LIEGE ABDALLAH KAWAI

**MELHORAMENTO DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Pseudomonas* sp. ATRAVÉS DA
ANÁLISE MOLECULAR E MODIFICAÇÃO GENÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia
do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título Mestre em
Microbiologia.

São Paulo
2013

LIEGE ABDALLAH KAWAI

**MELHORAMENTO DA EFICIÊNCIA DE PRODUÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS POR *Pseudomonas* sp. ATRAVÉS DA ANÁLISE
MOLECULAR E MODIFICAÇÃO GENÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título Mestre em Microbiologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Kawai, Liege Abdallah.

Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxialcanoatos por *Pseudomonas* sp. através da análise molecular e modificação genética / Liege Abdallah Kawai. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Produção de polihidroxialcanoatos.

Versão do título para o inglês: Improvement of the efficiency of polyhydroxyalkanoates production by *Pseudomonas* sp. through molecular analysis and genetic modification.

1. *Pseudomonas* 2. Glicose marcada 3. Polihidroxialcanoatos
4. Via de Entner-Doudoroff 5. Recombinantes 6. Análise de fluxos metabólicos I. Gomez, Prof. Dr. José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB04/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Liege Abdallah Kawai.

Título da Dissertação: Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxicanoatos por *Pseudomonas* sp. através da análise molecular e modificação genética.

Orientador(a): Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 372/10 referente ao projeto intitulado: *"Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxiálcanoatos por Pseudomonas sp, através da análise molecular e modificação genética"* sob a responsabilidade de Liege Abdallah Kawai, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SÉRIES HUMANAS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO MAZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPSh - ICB/USP

Aos familiares e amigos.

Ao meu marido.

AGRADECIMENTOS

A Deus que não só caminhou ao meu lado, me levando no colo quando eu não tinha forças para prosseguir com minhas próprias pernas.

À minha mãe por apoiar minhas decisões e proporcionar a concretização de mais essa etapa de minha vida e ao meu pai por deixar maravilhosas lembranças em minha memória.

À minha família pelas palavras de apoio durante o período de elaboração e escrita do mestrado.

Ao meu marido pelo amor e paciência nos momentos de maior dificuldade, sempre me encorajando a seguir em frente.

À minha irmã, agradeço por tê-la como amiga e confidente.

Ao Professor Doutor José Gregório Cabrera Gomez pelos ensinamentos de inestimável valor e pela paciência durante todo meu trabalho.

À Professora Dra. Luiziana Ferreira da Silva e à Dra. Marilda Keico Taciro pelo apoio.

À HELIXXA pelo auxílio na finalização das análises desta dissertação.

Aos amigos do laboratório: Gabriela, que me auxiliou em todos os momentos, inclusive na entrega desta dissertação, à Paola, ao Luis, à Thatiane, ao Rafael, à Patricia, sempre presentes.

Ao meu grande amigo Emerson, que me auxiliou durante os estudos para a prova de ingresso ao mestrado .

Ao Aelson pelas análises e ensinamentos sobre HPLC e cromatografia.

Às amizades feitas antes ou durante o trabalho no laboratório, que seguirão em meu

coração e que de alguma maneira contribuíram na elaboração deste trabalho.

À CAPES pela bolsa concedida.

Obrigada por tudo.

“Façamos da interrupção um caminho novo.

Da queda um passo de dança,

do medo uma escada,

do sonho uma ponte,

da procura um encontro.”

(Fernando Sabino)

RESUMO

KAWAI, L. A. **Melhoramento da eficiência de produção de polihidroxialcanoatos por *Pseudomonas* sp. através da análise molecular e modificação genética.** 2013. 94 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A análise de fluxos metabólicos (AFM) do processo de produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 a partir de carboidratos revelou que essas fontes de carbono são metabolizadas principalmente pela via das pentoses (VP) que determina uma baixa eficiência de sua conversão em PHA (60-70% do valor máximo teórico). De acordo com modos elementares obtidos, eficiências significativamente maiores poderiam ser obtidas se uma parcela maior da glicose fosse metabolizada pela via Entner-Doudoroff (ED). Deste modo, o objetivo principal deste trabalho foi a realização da análise de fluxos metabólicos utilizando glicose marcada (C¹³) e o melhoramento genético de *Pseudomonas* sp. LFM046 utilizando estratégia de engenharia metabólica. Para cumprir estes objetivos, foram realizadas as seguintes etapas: (i) realização de experimentos para definição da melhor concentração de nitrogênio e fósforo a utilizar no meio de cultura favorecendo a produção de PHA; (ii) após a definição da composição do meio de cultura, foram realizados experimentos com glicose marcada com carbono 13, para confirmar os mecanismos de metabolização de carboidratos em *Pseudomonas* sp. LFM046; (iii) análise da presença dos genes *edd* e *eda*, específicos da via de Entner-Doudoroff em bactérias do gênero *Pseudomonas* através de buscas realizadas em bibliotecas genômicas; (iv) desenho de iniciadores genéricos (degenerados) para os genes *edd* e *eda*, à partir dos genes sequenciados (v) detecção de genes específicos da via de Entner-Doudoroff em *Pseudomonas* sp. LFM046 utilizando os iniciadores degenerados; (vi) Avaliação da expressão de genes específicos da via Entner-Doudoroff em *Pseudomonas* sp. LFM046 utilizando RT-PCR (reverse transcriptase) e (v) superexpressão de genes específicos da via Entner-Doudoroff em *Pseudomonas* sp. LFM046, através de clonagem de plasmídeos contendo inserto destes genes. Os experimentos com glicose marcada confirmaram um maior fluxo de carboidratos pela VP em relação a ED. Os genes *edd* e *eda* foram detectados com sucesso no genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046. A expressão destes genes foi detectada por RT-PCR, mas ainda necessitam ser confirmados pelo sequenciamento dos amplicons. A superexpressão de genes específicos de ED em *Pseudomonas* sp. LFM046 demonstrou apenas pequenos aumentos na eficiência de conversão de carboidratos em PHA pelas linhagens recombinantes.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos. *Pseudomonas*. Glicose marcada. Análise de fluxos metabólicos. Via de Entner-Doudoroff. Recombinantes.

ABSTRACT

KAWAI, L. A. **Improvement of the efficiency of polyhydroxyalkanoates production by *Pseudomonas* sp. through molecular analysis and genetic modification.** 2013. 94 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The metabolic flux analysis (AFM) of PHA_{MCL} production by *Pseudomonas* sp. LFM046 from carbohydrates revealed that these carbon sources are metabolized primarily by the pentose phosphate pathway (VP) which determines a low efficiency of conversion into PHA (60-70% of theoretical maximum). According to elementary mode analysis, significantly higher efficiencies could be obtained if a larger portion of the glucose was metabolized by the Entner-Doudoroff pathway (ED). Thus, the main objective of this study was to perform the metabolic fluxes analysis using labeled glucose (¹³C) and the genetic improvement of *Pseudomonas* sp. LFM046 using metabolic engineering strategy. To meet these objectives, the following steps were taken: (i) perform experiments to define the best concentration of nitrogen and phosphorus to use in the culture medium favoring the production of PHA; (ii) after the definition of the composition of the culture medium, experiments using glucose labeled with carbon 13 were performed, in order to confirm the mechanisms of carbohydrates metabolism in *Pseudomonas* sp. LFM046; (iii) evaluation of the presence of genes *eda* and *edd* specific from the Entner-Doudoroff pathway in *Pseudomonas* through searches performed in genomic libraries; (iv) designing generic primers (degenerated) for *edd* gene and *eda*, from sequenced genes; (v) detection of specific genes from Entner-Doudoroff pathway in *Pseudomonas* sp. LFM046 using the degenerate primers; (vi) Evaluation of the expression of specific genes from Entner-Doudoroff pathway in *Pseudomonas* sp. LFM046 using RT-PCR (reverse transcriptase) and (v) overexpression of the specific genes from Entner-Doudoroff pathway in *Pseudomonas* sp. LFM046 in plasmids containing these genes. The experiments with labeled glucose confirmed an increased flow of carbohydrates by VP compared to ED. The genes *edd* and *eda* were successfully detected in the genome of *Pseudomonas* sp. LFM046. The expression of these genes was detected by RT-PCR but their identities should be confirmed by sequencing the amplicons. The overexpression of specific genes from ED in *Pseudomonas* sp. LFM046 showed only small increases in the efficiency of conversion of carbohydrates into PHA by recombinant strains.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates. *Pseudomonas*. Labeled Glucose. Metabolic Flux Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema das vias metabólicas centrais EMP, ED e VP em <i>E. coli.</i> , citando os principais genes que codificam as principais enzimas para cada via	23
Figura 2 – Organização dos dois operons em <i>Pseudomonas putida</i> contendo os genes <i>edd</i> e <i>eda</i> , específicos da via de Entner-Doudoroff	24
Figura 3 - Vias metabólicas para a síntese de PHA _{MCL}	25
Figura 4 - Ilustração de como os padrões de distribuição de 1-C ¹³ podem ser utilizados na identificação das vias metabólicas ativas para o catabolismo de glicose.....	43
Figura 5 - Fragmentos característicos de propil-ésteres de 3HA obtidos por espectrometria de massas.....	44
Figura 6 - Espectrometria de massa da amostra 1 PL 0,06 B.....	45
Figura 7 - Acetil-CoA originado a partir de frutose-6-fosfato, através das vias EMP e ED, mostrando os diferentes embaralhamentos que podem ocorrer quando são utilizadas moléculas diferentes de frutose-6-fosfato para a formação de piruvato.....	50
Figura 8 - Cálculo da frequência de ocorrência de cada tipo de isotopômero do fragmento m/z = 131 Considerando o metabolismo de glicose marcada (20%) e não marcada (80%) pelas vias ED, EMP ou VP+ED ou ainda um caso particular VP + ED (ver essa situação particular no texto).....	54
Figura 9 - Espectrometria de massa, onde m/z= relação massa/carga, demonstrando os fragmentos 89 (m) e 131 (m), com a incorporação de 1, 2 ou 3 moléculas de carbono marcado (m+1, m+2 e m+3, respectivamente).....	55
Figura 10 - Disposição do gene <i>edd</i> em operon em <i>Pseudomonas</i>	58
Figura 11 - Árvore de identidade entre as linhagens utilizadas para o alinhamento e consequente desenho de oligonucleotídeos para detecção do gene <i>eda</i> em <i>Pseudomonas sp</i> LFM046.....	58
Figura 12 – Operon contendo o gene <i>eda</i>	59
Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% de amplicons obtidos com iniciadores para os genes <i>edd</i> ou <i>eda</i>	61
Figura 14 - cDNAs de <i>Pseudomonas sp.</i> LFM046 obtidos a partir de iniciadores específicos da via ED para o gene <i>edd</i>	65
Figura 15 - cDNAs de <i>Pseudomonas sp.</i> LFM046 obtidos à partir de iniciadores específicos da via ED para o gene <i>eda</i>	66

Figura 16 – Perfil eletroforético em gel de agarose dos amplicons obtidos com o par de iniciadores EDAF KT2440 e EDAR KT2440, à partir de plasmídeos com inserto..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios de cultura sob limitação de nitrogênio, fósforo ou sem limitação.....	30
Tabela 2 - Concentração para a solução de elementos traço.	30
Tabela 3 - Produção de PHA _{MCL} em cultivos em agitador rotativo.....	38
Tabela 4 - Valores de $Y_{HAN/CHAN}$ estimados para cada um dos monômeros constituintes de PHA _{MCL}	39
Tabela 5 - Produção de PHA à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio.....	40
Tabela 6 - Produção de PHA à partir de glicose marcada no primeiro carbono, sob restrição em fósforo ou nitrogênio.	42
Tabela 7 - Análise em espectrometria de massas, do ensaio contendo 1-C ¹³ glicose como fonte de carbono	46
Tabela 8 - Produção de PHA à partir de mistura de glicose marcada e não marcada (20:80, respectivamente), sob restrição de fósforo ou nitrogênio.....	47
Tabela 9 - Produção de PHA utilizando glicose marcada e não marcada (20:80), respectivamente, em meios sem nitrogênio (SN) ou sem fósforo (SP).....	49
Tabela 10 - Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA considerando o metabolismo de glicose marcada (20 %) e não marcada (80 %) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).	52
Tabela 11 - Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento m/z = 131 (m/z = 89) considerando o metabolismo de glicose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).	53
Tabela 12 - Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas das amostras 2 NL 0,3 A, 4 PL 0,06, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade.....	55
Tabela 13 - Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade	56
Tabela 14 - Oligonucleotídeos empregados para detecção do gene <i>edd</i>	58
Tabela 15 - Oligonucleotídeos empregados para detecção do gene <i>eda</i>	60
Tabela 16 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene <i>edd</i> e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRL.....	64
Tabela 17 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene <i>edd</i> e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRC	64

Tabela 18 – Iniciadores para genes <i>edd</i> e <i>eda</i> desenhados a partir de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.....	67
Tabela 19 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene <i>edd</i> e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRC	68
Tabela 20 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene <i>edd</i> e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o iniciador EDDF.	69
Tabela 21 - Produção de PHA _{MCL} por recombinantes de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046.....	71

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 OBJETIVO	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Polihidroxicanoatos	20
3.2 Importância econômica	21
3.3 Vias metabólicas centrais em <i>Pseudomonas</i> e produção de PHA	23
3.4 Análise de fluxos metabólicos utilizando glicose marcada com carbono 13	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Bactéria	29
4.2 Meios de Cultura	29
4.3 Condições de Cultivo	30
4.4 Condições analíticas	31
4.5 Extração de DNA genômico	32
4.6 Análise de genes da via de ED em <i>Pseudomonas</i> e desenho de iniciadores	33
4.7 Condições para o PCR	33
4.8 Eletroforese	34
4.9 RT-PCR (reverse transcriptase)	34
4.10 Superexpressão gênica	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Eficiência de conversão de carboidratos em PHA	36
5.2 Ensaio para definição do melhor Meio Mineral a ser utilizado em ensaios com glicose marcada com C ¹³	39
5.3 Experimentos utilizando glicose marcada	41
5.4 Análise da presença dos genes <i>edd</i> e <i>eda</i> em <i>Pseudomonas</i> sp LFM046	57
5.5 Avaliação da expressão gênica através de RT-PCR (reverse transcriptase)	64
5.6 Superexpressão dos genes <i>edd</i> e <i>eda</i>	66
6 CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS	74
REFERÊNCIAS	75
APÊNDICE	83
APÊNDICE A – Tabela completa do primeiro experimento para produção de PHA _{MCL} à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio	83

APÊNDICE B - Tabela completa do segundo experimento para produção de PHA _{MCL} à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio.....	85
APÊNDICE C – Ensaio utilizando como fonte de carbono 20% de glicose marcada em todos os carbonos e 80% de glicose não marcada.....	87
APÊNDICE D – Ensaio utilizando como fonte de carbono 20% de glicose marcada em todos os carbonos e 80% de glicose não marcada.....	89
APÊNDICE E - Tabela completa dos Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade	90
APÊNDICE F – Resultados de sequenciamento dos amplicons gerados à partir de PCR utilizando os iniciadores EDDF/EDDRL e <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	91
APÊNDICE G - Resultados de sequenciamento dos amplicons gerados à partir de PCR utilizando os iniciadores EDDF/EDDRC e <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	92
APÊNDICE H - Resultado de sequenciamento do inserto do gene <i>edd</i> no plasmídeo pBBR1MCS-2, para o recombinante <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 <i>edd</i>	93
APÊNDICE I – Resultado de sequenciamento do inserto do gene <i>edd</i> no plasmídeo pBBR1MCS-2, para o recombinante <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 <i>edd eda</i>	94

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres produzidos por diversas bactérias e acumulados sob a forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia ou equivalentes redutores, podendo representar até 80% da massa seca celular (ANDERSON; DAWES, 1990).

O primeiro e mais estudado dentre os PHAs foi o poli-3-hidroxibutirato (P3HB). Este polímero é acumulado por bactérias pertencentes aos mais diversos grupos taxonômicos (STEINBUCHER, 1991). Em meados do século XX, foram observadas suas propriedades termoplásticas (BAPTIST, 1962a), o que levou ao primeiro empreendimentos para sua produção comercial, que por diferentes razões não foi bem sucedida. A crise do petróleo nos anos 70 reacendeu muito o interesse industrial por esses polímeros e levou a detecção de outros monômeros que podiam ser inseridos ao polímero permitindo modificar suas propriedades termomecânicas (HOLMES, 1985; KUNIOKA; TAMAKI; DOI, 1989).

No início dos anos 80, a família dos PHAs ganhou um novo importante membro. Foi verificada a capacidade de acúmulo de um PHA contendo 3-hidroxi octanoato por *Pseudomonas oleovorans* (DE SMET et al., 1983). Logo foi observado que diferentes monômeros contendo de 6 a 14 átomos de carbono podem ser incorporado aos PHAs produzidos por diferentes espécies de *Pseudomonas* (BRANDL et al., 1988; HAYWOOD et al., 1989; HUISMAN et al., 1989; LAGEVEEN et al., 1988). Levando em conta sua composição monomérica, os PHA produzidos por *Pseudomonas* foram denominados PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}). Com relação a suas propriedades mecânicas, PHA_{MCL} se assemelham a elastômeros (DE KONING et al., 1995), ou seja, apresentam propriedades bastante distintas do P3HB, ou mesmo copolímeros contendo 3HB e outros comonômeros.

No início dos anos 90, foi desenvolvido no Brasil um programa de isolamento de bactérias produtoras de P3HB e que levou à detecção de bactérias capazes de produzir outros PHAs (GOMEZ et al., 1996; RODRIGUES et al., 1995). Dezesesseis isolados capazes de produzir PHA_{MCL} foram detectados (GOMEZ et al., 1996). A avaliação desses isolados revelou que apresentavam uma eficiência de conversão de carboidratos em PHA_{MCL} que atingia no máximo 60-70% do valor máximo teórico (GOMEZ, 2000).

Taciro (2008) estudou a produção de PHA_{MCL} a partir de carboidratos em cultivo contínuo por *Pseudomonas* sp. LFM046. Uma rede metabólica foi construída para representar a produção de PHA_{MCL} por essa bactéria. Foram estabelecidos os diferentes modos elementares

que representariam essa rede metabólica em estado estacionário. O modo elementar que melhor se ajustava aos dados de uma das condições experimentais avaliada indicou um fluxo intenso na via das pentoses. A análise de outros modos elementares revelou que para aumentar a eficiência de conversão de carboidrato em PHA_{MCL}, era necessário aumentar o fluxo na via de Entner-Doudoroff. Este trabalho teve por objetivo aprimorar a análise do metabolismo de conversão de carboidratos (glicose) em PHA_{MCL}. Assim, foi suprida glicose marcada (C¹³) a *Pseudomonas* sp. LFM046 e se analisou a distribuição de isotopômeros no PHA_{MCL} produzido. Além disso, foi analisada a presença e expressão de genes específicos da via de Entner-Doudoroff nessa bactéria. Finalmente, esses genes foram clonados com o objetivo de avaliar o efeito de sua superexpressão na conversão de carboidratos em PHA.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é o melhoramento genético de *Pseudomonas* sp. LFM046 com relação à eficiência de conversão de carboidratos em polihidroxialcanoatos utilizando estratégias de Engenharia Metabólica. Para isto, foram efetuados os seguintes objetivos específicos:

- realização de experimentos utilizando carbono marcado para confirmar os mecanismos de metabolização de carboidratos em *Pseudomonas* sp. LFM046;
- análise da presença de genes específicos da via de Entner-Doudoroff (ED) em bactérias do gênero *Pseudomonas* com genoma sequenciado;
- detecção de genes específicos da via ED em *Pseudomonas* sp. LFM046;
- avaliação da expressão de genes específicos da via ED em *Pseudomonas* sp. LFM046;
- super-expressão de genes específicos da via ED em *Pseudomonas* sp. LFM046.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres produzidos por diversas bactérias e acumulados sob a forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono, energia ou equivalentes redutores, podendo representar até 80% da massa seca celular (ANDERSON; DAWES, 1990). Estes polímeros são acumulados de forma mais expressiva sob condições desbalanceadas de crescimento, ou seja, quando há excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial para a multiplicação celular (BRANDL et al., 1990). São termoplásticos biodegradáveis consistindo de monômeros com configuração *R* e a massa molecular pode ser da ordem de 10^5 - 10^6 Da (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Os PHAs são divididos em dois grandes grupos: PHAs contendo monômeros de cadeia curta (PHA_{SCL} – monômeros C3 a C5 na cadeia principal) e PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL} – monômeros C6 a C14 na cadeia principal) (GOMEZ, 2000).

O poli-3-hidroxitirato (P3HB) e seus copolímeros são PHA_{SCL} produzidos por bactérias de diferentes gêneros e alguns empreendimentos foram realizados para sua produção industrial (LEMOS et al., 2006). PHA_{MCL} são produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, apresentando-se como elastômeros ou géis viscosos e uma série de aplicações têm sido propostas para esses polímeros (KIM et al., 2007; WITHOLT; KESSLER, 1999), tais como: a confecção de filmes de recobrimento (DE KONING et al., 1997); agentes ligantes em formulações de tintas a base de água (VAN DER WALLE et al., 1999); como fonte de monômeros quirálicos para a síntese de compostos ativos (EUGENIO et al., 2010; WITHOLT; KESSLER, 1999), como componentes de adesivos sensíveis à pressão (BABU et al., 1997) e como suporte para engenharia de tecidos e implantes médicos temporários (KIM et al., 2007; MISRA et al., 2006; WANG et al., 2002; ZINN et al., 2001).

Algumas espécies de *Pseudomonas* são capazes de produzir PHA_{MCL} a partir de carboidratos e outras fontes de carbono metabolizadas a acetil-CoA (HAYWOOD et al., 1990; TIMM; STEINBÜCHEL, 1990). A utilização de ácidos graxos e óleos vegetais permite a diversificação da composição de monômeros, promovendo também diferentes rendimentos no acúmulo de PHA (FERNÁNDEZ et al., 2005; HABA et al., 2007; KELLERHALS et al., 2000; MARSUDI et al., 2008; SOLAIMAN; ASHBY; FOGLIA, 1999; SOLAIMAN; ASHBY; FOGLIA, 2001; SOLAIMAN; ASHBY; FOGLIA, 2002; SONG et al., 2008; THAKOR; TRIVEDI; PATEL, 2005).

Desde a descoberta do poli-3-hidroxibutirato (P3HB), em *Bacillus megaterium*, em 1926, bactérias pertencentes a mais de 90 gêneros foram identificadas como capazes de acumular estes poliésteres (LUENGO et al., 2003). Os micro-organismos mais estudados para a produção de PHA são *Ralstonia eutropha* (conhecida previamente como *Alcaligenes eutrophus*) (KIM et al., 2005), *Pseudomonas* spp. (DANIEL et al., 1992; FULLER et al., 1992; KIMURA et al., 1992) e *Azotobacter* spp. (POZO; MARTINEZ-TOLEDO, 2002). Cada um destes micro-organismos pode acumular uma quantidade considerável de PHA na presença de uma grande quantidade de fonte de carbono. Por exemplo, de acordo com Jung et al. (2002) e Reddy et al. (2003), o acúmulo de PHA por *Alcaligenes eutrophus* pode atingir mais do que 80% da massa seca celular (MSC) utilizando frutose ou glicose como fonte de carbono.

3.2 Importância econômica

A partir da década de 60, estes polímeros passaram a despertar grande interesse industrial, pois se verificou que apresentavam propriedades termoplásticas (BAPTIST, 1962a; 1962b). Atualmente, cerca de 150 monômeros diferentes já foram detectados como constituintes de PHAs produzidos por bactérias (REHM; STEINBÜCHEL, 1999). Uma vez que as propriedades mecânicas destes materiais podem ser moduladas em função de sua composição monomérica, diversos autores acreditam que PHAs poderão se constituir em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações.

Uma das questões importantes a ser respondida é a fatia do mercado em que PHA poderiam substituir os plásticos de origem petroquímica. Em uma pesquisa feita no oeste da Europa em 2007, observou-se que 43% de todos os plásticos eram utilizados para embalagens, 21% eram utilizados em prédios e construções, 8% para automóveis, 5% para materiais eletroeletrônicos e os 23% restantes eram utilizados para outras aplicações. Na sua maioria, esses plásticos são polipropileno, polietileno, PVC (cloreto de polivinila) e PET (polietilenotereftalato). Hoje se sabe que o potencial técnico para a substituição dos plásticos em geral por bioplásticos é de 90%. Esse valor é calculado de acordo com as propriedades técnicas desses plásticos de origem biológica, pois nem sempre esse potencial de substituição pode ser realizado devido a questões de viabilidade econômica e disponibilidade de recursos. Por essa razão, as pesquisas atuais têm tentado tornar a produção de bioplásticos viável e em grande escala, para que estes possam num futuro próximo substituir a maior parte dos compostos petroquímicos que são utilizados hoje. De acordo com o estudo realizado, os

PHAs em conjunto com outros bioplásticos teriam potencial técnico para substituir 90% dos plásticos de origem petroquímica, correspondendo a uma quantidade de 204,698 milhões de toneladas/ano (SHEN et al., 2010).

No Brasil, foi desenvolvido processo de produção de P3HB e co-polímeros P3HB-*co*-3HV em sistema integrado em usinas de açúcar e álcool. Custos reduzidos de produção são garantidos valendo-se do uso insumos presentes no sistema e com baixo custo (NONATO et al., 2001). Além disso, nesse sistema se utiliza energia renovável, garantindo um ciclo realmente verde de produção (GERNGROSS; SLATER, 2000; NONATO et al., 2001). A possibilidade de gerar PHA_{MCL} em um sistema de produção desses polímeros integrado a usinas de açúcar e álcool permitiria diversificar os materiais produzidos e atender os requisitos para diferentes tipos de aplicação. Além de PHA_{MCL}, co-polímeros de P3HB-*co*-HA_{MCL} também poderiam ser produzidos utilizando linhagens recombinantes de *Pseudomonas* (GOMES, 2010).

Em 1998, com apoio do PADCT (CNPq) iniciaram-se estudos no Brasil sobre a produção de PHA_{MCL}. Foram selecionadas linhagens produtoras de PHA_{MCL} (GOMEZ, 2000; SILVA-QUEIROZ et al., 2003) e estudada sua produção (DINIZ et al., 2004; SILVA-QUEIROZ et al., 2009), além da caracterização deste polímero (SANCHEZ et al., 2003). Mesmo a melhor linhagem selecionada apresentou apenas 60-70% da eficiência de conversão de carboidratos em PHA_{MCL} (GOMEZ, 2000).

Taciro (2008) estudou a produção de PHA_{MCL} a partir de carboidratos em cultivo contínuo por *Pseudomonas* sp. LFM046. Foram realizados experimentos em diferentes vazões específicas e sob diferentes relações de carbono e nutriente limitante do crescimento celular (nitrogênio e/ou fósforo). Dessa forma, foi possível identificar a região de dupla limitação nutricional e explorar ao máximo o acúmulo de PHA sob limitação de nitrogênio e/ou fósforo. Utilizando dados obtidos em estado estacionário foi implementada a análise de fluxos por balanços metabólicos. Os resultados indicaram que a bactéria deveria estar utilizando principalmente a via das Pentoses no metabolismo de carboidratos. A análise de diferentes modos elementares de funcionamento do metabolismo demonstrou ainda que para aumentar a eficiência de síntese de PHA_{MCL} a partir de carboidratos, seria necessário um aumento do fluxo de glicose pela via de Entner-Doudoroff.

3.3 Vias metabólicas centrais em *Pseudomonas* e produção de PHA

As vias metabólicas centrais para o metabolismo de carboidratos em bactérias são: Embden-Meyerhof Parnas (EMP), Entner-Doudoroff (ED) e via das pentoses (VP). Um esquema simplificado demonstrando os passos de cada via, citando os principais genes que codificam as enzimas responsáveis pela oxidação dos açúcares é apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema das vias metabólicas centrais EMP, ED e VP em *E. coli.*, citando os principais genes que codificam as principais enzimas para cada via

Fonte: Adaptada de Ponce, García e Muñoz, 2005.

Observando-se a Figura 1, verifica-se que as vias EMP e ED são responsáveis pela conversão de glicose a gliceraldeído-3-fosfato, que posteriormente é convertido a piruvato. A diferença entre elas é a participação de algumas enzimas que convertem intermediários do

catabolismo de glicose ao gliceraldeído-3-fosfato. Para que a glicose seja metabolizada pela via ED, são necessárias duas enzimas, a 6-fosfogliconato desidratase, codificada pelo gene *edd* e a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato (KDPG) aldolase, codificada pelo gene *eda* (CASTILLO; DUQUE; RAMOS, 2008; DADDAOUA; KRELL; RAMOS, 2009; KIM; JEON; PARK, 2008).

Em *Pseudomonas putida*, estes genes encontram-se dispostos em dois operons distintos, o primeiro com quatro genes, o *edd*, *glk*, *gltR2* e *glts* e o segundo contendo três genes, o *zwf*, *pgl*, e *eda*, representados na Figura 2 (CASTILLO; DUQUE; RAMOS, 2008; DADDAOUA; KRELL; RAMOS, 2009; KIM; JEON; PARK, 2008).

Figura 2 – Organização dos dois operons em *Pseudomonas putida* contendo os genes *edd* e *eda*, específicos da via de Entner-Doudoroff

Fonte: Daddaoua, Krell e Ramos, 2009.

Conforme citado anteriormente, a via EMP também pode ser utilizada por micro-organismos para o metabolismo de carboidratos, também convertendo glicose a gliceraldeído-3-fosfato, sendo caracterizada pela presença da enzima fosfofrutoquinase, codificada pelo gene *pfk*. De acordo com White (2006) esta enzima não é descrita para *Pseudomonas*, o que sugere a ausência da via EMP nestes micro-organismos.

A VP, também conhecida como via das pentoses fosfato, é importante para a formação de pentoses, açúcares com 5 carbonos, necessários para a produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, entre outros compostos celulares. Além disso, NADP^+ é reduzido a NADPH durante a oxidação dos intermediários desta via, o qual é utilizado em outras vias de biossíntese. A partir destas vias, é formado o acetil-Coenzima-A, que pode ser destinado para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos, também conhecido como ciclo de Krebs, ou para a síntese de PHA.

De acordo com Witholt e Kessler, (1999), a biossíntese de PHA_{MCL} em bactéria está intimamente ligada a três vias metabólicas diferentes, que geram moléculas precursoras de PHA_{MCL} (Figura 3): (I) a via de biossíntese de ácidos graxos *de novo*, que produz precursores de (R)-3-hidroxiacil-CoA de fontes de carbono não relacionadas, como glicose e gliconato; (II) a degradação de ácidos graxos pela β -oxidação que é a principal via de catabolismo dos ácidos graxos; (III) elongação de cadeia, na qual acil-CoA é estendido com acetil-CoA. Essas vias metabólicas produzem diversas moléculas precursoras de PHA_{MCL}, apresentando número de carbonos diferentes.

Figura 3 - Vias metabólicas para a síntese de PHA_{MCL}

Fonte: Adaptada de Witholt e Kessler, 1999.

Com relação ao metabolismo para a produção de PHA, o primeiro a ser descoberto e desta maneira, melhor estudado, é o P3HB. No metabolismo bacteriano, a acetil-coenzima A (acetil-CoA) é produzida e convertida a P3HB por três enzimas biossintéticas: (i) 3-cetotiolase, (ii) acetoacil-CoA redutase e PHA sintase. Durante o crescimento bacteriano, a 3-cetotiolase será inibida por coenzimas A livres, liberadas pelo ciclo de Krebs. Quando a metabolização do acetil-CoA no ciclo de Krebs é reduzida devido à limitação de algum nutriente que não seja fonte de carbono, este acetil-CoA excedente é levado à biossíntese de PHA.

Considerando a síntese de P3HB, a 3-cetotiolase combina 2 moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA. Em seguida, a acetoacetil-CoA redutase promove a redução do acetoacetil-CoA, oxidando NADPH, a 3-hidroxiacetil-CoA. Na etapa final, a PHA sintase polimeriza 3-hidroxiacetil-CoA a P3HB, liberando a coenzima A.

Em relação à produção de PHA_{MCL}, supõe-se que as moléculas enoil-CoA e 3-cetoacil-CoA (intermediários da β -oxidação de ácidos graxos) sejam subsequentemente convertidas a moléculas de *R*-3-hidroxiacil-CoA pelas enzimas enoil-CoA hidratase (PhaJ) e 3-cetoacil-ACP redutase (PhaB), respectivamente. (STEINBÜCHEL; HEIN, 2001). Quando são utilizados ácidos graxos ou óleos vegetais como fonte de carbono, a enoil-CoA redutase (PhaJ) é a principal fornecedora do (*R*)-3-hydroxyacyl-CoA para a biossíntese de PHA. Há ainda uma conexão da biossíntese de ácidos graxo *de novo* com a biossíntese de PHA, uma vez que (*R*)-3-hidroxiacil-ACP é convertido a (*R*)-3-hidroxiacil-CoA, pela ação de uma transacilase (PhaG). O (*R*)-3-hidroxiacil-CoA será incorporado a cadeia de PHA pela ação da PHA sintase (PhaC), liberando a coenzima A (CoA) (KIM et al., 2007; VERLINDEN et al., 2007).

3.4 Análise de fluxos metabólicos utilizando glicose marcada com carbono 13

O estado metabólico celular e consequentemente um mapa de fluxos metabólicos não pode ser diretamente extrapolado através do genótipo, nem do mapeamento completo da expressão gênica, tampouco do mapeamento completo (proteômico) da concentração proteica individualmente ou em combinação. Estas abordagens desconsiderariam o fato de haver relação entre a expressão gênica, concentração proteica e taxas de reações metabólicas, que não é linear, nem unidirecional. Desta maneira, a análise de fluxos metabólicos tem se tornado uma importante ferramenta para a compreensão da fisiologia celular dos micro-organismos e permite uma quantificação do estado estacionário de fluxos intracelulares numa rede metabólica, através da quantificação e qualificação de metabólitos por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS) ou ressonância magnética (NMR) (CHOUDHARY et al., 2011; KLAPA, 2010; NIELSEN, 2003).

Deste modo, é possível a definição de um modelo que descreve a propagação dos átomos marcados em uma rede metabólica em dados experimentais e o destino final dos átomos marcados permite que os fluxos metabólicos internos sejam decifrados sob um estado estacionário e condições transitórias (que representam cálculo de resultados complexo e, portanto, uma avaliação difícil, porém possível) (CHOUDHARY et al., 2011; KLAPA, 2010;

NIELSEN, 2003). Com foco no estudo de vias metabólicas, marcadores isótopos tem sido aplicados para uma grande diversidade de propósitos, por exemplo, para quantificação de reações reversíveis (METALLO; WALTHER; STEPHANOPOULOS, 2009). Um marcador isotópico é uma molécula contendo átomo(s) que foi substituído por um isótopo diferente. Este isótopo pode ser radioativo, como ^{14}C , ou estável, como ^{13}C , ^{18}O , ^{16}N e possui aplicações diversas na análise de vias metabólicas (CROWN; ANTONIEWICZ, 2012).

Uma aplicação direta de marcadores isotópicos é a comprovação de que determinada via metabólica está presente em determinado micro-organismo e como está distribuída sua atividade, por exemplo, pela análise do acúmulo desta marcação com isótopos em um produto metabólico final de uma via. Marcadores também podem fornecer dados sobre a estrutura de vias metabólicas, estequiometria de reações enzimáticas, presença de vias convergentes e a atividade relativa de vias que competem pelo mesmo substrato (CROWN; ANTONIEWICZ, 2012; CROWN et al., 2011; DE GRAAF; VENEMA, 2008; KRUGER et al., 2012; QUEK, et al., 2010).

Assim, estudos envolvendo carboidratos com carbonos marcados são desenvolvidos na tentativa de compreensão das vias metabólicas aplicadas por cada tipo de micro-organismo em determinadas situações. Esta técnica é baseada relativamente em princípios básicos de bioquímica, na qual alimentações específicas com substratos marcados com carbono 13 (^{13}C) para as células permitem uma caracterização metabólica de um estado estacionário ou pseudoestacionário (CHOUDHARY et al., 2011; KLAPA, 2010). A utilização de substratos marcados com carbono 13 fornece restrições para as equações estequiométricas usadas em análise de fluxos metabólicos (AFM), evitando suposições sobre saldos redox e energia e considerando caminhos paralelos, ciclos e reversibilidade (CHOUDHARY et al., 2011, CROWN; ANTONIEWICZ, 2012).

Os metabólitos utilizados frequentemente para este tipo de análise são os aminoácidos, pois são estáveis, abundantes e seu padrão de marcação reflete aos precursores de metabólitos gerados no metabolismo central (CHOUDHARY et al., 2011; CROWN; ANTONIEWICZ, 2012). Entretanto, outros metabólitos foram utilizados para análise de fluxos metabólicos, como por exemplo, para determinação de estruturas de vias metabólicas que não fazem parte do metabolismo central, como a biossíntese de isoprenóides, em que se avalia o padrão de marcação dos aminoácidos e ácidos graxos (SCHWENDER et al., 1996) e a biossíntese de policetídeos, avaliando a marcação destes por ^{15}N , ^{13}C e ^{18}O (SIMPSON, 1998).

O padrão de marcação de monômeros de PHA nunca foi utilizado para avaliar a distribuição de fluxos no metabolismo de carboidratos. Assim, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a relevância dessa análise para determinação desses fluxos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactéria

No presente trabalho, foi utilizada a *Pseudomonas* sp. LFM046, isolada de amostras de solo de canavial da Usina São José (GOMEZ et al., 1996) e mantida em freezer a -80 °C. As linhagens *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Pseudomonas fluorescens* LFM069 e *Pseudomonas putida* KT2440 foram utilizadas como controles positivos para a amplificação dos genes *edd* e *eda*.

4.2 Meios de Cultura

Para inóculo dos micro-organismos, foram utilizados os meios de cultura Luria-Bertani (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L e NaCl 5 g/L) e em ensaios em frascos agitados, foram empregados os meios minerais apresentados na Tabela 1 adicionados de fonte de carbono (glicose ou frutose). Para obtenção de meios sólidos foram adicionados 16 g/L de ágar em meio LB. Aos meios minerais foi adicionado ainda 1 mL/L (v/v) de solução de elementos traço com a composição descrita na Tabela 2. Quando necessário, foi adicionado ao meio de cultura o antibiótico Canamicina, de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989).

Tabela 1 - Meios de cultura sob limitação de nitrogênio, fósforo ou sem limitação.

Nutriente	Meio Mineral (em g/L)									
	Ramsay ***	Ñ Lim	NL 0,1	NL 0,2	NL 0,3	PL 0,02	PL 0,04	PL 0,06	SN	SP
Na ₂ HPO ₄	3,5	---	---	---	---	---	---	---	---	---
KH ₂ PO ₄	1,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,02	0,04	0,06	0,2	---
Na ₂ SO ₄	---	---	---	---	---	---	---	---	1,63	---
KCl	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0,11
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0	1,35	0,1	0,2	0,3	1,35	1,35	1,35	---	1,21
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Citrato Fe.NH ₄	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Tris-Base*	---	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Glicose e/ou	15	4	8	8	8	8	8	8	8	8
Frutose**										

N lim = meio sem limitação de nutrientes; NL 0,1 = meio com limitação de nitrogênio, (sulfato de amônia 0,1 g/L); NL 0,2 = meio com limitação de nitrogênio, (sulfato de amônia 0,2 g/L); NL 0,3 = meio com limitação de nitrogênio, (sulfato de amônia 0,3 g/L); PL 0,02 = meio com limitação de fósforo, (fosfato de potássio 0,02 g/L); PL 0,04 = meio com limitação de fósforo, (fosfato de potássio 0,04 g/L); PL 0,06 = meio com limitação de fósforo, (fosfato de potássio 0,06 g/L).

*O pH inicial desses meios minerais foi ajustado para 7,2 utilizando HCl 5M.

**Para os ensaios usando glicose totalmente marcada, essa foi fornecida juntamente com glicose não marcada na proporção 20:80, respectivamente. Para os ensaios utilizando misturas de glicose e frutose, a proporção é de 1:1.

***Ramsay et al., 1990.

Tabela 2 - Concentração para a solução de elementos traço.

Nutriente	Concentração
H ₃ BO ₃	0,30 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,20 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,03 g/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,03 g/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 g/L

4.3 Condições de Cultivo

Pseudomonas sp. LFM046 foram estriadas em LB sólido, mantidas a 30 °C durante 48 horas. Após este período, colônias isoladas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer contendo 25 mL de LB líquido os quais, após o inóculo, foram colocados durante 24 h em incubador rotativo modelo TE-420 (Tecnal, Piracicaba, SP) a 150 rpm e 30 °C. Em seguida, as culturas em LB líquido foram então centrifugadas a 4 °C, 6793 xg durante 10 minutos, em tubos cônicos estéreis de 50 mL. A biomassa foi lavada duas vezes com solução salina 0,85 % e utilizada para inoculação em Meio Mineral e incubadas em agitador rotativo, nas mesmas

condições descritas anteriormente, por um período de 72 horas. Ao final do cultivo, foram analisados: pH, concentração de biomassa seca, concentração de carboidratos, teor e composição de PHA.

4.4 Condições analíticas

Determinação do pH: O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro Tecnal, modelo TEC-2 (Tecnal, Piracicaba, SP) utilizando padrões de pH 4,0 e 7,0.

Concentração de biomassa seca: foi extraída uma duplicata analítica de cada frasco de Erlenmeyer utilizado nos experimentos, onde cada amostra continha 10 mL do cultivo em meio mineral. Estas amostras foram centrifugadas (6793 xg, 10 minutos, 4 °C) em tubos cônicos estéreis de 15 mL, onde o sobrenadante foi reservado para quantificação de açúcares e a biomassa precipitada foi liofilizada, sendo quantificada por gravimetria.

Concentração de carboidratos: A concentração de glicose ou frutose foi determinada em HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos), com detector por Índice de Refração IR-101 (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japão) a 35 °C, equipado com uma coluna Aminex HPX87-H (Biorad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C. A fase móvel utilizada era composta por H₂SO₄ 6 mM a uma vazão de 0,6 mL/min e o volume de injeção de amostra foi de 20 µL. Padrões foram preparados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L utilizando (D)-glicose ou (D)-frutose e as amostras foram diluídas até concentrações compreendidas no intervalo da curva de calibração construída.

Quantidade e composição de PHAs: Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram submetidas à propanólise em tubo ao qual foram adicionados: 2 mL de solução de HCl em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2 dicloroetano e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol (RIIS; MAI, 1988). Após vigorosa agitação, a mistura foi incubada em banho a 100 °C por 3 horas, agitando-se mais uma vez após os primeiros 30 minutos. Em seguida, resfriaram-se os tubos, adicionou-se água destilada (4 mL), agitou-se em agitador de tubos vórtex e, após repouso, separou-se a fase orgânica inferior, contendo os propil-ésteres. A concentração de propil-ésteres foi determinada por cromatografia gasosa. Cerca de 1 µL da fase orgânica foi analisada após a injeção fracionada (1:25) em cromatógrafo Agilent 7890A

equipado com uma coluna HP5, detectando-se os propil-ésteres por meio de ionizador de chama. As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 300 °C, respectivamente. Empregou-se um programa de temperatura da coluna para separar os propil-ésteres, que consistiu em 100 °C por 1 minuto, aumentando até 210 °C a uma razão de 8 °C/min e 210 °C por 15 minutos. O gás de arraste empregado foi hélio a uma vazão de 0,8 mL/min. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *Pseudomonas* sp. LFM046 a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-*co*-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxihexanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato), 3HDd (3-Hidroxidodecanoato) e 3HDd₅ (3-Hidroxidecanoato).

A identidade de 3-hidroxialcanoatos (3HA), bem como o seu padrão de marcação com C¹³, foram avaliados por CG-MS em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC17A (Shimadzu, Kyoto, Keihanshin, Japão) nas mesmas condições apresentadas acima. Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons (EI) em um espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A a 70 eV (Shimadzu, Kyoto, Keihanshin, Japão).

4.5 Extração de DNA genômico

O DNA genômico de *Pseudomonas* sp. LFM 046, assim como o das linhagens *Pseudomonas aeruginosa* PA14, *Pseudomonas fluorescens* LFM069, *Pseudomonas putida* KT2440 utilizadas como controle positivo nas PCRs foi extraído com o kit da marca Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), denominado “DNeasy Blood and Tissue Kit”, seguindo o protocolo para bactérias Gram-negativas fornecido pelo mesmo. Para a verificação da integridade do DNA extraído, foi utilizado gel de agarose 0,8 %, nas mesmas condições descritas posteriormente no item 6.10 Eletroforese.

A absorbância a 260 e 280 nm foi avaliada no equipamento NanoVue Plus (GE Healthcare, Waukesha, WI, Estados Unidos) para estimar a concentração de DNA e sua pureza.

4.6 Análise de genes da via de ED em *Pseudomonas* e desenho de iniciadores

Partindo-se da sequência dos genes *edd* e *eda* de *Ralstonia solanacearum* PSI07 disponível no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) foram recuperadas sequências similares em genomas de *Pseudomonas* sequenciados utilizando o programa BLASTn. As sequências recuperadas foram alinhadas e utilizando o programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) foi possível a construção de árvores filogenéticas. Regiões conservadas dos genes foram utilizadas para desenhar iniciadores degenerados para amplificação desses genes por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).

Para desenho dos iniciadores, foi utilizado o programa FastPCR, o qual permite verificar sítios de restrição contidos no fragmento a ser amplificado, fornece condições ideais para a PCR com aquele determinado par de iniciadores e faz PCR *in silico*, demonstrando o fragmento do gene ou o gene a ser amplificado.

4.7 Condições para o PCR

As diferentes reações de PCR foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), adotando as seguintes condições para um volume de 5 µL de reação:

- 3,0 µL de PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, Estados Unidos)*;
- 0,35 µL de iniciador *forward* (10 µM);
- 0,35 µL de iniciador *reverse* (10 µM);
- 0,40 µL de DNA (entre 50-250 ng);
- 0,45 µL de água livre de nuclease;
- 0,45 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Whitehouse Station, NJ, Estados Unidos).

* 50 U/mL Taq DNA polimerase, 400 µM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 3 mM de MgCl₂

A amplificação dos fragmentos de interesse foi realizada em termociclador (Eppendorf, Mastercycler gradient) utilizando o kit GoTaq Master Mix (Promega) seguindo as indicações do fabricante. As condições de cada uma das reações foram as seguintes: temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, subsequentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 60 segundos, anelamento entre 49,7 °C e 64 °C e extensão a 72 °C por 1 minuto por Kb,

repetindo-se este ciclo por 35 vezes. Ao final dos ciclos a reação foi mantida a 72 °C por 10 minutos para completar a duplicação dos fragmentos parcialmente amplificados e incubação final a 4 °C.

4.8 Eletroforese

As amostras de DNA foram submetidas a corridas eletroforéticas de 60-120 V, 80 mA, 80 W por 1 hora. Ao final da corrida eletroforética, os fragmentos de DNA puderam ser observados após coloração por 20 minutos do gel com brometo de etídeo (0,1 mg/100 mL de TAE 5x), lavagem no mesmo tampão e visualização sob luz UV (254 nm) em transluminador Multidoc-It Digital Imaging System UV Transilluminator (UVP, Upland, CA, USA).

Tampão TAE

- 242 g - Tris-base (hidroximetil aminometano);
- 57,1 mL - Ácido acético glacial;
- 100 mL - EDTA de cálcio e sódio (etileno diamino tetracetato de cálcio e sódio) 0,5 M;
- 1000 mL - H₂O q.s.p.

4.9 RT-PCR (reverse transcriptase)

Com o intuito de avaliar a expressão dos genes *edd* e *eda* em *Pseudomonas* sp LFM046, foi realizado o RT-PCR (reverse transcriptase) à partir de RNAs mensageiros extraídos desta linhagem. Para a extração de RNAs foi realizada a extração manual, utilizando o protocolo Guanidina-Fenol-Ácido (FARREL, 2010).

Desta maneira, foram amplificados os cDNAs à partir dos mRNAs com o kit “SuperScript® III Reverse Transcriptase”(Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos).

4.10 Superexpressão gênica

Para a superexpressão dos genes *edd* e *eda*, foram avaliadas as sequências destes genes em *Pseudomonas putida* KT2440 (CASTILLO; DUQUE; RAMOS, 2008; DADDAOUA;

KRELL; RAMOS, 2009; KIM; JEON; PARK, 2008), permitindo o desenho de iniciadores sem degeneração, contendo sítios de restrição em suas extremidades.

Após a amplificação destes genes de *Pseudomonas putida* KT2440, estes foram purificados a partir do gel de agarose após eletroforese, utilizando o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos). Em seguida, os sítios de restrição contidos nos iniciadores e amplificados nas extremidades dos genes foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição, seguindo o protocolo do fabricante.

Os plasmídeos pBBR1MCS-2 também foram digeridos com a mesma enzima de restrição utilizada para a digestão da extremidade do gene. Posteriormente, os genes foram ligados ao plasmídeo utilizando a enzima T4 DNA ligase da marca Invitrogen (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Estes plasmídeos foram clonados em *E. coli* XL1 Blue por transformação para teste de α -complementação (BULLOCK; FERNANDEZ; SHORT, 1987). Posteriormente, os plasmídeos apresentando o inserto desejado foram extraídos de *E. coli* XL1 Blue recombinantes e clonados em *Pseudomonas* sp. LFM046 por eletroporação.

Os plasmídeos com inserto clonados em *Pseudomonas* sp. LFM046 foram enviados para sequenciamento.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eficiência de conversão de carboidratos em PHA.

Uma das motivações deste trabalho foi a baixa eficiência de conversão de carboidratos em PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 observada por Gomez (2000). Assim, inicialmente, foram realizados experimentos para confirmar essa baixa eficiência. Os experimentos foram realizados da mesma forma como descrito por Gomez (2000), entretanto, foram avaliados não apenas cultivos em que glicose e frutose foram supridas como fonte de carbono, mas também cultivos em que apenas glicose ou apenas frutose foram supridos como fonte de carbono (Tabela 3).

A eficiência máxima teórica da conversão de carboidratos em PHA depende do teor de PHA acumulado (GOMEZ et al., 1996) e também da composição do PHA produzido (GOMEZ, 2000). Esta eficiência pode ser estimada através da equação 1 (GOMEZ, 2000). Para $Y_{Xr/Cc}$, que corresponde ao fator de conversão da fonte de carbono em biomassa residual, considera-se um valor clássico, ou seja, cerca de 0,5 gramas de biomassa seria formada para cada grama de glicose ou frutose consumida. Os fatores de conversão da fonte de carbono em cada um dos 3HAs pode ser estimado considerando as vias metabólicas para sua síntese, inclusive o balanço de coenzimas (NADH/NAD, NADPH/NADP, ATP/ADP). A Tabela 4 apresenta os valores estimados por Gomez (2000) para conversão de cada um dos monômeros presentes em PHA_{MCL}. Estes parâmetros foram utilizados para estimar a quantidade máxima de PHA que poderia ser produzido em cada uma das condições experimentais.

Como se observa na Tabela 3, as eficiências observadas variaram dependendo da fonte de carbono utilizada. Os maiores valores (cerca de 66,7 %) foram observados quando apenas glicose foi suprida como fonte de carbono. Os menores valores de eficiência foram observados quando apenas frutose foi suprida (cerca de 57,2 %). Um valor intermediário (63,3 %) foi observado quando uma mistura de glicose e frutose foi suprida. As diferenças observadas quando as diferentes fontes de carbono foram supridas podem representar uma menor eficiência no consumo da frutose em relação à glicose, como já havia sido observada por Gomez (2000).

Os resultados apresentados na Tabela 3 corroboram uma eficiência de conversão de carboidratos em PHA_{MCL} por *Pseudomonas* sp. LFM046 correspondendo a 60-70 % do valor máximo teórico estimado com o uso da equação 1. Assim, ao contrário do que foi observado para processo de produção de P3HB, em que foi possível selecionar bactérias operando com a

eficiência máxima de conversão de carboidratos nesse polímero (GOMEZ et al., 1996), no processo de produção de PHA_{MCL} a partir de carboidratos ainda há um espaço considerável para melhoramento do desempenho.

$$Y_{P/C}^G = \frac{\% \text{PHA}}{\frac{100}{Y_{X_R/C_C}} - \frac{\% \text{PHA}}{Y_{X_R/C_C}} + \frac{\% \text{HA}_1}{Y_{X_{\text{HA}1}/C_{\text{HA}1}}} + \frac{\% \text{HA}_2}{Y_{X_{\text{HA}2}/C_{\text{HA}2}}} + \frac{\% \text{HA}_3}{Y_{X_{\text{HA}3}/C_{\text{HA}3}}} \cdot \cdot \cdot + \frac{\% \text{HA}_n}{Y_{X_{\text{HA}n}/C_{\text{HA}n}}}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Tabela 3 - Produção de PHA_{MCL} em cultivos em agitador rotativo.

Fonte de carbono	MSC (g/L)		Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)	Y _{PHA/C} (g/g)	Y ^{Max} _{PHA/C} (g/g)	Y ^{Max} _{PHA/C} (%)
	Total	Residual	PHA	3HHx	3HO	3HD	3HDd	3HDd□ ₅				
Glicose	4,23	1,91	2,32	4,73	32,26	57,67	3,49	1,85	54,83	0,155	0,235	65,9
	4,28	1,93	2,35	4,69	31,68	57,92	3,73	1,99	54,94	0,157	0,235	66,7
	4,35	2,03	2,32	4,57	32,11	57,54	3,86	1,92	53,44	0,155	0,230	67,5
	4,34	2,08	2,26	4,67	30,96	57,15	3,08	4,14	52,02	0,151	0,224	67,1
	4,42	2,12	2,30	4,54	31,57	58,29	3,70	1,90	52,00	0,153	0,224	68,3
	4,27	2,34	1,93	4,47	31,81	58,29	3,58	1,85	45,12	0,128	0,198	64,8
	4,32±0,07	2,07±0,16	2,25±0,16	4,61±0,10	31,73±0,46	57,81±0,45	3,57±0,27	2,28±0,92	52,06±3,63	0,150±0,011	0,224±0,014	66,7±1,2
Frutose	3,75	2,08	1,67	4,50	28,96	61,71	3,13	1,71	44,52	0,111	0,196	56,8
	3,93	2,20	1,73	4,33	28,67	62,09	3,03	1,88	44,09	0,116	0,194	59,5
	3,74	2,17	1,57	4,24	28,91	62,09	3,10	1,65	41,90	0,104	0,186	56,3
	3,73	2,03	1,70	4,23	28,62	62,01	3,27	1,87	45,50	0,113	0,200	56,7
	3,74	2,03	1,71	4,41	28,12	61,48	3,85	2,14	45,67	0,114	0,200	56,9
	3,76	2,07	1,69	4,24	27,69	62,27	3,77	2,03	45,07	0,113	0,198	57,1
	3,78±0,08	2,10±0,07	1,68±0,06	4,32±0,11	28,49±0,49	61,94±0,29	3,36±0,36	1,88±0,18	44,46±1,39	0,112±0,04	0,196±0,005	57,2±1,1
Glicose e Frutose	4,00	2,06	1,94	4,16	29,41	61,42	3,27	1,73	48,38	0,129	0,211	61,3
	4,36	2,38	1,98	4,31	29,09	61,50	3,24	1,87	45,42	0,132	0,199	66,2
	4,27	2,22	2,05	4,21	29,49	60,89	3,60	1,81	48,09	0,137	0,209	65,3
	4,20	2,22	1,98	4,48	29,59	60,50	3,61	1,82	47,10	0,132	0,206	64,1
	4,09	2,06	2,03	4,16	29,74	60,59	3,64	1,87	49,68	0,135	0,216	62,9
	3,94	2,05	1,89	4,11	29,64	61,35	3,09	1,81	48,08	0,126	0,209	60,3
	4,14±0,16	2,16±0,13	1,98±0,06	4,24±0,14	29,49±0,23	61,04±0,44	3,41±0,24	1,82±0,05	47,79±1,43	0,132±0,004	0,208±0,005	63,3±2,3

MSC – massa seca celular; PHA – polihidroxialcanoato(s); 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDd – 3-hidroxidodecanoato; 3HDd□₅ – 3-hidroxi-5-dodecenoato; Y_{PHA/C} – fator de conversão da fonte de carbono em PHA; Y^{Max}_{PHA/C} – fator de conversão máximo da fonte de carbono em PHA.

Pseudomonas sp. LFM046 foi cultivada em caldo LB por 24 horas (30 °C/150 rpm). Esta cultura foi utilizada para inocular meio mineral contendo excesso de fonte de carbono (15 g/L) e limitado na fonte de nitrogênio (sulfato de amônio 1 g/L). O cultivo em meio mineral foi conduzido por 72 horas (30 °C/150 rpm). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e duplicata analítica de cada réplica biológica.

Tabela 4 - Valores de $Y_{HAN/CHAN}$ estimados para cada um dos monômeros constituintes de PHA_{MCL}.

3HAs	$Y_{HAN/CHAN}$ (g/g)
3HHx	0,42
3HO	0,39
3HD	0,38
3HDd	0,37
3HDdΔ ₅	0,36

5.2 Ensaio para definição do melhor Meio Mineral a ser utilizado em ensaios com glicose marcada com C¹³

Devido ao elevado custo da glicose marcada, inicialmente foram realizados experimentos para avaliar a menor quantidade de glicose que permitiria produção efetiva de PHA sob limitação de fósforo ou nitrogênio. Assim, um novo meio de cultura foi formulado, no qual se substituiu o tampão fosfato por Tris-base, com o pH inicial do meio de cultura sendo ajustado para 7,2. Fosfato de potássio foi mantido na composição, entretanto em concentrações muito menores, pois nesses novos meios de cultura deve suprir apenas as necessidades de fósforo. Para avaliar a limitação de fósforo ou nitrogênio, foram testadas três concentrações diferentes de cada um dos sais que suprem esses elementos.

As diferentes composições de meios estão apresentadas na Tabela 1. Foram feitos dois ensaios nas mesmas condições, para que realmente fosse comprovado em quais meios de cultura *Pseudomonas sp* LFM046 acumularia maior quantidade de PHA. Cada um desses ensaios foi feito em triplicata e de cada triplicata foram extraídas duas amostras analíticas, de acordo com a metodologia apresentada no item 4.4 deste trabalho. As médias e desvios padrão para todos esses resultados estão apresentados na Tabela 5. Os resultados completos, assim como médias e desvios padrão encontram-se disponíveis no final do trabalho, no APÊNDICE A e APÊNDICE B.

Tabela 5 - Produção de PHA à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio.

Condição		MSC (g/L)	pH	Composição PHA mol%					PHA (%)	PHA (g/L)	Xr (g/L)
				3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDd Δ 5			
Ñ Lim	Média	1,32	6,54			56,82	43,58		1,61	0,02	1,30
	$\pm$ D.P.	0,32	0,38			6,73	6,90		0,64	0,01	0,32
NL 0,1	Média	1,07	7,21	3,12	23,93	67,07	2,08	3,75	45,25	0,45	0,62
	$\pm$ D.P.	0,29	0,02	0,39	3,58	4,53	0,25	0,37	14,96	0,08	0,35
NL 0,2	Média	1,29	7,19	3,31	24,19	65,85	2,32	4,11	50,26	0,65	0,64
	$\pm$ D.P.	0,09	0,10	0,36	3,69	4,33	0,12	0,19	10,42	0,15	0,15
NL 0,3	Média	1,54	7,11	3,34	25,48	64,31	2,35	4,26	50,92	0,78	0,76
	$\pm$ D.P.	0,09	0,16	0,45	3,53	4,37	0,07	0,36	4,06	0,05	0,10
PL 0,02	Média	0,81	6,80	3,22	17,22	63,58	4,24	5,72	20,71	0,17	0,64
	$\pm$ D.P.	0,19	0,56	5,14	5,35	2,76	0,77	1,18	11,88	0,11	0,16
PL 0,04	Média	1,34	6,81	2,25	19,58	67,58	3,77	6,29	28,61	0,39	0,94
	$\pm$ D.P.	0,32	0,05	0,33	3,15	4,03	0,73	0,64	10,50	0,20	0,22
PL 0,06	Média	1,47	6,56	2,00	17,20	69,57	4,18	6,59	31,67	0,48	1,02
	$\pm$ D.P.	0,17	0,89	0,37	2,88	4,00	0,49	0,80	6,75	0,13	0,09

Ñ Lim = Sem limitação de nitrogênio ou fósforo; NL 0,1 = sulfato de amônio 0,1 g/L; NL 0,2 = sulfato de amônio 0,2 g/L; NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,02 = fosfato de potássio 0,02 g/L; PL 0,04 = fosfato de potássio 0,04 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3HHX = 3 hidroxihexanoato; 3HO = 3 hidroxiocetanoato; 3HD = 3 hidroxi-decanoato; 3HDd Δ 5 = 3 hidroxidodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxidodecanoato; PHA (%) MSC = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual.

Como se observa na Tabela 5, o cultivo sob condições de não limitação nutricional foi efetivo, uma vez que levou ao acúmulo de pequena quantidade de PHA (menos de 3% da MSC). Este cultivo provavelmente está limitado na fonte de carbono. Sob limitação de nitrogênio, o teor de PHA acumulado não variou significativamente nas três concentrações de sulfato de amônio avaliadas. Entretanto, a concentração de PHA obtida foi maior no meio NL 0,3 em relação a NL 0,1.

Nos experimentos com limitação de fósforo, observaram-se resultados semelhantes à limitação em nitrogênio, ou seja, nas diferentes situações não se observaram aumentos significativos do teor de PHA acumulado, mas a concentração de PHA foi maior no meio PL 0,06, quando comparado ao meio PL 0,02. Comparando os resultados obtidos no experimento com restrição em nitrogênio ou restrição em fósforo, a melhor condição para acúmulo de PHA foi de restrição em nitrogênio, produzindo 0,78 g/L de PHA comparada à 0,48 g/L de PHA quando com restrição em fósforo.

Uma vez que o nitrogênio é um nutriente limitante ao crescimento celular, o que se prevê quando há o aumento de sua concentração no meio de cultura, é que também haja um

aumento proporcional do crescimento celular e acúmulo de PHA. Considerando que NL 0,2 e NL 0,3 tem respectivamente duas vezes e três vezes mais nitrogênio que NL 0,1, o esperado seria ocorrer o dobro (NL 0,2) e o triplo (NL 0,3) do crescimento celular e produção de PHA com a utilização destes meios em relação a NL 0,1, o que não ocorreu.

De acordo com Ryu et al., (1997), Taciro (2008) e Wendlandt et al., (2001), o esperado seria que para acúmulo de PHA, a condição mais favorável seria de restrição em fósforo, ocorrendo o oposto nos resultados experimentais do presente trabalho, onde a restrição em nitrogênio foi a melhor condição para produção destes polímeros. Por outro lado, os resultados obtidos por Chinwetkitvanich et al., (2003) e por Wen et al., (2010), corroboram com os resultados deste experimento, onde a maior produção de PHA ocorreu em meio com restrição em nitrogênio.

Esta diferença entre o resultado observado em relação ao esperado, quando comparando os resultados de Ryu et al., (1997), Taciro (2008) e Wendlandt et al., (2001) com os obtidos não está relacionada ao pH final, que está muito próximo de 7,0 (pH neutro), ideal para o acúmulo de PHA. O que pode-se sugerir é que no experimento demonstrado na Tabela 5 e nos experimentos de Chinwetkitvanich et al., (2003) e por Wen et al., (2010) esteja ocorrendo uma dupla limitação de nutrientes essenciais no meio de cultura onde há restrição de fósforo, fazendo com que a produção de PHA não seja tão eficiente nesta condição.

Deste modo, para os experimentos de produção de PHA utilizando glicose marcada no carbono 1 foram selecionados os meios NL 0,3 e PL 0,06, sendo a glicose suprida na concentração de 8 g/L. Nos experimentos utilizando glicose marcada em todos os carbonos (U-C¹³ Glicose), é utilizada uma mistura de glicose marcada e não marcada, na proporção 20:80, respectivamente. Como a concentração de glicose marcada é menor do que a concentração de glicose sem marcação, nesses experimentos foram avaliadas duas formulações de meio limitados em nitrogênio (NL 0,2 e NL 0,3), dois limitados em fósforo (PL 0,04 e PL 0,06) e meio sem limitação (Ñ lim).

5.3 Experimentos utilizando glicose marcada

O primeiro ensaio tendo como fonte de carbono glicose marcada no primeiro carbono com C¹³ (1-C¹³ glicose) utilizou os meios de cultura limitados em nitrogênio, com concentração de sulfato de amônio 0,3 g/L (NL 0,3) ou limitação de fósforo, com concentração de fosfato de potássio 0,06 g/L (PL 0,06). Os resultados, bem como as médias e

desvios padrão estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de PHA à partir de glicose marcada no primeiro carbono, sob restrição em fósforo ou nitrogênio.

CONDIÇÃO	MSC	pH	Composição de PHA (mol%)					PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{XR}
			3HHX	3HO	3HD	3HDdΔ ₅	3HDd					
1 NL 0,3 A	1,78	7,10	3,89	26,40	63,60	3,81	2,30	29,93	0,53	1,25	0,09	0,22
1 NL 0,3 B	1,96	7,14	3,95	26,64	63,31	3,73	2,37	26,94	0,53	1,43	0,09	0,25
2 NL 0,3 A	1,69	7,15	3,85	27,09	63,05	3,49	2,52	29,39	0,50	1,19	0,09	0,20
2 NL 0,3 B	1,72	7,15	3,85	27,10	62,92	3,44	2,69	30,17	0,52	1,20	0,09	0,21
Média	1,79	7,14	3,88	26,81	63,22	3,62	2,47	29,11	0,52	1,27	0,09	0,22
±Desv Pad	0,12	0,02	0,05	0,35	0,30	0,18	0,17	1,48	0,02	0,11	0,00	0,02
1 PL 0,06 A	1,62	5,11	1,86	17,34	69,21	5,46	6,13	28,52	0,46	1,16	0,08	0,20
1 PL 0,06 B	1,68	5,08	1,93	17,43	69,14	5,56	5,93	17,29	0,29	1,39	0,06	0,30
2 PL 0,06 A	1,64	5,09	2,03	17,43	70,04	5,60	4,89	16,59	0,27	1,37	0,06	0,29
2 PL 0,06 B	1,73	5,09	1,94	17,25	69,27	5,62	5,92	14,97	0,26	1,47	0,04	0,25
Média	1,67	5,09	1,94	17,37	69,42	5,56	5,72	19,34	0,32	1,35	0,06	0,26
±Desv Pad	0,05	0,01	0,07	0,09	0,42	0,07	0,56	6,19	0,09	0,13	0,01	0,04

NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3HHX = 3 hidroxi-hexanoato; 3HO = 3 hidroxi-octanoato; 3HD = 3 hidroxi-decanoato; 3HDdΔ₅ = 3 hidroxi-dodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxi-dodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual; Y_{PHA} = rendimento de PHA à partir de glicose; Y_{XR} = rendimento de massa seca celular à partir de glicose. As letras A e B no final da nomenclatura das amostras correspondem à duplicata analítica da mesma amostra.

Sob limitação de nitrogênio, o teor de PHA acumulado atingiu cerca de 30 % da massa seca celular e os dois principais monômeros detectados foram 3HD, correspondendo a cerca de 63 mol% , e 3HO, correspondendo a cerca de 27 mol%. Sob limitação de fósforo o teor de PHA acumulado correspondendo a cerca de 15 % da massa seca celular e observou-se uma pequena diferença na composição monomérica. Nestes experimentos, 3HD correspondeu a aproximadamente 70 mol%, enquanto 3HO correspondeu a cerca de 17 mol%.

Duas das amostras listadas na Tabela 6 foram analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-MS), com o objetivo de avaliar por quais vias do metabolismo central a glicose é oxidada.

Como se observa na Figura 4, glicose marcada no carbono 1 permite diferenciar a via do metabolismo central utilizada. Caso a via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) seja utilizada, teremos que o carbono marcado corresponderá ao carbono 3 de uma das duas moléculas de piruvato formadas. Caso a via de Entner-Doudoroff (ED) seja utilizada, teremos marcação do carbono 1 de metade das moléculas de piruvato formadas. A utilização da via das pentoses (VP) leva a descarboxilação do carbono 1 nos primeiros passos dessa via, dessa forma o piruvato formado não apresentará qualquer marcação.

Acetil-CoA é a molécula precursora da biossíntese de PHA. Assim, a EMP é a única via do metabolismo central que levaria a marcação dos monômeros de PHA, pois, mesmo o piruvato marcado no carbono 1 (gerado pela via ED) terá seu carbono marcado retirado, pela ação do complexo piruvato desidrogenase. Caso a via EMP seja utilizada 50 % dos acetil-CoA gerados deverão estar marcados no carbono 2.

Figura 4 - Ilustração de como os padrões de distribuição de 1-C^{13} podem ser utilizados na identificação das vias metabólicas ativas para o catabolismo de glicose.

EMP = Via de Embden-Meyerhof Parnas, ED = Via de Entner-Doudoroff, VP = Via das Pentoses.
Fonte: Nielsen, 2003.

Na análise de propil-ésteres de 3HA por espectrometria de massas, os fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$ são característicos e correspondem, respectivamente, a clivagem α do grupo funcional hidroxil e ao rearranjo de McLafferty de um subfragmento deste com a retirada do grupo propil (LEE et al., 1995). O fragmento $[M-59]$ é característico de cada um dos 3HA. Como apontado na Figura 5, fragmentos com $m/z = 115$, 143, 171, 199 e 197 são esperados, respectivamente, para propil-ésteres de 3HHx, 3HO, 3HD, 3HDd e 3HDd α_5 .

Figura 5 - Fragmentos característicos de propil-ésteres de 3HA obtidos por espectrometria de massas.

A Figura 6 mostra um espectro de massas para o 3-hidroxiocetanoato-propil-ester obtido em experimento com 1- ^{13}C glicose. Para a análise do metabolismo de glicose foram utilizados os fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$ dos propil-ésteres dos monômeros 3HO e 3HD. Foram escolhidos propil-ésteres de 3HO e 3HD pois são detectados em maior quantidade no PHA. Além disso, foram utilizados na análise os fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$, pois correspondem aos carbonos provenientes de uma e meia molécula de acetil-CoA, simplificando a análise. Dessa forma, caso a via EMP seja utilizada para metabolismo de glicose, teríamos quatro isotopômeros 89/90 e 131/132. Os isotopômeros 89/90 deveriam estar presentes em igual quantidade, assim como os isotopômeros 131/132, uma vez que pela via EMP, a partir de glicose seriam formados dois piruvatos um marcado no carbono 2 e outro não marcado. O metabolismo pela via das pentoses ou ED não levaria a qualquer marcação, pois não teríamos acetil-CoA marcados.

Figura 6 - Espectrometria de massa da amostra 1 PL 0,06 B

De acordo com a Figura 4 e os dados de intensidade relativa (IR) dos fragmentos (Tabela 7), pode-se concluir que, se a via EMP for utilizada para o metabolismo de glicose, menos de 10% dessa fonte de carbono é oxidada por essa via. Ou seja, os resultados se adequam melhor ao modelo no qual a glicose é catabolizada pela Via das Pentoses e/ou ED, estando de acordo com as análises de fluxo metabólico realizadas por Taciro (2008), através de resultados de experimentos realizados em biorreator.

Além disso, conforme exposto anteriormente, até hoje o gene *pfk* que codifica a enzima fosfofrutoquinase, essencial para que carboidratos sejam metabolizados pela via EMP, ainda não foi encontrado em espécies do gênero *Pseudomonas* (DEL CASTILLO et al., 2007; MA et al., 1998; SAWYER et al., 1977; SCHLEISSNER; REGLERO; LUENGO, 1997; VICENTE; CANOVAS, 1973b; WHITE, 2006), o que corrobora com estes resultados.

Tabela 7 - Análise em espectrometria de massas, do ensaio contendo 1-C¹³ glicose como fonte de carbono

m/z	Amostra NL 0,3				Amostra PL 0,06			
	3 HO		3 HD		3 HO		3 HD	
	IR	Porcentagem	IR	Porcentagem	IR	Porcentagem	IR	Porcentagem
89	85,6	100	100	100	82,5	100	93	100
90	3,57	4,17	3,56	3,56	3,24	3,93	3,75	4,03
131	30,7	100	50,8	100	27,1	100	49,3	100
132	2,04	6,65	2,78	5,47	1,75	6,45	2,98	6,05

m/z = relação massa/carga, NL 0,3 = meio mineral com restrição em nitrogênio 0,3 g/l, PL 0,06 = meio mineral com restrição 0,06 g/L, IR = intensidade relativa, 3HO = 3 hidroxi-octanoato, 3 HD = 3 hidroxi-decanoato.

O segundo experimento foi feito em triplicata, utilizando os meios Ñ Lim, NL 0,2, NL 0,3, PL 0,04 e PL 0,06, de acordo com as condições indicadas na Tabela 1. Os meios NL 0,3 e P 0,06 g/L foram feitos em quadruplicata, onde os erlenmeyers com numeração 1, 2 e 3 utilizaram como fonte de carbono glicose totalmente marcada com C¹³ e não marcada na proporção de 20:80, respectivamente, e no erlenmeyer número 4 continha somente glicose não marcada, servindo como referência para as análises de propil-ésteres de 3HA por espectrometria de massa (MS) em análise posterior à Cromatografia Gasosa (CG). O objetivo deste experimento foi avaliar o metabolismo de glicose por *Pseudomonas sp* LFM046 através da análise da distribuição desses carbonos marcados nos 3HA. Na Tabela 8 estão apresentadas as médias e desvios padrão para cada resultado. Os resultados completos, assim como médias e desvios padrão encontram-se em anexo no final do trabalho (APÊNDICE C).

Tabela 8 - Produção de PHA à partir de mistura de glicose marcada e não marcada (20:80, respectivamente), sob restrição de fósforo ou nitrogênio.

COND.		MSC	pH	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{XR}
				3HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdD ₅					
Ñ	Média	1,06	5,16				54,14	45,86		1,05	0,01	1,05	0,004	0,38
Lim	± DP	0,09	0,03				19,20	19,20		0,34	0,00	0,09	0,002	0,04
NL	Média	1,06	6,91		4,36	24,67	64,36	3,01	3,33	34,33	0,33	0,69	0,08	0,16
0,2	+ DP	0,11	0,02		0,45	0,73	1,92	0,91	1,64	9,90	0,10	0,16	0,02	0,05
NL	Média	1,42	6,75	0,43	4,36	25,08	63,05	2,85	4,24	40,03	0,57	0,85	0,10	0,16
0,3	+ DP	0,15	0,04	0,06	0,19	0,51	0,63	0,07	0,15	2,42	0,08	0,09	0,02	0,02
PL	Média	0,86	6,55		2,25	16,64	63,14	5,53	12,44	15,39	0,13	0,72	0,05	0,25
0,04	+ DP	0,15	0,12		0,41	2,80	10,14	0,96	14,10	7,77	0,08	0,14	0,03	0,02
PL	Média	1,28	5,30		2,08	16,10	68,62	6,31	6,89	17,42	0,22	1,06	0,05	0,24
0,06	+ DP	0,25	0,04		0,20	0,89	0,78	0,55	0,29	2,16	0,06	0,20	0,00	0,03

Ñ Lim = Sem limitação de nitrogênio ou fósforo; NL 0,2 = sulfato de amônio 0,2 g/L; NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,04 = fosfato de potássio 0,04 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3 HB = 3 hidroxibutirato; 3HHX = 3 hidroxihexanoato; 3HO = 3 hidroxioctanoato; 3HD = 3 hidroxidecanoato; 3HDdΔ5 = 3 hidroxidodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxidodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual; Y_{PHA} = rendimento de PHA à partir de glicose; Y_{XR} = rendimento de massa seca celular à partir de glicose. As letras A e B no final da nomenclatura das amostras correspondem à duplicata analítica da mesma amostra.

Na Tabela 8, pode-se observar que utilizando o meio Ñ lim, o teor de PHA acumulado por *Pseudomonas sp* LFM046 atingiu cerca de 1% da massa seca celular, sendo que os únicos monômeros detectados nessa condição foram 3HO e 3HD. Para avaliar a limitação de fósforo ou nitrogênio, foram testadas duas concentrações diferentes de cada um dos sais que suprem esses elementos. Sob limitação de nitrogênio o teor de PHA acumulado não variou significativamente nas duas concentrações de sulfato amônio avaliadas, entretanto a concentração de PHA obtida em NL 0,3 é um pouco maior em relação NL 0,2. Nas condições com limitação de fósforo, observou-se resultados semelhantes à limitação em nitrogênio, ou seja, nas diferentes situações não se observou aumentos significativos do teor de PHA acumulado. Para avaliação da distribuição de carbonos marcados e não marcados dos isotopômeros obtidos com esse ensaio, as amostras foram enviadas para análise em espectrometria de massas e os resultados estão disponíveis posteriormente, na Tabela 12.

O terceiro ensaio utilizando glicose totalmente marcada com carbono 13 e glicose não marcada, proporção 20:80, respectivamente, foi para avaliar a distribuição dos isotopômeros quando em condição somente de acúmulo. Para isso, foi realizado o inóculo de *Pseudomonas sp*. LFM046 em meio LB durante 24 horas e realizado o procedimento de lavagem das células em solução salina 0,85 % de acordo com o protocolo descrito no item 4.3, para evitar a presença de compostos do meio LB no meio a ser inoculado. Após estes procedimentos, os meios sem nitrogênio (SN) ou sem fósforo (SP), descritos na Tabela 1, foram inoculados e colocados em agitador rotativo por 24 horas. As médias e desvios padrão dos resultados obtidos estão apresentados na Tabela 9 e a tabela completa encontra-se disponível no final do trabalho (APÊNDICE D).

Tabela 9 - Produção de PHA utilizando glicose marcada e não marcada (20:80), respectivamente, em meios sem nitrogênio (SN) ou sem fósforo (SP).

Cond.	MSC	pH	Composição PHA Mol%						PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{Xr}
			3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDd□ ₅						
SN 0h	Média	2,78	7,20	15,39	23,28	25,55	0,00	35,78	2,29	0,04	1,81	0,01	0,36
	± D. P.	0,20	0,00	2,22	32,92	18,97	0,00	11,73	0,98	0,04	1,57	0,01	0,32
SP 0h	Média	3,01	7,20	3,30	53,30	18,72	0,00	24,68	2,18	0,07	2,95	0,01	0,61
	± D. P.	0,36	0,00	5,71	10,08	5,65	0,00	7,64	0,54	0,02	0,34	0,00	0,05
SN 24h	Média	3,13	7,10	3,42	31,32	58,42	3,03	3,81	30,72	0,96	2,16	0,19	0,43
	± D. P.	0,18	0,01	0,59	0,83	0,96	0,22	0,21	1,12	0,06	0,13	0,01	0,02
SP 24h	Média	3,02	6,43	3,63	22,92	61,50	4,78	7,16	16,86	0,51	2,51	0,11	0,52
	± D. P.	0,04	0,03	0,69	2,38	2,27	0,20	0,37	0,94	0,03	0,05	0,01	0,03

SN = sem nitrogênio, SP = sem fósforo. 3HHX = 3 hidroxi-hexanoato; 3HO = 3 hidroxi-octanoato; 3HD = 3 hidroxi-decanoato; 3HDd Δ_5 = 3 hidroxi-dodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxi-dodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual; Y_{PHA} = rendimento de PHA à partir de glicose; Y_{Xr} = rendimento de massa seca celular à partir de glicose.

Assim como nos ensaios anteriores, os monômeros com maior proporção foram o 3 hidroxi-decanoato e o 3 hidroxi-octanoato, chegando a 61,50 mol% e a 31,32 mol%, respectivamente, ao final do cultivo. Para avaliação da distribuição de carbonos marcados e não marcados dos isotopômeros obtidos com esse ensaio, as amostras foram enviadas para análise em espectrometria de massas e os resultados estão disponíveis posteriormente, na Tabela 13.

O uso de misturas de glicose marcada e não marcada permite avaliar o embaralhamento de carbonos no metabolismo e a medida de distribuição dos diferentes isotopômeros pode ser utilizada para avaliar a distribuição de fluxos nas diferentes vias do metabolismo. A via ED ou EMP não promovem o embaralhamento de carbonos do acetil-CoA. Tão pouco a via das pentoses isoladamente. Entretanto, caso a frutose-6-fosfato resultante do metabolismo de glicose pela via das pentoses seja metabolizada na via ED, o acetil-CoA formado poderá conter carbonos originados de diferentes moléculas de glicose. (Figura 7).

Figura 7 - Acetil-CoA originado a partir de frutose-6-fosfato, através das vias EMP e ED, mostrando os diferentes embaralhamentos que podem ocorrer quando são utilizadas moléculas diferentes de frutose-6-fosfato para a formação de piruvato.

No caso de isotopômeros de propil-ésteres de 3HA, é interessante analisar os fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$, uma vez que esses fragmentos compreendem apenas três carbonos do 3HA, dois deles provenientes de uma molécula de acetil-CoA e o terceiro de

outra molécula de acetil-CoA. Na Figura 8 são apresentadas as probabilidades de se encontrar diferentes isotopômeros do fragmento $m/z=131$ (ou $m/z= 89$) levando em conta as vias metabólicas utilizadas para oxidação da glicose.

Como já mencionado, a oxidação da glicose na via ED, EMP, VP ou ainda a combinação VP+EMP não levam a embaralhamentos de carbonos nas moléculas de acetil-CoA. A frequência com que devemos encontrar lado a lado nas moléculas de 3HA quatro carbonos não marcados nessa situação é de $0,8 \times 0,8 = 0,64$ e de encontrar lado a lado nas moléculas de 3HA quatro carbonos marcados é de $0,2 \times 0,2 = 0,04$. Assim, também pode ser calculada a frequência com que deverão ser encontrados lado a lado nas moléculas de 3HA quatro carbono sendo dois marcado e dois não marcados, ou vice-versa, $0,2 \times 0,8 = 0,16$. Assim, caso as vias metabólicas que não promovem o embaralhamento de carbonos estejam sendo utilizadas, os isotopômeros M, M+1, M+2 e M+3 correspondentes ao fragmento $m/z = 131$ (ou $m/z = 89$) deverão ser observados com frequências de 0,64; 0,16; 0,16 e 0,04; respectivamente (Figura 8).

No caso de ocorrer o embaralhamento de carbonos, a análise se torna um pouco mais complexa. Vamos analisar essa situação considerando uma situação simplificada. Ou seja, vamos considerar qual seria a frequência com que os diferentes isotopômeros dos fragmentos $m/z = 131$ (ou $m/z = 89$) devem ocorrer admitindo que as glicoses marcadas ou não marcadas são metabolizadas na via das pentoses e as frutoses-6-fosfato resultantes seriam encaminhadas para a via ED. É claro que esta é uma simplificação pois não é possível para o metabolismo distinguir as moléculas de glicose tomadas do meio daqueles que seriam provenientes de intermediários do metabolismo. Entretanto, esta é uma boa aproximação e um cálculo mais preciso poderia ser realizado considerando a distribuição de fluxos entre as vias das pentoses e ED.

Considerando o metabolismo da glicose (marcada e não marcada) na via das pentoses, seriam gerados 2 mols de frutose-6-fosfato e 1 mol de gliceraldeído-3-fosfato para cada 3 mols de glicose metabolizada. O metabolismo do gliceraldeído-3-fosfato levaria à formação de acetil-CoA sem embaralhamento de carbonos provenientes de diferentes moléculas de glicose (Figura 7). Se a frutose-6-fosfato fosse convertida a glicose-6-fosfato e posteriormente metabolizada na via ED, teríamos a formação de 4 mols de acetil-CoA, dois dos quais poderiam conter carbonos provenientes de diferentes moléculas de glicose, ou seja, com carbonos embaralhados. A questão, portanto, é estimar qual a frequência com que devem ocorrer as diferentes moléculas de acetil-CoA considerando este metabolismo e

posteriormente avaliar a frequência com que ocorreriam os diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$ (ou $m/z = 89$). A Tabela 10 apresenta a distribuição de frequência com que devem ser encontradas as diferentes moléculas de acetil-CoA tomando como base na ocorrência do metabolismo como descrita acima e considerando a mistura de glicose marcada e não marcada na proporção 20:80.

Tabela 10 - Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA considerando o metabolismo de glicose marcada (20 %) e não marcada (80 %) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).

Frequência de diferentes moléculas de acetil-CoA			
OO	OX	XO	XX
$((0,8 \times 3/5) + (0,8 \times 0,8 \times 2/5))$	$(0,8 \times 0,2 \times 2/5)$	$(0,2 \times 0,8 \times 2/5)$	$((0,2 \times 3/5) + (0,2 \times 0,2 \times 2/5))$
O – carbono não marcado X – carbono marcado			

Considerando as frequências de ocorrências dos diferentes isótopos de acetil-CoA (Tabela 10) é possível calcular as frequências com que ocorreriam os diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$ (ou $m/z = 89$). A Tabela 11 apresenta o cálculo dessas frequências. Como já mencionado esses cálculos poderiam ser aprimorados com considerações mais precisas sobre a distribuição de fluxos entre a via das pentoses e a via ED.

A Figura 8 apresenta a frequência dos diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$ considerando diferentes formas de oxidação da glicose analisadas aqui em um cultivo no qual foi fornecida 20 % de glicose marcada e 80 % de glicose não marcada.

Tabela 11 - Cálculo da frequência de ocorrências dos diferentes isotopômeros do fragmento $m/z = 131$ ($m/z = 89$) considerando o metabolismo de glicose marcada (20%) e não marcada (80%) pela via das pentoses e ED (ver a situação particular considerada no texto).

Fragmento $m/z = 131$	Acetil-CoA 1					Acetil-CoA 2					Frequência Isotopômero		
	OO	OX	XO	XX	Frequência (A)	OO	OX	XO	XX	Frequência (B)	(A x B)	M + X	
OOO	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,588	0,588	M
XOO	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,051		
OXO	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,051	0,249	M+1
OOX	0,736	0,000	0,000	0,000	0,736	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,147		
XXO	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,736	0,064	0,000	0,000	0,800	0,108		
OXX	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,012	0,134	M+2
XOX	0,000	0,000	0,064	0,000	0,064	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,012		
XXX	0,000	0,000	0,000	0,136	0,136	0,000	0,000	0,064	0,136	0,200	0,027	0,027	M+3

1 – acetil-CoA que contribui com dois carbonos para o fragmento $m/z = 131$.

2 – Acetil-CoA que contribui com apenas um carbono para o fragmento $m/z = 131$.

O – carbono não marcado X – carbono marcado.

Figura 8 - Cálculo da frequência de ocorrência de cada tipo de isotopômero do fragmento $m/z = 131$ Considerando o metabolismo de glicose marcada (20%) e não marcada (80%) pelas vias ED, EMP ou VP+ED ou ainda um caso particular VP + ED (ver essa situação particular no texto).

As amostras 2 NL 0,3 A, 4 PL 0,06 B da Tabela 8 e todas as amostras da Tabela 9 foram analisadas por CG-MS quanto à distribuição de isotopômeros, e comparadas a valores teóricos obtidos com cálculos de frequência de distribuição dos isotopômeros (Figura 8). A Figura 9 apresenta um espectro de massas típico observado nestas análises. Foram analisados os isotopômeros dos fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$ dos propil-ésteres do 3HO e 3HD, monômeros de PHA. O valor médio e o desvio padrão observado para os diferentes isotopômeros (M, M+1, M+2, M+3) dos fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$ referentes aos ensaios da Tabela 8 e Tabela 9 estão apresentados na Tabela 12 e na Tabela 13, respectivamente.

Figura 9 - Espectrometria de massa, onde m/z = relação massa/carga, demonstrando os fragmentos 89 (m) e 131 (m), com a incorporação de 1, 2 ou 3 moléculas de carbono marcado (m+1, m+2 e m+3, respectivamente).

Tabela 12 - Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas das amostras 2 NL 0,3 A, 4 PL 0,06, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade

	Valores Teóricos		Valores Experimentais	
	VP/EMP/ED ou VP+ED	VP+ED	MM NL 0,3	MM PL 0,06
M	0,64	0,59	$0,58 \pm 0,02^*$	$0,60 \pm 0,02^*$
M+1	0,16	0,24	$0,22 \pm 0,01^*$	$0,22 \pm 0,01^*$
M+2	0,16	0,13	$0,15 \pm 0,01^*$	$0,14 \pm 0,01^*$
M+3	0,04	0,03	$0,04 \pm 0,01^*$	$0,04 \pm 0,01^*$

*média $\pm$ desvio padrão

VP = Via das Pentoses, EMP = Embden-Meyerhof Parnas, ED = Entner-Doudoroff, MM NL 0,3 = meio mineral com restrição em nitrogênio 0,3 g/L, MM PL 0,06 = meio mineral com restrição em fósforo 0,06 g/L.

Os resultados experimentais, quando comparados aos valores teóricos, sugerem que *Pseudomonas sp* LFM046 está catabolizando glicose através das vias VP+ED, e não pelas opções VP, EMP, ED ou VP+EMP. Embora ajustes da distribuição de frequência de isotopômeros poderão ser realizados considerando diferentes distribuições de fluxos entre as

vias das pentoses e via ED.

Tabela 13 - Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade

	Valores Teóricos		Valores Experimentais	
	VP/EMP/ED ou VP+ED	VP+ED	SN Média	SP Média
M	0,64	0,59	$0,646 \pm 0,0014$	$0,659 \pm 0,010$
M+1	0,16	0,24	$0,210 \pm 0,012$	$0,195 \pm 0,011$
M+2	0,16	0,13	$0,120 \pm 0,003$	$0,122 \pm 0,010$
M+3	0,04	0,03	$0,025 \pm 0,003$	$0,023 \pm 0,004$

Os valores dados para SN e SP são a média $\pm$ desvio padrão.

VP = Via das Pentoses, EMP = Embden-Meyerhof Parnas, ED = Entner-Doudoroff; SN = sem nitrogênio; SP = sem fósforo.

Assim como no experimento anterior, onde havia acúmulo e crescimento celular, os resultados experimentais, sugerem que *Pseudomonas sp* LFM046 está catabolizando glicose através das vias VP+ED, e não pelas opções VP, EMP, ED ou VP+EMP.

A estimativa precisa da distribuição de fluxos que os resultados representam depende de um processo de otimização. Inicialmente, descreve-se o mapa de direcionamento de carbonos em cada uma das reações do metabolismo por meio de uma matriz. Assim, tem-se um modelo da distribuição de marcação que depende da distribuição de fluxos nas diferentes vias metabólicas. Um modelo preliminar para descrever o processo de produção de PHA_{MCL} por *Pseudomonas sp*. LFM046 foi desenhado pelo Dr. Carlos Arturo Riascos (resultados não publicados). A aplicação dos dados experimentais da Tabela 12 ao modelo metabólico, indicou, após a otimização, uma distribuição de fluxos correspondendo a cerca de 75% da glicose sendo metabolizada na via das pentoses e 25% na via de Entner-Doudoroff. Isto é, claramente aponta para um maior fluxo na via das pentoses em relação à via de Entner-Doudoroff. Os dados da Tabela 13, obtidos sob condições exclusivas de acúmulo de PHA, indicam um fluxo ainda maior na via das pentoses em relação à via de Entner-Doudoroff.

Após os ensaios com glicose contendo carbono marcado, foram iniciadas análises dos genes *edd* e *eda*, específicos da via de Entner-Doudoroff, nos quais para tentativa de comprovar a presença e atividade dessa via em *Pseudomonas sp* LFM046 utilizando como ferramenta técnicas de PCR e RT-PCR.

5.4 Análise da presença dos genes *edd* e *eda* em *Pseudomonas* sp LFM046.

Duas atividades enzimáticas são específicas para a via de Entner-Doudoroff: 6-fosfogliconato desidratase (*edd*) e 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogliconato aldolase (*eda*) (CONWAY, 1992). O objetivo desta etapa foi avaliar a distribuição dos genes que codificam essas enzimas em diferentes linhagens de *Pseudomonas*, bem como analisar sua presença em *Pseudomonas* sp. LFM046.

Os genes *edd* de *Pseudomonas* encontrados no banco de dados do NCBI possuem de 1824 a 1856 pares de base (pb) e os genes *eda* possuem de 621 a 708 pb. Para a detecção desses genes, foram desenhados 3 iniciadores para cada gene, sendo 2 *reverse* e 1 *forward* (F). Dessa maneira, o primeiro par de iniciadores amplifica um amplicon maior (RL), e o segundo par de iniciadores amplifica um amplicon menor (RC), com finalidade de identificar a presença dos genes *edd* e *eda* no genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046 utilizando técnica de PCR e a sua expressão utilizando técnica de RT-PCR.

No alinhamento do gene *edd* e desenho dos oligonucleotídeos foram utilizadas sequências de DNA dos genomas das linhagens: *Pseudomonas aeruginosa* PA7, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas mendocina* ymp, *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Pseudomonas entomophila* L48, *Pseudomonas stutzeri* A1501, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas syringae* 1448A, *Pseudomonas syringae* B728A, *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* W691, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas putida* GB-1, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *Pseudomonas aeruginosa* LESB58, *Pseudomonas aeruginosa* PA14 e *Pseudomonas putida* F1. Os oligonucleotídeos desenhados a partir desse alinhamento estão apresentados na Tabela 14.

A Figura 10 representa esquematicamente a disposição do gene *edd*, encontrada para todas as espécies de *Pseudomonas* utilizadas para o desenho de iniciadores degenerados. A organização deste gene em operon foi encontrada conforme descrito por Castillo, Duque e Ramos (2008), Daddaoua, Krell e Ramos (2009) e Kim, Jeon e Park (2008) para *Pseudomonas putida* KT2440.

Figura 10 - Disposição do gene *edd* em operon em *Pseudomonas*. **Tabela 14** - Oligonucleotídeos empregados para detecção do gene *edd*.

Nome	Sequência 5' → 3'	Tamanho amplicon
EDDF*	STTCTAYGGYACYGCCAAYWCC	1º par ~861 pb
EDDRL	TCBGTNACCARYGCNACYTTGWA	
EDDF*	STTCTAYGGYACYGCCAAYWCC	2º par ~266 pb
EDDRC	CVAWBGCBRKVAKRTGCAGS	

*EDDF é o mesmo para os dois pares de oligonucleotídeos.

Apesar da similaridade entre os genes alinhados, a análise no programa FastPCR não indicava regiões compatíveis para pares de iniciadores e simultaneamente bem conservadas. Assim, foram escolhidas as áreas mais conservadas, embora ainda exigindo o desenho dos iniciadores com degenerações.

O gene *eda* não possui tantas regiões conservadas quanto o gene *edd*, dificultando até mesmo o desenho de iniciadores degenerados à partir da sequência de nucleotídeos deste gene para o gênero *Pseudomonas*. Por este motivo, foi elaborada a árvore de identidade entre o gene *eda* das espécies de *Pseudomonas* encontradas, demonstrada na Figura 11, com o auxílio do programa Clustalw.

Figura 11 - Árvore de identidade entre as linhagens utilizadas para o alinhamento e consequente desenho de oligonucleotídeos para detecção do gene *eda* em *Pseudomonas* sp LFM046.

Observando a árvore de identidade apresentada na Figura 11, pode-se dividir estas espécies em três grupos: (i) *Pseudomonas entomophila* e *Pseudomonas putida*, (ii) *Pseudomonas fluorescens* e (iii) *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas syringae*. Entretanto, para desenho dos iniciadores degenerados para o gene *eda*, este alinhamento foi dividido em 2 grupos, conforme destacado na Figura 11, para tentar agrupar o maior número de espécies por par de iniciador desenhado, tentando com isso obter um iniciador o mais genérico possível. Para identificação durante os experimentos, estes iniciadores foram denominados EDA e EDAA.

Há também um terceiro grupo de *Pseudomonas* que possui uma segunda cópia desse gene, mas com sequência de nucleotídeos diferente da primeira cópia, os quais estão denominados no banco de dados do NCBI como *eda1* e que para identificação durante os experimentos foi denominado EDA1.

O gene *eda* em *Pseudomonas* também está disposto em um operon, conforme descrito por Castillo, Duque e Ramos (2008), Daddaoua, Krell e Ramos (2009) e Kim, Jeon e Park (2008), representada na Figura 12.

Figura 12 – Operon contendo o gene *eda*.

Para o alinhamento do grupo EDA e desenho dos oligonucleotídeos foram utilizadas sequências de DNA das linhagens: *Pseudomonas fluorescens* SBW25, *Pseudomonas syringae* B728A, *Pseudomonas syringae* 1448A, *Pseudomonas syringae* DC3000, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 e *Pseudomonas aeruginosa* PA14. No alinhamento do segundo grupo, o EDAA, foram utilizadas as linhagens: *Pseudomonas entomophila* L48, *Pseudomonas putida* GB-1, *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* W619, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas fluorescens* Pf-5, *Pseudomonas fluorescens* PfO-1, *Pseudomonas fluorescens* SBW25 e *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Para o terceiro grupo, EDA1, foram alinhados os genes das linhagens: *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* F1, *Pseudomonas putida* GB-1, *Pseudomonas entomophila* L48 e *Pseudomonas aeruginosa* PA7. Os oligonucleotídeos desenhados a partir desses alinhamentos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Oligonucleotídeos empregados para detecção do gene *eda*

Nome	Sequência 5' → 3'		Tamanho amplicon
EDAF*	TTTCGVGTSATCGARGTDCCGCT	1° par	~ 451 pb
EDARL	CHGGYTTGAAYARCCCGGARCC		
EDAF*	TTTCGVGTSATCGARGTDCCGCT	2° par	~ 183 pb
EDARC	YACSTTGGCRTCCTGTGVGG		
EDAAF*	RATCACCATYGYCGYGARSM	3° par	~ 474 pb
EDAARL	ACRTTDDKKBAVBGCCAKRTAGY		
EDAAF*	RATCACCATYGYCGYGARSM	4° par	~ 231 pb
EDAARC	GTRMWNCCMGGGGTRACSAYR		
EDA1F*	TGGAAGTGACSCCTGCGCWCRMG	5° par	~ 377 pb
EDA1RL	CASRTTGKCCRGTTYACVC		
EDA1F*	TGGAAGTGACSCCTGCGCWCRMG	6° par	~ 155 pb
EDA1RC	DCCVGGRSTRACGRCRAACTGY		

*EDAF é igual para os 1° e 2°, EDAAF é igual para os 3° e 4° pares e EDA1F é igual para os 5° e 6° pares de oligonucleotídeos.

Os amplicons obtidos com os diferentes pares de iniciadores a partir de *Pseudomonas* sp LFM046, bem como de seus controles positivos (uma das linhagens utilizada para desenho dos iniciadores) estão apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Perfil eletroforético em gel de agarose 1,2% de amplicons obtidos com iniciadores para os genes *edd* ou *eda*

a. Amplicons para o par de iniciadores EDAF/EDARL. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas fluorescens*, 4 = controle negativo. **b.** Amplicons para o par de iniciadores EDAAF/EDAARL. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas aeruginosa* PA14, 4 = controle negativo, 6 = 1 Kb Plus Ruler. **c.** Amplicons para o par de iniciadores EDDF/EDDRL. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas aeruginosa* PA14, 4 = controle negativo, 5 = 1 Kb Plus Ruler. **d.** Amplicons para o par de iniciadores EDDF/EDDRC. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas aeruginosa* PA14, 4 = controle negativo, 5 = 1 Kb Plus Ruler. **e.** Amplicons para o par de iniciadores EDA1F/EDA1RL. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas putida* KT2440, 4 = controle negativo, 5 = 1 Kb Plus Ruler. **f.** Amplicons para o par de iniciadores EDAF/EDARC. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas fluorescens*, 4 = controle negativo. **g.** Amplicons para o par de iniciadores EDAF/EDARL. 1 = 1 Kb Plus Ruler, 2 = *Pseudomonas sp* LFM046, 3 = *Pseudomonas fluorescens*, 4 = controle negativo.

A Figura 13a. mostra amplicons obtidos à partir de PCR para teste da presença do gene *eda* em *Pseudomonas* sp. LFM046 e utiliza como controle positivo a linhagem *Pseudomonas fluorescens*, a qual foi uma das espécies selecionadas para desenho do par de iniciadores EDAF/EDARL. Para controle negativo foi realizada uma reação sem a presença de DNA, mas que continha os iniciadores sendo testados para as linhagens de interesse, assim como a enzima polimerase e dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados).

Pode-se observar um amplicon de aproximadamente 451 pb tanto para *Pseudomonas* sp. LFM046, quanto para *Pseudomonas fluorescens*, sugerindo a presença do gene *eda* em ambas as espécies. As mesmas linhagens foram utilizadas para a construção do iniciador EDARC, utilizando o mesmo iniciador *forward* (EDAF). A Figura 9f corresponde à amplificação do gene *eda*, pelo par de iniciadores EDAF/EDARC, com as mesmas linhagens utilizadas para amplificação a partir dos iniciadores EDAF/EDARL, apresentando um como resultado um amplicon de aproximadamente 183 pb, o que confirma a sugestão de *Pseudomonas* sp LFM046 apresentar o gene *eda* e de este ser semelhante ao das linhagens utilizadas para desenho destes iniciadores.

A Figura 13b mostra amplicons obtidos a partir de PCR para teste da presença do gene *eda* em *Pseudomonas* sp. LFM046 e utiliza como controle positivo a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA14, a qual foi uma das espécies selecionadas para desenho do par de iniciadores EDAAF/EDAARL. Para controle negativo foi realizada uma reação sem a presença de DNA, mas que continha os iniciadores sendo testados para as linhagens de interesse, assim como a enzima polimerase e dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados). Pode-se observar um amplicon de aproximadamente 474 pb para *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto o mesmo padrão não é observado para *Pseudomonas* sp. LFM046, o que demonstra a não amplificação do gene *eda* em *Pseudomonas* sp LFM046 com este par de iniciadores.

Este resultado sugere que o gene *eda* que pode estar presente em *Pseudomonas* sp. LFM046 pode ter similaridade mais próxima das linhagens utilizadas para o desenho dos iniciadores EDAF/EDARC/EDARL do que das linhagens utilizadas para desenho dos iniciadores EDAAF/EDAARC/EDAARL.

As Figuras 13c e 13d, mostram amplicons obtidos à partir de PCR para teste da presença do gene *edd* em *Pseudomonas* sp. LFM046 e utiliza como controle positivo a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* PA14, a qual foi uma das espécies selecionadas para desenho dos pares de iniciadores EDDF/EDDL e EDDF/EDDC. Para controle negativo foi realizada uma reação sem a presença de DNA, mas que continha os iniciadores sendo testados

para as linhagens de interesse, assim como a enzima polimerase e dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados).

Na Figura 13c foi possível visualizar um amplicon de aproximadamente 860 pb tanto para *Pseudomonas* sp. LFM046 como para o controle positivo (*P. aeruginosa* PA14), sugerindo a presença do gene *edd* em *Pseudomonas* sp. LFM046. Observando-se a Figura 13d, nota-se um amplicon de aproximadamente 266 pb para *Pseudomonas* sp. LFM046 e para o controle positivo. Este resultado reforça a sugestão da presença do gene *edd* em *Pseudomonas* sp. LFM046 e a amplificação obtida anteriormente com os iniciadores EDDF/EDDRL, pois foi utilizado o mesmo iniciador *forward* para obtenção de ambos amplicons, somente alterando o iniciador *reverse*.

Na Figura 13e está o perfil eletroforético dos amplicons obtidos a partir de PCR para teste da presença do gene *edaI* em *Pseudomonas* sp. LFM046 com os iniciadores EDA1F/EDA1RL, tendo *Pseudomonas putida* KT2440 como controle positivo. O resultado mostra um amplicon de aproximadamente 377 pb, tanto para a linhagem teste quanto para o controle positivo, sugerindo também a presença do gene *edaI* em *Pseudomonas* LFM046. A Figura 13g, mostra o teste com as mesmas linhagens, somente alterando o iniciador *reverse*. Sendo assim, foram utilizados os iniciadores EDA1F/EDA1RC, obtendo um amplicon de aproximadamente 155 pb, reafirmando a hipótese de *Pseudomonas* sp. LFM046 possuir o gene *edaI*.

Todos os amplicons obtidos para *Pseudomonas* sp. LFM046 com os pares de iniciadores EDDF/EDDRL e EDDF/EDDRC foram sequenciados para confirmação de sua identidade. A partir destes resultados de sequenciamento, foi feita uma busca no banco de genes do NCBI com a ferramenta blastn, para confirmação deste amplicon obtido ser o gene *edd* e qual a similaridade e identidade com os genes sequenciados de outras *Pseudomonas*. Para cada sequenciamento, foram enviadas duas reações, uma contendo somente o iniciador *forward* e outra contendo o iniciador *reverse*. Os resultados de sequenciamento para os amplicons obtidos através de PCR com *Pseudomonas* sp. LFM046 e os pares de iniciadores EDDL/EDDRL e EDDF/EDDRC estão expostos no final do trabalho, no APÊNDICE F e APÊNDICE G, respectivamente.

A Tabela 16 mostra o resultado do alinhamento feito com blastn à partir da sequência de nucleotídeos obtida para o gene *edd*, com os iniciadores EDDF/EDDRL e a Tabela 17 mostra o resultado do alinhamento para EDDF/EDDRC, ambos amplificados a partir do DNA genômico de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Tabela 16 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene *edd* e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRL.

Linhagem	GENE <i>edd</i>	
	Similaridade	Identidade
<i>Pseudomonas entomophila</i> L48	100%	91%
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	100%	86%
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	100%	98%
<i>Pseudomonas putida</i> S-16	100%	86%
<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	100%	84%
<i>Pseudomonas putida</i> HB3267	100%	86%
<i>Pseudomonas putida</i> W619	100%	84%
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	100%	84%
<i>Pseudomonas putida</i> F1	100%	84%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> A1501	100%	87%

Na Tabela 16 pode-se observar uma grande similaridade e identidade entre o gene *edd* obtido na amplificação por PCR utilizando os iniciadores EDDF/EDDRL e os demais genes *edd* de *Pseudomonas* listados no NCBI, o que confirma a presença do gene *edd* em *Pseudomonas* sp. LFM046.

Tabela 17 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene *edd* e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRC

Linhagem	GENE <i>edd</i>	
	Identidade	Similaridade
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf-5	69%	92%
<i>Azotobacter vinelandii</i> DJ	71%	92%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1	69%	92%
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 14405	67%	92%
<i>Pseudomonas mendocina</i> NK-01	69%	92%
<i>Pseudomonas syringae</i>	68%	92%

Os sequenciamentos para o gene *eda* não foi conclusivo, necessitando de repetição para confirmação de sua presença em *Pseudomonas* sp. LFM046.

5.5 Avaliação da expressão gênica através de RT-PCR (reverse transcriptase)

Após a detecção dos genes *edd* e *eda* em *Pseudomonas* sp. LFM 046 através de PCR e a confirmação através de sequenciamento foram extraídos os RNAs desta linhagem para realização de RT-PCR e tentativa de avaliação da expressão destes genes. As condições de

cultivo foram as mesmas de ensaios de acúmulo de PHA, com utilização dos meios NL 0,3 e PL 0,06 em duplicata, também para avaliar se com restrição em diferentes nutrientes, o metabolismo desta linhagem é modificado.

Após a extração de RNA seguindo a metodologia do item 4.9, foi feita a síntese do cDNA à partir dos mRNA com o kit “SuperScript® III Reverse Transcriptase”(Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos), utilizando a metodologia e os oligonucleotídeos fornecidos pelo fabricante. Em seguida, foi realizada uma PCR com os cDNAs obtidos e iniciadores específicos para a via de Entner-Doudoroff, desenhados anteriormente. A Figura 14 mostra os amplicons de cDNAs (DNAs complementares) para o par de iniciadores EDDF/EDDRC, a partir de mRNAs (RNAs mensageiros) de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Figura 14 - cDNAs de *Pseudomonas* sp. LFM046 obtidos a partir de iniciadores específicos da via ED para o gene *edd*.

1, 2, 3 e 4 = cDNAs do gene *edd* de *Pseudomonas* sp LFM046 obtidos através de RT-PCR, utilizando os meios de cultura NL 0,3(duplicata) e PL 0,06 (duplicata), respectivamente; 5 = 1 Kb plus ruler.

O amplicon de aproximadamente 266 pares de base obtido para o gene *edd* sugere a expressão deste gene em *Pseudomonas* sp. LFM046. Estes amplicons foram purificados e enviados para sequenciamento, entretanto este resultado não foi conclusivo, necessitando ser repetido.

O mesmo procedimento foi realizado para tentar avaliar a expressão do gene *eda* em *Pseudomonas* sp. LFM046. A Figura 15 mostra os amplicons para o par de iniciadores EDAF/EDARC, à partir de cDNA de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Figura 15 - cDNAs de *Pseudomonas* sp. LFM046 obtidos à partir de iniciadores específicos da via ED para o gene *eda*.

1, 2, 3 e 4 = cDNAs do gene *edd* de *Pseudomonas* sp LFM046 obtidos através de RT-PCR, utilizando os meios de cultura NL 0,3(duplicata) e PL 0,06 (duplicata), respectivamente; 5 = 1 Kb plus ruler

O amplicon de aproximadamente 183 pares de base obtido para o gene *eda* sugere a expressão deste gene em *Pseudomonas* sp. LFM046. Estes amplicons foram purificados e enviados para sequenciamento, entretanto este resultado não foi conclusivo, necessitando ser repetido.

5.6 Superexpressão dos genes *edd* e *eda*

Os genes *edd* e *eda* foram amplificados a partir de *Pseudomonas putida* KT2440 com iniciadores específicos para o gene desta espécie, de acordo com a metodologia descrita no item 4.9. Para facilitar clonagem nos plasmídeos dos genes obtidos, foi adicionada uma cauda poli A (sequencia de 3 adeninas) nas extremidades de cada iniciador, seguida de um sítio de restrição, utilizado como estratégia para clonagem, orientada.

Uma vez que o gene *edd* é o primeiro na sequencia de genes do operon em que se encontra, seu iniciador *forward* foi desenhado com a tentativa de abranger o promotor deste operon, considerando que antes do promotor, há o inibidor *gap-1* conforme mostra Figura 10. Deste modo, para desenho dos iniciadores do gene *edd* foram consideradas 250 bases à montante do início do gene e 150 bases à jusante do final do gene. A denominação dada a este par de iniciadores foi EDDF KT2440 para o iniciador *forward* e EDDR KT2440 para o iniciador *reverse*, contendo os sítios de restrição KpnI (GGTACC) e HindIII (TTCGAA), respectivamente, posteriores a cauda poli A. A organização final dos iniciadores desenhados é: cauda poli A → sítio de restrição → sequencia complementar ao início/final do gene.

O gene *eda* é o último gene do operon em que se encontra e desta maneira, não foi possível utilizar a estratégia de abranger o promotor do operon na amplificação deste gene, entretanto as outras estratégias utilizadas para o desenho de iniciadores para o gene *edd* (cauda poli A e sítios de restrição nas extremidades dos iniciadores) também foi utilizada para o gene *eda*. No iniciador *forward*, denominado EDAF KT2440, foi inserido o sítio de restrição *Xba*I e no iniciador *reverse*, denominado EDAR KT2440, foi inserido o sítio de restrição *Sac*I, que correspondem às sequências TCTAGA e CTCGAG, respectivamente. Estes sítios de restrição foram adicionados após a cauda poli A, gerando os iniciadores com a organização: cauda poli A → sítio de restrição → sequência complementar ao início/final do gene. A Tabela 18 mostra os iniciadores desenhados, com suas denominações e os tamanhos previstos dos amplicons.

Tabela 18 – Iniciadores para genes *edd* e *eda* desenhados a partir de *Pseudomonas putida* KT2440.

Nome	Sequência 5' → 3'		Tamanho amplicon
EDDF KT2440	AAAGGTACCCCATTTGATGGCGATGCGAAGG	1º par	~ 2,27 Kb
EDDR KT2440	AAATTTCGAACCTTCATGCAGCTGGTTGTCACG		
EDAF KT2440	AAATCTAGAACTGAAATGCCGATTCGCGCTT	2º par	~ 0,71 Kb
EDAR KT2440	AAACTCGAGAGCCGTAAAGCACACAACCTG		

A partir dos amplicons obtidos para cada gene, foram obtidos quatro recombinantes diferentes da linhagem *Pseudomonas* sp LFM046, sendo: (i) *Pseudomonas* sp LFM046 pBBR1MCS-2, que possui o plasmídeo pBBR1MCS-2 sem inserto; (ii) *Pseudomonas* sp LFM046 pBBR1MCS-2 *edd*, que possui o plasmídeo pBBR1MCS-2 com inserto do gene *edd*; (iii) *Pseudomonas* sp LFM046 pBBR1MCS-2 *eda*, com plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo inserto do gene *eda*; (iv) *Pseudomonas* sp LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda*, com plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo inserto dos genes *edd* e *eda*. Estes plasmídeos foram enviados para sequenciamento, a fim de confirmar a clonagem dos genes de interesse, utilizando seus respectivos iniciadores para os genes *edd* e/ou *eda*, sendo um sequenciamento feito com o iniciador *forward* e o outro com o *reverse*. O resultado de sequenciamento encontra-se disponível no APÊNDICE H, no final do trabalho.

Com os resultados de sequenciamento, foi feita uma busca no banco de genes do NCBI, para confirmação deste amplicon obtido ser o gene *edd* e qual a similaridade e identidade com os outros micro-organismos encontrados. Foi utilizado o blastn como

ferramenta de busca para nucleotídeos. Na Tabela 19 estão listados os resultados obtidos.

Tabela 19 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene *edd* e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o par de iniciadores EDDF/EDDRC

Linhagem	GENE <i>edd</i>	
	Similaridade	Identidade
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	99%	94%
<i>Pseudomonas putida BIRD-1</i>	98%	94%
<i>Pseudomonas putida ND6</i>	98%	94%
<i>Pseudomonas putida DOT-T1E</i>	100%	94%
<i>Pseudomonas putida F1</i>	100%	94%
<i>Pseudomonas putida GB-1</i>	100%	94%
<i>Pseudomonas putida S16</i>	100%	94%
<i>Pseudomonas putida HB3267</i>	100%	94%

Este resultado de sequenciamento comprova que houve a clonagem do gene *edd* no plasmídeo pBBR1-MCS2, obtendo-se o recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1-MCS2 *edd*.

Em relação ao plasmídeo pBBR1MCS-2 com inserto dos genes *edd* e *eda*, foi obtido resultado para o sequenciamento do gene *edd*. O sequenciamento para o gene *eda* de ambos plasmídeos não foi conclusivo, tendo que ser repetido para comprovação da inserção deste gene, entretanto foi feita a amplificação deste por PCR, observando-se o amplicon do tamanho esperado no gel de agarose 1,2% após corrida eletroforética, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 – Perfil eletroforético em gel de agarose dos amplicons obtidos com o par de iniciadores EDAF KT2440 e EDAR KT2440, à partir de plasmídeos com inserto

1 = 1 Kb Plus Ruler; 2 e 3 = pBBR1MCS-2 com inserto do gene *eda*; 4 e 5 pBBR1MCS-2 com inserto dos genes *edd* e *eda*, utilizando somente os iniciadores EDAF KT2440 e EDAR KT2440; 6 = controle negativo (somente iniciadores, sem amostra de DNA).

O resultado do sequenciamento para o gene *edd* inserido no plasmídeo da linhagem recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda* encontra-se disponível no APÊNDICE I, no final do trabalho. Com esse resultado de sequenciamento, foi feita uma busca no banco de genes do NCBI, para confirmação deste amplicon obtido ser o gene *edd* e qual a similaridade e identidade com os outros micro-organismos encontrados. Foi utilizado o blastn como ferramenta de busca para nucleotídeos. Na Tabela 20 estão listados os resultados obtidos.

Tabela 20 - Similaridade e identidade entre o sequenciamento obtido para o gene *edd* e as linhagens no banco de genes do NCBI, utilizando o iniciador EDDF.

Linhagem	GENE <i>edd</i>	
	Identidade	Similaridade
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	97%	99%
<i>Pseudomonas putida</i> BIRD-1	96%	97%
<i>Pseudomonas putida</i> ND6	95%	99%
<i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E	95%	99%
<i>Pseudomonas putida</i> F1	95%	99%
<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	93%	95%
<i>Pseudomonas putida</i> S16	91%	97%
<i>Pseudomonas putida</i> HB3267	91%	97%

Este resultado de sequenciamento comprova que houve a clonagem do gene *edd* no plasmídeo pBBR1-MCS2 e o PCR com o plasmídeo e o par de iniciadores EDAF KT2440/EDAR KT2440, sugere que foram obtidos os recombinantes *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1-MCS2 *edd eda*.

Para testar a alteração da produção de PHA e do crescimento celular destes micro-organismos recombinantes, foi realizado um ensaio utilizando o meio de cultura Ramsay et al. (1990), descrito na Tabela 1 e glicose (15 g/L). A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 sem inserto foi utilizada como controle positivo quanto a produção de PHA, para verificar possíveis alterações dos parâmetros avaliados, que possam ter ocorrido pela presença do plasmídeo na célula. Foi adicionado o antibiótico canamicina (SAMBROOK et al., 1989) ao meio de cultura contendo as recombinantes, para manutenção do plasmídeo na célula (pressão seletiva). O experimento foi realizado em duplicata e as análises dos resultados foram feitas de acordo com a metodologia descrita anteriormente, estando demonstrados na Tabela 21.

Tabela 21 - Produção de PHA_{MCL} por recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Cond.	MSC	pH	Composição PHA mol%						PHA (%)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{XR}	Y ^{Max} _{PHA/C} (g/g)	Y ^{Max} _{PHA/C} (%)
			3HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdD ₅							
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBRMCS2 A	4,32	6,13	38,00	2,72	15,64	41,02	1,42	1,20	48,39	2,09	2,23	0,16	0,17	0,217	74,99
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBRMCS2 B	4,40	6,21	37,65	2,63	15,79	41,37	1,33	1,23	36,10	1,59	2,81	0,12	0,22	0,166	74,38
Média	4,36	6,17	37,82	2,68	15,72	41,20	1,37	1,21	42,24	1,84	2,52	0,14	0,20	0,19	74,68
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 <i>eda</i> A	4,80	6,12	95,17	0,34	0,89	3,60	0,00	0,00	46,41	2,23	2,57	0,17	0,20	0,225	77,22
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 046 <i>eda</i> B	4,36	6,10	95,34	0,33	0,86	3,48	0,00	0,00	53,59	2,34	2,02	0,18	0,16	0,259	70,56
Média	4,58	6,11	95,26	0,34	0,87	3,54	0,00	0,00	50,00	2,28	2,30	0,18	0,18	0,24	73,89
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 046 <i>edd</i> A	4,48	5,60	9,06	3,31	24,87	59,02	2,11	1,63	41,31	1,85	2,63	0,14	0,20	0,184	78,12
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 046 <i>edd</i> B	4,46	5,47	2,87	3,84	26,17	63,38	2,10	1,65	45,87	2,05	2,41	0,16	0,19	0,201	78,99
Média	4,47	5,54	5,96	3,58	25,52	61,20	2,11	1,64	43,59	1,95	2,52	0,15	0,20	0,19	78,56
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 046 <i>edd eda</i> A	4,74	5,70	2,74	2,96	25,04	64,67	2,57	2,02	49,89	2,36	2,38	0,18	0,19	0,217	85,30
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 pBBR1MCS-2 046 <i>edd eda</i> B	4,72	5,60	3,97	0,00	27,27	64,65	2,41	1,69	37,86	1,79	2,93	0,14	0,23	0,170	82,38
Média	4,73	5,65	3,36	1,48	26,15	64,66	2,49	1,86	43,87	2,08	2,65	0,16	0,21	0,19	83,84

MSC = massa seca celular; 3HB = 3 hidroxibutirato; 3HHX = 3 hidroxihexanoato; 3HO = 3 hidroxioctanoato; 3HD = 3 hidroxidecanoato; 3HDdΔ5 = 3 hidroxidodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxidodecanoato; PHA (%) MSC = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual; Y_{PHA} = rendimento de PHA à partir de glicose; Y_{XR} = rendimento de massa seca celular à partir de glicose. As letras A e B no final da nomenclatura das amostras correspondem à duplicata experimental.

Conforme se pode observar na Tabela 21, a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBRMCS2, que contém o plasmídeo sem inserto, demonstrou um perfil diferente dos ensaios anteriores para a produção de PHA_{MCL}, nos quais foram utilizados a linhagem selvagem. Para este recombinante, assim como nos ensaios anteriores, o 3-hidroxidecanoato (3HD) foi o monômero com maior proporção (41,20 mol%) e diferindo dos outros ensaios, o 3-hidroxibutirato (3HB) foi o segundo monômero com maior proporção (37,82 mol%), ficando em terceiro o 3-hidroxioctanoato (15,72 mol%) em relação à proporção acumulada de monômeros de PHA.

Pseudomonas sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *eda*, recombinante com plasmídeo com inserto do gene *eda*, deslocou toda a produção de PHA_{MCL} para PHA_{SCL}, produzindo cerca de 95,26 mol % de 3HB e muito pouco 3HD (3,54 mol%). Não se sabe o porque do deslocamento da produção de PHA_{MCL} para PHA_{SCL} (3HB) nestas duas linhagens, uma vez que o recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 não traz genes clonados no plasmídeo e em *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *eda*, o gene clonado no plasmídeo é da via de Entner-Doudoroff, não estando relacionado a nenhuma PHA sintase, o que justificaria estes resultados. Assim, as linhagens recombinantes deverão ser analisadas no futuro para entender melhor o que levou a produção de PHA contendo uma fração molar tão elevada de 3HB.

Os recombinantes *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd* contendo plasmídeo com inserto do gene *edd* e *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda* (contendo plasmídeos com inserto dos genes *edd* e *eda*) foram os que mais se aproximaram do perfil anteriormente apresentado pela linhagem selvagem, produzindo em maior proporção o 3HD (61,20 e 64,66 mol%, respectivamente) e o segundo monômero com maior proporção foi o 3HO (25,52 e 26,15, respectivamente).

Comparando-se os resultados deste experimento utilizando os recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 sem inserto, *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd* e *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda* apresentaram uma maior eficiência da produção de PHA, quando comparados à eficiência apresentada pela linhagem selvagem abrigando apenas o vetor. A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd* obteve 78,56% do rendimento máximo teórico para a produção de PHA e a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda* 83,84, enquanto a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 abrigando apenas o vetor atingiu selvagem chegou a 74,68%.

Este aumento na eficiência de produção de PHA pode sugerir um aumento no do fluxo

de carboidratos pela via ED, gerando um balanço da utilização das vias ED e VP em *Pseudomonas* sp. LFM046, o que comprovaria a conclusão do trabalho de Taciro (2008).

Para avaliar o aumento da expressão destes genes em *Pseudomonas* sp. LFM046, seria ideal a realização de testes bioquímicos para a análise da atividade enzimática dos genes *edd* e *eda*, tanto para a linhagem selvagem quanto para as linhagens recombinantes (KOVACHEVICH; WOOD, 1955; VICENTE; CANOVAS, 1973a). Além disso, sugere-se avaliação mais detalhada pela repetição dos ensaios com a mistura de glicose marcada em todos os carbonos e glicose não marcada, para nova análise de fluxos metabólicos, comparando o metabolismo de glicose pelas vias VP e ED na linhagem selvagem com os recombinantes.

6 CONCLUSÕES E ETAPAS FUTURAS

Os meios de cultura que melhor se adequam à produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 são sulfato de amônio 0,3 g/L (NL 0,3) e fosfato de potássio 0,06 g/L (PL 0,06).

A análise de fluxos metabólicos de *Pseudomonas* sp. LFM046 utilizando glicose marcada com carbono 13 descarta a participação da via Embden-Meyerhof Parnas no catabolismo de carboidratos e sugere o a utilização principalmente da via das pentoses, confirmando resultados prévios (TACIRO, 2008).

Os resultados obtidos com o sequenciamento dos amplicons para os genes *edd* e *eda* sugerem que *Pseudomonas* sp. LFM046 possui estes genes, específicos da via de Entner-Doudoroff.

De acordo com os amplicons obtidos através de RT-PCR (reverse transcriptase) para os mRNAs dos genes *edd* e *eda* pode-se sugerir a expressão destes genes, entretanto será necessário novo sequenciamento para confirmação deste resultado.

A superexpressão gênica em *Pseudomonas* sp. LFM046 aumentou em pequena proporção eficiência na produção de PHA, com relação à linhagem selvagem.

Testes bioquímicos deverão ser realizados, para melhor compreensão das modificações ocorridas no metabolismo de *Pseudomonas* sp. LFM046 com a clonagem dos genes *edd* e/ou *eda*, a fim de avaliar a atividade enzimática destes genes nas linhagens recombinantes, comparando com a linhagem selvagem.

Novos testes com mistura de glicose marcada e não marcada podem ser realizados com as linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 para melhor compreensão do balanço entre as vias VP e ED no metabolismo de carboidratos.

REFERÊNCIAS*

- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **FEMs Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- BAPTIST, J. N. **Process for preparing poly-3-hydroxybutyric acid**. US Patent Application 3036959, 1962a.
- BAPTIST, J. N. **Process for preparing poly-3-hydroxybutyric acid**. US Patent 3,044,942, 1962b.
- BRANDL, H. et al. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(α -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 41, p. 77-93, 1990.
- BRANDL, H. et al. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential application as and biodegradable polyesters. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998; 54:1977-82
- BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. **Biotechniques**, v. 5, n. 4, p. 376-379, 1987.
- CASTILLO, T. D.; DUQUE, E.; RAMOS, J. L. A set of activators and repressors control peripheral glucose pathways in *Pseudomonas putida* to yield a common central intermediate. **Journal of Bacteriology**, v. 190, p. 2331–2339, 2008.
- CHINWETKITVANICH, S.; RANDALL, C. W.; PANSWAD, T. Effects of phosphorus limitation and temperature on PHA production in activated sludge. **Water Science and Technology**, v. 50, p. 135–143, 2004.
- CHOUDHARY, M. K. et al. Re-examination of Metabolic Fluxes in *Escherichia coli* during Anaerobic Fermentation of Glucose Using ^{13}C Labeling Experiments and 2-dimensional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p. 419-437, 2011.
- CONWAY, T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. **FEMs Microbiology Reviews**, v. 103, p. 1-2, 1992.
- CROWN, S. B. et al. Resolving the TCA cycle and pentose-phosphate pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824: isotopomer analysis, in vitro activities and expression analysis. **Biotechnology Journal**, v. 6, p. 300–305, 2011.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICA. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CROWN, S. B.; ANTONIEWICZ, M. R. Minireview Parallel labeling experiments and metabolic flux analysis: Past, present and future methodologies. **Metabolic Engineering**, v. 16, p. 21-32, 2012.

DANIEL, M. et al. Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly-hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium *Pseudomonas* 135. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 37, p. 702–706, 1992.

DADDAOUA, A.; KRELL, T.; RAMOS, J. L. Regulation of glucose metabolism in *pseudomonas*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 21360–21368, 2009.

DE EUGENIO, L. I. et al. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for the metabolic balance. **Environmental Microbiology**, v. 12, p. 207–221, 2010.

DE GRAAF, A. A.; VENEMA, K. Gaining insight into microbial physiology in the large intestine: a special role for stable isotopes. **Advances in Microbial Physiology**, v. 53, p. 73–168, 2008.

DE KONING, G. J. M. Physical properties of bacterial poly [(R)-3-hydroxyalkanoates]. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 303-309, 1995.

DE KONING, G. J. M. et al. A process for the production of bacterial medium,-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates]: reviewing the status quo. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BACTERIAL POLYHYDROXYALKANOATES, 1996. **Abstracts...** Ottawa: NRC Research Press, 1997. p. 137-141.

DEL CASTILLO, T. et al. Convergent Peripheral Pathways Catalyze Initial Glucose Catabolism in *Pseudomonas putida*: Genomic and Flux Analysis. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 5142–5152, 2007.

DE SMET, M. J. et al. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 2, p. 870-878, 1993

DINIZ, S. C. et al. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 119, p. 51-69, 2004.

DU, G. et al. Continuous production of poly-3-hydroxybutyrate by *Ralstonia eutropha* in a two-stage culture system. **Journal of Biotechnology**, v. 88, p. 59–65, 2001.

FARREL, R. RNA methodologies. In: FARREL, R. **RNA methodologies**. San Diego: Academic Press, 2010. p. 57-60.

FERNÁNDEZ, D. et al. Agro-industrial oily wastes as substrates for PHA production by the newstrain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: effect of culture conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, p. 159–167, 2005.

FULLER, R. C. et al. The supramolecular architecture of the polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas oleovorans*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 279–288, 1992.

GERNGROSS, T. U.; SLATER, S. C. How green are green plastics? **Scientific American**, p. 24-29, 2000.

GOMES, R. S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da sua composição monomérica**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996; 45:785-91.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes**. 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

HABA, E. et al. Poly 3-(hydroxyalkanoates) produced from oily substrates by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 (NCBIM40044): effect of nutrients and incubation temperature on polymer composition. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 99–106, 2007.

HAYWOOD, G. W. et al. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 91-96, 1988.

HAYWOOD, G. W. et al. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxy-decanoate from simple carbohydrate substrate by *Pseudomonas* sp strain NCIMB 40135. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3354–3359, 1990.

HOLMES, P.A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics Tecnol**, v. 16, p. 32-36, 1985.

HUISMAN, G. W. et al. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoate) synthesis. **Journal of Bacteriology**, v.176, p. 1661-1666, 1994.

JUNG, Y. M.; PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned phbCAB genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 201–208, 2002.

KELLERHALS, M. B.; KESSLER, B.; WITHOLT, B. Renewable long-chain fatty acids for production of biodegradable medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) at laboratory and pilot plant scales. **Macromolecules**, v. 33, p. 4690–4698, 2000.

KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, 97, p. 104, 2001.

KIM, J. S.; LEE, B. H.; KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 169–174, 2005.

KIM, D. Y. et al. Review: Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. **The Journal of Microbiology**, v. 45, p. 87–97, 2007.

KIM, J.; JEON, C. O.; PARK, W. Dual regulation of zwf-1 by both 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate and oxidative stress in *Pseudomonas putida*. **Microbiology**, v. 154, p. 3905–3916, 2008.

KIMURA, H.; YOSHIDA, Y.; DOI, Y. Production of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Pseudomonas acidovorans*. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 445–450, 1992.

KLAPA, M. I. Metabolic flux analysis. In: SMOLKE, C. D. et al. **The metabolic pathway engineering handbook: Fundamentals**. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 356–373.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, p. 175–176, 1995.

KOVACHEVICH, R.; WOOD, A. W. Carbohydrate metabolism by *Pseudomonas fluorescens* III. Purification and properties of a 6-phosphogluconate dehydrase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 213, p. 745–756, 1955.

KRUGER, N. J. et al. Strategies for investigating the plant metabolic network with steady-state metabolic flux analysis: lessons from an *Arabidopsis* cell culture and other systems. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 2309–2323, 2012.

KUNIOKA, M.; TAMAKI, A.; DOI, Y. Crystalline and thermal properties of bacterial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v. 22, p. 694–697, 1989.

LAGEVEEN, R. et al. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition do poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, n. 12, p. 2924–2932, 1988.

LEE et al. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, p. 901–909, 1995.

LEMO, P. C.; SERAFIM, L. S.; REIS, M. A. M. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 226–238, 2006.

LUENGO, J. M. et al. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 251–260, 2003.

MA, J. F. et al. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). **Journal of Bacteriology**, v. 180, p.1741–1749, 1998.

MARSUDI, S.; UNNO, H.; HORI, K. Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 955–961, 2008.

METALLO, C. M.; WALTHER, J. L.; STEPHANOPOULOS, G. Evaluation of ¹³C isotopic tracers for metabolic flux analysis in mammalian cells. **Journal of Biotechnology**, v. 144, p. 167-174, 2009.

MISRA, S. K. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2249-2258, 2006.

NIELSEN, J. It is all about Metabolic Fluxes. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 7031-7035, 2003.

NONATO, R. V.; MANTELATTO, P. E.; ROSSEL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 1–5, 2001.

PONCE, E.; GARCÍA, M.; MUÑOZ, M. E. Participation of the Entner–Doudoroff pathway in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system (PTS– Glc+) in gluconate and glucose batch cultures. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 975-982, 2005.

POZO, C.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V. Effects of culture conditions on the production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter chroococcum* H23 in media containing a high concentration of alpechin (wastewater from olive oil mills) as primary carbon source. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 125–131, 2002.

QUEK, L. E. et al. Metabolic flux analysis in mammalian cell culture. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 161–171, 2010.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-β-hydroxybutyric-co-β-hydroxyvaleric acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 137–146, 2003.

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

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. **Journal of Chromatography**, v. 445, p. 285-289, 1988.

RODRIGUES, M. F. A. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia sp.*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1995; 43:880-6.

RYU, H. W. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by high cell density fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with phosphate limitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, p. 28-32, 1997.

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

SANCHEZ, R. J. et al. Medium-chain-length polyhydroxy-alkanoic acids (PHAMCL) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **European Polymer Journal**, v. 39, p. 1385-1394, 2003.

SAWYER, M. H. et al. Pathways of D-fructose catabolism in species of *Pseudomonas*. **Archives of Microbiology**, v. 112, p. 49-55, 1977.

SCHWENDER, J., et al. Biosynthesis of isoprenoids (carotenoids, sterols, prenyl side-chains of chlorophylls and plastoquinone) via a novel pyruvate/glyceraldehyde 3-phosphate non-mevalonate pathway in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Biochemical Journal**, v. 316, p. 73-80, 1996.

SCHLEISSNER, C.; REGLERO, A.; LUENGO, J. M. Catabolism of D-glucose by *Pseudomonas putida* U occurs via extracellular transformation into D-gluconic acid and induction of a specific gluconate transport system. **Microbiology**, v. 143, p. 1595-1603, 1997.

SHEN, L.; WORREL, E.; PATEL, M. Present and future development in plastics from biomass. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 4, p. 25-40, 2010.

SILVA-QUEIROZ, S. R. **Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAmcl) por bactérias a partir de óleos vegetais**. 2003. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA-QUEIROZ, S. R. et al. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 111-118, 2009.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Biotechnology**, p. 784-791, 1983.

SIMPSON, T. J. Application of isotopic methods to secondary metabolic pathways. **Topics in Current Chemistry**, v. 195, p. 1–48, 1998.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Medium-chain-length poly(ϵ -hydroxyalkanoate) synthesis from triacylglycerols by *Pseudomonas saccharophila*. **Current Microbiology**, v. 38, p. 151–154, 1999.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 664–669, 2001.

SOLAIMAN, D. K. Y.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Physiological characterization and genetic engineering of *Pseudomonas corrugata* for medium-chain-length polyhydroxyalkanoates synthesis from triacylglycerols. **Current Microbiology**, v. 44, p. 189–195, 2002.

SONG, J. H. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) production using waste vegetable oil by *Pseudomonas* sp. Strain DR2. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 1408–1415, 2008.

STEINBÜCHEL A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: Byrom D, editor. **Biomaterials novel materials from biological sources**. New York: Macmillian Publishers Basingstoke. 1991. P 123-213.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v. 71, p. 81-123, 2001.

TACIRO, M. K. **Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAMCL) sob limitação múltipla de nutrientes**. 2008. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

THAKOR, N.; TRIVEDI, U.; PATEL, K. C. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1843–1850, 2005.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyester consisting of medium-chainlength 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3360–3367, 1990.

VAN DER WALLE, G. A. M. et al. Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 123-128, 1999.

VICENTE, M.; CANOVAS, J. L. Glucolysis in *Pseudomonas putida*: physiological role of alternative routes from the analysis of defective mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 116, p. 908-914, 1973a.

VICENTE, M.; CANOVAS, J. L. Regulation of the glucolytic enzymes in *Pseudomonas putida*. Arch. Mikrobiol., v. 93, p. 53–64, 1973b.

VERLINDEN, R. A. J. et al. Article review: bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1437–1449, 2007.

WANG, Y. et al. A tough biodegradable elastomer. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 602-606, 2002.

WEN, Q. et al. Effects of phosphorus and nitrogen limitation on PHA production in activated sludge. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, p. 1602–1607, 2010.

WENDLANDT, K., et al. Producing poly-3-hydroxybutyrate with a high molecular mass from methane. *Journal of Biotechnology*, v. 86, p. 127–133, 2001.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 3rd ed. Oxford: Oxford USA Trade, 2006. 656 p.

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

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 5-21, 2001.

APÊNDICE A – Tabela completa do primeiro experimento para produção de PHA_{MCL} à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio.

(continua)

CONDIÇÃO	MSC (g/L)	pH	Composição PHA Mol%						PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)
			HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdΔ ₅			
1 Ñ Lim A	1,46	6,17				51,35	48,65		1,51	0,02	1,44
1 Ñ Lim B	1,15	6,19				52,61	47,39		1,18	0,01	1,14
2 Ñ Lim A	1,4	6,16				51,50	48,50		1,25	0,02	1,38
2 Ñ Lim B	2,25	6,16				44,82	55,18		1,24	0,03	2,22
3 Ñ Lim A	1,15	6,19				50,86	49,14		2,02	0,02	1,13
3 Ñ Lim B	1,47	6,17				61,32	2,16		0,03	0,00	1,47
Média	1,48	6,17				52,08	41,84		1,20	0,02	1,46
+ DP	0,40	0,01				5,31	19,63		0,65	0,01	0,40
1 NL 0,1 A	1,4	7,25		3,71	28,47	61,25	2,14	4,43	32,90	0,46	0,94
1 NL 0,1 B	1,68	7,20		3,53	27,29	62,65	2,42	4,11	22,89	0,38	1,30
2 NL 0,1 A	0,93	7,18			27,42	62,64	2,40	4,01	38,78	0,36	0,57
2 NL 0,1 B	1,51	7,23		3,53	27,42	62,64	2,40	4,01	23,88	0,36	1,15
3 NL 0,1 A	0,94	7,19		3,47	27,65	62,63	2,29	3,96	33,57	0,32	0,62
3 NL 0,1 B	1,11	7,20									
Média	1,26	7,21		3,56	27,65	62,36	2,33	4,11	30,41	0,38	0,92
+ DP	0,31	0,03		0,11	0,47	0,62	0,12	0,19	6,81	0,05	0,32
1 NL 0,2 A	1,13	7,06	0,00	3,72	27,77	61,80	2,45	4,26	40,21	0,45	0,68
1 NL 0,2 B	1,46	7,11	0,53	3,74	27,64	61,26	2,56	4,26	30,01	0,44	1,02
2 NL 0,2 A	1,25	7,10	0,37	3,54	27,65	61,67	2,38	4,39	46,61	0,58	0,67
2 NL 0,2 B	1,32	7,10	0,00	3,49	27,61	62,21	2,34	4,35	39,35	0,52	0,80
3 NL 0,2 A	1,24	7,08	0,00	3,71	27,76	61,93	2,36	4,23	45,09	0,56	0,68
3 NL 0,2 B	1,16	7,11	0,52	3,60	27,72	61,59	2,35	4,22	46,51	0,54	0,62
Média	1,26	7,09		3,64	27,69	61,74	2,41	4,29	41,30	0,52	0,74
+ DP	0,12	0,02		0,11	0,07	0,32	0,09	0,07	6,36	0,06	0,15
1 NL 0,3 A	1,51	6,88	0,40	3,76	29,47	59,09	2,28	5,01	52,69	0,80	0,71
1 NL 0,3 B	1,56	6,94	0,36	3,74	29,34	59,21	2,34	5,01	52,52	0,82	0,74
2 NL 0,3 A	1,4	6,98	0,41	3,67	28,39	60,90	2,41	4,21	51,61	0,72	0,68
2 NL 0,3 B	1,64	6,98	0,43	3,94	28,44	60,59	2,41	4,20	46,89	0,77	0,87
3 NL 0,3 A	1,54	7,01	0,46	3,65	28,77	60,64	2,40	4,09	44,64	0,69	0,85
3 NL 0,3 B	1,65	6,96	0,41	3,61	28,62	60,73	2,45	4,19	44,43	0,73	0,92
Média	1,55	6,96		3,73	28,84	60,19	2,38	4,45	48,80	0,75	0,80
+ DP	0,09	0,04		0,12	0,46	0,82	0,06	0,43	3,92	0,05	0,10
1 PL 0,02 A	0,96	6,46		19,25	20,33	67,17	4,29	5,86	12,72	0,12	0,84
1 PL 0,02 B	0,9	6,49		2,62	23,33	64,02	3,24	6,79	42,65	0,38	0,52
2 PL 0,02 A	0,83	6,49		2,43	21,97	64,64	3,84	7,12	25,80	0,21	0,62
2 PL 0,02 B	0,85	5,56		2,84	23,54	63,79	3,23	6,60	39,79	0,34	0,51
3 PL 0,02 A	1,24	6,46		2,60	22,16	64,82	3,40	7,03	21,70	0,27	0,97
3 PL 0,02 B	0,75	6,46		2,60	22,21	64,78	3,42	7,00	32,56	0,24	0,51

(conclusão)

<u>Média</u>	0,92	6,32	5,39	22,26	64,87	3,57	6,73	29,20	0,26	0,66
<u>+ DP</u>	0,17	0,37	6,79	1,15	1,20	0,42	0,47	11,35	0,09	0,20
1 PL 0,04 A	1,61	6,78	2,38	22,28	64,79	4,07	6,48	18,81	0,30	1,31
1 PL 0,04 B	1,21	6,83	2,70	23,02	63,83	3,56	6,89	44,93	0,54	0,67
2 PL 0,04 A	0,77	6,74	2,43	21,72	63,78	5,66	6,41	20,51	0,16	0,61
2 PL 0,04 B	1,31	6,82	2,48	22,90	63,36	3,99	7,28	26,13	0,34	0,97
3 PL 0,04 A	1,12	6,82	2,46	22,53	63,93	4,21	6,88	16,98	0,19	0,93
3 PL 0,04 B	1,17	6,80	2,53	22,85	63,31	4,10	7,20	24,64	0,29	0,88
<u>Média</u>	1,20	6,80	2,50	22,55	63,83	4,26	6,86	25,33	0,30	0,89
<u>+ DP</u>	0,27	0,03	0,11	0,49	0,53	0,72	0,36	10,21	0,14	0,25
1 PL 0,06 A	1,19	7,40	2,07	20,01	65,58	4,69	7,65	28,37	0,34	0,85
1 PL 0,06 B	1,38	7,38	2,59	19,84	65,11	4,90	7,56	21,22	0,29	1,09
2 PL 0,06 A	1,4	7,37	2,30	20,48	65,08	4,77	7,36	23,89	0,33	1,07
2 PL 0,06 B	1,53	7,40	2,08	20,12	66,17	4,33	7,30	27,57	0,42	1,11
3 PL 0,06 A	1,16	7,36								
3 PL 0,06 B	1,41	7,36	2,54	20,10	65,14	4,42	7,15	33,63	0,47	0,94
<u>Média</u>	1,35	7,38	2,32	20,11	65,42	4,62	7,40	26,93	0,37	1,01
<u>+ DP</u>	0,14	0,02	0,25	0,23	0,47	0,24	0,20	4,72	0,07	0,11

Ñ Lim = Sem limitação de nitrogênio ou fósforo; NL 0,1 = sulfato de amônio 0,1 g/L; NL 0,2 = sulfato de amônio 0,2 g/L; NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,02 = fosfato de potássio 0,02 g/L; PL 0,04 = fosfato de potássio 0,04 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3 HB = 3 hidroxi-butirato; 3HHX = 3 hidroxi-hexanoato; 3HO = 3 hidroxi-octanoato; 3HD = 3 hidroxi-decanoato; 3HDdΔ5 = 3 hidroxi-dodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxi-dodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual.

APÊNDICE B - Tabela completa do segundo experimento para produção de PHA_{MCL} à partir de glicose, sob restrição de fósforo ou nitrogênio.

(continua)

Condição	MSC	pH	Composição PHA mol%						PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)
			3HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdD ₅			
1 Ñ Lim A	1,11	6,82				64,90	35,10		2,44	0,03	1,08
1 Ñ Lim B	1,3	6,83				62,25	37,75		1,88	0,02	1,28
2 Ñ Lim A	1,14	6,94				55,83	44,17		1,77	0,02	1,12
2 Ñ Lim B	1,13	6,93				63,53	36,47		1,83	0,02	1,11
3 Ñ Lim A	1,08	6,94				65,85	34,15		2,20	0,02	1,06
3 Ñ Lim B	1,19	6,94				57,07	42,93		2,00	0,02	1,17
Média	1,16	6,90				61,57	38,43		2,02	0,02	1,13
± D.P.	0,08	0,06				4,17	4,17		0,25	0,00	0,08
1 NL 0,1 A	0,78	7,19		2,75	20,46	71,45	1,94	3,40	62,81	0,49	0,29
1 NL 0,1 B	0,89	7,20		2,77	20,53	71,42	1,91	3,37	56,01	0,50	0,39
2 NL 0,1 A	0,98	7,23		2,88	20,94	70,83	1,89	3,47	56,69	0,56	0,42
2 NL 0,1 B	0,92	7,22		2,86	21,02	70,81	1,86	3,46	56,15	0,52	0,40
3 NL 0,1 A	0,88	7,21		2,85	21,06	70,78	1,83	3,48	56,74	0,50	0,38
3 NL 0,1 B	0,86	7,22		2,81	20,92	70,65	1,82	3,51	57,29	0,49	0,37
Média	0,89	7,21		2,82	20,82	70,99	1,87	3,45	57,61	0,51	0,38
± D.P.	0,07	0,01		0,05	0,26	0,35	0,05	0,05	2,59	0,02	0,05
1 NL 0,2 A	1,28	7,29		3,11	21,56	68,87	2,33	3,94	56,48	0,72	0,56
1 NL 0,2 B	1,27	7,28		3,04	21,58	69,07	2,17	3,92	57,50	0,73	0,54
2 NL 0,2 A	1,31	7,29		3,10	20,22	70,24	2,25	3,97	59,46	0,78	0,53
2 NL 0,2 B	1	7,29		2,89	20,35	70,57	2,22	3,97	57,91	0,58	0,42
3 NL 0,2 A	1,35	7,29		2,93	20,31	70,65	2,20	3,91	61,60	0,83	0,52
3 NL 0,2 B	1,27	7,29		2,80	20,06	70,37	2,18	3,90	62,37	0,79	0,48
Média	1,25	7,29		2,98	20,68	69,96	2,23	3,93	59,22	0,74	0,51
± D.P.	0,12	0,00		0,13	0,70	0,78	0,06	0,03	2,36	0,09	0,05
1 NL 0,3 A	1,53	7,26		3,24	22,78	67,51	2,36	4,11	53,26	0,81	0,72
1 NL 0,3 B	1,71	7,26		3,27	22,77	67,53	2,32	4,11	47,92	0,82	0,89
2 NL 0,3 A	1,52	7,26		2,63	21,72	69,40	2,28	3,97	53,64	0,82	0,70
2 NL 0,3 B	1,44	7,25		2,82	21,66	69,16	2,21	3,93	57,49	0,83	0,61
3 NL 0,3 A	1,44	7,26		2,95	22,08	68,24	2,36	4,15	51,47	0,74	0,70
3 NL 0,3 B	1,48	7,25		2,75	21,76	68,70	2,39	4,15	54,44	0,81	0,67
Média	1,52	7,26		2,94	22,13	68,42	2,32	4,07	53,04	0,80	0,72
± D.P.	0,10	0,01		0,26	0,52	0,81	0,07	0,10	3,19	0,03	0,09
1 PL 0,02 A	0,73	7,26		1,62	11,77	60,50	4,75	4,87	12,77	0,09	0,64
1 PL 0,02 B	0,74	7,28		1,51	13,05	67,48	5,27	5,48	11,00	0,08	0,66
2 PL 0,02 A	0,75	7,30		1,52	12,17	60,62	4,62	4,78	10,92	0,08	0,67
2 PL 0,02 B	0,43	7,29		1,66	13,22	65,57	4,99	5,24	17,78	0,08	0,35
3 PL 0,02 A	0,67	7,28		0,00	11,23	59,08	4,84	3,93	10,90	0,07	0,60
3 PL 0,02 B	0,83	7,29		0,00	11,62	60,54	5,00	4,01	9,91	0,08	0,75
Média	0,69	7,28		1,05	12,17	62,30	4,91	4,72	12,21	0,08	0,61
± D.P.	0,14	0,01		0,82	0,80	3,38	0,23	0,63	2,88	0,01	0,14

(conclusão)										
1 PL 0,04 A	1,29	6,9	1,62	16,31	73,03	3,53	5,52	13,18	0,17	1,12
1 PL 0,04 B	1,19	6,92	1,68	15,51	72,21	3,27	5,74	29,58	0,35	0,84
PL 0,04 A	1,98	6,76	2,16	17,14	69,19	2,88	5,70	42,20	0,84	1,14
2 PL 0,04 B	1,75	6,78	2,10	17,24	70,31	3,61	5,72	29,39	0,51	1,24
3 PL 0,04 A	1,3	6,80	2,26	16,74	71,60	3,15	5,84	36,50	0,47	0,83
3 PL 0,04 B	1,35	6,80	2,25	16,76	71,58	3,21	5,83	40,50	0,55	0,80
Média	1,48	6,83	2,01	16,62	71,32	3,27	5,73	31,89	0,48	0,99
± D.P.	0,31	0,07	0,29	0,63	1,37	0,26	0,12	10,62	0,22	0,19
1 PL 0,06 A	1,7	5,5	1,63	13,99	72,63	3,85	6,10	33,21	0,56	1,14
1 PL 0,06 B	1,49	5,53	1,52	14,45	72,54	4,01	5,86	28,30	0,42	1,07
2 PL 0,06 A	1,54	5,54	2,02	13,96	73,36	3,99	6,06	35,14	0,54	1,00
2 PL 0,06 B	1,57	5,53	1,61	14,08	73,71	4,04	6,06	32,71	0,51	1,06
3 PL 0,06 A	1,7	6,15	1,73	16,04	72,99	3,50	5,74	40,45	0,69	1,01
3 PL 0,06 B	1,56	6,14	1,85	16,10	72,92	3,45	5,67	43,92	0,69	0,87
Média	1,59	5,73	1,73	14,77	73,03	3,81	5,92	35,62	0,57	1,02
± D.P.	0,09	0,32	0,18	1,02	0,44	0,27	0,18	5,66	0,10	0,09

Ñ Lim = Sem limitação de nitrogênio ou fósforo; NL 0,1 = sulfato de amônio 0,1 g/L; NL 0,2 = sulfato de amônio 0,2 g/L; NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,02 = fosfato de potássio 0,02 g/L; PL 0,04 = fosfato de potássio 0,04 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3 HB = 3 hidroxibutirato; 3HHX = 3 hidroxihexanoato; 3HO = 3 hidroxioctanoato; 3HD = 3 hidroxidecanoato; 3HDdΔ5 = 3 hidroxidodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxidodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual.

APÊNDICE C – Ensaio utilizando como fonte de carbono 20% de glicose marcada em todos os carbonos e 80% de glicose não marcada.

(continua)

COND.	MSC	pH	Composição PHA (mol%)						PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{XR}
			3HB	3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdD ₅					
1 Ñ Lim A	1,15	5,15				49,43	50,57		0,89	0,01	1,14	0,004	0,43
1 Ñ Lim B	1,22	5,16				52,64	47,36		1,33	0,02	1,20	0,006	0,44
2 Ñ Lim A	0,98	5,22				100,00	0,00		0,39	0,00	0,98	0,001	0,35
2 Ñ Lim B	1,09	5,18				52,98	47,02		0,96	0,01	1,08	0,004	0,39
3 Ñ Lim A	1,03	5,14				56,35	43,65		1,24	0,01	1,02	0,005	0,37
3 Ñ Lim B	1,02	5,14				55,31	44,69		1,13	0,01	1,01	0,004	0,38
Média	1,06	5,16				54,14	45,86		1,05	0,01	1,05	0,004	0,38
± DP	0,09	0,03				19,20	19,20		0,34	0,00	0,09	0,002	0,04
1 NL 0,2 A	1,21	6,85		4,50	24,61	64,17	2,97	3,75	31,09	0,38	0,83	0,097	0,21
1 NL 0,2 B	1,13	6,90		3,48	23,20	68,10	5,23	0,00	12,32	0,14	0,99	0,037	0,27
2 NL 0,2 A	1,09	6,90		4,32	24,74	64,04	3,02	3,88	37,43	0,41	0,68	0,099	0,17
2 NL 0,2 B	0,96	6,91		4,44	24,58	63,98	3,03	3,97	35,74	0,34	0,62	0,084	0,15
3 NL 0,2 A	0,93	6,91		4,69	25,04	63,13	2,98	4,16	39,66	0,37	0,56	0,084	0,13
3 NL 0,2 B	1,05	6,91		4,72	25,30	62,74	3,01	4,24	32,92	0,35	0,70	0,079	0,16
Média	1,06	6,91		4,36	24,67	64,36	3,01	3,33	34,33	0,33	0,69	0,08	0,16
± DP	0,11	0,02		0,45	0,73	1,92	0,91	1,64	9,90	0,10	0,16	0,02	0,05
1 NL 0,3 A	1,56	6,82	0,35	4,26	25,29	63,09	2,86	4,15	41,11	0,64	0,92	0,12	0,17
1 NL 0,3 B	1,3	6,78	0,39	4,60	25,71	62,20	2,97	4,13	38,06	0,49	0,81	0,09	0,15
2 NL 0,3 A	1,45	6,76	0,42	4,49	25,43	62,77	2,81	4,07	39,55	0,57	0,88	0,12	0,18
2 NL 0,3 B	1,52	6,76	0,43	4,50	25,44	62,71	2,82	4,10	36,57	0,56	0,96	0,11	0,20
3 NL 0,3 A	1,49	6,76	0,51	4,07	24,35	64,01	2,77	4,29	44,24	0,66	0,83	0,11	0,14
3 NL 0,3 B	1,51	6,76	0,52	4,11	24,31	63,96	2,78	4,30	42,17	0,64	0,87	0,11	0,15
4 NL 0,3 A	1,43	6,69	0,40	4,43	24,94	62,90	2,88	4,44	39,66	0,57	0,86	0,10	0,15
4 NL 0,3 B	1,1	6,69	0,39	4,40	25,13	62,74	2,88	4,46	38,84	0,43	0,67	0,07	0,11
Média	1,42	6,75	0,43	4,36	25,08	63,05	2,85	4,24	40,03	0,57	0,85	0,10	0,16
± DP	0,15	0,04	0,06	0,19	0,51	0,63	0,07	0,15	2,42	0,08	0,09	0,02	0,02

(conclusão)												
1 PL 0,04 A	0,75	6,50	2,40	17,60	67,29	6,27	6,45	12,78	0,10	0,65	0,03	0,22
1 PL 0,04 B	0,94	6,45	1,44	10,93	42,46	3,96	41,21	23,49	0,22	0,72	0,08	0,25
2 PL 0,04 A	0,77	6,46	2,32	17,87	66,78	6,37	6,67	14,16	0,11	0,66	0,05	0,28
2 PL 0,04 B	0,66	6,46	2,30	17,95	66,83	6,31	6,62	17,05	0,11	0,55	0,05	0,24
3 PL 0,04 A	1,03	6,70	2,43	17,96	67,66	5,15	6,80	22,61	0,23	0,80	0,07	0,23
3 PL 0,04 B	0,99	6,70	2,62	17,56	67,81	5,14	6,88	2,25	0,02	0,97	0,01	0,27
Média	0,86	6,55	2,25	16,64	63,14	5,53	12,44	15,39	0,13	0,72	0,05	0,25
+ DP	0,15	0,12	0,41	2,80	10,14	0,96	14,10	7,77	0,08	0,14	0,03	0,02
1 PL 0,06 A	1,1	5,35	2,11	15,37	69,11	6,93	6,49	14,83	0,16	0,94	0,05	0,28
1 PL 0,06 B	1,11	5,36	1,82	15,29	69,49	6,91	6,49	15,25	0,17	0,94	0,05	0,28
2 PL 0,06 A	1,12	5,30	2,02	15,77	68,98	6,48	6,75	18,25	0,20	0,92	0,05	0,23
2 PL 0,06 B	1,22	5,26	2,01	15,86	68,63	6,62	6,87	16,39	0,20	1,02	0,05	0,25
3 PL 0,06 A	1,15	5,25	1,98	15,73	68,94	6,27	7,08	18,61	0,21	0,94	0,05	0,20
3 PL 0,06 B	1,28	5,30	1,97	15,76	68,95	6,24	7,07	17,30	0,22	1,06	0,05	0,22
4 PL 0,06 A	1,81	5,27	2,47	17,53	67,31	5,54	7,16	17,05	0,31	1,50	0,05	0,25
4 PL 0,06 B	1,46	5,27	2,25	17,49	67,53	5,53	7,20	21,65	0,32	1,14	0,05	0,19
Média	1,28	5,30	2,08	16,10	68,62	6,31	6,89	17,42	0,22	1,06	0,05	0,24
+ DP	0,25	0,04	0,20	0,89	0,78	0,55	0,29	2,16	0,06	0,20	0,00	0,03

Ñ Lim = Sem limitação de nitrogênio ou fósforo; NL 0,2 = sulfato de amônio 0,2 g/L; NL 0,3 = sulfato de amônio 0,3 g/L; PL 0,04 = fosfato de potássio 0,04 g/L; PL 0,06 = fosfato de potássio 0,06 g/L; MSC = massa seca celular; 3 HB = 3 hidroxi-butirato; 3HHX = 3 hidroxi-hexanoato; 3HO = 3 hidroxi-octanoato; 3HD = 3 hidroxi-decanoato; 3HDdΔ5 = 3 hidroxi-dodecanoato delta 5; 3HDd = 3 hidroxi-dodecanoato; PHA (% MSC) = porcentagem de massa seca correspondente a PHA; PHA (g/L) = PHA em gramas por litro, Xr (g/L) = massa seca residual.

APÊNDICE D – Ensaio utilizando como fonte de carbono 20% de glicose marcada em todos os carbonos e 80% de glicose não marcada.

Condição	MSC	pH	Composição PHA Mol%					PHA (%MSC)	PHA (g/L)	Xr (g/L)	Y _{PHA}	Y _{Xr}
			3HHX	3HO	3HD	3HDd	3HDdD ₅					
1 SN inicial	2,64	7,2	16,96	0,00	38,96	0,00	44,07	1,59	0,04	2,60	0,01	0,48
2 SN inicial	2,92	7,2	13,82	46,56	12,14	0,00	27,48	2,98	0,09	2,83	0,02	0,60
Média	2,78	7,20	15,39	23,28	25,55	0,00	35,78	2,29	0,04	1,81	0,01	0,36
± Desv. Pad.	0,20	0,00	2,22	32,92	18,97	0,00	11,73	0,98	0,04	1,57	0,01	0,32
1 SP inicial	3,24	7,2	9,89	45,19	13,05	0,00	31,87	2,68	0,09	3,15	0,02	0,62
2 SP inicial	2,6	7,2	0,00	50,14	24,35	0,00	25,51	1,60	0,04	2,56	0,01	0,55
3 SP inicial	3,2	7,2	0,00	64,58	18,76	0,00	16,66	2,26	0,07	3,13	0,02	0,65
Média	3,01	7,20	3,30	53,30	18,72	0,00	24,68	2,18	0,07	2,95	0,01	0,61
± Desv. Pad.	0,36	0,00	5,71	10,08	5,65	0,00	7,64	0,54	0,02	0,34	0,00	0,05
1 SNA 24h	3,33	7,11	3,85	29,93	59,57	2,93	3,73	30,43	1,01	2,32	0,19	0,43
1 SNB 24h	3,37	7,1	3,74	32,37	56,92	3,17	3,80	30,82	1,04	2,33	0,19	0,43
2 SNA 24h	2,99	7,09	3,69	31,09	58,95	2,66	3,61	28,76	0,86	2,13	0,18	0,45
2 SNB 24h	3	7,09	3,63	31,85	57,80	3,06	3,65	31,13	0,93	2,07	0,20	0,44
3 SNA 24h	3	7,11	3,35	31,10	58,26	3,10	4,19	32,17	0,97	2,03	0,19	0,40
3 SNB 24h	3,06	7,11	2,26	31,56	59,01	3,29	3,87	31,01	0,95	2,11	0,19	0,42
Média	3,13	7,10	3,42	31,32	58,42	3,03	3,81	30,72	0,96	2,16	0,19	0,43
± Desv. Pad.	0,18	0,01	0,59	0,83	0,96	0,22	0,21	1,12	0,06	0,13	0,01	0,02
1 SPA 24h	3	6,4	3,59	24,86	58,74	5,00	7,81	18,30	0,55	2,45	0,11	0,48
1 SPB 24h	3,04	6,48	4,50	22,57	61,10	4,83	7,00	15,87	0,48	2,56	0,09	0,50
2 SPA 24h	3	6,4	3,57	20,64	63,87	4,68	7,23	16,35	0,49	2,51	0,10	0,54
2 SPB 24h	3,06	6,41	4,17	19,84	64,18	4,55	7,26	16,09	0,49	2,57	0,11	0,55
3 SPA 24h	3,06	6,45	3,44	25,97	59,25	4,61	6,74	16,96	0,52	2,54	0,11	0,53
3 SPA 24h	2,97	6,45	2,50	23,65	61,87	5,03	6,94	17,57	0,52	2,45	0,11	0,51
Média	3,02	6,43	3,63	22,92	61,50	4,78	7,16	16,86	0,51	2,51	0,11	0,52
± Desv. Pad.	0,04	0,03	0,69	2,38	2,27	0,20	0,37	0,94	0,03	0,05	0,01	0,03

APÊNDICE E - Tabela completa dos Valores experimentais obtidos com a análise por espectrometria de massas, comparados a dados teóricos obtidos por cálculos de probabilidade

	Valores Teóricos		Valores Experimentais							
	VP/EMP/ED ou VP+ED	VP+ED	1 SN	2 SN	3 SN	SN Média	1 SP	2 SP	3 SP	SP Média
M	0,64	0,59	0,64 ± 0,01	0,63 ± 0,02	0,63 ± 0,04	0,63 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,64 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,63 ± 0,02
M+1	0,16	0,24	0,22 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,01
M+2	0,16	0,13	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,01
M+3	0,04	0,03	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00

Os valores dados para SN e SP são a média ± desvio padrão.

VP = Via das Pentoses, EMP = Embden-Meyerhof Parnas, ED = Entner-Doudoroff; SN = sem nitrogênio; SP = sem fósforo.

APÊNDICE F – Resultados de sequenciamento dos amplicons gerados à partir de PCR utilizando os iniciadores EDDF/EDDRL e *Pseudomonas* sp. LFM046

EDDF

CTCTCTTACCCCCTTGAGGGWGGCTGCCTGCCGGGCGCTCCTTCGTCATCCCAATACCCGCT
GCGGGAGGCACTGTACCGTGGAGACGGCGCGCCAGGTCACCCGCCTGACCCGGCCCCGSTGGG
CAGTTCCTGCCCATAGGCGAGATCGTCGACGAACGTGTGCTGATCAACTCGGTGGTGGCGCT
GCATGCGACCSGCGGGTCCACCAACCACACCTTGACCTGCCGGCCATCGCCCAGGCGGCGG
GCATCCAGCTCACCTGGCAGGACAMGGCCGAGCTCTCCGAAGTGGTGGCGACCCCTCGCCAC
GTCTATCCCAACGGCAAGGCCGACATCAATCACTTCCAGGCCGCCGGCGGCGTGGCCTTCCT
GGTGCGCGAACTGCTCGACGCCGGGCTGCTCCATGAAGACGTCAACACCGTCATGGGGCGTG
GGCTGCAYCATTACACCCAGGAGCCCTTCCTCGAAGACGGCAAGCTGGTCTGGCGTGATGGT
CCGGCCGCCAGCCTGGACGAGAGCATCCTGCGCCCCGGTGGCACGCCCCCTTCTCGCCGGAGGG
CGGCCTGCGGGTAATGAAGGGCAACCTCGGCCGTGGCGTGATGAAGGTGTCCGCCGTGGCCC
CGGAGCACCAGGTGGTGGAAAGCCCCGGCGCGGGTATTCCACGATCAGCAGGCGCTGGCCGAT
GCCTTCAAGGCTGGCGAATTGGAGCGCGACCTGGTGGCGGTGATGCGCTTCCAGGGGCCGCG
CAGCAATGGCATGCCTGAGCTGCACAAGATGACGCCCTTTCCTCGGCGTCTTGACGGATCGK
KGCTWCAAGGTCGCRYTGGTCAACAGAAATT

EDDRL

GYCYGSMRRASGCGGARGGAGGGCGTCATCTTGTGCAGCTCAGGCATGCCATTGCTGCGCG
GCCCCTGGAAGATCATCACCGCCACCAGGTGCGCTCCAATTGCGCAGCCTTGAAGGCATCG
GCCAGCGCCTGCTGATCGTGGAATACCCGCGCCGGGGCTTCCACCACCTGGTGCTCCGGGGC
CACGGCGGACACCTTCATCACGCCACGGCCGAGGTTGCCCTTCATTACCCGCAGGCCGCCCT
CCGGCGAGAAGGGGCGTGCCACCGGGCGCAGGATGCTCTCGTCCAGGCTGGCGGCCGGACCA
TCACGCCAGACCAGCTTGCCGTCTTCGAGGAAGGGCTCCTGGGTGTAATGGTGCAGCCCACG
CCCCATGACGGTGTTGACGTCTTCATGGAGCAGCCGGCGTCGAGCAGTTCGCGCACCAGGA
AGGCYACGYCGYCGGCGGCCTGGAAGTGATTGATGTCGGCCTTGCCGTTGGGATAGACGTGG
GCGAGGGTCGGCACCACTTCGGAGAGCTCGGCCATGTCCTGCCAGGTGAGCTGGATGCCCGC
CGCCTGGGCGATGGCCGGCAGGTGCAAGGTGTGGTTGGTGGACCCGCCGGTTCGCATGCAGCG
CCACCACCGAGTTGATCAGCACACGTTTCGTCGACGATCTCGCCTATGGGCAGGAACTGCCCA
CCCTGCCGGGTGAGGCGGGTGACCTGGCGCGCCGTCTCCACGGTCAGTGCCTCCCGCAGCGG
GGTWTGTTGGGATTGACGAAKGAGCGCCCGGCAGTGCAGCCCYATCMCTCCATGAGMATCTGG
TTGGWGTGTCGKAMCCMTAGAAAGACT

APÊNDICE G - Resultados de sequenciamento dos amplicons gerados à partir de PCR utilizando os iniciadores EDDF/EDDRC e *Pseudomonas* sp. LFM046

EDDF

GYMTGCRGTGATGGGGCTGCAYCTSCWGGSMKYGTMCCTTCGTCATCCCAATACCCCGCTGCG
GGAGSCWYTGWCCGTGGAGACGGCGCGCCAGGTCACCCGCCTGACCCGGCAGGGTGGGCAGT
TCCTGCCCATAGGCGAGATCGTCGACGAACGTGTGCTGATCAACTCGGTGGTGGCGCTGCAT
GCGACCGGCGGGTCCACCAACCACACCCTGCACCTSCCCGCMWTKGA

EDDRC

GGTTYATTGGAYTGATCCWGTAGGCASTACMYRRGTKAATCAGCACACGTTTCGTCGACGATC
TCGCCTATGGGCAGGAAGTGCACCCCTGCCGGGTGAGGCGGGTGACCTGGCSCKYCGTCTC
CACGGTCAGTGCCTCCCGCAGCGGGGTATTGGGATTGACGAAGGAGGCGCCCGGCAGGTGCA
GCCCCATCACCTCCATGAGCATCTGGTTGGWRTTGGCRGTRCCRTAGAAGA

APÊNDICE H - Resultado de sequenciamento do inserto do gene *edd* no plasmídeo pBBR1MCS-2, para o recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd*

Iniciador EDDF KT2440

GSYMYMMYYWKYYWGKAWMCCTCTGGCMGTTCGAGTGAACCTGTGGCACAAAGGAGCTTCAC
TGAAACGGTTTTGTTGYTGGAATTACAAGATTATTTCACTGGCTGATAGAAAACAAGCCTTTT
TAGTGGCAGTATTTTGTTTAAATATACAACGAGTGGTTGGGTGTCGTGCCTCCACCGATGCA
GCGGGCTCCTAACCATGAGCCTAGGCCGCAATCGTTTGGAGGGGAAATGCTCGGTAAACCGC
CCTTACAATTAGCCTGGAGTCCAGTACATGCATCCGCGCATCCTTGAGGTCACCCAGCGGCT
GGTCGAACGCAGCCGCGCCACCCGCGAACGCTACCTGCAACTGATTTCGCGGCGCGGCCAGTG
AAGGCCCCATGCGTGCCAGCCTGCAGTGCGCCAACTTCGCCCACGGCGTGGCCGTTGCGGC
AGCGAAGACAAGCAGACTCTGCGCCTGATGAACGCGGCCAACGTGGCCATCGTCTCGGCCTA
CAACGACATGTTGTCTGCCCACCAGCCTTACTTGCACCTCCCCGAGCAGATCAAGCAGGCCC
TGCGCGAGGTTCGGCTCGGTTCGGCCAGTTTCGCCGGTGGCGTGCCGGCCATGTGCGATGGGGTG
ACCCAGGGCGAGCCGGGCATGGAGCTGGCGATCGCCAGCCGTGAAGTGATCGCGATGTCCAC
GGCGGTAGCGCTGTTCGCACAACATGTTTCGACGCGGCACTCATGCTGGGCATCTGCGACAAGA
TCGTCCCCGGCCTGATGATGGGCGCGTTGCGCTTCGGCCACCTGCCGACCATCTTCGTCCCG
GGTGGGCCAATGGTTTCCGGCATCTCCAACAAGCAGAAGCCGATGTGCGCCAGCGCTATGCC
GAAGGCAAGGYCAGCCGCGAAGAGCTGTGGAGTCCGARATGRAATTCCCTACCACAGCCCCG
CACTTGCACCTCYWCGAACGCCACCCACCAGTGTGGATGCACGGTAARTGGGGTCGGTSATG
CTA

Iniciador EDDR KT2440

GSSYKKKKYSSRGCGGKGGSSRRSSACKYATCGGGCATTGGTGCCGCCAATATCACCGACCA
GCAGGTGCTTCATTTGAGGTGCTCCAGGGCCGAGGTAAAGGCACTGGCGCCCTGCTCTGCCG
GGCTGAACGCCATGCGCATGAAGCCGAACAGCTCGCGCCCACACCCAGGTCGTTGCCCTGG
GGTGCCGGCGGCAGCTCACGGCTGGCCAGTTCTTCGGCCGACACCATGATCCGCAACGTGCC
TTCGACTCCGTCGACCCGCACGATATCACCATCGCGCACCCGTGCCAGCGGGCCGCGTCGT
AAGCCCCCGGGCAAACGTGGATGGCCGCGGGGATCTTGCCCCGAGGCACCGGACATGCGCCCC
TCGGTGACCAACGCAACCTTGTAGCCACGGTCCTGCAATACACCGAGGAACGGGGTGAGCTT
GTGCASTTCCGGCWTGCCATTGCAGCGYGGGCCCTGGAAGCGCACCACCGCGACAAAGTCAC
GCTCCAGCTCACCGGCCTTGAACGCATCGGCCAGCGACTGCTGGTCTTGGAACACCCGCSCC
GGGGCCTCGACCACCTGGTGCTCGGGGGCRAGGCAGATACTTTCATCACGCCACGGCCCAGG
TTGICYWTCCMTCCCCGCAGAYCGCCTTCGSCCGAAATGKCSRCACACCGGRCGCAGAYGCT
TCSTCCMAGSTGTGTTGCKGCCCTTCSCGCACA

APÊNDICE I – Resultado de sequenciamento do inserto do gene *edd* no plasmídeo pBBR1MCS-2, para o recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046 pBBR1MCS-2 *edd eda*.

Iniciador EDDF KT2440

TSYWATGGMAGWWACCTCTGGCAGTTCGAGTGAACCTGTGGCACAAAGGAGCTTCACTGAAA
 CGGTTTTGTTGTTGGAATTACAAGATTATTCAGTGGCTGATAGAAAACAAGCCTTTTTTAGTG
 GCAGTATTTTTGTTTAAATATACAACGAGTGGTTGGGTGTCGTGCCTCCACCGATGCAGCGGG
 CTCCTAACCATGAGCCTAGGCCGCAATCGTTTGGAGGGGAAATGCTCGGTAAACCGCCCTTA
 CAATTAGCCTGGAGTCCAGTACATGCATCCGCGCATCCTTGAGGTCACCCAGCGGCTGGTTCG
 AACGCAGCCGCGCCACCCGCGAACGCTACCTGCAACTGATTCGCGGGCGCGGCCAGTGAAGGC
 CCCATGCGTGCCAGCCTGCAGTGCGCCAACTTCGCCCACGGCGTGGCCGGTTGCGGCAGCGA
 AGACAAGCAGACTCTGCGCCTGATGAACGCGGCCAACGTGGCCATCGTCTCGGCCTACAACG
 ACATGTTGTCTGCCCACCAGCCTTACTTGCACTTCCCCGAGCAGATCAAGCAGGCCCTGCGC
 GAGGTCGGCTCGGTGCGCCAGTTCGCCGGTGGCGTGCCGGCCATGTGCGATGGGGTGACCCA
 GGGCGAGCCGGGCATGGAGCTGGCGATCGCCAGCCGTGAAGTGATCGCGATGTCCACGGCGG
 TAGCGCTGTGCGACAACATGTTTCGACGCGGCACTCATGCTGGGCATCTGCGACAAGATCGTC
 CCCGGCCTGATGATGGGCGCGTTGCGCTTCGGCCACCTGCCGACCATCTTCGTCCCGGGTGG
 GCCAATGGTTTCCGGCATCTCCACAAGCARAAGGCCGATGTGCGCCAGCGCTATGCCGAAGC
 AAGGCCAGCCGCGAAGAGCTGTGGAGTCCGAGATGATCTACCMRCCCGGCACTGCACTTCC
 WACGCACCGCAAMCCAAMCAGATKGGGTGAWGCAAGATKGAWGGGGGGCGTK