

## Efecto del ácido acrílico en las propiedades térmicas de polihidroxicanoatos obtenidos con hidrolizados de cera de abeja

QUINTANAR-GÓMEZ, Samuel\*†, GRACIDA-RODRÍGUEZ, Jorge, ABREU-CORON, Arturo y TÉLLEZ-JURADO, Alejandro

Recibido 14 de Julio, 2017; Aceptado 4 de Septiembre, 2017

### Resumen

Se realizó la caracterización térmica de polihidroxicanoatos de cadena corta y media (scl-mcl-PHA) sintetizados con *Cupriavidus necator* a partir de hidrolizados de cera de abeja (Hw) y ácido acrílico; para evaluar la influencia de un inhibidor de la  $\beta$ -oxidación en las propiedades térmicas del biopolímero resultante. Se observó, que el ácido acrílico favoreció la incorporación de monómeros de cadena media (mcm), además de promover un aumento del % mol de 3-hidroxiocanoato (3HO), 3-hidroxi-decanoato (3HD) y 3-hidroxi-dodecanoato (3HDD). Estos resultados fueron confirmados mediante cromatografía de gases (GC) de scl-mcl-PHA metanolizados. Las propiedades térmicas de dichos materiales se vieron afectadas como consecuencia de la incorporación de los mcm, lo cual redujo su cristalinidad, dando como resultado un elastómero con apariencia similar a un hule, además de disminuir los valores de la temperatura de fusión ( $T_m$ ) en más de 100 °C con respecto al PHB y modificando su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ).

**Cupriavidus necator, Cera de abeja,  $\beta$ -oxidación, DSC, PHA**

### Abstract

The thermal characterization of short and medium chain polyhydroxyalkanoates (scl-mcl-PHA) synthesized with *Cupriavidus necator* using beeswax hydrolysates (Hw) and acrylic acid; was performed to evaluate the influence of an  $\beta$ -oxidation inhibitor in the thermal properties of the biopolymer. It was observed that acrylic acid favours the incorporation of medium chain monomers (mcm), in addition to promoting an increase mol % of 3-hydroxyoctanoate (3HO), 3-hydroxydecanoate (3HD) and 3-hydroxydodecanoate (3HDD). These results were confirmed by gas chromatography (GC) of methanolized scl-mcl-PHA. The thermal properties of these materials were affected as a consequence of the incorporation of mcm, which reduced their crystallinity, resulting in an elastomer with a similar appearance to a rubber, in addition to lowering the values of the melting temperature ( $T_m$ ) by more than 100 °C with respect to PHB and modifying its glass transition temperature ( $T_g$ ).

**Cupriavidus necator, Beeswax,  $\beta$ -oxidation, DSC, PHA**

**Citación:** QUINTANAR-GÓMEZ, Samuel\*†, GRACIDA-RODRÍGUEZ, Jorge, ABREU-CORON, Arturo & TÉLLEZ-JURADO, Alejandro. Efecto del ácido acrílico en las propiedades térmicas de polihidroxicanoatos obtenidos con hidrolizados de cera de abeja. Revista de Ingeniería Biomédica y Biotecnología. 2017, 1-1: 12-19.

\* Correspondencia al autor (email: sam\_quigo@yahoo.com.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor

## 1. Introducción

Diversos trabajos reportan que *Cupriavidus necator* (antes *Wautersia eutropha* > *Ralstonia eutropha* > *Alcaligenes eutrophus*) tiene la capacidad de producir mcl-PHA a partir del desarrollo de estrategias de alimentación con glucosa o fructosa, en combinación con ácidos grasos (Budde *et al*, 2011, López-Cuellar *et al*, 2011, Insomphun *et al*, 2013, Rathinasabapathy *et al*, 2013). López-Cuellar *et al*, (2011) sintetizaron un mcl-PHA con monómeros de 3-hidroxi octanoato (3HO) y 3-hidroxidodecanoato (3HDD) a partir de *C. necator*, cultivada con aceite de canola en una fermentación por lote alimentado de 3 etapas. Rathinasabapathy *et al*, (2013) reportaron la síntesis de un scl-mcl-PHA con monómeros de 3-hidroxi valerato (3HV), 3-hidroxi hexanoato (3HHx) y 3-hidroxi octanoato (3HO), enlazados a 3-hidroxi butirato (3HB), a partir del mismo método de síntesis. Debido a la naturaleza hidrofóbica de estos sustratos, algunos estudios han implementado estrategias de cultivo usando agentes emulsificantes para incrementar la superficie de contacto y su biodisponibilidad. Budde *et al*, (2011) describieron un método para el desarrollo de *R. eutropha* cultivada en aceite de palma a concentración del 1% en presencia de Tritón X-100 (concentración de 0.05 %) como agente emulsificante. Otra estrategia potencial consiste en inhibir las reacciones de  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos para obtener una producción más efectiva de mcl-PHA (Jiang, 2010).

Insomphun *et al*, (2013) estudiaron los efectos de la interrupción de las enzimas (S)-2-enoil-CoA hidratasa / (S)-3-hidroxi acil-CoA deshidrogenasa en *R. eutropha* para obtener información con respecto al mecanismo de  $\beta$ -oxidación y regular la composición de P(3HB-co-3HHx) sintetizado a partir de aceite de soja como fuente de carbono, observando una disminución en la fracción molar de 3HB (55.8 mmol/L a 32.1 mmol/L) acompañada de un incremento de la fracción monomérica de 3HHx (1.1 a 4.3 mmol/L). Jiang, (2010) sintetizó un mcl-PHA con monómeros de 3-hidroxi nonanoato (3HN) y 3-hidroxi heptanoato (3HHp) a partir de una cepa de *Pseudomonas putida* KT2440 alimentada con ácido nocánico como única fuente de carbono. Este estudio reportó que al adicionar ácido acrílico (0.02 g/L) como inhibidor de la  $\beta$ -oxidación al medio de cultivo, el copolímero obtenido presentó un incremento significativo de la fracción de 3HN (de 68 mol % a 88 mol %) en conjunto a la concentración de mcl-PHA intracelular.

La  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos es la ruta principal para la conversión de los ácidos grasos, y compuestos estructuralmente relacionados a precursores de mcl-PHA (Jiang, 2010). Muchos ésteres de ácidos grasos, además de compuestos cerosos homólogos de diferente longitud de cadena carbonada se encuentran en la cera de abeja (Maia y Nunes, 2013). Estos sustratos pueden ser liberados mediante hidrólisis alcalina y utilizados como fuente de carbono para la síntesis de scl-mcl-PHA. En este estudio, se analizó el efecto del ácido acrílico (Sigma-Aldrich) como inhibidor de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, durante la incorporación de monómeros de cadena media (mcm) y su influencia al caracterizar química y térmicamente los scl-mcl-PHA sintetizados con una cepa de *C. necator* alimentada con fracciones de hidrolizados de cera de abeja (Hw).

## 2. Metodología a desarrollar

**Microorganismo y medio de cultivo.** *C. necator* ATCC 17699 fue propagado en caldo Luria Bertani (LB) e incubado a 30 °C. El inóculo para todos los ensayos fue preparado por transferencia de 100 mL del matraz semilla con medio LB, incubado por 36 h a 150 rpm y 30 °C en un agitador rotatorio (Excella E24, New Brunswick Scientific). El medio de fermentación de la etapa 1 (cultivo en lote), primer lote alimentado en etapa 2 (producción de biomasa) y segundo lote alimentado en etapa 3 (síntesis de fracciones de mcl-PHA); son descritas en la Tabla 1. La solución de elementos traza fue definida por Shang *et al.*, (2004).

**Fermentación.** Los cultivos fueron realizados por triplicado, en una unidad de fermentación de 5 L (FA-5000, VICHÍ). El contenido del matraz semilla (10% v/v) fue transferido al medio de fermentación bajo las mismas condiciones descritas en la sección previa, el pH 7.0 fue controlado con NaOH 2M y HCl 0.47M. Las muestras fueron tomadas cada 3 h para cuantificar glucosa, sulfato de amonio, biomasa y PHA. La fermentación fue realizada acorde al método propuesto por López-Cuellar *et al.*, (2011). La solución de glucosa de 30 g/L fue alimentada a 50 mL/h (Chakraborty *et al.*, 2012) (MasterFlex L/S Model 77200-62) para alcanzar alta densidad celular. Durante la etapa 3 (síntesis de fracciones de mcl-PHA bajo limitación de nitrógeno), se utilizaron las fracciones de Hw (AG SA: ácido graso en ausencia de ácido acrílico, AG CA: ácido graso en presencia de ácido acrílico, OH SA: alcohol céreo en ausencia de ácido acrílico y OH CA: alcohol céreo en presencia de ácido acrílico) por separado como co-sustratos (en conjunto a la glucosa remanente de las etapas previas) a una concentración de 5 g/L, en presencia de 0.43 g/L Tritón X-100 (Sigma-Aldrich); 3 veces su CMC (Budde *et al.*, 2011) adicionado a 0.33 L/h.

Las fracciones de Hw en ausencia de ácido acrílico fueron consideradas como controles negativos. En relación a los experimentos en presencia de ácido acrílico (Sigma-Aldrich) se consideró adicionar una concentración de 3 mM (Jiang, 2010).

**Técnicas analíticas.** La determinación de peso seco (X) se realizó por gravimetría; la biomasa residual (rX) fue definida como la concentración de X sin PHA (Budde *et al.*, 2011). La concentración de glucosa fue determinada por el método de DNS (Barbosa *et al.*, 2005). La cuantificación de sulfato de amonio fue llevada a cabo por el método de Weatherburn (López-Cuellar *et al.*, 2011). La cantidad de hidrolizado de cera de abeja residual (rHw) fue definido como la concentración de Hw recuperado por centrifugado de la muestra; determinada por la ecuación 1 modificada, descrita por Budde *et al.*, (2011):

$$rHw = \text{masa recuperada} \left( \frac{V_{org}}{V_{transferido}} \right) \left( \frac{1}{V_{muestra}} \right) \quad (1)$$

Donde, V org es el volumen de la fase orgánica antes de la extracción. Debido a que la mezcla de disolventes incluye metanol, no todo el disolvente permanece en la fase orgánica después del contacto con el medio acuoso. Se midió el V org a 15 mL cuando se utilizó cloroformo/metanol 10:5. El V transferido fue de 5 mL y el V muestra de 10 mL (volumen tomado del medio de cultivo).

**Purificación de scl-mcl-PHA.** Los scl-mcl-PHA fueron purificados a partir de reflujo con cloroformo durante 10 minutos y precipitados con hexano frío (Nurbas y Kutsal, 2004). El procedimiento fue llevado a cabo tres veces para obtener un polímero purificado y evitar la presencia de residuos celulares además de posibles metabolitos residuales presentes en la cera de abeja. El solvente excedente fue removido por evaporación (R-210, BUCHI).

**Caracterización química de scl-mcl-PHA.** Se utilizó un sistema de CG Thermo scientific modelo Trace 1310, equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar Thermo scientific (30 m × 0.32 mm, un espesor de película de 1.0 μm). El gas acarreador fue He (flujo de 1 mL / min). Las rampas de temperatura fueron realizadas conforme al método de Rathinasabapathy *et al*, (2013). Las muestras de mcl-PHA fueron metanolizadas previamente para metilar los monómeros de ácidos grasos (Impallomeni *et al*, 2013). Los ésteres metílicos resultantes fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con estándares de 3-hidroxicanoatos.

**Caracterización térmica de scl-mcl-PHA.** Los experimentos de DSC fueron desarrollados usando un calorímetro de barrido diferencial (Mettler-Toledo DSC822e). Las muestras (8 mg) fueron encapsuladas en charolas de aluminio y calentadas en un rango de temperatura de -80 a 220 °C usando una rampa de calentamiento de 10 °C/min y tomando la segunda corrida como válida para determinar la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) y de fusión (T<sub>m</sub>) (Nurbas y Kutsal, 2004).

### 3. Resultados

#### Caracterización química de scl-mcl-PHA sintetizados con fracciones de Hw.

En la Tabla 2 se muestran los tiempos de retención establecidos por CG, para los estándares de ácidos grasos y los monómeros hidrolizados de scl-mcl-PHA. La determinación de las fracciones monoméricas del scl-mcl-PHA sintetizado con la fracción de alcoholes céreos de Hw sin ácido acrílico (OH SA), obtuvo una incorporación de mcm de 1.7 % mol en relación a la fracción de 3HB (% mol de 98.3).

Al cuantificar los monómeros del scl-mcl-PHA, sintetizados con la fracción de alcoholes céreos de Hw y ácido acrílico (OH CA), se observó una incorporación del 2.55 % mol correspondiente a 3HV, 0.70 % mol de 3HO y 0.34 % mol de 3HD en relación al 3HB (96.34 % mol). Estos resultados sugieren que la β-oxidación de las fracciones céreos de Hw se lleva a cabo de manera selectiva, favoreciendo la asimilación mayoritaria de componentes céreos de menor tamaño.

El bajo % mol de mcm fue atribuido a la acumulación previa de PHB, la cual desacelera la asimilación de la fracción de alcoholes céreos de Hw suministrada en el medio de cultivo, acumulando lentamente en forma de scl-mcl-PHA (Lee *et al*, 2008). Este efecto fue reportado por Khanna y Sirvastava, (2007), quienes observaron que al añadir ácido valérico a un medio de cultivo fresco, durante la síntesis de P(HB-co-HV) con glucosa, una gran cantidad intracelular de PHB acumulado, produjo un efecto de desaceleración metabólica, determinado por la mala asimilación del ácido valérico y bajo % mol de 3HV en el copolímero.

Al comparar el % mol de mcm, a partir de las fracciones de alcoholes céreos de Hw asimiladas por *C. necator*, se puede deducir que el ácido acrílico interrumpe la actividad de las enzimas enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa, impidiendo a su vez el catabolismo de precursores hasta acetyl-CoA. Riedel *et al*, (2014), mencionaron que la inhibición química de la β-oxidación en una cepa de *R. eutropha* H16 por adición de ácido acrílico produjo co-polímeros de poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-hexanoato) [P(HB-co-HHx)] al usar octanoato de sodio como única fuente de carbono. Dicho fenómeno fue observado en el experimento en el scl-mcl-PHA obtenido a partir de la fracción de alcoholes céreos de Hw en presencia de ácido acrílico (Tabla 2).

Los scl-mcl-PHA sintetizados a partir de la fracción de ácidos grasos de Hw sin ácido acrílico (AG SA), presentaron una composición porcentual de 97 % mol de 3HB en conjunto con un 3 % mol de 3HD.

La determinación de los monómeros del scl-mcl-PHA sintetizado con ácidos grasos de Hw y ácido acrílico (AG CA) mostró la presencia de 3HB (95.9 % mol), 3HO (3.0 % mol) y 3HD (1.1 % mol). La concentración de mcm fue similar a la reportada por Rathinasabapathy *et al*, (2013); quienes sintetizaron un scl-mcl-PHA a partir de *C. necator* alimentada con fructosa y aceite de canola en una fermentación por lote alimentado de 3 etapas, obteniendo una composición monomérica del 99.81 % mol correspondiente a 3HB, 0.06 % mol de 3HV, 0.09 % mol de 3HHx, 0.04 % mol de 3HO. El scl-mcl-PHA sintetizado a partir de la fracción de AG SA presentó un 3.0 % correspondiente a 3HDD (superior al obtenido en el polímero sintetizado a partir de la misma fuente de carbono en presencia de ácido acrílico).

Este resultado confirmó que la ausencia de ácido acrílico favorece la asimilación intracelular de precursores de mcm; sin embargo, su presencia en el medio de cultivo, inhibe la  $\beta$ -oxidación ácidos grasos de Hw, generando una baja incorporación del % mol de fracciones de mcm en el scl-mcl-PHA resultante.

Dicho comportamiento fue descrito por Guzik *et al*, (2014), quienes al comparar la composición monomérica de mcl-PHA obtenidos a partir de una cepa de *P. putida* KT2440 (nativa), y cuatro cepas de *P. putida* KT2440 con inserción inactiva de las enzimas acil-CoA deshidrogenasas (insPP\_1893, nsPP\_2039, nsPP\_2039 y insPP\_2437), observaron que la composición monomérica de los polímeros producidos por las cuatro cepas mutantes, difirió en menos del 5 % con respecto al mcl-PHA sintetizado por la cepa nativa de *P. putida* KT2440, además de presentar un patrón de reducción de crecimiento y consecuente acumulación de PHA cuando se alimentaban ácidos grasos con longitud de cadena carbonada de 10 a 14 C.

Impallomeni *et al*, (2013), reportaron al sintetizar un mcl-PHA (con 32 % mol de 3HD) a partir de *Pseudomonas aeruginosa* alimentada con aceite de *Brassica carinata* como fuente de carbono, (la cual contenía como componente mayoritario ácido cis-13-docosenoico, C<sub>22</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>), que el % mol de mcm incorporados en un mcl-PHA puede ser atribuido a la complejidad de la fuente de carbono utilizada. Al comparar los cuatro tratamientos de síntesis de scl-mcl-PHA a partir de las fracciones de Hw, se pudo apreciar que el ácido acrílico favorece la incorporación de mcm en conjunto a 3HB (Tabla 2), promoviendo un aumento del % mol de 3HO, 3HD y 3HDD, reportados en diferentes trabajos de síntesis de mcl-PHA a partir de aceites (López-Cuellar *et al*, 2011; Impallomeni *et al*, 2013; Rathinasabapathy *et al*, 2013).

Este comportamiento sugiere además que las fracciones ceras de Hw en presencia de ácido acrílico conforman un mayor % mol de monómeros de mcl-PHA intracelular antes de ser degradados a acetyl-CoA por efecto de la  $\beta$ -oxidación (Jiang *et al*, 2010).

El ácido acrílico es un inhibidor de la enzima  $\beta$ -cetotilasa, lo cual genera desviación de intermediarios en la  $\beta$ -oxidación a PHA (Riedel *et al*, 2014). Esto conforma que *C. necator*, al ser incapaz de catabolizar las fracciones de Hw por inhibición de la  $\beta$ -oxidación, acumuló los ácidos grasos de menor tamaño de las fracciones de Hw como mcm en el scl-mcl-PHA.

### Caracterización térmica de scl-mcl-PHA sintetizados con fracciones de Hw.

En el Gráfico 1 se muestra el DSC de los scl-mcl-PHA sintetizados a partir fracciones de Hw en presencia y ausencia de ácido acrílico, usando como referencia PHB ( $T_m$  de 173.38 °C). El termograma correspondiente a OH SA presentó dos valores de  $T_m$  (70.19 y 77.35 °C). El resultado de  $T_g$  obtenido en este experimento (Tabla 3), es reportado para mcl-PHA con propiedades elastoméricas (Impallomeni *et al*, 2013). Los valores de  $T_m$  y  $\Delta H_m$  (Tabla 3), fueron similares a los obtenidos por López-Cuellar *et al*, (2011) para un mcl-PHA con monómeros de 3HV, 3HO y 3HDD. La  $T_m$  sugirió la reducción de recristalización de monómeros de PHB dispersos debido a la incorporación del 4.6 % mol de 3HDD (López-Cuellar *et al*, 2011).

El termograma del scl-mcl-PHA sintetizado a partir de OH CA, nuevamente presentó una señal doble de  $T_m$  (Gráfico 1), atribuida a la recristalización de fracciones microcristalinas de PHB (López-Cuellar *et al*, 2011). La  $T_g$  y  $\Delta H_m$ , fueron similares a las reportadas por Impallomeni *et al*, (2011) (Tabla 3); para un mcl-PHA como monómeros de 3HHx, 3HO, 3HD, 3HDD y 3-hidroxitetradecanoato (3HTD) sintetizado a partir de *P. putida* alimentada con ácido erúico (ácido cis-13-docosenoico,  $C_{22}H_{42}O_2$ ) y nervónico (ácido cis-15-tetradecosenoico,  $C_{24}H_{46}O_2$ ).

La incorporación de monómeros de 3HB, 3HHx, 3HO y 3HD (en una composición de 47.12 % mol, 3.62 % mol, 21.11 % mol, y 28.14 %, respectivamente), disminuyó la  $T_m$  del scl-mcl-PHA sintetizado con OH CA con respecto al PHB (Khanna y Srivastava, 2007).

Los valores de  $\Delta H_c$  en ambos scl-mcl-PHA sintetizados con OH SA y OH CA fueron diferentes, relacionándose al aumento del % mol de mcm incorporados en la estructura del scl-mcl-PHA (asistido con ácido acrílico) y la interacción de sus enlaces intermoleculares (Impallomeni *et al*, 2011). Los resultados de  $T_m$  y  $\Delta H_m$  obtenidos durante el barrido térmico del scl-mcl-PHA sintetizado con AG SA, se muestran en la Tabla 3. La disminución de dichos valores con respecto a otros estudios sugiere la presencia de un mayor porcentaje de mcm. Al realizar el enfriamiento del scl-mcl-PHA, ocurrió una secuencia de transición exotérmica a 126.17 °C con una  $\Delta H_c$  de 6.14 J  $g^{-1}$ . Este comportamiento fue descrito por Impallomeni *et al*, (2011) quienes lo relacionan con la capacidad de algunos polímeros para recristalizar en función al % mol de mcm y los grupos funcionales presentes en las cadenas laterales, de mcl-PHA. Los valores de  $T_m$  (74.92 y 80.92 °C) y  $\Delta H_m$  (12.36 J  $g^{-1}$ ) obtenidos durante la caracterización térmica del scl-mcl-PHA sintetizado con AG CA (Tabla 3), confirmaron la presencia de mcm, debido a que los mcm influyen directamente en la disminución de la  $T_m$  de mcl-PHA (Impallomeni *et al*, 2011). Un ejemplo de este fenómeno fue descrito por Liu *et al*, (2011); quienes alimentaron un cultivo con ácido decanoico, dodecanoico y tetradecanoico para la obtención de un mcl-PHA con monómeros de PHD a partir de *P. KTQQ20* con inhibición de la  $\beta$ -oxidación.

El polímero resultante presentó una composición de P(16 % mol 3HD-co-84 % mol 3HDD) con una  $T_m$  de 78 °C y un  $\Delta H_m$  de 41 J  $g^{-1}$ , atribuidos a la presencia de monómeros de 3HD y 3HDD.

#### 4. Agradecimientos

Este proyecto se realizó gracias al financiamiento con clave 373182 CONACYT.

#### 5. Conclusiones

La caracterización térmica de las muestras de scl-mcl-PHA sintetizados a partir de las fracciones de Hw, mostró evidencia de incorporación de mcm en la estructura química de los scl-mcl-PHA, dando como resultado una disminución en los valores de  $T_m$  y  $T_g$  obtenidos durante el barrido térmico de las muestras con respecto al PHB. Al comparar las  $T_c$  obtenidas por los scl-mcl-PHA sintetizados en presencia de ácido acrílico, se confirmó la incorporación de una mayor cantidad de mcm durante el proceso de síntesis de scl-mcl-PHA. Estos resultados sugirieron que el ácido acrílico, favoreció la asimilación de los componentes cerosos de Hw, con lo cual *C. necator* aumentó el % mol de mcm como consecuencia del efecto inhibitorio de la  $\square$ -oxidación.

#### 6. Referencias

Barbosa B., Hernández A.E., Romero D.M., Sarmiento N.M. (2004). Producción de Poli- $\square$ -hidroxibutirato (PHB) por *Ralstonia eutropha* ATCC 17697. *UnivSci.* 10, 45-54.

Budde C.F., Riedel S.L., Hübner F., Risch S., Popović M.K., Rha C.K., Sinskey A.J. (2011). Growth and polyhydroxybutyrate production by *Ralstonia eutropha* in emulsified plant oil medium. *Appl Microbiol Biotechnol.* doi:10.1007/s00253-011-3102-0.

Chakraborty P., Muthukumarappanand K., Gibbons W.R. (2012). Research Article PHA Productivity and Yield of *Ralstonia eutropha* When Intermittently or Continuously Fed a Mixture of Short Chain Fatty Acids. *J Biomed Biotechnol.* Article ID 506153.

Impallomeni G., Ballistreri A., Carnemolla G.M., Guglielmino S.P., Nicolò M.S., Cambria M.G. (2011). Synthesis and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Brassica carinata* oil with high content of erucic acid and from very long chain fatty acids. *Int J Biol Macromol.* 48, 137-145.

Insomphun C., Mifune J., Orita I., Numata K., Nakamura S., Fukui T. (2013). Modification of  $\square$ -oxidation pathway in *Ralstonia eutropha* for production of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from soybean oil. *J. Biosci. Bioeng.* XX: 1-7.

Jiang X. (2010). Process development for the production and separation of medium-chain-length Poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas putida* KT2440. PhD Thesis Queen's University, Kingston, Ontario, Canada.

Khanna S., Srivastava A.K. (2007). SHORT COMMUNICATION. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34: 457 - 461.

Liu Q., Luo G., Zhou X.R., Chen G.Q. (2011). Biosynthesis of Poly(3-hydroxydecanoate) and 3-hydroxydodecanoate dominating polyhydroxyalkanoates by  $\square$ -oxidation pathway inhibited *Pseudomonas putida*. *Metab Eng.* 13, 11-17.

López-Cuellar M.R., Alba-Flores J., Gracida Rodríguez J.N., Pérez-Guevara F. (2011). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) with canola oil as carbon source. *Int J Biol Macromol.* 48: 74-80.

Maia M, Nunes FM. (2013). Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chem.* 136:961-968.

Guzik M.W., Narancic T., Ilic-Tomic T., Vojnovic S., Kenny S.T., Casey W.T. Duane G.F., Casey E., Woods T., Babu R.P., Nikodinovic-Runic J., O'Connor K.E. (2010). Identification and characterization of an acyl-CoA dehydrogenase from *Pseudomonas putida* KT2440 that shows preference towards medium to long chain length fatty acids. *Microbiology.* 160: 1760–1771.

Nurbas M. and Kutsal T. (2004). Production of PHB and P(HB-co-HV) Biopolymers by using *Alcaligenes Eutrophus*. *Iran Polym J.* 13, 45-51.

Rathinasabapathy A., Ramsay B.A., Ramsay J.A., Pérez-Guevara F. (2013). A feeding strategy for incorporation of canola derived medium-chain-length monomers into the PHA produced by wild-type *Cupriavidus necator*. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI:10.1007/s11274-013-1563-2.

Riedel, S.L., Jingnan L., Ulf S., Christopher J.B. (2014). Lipid and fatty acid metabolism in *Ralstonia eutropha*: relevance for the biotechnological production of value-added products. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 98 (4):1469–1483.

Shang L., Yim S.C., Park H.G., Chang H.N. (2004). Sequential Feeding of Glucose and Valerate in a Fed-Batch Culture of *Ralstonia eutropha* for Production of Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) with High 3-hydroxyvalerate Fraction. *Biotechnol Prog.* 20:140-144.