LEE, S.Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 51, p.13-21, 1999b.

CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. Genus *Bacillus*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. Maryland: Williams & Wilkins, 1989. p. 1105-1139.

COLIN, C.S.; RAGUÉNÈS, G.; COSTA, B.; GUEZENNEC, J. Biosynthesis of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas guezenei* from various carbon sources. **Reactive & Functional Polymers**, 68, p. 1534–1541, 2008.

- DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxitirato) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos**. 2006. 131f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DAWES, E.A.; SENIOR, P.J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, 10, p. 135-266, 1973.
- DELEGAU, A.; SCHEPER, T.; BAILEY, J.E.; GUSKE, C. Fluorometric measurement of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Alcaligenes eutrophus* by flow cytometry and spectrofluorometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 42, p. 653-657, 1995.
- DOI, Y.; SEGAWA, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, 12, p. 106-111, 1990.
- 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**, 8, p. 103-110, 2001.
- FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante**. 2003. 155f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells**. 15. ed. New York: Wiley-Liss, 2005.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.
- GARCIA, M. C. F. **Proposta de um processo de extração de poli(3-hidroxitirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero**. 2006. 158f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação

em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GOMEZ, J.G.C.; BUENO NETTO, C.L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, 17, p. 24-29, 1997.

GOUDA, M.K.; SWELLAM, A.E.; OMAR, S.H. Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. **Microbiological Research**, 156, p. 201–207, 2001.

GRAF, R. T.; KOENIG, J. L.; ISHIDA, H. Introduction to optics and infrared spectroscopic techniques. **Polymer Science and Technology**, 36, p. 1-31, 1987.

GU, J.D. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 52, p. 69–91, 2003.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, 38, p. 1599-1616, 2003.

GURIEFF, N.; LANT, P. Comparative life cycle assessment and financial analysis of mixed culture polyhydroxyalkanoate production. **Bioresource Technology**, 98, p. 3393–3403, 2007.

HARDING, K.G.; DENNIS, J.S.; VON-BLOTNITZ, H.; HARRISON, S.T.L. Environmental analysis of plastic production processes: comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. **Journal of Biotechnology**, 130, p. 57–66, 2007.

HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J.D.; WISE, D.L.; TRANTOLO, D.J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an *in vivo* application. **Journal of Biotechnology**, 86, 135–150, 2001.

HIRAISHI, A. Direct automated sequencing of 16S rRNA gene amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without

DNA purification. **Letters in Applied Microbiology**, 15, p. 210–213, 1992.

HORI, K.; KANEKO, M.; TANJI, Y.; XING, X.H.; UNNO, H. Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59, p. 211–216, 2002.

HUISMAN, G. W.; WONINK, E.; MEIMA, R.; KAZEMIER, B.; TERPSTRA, P.; WITHOLT, B. Metabolism of Poly(3-Hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans* - Identification and Sequences of Genes and Function of the Encoded Proteins in the Synthesis and Degradation of PHA. **Journal of Biological Chemistry**, 266, p. 2191-2198, 1991.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2003. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias>. Acesso em: 20 out. 2008.

JACQUEL, N.; LO, C.W.; WEI, Y.H.; WU, H.S.; WANG, S.S. Isolation and purification of bacterial poly(3-hydroxyalkanoates). **Biochemical Engineering Journal**, 39, p. 15–27, 2008.

KANSIZ, M.; BILLMAN-JACOB, H.; MCNAUGHTON, D. Quantitative determination of the biodegradable polymer poly(b-hydroxybutyrate) in a recombinant *Escherichia coli* strain by use of mid-infrared spectroscopy and multivariate statistics. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, p. 3415–3420, 2000.

KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A.K. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. **Process Biochemistry**, 40, p. 607-619, 2005.

KHARDENAVIS, A.A.; KUMAR, M.S.; MUDLIAR, S.N.; CHAKRABARTI, T. Biotechnological conversion of agro-industrial wastewaters into biodegradable plastic, poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, **Biosource Technology**, 98, p. 3579-3584, 2007.

KIM, B.S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiology and Technology**, 27, p. 774-777, 2000.

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

KITAMURA, C.M. **Avaliação de Diferentes Meios de Cultura para a Enumeração e Isolamento de Bactérias Formadoras de Endósporos de Ambientes Aquáticos**. 2007. 34f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (*phaC*) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 65, p. 3561-3565, 1999.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. Methods of seawater analysis. Verlag Chemie, p. 126-133, 1976.

KULPREECHA, S.; BOONRUANGTHAVORN, A.; MEKSIRIPORN, B.; THONGCHUL, N. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 107, p. 240-245, 2009.

LAW, K.H.; CHENG, Y.C.; LEUNG, Y.C.; LO, W.H.; CHUA, H.; YU, H.F. Construction of recombinant *Bacillus subtilis* strains for polyhydroxyalkanoates synthesis. **Biochemical Engineering Journal**, 16, p. 203-208, 2003.

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioengineering**, 49, p. 1-14, 1996a.

LEE, S.Y. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Tibtech**, 14, p. 431-438, 1996b.

LEE, S.Y.; CHANG, H.N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 52, p. 27-85, 1995.

LEE, S.Y.; CHOI, J.; WONG, H.H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 25 , p. 31-36, 1999.

LI, R.; ZHANG, H.; QI, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, 98, p. 2313-2320, 2007.

LI, X. T.; ZHANG, Y.; CHEN, G. Q. Nanofibrous polyhydroxyalkanoate matrices as cell growth supporting materials. **Biomaterials**, 29, p. 3720-3728, 2008.

LIEBERGESELL, M.; RAHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of the *Thiocapsa pfennigii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54, p. 186-94, 2000.

LUCAS, N.; BIENAIME, C.; BELLOY, C.; QUENEUDEC, M.; SILVESTRE, F.; SAUCEDO, J.E.N. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere**, 73, p. 429-442, 2008.

LUENGO, J. M., GARCIA, B., SANDOVAL, A., NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion Microbiology**, 6, p. 251-60, 2003.

LUVIZETTO, D. J. **Cultivo da bactéria *Bacillus megaterium* para produção do biopolímero poli(3-hidroxibutirato) e modelagem matemática do bioprocesso.** 2007. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LUZIER, W.D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **The Proceedings of the National Academy of Science USA**, 89, p. 839-842, 1992.

## Referências Bibliográficas

---

MADISON, L. L. e HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 63, p. 21-53, 1999.

MARQUES, M.F.V.; POLOPONSKY, M.; CHAVES, E.G. Estudo comparativo de polimerização de propileno com diferentes catalisadores metalocênicos através de um planejamento de experimentos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 12, p. 48-59, 2002.

MCCOOL, G. J.; CANNON, M. C. PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, 183, p. 4235-43, 2001.

MCCOOL, G.J.; FERNANDEZ, T.; LI, N.; CANNON, M.C. Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*. **FEMS Microbiology Letters**, 138, p. 41-48, 1996.

METABOLIX – BIO-INDUSTRIAL EVOLUTION. Brand History. Disponível em: <http://www.metabolix.com>. Acesso em: 05 de janeiro de 2009.

MILLER, G.L. **Analytical Chemistry**, 31, p.426-428, 1959.

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

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000.

OJUMU, T. V.; YU, J.; SOLOMON, B. O. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **African Journal of Biotechnology**, 3, p. 18-24, 2004.

OLIVEIRA, R.V. **Biodiversidade de Bactérias Formadoras de Endósporos em Riachos Ácidos do Município de Araquari, Santa Catarina**. 2007. 32f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

OLIVEIRA, L.A.; AMORIM, T.S.; SANTOS, D.V.; SILVA, J. Composição físico-química de variedades de mandioca de mesa cultivadas no sistema orgânico. **Revista Raízes e Amidos Tropicais/UNESP**, 3, 2007.

OMAR, S.; RAYES, A.; EQAAB, A.; VOB, I.; STEINBÜCHEL, A. Optimization of cell growth and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation on date syrup by a *Bacillus megaterium* strain. **Biotechnology Letters**, 23, p. 1119-1123, 2001.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 4. ed, São Paulo: Makron Books, 1998. p. 258-271.

PEREIRA, B.A. **Caracterização de Rizobactérias Formadoras de Endósporos associadas a *Tibouchina urvilleana* (DC.) Cogn. de áreas impactadas por rejeitos da mineração do carvão**. 2005. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, 83, p.346-356, 1977.

PHB INDUSTRIAL S.A. Biocycle. Disponível em: <http://www.biocycle.com.br>. Acesso em: 05 de janeiro de 2009.

PIEMOLINI, L.T. **Modelagem estrutural da PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* para estudos de mutação sítio-dirigida**. 2004. 79f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PIJUAN, M.; CASAS, C.; BAEZA, J.A. Polyhydroxyalkanoate synthesis using different carbon sources by two enhanced biological phosphorus removal microbial communities. **Process Biochemistry**, 44, p. 97–105, 2009.

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

RAMSAY, B.A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J.A. Production of Poly-(P-Hydroxybutyric-co-3-Hydroxyvaleric) Acids. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, p. 2093-2098, 1990.

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

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**, 376, p. 15-33, 2003.

REHM, B. H.; ANTONIO, R. V.; SPIEKERMANN, P.; AMARA, A. A.; STEINBÜCHEL, A. Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594, p. 178-190, 2002.

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

RIBEIRO, A.H.R. **Qualidade Microbiológica de Fermentados de *Sardinella brasiliensis* e Caracterização da Flora Bacteriana Total e Halofílica**. 2007. 45f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.

RODRIGUES, R. C. **Condições de cultura para a produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Ralstonia eutropha* a partir de resíduos de indústrias de alimentos**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3.ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, 50, 2004.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; HAMEED, A.; AHMED, S. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, 26, p. 246–265, 2008.

SHISHATSKAYA, E. I.; VOLOVA, T. G. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for *in vitro* cell cultures. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 15, p. 915-923, 2004.

SIRACUSA, V.; ROCCULI, P.; ROMANI, S.; ROSA, M.D. Biodegradable polymers for food packaging: a review. **Trends in Food Science & Technology**, 19, p. 634-643, 2008.

SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, 170, p. 4431-4436, 1988.

SLEPECKY, R.A.; LAW, J.H. Synthesis and degradation of poly-3-hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, 82, p. 37-42, 1961.

SOLAIMAN, D.K.; ASHBY, R.D.; LICCIARDELLO, G.; CATARA, V. Genetic organization of pha gene locus affects phaC expression, poly(hydroxyalkanoates) composition and granule morphology in *Pseudomonas corrugate*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 35, p. 111-120, 2008.

SOUZA, P.P.; SILVA, G.G.; AMARAL, L.O.F. Transição Vítrea. **Química Nova**, 20, 2004.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that

accumulate polyhydroxyalkanoic acids and others lipids storage compound. **Archives of Microbiology**, 128, p. 219-228, 1999.

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

STEINBÜCHEL, A.; EVERSLOH, L.T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, 16, p. 81-96, 2003.

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

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review of Biochemistry**, 74, p. 433-80, 2005.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, 25, p. 1503-1555, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, 24, p. 1596-1599, 2007.

TEIXEIRA, M.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, R.F.; COSTA, F.E.C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovariiedades em três estados brasileiros. **Pesquisa agropecuária brasileira**, 42, p.43-49, 2007.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of Polyesters Consisting of Medium-Chain-Length 3-Hydroxyalkanoic Acids from Gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and Other Fluorescent *Pseudomonads*. **Applied and Environmental Microbiology**, 56, p. 3360-3367, 1990.

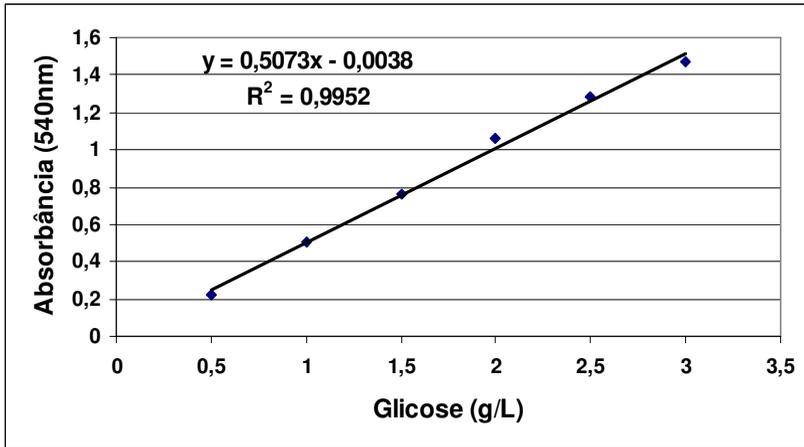
- VALAPPIL, S.P.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**, 91, p.1-17, 2007a.
- VALAPPIL, S.P.; MISRA, S.K.; BOCCACCINI, A.R.; KESHAVARZ, T.; BUCKE, C.; ROY, I. Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterized *Bacillus cereus* SPV. **Journal of Biotechnology**, 132, p. 251-258 2007b.
- VALAPPIL, S.P.; PEIRIS, D.; LANGLEY, G.J.; HERNIMAN, J.M.; BOCCACCINI, A.R.; BUCKE, C.; ROYA, I. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biosynthesis from structurally unrelated carbon sources by a newly characterized *Bacillus* spp. **Journal of Biotechnology**, 127, p. 475–487, 2007c.
- VASCONCELOS, Y. Plástico de açúcar. **Revista FAPESP**, 80, 2002.
- VIEIRA, L.M. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2004/2005. Mandioca. **Instituto CEPA/SC**, 2005.
- YOO, Y.J.; CHUNG, Y.J.; CHA, H.J.; YEO, J.S. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 83, p. 492-495, 1997.
- WEINGARTNER, V. **Identificação e Atividade Antimicrobiana de Bactérias Formadoras de Endósporos Isoladas de Ambientes Impactados pela Mineração do Carvão**. 2005. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – ênfase em Biotecnologia) – Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí.
- WU, Q.; HUANG, H.; HU, G.H.; CHEN, J.; HO, K.P.; CHEN, G.Q. Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. JMa5 cultivated in molasses media. **Antonie van Leeuwenhoek**, 80, p. 111–118, 2001.
- ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K.; DENNIS, D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia*

## Referências Bibliográficas

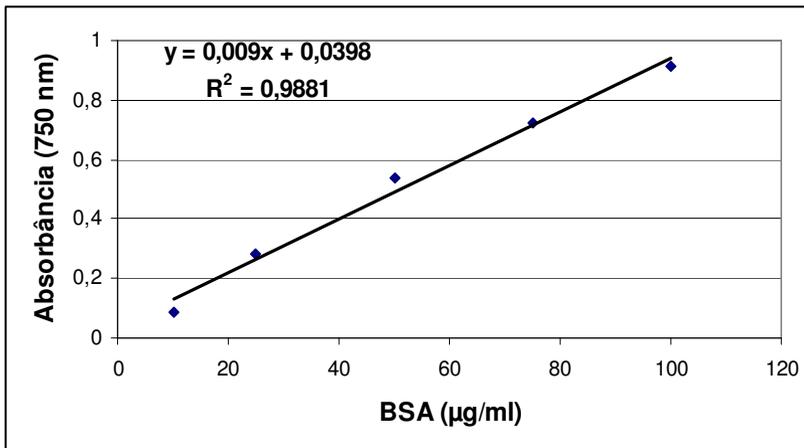
---

*coli* and *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, p. 1198-1250, 1994.

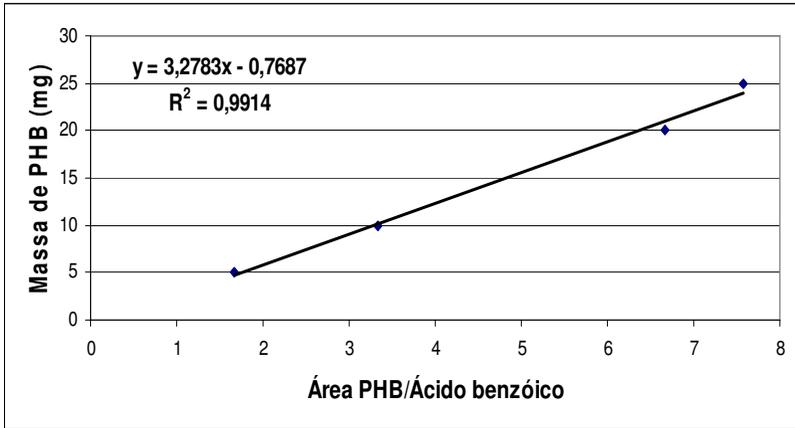
**ANEXOS**



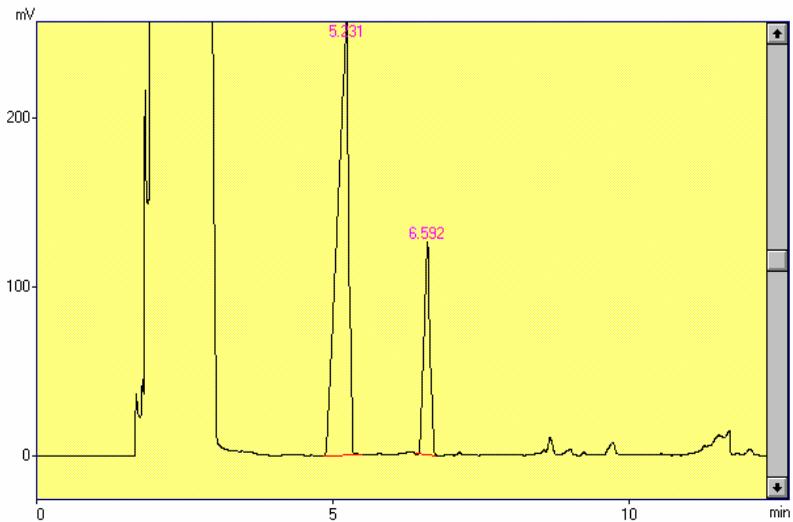
**Figura A.1.** Curva de calibração para determinação da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS).



**Figura A.2.** Curva de calibração para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Peterson (1977) (Lowry modificado).



**Figura A.3.** Curva padrão para determinação da concentração de P(3HB), estabelecida por meio da relação das áreas de P(3HB)/padrão interno pela massa de polímero.



**Figura A.4.** Exemplo de cromatograma obtido a partir da análise em Cromatografia Gasosa para o polímero produzido por LAMA265, cultivado em 20% de resíduo hidrolisado. O primeiro pico corresponde ao P(3HB) e o segundo ao ácido benzóico.

**Tabela A.1.** Microrganismos da coleção do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LAMA/UNIVALI) e informações sobre onde foram isolados e a partir de qual amostra.

<b>Código de Referência</b>	<b>Município</b>	<b>Local de Coleta</b>	<b>Amostra</b>	<b>Espécie</b>
LAMA002	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Água	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA032	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Sedimento	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA055	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Bacillus cereus</i>
LAMA100	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA102	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA113	Itajaí	-	Sardinha	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA135	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA142	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA159	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA167	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA169	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA174	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA176	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>

## Anexos

LAMA180	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus cereus</i>
LAMA258	Araquari			<i>Bacillus cereus</i>
LAMA260	Araquari			<i>Bacillus cereus</i>
LAMA091	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus ehimensis</i>
LAMA190	Indaial	Rio Warnaw	Água	<i>Bacillus ehimensis</i>
LAMA031	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Sedimento	<i>Bacillus firmus</i>
LAMA018	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Sedimento	<i>Bacillus licheniformis</i>
LAMA020	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Sedimento	<i>Bacillus licheniformis</i>
LAMA062	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Bacillus licheniformis</i>
LAMA084	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus licheniformis</i>
LAMA259	Araquari			<i>Bacillus licheniformis</i>
LAMA252	Araquari			<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA075	Brusque	Rio Itajaí-mirim		<i>Bacillus mycoides</i>
LAMA076	Itajaí	Rio Itajaí-mirim		<i>Bacillus mycoides</i>
LAMA157	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus mycoides/pseudomycoides</i>
LAMA054	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Bacillus racemilacticus</i>

## Anexos

LAMA083	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus racemilacticus</i>
LAMA086	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus racemilacticus</i>
LAMA092	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus racemilacticus</i>
LAMA090	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus simplex</i>
LAMA156	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus smithii</i>
LAMA023	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Água	<i>Bacillus subtilis</i>
LAMA095	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA146	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus subtilis</i>
LAMA148	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Bacillus thuringiensis</i>
LAMA098	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
LAMA099	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Geobacillus kaustophilus</i>
LAMA139	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus apiarius</i>
LAMA149	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus apiarius</i>
LAMA151	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus apiarius</i>
LAMA181	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus borealis</i>
LAMA186	Indaial	Rio Warnaw	Água	<i>Paenibacillus borealis</i>
LAMA262	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Bacillus megaterium</i>

## Anexos

LAMA272	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
LAMA273	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
LAMA274	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
Carlos32	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>
LAMA073	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA094	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Paenibacillus koreensis</i>
LAMA097	Criciúma	Rio Sangão	Água+sedimento	<i>Paenibacillus koreensis</i>
LAMA261	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA263	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA264	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA265	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Bacillus megaterium</i>
LAMA266	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
Carlos10	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA268	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus macquarensis</i>
LAMA051	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Paenibacillus pallidus</i>
Carlos12	Itajaí	Rio Itajaí-mirim	Água	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LAMA015	Capivari de Baixo	Rejeitos piritosos	Sedimento	<i>Paenibacillus polymyxa</i>

## Anexos

LAMA050	Criciúma	Carbonífera Criciúma		<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LAMA138	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LAMA184	Indaial	Rio Warnaw	Água	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LAMA133	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA136	Capivari de Baixo	área recuperada	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA140	Capivari de Baixo	rejeitos piritosos	Solo rizosférico	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA254	Araquari			<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA255	Araquari			<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>
LAMA256	Araquari			<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>

Tabela A.2. Sequência de nucleotídeos dos isolados selecionados.

Isolado	Sequência 16S rRNA
LAMA073	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAG CTTGCTTCTATGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTC GGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCAC TTACAGATGGGGCCCGGTCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACC TGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT CCGCAATGGACGAGAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGT TAGGGAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACTTTGACGGTACCTAACAGAAAAGCCACGGCTAACTACGT GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGC GGTT TCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAAAGTGGGAACTTGGAGTGCAGAAG AGAAAAGCGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGGCGGCT TTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGC GTAAACGGTGTAGTCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCCGCTG GGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA ATTCAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGAGCGTTCCTTCG GGGACAGAGTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA GCGCAACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGCCACTCTAAGGTGACTGCCGTTGCAAAACGGAGGAA GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAAGG GCTGCAAGACCGGAGGTTAAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTAC ATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC CCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGA CAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

## LAMA095

AGAGTCTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAG  
CTCGCTTCTATGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCG  
GGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTT  
ACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTG  
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTTCCG  
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAG  
GAAGAACAAGTACAAGAGTA ACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTA  
AGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA ACTTGAGTGCAGAAGAGAAA  
AGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAGGGCGGCTTTTGGT  
CTGTA ACTGACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTT TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT  
ACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGAA  
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTGTGACA ACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACA  
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC  
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAAGGGCTGCAAGAC  
CGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACCATCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGA  
ATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCAACCAC  
GAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGG  
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT

LAMA262

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACTGATTAGAAGC  
TTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTTCGG  
GAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTA  
CAGATGGGCCCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGA  
GAGGGTGATCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC  
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTGTGTGTTAGG  
GAAGAACAAGTACAAGAGTAACTGCTTGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTA  
AGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGAAA  
AGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTTTGGT  
CTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA AAC  
GATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCTTTAGTGTGTCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGT  
ACGGTGC AAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAA  
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGCAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGGACA  
GAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAAC  
CTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAAGGGCTGCAAGC  
CGCGAGGTCAAGCCAATCCCATAAAACATTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGA  
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAACCCAC  
GAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGG  
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

---

---

LAMA265

CGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGA  
ACTTGAGTGCAGAAGAGAAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCACT  
GGCGAAGGCGGCTTTTTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC  
TGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGTGCTGCAGCTAACGCATT  
AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACTCTAGAGATAGA  
GCGTTCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAA  
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACA  
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGTACAATGGAT  
GGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCGAGGTCAAGCCAATCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCA  
ACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTACACACCAGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGGAGTAACCGTAAGGAGCTAGCCGCCT  
AAGGTGGGACAGATGATTGGGGGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

---