

NATHÁLIA FERNANDES GONÇALVES MACHADO

**ESTUDO DO METABOLISMO DE PROPIONATO EM *PSEUDOMONAS* SP.
LFM046 PARA O CONTROLE NA COMPOSIÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS**

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

São Paulo
2013

NATHÁLIA FERNANDES GONÇALVES MACHADO

**ESTUDO DO METABOLISMO DE PROPIONATO EM *PSEUDOMONAS* SP.
LFM046 PARA O CONTROLE NA COMPOSIÇÃO DE
POLIHIDROXIALCANOATOS PRODUZIDOS**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: 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

Machado, Nathália Fernandes Gonçalves.

Estudo do metabolismo de Propionato em *Pseudomas* sp. LFM046 para o controle na composição de polihidroxicanoatos produzidos / Nathália Fernandes Gonçalves Machado. -- São Paulo, 2013.

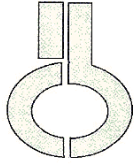
Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

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

Versão do título para o inglês: Study of Propionate metabolism in *Pseudomas* sp. LFM046 to control the composition of polyhydroxyalkanoates produced.

1. *Pseudomonas* 2. Plásticos biodegradáveis 3. Polihidroxicanoatos
4. Propionato 5. Ciclo do 2-metilcitrate 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/SBIB019/2013



**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° 382/10 referente ao projeto intitulado: *“Estudo do metabolismo de propionato em Pseudomonas SP. LFMO46 para o controle na composição de polihidroxicanoatos produzidos”* sob a responsabilidade de **Nathália Fernandes Gonçalves Machado**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, 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, 27 de abril de 2010.

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

PROF. DR. PAOLO M.A ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, familiares e amigos
por me incentivarem e apoiarem
sempre e, acima de tudo, por terem
me tornado quem eu sou.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Dr. José Gregório Cabrera Gomez pela oportunidade de realizar este projeto de pesquisa. Sua orientação, ensinamentos e novas perspectivas apresentados foram essenciais para a realização deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Biopolímeros agradeço pelo companheirismo, ajuda e momentos de descontração. À Dani eu agradeço pela amizade e pelas noites compartilhadas dentro e fora do laboratório. Ao Rafa, agradeço por ter me apresentado os PHAs, pelas conversas e pelas risadas.

A todos os professores que de alguma forma contribuíram para esta conquista e para minha formação.

Aos meus amigos, gostaria de agradecer por tornarem essa jornada mais leve e deliciosa, por todos os momentos compartilhados, pela ajuda e pela presença. Pelos sorrisos, pelos conselhos e pelos olhares que me deixam sem palavras. Vocês são incríveis!

Agradeço, principalmente, aos meus pais por todo apoio, amor e compreensão até nos momentos mais incompreensíveis. Saibam que sem vocês todos os passos, até os mais certos, teriam sido muito mais difíceis. Obrigado por tudo. Eu amo vocês!

Agradeço ao CNPq e à FAPESP (Processo 2010/03162-3) pelo apoio financeiro.

“E pela minha lei
a gente era obrigado
a ser feliz!”
Chico Buarque

RESUMO

MACHADO NFG. Estudo do metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046 para o controle na composição de polihidroxialcanoatos produzidos. 2013. (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres produzidos por bactérias como material de reserva de carbono e energia. Esses polímeros despertam interesse industrial, pois apresentam propriedades termoplásticas. PHA produzidos por *Pseudomonas* são elastômeros ou géis viscosos e contêm monômeros de cadeia média (C6-C14). Utilizando carboidratos e ácido propiônico foi produzido um PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 contendo monômeros com número ímpar (HAI) e par (HAp) de carbonos. Demonstrou-se que polímeros desse tipo apresentam propriedades adequadas para serem utilizados em formulações de adesivos de contato. Entretanto, a eficiência de conversão do ácido propiônico em unidades HAI foi baixa e mutantes deficientes no metabolismo de propionato foram obtidos. O objetivo deste trabalho foi aprofundar os estudos do metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046. Foi analisada a presença de genes de três vias descritas para o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* spp. com genomas sequenciados. Genes relacionados ao ciclo do 2-metilcitrato foram encontrados em todas as espécies de *Pseudomonas* tipicamente compondo um operon *prpRBCAcnMprpFD*, embora em algumas espécies *prpD* encontrasse separado do operon. Genes da via do metilmalonil-CoA de *E. coli* (*scpAArgKscpBC*) não foram encontrados em nenhum dos genomas de *Pseudomonas* sequenciados. Genes da α -oxidação de propionato foram encontrados em todas as linhagens de *P. aeruginosa*, mas não em outras espécies. O operon correspondente a α -oxidação contém seis genes em linhagens de *P. aeruginosa*, enquanto em *Burkholderia* spp. são três genes. A análise de um mutante *prp* de *Pseudomonas* sp. LFM046 obtido por inserção de transposon revelou que estava mutado no gene *prpB*, relacionado ao ciclo do 2-metilcitrato. A análise de mutantes obtidos por radiação ultravioleta revelou que nenhum deles apresentava características de metabolização do propionato semelhante ao mutante afetado no gene *prpB*, entretanto dois devem estar afetados em via menos relevante para o metabolismo de propionato e outros dois na ativação desse ácido orgânico. Experimentos com propionato marcado no carbono 1 (C^{13}) demonstraram que as vias do oxobutirato, do metilmalonil-CoA e do 2-hidroxiglutarato não devem contribuir para o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046. Experimentos adicionais serão necessários para demonstrar se alguma outra via metabólica contribui para o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046.

Palavras-chaves: *Pseudomonas*. Polihidroxialcanoatos. Metabolismo de propionato. Ciclo do 2-metilcitrato.

ABSTRACT

MACHADO NFG. Study of propionate metabolism in *Pseudomonas* sp. LFM046 to control the composition of polyhydroxyalkanoates produced. 2013. (Master thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters produced by bacteria as carbon and energy reserve material. These polymers awaken industrial interest since they have thermoplastic properties. PHA produced by *Pseudomonas* are elastomers or viscous gels and contain medium chain monomers (C6-C14). Using carbohydrates and propionic acid, *Pseudomonas* sp. LFM046 produced PHA containing monomers with odd (HAI) and pair (HAP) number of carbons. It was demonstrated that such polymers have suitable properties to be used in contact adhesives formulations. However, the efficiency of propionic acid conversion in HAI units was low and propionate metabolism mutants were obtained. The objective of this study was to deepen the studies of the propionate metabolism in *Pseudomonas* sp. LFM046. The presence of genes described for three propionate metabolism pathways were analyzed in *Pseudomonas* spp. with sequenced genomes. Genes related to the 2-methylcitrate cycle were found in all species of *Pseudomonas* typically constituting an operon *prpRBCAcmprpFD*, although in some species *prpD* is not found in the operon but in another genome region. Genes related to the methylmalonyl-CoA pathway from *E. coli* (*scpAArgKscpBC*) were not found in any of *Pseudomonas* sequenced genomes. Genes related to the propionate α -oxidation were found in all strains of *P. aeruginosa*, but not in other *Pseudomonas* species. The operon corresponding to α -oxidation contains six genes in *P. aeruginosa* strains, while in *Burkholderia* spp. contains three genes. The analysis of a *Pseudomonas* sp. LFM046 *prp* mutant obtained by transposon insertion revealed that it was mutated on the *prpB* gene, related to the 2-methylcitrate cycle. The analysis of mutants obtained by UV showed that none of them had similar characteristics in the propionate metabolism to the propionate metabolism mutant affected in *prpB*, however two of them must be affected in a least significant pathway of the propionate metabolism and other two on the activation of this organic acid. Experiments with labeled propionate at carbon 1 (^{13}C) showed that the oxobutyrate, the methylmalonyl-CoA and 2-hydroxyglutarate pathways should not contribute to the propionate metabolism in *Pseudomonas* sp. LFM046. Additional experiments will be needed to establish whether some other pathway contributes to the propionate metabolism in *Pseudomonas* sp. LFM046.

Keywords: *Pseudomonas*. Polyhydroxyalkanoates. Propionate metabolism. 2-Methylcitrate cycle.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Polihidroxicanoatos.....	15
2.2 Aplicações dos PHAmcl.....	16
2.3 Metabolismo de PHAmcl.....	17
2.4 Metabolismo de propionato.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Microrganismos utilizados.....	27
3.2 Meios de cultura e condições de cultivo.....	27
3.3 Metodologia Analítica.....	31
<i>3.3.1 Determinação da Biomassa.....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.2 Determinação do pH.....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.3 Quantidade e composição de PHAs.....</i>	<i>31</i>
<i>3.3.4 Concentração de carboidratos.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3.5 Concentração de propionato.....</i>	<i>33</i>
<i>3.3.6 Determinação do fator de conversão entre ácido propiônico monômeros de cadeia ímpar ($Y_{HAi/prp}$).....</i>	<i>33</i>
<i>3.3.7 Análise Estatística.....</i>	<i>34</i>
3.4 Manipulação de DNA.....	34
<i>3.4.1 Extração do DNA genômico e plasmidial.....</i>	<i>34</i>
<i>3.4.2 Digestão do DNA.....</i>	<i>34</i>
<i>3.4.3 Ligação</i>	<i>35</i>
<i>3.4.4 Inserção de DNA em bactérias por transformação.....</i>	<i>35</i>
<i>3.4.5 Construção da biblioteca genômica da linhagem LFM046.....</i>	<i>36</i>

3.4.6 Busca do local de mutação por UV.....	38
3.4.7 Identificação do local de inserção do transposon mini-Tn5 no genoma da linhagem LFM693.....	38
3.5 Análise da linhagem mutante LFM 693 pela técnica de Southern Blot.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Análise do contexto genômico do locus <i>prp</i> e outros genes relacionados ao metabolismo de propionato em <i>Pseudomonas</i>	42
4.2 Detecção do local de inserção do transposon no mutante LFM693.....	49
4.3 Crescimento de mutantes em propionato.....	54
4.4 Produção de PHA por mutantes afetados no metabolismo de propionato.....	55
4.6 Construção da biblioteca genômica de LFM046 e determinação do local de mutação em mutante UV.....	68
4.6 Ensaios com carbono marcado.....	69
5 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
Apêndice – Resultados dos ensaios em frascos agitados.....	94

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A produção de polihidroxialcanoatos (PHA) como material de reserva de carbono e energia é uma característica presente em muitas bactérias. A descoberta que poli-3-hidroxi-butirato (P3HB), o mais conhecido dos PHA, apresenta propriedades termoplásticas despertou o interesse industrial já na década de 1960. O interesse industrial aumentou com a descoberta de que diversos outros monômeros podem ser incorporados aos PHA produzidos por bactérias e que as propriedades térmicas e mecânicas do polímero são moduladas de acordo com essa composição. PHA contendo monômeros de cadeia média (PHAmcl - 6 a 14 átomos de carbono) apresentam propriedades elastoméricas semelhantes à borracha (Brandl et al., 1988; Reddy et al., 2003).

Na biossíntese de PHA, um fator que contribuiu para o surgimento de diferentes monômeros é a fonte de carbono utilizada, além da especificidade da PHA sintase. Uma estratégia para diversificar a composição do PHAmcl produzido a partir de carboidratos consistiu em fornecer ácido propiônico como co-substrato. Dessa forma, foi possível incorporar além dos monômeros contendo número par de carbonos (HAp), normalmente sintetizados a partir de carboidratos, também monômeros com número ímpar de carbonos (HAi) em *Pseudomonas* sp. LFM046 (Gomez, 2000). Entretanto, a eficiência de conversão do ácido propiônico em HAI foi muito baixa (< 15%) e foram obtidos mutantes deficientes no metabolismo de propionato utilizando radiação ultravioleta. Os resultados avaliados na presença de cerca de 1g/L de propionato foram variáveis e apenas algumas vezes indicavam um aumento na eficiência de conversão desse co-substrato em monômeros ímpares (Gomez, 2000; Gomez et al., 2001).

Diversas vias metabólicas para o catabolismo de propionato já foram propostas para bactérias considerando-se estudos envolvendo determinações enzimáticas em extratos celulares (Wegener et al., 1968). Entretanto, a confirmação para a maioria destas vias metabólicas ainda carece de base genética. Uma via completamente esclarecida do metabolismo de propionato é a do 2-metilcitrato, tanto para fungos (Pronk et al., 1994) como para bactérias (Textor et al., 1997). Os genes da via do 2-metilcitrato estão organizadas em um operon *prpBCDE* em *E. coli* e *S. typhimurium* (Horswill e Escalante-Semerena, 1997; Textor et al., 1997). Foi demonstrada a importância da enzima metilmalonil-CoA mutase, presente na via do metilmalonil-CoA, para a formação de HV em *Nocardia corallina* (Valentin e Dennis, 1996) e o bloqueio do ciclo do 2-metilcitrato em *S. enterica* levou à conversão de succinil-CoA a propionil-CoA, por esta via (Aldor et al., 2002). Além dessas vias, foi observada a existência de genes possivelmente relacionados à α -oxidação de propionato em *Burkholderia sacchari*.

Este trabalho teve como objetivo estudar o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046 com vistas a um maior controle sobre a composição do PHA produzido a partir de misturas de carboidratos e ácido propiônico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por diversas bactérias na forma de grânulos intracelulares que podem atingir até 80% da massa seca celular (Anderson e Dawes, 1990; Doi, 1990). Uma camada de proteínas associadas ao grânulo, denominadas PHAsinas, o estabiliza e evita a coalescência do mesmo no citoplasma (Sudesh et al., 2000). O acúmulo de polihidroxialcanoatos em bactérias não afeta a pressão osmótica das células (Preusting, 1992). Esta classe de biopolímeros despertou interesse industrial devido as suas propriedades termoplásticas serem semelhantes aos polímeros de origem petroquímica, além de apresentarem uma alternativa para minimizar os sérios problemas ambientais causados pelo uso massivo do petróleo (Gomez e Bueno Netto, 1997; Silva et al., 2007). A síntese de PHA normalmente ocorre quando há excesso de uma fonte de carbono no meio de cultura e a limitação de ao menos um nutriente essencial ao crescimento (N, P, O₂, etc) (Brandl et al., 1990).

Atualmente, são conhecidos cerca de 150 diferentes monômeros sendo constituintes dos polihidroxialcanoatos e que são produzidos por diferentes bactérias submetidas a diferentes condições de cultivo a partir de diferentes fontes de carbono. De acordo com o comprimento da cadeia carbônica principal do monômero, os PHA são classificados em PHAscl e PHAmcl. Os PHAscl (“short chain length”) são os PHA contendo monômeros de cadeia curta, ou seja, monômeros com 3 a 5 átomos de carbono e são encontrados em diferentes espécies bacterianas (*Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus ruber*, entre outras). Os PHAmcl (“medium chain length”) contém monômeros de cadeia média,

ou seja, com 6 a 14 átomos de carbono e são encontrados em *Pseudomonas* spp. (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas putida*) (Rehm, 2003; Steinbüchel e Valentim, 1995). Dos 150 diferentes monômeros detectados em PHA produzidos por bactérias, cerca de 90% pertencem à classe dos PHAmcl (Rehm e Steinbüchel, 1999). A composição monomérica, bem como a massa molecular e a distribuição do massa molecular conferem diferentes propriedades físicas e mecânicas aos PHA. Assim, estes biopolímeros poderão se constituir em um futuro muito próximo em polímeros feitos sob medida para as mais diferentes aplicações (Kim et al., 2007).

Dentre os polihidroxicanoatos mais estudados, destaca-se o homopolímero de cadeia curta poli-3-hidroxi-butirato (P3HB). No Brasil, este biopolímero (P3HB) já é produzido em escala industrial pela PHB Industrial S/A utilizando tecnologia desenvolvida pela Universidade de São Paulo, pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT) e pelo Centro de Tecnologia da Copersucar (CTC) (Nonato et al., 2001).

Os polihidroxicanoatos que contém monômeros de cadeia média (PHAmcl) possuem características distintas daqueles contendo monômeros de cadeia curta (HAscl). Enquanto os PHAscl assemelham-se aos plásticos como o polipropileno, os PHAmcl apresentam propriedades elastoméricas semelhantes à borracha (Brandl et al., 1988; Reddy et al., 2003).

2.2 Aplicações dos PHAmcl

Embora os PHAmcl não sejam ainda comercializados, algumas aplicações industriais já foram descritas, dentre elas: a confecção de filmes de recobrimento (De Koning et al., 1997); agentes ligantes em

formulações de tintas a base de água (Van de Walle et al., 1999); como fonte de monômeros quirálicos para a síntese de compostos ativos (Witholt e Kessler, 1999; Eugenio et al., 2010), 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) e como dispositivos de liberação controlada de drogas (Kabilan et al., 2012).

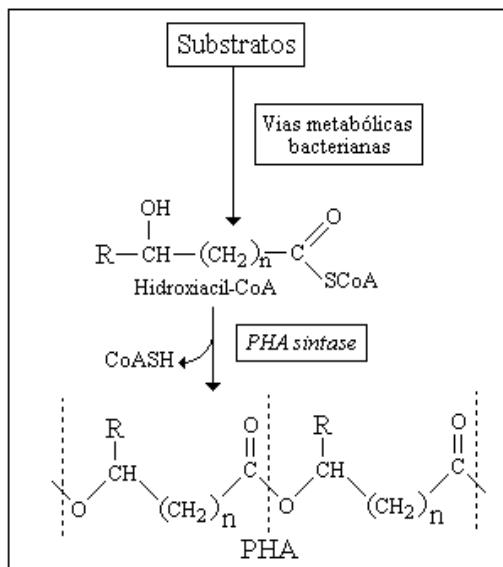
Babu et al. (1996) avaliaram a utilização de PHAmcl como componentes de adesivos sensíveis à pressão em cooperação com a 3M Company (St. Paul, MN, USA). As formulações que apresentaram melhores resultados continham em sua composição monômeros com número par de carbonos (HAp) e monômeros com número ímpar de carbonos (HAi) ou então HAp saturados e HAI insaturados. Para obtenção desses polímeros, foram utilizadas misturas dos ácidos nonanóico ou 10-undecenóico com ácido octanóico. Embora os resultados apresentados por Babu et al. (1996) sejam interessantes uma vez que demonstram a possibilidade de se obter um PHAmcl para uma aplicação industrial importante, as fontes de carbono utilizadas são ainda de custo elevado, representando um impedimento para produção desses polímeros a um custo compatível com a aplicação pretendida.

2.3 Metabolismo de PHAmcl

Na biossíntese de PHA, um fator que contribuiu para o surgimento de diferentes monômeros é a fonte de carbono utilizada, a qual será convertida em um hidroxiacil-CoA por meio das vias metabólicas existentes em cada linhagem bacteriana (Figura 1). Steinbüchel e Lütke-Eversloh (2003) destacam também que além do substrato, a capacidade de se produzir monômeros de cadeia curta ou

média em uma mesma cadeia polimérica está relacionada com a especificidade da PHA sintase. As PHA sintases são enzimas chaves no processo de síntese de polihidroxialcanoatos e catalisam a ligação dos monômeros formados por transesterificação (Witholt e Kessler, 1999). As PHA sintases são agrupadas em 4 classes que diferenciam-se pela especificidade em incorporar polímeros de cadeia curta ou média (Rhem, 2003). O gênero das *Pseudomonas* abriga a classe II de PHA sintase. Esta classe é constituída de um único polipeptídeo que apresenta especificidade para HAMcl, dificilmente incorporando HAScl (Rhem, 2003).

Figura 1 - Metabolismo de síntese de PHA em bactérias



Fonte: Gomez e Bueno Netto, 2001

Os PHAMcl podem ser produzidos tanto a partir de carboidratos como de compostos alifáticos. A síntese a partir de hidrocarbonetos, álcoois, ácidos carboxílicos (compostos alifáticos) é a que permite a incorporação de diversos monômeros aos polímeros, uma vez que a composição deste pode ser modificada dependendo do substrato que é utilizado. Silva-Queiroz et al., em 2009, relataram que a composição de PHA produzidos por *Pseudomonas* a partir de óleos vegetais depende

dos ácidos graxos que constituem o óleo. Pode-se citar ainda o emprego de diferentes ácidos carboxílicos como fonte de carbono para produção de PHAmcl em cultivo com *P. oleovorans*. O cultivo em ácidos carboxílicos contendo número ímpar de carbono resultou em um polímero que contém principalmente monômeros com número ímpar de carbonos; por outro lado, o cultivo em ácidos carboxílicos contendo número par de carbonos favoreceu a incorporação de monômeros com número par de carbonos (Brandl et al., 1988).

Já a síntese a partir de glicose, frutose, gliconato, acetato, glicerol, entre outros substratos é caracterizada pela obtenção de um polímero contendo 3-hidroxidecanoato (3HD) como principal constituinte, além de 3-hidroxi octanoato (3HO), 3-hidroxi hexanoato (3HHx), 3-hidroxi dodecanoato (3HDd), 3-hidroxi tetradecanoato (3HTd), 3-hidroxi-5-*cis*-dodecanoato (3HDd Δ_5) e 3-hidroxi-7-*cis*-dodecanoato (3HTd Δ_7) como constituintes secundários (Haywood et al., 1990; Sánchez et al., 2003).

Está claro que dependendo do tipo de substrato fornecido diferentes monômeros serão gerados e incorporados ao PHA. Huijberts et al. (1994) apontam as três principais vias metabólicas envolvidas na síntese de PHAmcl. A primeira via gera 3-hidroxi acil-CoA pela via de biossíntese de ácidos graxos quando carboidratos são fornecidos. A partir da condensação de diversas moléculas de acetil-CoA (via malonil-CoA) é gerado o 3-hidroxiácido que será incorporado ao polímero (Rehm et al., 1998; Steinbüchel e Hein, 2001). A segunda via consiste na oxidação de alcanos, álcoois ou ácidos carboxílicos por intermédio da β -oxidação (Brandl et al., 1988; Lageveen et al., 1988). Por fim, quando a célula é suprida com ácido hexanóico como única fonte de carbono, observa-se a presença de monômeros contendo dois carbonos a mais que o substrato fornecido, assim a condensação de acetil-CoA com outros acil-CoA intermediários da β -oxidação também deve ocorrer (Witholt e Kessler, 1999).

A composição dos PHAmcl obtidos a partir de carboidratos não pode ser significativamente alterada, pois os substratos são inicialmente convertidos a acetil-CoA e os monômeros sintetizados a partir desse intermediário metabólico pela via de biossíntese de ácidos graxos.

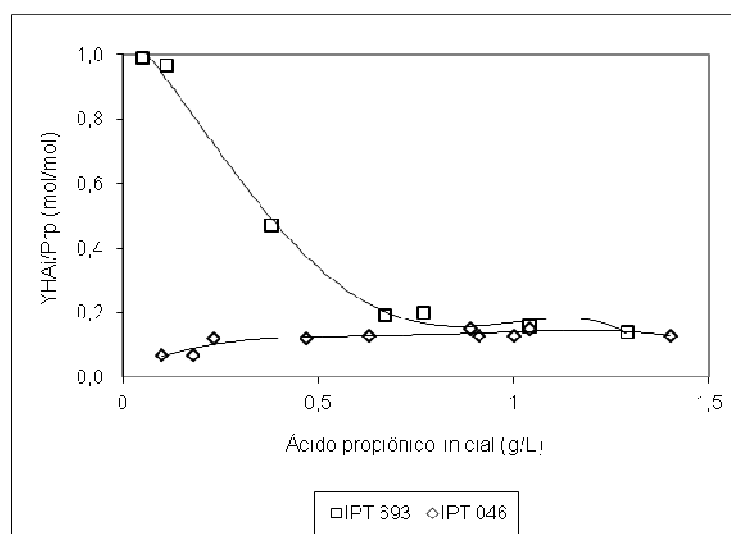
Gomez (2000), ao isolar linhagens bacterianas do solo capazes de acumular PHAmcl, selecionou uma cepa de *Pseudomonas* sp. (LFM046) que se destacou, comparada com a linhagem referência KT2440 de *P. putida*, quando foi cultivada na presença de carboidratos como fonte de carbono. Uma estratégia para diversificar a composição do PHAmcl produzido a partir de carboidratos consistiu em fornecer ácido propiônico como co-substrato. Dessa forma, foi possível incorporar além dos monômeros contendo número par de carbonos (HAp), normalmente sintetizados a partir de carboidratos, também monômeros com número ímpar de carbonos (HAi) em *Pseudomonas* sp. LFM046 (Gomez, 2000). Entretanto, a eficiência de conversão do ácido propiônico em HAI foi muito baixa (< 15%) e foram obtidos mutantes deficientes no metabolismo de propionato utilizando radiação ultravioleta. Os resultados avaliados na presença de cerca de 1g/L de propionato foram variáveis e apenas algumas vezes indicavam um aumento na eficiência de conversão desse co-substrato em monômeros ímpares (Gomez, 2000; Gomez et al., 2001).

Posteriormente, Bretas et al. (2005) utilizaram o transposon mini-*Tn5* como ferramenta para selecionar mutantes afetados no metabolismo de propionato. A linhagem mutante LFM693 destacou-se por ser incapaz de metabolizar o ácido propiônico durante o crescimento, mas capaz de utilizar este ácido carboxílico para produzir PHAmcl.

Bretas et al. (2005) selecionou o mutante denominado LFM693 e este foi cultivado em frascos agitados utilizando diferentes

concentrações de ácido propiônico (Figura 2). Os resultados demonstraram que quando a concentração inicial desta fonte de carbono foi de 1 g/L, esta linhagem apresenta uma eficiência na conversão de propionato em monômeros ímpares ($Y_{\text{HAI}/\text{prp}}$) semelhante a da linhagem selvagem (LFM046), aproximadamente 0,15 mol/mol. Entretanto, sob concentrações iniciais baixas de ácido propiônico (0,1 g/L), a eficiência do mutante LFM693 é significativamente maior ($Y_{\text{HAI}/\text{prp}} = 0,99$ mol/mol), sugerindo que esta linhagem possa alcançar valores maiores de $Y_{\text{HAI}/\text{prp}}$, isto é, melhorar a eficiência na conversão de ácido propiônico em monômeros HAI.

Figura 2 - Eficiência de conversão do propionato em monômeros ímpares sob diferentes concentrações iniciais de propionato



Fonte: Bretas et al., 2005

Os resultados obtidos com mutantes de *P. putida* afetados no metabolismo de propionato indicam que é possível produzir um PHAmcl contendo monômeros HAI e HAp a partir de carboidratos e ácido propiônico, semelhante àquele obtido com misturas dos ácidos octanóico e nonanóico e que apresentam propriedades adequadas para formulações de adesivos de contato. A grande vantagem associada à

utilização de carboidratos e ácido propiônico é a utilização de substratos renováveis e de menor custo, refletindo diretamente no custo do produto. Entretanto, deve-se destacar que uma alta eficiência na conversão de substratos a produtos é um dos fatores apontados como importantes para minimizar o custo de produção de polihidroxialcanoatos (Choi e Lee, 1999; Lemos et al., 2006; Patwardhan e Srivastava, 2004).

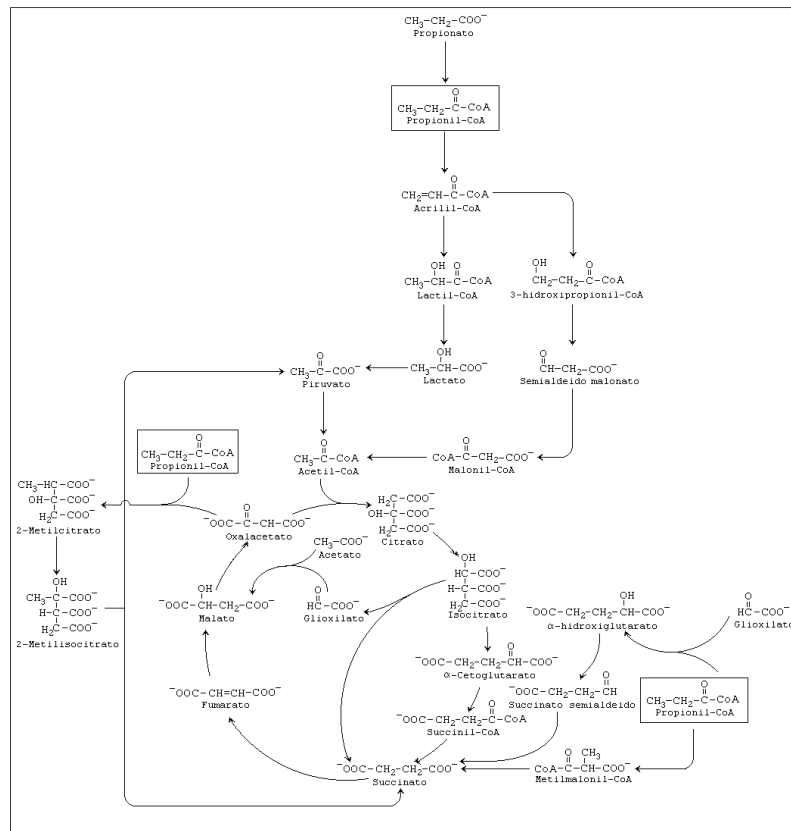
Visando elevar as eficiências de conversão de substratos em polihidroxialcanoatos, algumas estratégias envolvendo processos de produção já foram estudadas em diversos trabalhos citados na literatura. Pereira (1996) estudando a produção do copolímero P3HB-co-3HV (poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato), utilizou hexoses e ácido propiônico para elevar a concentração de 3HV durante a fase de acúmulo. Para tanto, Pereira empregou um regime do tipo descontínuo alimentado, no qual o ácido propiônico foi disponibilizado no meio de cultura via controle de pH. Nesse trabalho, a conversão de ácido propiônico em unidades de 3HV foi quadruplicada ($Y_{3HV/prp}=0,4$ g/g) quando confrontada com os dados de literatura. Du et al. (2000) estudaram diferentes relações de glicose e ácido propiônico na solução de alimentação para a produção do copolímero P3HB-co-3HV empregando o regime descontínuo alimentado.

Recentemente, estudos da modulação da composição monomérica de polihidroxialcanoatos através da manipulação do fluxo da oferta de substratos para cultivos em biorreatores de bancada foram realizados (Rocha et al., 2007). Empregando uma linhagem de *Burkholderia sacchari* LFM189, foi possível estabelecer uma relação proporcional entre a síntese de unidades de 3HV e a concentração de ácido propiônico fornecida no meio de cultura, além da obtenção de altos rendimentos da conversão de ácido propiônico em unidades de 3HV ($Y_{3HV/prp}=1,25, 1,27$ e $1,34$ g/g) (Rocha et al., 2008).

2.4 Metabolismo de propionato

Diversas vias metabólicas para o catabolismo de propionato já foram propostas para bactérias (Figura 3) considerando-se estudos envolvendo determinações enzimáticas em extratos celulares (Wegener et al., 1968).

Figura 3 - Principais vias metabólicas propostas para o metabolismo do ácido propiônico

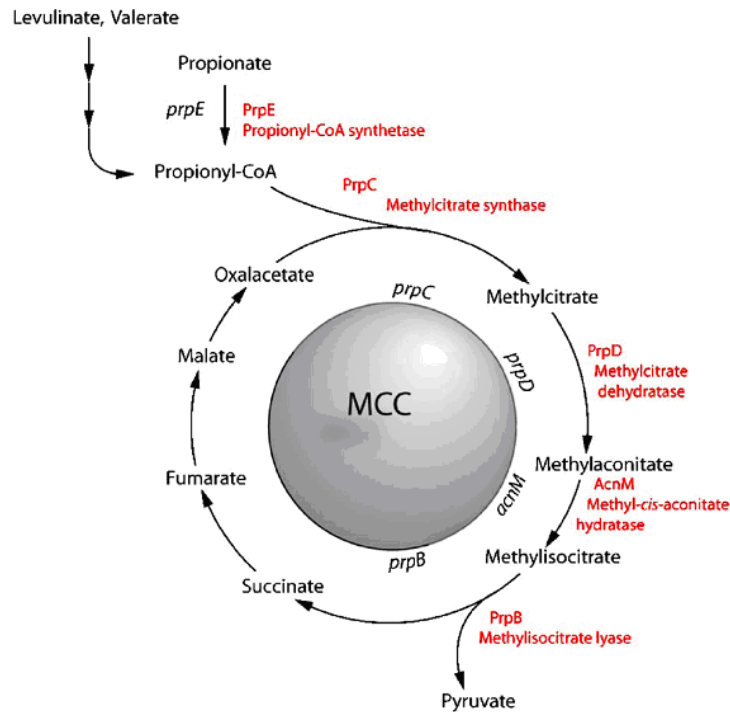


Fonte: Wegener et al., 1968

Entretanto, a confirmação para a maioria destas vias metabólicas ainda carece de base genética. Um gene que afeta o metabolismo de propionato foi localizado a aproximadamente 98 minutos no cromossomo de *Escherichia coli* (Spratt et al., 1981). Este gene foi

designado *prpA* em estudos posteriores (Berlyn, 1998). Apesar do seqüenciamento de todo o genoma de *E. coli*, nenhuma relação clara entre o gene *prpA* e uma via específica do catabolismo de propionato foi estabelecida (Textor et al., 1997). A única via completamente esclarecida do metabolismo de propionato é a do 2-metilcitrato, tanto para fungos (Pronk et al., 1994) como para bactérias (Textor et al., 1997). Os genes da via do 2-metilcitrato estão organizadas em um operon *prpBCDE* em *E. coli* e *S. thyphimurium* (Horswill e Escalante-Semerena, 1997; Textor et al., 1997). Em *Burkolderia sacchari* LFM101, a referida via foi detectada como uma das mais relevantes para o metabolismo de propionato (Pereira et al., 2009; Silva, 1998). A análise do genoma de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou a existência de genes do operon da via do 2-metilcitrato nesta classe de bactérias (www.pseudomonas.com). Ewering et al.. (2006) avaliaram o metabolismo de propionato em mutantes de *Ralstonia eutropha* e *P. putida* afetados na via de 2-metilcitrato (Figura 4). Mutantes nocauteados no gene *acnM* excretavam quantidades expressivas de 2-metilcitrato.

Figura 4 - Via do 2-metilcitrato



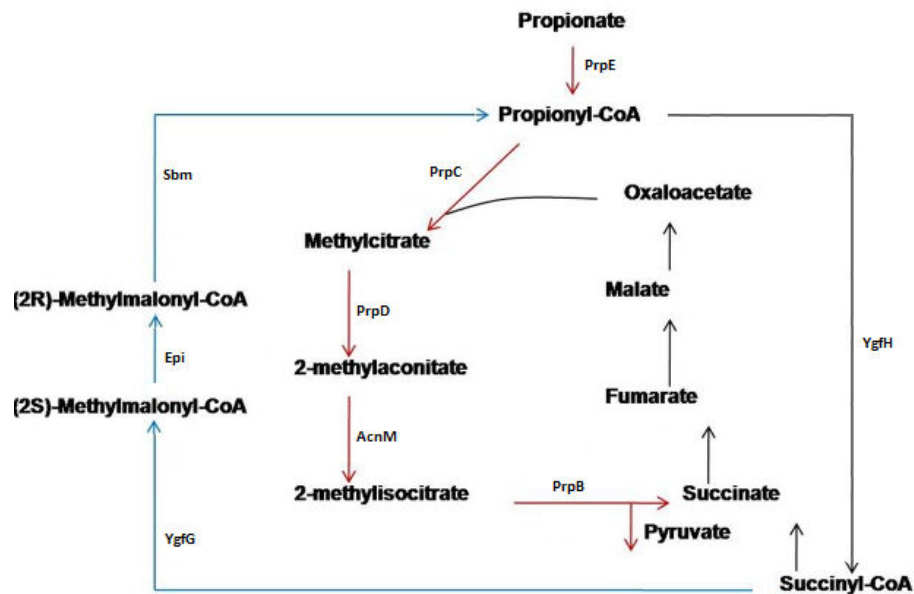
Fonte: Ewering et al., 2006

O metabolismo de propionato está intimamente relacionado à via do metilmalonil (Fig. 5) e ao metabolismo central, como por exemplo, o ciclo do ácido cítrico (Surovova et al., 2012).

Valentin e Dennis (1996) demonstraram a importância da enzima metilmalonil-CoA mutase (Sbm) para a formação de 3HV em *Nocardia corallina*, uma vez que quando fornecido ácido valérico como fonte de carbono este monômero foi predominante. No entanto, os mutantes *sbm* negativos acumulavam poli(3HB-co-HV) contendo entre 2 e 5% mol 3HV, sugerindo que uma via alternativa para formação deste monômero está presente. O ciclo do 2-metilcitrato foi bloqueado em *Salmonella entérica* (mutante *prpC*) o que aumentou a porcentagem de 3HV no polímero produzido e demonstrou que succinil-CoA do ciclo do ácido cítrico é convertido a propionil-CoA, pela via do metilmalonil-CoA (Aldor et al., 2002).

Além dessas vias conhecidas para o metabolismo de propionato, Cintra, em 2008, demonstrou a existência de genes possivelmente relacionados à α -oxidação de propionato em *Burkholderia sacchari*.

Figura 5 - Vias do 2-metilcitrato (linhas vermelhas) e do metilmalonil (linhas azuis)



PrpB: Metilisocitrato liase; PrpC: Metilcitrato sintase; PrpD: Metilcitrato desidratase;
 PrpE: Propionil-CoA sintetase; AcnM: Aconitase hidratase; Sbm: Metilmalonil-CoA
 mutase; YgfG: metilmalonil-CoA decarboxilase; YgfH: coenzima A transferase (Adaptado
 de Surovova et al., 2012).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos utilizados

Neste estudo, foi utilizada a bactéria *Pseudomonas* sp. LFM046 (Gomez, 2000) e seus mutantes obtidos utilizando radiação ultravioleta (Gomez, 2000), cultivados a 30 °C.

O mutante LFM693, obtido a partir da linhagem selvagem LFM046 com utilização do transposon mini-Tn5 (Bretas et al., 2005) também foi utilizado neste trabalho.

Também foram utilizadas as linhagens de *Escherichia coli* XL1-Blue (Bullock et al., 1987) e S17-1 (Simon et al., 1983), cultivadas a 37 °C.

3.2 Meios de cultura e condições de cultivo

As linhagens utilizadas neste trabalho foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB, Tabela 1) (Sambrook et al., 2001) sólido ou líquido e incubadas em estufa ou em agitador rotativo, a 150 rpm. As temperatura empregadas foram de 30 °C para linhagens de *Pseudomonas* sp. e 37 °C para linhagens de *E. coli*.

Os ensaios de crescimento e acúmulo foram realizados em meio mínimo (Tabela 1) (Ramsay et al., 1990) com 15 g/L de glicose. Ácido propiônico foi adicionado ao cultivo em diferentes concentrações (0, 0,25 g/L e 0,5 g/L) após as primeiras 24 horas de cultivo, associadas a glicose residual da fase de crescimento. O experimento teve duração de 72 horas e foi realizado em duplicata. Amostras foram retiradas após inóculo em MM para determinar concentração celular inicial e concentração de glicose e formação de PHA de cadeia média. Após a adição de ácido propiônico, foi retirada amostra dos frascos nos quais

ocorreu a adição para determinar concentração inicial de propionato. Ao final do ensaio, amostra foi retirada para determinar a concentração celular total, consumo de ácido propiônico, glicose e formação de polihidroxialcanoatos de cadeia média.

Nos ensaios para avaliar a possibilidade de excreção de ácido metilisocítrico como alternativa ao estudo do metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp., foram adicionadas após as primeiras 24 horas de cultivo 2 concentrações diferentes de ácido propiônico (0, 0,1 e 0,8 g/L) para avaliar a possível excreção deste ácido sob diferentes condições de cultivo. Ao final do cultivo (72 horas), cerca de 15 mL de sobrenadante foi retirado e liofilizado em tubo de vidro. Em seguida, as amostras foram submetidas a metanólise e analisadas em cromatografia gasosa, como descrito na literatura (Ewering *et al.*, 2006). Foi utilizado como parâmetro para a detecção do ácido metilisocítrico em cromatografia gasosa o ácido isocítrico. Este ácido foi submetido ao mesmo tratamento que as amostras.

No caso de ensaio com ácido propiônico marcado no carbono 1 (Sigma-Aldrich Co., São Paulo, SP, Brasil - 99% Propionic acid 1-13-C) (0,1, 0,5 g/L e 1 g/L) utilizando as linhagens LFM046 e LFM693, após 72 horas de cultivo, o sobrenadante foi retirado para determinação da concentração final de propionato e as células foram colhidas para determinação do biopolímero. Para o ensaio com glicose completamente marcada, houve divisão entre fase de crescimento e fase de acúmulo. Em um primeiro momento, as linhagens LFM046 e LFM693 foram cultivadas em MM sem limitação de nitrogênio (MM1, Tabela 3) com 10 g/L de glicose, durante 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com solução salina 0,8% e inoculadas em MM sem adição de nitrogênio (MM2, Tabela 3), no qual foram adicionados 5g/L de glicose completamente marcada e ácido propiônico nas concentrações de 0, 0,25 e 1g/L.

Para selecionar linhagens contendo o plasmídeo pBBR1MCS-2 (Km^r) ou para o mutante LFM693, que possui plasmídeo mini-*Tn5* com marca de resistência a canamicina, este antibiótico foi utilizado em concentração no meio de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura

Componentes	Meio Luria-Bertani	Meio Mínimo
Complexos	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)
Triptona	10	---
Extrato de levedura	5	---
NaCl	5	---
Definidos quimicamente		
KH_2PO_4	---	1,5
Na_2HPO_4	---	3,5
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	---	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	---	0,2
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	---	0,01
Citrato férrico amoniacal	---	0,06
Solução de Elementos Traços	---	1

Para as formulações de meio mineral a solução de elementos traços continha a formulação mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da Solução de Elementos Traços (SET).

Componentes	Concentração
H ₃ BO ₃	0,3 g/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,2 g/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,1 g/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	30 mg/L
NaMoO ₄ .2H ₂ O	30 mg/L
NiCl ₂ .6H ₂ O	20 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	10 mg/L

Tabela 3 - Composição dos meios de cultura utilizados no ensaio com glicose marcada.

Componentes	MM1	MM2
Na₂HPO₄	3,5 g/L	3,5 g/L
KH₂HPO₄	1,5 g/L	1,5 g/L
(NH₄)₂SO₄	3,5 g/L	0
MgSO₄.7H₂O	1 mL/L	1 mL/L
CaCl₂.2H₂O	1 mL/L	1 mL/L
Citrato férrico amoniacoal	1 mL/L	1 mL/L
Solução de Elementos Traços	1 mL/L	1 mL/L

3.3 Metodologia Analítica

3.3.1 Determinação da Biomassa

A massa seca celular foi determinada gravimetricamente após centrifugação de volume conhecido da cultura, lavagem e liofilização das células.

3.3.2 Determinação do pH

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

3.3.3 Quantidade e composição de PHAs

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (Riis e Mai, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação após os primeiros 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase

aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890 Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos) equipado com uma coluna HP-5 (5% fenilmetilsiloxano, comprimento - 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 210 °C a 8 °C /min e 210 °C por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxi butirato), 3HV (3-Hidroxi valerato), 3HHx (3-Hidroxi hexanoato), 3HHp (3-Hidroxi heptanoato), 3HO (3-Hidroxi octanoato), 3HN (3-Hidroxi nonanoato), 3HD (3-Hidroxi decanoato) e 3HDD (3-Hidroxi dodecanoato).

3.3.4 Concentração de carboidratos

As concentrações de glicose foram determinadas em HPLC (Ultimate 3000 – Dionex: Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, Estados Unidos) equipado com coluna para determinação de açúcares (Aminex HPX87-H). O detector utilizado foi o de índice de refração diferencial (Shodex IR-101).

3.3.5 Concentração de propionato

As concentrações de propionato foram determinadas em HPLC (Ultimate 3000 Dionex) equipado com uma coluna Aminex HPX87-H (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, California). O detector utilizado foi o de luz ultravioleta com arranjo de diodos (Dionex).

3.3.6 Determinação do fator de conversão entre ácido propiônico monômeros de cadeia ímpar ($Y_{HAi/prp}$)

Segundo Hiis (2001) o $Y_{HAi/prp}$ foi calculado seguindo a equação:

$$Y_{HAi/prp} = \frac{HAi - HAI_o}{Prp_o - Prp}$$

Em que:

HAi = massa de monômeros ímpares ao final do ensaio

HAI_o = massa de monômeros ímpares no início do ensaio

Prp_o = massa de propionato no início do ensaio

Prp = massa de propionato ao final do ensaio

3.3.7 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e a análise estatística foi efetivada pela comparação de médias considerando os desvios padrões.

3.4 Manipulação de DNA

3.4.1 Extração do DNA genômico e plasmidial

A extração de DNA foi feita utilizando os kits de extração de DNA plasmidial QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Valencia, CA, Estados Unidos), e o kit de extração de DNA genômico DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen) após o cultivo das linhagens bacterianas por 12 horas em meio LB, conforme indicações do fabricante.

3.4.2 Digestão do DNA

O DNA genômico da linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 foi digerido com a endonuclease de restrição *HindIII*, bem como o plasmídeo pBBR1-MCS2 (Kovach et al., 1985).

3.4.3 Ligação

As reações de ligação foram realizadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de ligação foi utilizado para transformar as linhagens de *E. coli* XL1-Blue ou *E. coli* S17-1 pelo método de obtenção de células quimiocompetentes e transformação descrito no próximo item (Sambrook et al., 2001).

3.4.4 Inserção de DNA em bactérias por transformação

Para preparo de células competentes, as linhagens de *E. coli* XL1-Blue ou S17-1 foram inoculadas separadamente em 25 mL de meio LB adicionado de MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM e incubada em agitador rotativo (150 rpm) a 37 °C até atingir densidade óptica (DO_{650nm}) igual a 0,3-0,6. Foram transferidos 8 mL da cultura para tubos estéreis e gelados que foram mantidos em gelo por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados (5000 rpm, 15 minutos, 4° C). O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 4 mL de tampão de transformação (Tabela 4) gelado. As células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, o “pellet” foi ressuscitado em 0,8 mL do tampão de transformação, dividido em alíquotas de 200 µL as quais foram mantidas em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente.

Para cada 200 µL de células competentes, foi adicionado 10 µL de DNA resultante da reação de ligação. Esta mistura foi homogeneizada por inversão de tubos e incubada em banho de gelo por 30 minutos.

Após este tempo, os tubos foram submetidos a choque térmico a 42 °C por 90 segundos e imediatamente resfriada em gelo, onde foram incubados por 2 minutos. Adicionou-se 600 µL de meio LB e as células foram incubadas por 1 hora a 37 °C. Os clones transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico apropriado (canamicina ou ampicilina). IPTG (isopropil-tio-β-D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) também foram adicionados para diferenciar clones recombinantes contendo o inserto de DNA, na linhagem de *E. coli* XL1-Blue.

Tabela 4 - Formulação do tampão de transformação

Reagente	Concentração (mM)
Tris/HCL	10
CaCl ₂	50
MgCl ₂	10
MgSO ₄	10

O pH foi ajustado em 8,0 e o volume correspondente desta formulação foi de 1000 mL de água destilada.

3.4.5 Construção da biblioteca genômica da linhagem LFM046

Para estudar o metabolismo de propionato na linhagem selvagem LFM046 foi construída sua biblioteca genômica. Para tanto, o DNA genômico da linhagem selvagem foi extraído utilizando kit de extração de DNA genômico da Qiagen (DNeasy® Blood & Tissue). Foi analisada a quantidade e pureza do DNA por medidas de absorbância 260-280 no espectrofotômetro *NanoVue* (GE healthcare) e o DNA foi parcialmente digerido com a enzima *HindIII* por diferentes tempos (entre 5 e 25 minutos a 37 °C, seguido de inativação por 20 minutos a 65 °C) para escolha do tempo ótimo de digestão. O plasmídeo pBBR1MCS-2 foi

extraído utilizando kit de extração de DNA plasmidial da Qiagen (QIAprep® Spin Miniprep). A concentração plasmidial também foi estimada e o plasmídeo foi completamente digerido utilizando a enzima *HindIII* (*overnight* a 37 °C, seguido de inativação por 20 minutos a 65 °C).

A ligação entre o plasmídeo pBBR1MCS-2 totalmente digerido e o DNA genômico da linhagem LFM046 parcialmente digerido foi feita utilizando os DNAs digeridos, a enzima T4 DNA ligase e o tampão da enzima. A reação ocorreu à temperatura ambiente por 16 horas.

Em seguida, foram preparadas células competentes de *E. coli* XL1-Blue e *E. coli* S-17 que foram em seguida transformadas com o produto de ligação entre o plasmídeo pBBR1MCS-2 e o DNA genômico parcialmente digerido da linhagem LFM046.

O resultado da transformação da linhagem *E. coli* S17-1 foi plaqueada (100 µl por placa) em meio LB com canamicina (LBK) e a linhagem *E. coli* XL1-Blue foi plaqueada em meio LBK com 20 µl de IPTG (0,1 M) e 50 µl de XGal (20 mg/mL).

A linhagem *E. coli* XL1Blue foi utilizada para se avaliar a proporção de plasmídeos com insertos do DNA genômico da LFM046 do total de colônias transformadas. Devido a α -complementação do operon LacZ, plasmídeos com inserto originam colônias brancas enquanto colônias azuis são originadas por bactérias transformadas por plasmídeos livres de inserto, quando cultivadas em meio LB com a marca de resistência do plasmídeo e IPTG e XGal. A linhagem *E. coli* S17-1 foi utilizada por ser capaz de conjugar com outras bactérias.

3.4.6 Busca do local de mutação por UV

Com o objetivo de identificar novos genes relacionados com o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046, buscaram-se clones da biblioteca genômica capazes de complementar mutantes obtidos por UV (Gomez, 2000). Para isso, foram utilizadas placas de MM com 1 g/L de propionato sobre a qual foi cultivado um tapete da linhagem mutante em estudo. Sobre o tapete, foram inoculados clones da biblioteca genômica para que ocorresse conjugação entre as linhagens.

3.4.7 Identificação do local de inserção do transposon mini-Tn5 no genoma da linhagem LFM693

Para identificar o gene interrompido e determinar o local de inserção do mini-Tn5/*acZ* na linhagem mutante LFM693, foi realizada a clonagem direta no vetor pUCBM20. Para tanto, o DNA genômico do mutante foi extraído e digerido com a enzima *Pst*I e, em seguida, ligado e transferido para *E. coli* XL1-Blue por transformação. Os clones contendo fragmentos de interesse foram selecionados em meio LB com canamicina. Para a identificação do gene mutado foi realizado o seqüenciamento do fragmento utilizando os iniciadores Ext12 (5'CGCTGACTTGACGGGACGGGACGGC3'), M13f(5'GTAAAACGACGGCCAGT3') e M13r (5'CAGGAAACAGCTATGAC3').

As sequências obtidas foram comparadas ao genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 utilizando o programa BLASTN (Silva-Queiroz, 2007).

3.5 Análise da linhagem mutante LFM 693 pela técnica de *Southern Blot*

Objetivando analisar se o transposon mini-Tn5 havia se inserido em apenas um ponto no genoma da linhagem mutante, foi empregada a técnica de *Southern Blot*. Este experimento foi realizado em parceria com o laboratório da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques do Instituto de Ciências Biomédicas II-USP.

A obtenção da sonda para detectar a inserção do vetor com o fragmento de interesse foi utilizado o método de *random priming synthesis* (Feinberg, 1993) para a marcação da sonda.

Em um banho de gelo, foram colocados em um tubo eppendorf 5 µL do fragmento de DNA, 12 µL de água ultra-pura (Milli-Q) e 1 µL do iniciador pdN6. Em seguida, o tubo foi fervido por 2 minutos e, imediatamente, retornado ao gelo. Adicionou-se 1µL de tampão Klenow (GIBCO Products Invitrogen Corporation, Grand Island, NY Estados Unidos) fornecido pelo fabricante, 1 µL de cada nucleotídeo dTTP, dGTP e dATP, 5 µL de [³²P] dCTP e 1U da enzima Klenow (GIBCO), em volume final de 30 µL. A reação foi mantida em temperatura ambiente por 2 horas e, em seguida, foi adicionado 80 µL de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0) e retirado o [³²P] dCTP livre através do

kit Concert Nucleic Acid Purification System (Qiagen). Após a purificação da sonda, foi retirado 1 μL e a radiação foi quantificada em contador de cintilação para posteriormente ser utilizada no *Southern Blot*.

Para confirmar a integração do transposon no cromossomo da linhagem LFM693, o DNA genômico foi digerido com *Pst*I. A digestão foi realizada nas seguintes proporções: 5 μL do DNA genômico, 2,5 μL de tampão 2, 1 μL da enzima *Pst*I e 16 μL de água Milli-Q. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel agarose 0,8% em tampão de corrida TBE 1X, sendo realizada a corrida a 110V, empregando como marcador de massa o DNA Ladder 1Kb Plus (Invitrogen). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e foi fotografado sob luz UV com uma régua ao lado do marcador.

De modo a transferir o DNA do gel de agarose para uma membrana de nitrocelulose, foi empregado o procedimento descrito por Southern (1975). Para tanto, o gel de agarose foi lavado em água destilada para retirar o brometo de etídio e em seguida foi incubado por 45 minutos em solução de desnaturação (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M) lavado novamente em água destilada e transferido para o segundo tampão (neutralização) contendo Tris base 0,5 M, NaCl 1,5 M em pH 7,5. Por fim, foi incubado em solução X SSC (NaCl 3M e citrato de sódio 0,3 M). A transferência foi realizada em um recipiente contendo 300 mL de solução 10 X SSC por 16 horas em temperatura ambiente.

Após a transferência do DNA do gel de agarose para a membrana de nitrocelulose, previamente seca em temperatura ambiente (30 min.), o gel foi novamente corado em brometo de etídio e visualizado sob luz UV para verificar a transferência para a membrana e fixar o DNA na mesma. Esta exposição teve duração de 5 minutos. Posteriormente a membrana foi pré-hibridizada por 2 horas a 37 °C em solução de hibridização (SSC 5 X, formamida 30%, EDTA 10 mM, SDS 1%, Sorensen buffer composto de fosfato de potássio (pH 6.2) 60 mM e leite em pó 5%) A etapa seguinte consistiu na hibridização com a sonda marcada a 37 °C por 14 horas. Após a hibridização, a membrana foi lavada com as soluções 2 X SSC 0,1 % SDS (30 minutos – 37 °C), 1 X SSC 0,1 % SDS (30 minutos – 37 °C) e 1 X SSC 0,1 % SDS (30 minutos – 65 °C). Por fim, a membrana foi seca em temperatura ambiente por 30 minutos e exposta a filme Hyperfilm (Amersham) durante a noite a -70 °C.

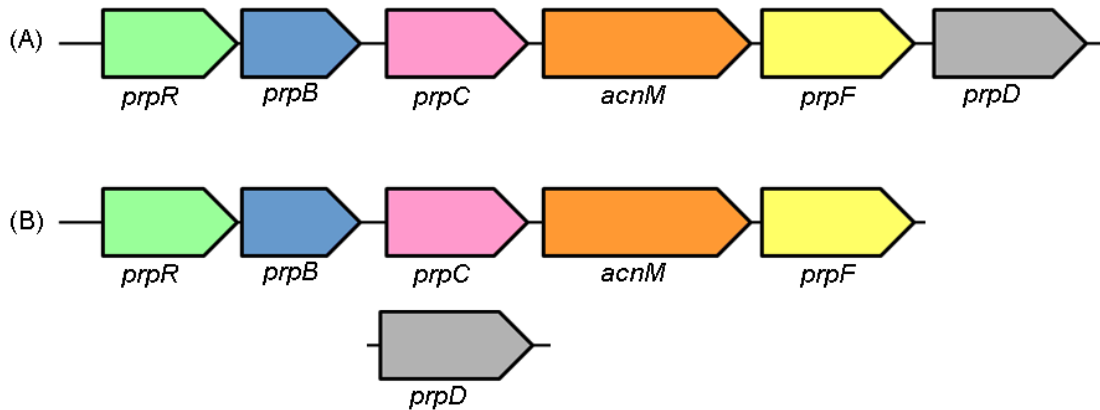
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do contexto genômico do locus *prp* e outros genes relacionados ao metabolismo de propionato em *Pseudomonas*

O locus *prp* relativo a via do 2-metilcitrato está descrito em 27 espécies de *Pseudomonas* no NCBI (National Center for Biotechnology Information), ou seja, todos os genomas completos disponíveis na época em que foi realizada esta análise. A análise destes locus mostrou que existem duas configurações de agrupamentos possíveis em *Pseudomonas*. Em ambas, estão presentes um regulador de transcrição (*prpR*), seguido dos genes *prpB* (metilisocitrato liase), *prpC* (metilcitrato sintase), *acnM* (methyl-cis-aconitase hidratase), *prpF* (methylaconitate delta2-delta3-isomerase), no mesmo sentido de transcrição. Em uma das configurações do agrupamento, o gene *prpD* (metilcitrato desidratase) está presente em seguida ao gene *prpF* (Fig. 6 – A), enquanto na outra este gene não está presente no agrupamento (Fig. 6 – B). Neste segundo caso, o gene *prpD* foi encontrado descrito em outras regiões do genoma apenas em *P. fluorescens* F113 mas uma análise utilizando Blastx levou a proteínas hipotéticas com 100% de similaridade com PrpD em outras regiões do genoma em todas as outras espécies que não possuem o gene *prpD* no agrupamento (*P. syringae* pv. *phaseolica* 1448A, *P. syringae* pv. *tomato* str. DC3000, *P. syringae* pv. *syringae* B728a, *P. stutzeri* DSM4166, *P. stutzeri* ATCC17588, *P. stutzeri* A1501, *P. fulva* 12-X, *P. brassicacearum* subsp. *brassicacearum* NFM421, *P. mendocina* ymp, *P. mendocina* NK-01). No primeiro caso, encontram-se descritas as seguintes espécies: *P. aeruginosa* UCBPP-PA14, *P. aeruginosa* PA01, *P. aeruginosa* LESB58, *P. aeruginosa* NCGM2.S1, *P. aeruginosa* M18, *P. aeruginosa* PA7, *P.*

fluorescens Pf-5, *P. fluorescens* SBW25, *P. fluorescens* Pf0-1, *P. entomophila* L48, *P. putida* W619, *P. putida* KT2440, *P. putida* GB-1, *P. putida* F1, *P. putida* S16, *P. putida* BIRD-1.

Figura 6 - Contexto genômico do locus *prp* em *Pseudomonas*



prpR: regulador de transcrição; *prpB*: metiliscitrato liase, *prpC*: metilcitrato sintase, *acnM*: methyl-*cis*-aconitase hidratase, *prpF*: methylaconitate delta2-delta3-isomerase, *prpD*: metilcitrato desidratase

Essas duas configurações foram recentemente descritas na literatura. Surovova et al. (2012) descrevem que a maioria das *Pseudomonadales* possui os genes do metabolismo de propionato organizado no operon *prpRBC-acnM-prpFD* e que algumas bactérias desse táxon possuem operons mais curtos, como *prpRBC-acnM-prpF*, onde *prpR* refere-se ao regulador de transcrição do operon.

Os genes *prpB*, *prpC* e *prpD* são todos requeridos para o catabolismo de propionato em *Salmonella typhimurium*. A importância da proteína codificada pelo gene *prpE* (propionil-CoA sintetase) no catabolismo de propionato ainda não está completamente esclarecida. Uma possível hipótese para a ausência do gene *prpE* no operon de diversas bactérias é que outras acyl-CoA sintetases poderiam substituir a enzima por ele codificada (Horswill e Escalante-Semenera, 1997).

Nenhum dos genes presentes no operon *prp* da via do 2-metilcitrato mostraram-se duplicados nos genomas de *Pseudomonas* depositados no NCBI, como foi reportado para outras bactérias (Claes et al., 2002; Ewering et al., 2006; Pereira et al., 2009).

Também foi analisada a presença dos genes da via do metilmalonil-CoA em *Pseudomonas*. Embora esta via tenha sido descrita como envolvida no catabolismo de propionato (Steinbüchel, 1991), também tem sido descrita como uma via para produção de propionato a partir de succinato em *Nocardia corallina* (Valentin e Dennis, 1996) e em *Salmonella enterica* expressando genes desta via de *E. coli* (Aldor et al., 2002) e permitindo a síntese de 3HV (3-hidroxivalerato), ou seja, um HAI.

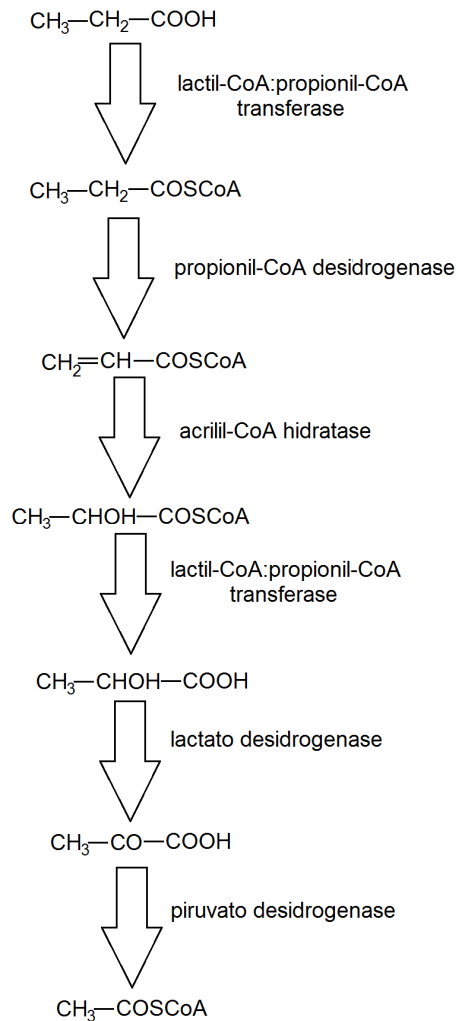
Em *E. coli* K12 (MG1655), os genes relacionados a via do metilmalonil-CoA apresentam-se organizados no operon *scpAargKscpBC*, no qual o gene *scpA* codifica a enzima metilmalonil-CoA mutase, o papel do gene *argK* ainda não está bem esclarecido mas sugere-se que codifique uma proteína com papel regulador, o gene *scpB* codifica a enzima metilmalonil-CoA decarboxilase e o *scpC* codifica uma propionil-CoA:succinil-CoA transferase. A busca por genes desta via no genoma de *Pseudomonas* utilizando o programa tBlastX não permitiu identificar genes com alta similaridade aos genes *scpA* e *scpB*. Mesmo os genes detectados com baixa similaridade não se encontram agrupados nos genomas de *Pseudomonas*.

Foram detectados genes com uma boa similaridade a *scpC* em todos os genomas de *Pseudomonas*, entretanto, próximos a este não foram detectados genes que poderiam estar relacionados ao metabolismo de propionato pela via do metilmalonil-CoA. O produto do gene *scpC* catalisa uma reação bastante comum em outras vias metabólicas, assim o que pode ter sido detectado em *Pseudomonas* é um gene relacionado com essas outras vias, mas não a via do metilmalonil-CoA.

Os dados sugerem, portanto, que a via do metilmalonil-CoA não deve estar presente em *Pseudomonas*.

Outra via que pode estar presente em *Pseudomonas* é a via de α -oxidação (Fig. 7). Genes que podem estar relacionados a essa via metabólica em *Burkholderia sacchari* foram propostos pelo nosso grupo (Cintra, 2008). Nesse estudo, foram realizados experimentos de complementação fenotípica de mutantes obtidos por UV a partir de clones de biblioteca genômica de *B. sacchari*. Um desses clones foi capaz de reconstituir a capacidade de crescimento em propionato em alguns dos mutantes. A análise da sequência de aminoácidos codificada pelo fragmento capaz de complementar o mutante revelou similaridade com sequências de reguladores transcricionais do tipo LysR de diversas bactérias do gênero *Burkholderia*. Uma busca pelas regiões adjacentes ao gene codificador de LysR em *Burkholderia* spp. mostrou a presença de três genes anotados como acil-CoA desidrogenase, acil-CoA transferase/L-carnitina desidratase e uma permease da superfamília de facilitadores MFS, mas não vinculados ao metabolismo de propionato. Com base nos resultados de complementação fenotípica foi proposto que os genes codificariam uma propionil-CoA desidrogenase, uma lactil-CoA:propionil-CoA transferase/acrilil-CoA hidratase e uma propionato permease.

Figura 7 - Via de α -oxidação do propionato



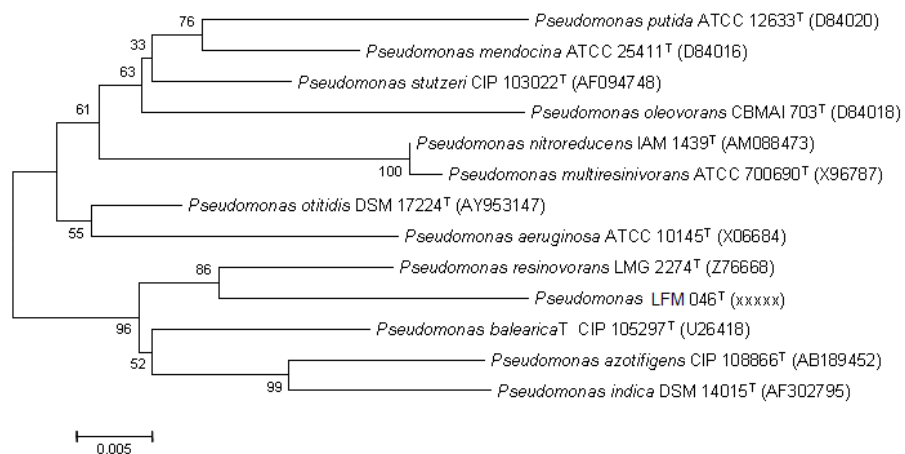
Quando buscados nos genomas de *Pseudomonas*, os genes da via da α -oxidação foram encontrados em todas as 11 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*, mas não em outras espécies deste gênero com genomas sequenciados. Enquanto nos operons de *Burkholderia* são três os genes associados a α -oxidação de propionato (Cintra, 2008), nos genomas de *P. aeruginosa* foram encontrados seis genes que provavelmente se organizam em um operon. O primeiro gene do operon de *Pseudomonas* é homólogo ao mesmo gene no operon de *Burkholderia* e codifica a propionil-CoA desidrogenase, responsável

pela conversão de Propionil-CoA em acrilil-CoA. O segundo gene do operon de *Pseudomona* é homólogo ao mesmo gene no operon de *Burkholderia* e codifica duas atividades enzimáticas: acil-CoA:Propionil-CoA transferase (ou lactil-CoA:Propionil-CoA transferase) e acrilil-CoA hidratase. O terceiro gene do operon de *Pseudomonas* não encontra homólogo no operon de *Burkholderia*. Esse gene está anotado como uma enoil-CoA hidratase e pode ser responsável pela mesma reação da acrilil-CoA hidratase, embora não foram encontradas similaridades significativas entre esses dois genes. O quarto gene do operon de *Pseudomonas* não tem homólogo no operon de *Burkholderia* e está anotado como uma 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase e pode corresponder a lactato desidrogenase, ou seja, seria uma 2-hidroxiacil-CoA desidrogenase. O quinto gene do operon de *Pseudomonas* também não encontra homólogo no operon de *Burkholderia* e está anotado como codificando uma acil-CoA tiolase, pode assim ser uma lactil-CoA thiolase. Nesse caso, a transferência da Coenzima A para o propionato pode ser realizada a partir de outro grupo acil diferente do lactil e a tiolase seria responsável pela conversão de lactil-CoA a lactato. Embora o sexto gene do operon de *Pseudomonas* e o terceiro gene do operon de *Burkholderia* codifiquem para transportadores e supostamente estariam envolvidos no transporte do ácido propiônico para o interior da célula, não foi verificada grande similaridade entre estes dois genes, não representando homólogos.

Desta forma, a α -oxidação do propionato não parece estar tão distribuída no grupo das *Pseudomonas* como o ciclo do 2-metilcitrato e pode ser uma possível via alternativa para degradação de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046. Entretanto, seriam necessários estudos para avaliar sua presença nesta bactéria, uma vez que ela se apresenta restrita a uma única espécie do gênero.

Estudos recentes realizados em nosso laboratório, levaram à construção da árvore filogenética a partir de sequências de rDNA 16S de *Pseudomonas* sp. LFM046 e outras linhagens tipo de *Pseudomonas*. Os resultados mostraram que a linhagem *Pseudomonas* LFM046 se posiciona em um ramo diferente de *P. aeruginosa* e agrupada com *P. resinovorans*, *P. balearica*, *P. azotifigens* e *P. indica* (Fig. 8). Nenhuma dessas linhagens de *Pseudomonas* teve o seu genoma sequenciado, o que prejudica a comparação e formulação de hipóteses para o metabolismo da linhagem LFM046.

Figura 8 - Árvore filogenética construída a partir de sequências de rDNA16S de LFM046 e outras linhagens de *Pseudomonas*



Fonte: Rocha, resultados não publicados

4.2 Detecção do local de inserção do transposon no mutante LFM693

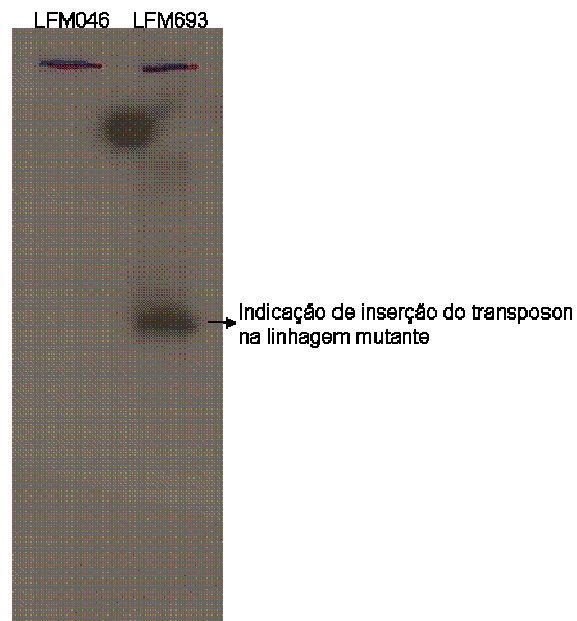
O mutante LFM693 apresenta fenótipo de incapacidade de crescer em propionato, associado a um aumento expressivo na eficiência de conversão de propionato em monômeros HAI, embora esse aumento apenas seja observado sob concentrações baixas de propionato (Bretas et al., 2005). A incorporação de HAI, além de possibilitar a obtenção de novas propriedades no PHAmcl, viabilizam o estudo do metabolismo deste microrganismo no que diz respeito ao uso de ácido propiônico como fonte de carbono.

A análise por *Southern Blot* apresenta-se como uma importante ferramenta para avaliar se uma dada sequência genômica está presente no genoma do microrganismo em estudo. No caso do mutante LFM693 é de grande importância o uso desta técnica para verificar se o transposon se inseriu em apenas uma região do genoma, de tal forma que essa possa ser diretamente relacionada ao fenótipo observado. Esta análise foi realizada em parceria com o laboratório da Profa. Dra. Marilis do Valle Marques do Departamento de Microbiologia da Universidade de São Paulo, pois envolvia o uso de composto radioativo.

Inicialmente, o DNA genômico da linhagem selvagem LFM046 e da linhagem mutante LFM693 foram extraídos e digeridos com a enzima *Pst*I. Após a digestão, o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose, para separar os diferentes fragmentos de DNA formados, e o gel foi corado com brometo de etídio. Utilizou-se o procedimento descrito por Southern (1975) para transferir o DNA do gel para membrana de nitrocelulose. O DNA foi fixado na membrana utilizando luz UV e a membrana foi, em seguida, hibridizada com sonda radioativa correspondente ao transposon mini-Tn5. A Figura 9 apresenta o resultado final deste experimento. A linhagem LFM046 não apresentou ligação com a sonda radioativa, o que demonstra que não há regiões

homólogas ao transposon mini-Tn5 no genoma desta linhagem. Por outro lado, pode-se observar que a ligação da sonda com a linhagem mutante LFM693 resultou em uma única banda, indicando uma única inserção do transposon no genoma desta linhagem. Desta forma, é possível concluir que as alterações fenotípicas observadas na linhagem LFM693 são decorrentes de uma única inserção do transposon mini-Tn5 em seu genoma, ou seja, o transposon se inseriu em um gene relevante para o metabolismo de propionato.

Figura 9 - Resultado da análise do *Southern Blot* para avaliar a inserção do transposon na linhagem mutante



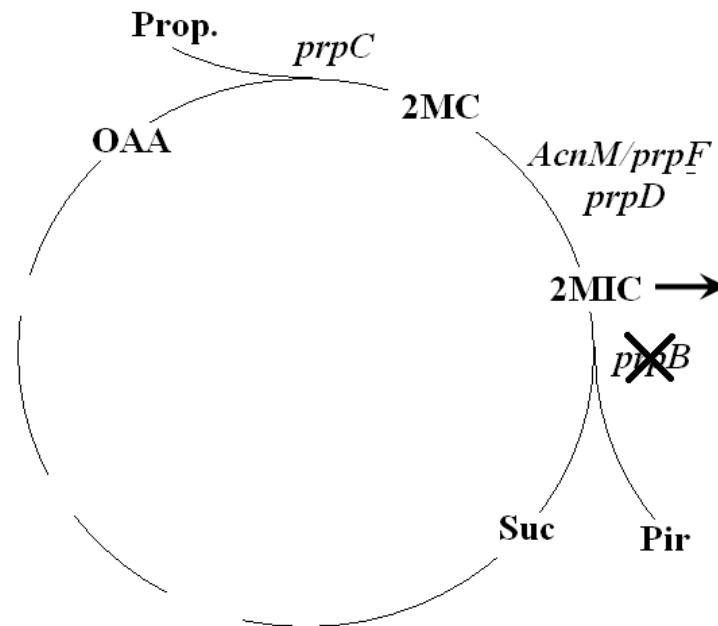
Para identificação do gene no qual o transposon se inseriu, o DNA genômico de *Pseudomonas* sp. LFM693 foi digerido com a enzima *Pst*I e clonado no vetor pUCBM20. Os clones de *E. coli* contendo parte do transposon inserido no vetor pUCBM20 foram selecionados por apresentar resistência simultânea a ampicilina (vetor) e canamicina (transposon). Um dos clones obtidos foi submetido a sequenciamento utilizando iniciadores presentes no vetor (M13f e M13r), bem como

iniciador complementar a região do transposon (Ext12 – Braz, 2006). A análise das seqüências, submetida para análise no programa BlastN do NCBI identificou que o transposon se inseriu em uma região que codifica para a 2-metilisocitrato liase (*prpB*). Este gene está relacionado com o ciclo do 2-metilcitrato que se apresenta como uma das vias para oxidação de ácido propiônico para vários procariotos (Textor et al., 1997), especialmente bactérias que produzem monômeros de cadeia ímpar como *Burkholderia sacchari* (Bramer et al., 2002; Pereira et al., 2009; Silva, 1998), *P. putida* e *Ralstonia eutropha* (Ewering et al., 2006). Esta via metabólica também foi detectada em todas as espécies de *Pseudomonas* com genoma sequenciado (item 4.1).

Ewering et al. (2006) demonstraram que a interrupção do gene *acnM*, também relacionado ao ciclo do 2-metilcitrato, em *R. eutropha* e *P. putida* levou à excreção de 2-metilcitrato, substrato da enzima AcnM.

Foi demonstrado que a eficiência de conversão de propionato em HAI depende da concentração de propionato suprido em *Pseudomonas* sp. LFM693. Isto é, sob altas concentrações de propionato (~1,0 g/L) a eficiência é baixa e similar à linhagem selvagem. Por outro lado, sob baixas concentrações (<0,5 g/L) a eficiência de conversão aumenta, podendo atingir o valor máximo teórico. A baixa eficiência sob altas concentrações de propionato pode ser explicada de duas formas: (i) sob altas concentrações de propionato uma outra via responsável pelo catabolismo de propionato assume um papel relante e leva a oxidação do propionato, impedindo que possa ser utilizado para formar monômeros HAI; (ii) sob altas concentrações de propionato este é excretado como 2-metilisocitrato no mutante deficiente no gene *prpB* (Fig. 10).

Figura 10 – Excreção de 2-metilcitrato em mutante com interrupção no gene *prpB*.



Assim, para avaliar se o mutante afetado no gene *prpB* excreta 2-metilisocitrato, foram realizados cultivos de *Pseudomonas* sp. LFM693 sob condições de baixa e alta concentração de propionato.

Ao final do experimento em frasco agitado, o sobrenadante foi reservado em tubo de ensaio para ser liofilizado e submetido à metanólise. As amostras foram submetidas à cromatografia gasosa e os cromatogramas foram analisados com o objetivo de identificar picos que pudessem ser associados ao ácido 2-metilisocítrico. Os cromatogramas das amostras foram comparados aos cromatogramas obtidos pela análise de ácido isocítrico submetido à metanólise. O ácido isocítrico, depois de submetido à metanólise, revelou um pico com tempo de retenção de 10,6-10,7 (Figuras 11A e 11B) minutos. Não foi identificado nenhum pico com tempo de retenção igual ou próximo àquele obtido após metanólise do ácido isocítrico (10,6-10,7 min.) e que pudesse explicar a formação do ácido metilisocítrico pelo mutante

4.3 Crescimento de mutantes em propionato

Os mutantes obtidos por Gomez (2000), deficientes no metabolismo de propionato, foram testados quanto a sua capacidade de crescimento em Meio Mineral sólido com 1,0 g/L propionato (MMP) como única fonte de carbono.

Os resultados obtidos demonstraram que as características de crescimento observadas anteriormente no laboratório foram mantidas nestes mutantes (Tabela 5). Dos 21 mutantes obtidos com tratamento com radiação ultravioleta, 14 apresentaram um fenótipo semelhante ao da linhagem LMF693, ou seja, mesmo após 7 dias de cultivo não se observou qualquer crescimento em meio mineral contendo propionato como única fonte de carbono. Os outros sete mutantes apresentaram crescimento menor e/ou mais tardio que a linhagem selvagem e podem ser diferenciados entre si pela intensidade de crescimento e/ou tempo necessário para crescer.

Tabela 5 - Crescimento da linhagem LFM046 e seus mutantes em MMP

Linhagem	Tempo de cultivo (dias)							Linhagem	Tempo de cultivo (dias)						
	1	2	3	4	5	6	7		1	2	3	4	5	6	7
046	+	+	+	+	+	+	+	485	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
693	-	-	-	-	-	-	-	487	-	-	-	-	-	-	-
467	-	-	-	-	-	-	-	488	-	-	-	-	-	-	-
469	-	+	+	+	+	+	+	489	-	-	-	-	-	-	-
470	-	-	-	-	-	-	-	490	-	-	-	-	-	-	-
471	-	+	+	+	+	+	+	495	-	-	-	-	-	-	-
473	-	-	+/-	+	+	+	+	496	-	-	-	-	-	-	-
479	-	-	-	-	-	-	-	499	-	-	-	-	-	-	-
480	-	-	-	-	-	-	-	500	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-
481	-	-	-	-	-	-	-	501	-	-	-	-	-	-	-
482	-	+/-	+	+	+	+	+	IP18	-	-	-	-	-	-	-
483	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-								

4.4 Produção de PHA por mutantes afetados no metabolismo de propionato

Foram realizados cultivos em frascos agitados com os mutantes da linhagem LFM046 obtidos por radiação ultravioleta com o objetivo de caracterizá-los melhor fenotipicamente. Nos cultivos realizados por Gomez (2000), estes mutantes foram avaliados apenas com relação à capacidade de produzir PHA a partir de glicose e propionato suprido na concentração de 1 g/L. Entretanto, Bretas et al. (2005) demonstraram que a eficiência de conversão de propionato em monômeros ímpares pelo mutante LFM693, obtido pela inserção de transposon, está associada à concentração de propionato suprido, indicando que a relevância das vias do metabolismo de propionato pode depender da concentração deste no meio.

Assim, o objetivo nestes cultivos foi avaliar se algum dos mutantes obtidos por radiação ultravioleta possui um perfil de utilização de propionato e produção de HAI semelhante ao do mutante LFM693. Ou seja, uma maior eficiência na conversão de propionato em monômeros HAI sob baixa concentração de propionato (inferior a 0,5 g/L). Outro objetivo destes experimentos foi verificar se alguns dos mutantes apresentaria um perfil fenotípico que indicasse estar afetado em gene de interesse para estudar melhor o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046.

Os resultados resumidos (média e desvio padrão) obtidos nestes cultivos (Tabelas 6 e 7) foram divididos de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, ou seja, a capacidade da linhagem crescer ou não em meio mineral com propionato como única fonte de carbono. Os resultados completos de cada cultivo encontram-se ao final do trabalho no Apêndice.

A linhagem selvagem apresentou o comportamento típico observado anteriormente (Bretas et al., 2005; Rocha et al., 2009), ou seja, a adição de propionato não interferiu de forma expressiva no teor

de PHA acumulado, entretanto, levou a inserção de monômeros ímpares (HAI - 3HHp e 3HN), além dos monômeros pares detectados quando apenas glicose foi suprida. A eficiência de conversão de propionato em monômeros ímpares foi baixa, representando menos que 10% do valor máximo teórico.

Monômeros HAI foram detectados no PHA produzido por apenas três dos mutantes (LFM469, LFM471 e LFM482) com crescimento tardio ou parcialmente limitado em propionato (Tabelas 6). É interessante notar que foram esses mutantes que aparentam estar menos afetados no metabolismo de propionato de acordo com os resultados obtidos nos cultivos em meio mineral sólido (Tabela 5), indicando que as vias afetadas podem ser responsáveis apenas parcialmente pelo consumo de propionato. O mutante LFM469 apresentou um desempenho no consumo de propionato e em sua conversão em monômeros HAI muito semelhante à linhagem selvagem, indicando que a mutação não afeta de forma expressiva a utilização do propionato. Os outros dois mutantes (LFM471 e LFM482) apresentaram menor consumo de propionato em uma das duas condições avaliadas e os valores médios de $Y_{HAI/P}$ foram um pouco superiores ao valor observado para a linhagem selvagem (Tabela 6). Como já mencionado, estes mutantes podem estar afetados em vias de menor relevância para o catabolismo de ácido propiônico em *Pseudomonas* sp. LFM046. A identificação dos genes em que eles estão afetados poderá trazer informações relevantes para a compreensão do metabolismo de propionato nessa e em outras bactérias.

Com relação aos outros cinco mutantes com crescimento tardio ou parcialmente limitado em propionato não se detectou HAI no PHA produzido (Tabela 6). O consumo de propionato nestes mutantes foi sempre menor que a linhagem selvagem, confirmando estarem afetados na utilização desse ácido orgânico. O mutante LFM500 não consumiu qualquer propionato no cultivo (Tabela 6), resultado que correlaciona

bem com seu crescimento mais tardio e menor em meio mineral sólido. Este mutante pode estar afetado em passo inicial do metabolismo de propionato que impede sequer sua ativação para ser utilizado na produção de HAI (LFM500).

A produção de PHA contendo HAI foi detectada apenas em dois mutantes (LFM479 e LFM490) que não apresentaram qualquer crescimento em propionato mesmo após 7 dias de cultivo (Tabela 5). Entretanto, a fração molar de HAI e a eficiência de conversão de propionato nestes foi sempre inferior à linhagem selvagem (Tabela 7).

O mutante LFM501 apresentou um perfil semelhante ao mutante LFM500. Isto é, não foi capaz de utilizar o ácido propiônico e não se detectou qualquer HAI no PHA produzido. O mutante LFM470 também pode ser incluído neste grupo, pois diverge apenas dos demais por ter apresentado um pequeno consumo de ácido propiônico. Estes mutantes devem estar afetados em um passo inicial da utilização de propionato e, portanto, seria importante identificar o gene afetado neles. Este mesmo perfil havia sido apontado anteriormente para a linhagem LFM496 (Bretas et al., 2005; Gomez, 2000), entretanto os dados da Tabela 7 não permitiram confirmar este perfil para esse mutante.

A ativação do propionato a propionil-CoA é realizado por uma propionil-CoA sintetase. Na ausência dessa atividade enzimática, o propionato não é ligado à coenzima A e não pode ser metabolizado, seja para geração de energia, seja para a síntese de PHAs. Horswill e Escalante-Semerena (1999) obtiveram mutantes de *Salmonella typhimurium* afetados na propionil-CoA sintetase, através da inativação do gene *prpE* por recombinação homóloga, entretanto, os mutantes apresentavam crescimento em propionato semelhante ao da linhagem selvagem. Mutantes afetados tanto no gene que codifica para enzima propionil-CoA sintetase como naquele que codifica para acetil-CoA sintetase apresentavam-se incapazes de crescer em propionato (Horswill e Escalante-Semerena, 1999). Assim, os autores concluíram que acetil-CoA sintetase poderia de modo alternativo ativar o propionato ligando-o à coenzima A. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que em *Pseudomonas* sp. LFM046,

diferentemente do que foi observado em *S. typhimurium*, deve ocorrer única e exclusivamente a partir de uma enzima, provavelmente específica para o propionato.

Tanto no operon da via do metilmalonil-CoA, como naquele da α -oxidação foram encontrados genes cujos produtos podem estar envolvidos na ativação do propionato através da transferência da Coenzima A a partir de um outro acil-CoA, ou seja, pela ação de uma acil-CoA:propionil-CoA transferase. Entretanto, as análises bioinformáticas em *Pseudomonas* com genomas sequenciados incidiram que a via do metilmalonil-CoA não deve estar presente em *Pseudomonas* e a via da α -oxidação deve se restringir a *Pseudomonas aeruginosa*.

Observou-se uma expressiva redução no acúmulo de PHA por algum dos mutantes avaliados. Para alguns dos mutantes (LFM470, LFM483, LFM485, LFM487, LFM496, LFM499, LFM500), a redução no acúmulo de PHA foi observada apenas quando ácido propiônico foi fornecido. Esses resultados são compatíveis com efeitos inibitórios maiores devido à manutenção da concentração mais alta desse ácido durante o cultivo. Para outros mutantes (LFM467, LFM481, LFM488, LFM489, LFM490, LFM495, LFM501 e IP18), o teor de PHA foi reduzido mesmo no cultivo em que foi fornecida apenas glicose, indicando que devem estar afetados em gene não específico do metabolismo de propionato.

Resumindo os resultados obtidos até o momento, nenhum dos mutantes apresentou um perfil fenotípico semelhante ao mutante LFM693, ou seja, um aumento expressivo na eficiência de conversão de propionato em monômeros HAI sob baixas concentrações de propionato. Dois mutantes (LFM471 e LFM482) podem estar afetados em vias metabólicas menos relevantes para o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046. Três mutantes (LFM470, LFM500 e LFM501) devem estar afetados em passo inicial da ativação do propionato, embora o baixo acúmulo de PHA por um destes

mutantes (LFM501) mesmo quando apenas glicose foi suprida sugere que deve estar afetado em gene não específico do metabolismo de propionato.

Assim, a identificação dos genes afetados em pelo menos 4 ou 5 mutantes *prp* poderá conduzir a uma melhor compreensão do metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046.

Tabela 6 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes obtidos por UV com crescimento tardio em propionato.

(continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDD Δ_5 (mol%)	PHA (%MSC)	Y _{HAI/P} (mol/mol)	
LFM046	Média	3,66	14,34		0,00	3,96	0,00	33,59	0,00	55,04	4,58	2,83	41,47	-
	Desv.Pad.	±1,30	±2,45	0	±0,00	±1,38	±0,00	±4,18	±0,00	±5,07	±2,80	±1,84	±15,84	-
	Média	3,46	13,95		0,24	3,06	0,64	29,67	1,85	55,88	5,26	3,65	39,17	0,06
	Desv.Pad.	±0,61	±1,82	0,25	±0,10	±1,86	±0,85	±4,68	±1,89	±3,36	±3,07	±2,86	±16,62	±0,03
LFM469	Média	3,77	13,88		0,45	1,87	1,43	27,54	5,05	56,09	5,58	2,43	37,47	0,08
	Desv.Pad.	±1,43	±2,44	0,50	±0,10	±1,83	±2,21	±6,40	±6,58	±3,71	±3,19	±1,57	±16,86	±0,08
	Média	4,21	14,96		0	4,98	0,00	35,25	0,00	54,55	3,04	2,19	55,00	-
	Desv.Pad.	±0,25	±0,36	0	±0,00	±0,10	±0,00	±1,73	±0,00	±2,00	±0,03	±0,20	±1,94	-
LFM471	Média	4,03	14,9		0,25	4,89	1,15	34,98	2,21	52,00	2,85	1,92	47,56	0,12
	Desv.Pad.	±0,13	±0,33	0,25	±0,03	±0,34	±0,00	±0,73	±0,31	±0,71	±0,11	±0,06	±4,66	±0,02
	Média	3,99	15,77		0,50	4,77	1,87	32,1	4,17	52,67	2,64	1,77	52,81	0,12
	Desv.Pad.	±0,08	±0,48	0,50	±0,03	±0,10	±0,00	±0,50	±0,20	±0,42	±0,00	±0,03	±1,89	±0,00
LFM471	Média	4,25	14,15		0	4,32	0,00	32,45	0,00	53,48	6,01	3,74	59,33	-
	Desv.Pad.	±0,05	±2,62	0	±0,00	±0,03	±0,00	±0,32	±0,00	±0,30	±0,30	±0,24	±1,50	-
	Média	3,80	15,01		0,14	5,96	0,47	37,87	1,38	46,9	4,55	2,86	58,88	0,14
	Desv.Pad.	±0,24	±0,39	0,25	±0,04	±1,33	±0,06	±3,73	±0,15	±6,91	±1,14	±0,50	±12,54	±0,01
LFM471	Média	4,08	14,1		0,44	4,74	0,95	31,83	1,39	51,53	5,74	3,83	51,40	0,05
	Desv.Pad.	±0,13	±1,76	0,50	±0,06	±0,18	±0,10	±0,09	±0,00	±0,15	±0,02	±0,01	±0,11	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxi-octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD Δ_5 – 3-hidroxil-5-dodecanoato; PHA – polihidroxialcanoatos; Y_{HAI/P} – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 6 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes obtidos por UV com crescimento tardio em propionato.

(continuação)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDD Δ 5 (mol%)	PHA (%MSC)	Y _{HAI/P} (mol/mol)	
LFM473	Média	2,77	14,07	0	0,00	3,18	0,00	24,24	0,00	56,67	11,5	4,41	59,26	-
	Desv.Pad.	±0,40	±1,99	0	±0,00	±0,03	±0,00	±0,06	±0,00	±0,37	±0,48	±0,02	±0,06	-
	Média	2,43	11,45	0,25	0,21	3,26	0,00	24,28	0,00	56,73	11,35	4,38	56,00	0,00
	Desv.Pad.	±0,08	±0,02	0,25	±0,00	±0,10	±0,00	±0,12	±0,00	±0,51	±0,37	±0,16	±0,10	±0,00
LFM482	Média	2,06	11,87	0,50	0,19	3,30	0,00	26,98	0,00	56,71	8,89	4,13	50,83	0,00
	Desv.Pad.	±0,01	±2,62	0,50	±0,03	±0,35	±0,00	±1,73	±0,00	±5,89	±4,04	±0,47	±2,03	±0,00
	Média	3,40	13,76	0	0	4,08	0,00	30,69	0,00	58,13	3,48	3,62	28,55	-
	Desv.Pad.	±0,33	±0,10	0	±0,00	±0,12	±0,00	±1,38	±0,00	±1,30	±0,03	±0,17	±3,77	-
LFM483	Média	2,42	9,43	0,25	0,19	2,88	3,02	21,22	2,41	55,88	3,98	10,6	21,46	0,06
	Desv.Pad.	±1,74	±3,34	0,25	±0,09	±1,77	±2,92	±11,58	±1,48	±0,70	±0,89	±10,33	±21,27	±0,06
	Média	3,43	13,11	0,50	0,22	2,04	0,91	30,13	5,04	54,88	3,72	3,29	36,11	0,16
	Desv.Pad.	±0,06	±0,18	0,50	±0,08	±2,88	±1,09	±0,78	±0,03	±3,13	±0,00	±0,04	±8,07	±0,06
LFM483	Média	4,35	15,78	0	0	2,31	0,00	36,1	0,00	58,08	3,14	0,36	40,24	-
	Desv.Pad.	±0,12	±1,11	0	±0,00	±3,27	±0,00	±1,88	±0,00	±1,41	±0,05	±0,03	±7,83	-
	Média	2,1	5,54	0,25	0,12	0,00	0,00	24,54	0,00	61,86	11,25	2,35	6,25	0,00
	Desv.Pad.	±0,40	±1,73	0,25	±0,00	±0,00	±0,00	±1,74	±0,00	±4,35	±6,13	±0,05	±0,36	±0,00
LFM483	Média	2,38	5,18	0,50	0,24	0,00	0,00	26,37	0,00	59,88	10,82	2,93	4,69	0,00
	Desv.Pad.	±0,02	±1,67	0,50	±0,00	±0,00	±0,00	±3,48	±0,00	±3,66	±7,51	±0,37	±0,20	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxiocetanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD Δ 5 – 3-hidroxidodecanoato; PHA – polihidroxialcanoatos; Y_{HAI/P} – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 6 - Produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes obtidos por UV com crescimento tardio em propionato.

(conclusão)

Linhagem	Xt	Glicose	C3 forn.	C3 cons.	3HHx	3HHp	3HO	3HN	3HD	3HDD	3HDDΔ5	PHA	YHAI/P	
Bacteriana	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(%MSC)	(mol/mol)	
LFM485	Média	3,71	12,93	0,00	0,00	0,00	32,77	0,00	63,53	3,45	0,24	42,77	-	
	Desv.Pad.	±0,20	±0,71	0	±0,00	±0,00	±1,37	±0,00	±1,21	±0,08	±0,08	±13,87	-	
	Média	2,64	7,41	0,12	2,22	0,00	16,65	0,00	48,51	23,10	9,52	3,95	0,00	
	Desv.Pad.	±0,22	±0,52	0,25	±0,00	±0,36	±0,00	±0,03	±0,00	±4,75	±2,11	±7,25	±0,22	±0,00
	Média	2,08	7,45	0,29	0,00	0,00	24,32	0,00	57,47	15,24	2,97	5,26	0,00	
	Desv.Pad.	±0,07	±1,46	0,50	±0,02	±0,00	±0,00	±9,28	±0,00	±7,84	±15,05	±2,07	±2,48	±0,00
LFM500	Média	4,15	17,52	0,00	3,77	0,00	25,57	0,00	44,41	22,90	3,34	39,60	-	
	Desv.Pad.	±0,12	±1,09	0	±0,00	±1,27	±0,00	±11,36	±0,00	±16,46	±27,86	±1,23	±41,31	-
	Média	1,76	10,74	0,00	2,95	0,00	14,29	0,00	35,15	39,06	8,55	12,00	0,00	
	Desv.Pad.	±0,01	-	0,25	±0,00	±0,34	±0,00	±1,59	±0,00	±5,50	±9,21	±1,77	±1,69	±0,00
	Média	1,75	7,61	0,00	0,00	0,00	5,34	0,00	36,36	38,71	19,59	8,38	0,00	
	Desv.Pad.	±0,02	±0,21	0,50	±0,00	±0,00	±0,00	±4,05	±0,00	±32,39	±54,75	±18,31	±6,81	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ₅ – 3-hidroxi-5-dodecenoato; PHA – polihidroxi alcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 7 - Produção de PHA por mutantes obtidos por UV de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de crescer em propionato.

(continua)

Linhagem	Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3								PHA (%MSC)	Y _{HAI/P} (mol/mol)
					cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ ₅ (mol%)		
LFM467	Média	1,21	4,52		0,00	6,21	0,00	0,00	0,00	47,19	3,38	43,23	1,67	-
	Desv.Pad.	±0,15	±1,33	0	±0,00	±8,78	±0,00	±0,00	±0,00	±8,75	±4,77	±4,80	±0,35	-
	Média	1,24	4,65		0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	48,87	10,57	40,56	1,49	0,00
	Desv.Pad.	±0,20	±0,07	0,25	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,32	±0,24	±0,08	±0,09	±0,00
	Média	1,17	1,67		0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	54,7	4,61	40,69	1,56	0,00
	Desv.Pad.	±0,19	±0,32	0,50	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,12	±6,52	±2,39	±0,30	±0,00
LFM470	Média	3,93	15,55		0,00	3,87	0,00	29,17	0,00	56,46	6,57	3,92	62,01	-
	Desv.Pad.	±0,00	±0,68	0	±0,00	±0,03	±0,00	±0,04	±0,00	±0,77	±0,35	±0,41	±4,47	-
	Média	1,93	7,44		0,03	3,04	0,00	25,02	0,00	56,11	5,06	10,77	13,19	0,00
				0,25										
	Média	2,03	8,25		0,04	3,35	0,00	25,53	0,00	51,69	8,34	11,09	15,63	0,00
	Desv.Pad.	±0,05	±2,37	0,50	±0,01	±0,93	±0,00	±1,16	±0,00	±5,98	±6,34	±1,73	±6,19	±0,00
LFM479	Média	2,39	12,72		0,00	2,54	0,00	24,35	0,00	53,98	13,78	5,34	65,83	-
	Desv.Pad.	±0,08	±0,09	0	±0,00	±0,53	±0,00	±2,47	±0,00	±2,85	±1,47	±0,56	±11,45	-
	Média	1,95	12,55		0,14	3,37	0,28	24,1	0,91	56,26	10,88	4,20	47,59	0,04
	Desv.Pad.	±0,05	±2,18	0,25	±0,04	±0,20	±0,02	±1,12	±0,03	±2,17	±3,03	±0,41	±3,59	±0,01
	Média	1,31	15,36		0,43	3,29	0,00	23,33	0,00	45,44	20,67	7,27	30,12	0,00
	Desv.Pad.	±0,25	±1,42	0,50	±0,01	±0,50	±0,00	±1,65	±0,00	±1,39	±1,14	±0,38	±7,73	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ₅ – 3-hidroxí-5-dodecenoato; PHA – polihidroxialcanoatos; Y_{HAI/P} – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 7 - Produção de PHA por mutantes obtidos por UV de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de crescer em propionato.

(continuação)

Linhagem	Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3									PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
					cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)			
LFM480	Média	2,61	11,03		0,00	1,59	0,00	24,99	0,00	59,43	9,25	4,43	60,9	-	
	Desv.Pad.	±0,34	±0,93	0	±0,00	±2,25	±0,00	±0,93	±0,00	±2,75	±1,25	±0,61	±2,04	-	
	Média	1,87	8,07		0,05	3,14	0,00	24,34	0,00	53,68	13,64	5,20	47,06	0,00	
				0,25											
	Média	1,47	7,98		0,08	3,40	0,00	24,84	0,00	57,99	9,40	4,37	36,47	0,00	
	Desv.Pad.	±0,09	±1,52	0,50	±0,02	±0,10	±0,00	±1,49	±0,00	±4,23	±4,90	±0,92	±5,01	±0,00	
LFM481	Média	2,96	9,91		0,00	1,10	0,00	29,67	0,00	53,93	8,57	6,73	13,23	-	
	Desv.Pad.	±0,60	±0,90	0	±0,00	±1,56	±0,00	±0,66	±0,00	±1,31	±5,17	±5,58	±7,65	-	
	Média	3,33	6,93		0,05	1,71	0,00	13,41	0,00	63,76	6,72	13,99	5,39	0	
	Desv.Pad.	±0,09	±0,58	0,25	-	±0,03	±0,00	±1,49	±0,00	±7,26	±0,77	±4,81	±2,22	±0,00	
	Média	1,94	6,82		0,17	1,42	0,00	10,16	0,00	40,65	33,72	14,05	6,45	0	
	Desv.Pad.	±0,44	±0,11	0,50	±0,08	±0,65	±0,00	±4,84	±0,00	±24,39	±37,87	±7,99	±3,56	±0,00	
LFM487	Média	4,04	16,16		0,00	4,50	0,00	34,29	0,00	57,93	2,96	0,31	42,87	-	
	Desv.Pad.	±1,52	±0,90	0	±0,00	±0,18	±0,00	±0,31	±0,00	±0,80	±0,34	±0,04	±6,50	-	
	Média	3,78	15,71		0,14	0,00	0,00	26,55	0,00	58,84	7,90	6,71	25,08	0	
	Desv.Pad.	±1,84	±5,28	0,25	±0,02	±0,00	±0,00	±12,04	±0,00	±5,78	±8,62	±9,20	±19,98	±0,00	
	Média	2,04	14,15		0,23	0,00	0,00	25,37	0,00	62,53	8,81	3,3	12,47	0	
	Desv.Pad.	±1,03	±1,22	0,50	±0,11	±0,00	±0,00	±5,15	±0,00	±4,35	±6,49	±3,01	±2,08	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ₅ – 3-hidroxidodecanoato; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 7 - Produção de PHA por mutantes obtidos por UV de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de crescer em propionato.

(continuação)

Linhagem		Xt	Glicose	C3 forn.	C3 cons.	3HHx	3HHp	3HO	3HN	3HD	3HDD	3HDDΔ5	PHA	YHAI/P
Bacteriana		(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(mol%)	(%MSC)	(mol/mol)
LFM488	Média	5,82	14,45		0,00	3,02	0,00	37,61	0,00	50,52	5,29	2,40	20,81	-
	Desv.Pad.	±0,35	±2,76	0	±0,00	±4,27	±0,00	±1,11	±0,00	±3,94	±0,08	±0,11	±1,67	-
	Média	5,88	14,10		0,24	4,27	0,00	29,96	0,00	58,47	5,98	1,33	22,15	0,00
	Desv.Pad.	±0,92	±1,25	0,25	±0,02	±0,57	±0,00	±2,17	±0,00	±1,11	±1,69	±0,05	±6,40	±0,00
	Média	4,27	8,06		0,10	3,44	0,00	25,59	0,00	55,01	12,31	3,65	10,57	0,00
	Desv.Pad.	±0,26	±0,40	0,50	±0,01	±0,15	±0,00	±0,88	±0,00	±1,30	±2,61	±0,28	±1,72	±0,00
LFM489	Média	5,25	12,38		0,00	2,34	0,00	26,96	0,00	62,98	6,52	1,21	19,81	-
	Desv.Pad.	±0,16	±1,23	0	±0,00	±2,00	±0,00	±0,19	±0,00	±0,52	±1,92	±0,41	±2,08	-
	Média	3,80	14,00		0,19	1,78	0,00	27,17	0,00	63,63	6,51	0,90	20,73	0,00
	Desv.Pad.	±0,75	±0,76	0,25	±0,11	±2,52	±0,00	±0,94	±0,00	±0,26	±1,16	±0,15	±1,09	±0,00
	Média	3,36	5,61		0,19	0,00	0,00	13,88	0,00	52,81	28,85	4,46	3,00	0,00
	Desv.Pad.	±0,34	±1,25	0,50	±0,09	±0,00	±0,00	±3,65	±0,00	±1,25	±3,78	±1,13	±0,33	±0,00
LFM490	Média	6,59	16,20		0,00	5,23	0,00	34,95	0,00	54,76	4,65	0,41	26,51	-
	Desv.Pad.	±0,95	±1,27	0	±0,00	±0,03	±0,00	±0,60	±0,00	±1,18	±0,54	±0,01	±5,65	-
	Média	6,34	15,24		0,22	4,39	0,28	31,92	0,98	56,59	5,41	0,42	26,63	0,02
	Desv.Pad.	±0,44	±1,85	0,25	-	±0,89	±0,08	±2,05	±0,13	±2,13	±1,10	±0,08	±2,54	-
	Média	4,69	16,22		0,01	5,22	1,70	30,88	1,56	55,81	4,50	0,33	26,91	0,03
	Desv.Pad.	±1,07	±0,20	0,50	-	±0,80	±1,64	±0,34	±0,02	±1,19	±0,92	±0,01	±3,01	-

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ₅ – 3-hidroxi-5-dodecenoato; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 7 - Produção de PHA por mutantes obtidos por UV de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de crescer em propionato. (continuação)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDD Δ_5 (mol%)	PHA (%MSC)	Y _{HAI/P} (mol/mol)	
LFM495	Média	2,11	5,65		0,00	2,01	0,00	15,90	0,00	56,83	21,99	3,26	10,32	-
	Desv.Pad.	±0,51	±4,95	0	±0,00	±0,48	±0,00	±4,93	±0,00	±7,48	±11,66	±1,23	±1,43	-
	Média	1,48	4,96		0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	40,94	51,46	7,59	2,55	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±0,11	0,25	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±9,63	±7,36	±2,27	±0,38	±0,00
	Média	1,33	5,91		0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	43,54	41,53	14,93	2,65	0,00
	Desv.Pad.	±0,11	±0,31	0,50	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,16	±5,03	±9,19	±0,39	±0,00
LFM496	Média	4,18	15,49		0,00	5,02	0,00	34,94	0,00	55,29	3,93	0,81	32,06	-
	Desv.Pad.	±0,26	±0,28	0	±0,00	±0,19	±0,00	±0,72	±0,00	±0,89	±1,49	±0,31	±0,67	-
	Média	2,33	8,42		0,18	3,56	0,00	27,67	0,00	55,14	12,41	1,22	12,40	0,00
	Desv.Pad.	±0,77	±0,41	0,25	±0,04	±0,19	±0,00	±1,88	±0,00	±3,98	±5,95	±0,10	±3,21	±0,00
	Média	2,25	6,85		0,37	3,43	0,00	27,65	0,00	57,91	8,54	2,46	13,19	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±0,50	0,50	±0,13	±0,06	±0,00	±0,97	±0,00	±0,03	±0,42	±0,52	±0,47	±0,00
LFM499	Média	3,07	15,13		0,00	4,85	0,00	35,14	0,00	54,35	5,05	0,61	30,22	-
	Desv.Pad.	±1,18	±0,23	0	±0,00	±0,08	±0,00	±0,69	±0,00	±1,45	±2,05	±0,18	±0,94	-
	Média	2,04	8,13		0,20	3,60	0,00	26,71	0,00	54,51	12,93	2,26	12,05	0,00
	Desv.Pad.	±0,04	±0,76	0,25	±0,08	±0,14	±0,00	±2,12	±0,00	±3,45	±5,52	±0,19	±1,34	±0,00
	Média	2,07	9,02		0,56	3,39	0,00	26,73	0,00	56,65	11,21	2,02	10,27	0,00
				0,50										

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD Δ_5 – 3-hidroxidodecanoato-5; PHA – polihidroxialcanoatos; Y_{HAI/P} – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 7 - Produção de PHA por mutantes obtidos por UV de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de crescer em propionato.

(conclusão)

Linhagem	Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3							PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
					cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)			3HDD ₅ (mol%)
LFM501	Média	2,07	9,93		0,00	2,4	0,00	14,24	0,00	45,03	31,86	6,47	15,35	-
	Desv.Pad.	±0,07	±1,69	0	±0,00	±1,19	±0,00	±10,77	±0,00	±26,30	±36,83	±1,44	±5,87	-
	Média	1,31	6,35		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,92	55,7	21,38	5,98	0,00
	Desv.Pad.	±0,11	±2,92	0,25	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±5,81	±11,92	±6,11	±2,08	±0,00
	Média	1,40	6,75		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,3	37,81	4,89	4,48	0,00
	Desv.Pad.	±0,05	±2,53	0,50	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±60,39	±53,47	±6,92	±3,68	±0,00
IP18	Média	4,12	15,94		0,00	3,54	0,00	23,56	0,00	40,42	2,47	30,00	13,96	-
	Desv.Pad.	±0,05	±0,16	0	±0,00	±1,29	±0,00	±11,72	±0,00	±21,77	±1,19	±35,97	±1,17	-
	Média	3,53	13,86		0,21	2,30	0,00	17,21	0,00	34,69	41,06	4,75	24,8	0,00
	Desv.Pad.	±0,59	±2,22	0,25	±0,02	±2,39	±0,00	±11,08	±0,00	±18,22	±33,30	±1,60	±19,07	±0,00
	Média	2,48	14,68		0,32	0,00	0,00	10,55	0,00	32,49	48,14	8,81	15,79	0,00
	Desv.Pad.	±0,02	±2,95	0,50	±0,07	±0,00	±0,00	±0,83	±0,00	±12,29	±16,35	±3,22	±2,80	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – glicose consumida; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD₅ – 3-hidroxí-5-dodecenoato; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

4.5 Construção da biblioteca genômica de LFM046 e determinação do local de mutação em mutante UV

A biblioteca genômica foi construída após digestão do DNA genômico de *Pseudomonas* sp. LFM046 com a enzima de restrição *Hind*III e ligação ao vetor pBBR1MCS-2 (Kovach et al., 1995). Inicialmente, foram realizadas três transformações para inserção dos plasmídeos nas linhagens de *E. coli* XL1Blue e *E. coli* S17-1. Estas duas linhagens foram utilizadas, pois em *E. coli* XL1 Blue é possível avaliar a perda de alfa-complementação nos clones que contem inserto no vetor, enquanto em *E. coli* S17-1 isso não é possível. Por outro lado, *E. coli* S17-1 apresenta capacidade de mobilização do plasmídeo por conjugação, permitindo avaliar a capacidade do clone em complementar fenotipicamente o mutante em questão e dessa forma detectar plasmídeos contendo o gene afetado no mutante.

Na primeira transformação, foram obtidas 1172 colônias de *E. coli* XL1-Blue em placas de LB com canamicina, IPTG e XGal. A contagem do número de colônias brancas resultou em uma proporção de 12,80% de colônias brancas, ou seja, de colônias transformadas por plasmídeo pBBRMCS2 com inserto do DNA genômico da LFM046.

Nessa mesma transformação, foram obtidas 720 colônias de *E. coli* S17-1. Como a reação de ligação foi a mesma, estima-se que a proporção de plasmídeos com inserto seja igual nos dois casos. Dessa forma, na primeira transformação foram obtidos cerca de 93 mutantes contendo insertos do DNA genômico da linhagem LFM046.

Em seguida, foram realizadas novas transformações utilizando o mesmo protocolo, porém sem o mesmo sucesso, de modo que foram obtidos apenas uma média de 15 clones no final de cada transformação. Devido às dificuldades encontradas, os trabalhos para

obtenção de biblioteca genômica da LFM046 foi colocado em segundo plano e deverá ser realizado apenas no futuro.

Ainda assim, o mutante LFM496, que se acreditava estaria afetado na ativação do propionato com base nos resultados de Bretas et al. (2005), foi avaliado com relação à capacidade de ser complementado fenotipicamente por fragmentos de DNA presentes nos poucos clones obtidos na tentativa de construção da biblioteca genômica de *Pseudomonas* sp. LFM046.

A avaliação da complementação fenotípica foi realizada por conjugação em meio mineral sólido, ou seja, o mutante LFM496 foi espalhado na superfície de MMPK sólido e diferentes clones da biblioteca genômica foram inoculados em riscos sobre a superfície. A complementação fenotípica seria observada caso se verificasse crescimento, pois os clones de *E. coli* S17-1 não são capazes de crescer em meio mínimo e o mutante LFM496 não é capaz de crescer na presença de canamicina e não utiliza o propionato como única fonte de carbono. Assim, apenas transconjugantes de LFM496 abrigando genes que o complementam no plasmídio pBBR1MCS-2 (que carrega gene de resistência a canamicina) seriam capazes de crescer nessas condições.

Não se observou complementação fenotípica do mutante LFM496 por qualquer dos clones obtidos.

4.6 Ensaio com carbono marcado

Buscando o entendimento do catabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046, uma série de cultivos foi realizada empregando ácido propiônico marcado no carbono 1. O experimento foi iniciado com apenas glicose como fonte de carbono e propionato

foi adicionado após as primeiras 24 horas de cultivo. O cultivo foi encerrado com um total de 72 horas (48 horas após a adição de ácido propiônico). Os cultivos foram realizados tanto com a linhagem selvagem (LFM046) como com o mutante tendo o gene *prpB* interrompido pelo transposon mini-*Tn5* (LFM693). Foi avaliada a adição de propionato em quatro concentrações diferentes (0; 0,1; 0,5 e 1 g/L). Os resultados desta série de cultivos estão apresentados na Tabela 8.

A linhagem selvagem (LFM046) não sofreu mudança significativa na quantidade de PHA acumulado em função das concentrações de propionato adicionadas ao meio de cultura. Por outro lado, para linhagem mutante (LFM693) observa-se uma redução no teor de PHA acumulado pelo menos quando 1 g/L de propionato foi adicionado. As diferenças não são significativas quando se compara o teor de PHA acumulado quando 0,1 ou 0,5 g/L de propionato foi adicionado. Com relação à fração molar de monômeros com número ímpar de carbonos (HAI) observa-se uma diferença significativa tanto em função da concentração de propionato fornecida como em função das linhagens bacterianas. Para a linhagem LFM046, os valores de fração molar de HAI foram 0; 0,6; 2,3 e 8,0 quando a concentração de propionato suprida foi 0; 0,1; 0,5 e 1,0 g/L, respectivamente. Para a linhagem LFM693, os valores de fração molar de HAI foram 0; 4,9; 21,5 e 54,3 quando a concentração de propionato suprida foi 0; 0,1; 0,5 e 1,0 g/L, respectivamente. Ou seja, claramente a linhagem mutante apresentou uma eficiência maior em converter o propionato suprido em monômeros HAI, como já havia sido observado em experimentos anteriores realizados no laboratório (Bretas et al., 2005).

A Figura 12 apresenta as diferentes vias descritas para o catabolismo de propionato como apresentado por Textor et al. (1997). A via do 2-metilcitrato, que está inativada no mutante LFM693, leva a descarboxilação do carbono 1 do propionato para formação de acetil-CoA. Três vias de catabolismo de propionato (via do oxobutirato, via

do metimalonil-CoA e via do 2-hidroxioglutarato) permitem que o carbono 1 do propionato permaneça no acetil-CoA formado. Outras três vias catabólicas (α -oxidação, β -oxidação e via do citramalato), assim como a via do 2-metilcitrato, levam a descarboxilação do propionato no carbono 1 para formação de acetil-CoA.

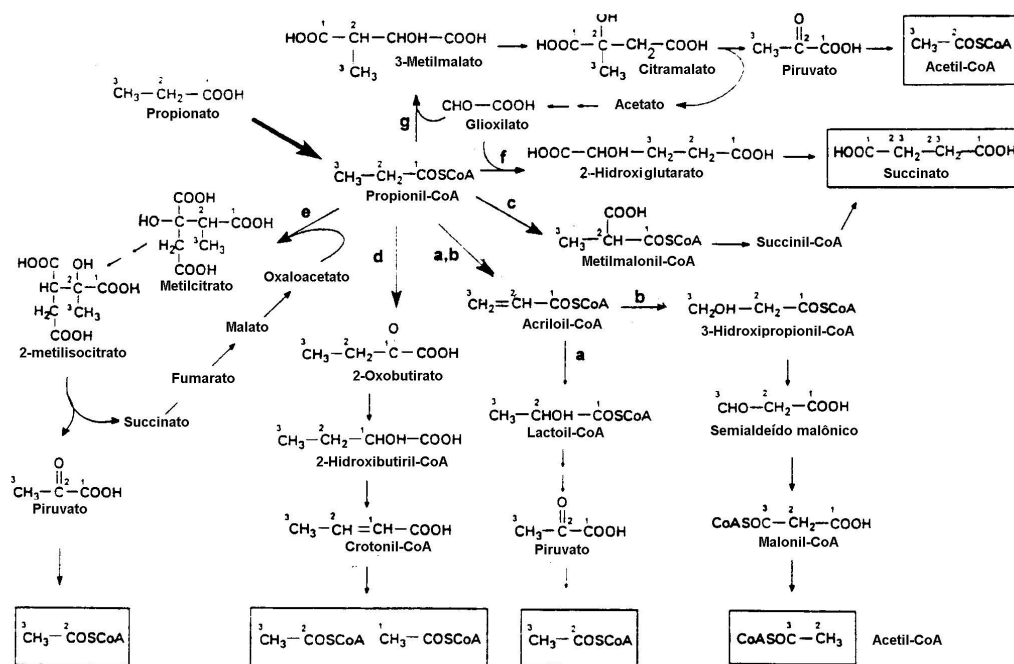
Deve-se levar em conta ainda que em algumas bactérias foram detectadas mais de uma cópia de genes relacionados com a via do 2-metilcitrato (Claes et al., 2002; Ewering et al., 2006; Pereira et al., 2009), o que pode indicar a duplicação dessa via metabólica, o que implicaria, portanto, que esta via pode ainda estar funcional no mutante LFM693. No entanto, a análise bioinformática de genomas sequenciados de *Pseudomonas*, utilizando o programa blastx, não mostrou duplicação de genes da via do 2-metilcitrato em nenhuma das espécies de *Pseudomonas* analisadas.

Tabela 8 - Produção de PHA em experimentos utilizando glicose não marcada e propionato marcado no carbono 1.

Linhagens	Concentração Propionato (g/L)	Composição PHA (mol%)							PHA (%MSC)
		3HHx	3HHp	3HO	3HN	3HD	3HDd ₅	3HDd	
LFM046	0,0	2,9	0,0	32,3	0,0	59,2	3,3	2,3	36,4
	0,0	3,0	0,0	32,6	0,0	58,5	3,2	2,7	34,7
	Média	3,0	0,0	32,4	0,0	58,8	3,3	2,5	35,5
	Desv.Pad	±0,1	±0,0	±0,2	±0,0	±0,5	±0,1	±0,3	±1,2
	0,1	3,4	0,0	33,4	0,6	59,7	0,3	2,6	33,5
	0,1	3,4	0,0	32,6	0,6	57,9	3,2	2,3	37,4
	Média	3,4	0,0	33,0	0,6	58,8	1,7	2,4	35,4
	Desv.Pad	±0,0	±0,0	±0,6	±0,0	±1,3	±2,1	±0,2	±2,8
	0,5	3,3	0,4	31,7	1,8	57,2	3,2	2,5	38,0
	0,5	3,1	0,3	31,6	2,0	56,6	3,5	2,9	37,9
	Média	3,2	0,4	31,6	1,9	56,9	3,3	2,7	38,0
	Desv.Pad	±0,1	±0,1	±0,1	±0,1	±0,4	±0,2	±0,3	±0,1
	1,0	3,0	1,5	29,6	6,9	53,7	3,0	2,2	41,9
	1,0*	3,2	1,3	30,2	6,2	54,5	2,6	1,9	26,0
	Média	3,1	1,4	29,9	6,6	54,1	2,8	2,1	34,0
Desv.Pad	±0,1	±0,1	±0,4	±0,5	±0,6	±0,3	±0,2	±11,2	
LFM693	0,0	3,5	0,0	32,7	0,0	58,4	3,5	1,9	54,2
	0,1	2,9	0,7	30,7	3,9	56,5	3,1	2,2	35,4
	0,1	3,0	0,9	32,0	4,3	54,5	3,1	2,1	33,1
	Média	2,9	0,8	31,4	4,1	55,5	3,1	2,1	34,2
	Desv.Pad	±0,1	±0,1	±0,9	±0,3	±1,4	±0,0	±0,1	±1,6
	0,5	2,3	3,4	24,2	17,9	47,3	2,7	2,3	34,1
	0,5*	3,1	4,0	24,9	17,7	45,8	2,5	2,1	35,6
	Média	2,7	3,7	24,5	17,8	46,5	2,6	2,2	34,8
	Desv.Pad	±0,6	±0,4	±0,5	±0,1	±1,1	±0,1	±0,1	±1,1
	1,0	1,2	8,9	12,5	42,9	30,8	1,5	2,2	22,2
1,0*	1,1	10,2	11,1	46,6	27,7	1,1	2,3	19,4	
Média	1,1	9,5	11,8	44,8	29,2	1,3	2,2	20,8	
Desv.Pad	±0,1	±0,9	±1,0	±2,6	±2,2	±0,3	±0,1	±2,0	

*Amostra analisada por CG-MS.

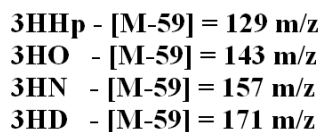
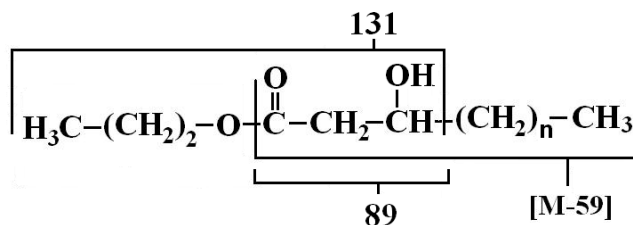
Figura 16 - Vias metabólicas para o catabolismo de propionato descritas em diferentes bactérias (Textor et al., 1997).



Três amostras (marcadas com asterisco na Tabela 8) foram selecionadas e analisadas por CG-MS, com o objetivo de avaliar possíveis vias metabólicas além da via do 2-metilcitrato envolvidas no catabolismo de propionato.

Os fragmentos $m/z = 131$ e $m/z = 89$ são característicos de propil-ésteres de 3HA e correspondem, respectivamente, a clivagem do grupo funcional hidroxil e ao rearranjo de McLafferty de um subfragmento deste com a retirada do grupo propil (Lee e Choi, 1995). O fragmento [M-59] é característico de cada um dos 3HA. Como apontado na Figura 13, fragmentos com $m/z = 129$, 143, 157 e 171 são esperados, respectivamente, para propil-ésteres de 3Hhp, 3HO, 3HN e 3HD. Todos esses fragmentos são esperados a partir de 3HA contendo apenas C^{12} em sua composição.

Figura 17 - Fragmentos característicos de propil-ésteres de 3HA obtidos por espectrometria de massas.



As Figuras 14, 15, 16 e 17 apresentam os espectros de massas observados para os propil-ésteres do 3HHp, 3HO, 3HN e 3HD, respectivamente, nos PHA produzidos pelas linhagens LFM046 ou LFM693. Em todos os espectros de massa, os fragmentos $m/z = 89$ e 131 característicos de propil-ésteres de 3HA são facilmente detectados. Nos espectros relacionados aos propil-ésteres de 3HHp (Figura 14) e 3HN (Figura 16) se observam fragmentos de $m/z 130$ e 158 , respectivamente, correspondendo a $[M-59]+1$, como era esperado, uma vez que para biossíntese desses monômeros é incorporado uma molécula de propionato, que nestes cultivos apresentava o carbono 1 correspondendo a C^{13} .

A outra informação importante que os espectros de massas poderia fornecer é com relação à contribuição de uma via metabólica que permitem que o carbono 1 do propionato permaneça no acetil-CoA formado (via do oxobutirato, via do metimalonil-CoA e via do 2-hidroxiglutarato). Caso essas vias contribuam para o metabolismo de propionato deverão ser encontrados isótopos $M+1$ e, eventualmente, $M+2$ dos fragmentos com $m/z = 89$ e 131 . Com objetivo de analisar essa contribuição foi analisado o percentual do fragmento $M+1$ em relação

ao seu isótopo M. Não foi observada diferença significativa no percentual do fragmento M+1 quando comparadas linhagens selvagem ($3,7 \pm 0,5\%$) e mutante ($3,5 \pm 0,7\%$) quando 1,0 g/L de propionato foi fornecido, bem como a linhagem mutante quando suprida com 0,5 ($4,1 \pm 0,1\%$) ou 1,0 ($3,5 \pm 0,7\%$) g/L de propionato. Espera-se que pelo menos na comparação entre a linhagem mutante e a linhagem selvagem supridas com 1 g/L de propionato, a via do 2-metilcitrato contribuiria com a formação de uma fração maior de acetil-CoA a partir de propionato na linhagem selvagem do que na linhagem mutante, e levariam a uma menor contribuição da via metabólica alternativa para o catabolismo de propionato na formação de fragmentos com M+1. Assim, este resultado é compatível com que os valores detectados como correspondendo aos isótopos M+1 do fragmento 89, de fato correspondem ao ruído da metodologia analítica e significaria que não há contribuição do carbono 1 do propionato para formação do acetil-CoA. Ou seja, não haveria contribuição de vias metabólicas em que não ocorre a descarboxilação do carbono 1 do propionato.

Os resultados obtidos não permitem excluir a presença de uma via metabólica, além daquela inativada no mutante LFM693, que também proporciona a descarboxilação do propionato no carbono 1. Estes resultados também não permitem excluir a possibilidade do propionato estar sendo utilizado para biossíntese de outro composto, como o 2-metilisocitrato.

Figura 14 - Espectrograma de massas de propil-éster de 3HHp observado no cultivo da linhagem LFM693 quando suprida com glicose e 1,0 g/L de propionato.

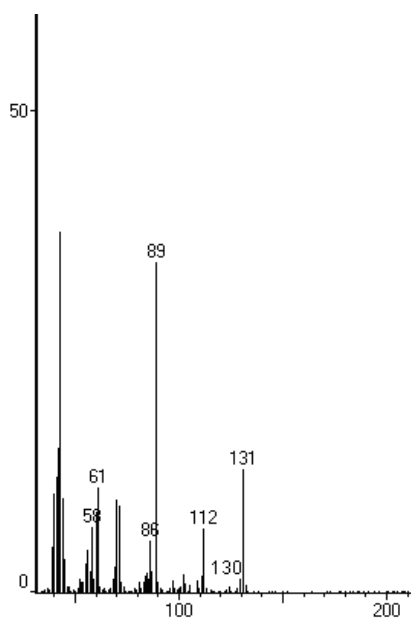


Figura 15 - Espectrograma de massas de propil-éster de 3HO observado no cultivo da linhagem LFM046 quando surpida com glicose e 1,0 g/L de propionato (A), ou da linhagem LFM693 quando surpida com glicose e 0,5 (B) ou 1,0 (C) g/L de propionato.

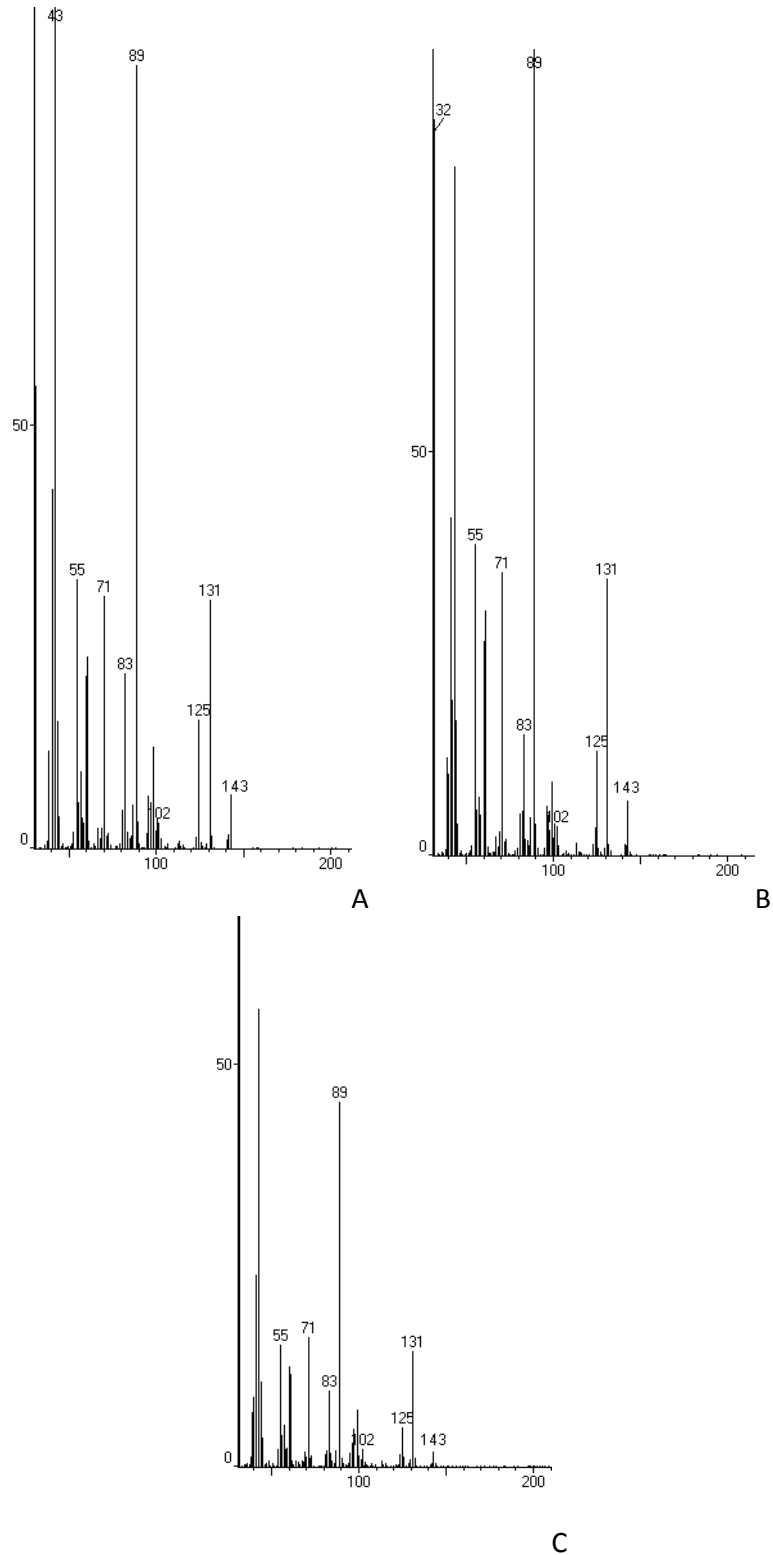


Figura 16 - Espectrograma de massas de propil-éster de 3HN observado no cultivo da linhagem LFM046 quando surprida com glicose e 1,0 g/L de propionato (A), ou da linhagem LFM693 quando surprida com glicose e 0,5 (B) ou 1,0 (C) g/L de propionato.

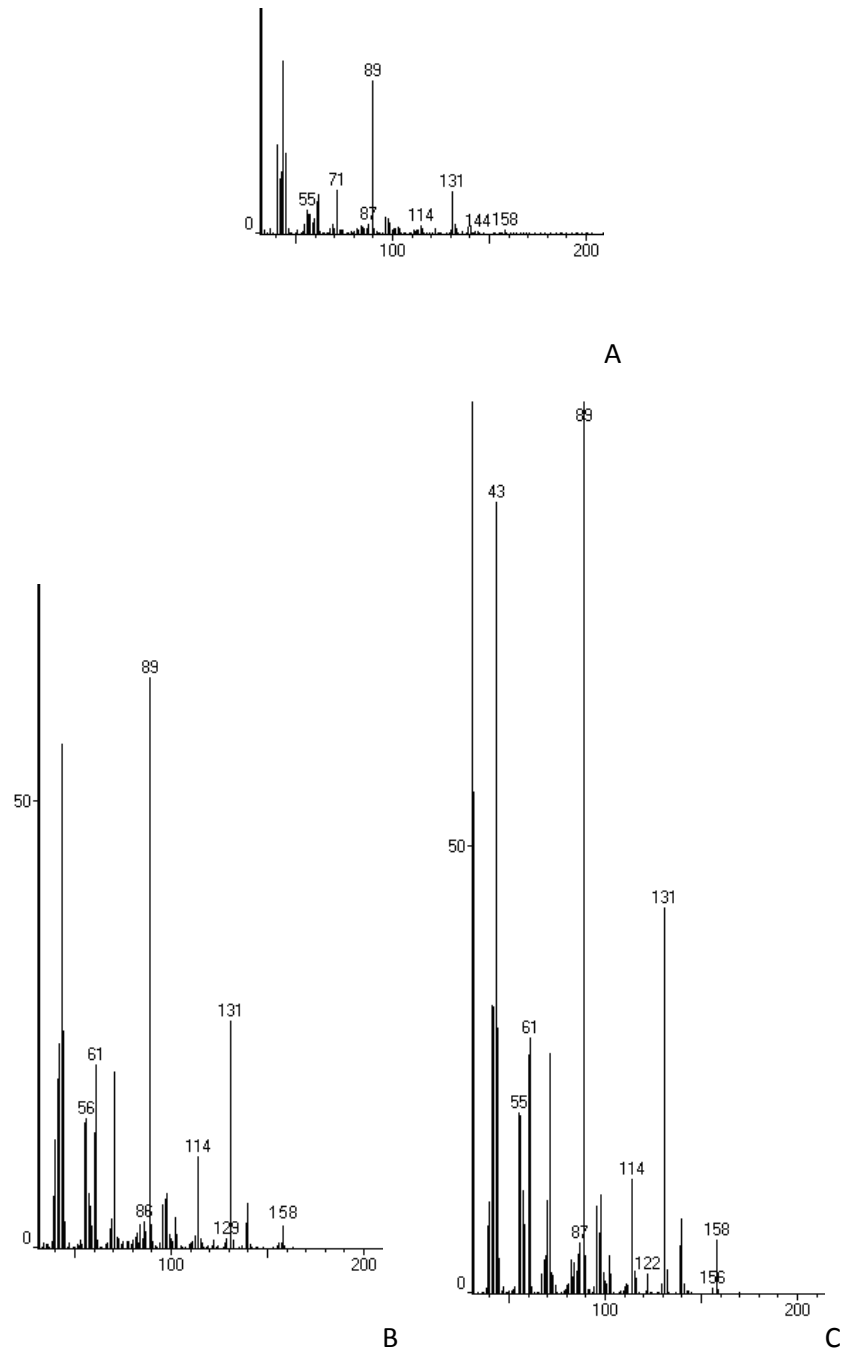
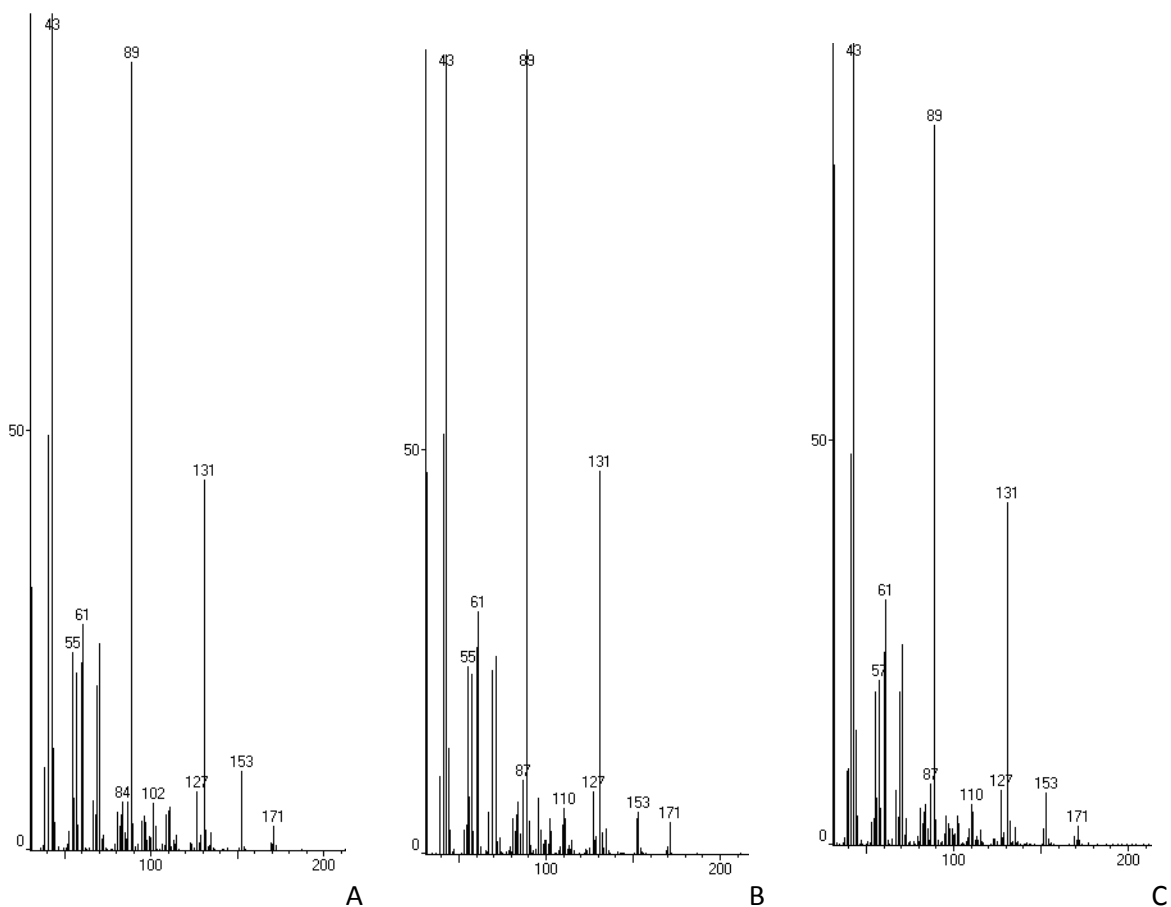


Figura 17 - Espectrograma de massas de propil-éster de 3HD observado no cultivo da linhagem LFM046 quando suprida com glicose e 1,0 g/L de propionato (A), ou da linhagem LFM693 quando suprida com glicose e 0,5 (B) ou 1,0 (C) g/L de propionato.



Para analisar a contribuição do propionato e da glicose na formação dos acetil-CoA que são incorporados ao 3HA, novos cultivos utilizando glicose totalmente marcada e propionato não marcado foram planejados. Desta forma, será possível avaliar a contribuição do propionato com grupos acetil-CoA para biossíntese dos 3HA. Caso se detecte uma contribuição com grupos de dois carbonos nos 3HA compatível com a quantidade propionato consumido, poderemos descartar a hipótese de excreção do 2-metiliscitrato. Caso o propionato não contribua com carbono para biossíntese dos 3HA, este

deve ter como destino a formação de um subproduto. Ensaio preliminares para avaliar as condições ideais de cultivo neste caso foram realizados sem adição de glicose marcada, tendo fase de crescimento e fase de acúmulo. Na fase de crescimento (24 horas) não houve limitação de nenhum nutriente, em seguida, as células foram lavadas com solução salina e inoculadas em meio com ausência de nitrogênio, contendo 5 g/L de glicose (neste momento, seria adicionada a glicose completamente marcada) e diferentes concentrações de ácido propiônico (0; 0,25 e 1 g/L). Os resultados destes experimentos estão apresentados na Tabela 9. Como a quantidade de material analisado neste ensaio foi baixa, não foi possível detectar picos de 3HHp nos cromatogramas para a linhagem selvagem com as duas concentrações de propionato e para a linhagem mutante com a concentração de 0,25 g/L. Também não foi possível detectar pico de 3HN para LFM046 com a menor concentração de propionato. Entretanto, os resultados confirmaram inserção de uma maior fração de monômeros HAI pela linhagem mutante quando comparada à linhagem selvagem.

Assim, os cultivos com a linhagem mutante (LFM693) poderão ser utilizados para avaliar a contribuição do propionato para a formação de 3HA após ter sido metabolizado a acetil-CoA. Medidas do consumo de glicose e propionato permitirão avaliar a contribuição de cada um na geração de acetil-CoA utilizado para síntese de monômeros ou oxidado no ciclo de Krebs. Por outro lado, a análise por espectrometria de massas permite avaliar a contribuição dos carbonos marcados (glicose) ou não marcados (propionato) na síntese dos monômeros. Isto pode ser realizado analisando-se os fragmentos com $m/z = 89$ ou 131 . Estes fragmentos são formados por 1,5 moléculas de acetil-CoA. Se apenas a glicose for utilizada para formação dos acetil-CoA, deverá ser detectado apenas o isótopo com massa $M+3$ do fragmento $m/z = 89$, ou seja, um fragmento com $m/z = 92$. Por outro lado, se propionato

também contribuir para formação de acetil-CoA, deverão ser encontrados isótopos do fragmento $m/z = 89$ apresentando $m/z = 89, 90$ e 91 . A análise das proporções dos diferentes isótopos permitirá determinar a contribuição do propionato e da glicose na formação de acetil-CoA. Se a contribuição do propionato para formação de acetil-CoA (detectada nos espectros de massas) for muito inferior aquela prevista pelo consumo desse em relação à glicose, o resultado indicará que parte do propionato foi direcionado para formação de um subproduto.

Esses experimentos serão realizados no futuro neste laboratório.

Tabela 9 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seu mutante LFM693.

(continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	C3 (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDDΔ_5 (mol%)	3HDD (mol%)	PHA (%MSC)
046	4,55	0,00	2,79	0,00	34,98	0,00	55,70	3,64	2,89	31,45
046	4,00	0,00	3,14	0,00	34,91	0,00	55,83	3,05	3,06	26,94
046	3,46	0,00	2,72	0,00	33,96	0,00	55,23	5,58	2,52	44,42
046	3,67	0,00	3,25	0,00	34,93	0,00	53,58	5,68	2,56	30,60
Média	3,92	0,00	2,97	0,00	34,70	0,00	55,08	4,49	2,76	33,35
±	0,48	0,00	0,26	0,00	0,49	0,00	1,04	1,34	0,26	7,63
046	4,21	0,25	3,23	0,00	35,55	0,00	54,82	3,65	2,75	30,70
046	4,24	0,25	2,86	0,00	34,56	0,00	54,77	5,03	2,77	32,42
046	4,37	0,25	3,03	0,00	34,91	0,00	54,77	4,40	2,90	26,42
046	4,14	0,25	3,03	0,00	34,54	0,00	54,13	5,43	2,88	29,35
Média	4,24	0,25	3,04	0,00	34,89	0,00	54,62	4,62	2,82	29,72
±	0,10	0,00	0,15	0,00	0,47	0,00	0,33	0,78	0,07	2,53
046	5,00	1,00	3,17	0,00	35,72	1,32	52,86	4,39	2,54	32,60
046	3,80	1,00	3,05	0,00	35,61	1,19	51,30	6,21	2,65	34,33
046	4,40	1,00	2,76	0,00	34,20	1,17	55,57	3,49	2,79	44,58
046	4,34	1,00	3,02	0,00	33,92	1,20	54,04	4,93	2,89	28,81
Média	4,39	1,00	3,00	0,00	34,86	1,22	53,44	4,76	2,72	35,08
±	0,49	0,00	0,17	0,00	0,93	0,07	1,81	1,14	0,15	6,74

Xt – massa seca celular; C3 forn – ácido propiônico fornecido; 3HHx – 3-hidroxi-hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi-heptanoato; 3HO – 3-hidroxi-octanoato; 3HN – 3-hidroxi-nonanoato; 3HD – 3-hidroxi-decanoato; 3HDD – 3-hidroxi-dodecanoato; 3HDD Δ_5 – 3-hidroxi-dodecanoato Δ_5 ; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi-álcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 9 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seu mutante LFM693.

(conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	C3 (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDDΔ_5 (mol%)	3HDD (mol%)	PHA (%MSC)
693	4,28	0,00	3,22	0,00	34,66	0,00	53,94	5,08	3,11	25,65
693	4,11	0,00	2,92	0,00	34,33	0,00	54,76	4,79	3,20	33,34
693	4,43	0,00	2,96	0,00	33,09	0,00	53,93	7,85	2,16	33,56
693	4,01	0,00	3,07	0,00	33,58	0,00	55,28	4,77	3,29	28,70
Média	4,21	0,00	3,04	0,00	33,91	0,00	54,48	5,62	2,94	30,31
±	0,19		0,14	0,00	0,71	0,00	0,66	1,49	0,53	3,83
693	4,36	0,25	2,63	0,00	32,64	1,43	53,44	6,52	3,34	31,70
693	4,04	0,25	3,22	0,00	34,46	1,65	54,06	4,04	2,57	26,61
693	3,58	0,25	3,46	0,56	34,20	2,72	50,76	5,19	3,12	37,96
693	3,33	0,25	3,17	0,00	31,92	2,15	49,37	7,36	6,02	37,29
Média	3,83	0,25	3,12	0,14	33,31	1,99	51,91	5,78	3,76	33,39
±	0,46		0,35	0,28	1,22	0,57	2,21	1,46	1,54	5,32
693	4,48	1,00	2,82	1,84	30,00	12,70	46,21	3,75	2,68	27,08
693	4,37	1,00	2,98	1,90	29,63	12,55	44,82	5,50	2,62	24,43
693	2,68	1,00	3,52	1,26	32,31	6,69	48,85	4,71	2,66	25,71
Média	3,84	1,00	3,11	1,67	30,65	10,65	46,63	4,65	2,65	25,74
±	1,01		0,36	0,35	1,45	3,43	2,05	0,88	0,03	1,33

Xt – massa seca celular; C3 forn – ácido propiônico fornecido; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxiheptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDD Δ_5 – 3-hidroxi dodecanoato Δ_5 ; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

5 CONCLUSÕES

Genes relacionados ao ciclo do 2-metilcitrato foram encontrados em todas as espécies de *Pseudomonas* tipicamente compondo um operon *prpRBCAcnMprpFD*, embora em algumas espécies *prpD* encontra-se separado do operon.

Genes da via do metilmalonil-CoA de *E. coli* (*scpAArgKscpBC*) não foram encontrados em nenhum dos genomas de *Pseudomonas* sequenciados.

Genes da α -oxidação de propionato foram encontrados em todas as linhagens de *P. aeruginosa*, mas não em outras espécies de *Pseudomonas*. O operon correspondente a α -oxidação contem seis genes em linhagens de *P. aeruginosa*, enquanto em *Burkholderia* spp. são três genes.

A análise de um mutante *prp* de *Pseudomonas* sp. LFM046 obtido por inserção de transposon revelou que estava mutado no gene *prpB*, relacionado ao ciclo do 2-metilcitrato.

O mutante afetado no gene *prpB* foi analisado com relação a excreção de 2-metilisocitrato. Comparação com ácido isocítrico não indicou a excreção desse ácido.

A análise de mutantes obtidos por radiação ultravioleta revelou que nenhum deles apresentava características de metabolização do propionato semelhante ao mutante afetado no gene *prpB*, entretanto dois devem estar afetados em via menos relevante para o metabolismo de propionato e outros dois na ativação desse ácido orgânico.

Experimentos com propionato marcado no carbono 1 (C^{13}) demonstraram que as vias do oxobutirato, do metimalonil-CoA e do 2-hidroxioglutarato não devem contribuir para o metabolismo de propionato em *Pseudomonas* sp. LFM046.

REFERÊNCIAS(*)

Aldor IS, Kim S, Prather KLJ, Keasling JD. Metabolic Engineering of a Novel Propionate-Independent Pathway for the Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in Recombinant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, 2002; Appl Environ Microbiol, 68:3848:3854.

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, 1990; Microbiol Rev, 54:450-472.

Babu, GN, Hammar WJ, Rutherford DR. Poly-3-hydroxyalkanoates as pressure sensitive adhesives. In: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates; 1996; Davos. Ontario: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates; 1997. p.48-56.

Berlyn MKB. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 10: the traditional map, 1998; Microbiol Mol Biol Rev, 62:814-984, 1998.

Bramer CO, Silva LF, Gomez JGC, Priefert H, Steinbüchel A. Identification of the 2-Methylcitrate Pathway Involved in the Catabolism of Propionate in the Polyhydroxyalkanoate-Producing Strain *Burkholderia sacchari* IPT101^T and Analysis of a Mutante Accumulating a Copolyester with Higher 3-Hydroxyvalerte Content, 2002; Appl Environ Microbiol. 68:271-279.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW, Fuller RC. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(β -Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters, 1988, Appl Environ Microbiol. 8:1977-1982.

Brandl H, Gross RA, Lenz RW. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible and biodegradable polyesters, 1990; Adv biochem Eng, 41:77-93.

* International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bretas AF, Silva LF, Gomez JGC. Produção de polihidroxicanoatos com composição diferenciada por mutantes de *Pseudomonas putida* a partir de carboidratos e ácido propiônico. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2005; Santos. São Paulo: Congresso Brasileiro de Microbiologia; 2005. P. 28-30.

Braz VS. Caracterização de genes envolvidos na resposta a metais em *Caulobacter crescentus*. São Paulo, 2006. 145f.

Bullock WO, Fernandez JM, Short JM. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection, 1987; *J Biotechnol*, 5:376-379.

Choi J, Lee SY. Process analysis and economic evaluation of poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation, 1999; *Appl Environ Microbiol*. 51:13-21.

Cintra ACSD. Alfa-oxidação de propionato está envolvida na redução da produção de plástico biodegradável em *Burkholderia sacchari*? São Paulo, 2008. 45p.

Claes WA, Puhler A, Kalinowski J. Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle, 2002; *J Bacteriol*, 184: 2728-2739.

De Koning GJM, Kellerhals M, Van Meurs C. et al. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas*. Process development and economic evaluation, 1997; *Bioproc Eng*, 17:15-21.

Doi Y, Kanesawa Y, Kunioka M, Saito T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), 1990; *Macromolecules*, 23(1):26-31.

Du GC, Chen J, Yu J, Lun S Feeding strategy of propionic acid production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*, 2000; Biochem Engineer J, 8:103-110.

Eugenio LI, Escapa IF, Morales V, Dinjaski N, Galán B, García JI, Prieto MA The turn over of médium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerase for metabolic balance, 2010; Environ Microbiol, 12:207-221.

Ewering C, Heuser F, Benolken JK, Bramer CO, Steinbuchel A. Metabolic engineering of strains of *Ralstonia eutropha* and *Pseudomonas putida* for biotechnological production of 2-methylcitric acid, 2006; Metab Eng, 8: 587-602.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Silva LF. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, 1996; Appl Microbiol Biotechnol, 45:785-791.

Gomez JGC, Bueno Netto CL. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias, 1997; Revista Brasileira de Engenharia Química, 17: 24-29.

Gomez JGC. Produção por *Pseudomonas* sp. de polihidroxiálcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes; São Paulo, 2000. 155p.

Gomez JGC, Silva LF, Taciro MK, Rodrigues MFA, Silva ES, Bonomi A, Simões DA, Bueno Netto CL, Pradella JGC. Production of biodegradable polymer from sugar cane in Brazil. In: 12th World Clean Air and Environment Congress and Exhibition; 2001, Seoul. Seoul: World Clean Air and Environment; 2001 p. 32.

Haywood GW, Anderson AJ, Ewing DF, Dawes EA. Accumulation of PHA containing primarily 3-hydroxy-decanoate from simple carbohydrate

substrate by *Pseudomonas* sp strain NCIMB40135, 1990; Appl Environ Microbiol, 56:3354-3359.

Horswill AR, Escalante-Semerena JC. Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of activators, and *prpBCDE* genes constitute an operon, 1997; J Bacteriol, 179(3):928-940.

Huijberts GNM, De Rijk TC, De Waard P, Eggink GC. NMR studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly-(3-hydroxyalkanoate) synthesis, 1994; J Bacteriol, 176:1661-1666.

Kabilan S, Ayyasamy M, Jayavel S, Paramasamy G. *Pseudomonas* sp. as a Source of Medium Chain Length Polyhydroxyalkanoates for Controlled Drug Delivery: Perspective, 2012; Int J Microbiol, doi:10.1155/2012/317823.

Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. Biosynthesis, modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates, 2007; J Microbiol, 45(2):87-97.

Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, Peterson KM. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes, 1995; Gene, 166(1):175-6.

Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Katelaar P, Eggink G, Witholt B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and poly-(R)-hydroxyalkanoates, 1988; Appl. Environ. Microbiol, 54:2924-2932.

Lee EY, Choi CY. Gas chromatography-mass spectrometric analysis and its application to a screening procedure for novel bacterial polyhydroxyalkanoic acids containing long chain saturated and unsaturated monomers, 1995; J. of Fermentation and Bioengineering 80:408-414.

Lemos PC, Serafim LS, Reis MAM. Synthesis of polyhydroxyalkanoates from different short-chain fatty acids by mixed cultures submitted to aerobic dynamic feeding, 2006; J Biotechnol, 122, 226–238.

Misra SK, Valappil SP, Roy I, Boccaccini AR. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic phase composites for tissue engineering applications, 2006; Biomacromol, 7(8):2249-2258.

Nonato RV, Mantelatto PE, Rossell CEV. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol, 2001; Microbiol Biotechnol, 57:1-5.

Patwardhan PR, Srivastava AK. Model-based fed-batch cultivation of *R. eutropha* for enhanced biopolymer production, 2004; Biochem Eng J, 20:21–28.

Pereira RPM. Produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *A. eutrophus* DSM545 sob diferentes condições de oferta de substratos. São Paulo, 1996. 149p.

Pereira EM, Silva-Queiroz SR, Gomez JGC, Silva LF. Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate in *Burkholderia sacchari*, 2009; Can J Microbiol, 55(6):688-697.

Preusting HR. *Pseudomonas oleovorans* as a source of bioplastics Production and characterization of poly-3-hydroxyalkanoates. Gröningen, 1992. 97p.

Pronk JT, Van der Linder-Beuman A, Verduyn C. et al. Propionate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for the metabolon hypothesis, 1994; Microbiol, 140:717-722.

Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Batille P, Ramsay JA. Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids, 1990; *Appl Environ Microbio*, 56: 2093-2098.

Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC Polyhydroxyalkanoates: an overview, 2003; *Bioresour Technol*, 87:137–146.

Rhem BHA, Krüger N, Steinbüchel A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis, 1988; *J Biol Chem*, 273:24044-24051.

Rehm BHA, Steinbüchel A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis, 1999; *Int J Biol Macromol*, 25:3-19.

Rehm BHA. Polyester synthases: natural catalysts for plastics, 2003; *Biochem J*, 376:15-33.

Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis, 1988; *J Chromatogr*, 445: 285-289.

Rocha RCS, Pereira FS, Taciro MK, Rodrigues MFA, Pradella JGC. Controle da biossíntese de poli-hidroxicanoatos bacterianos através do fluxo de substratos, 2007; *Quim Nova*, 30(1):53-55.

Rocha RCS, Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC. Production of P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high $Y_{3HV/prop}$ values by *Burkholderia sacchari* IPT 189, 2008; *World J Microbiol Biotechnol*, 24:427-431.

Rocha RCS, Silva SR, Bretas A, Era LK, Silva LF, Gomez JGC. The role of 2-methylcitrate cycle in the incorporation of odd-chain-length monomers into polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. In: 3rd Congress of European Microbiologists-FEMS; 2009; Gothenburg.FEMS; 2009. p. 77.

Sánchez RJ, Schripsema J, Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC, Gomez JGC. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT046 from renewable sources, 2003; *European Polym J*, 39:1385-1394.

Silva LF. Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia* sp visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) – um plástico biodegradável. São Paulo, 1998. 103p.

Silva-Queiroz SR. Biossíntese de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAmcl) por bactérias a partir de óleos vegetais. São Paulo, 2003. 99p.

Silva LF, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC, Gomez JGC. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil, 2007; *Quim Nova*, 30:1732-1743.

Simon R, Priefer U, Puhler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria, 1983; *Nature Biotech*, 1:784-791.

Spratt SK, Ginsburgh CL, Nunn WD, Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants defective in propionate metabolism, 1981; *J Bacteriol*, 146:1166-1169.

Steinbüchel A, Valentim HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids, 1995; *FEMS Microbiol Lett*, 128:219-228.

Steinbüchel A, Hein S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms, 2001; *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 71:81-123.

Steinbüchel A, Lütke-Eversloh T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms, 2003; *Biochem Eng J*, 16:81-96.

Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological, polyesters, 2000; Prog Polym Sci, 25:1503-1555.

Surovova IA, Ravcheev DA, Gelfand MS. Regulation and Evolution of Malonate and Propionate Catabolism in Proteobacteria, 2012; J Bacteriol, 194: 3234-3240.

Textor S, Wendish VF, De Graaf A, Muller U, Linder MI, Linder D, Buckel W. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria, 1997; Arch Microbiol, 168:428-436.

Valentin HE, Dennis D. Metabolic Pathway for Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) Formation in *Nocardia corallina*: Inactivation of *mutB* by Chromosomal Integration of a Kanamycin Resistance Gene, 1996; Appl Environ Microbiol, 62(2):372-379.

Van de Walle GAM, Buisman GJH, Weusthuis RA. Development of environmentally friendly coatings and paint using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder, 1999; Int J Biol Macromol, 25:123-128.

Wang Y, Amer GA, Sheppard BJ, Langer R. A tough biodegradable elastomer, 2002; Nat Biotechnol, 20(6):602-606.

Wegener WS, Reeves HC, Rabin R. et al. Alternate pathways of metabolism of short-chain fatty acids, 1968; Bacteriol Rev, 32:1-26.

Witholt B, Kessler B. Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics, 1999; Curr Opin Biotechnol, 10:279-285.

Zinn M, Witholt B, Egli T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate, 2001; Adv Drug Del Rev, 53:5-21.

Pseudomonas Genome Database. Genomas sequenciados de *Pseudomonas* spp. [database]. [acesso entre 2010 jul e 2013 fev]. Disponível em <http://www.pseudomonas.com>

National Center for Biotechnology Information. GenBank [database]. [acesso entre 2010 mar e 2013 fev]. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Apêndice – Resultados dos ensaios em frascos agitado

Tabela 1- Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 1.(continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
LFM046	3,68	14,99	0,00	0,00	4,53	0,00	36,63	0,00	54,03	2,85	1,96	46,92	-	
	3,78	15,62	0,25	0,32	4,50	0,00	30,95	2,40	57,45	2,79	1,90	54,74	0,07	
	3,92	15,77		0,32	4,71	0,00	33,11	1,86	55,65	2,85	1,82	55,77	0,06	
	Média	3,85	15,70		0,32	4,61	0,00	32,03	2,13	56,55	2,82	1,86	55,26	0,07
	Desv.Pad.	±0,09	±0,10		±0,00	±0,15	±0,00	±1,53	±0,38	±1,28	±0,04	±0,06	±0,73	±0,01
	2,97	14,47	0,50	0,64	3,02	0,00	25,26	6,07	59,99	2,98	2,68	44,73	0,06	
	3,65	13,43		0,53	3,94	0,00	29,32	5,31	56,84	2,55	2,05	48,48	0,08	
	Média	3,31	13,95		0,58	3,48	0,00	27,29	5,69	58,41	2,77	2,36	46,60	0,07
	Desv.Pad.	±0,48	±0,73		±0,08	±0,65	±0,00	±2,87	±0,54	±2,23	±0,31	±0,44	±2,65	±0,02
	LFM 467	1,32	3,58	0,00	0,00	12,41	0,00	0,00	0,00	41,00	6,75	39,84	1,92	-
1,10		5,46	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	53,38	0,00	46,62	1,42	-	
Média		1,21	4,52		0,00	6,21	0,00	0,00	0,00	47,19	3,38	43,23	1,67	-
Desv.Pad.		±0,15	±1,33		±0,00	±8,78	±0,00	±0,00	±0,00	±8,75	±4,77	±4,80	±0,35	-
1,38		4,60	0,25	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	49,10	10,40	40,50	1,42	0,00	
1,10		4,70		0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	48,64	10,75	40,62	1,55	0,00	
Média		1,24	4,65		0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	48,87	10,57	40,56	1,49	0,00
Desv.Pad.		±0,20	±0,07		±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,32	±0,24	±0,08	±0,09	±0,00
1,30		1,44	0,50	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	57,62	0,00	42,38	1,35	0,00	
1,03		1,90		0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	51,79	9,21	39,00	1,78	0,00	
Média	1,17	1,67		0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	54,70	4,61	40,69	1,56	0,00	
Desv.Pad.	±0,19	±0,32		±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,12	±6,52	±2,39	±0,30	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxicaprolato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 1- Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 1.(conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	4,38	14,70	0,00	0,00	0,00	0,00	4,91	0,00	34,03	0,00	55,96	3,06	2,05	53,63	-
	4,03	15,21		0,00	0,00	0,00	5,05	0,00	36,47	0,00	53,14	3,01	2,33	56,37	-
	Média	4,21	14,96	0,00	0,00	0,00	4,98	0,00	35,25	0,00	54,55	3,04	2,19	55,00	-
	Desv.Pad.	±0,25	±0,36	±0,00	±0,00	±0,00	±0,10	±0,00	±1,73	±0,00	±2,00	±0,03	±0,20	±1,94	-
LFM469	4,12	15,14	0,25	0,27	0,00	0,00	4,65	1,22	34,44	2,42	52,45	2,93	1,88	50,91	0,13
	3,93	14,67		0,23	0,00	0,00	5,14	1,07	35,52	1,99	51,54	2,78	1,96	44,20	0,11
	Média	4,03	14,90	0,25	0,00	0,00	4,89	1,15	34,98	2,21	52,00	2,85	1,92	47,56	0,12
	Desv.Pad.	±0,13	±0,33	±0,03	±0,00	±0,00	±0,34	±0,00	±0,73	±0,31	±0,71	±0,11	±0,06	±4,66	±0,02
	3,93	15,43	0,50	0,48	0,00	0,00	4,84	1,83	32,46	4,03	52,39	2,64	1,80	51,44	0,12
	4,05	16,11		0,53	0,00	0,00	4,70	1,91	31,74	4,31	52,94	2,65	1,75	54,18	0,12
	Média	3,99	15,77	0,50	0,00	0,00	4,77	1,87	32,10	4,17	52,67	2,64	1,77	52,81	0,12
	Desv.Pad.	±0,08	±0,48	±0,03	±0,00	±0,00	±0,10	±0,00	±0,50	±0,20	±0,42	±0,00	±0,03	±1,89	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxicvalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbonos

Tabela 2 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 2.(continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAi/P (mol/mol)
LFM046	4,03	17,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,29	0,00	33,63	0,00	55,87	3,73	2,48	65,21	-
	4,20	16,00		0,00	0,00	0,00	4,18	0,00	31,98	0,00	52,85	7,46	3,53	59,71	-
	Média	4,12	16,50	0,00	0,00	0,00	4,23	0,00	32,81	0,00	54,36	5,60	3,01	62,46	-
	Desv.Pad.	±0,12	±0,71	±0,00	±0,00	±0,00	±0,08	±0,00	±1,16	±0,00	±2,13	±2,63	±0,74	±3,89	-
	3,90	14,92	0,25	0,16	0,00	0,00	4,48	0,38	31,93	1,16	51,24	6,46	4,35	52,56	0,07
	3,83	14,66		0,15	0,00	0,00	4,28	0,42	30,71	1,18	50,32	9,24	3,85	55,38	0,10
Média	3,87	14,79	0,15	0,00	0,00	4,38	0,40	31,32	1,17	50,78	7,85	4,10	53,97	0,09	
Desv.Pad.	±0,05	±0,19	±0,01	±0,00	±0,00	±0,14	±0,03	±0,86	±0,01	±0,65	±1,97	±0,36	±1,99	±0,03	
LFM 470	3,30	14,78	0,50	0,39	0,00	0,00	4,62	0,00	33,61	1,49	51,86	4,44	3,97	53,03	0,03
	4,00	13,02		0,38	0,00	0,00	3,98	0,88	29,48	1,31	51,67	8,95	3,73	54,79	0,06
	Média	3,65	13,90	0,39	0,00	0,00	4,30	0,44	31,54	1,40	51,77	6,70	3,85	53,91	0,04
	Desv.Pad.	±0,49	±1,25	±0,01	±0,00	±0,00	±0,45	±0,62	±2,92	±0,13	±0,14	±3,19	±0,17	±1,24	±0,02
	3,93	15,07	0,00	0,00	0,00	0,00	3,90	0,00	29,14	0,00	57,01	6,32	3,63	65,17	-
	3,93	16,04		0,00	0,00	0,00	3,85	0,00	29,20	0,00	55,91	6,82	4,22	58,85	-
Média	3,93	15,55	0,00	0,00	0,00	3,87	0,00	29,17	0,00	56,46	6,57	3,92	62,01	-	
Desv.Pad.	±0,00	±0,68	±0,00	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±0,04	±0,00	±0,77	±0,35	±0,41	±4,47	-	
Média	1,93	7,44	0,25	0,03	0,00	0,00	3,04	0,00	25,02	0,00	56,11	5,06	10,77	13,19	0,00
Desv.Pad.	±0,05	±2,37	±0,01	±0,00	±0,00	±0,93	±0,00	±1,16	±0,00	±5,98	±6,34	±1,73	±6,19	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxivalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAi/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 2 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 2.(conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	4,22	16,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,30	0,00	32,22	0,00	53,69	6,22	3,57	58,27	-
	4,28	12,29		0,00	0,00	0,00	4,34	0,00	32,68	0,00	53,27	5,80	3,91	60,39	-
	Média	4,25	14,15	0,00	0,00	0,00	4,32	0,00	32,45	0,00	53,48	6,01	3,74	59,33	-
	Desv.Pad.	±0,05	±2,62	±0,00	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±0,32	±0,00	±0,30	±0,30	±0,24	±1,50	-
	LFM471	3,63	14,73	0,25	0,17	0,00	0,00	6,90	0,52	40,51	1,49	42,02	5,36	3,21	67,75
3,97		15,28	0,11		0,00	0,00	5,02	0,43	35,23	1,28	51,79	3,74	2,51	50,01	0,15
Média		3,80	15,01	0,14	0,00	0,00	5,96	0,47	37,87	1,38	46,90	4,55	2,86	58,88	0,14
Desv.Pad.		±0,24	±0,39	±0,04	±0,00	±0,00	±1,33	±0,06	±3,73	±0,15	±6,91	±1,14	±0,50	±12,54	±0,01
		4,17	15,35	0,50	0,48	0,00	0,00	4,61	0,88	31,90	1,39	51,63	5,75	3,84	51,32
	3,98	12,86	0,40		0,00	0,00	4,87	1,02	31,76	1,39	51,42	5,72	3,82	51,48	0,06
	Média	4,08	14,10	0,44	0,00	0,00	4,74	0,95	31,83	1,39	51,53	5,74	3,83	51,40	0,05
	Desv.Pad.	±0,13	±1,76	±0,06	±0,00	±0,00	±0,18	±0,10	±0,09	±0,00	±0,15	±0,02	±0,01	±0,11	±0,00
		4,17	18,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,30	30,53	0,00	55,26	6,03	3,88	58,53
4,07		15,49	0,00		0,00	0,00	4,04	0,00	30,58	0,00	56,05	5,64	3,69	58,27	-
Média		4,12	16,94	0,00	0,00	0,00	2,02	2,15	30,55	0,00	55,65	5,83	3,79	58,40	-
Desv.Pad.		±0,07	±2,04	±0,00	±0,00	±0,00	±2,86	±3,04	±0,03	±0,00	±0,56	±0,27	±0,13	±0,18	-
LFM478		2,17	10,41	0,25	0,18	0,00	0,00	2,51	1,47	21,31	3,26	44,08	10,32	17,05	21,86
	2,23	12,19	0,22		0,00	0,00	2,48	1,71	18,78	5,96	43,56	13,16	14,36	24,33	0,08
	Média	2,20	11,30	0,20	0,00	0,00	2,49	1,59	20,04	4,61	43,82	11,74	15,70	23,09	0,07
	Desv.Pad.	±0,05	±1,26	±0,03	±0,00	±0,00	±0,02	±0,17	±1,79	±1,91	±0,37	±2,00	±1,91	±1,75	±0,02
		2,27	11,92	0,50	0,36	0,00	0,00	2,75	0,00	24,10	1,58	48,71	10,89	11,97	20,37
2,27		13,57	0,41		0,00	0,00	2,58	0,00	22,47	1,51	45,45	17,06	10,93	22,39	0,01
Média		2,27	12,75	0,39	0,00	0,00	2,67	0,00	23,28	1,54	47,08	13,97	11,45	21,38	0,01
Desv.Pad.		±0,00	±1,16	±0,04	±0,00	±0,00	±0,12	±0,00	±1,15	±0,05	±2,31	±4,36	±0,73	±1,43	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcenoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 3 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 3.(continua)

Linagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	2,72	10,73	0,00	0,00	0,00	0,00	3,32	0,00	26,29	0,00	60,23	6,95	3,22	58,93	-
	2,60	9,08		0,00	0,00	0,00	3,27	0,00	25,26	0,00	56,78	10,36	4,33	61,79	-
	Média	2,66	9,90	0,00	0,00	0,00	3,30	0,00	25,77	0,00	58,50	8,66	3,77	60,36	-
	Desv.Pad.	±0,08	±1,16	±0,00	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±0,73	±0,00	±2,44	±2,41	±0,79	±2,03	-
	LFM046	2,77	12,65	0,25	0,20	0,00	0,00	3,04	0,52	23,67	1,69	55,78	10,75	4,54	59,22
2,78		12,93	0,20		0,00	0,00	3,38	0,36	23,90	1,47	55,87	10,55	4,47	59,30	0,07
Média		2,78	12,79	0,20	0,00	0,00	3,21	0,44	23,78	1,58	55,83	10,65	4,51	59,26	0,08
Desv.Pad.		±0,01	±0,20	±0,00	±0,00	±0,00	±0,25	±0,12	±0,16	±0,16	±0,06	±0,14	±0,05	±0,06	±0,01
		2,30	9,73	0,50	0,48	0,00	0,00	2,80	0,66	22,34	3,04	53,82	12,43	4,91	64,14
	2,37	8,89	0,51		0,00	0,00	2,97	0,72	23,01	2,89	55,20	10,69	4,51	55,67	0,04
	Média	2,33	9,31	0,49	0,00	0,00	2,89	0,69	22,67	2,97	54,51	11,56	4,71	59,91	0,05
	Desv.Pad.	±0,05	±0,59	±0,02	±0,00	±0,00	±0,12	±0,04	±0,48	±0,11	±0,98	±1,22	±0,28	±5,99	±0,01
		3,05	15,48	0,00	0,00	0,00	0,00	3,20	0,00	24,28	0,00	56,93	11,16	4,42	59,22
2,48		12,67	0,00		0,00	0,00	3,16	0,00	24,19	0,00	56,41	11,84	4,40	59,30	-
Média		2,77	14,07	0,00	0,00	0,00	3,18	0,00	24,24	0,00	56,67	11,50	4,41	59,26	-
Desv.Pad.		±0,40	±1,99	±0,00	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±0,06	±0,00	±0,37	±0,48	±0,02	±0,06	-
LFM 473		2,48	11,47	0,25	0,21	0,00	0,00	3,19	0,00	24,37	0,00	57,09	11,08	4,27	56,07
	2,37	11,44	0,20		0,00	0,00	3,33	0,00	24,20	0,00	56,37	11,61	4,50	55,94	0,00
	Média	2,43	11,45	0,21	0,00	0,00	3,26	0,00	24,28	0,00	56,73	11,35	4,38	56,00	0,00
	Desv.Pad.	±0,08	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±0,10	±0,00	±0,12	±0,00	±0,51	±0,37	±0,16	±0,10	±0,00
		2,07	10,01	0,50	0,21	0,00	0,00	3,05	0,00	28,20	0,00	52,54	11,75	4,46	52,26
2,05		13,73	0,17		0,00	0,00	3,55	0,00	25,75	0,00	60,87	6,03	3,80	49,39	0,00
Média		2,06	11,87	0,19	0,00	0,00	3,30	0,00	26,98	0,00	56,71	8,89	4,13	50,83	0,00
Desv.Pad.		±0,01	±2,62	±0,03	±0,00	±0,00	±0,35	±0,00	±1,73	±0,00	±5,89	±4,04	±0,47	±2,03	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxivalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxiocetanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 3 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 3.(conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	2,33	12,78	0,00	0,00	0,00	0,00	2,92	0,00	22,61	0,00	56,00	12,74	5,73	57,73	-
	2,45	12,66		0,00	0,00	0,00	2,16	0,00	26,10	0,00	51,97	14,82	4,94	73,92	-
	Média	2,39	12,72	0,00	0,00	0,00	2,54	0,00	24,35	0,00	53,98	13,78	5,34	65,83	-
	Desv.Pad.	±0,08	±0,09	±0,00	±0,00	±0,00	±0,53	±0,00	±2,47	±0,00	±2,85	±1,47	±0,56	±11,45	-
	LFM479	1,98	11,01	0,25	0,11	0,00	0,00	3,50	0,27	24,89	0,89	57,80	8,74	3,91	45,05
1,92		14,09	0,16		0,00	0,00	3,23	0,30	23,31	0,93	54,73	13,02	4,49	50,12	0,03
Média		1,95	12,55	0,14	0,00	0,00	3,37	0,28	24,10	0,91	56,26	10,88	4,20	47,59	0,04
Desv.Pad.		±0,05	±2,18	±0,04	±0,00	±0,00	±0,20	±0,02	±1,12	±0,03	±2,17	±3,03	±0,41	±3,59	±0,01
		1,13	16,36	0,50	0,42	0,00	0,00	3,64	0,00	24,50	0,00	44,46	19,86	7,54	22,22
	1,48	14,35	0,44		0,00	0,00	2,94	0,00	22,17	0,00	46,42	21,47	7,00	24,65	0,00
	Média	1,31	15,36	0,43	0,00	0,00	3,29	0,00	23,33	0,00	45,44	20,67	7,27	30,12	0,00
	Desv.Pad.	±0,25	±1,42	±0,01	±0,00	±0,00	±0,50	±0,00	±1,65	±0,00	±1,39	±1,14	±0,38	±7,73	±0,00
	LFM480	2,85	10,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	25,66	0,00	61,38	8,37	4,00	59,45
2,37		11,69	0,00		0,00	0,00	3,18	0,00	24,33	0,00	57,48	10,14	4,86	62,35	-
Média		2,61	11,03	0,00	0,00	0,00	1,59	0,00	24,99	0,00	59,43	9,25	4,43	60,90	-
Desv.Pad.		±0,34	±0,93	±0,00	±0,00	±0,00	±2,25	±0,00	±0,93	±0,00	±2,75	±1,25	±0,61	±2,04	-
		1,87	8,07	0,25	0,05	0,00	0,00	3,14	0,00	24,34	0,00	53,68	13,64	5,20	47,06
	1,53	9,05	0,50	0,10	0,00	0,00	3,47	0,00	25,89	0,00	60,99	5,94	3,72	32,92	0,00
	1,40	6,90		0,07	0,00	0,00	3,33	0,00	23,78	0,00	55,00	12,86	5,02	40,01	0,00
	Média	1,47	7,98	0,08	0,00	0,00	3,40	0,00	24,84	0,00	57,99	9,40	4,37	36,47	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±1,52	±0,02	±0,00	±0,00	±0,10	±0,00	±1,49	±0,00	±4,23	±4,90	±0,92	±5,01	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 4 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 4. (continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
LFM046	2,73	13,91	0,00	0,00	0,00	0,00	4,93	0,00	35,14	0,00	52,70	4,06	3,17	32,38	-	
	1,95	12,55		0,00	0,00	0,00	3,55	0,00	39,54	0,00	43,00	6,45	7,46	32,32	-	
	Média	2,34		0,00	0,00	0,00	4,24	0,00	37,34	0,00	47,85	5,25	5,32	32,35	-	
	Desv.Pad.	±0,55	±0,97	±0,00	±0,00	±0,00	±0,97	±0,00	±3,11	±0,00	±6,86	±1,69	±3,04	±0,04	-	
	2,72	10,78	0,25	0,22	0,00	0,00	3,33	0,69	25,69	3,02	58,49	3,01	5,76	30,03	0,06	
	2,57	12,84		0,24	0,00	0,00	3,24	1,50	20,76	7,61	56,01	2,95	7,94	20,20	0,09	
	Média	2,64	11,81		0,23	0,00	0,00	3,28	1,09	23,23	5,31	57,25	2,98	6,85	25,11	0,08
	Desv.Pad.	±0,11	±1,46		±0,01	±0,00	±0,00	±0,07	±0,57	±3,49	±3,24	±1,76	±0,04	±1,54	±6,96	±0,02
	2,83	15,52	0,50	0,45	0,00	0,00	3,45	1,06	20,61	4,21	64,32	2,74	3,62	24,89	0,04	
	3,15	15,08		0,39	0,00	0,00	1,41	0,82	11,83	27,03	53,58	1,99	3,35	32,77	0,34	
Média	2,99	15,30		0,42	0,00	0,00	2,43	0,94	16,22	15,62	58,95	2,36	3,48	28,83	0,19	
Desv.Pad.	±0,22	±0,31		±0,04	±0,00	±0,00	±1,44	±0,17	±6,21	±16,14	±7,59	±0,53	±0,19	±5,57	±0,21	
LFM 481	3,38	10,55	0,00	0,00	0,00	0,00	2,20	0,00	29,21	0,00	53,00	4,91	10,67	7,82	-	
	2,53	9,28		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	30,14	0,00	54,86	12,22	2,78	18,64	-	
	Média	2,96	9,91		0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	29,67	0,00	53,93	8,57	6,73	13,23	-
	Desv.Pad.	±0,60	±0,90		±0,00	±0,00	±0,00	±1,56	±0,00	±0,66	±0,00	±1,31	±5,17	±5,58	±7,65	-
	3,27	6,52	0,25	ND	0,00	0,00	1,69	0,00	14,46	0,00	58,63	7,27	17,39	3,82	0,00	
	3,40	7,34		0,05	0,00	0,00	1,73	0,00	12,36	0,00	68,90	6,18	10,59	6,96	0,00	
	Média	3,33	6,93		0,05	0,00	0,00	1,71	0,00	13,41	0,00	63,76	6,72	13,99	5,39	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±0,58		-	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±1,49	±0,00	±7,26	±0,77	±4,81	±2,22	±0,00
	1,63	6,90	0,50	0,22	0,00	0,00	0,96	0,00	6,74	0,00	23,40	60,50	8,40	8,97	0,00	
	2,25	6,74		0,11	0,00	0,00	1,88	0,00	13,58	0,00	57,90	6,94	19,70	3,93	0,00	
Média	1,94	6,82		0,17	0,00	0,00	1,42	0,00	10,16	0,00	40,65	33,72	14,05	6,45	0,00	
Desv.Pad.	±0,44	±0,11		±0,08	±0,00	±0,00	±0,65	±0,00	±4,84	±0,00	±24,39	±37,87	±7,99	±3,56	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxivalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 4 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 4. (conclusão)

Linagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	3,63	13,68	0,00	0,00	0,00	0,00	4,16	0,00	31,67	0,00	57,21	3,46	3,50	25,89	-
	3,17	13,83		0,00	0,00	0,00	3,99	0,00	29,72	0,00	59,05	3,51	3,73	31,22	-
	Média	3,40	13,76	0,00	0,00	0,00	4,08	0,00	30,69	0,00	58,13	3,48	3,62	28,55	-
	Desv.Pad.	±0,33	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±0,12	±0,00	±1,38	±0,00	±1,30	±0,03	±0,17	±3,77	-
LFM482	3,65	11,79	0,25	0,26	0,00	0,00	4,13	0,96	29,41	3,46	55,39	3,36	3,30	36,50	0,11
	1,18	7,07		0,13	0,00	0,00	1,64	5,08	13,03	1,36	56,38	4,61	17,91	6,43	0,02
	Média	2,42	9,43	0,19	0,00	0,00	2,88	3,02	21,22	2,41	55,88	3,98	10,60	21,46	0,06
	Desv.Pad.	±1,74	±3,34	±0,09	±0,00	±0,00	±1,77	±2,92	±11,58	±1,48	±0,70	±0,89	±10,33	±21,27	±0,06
	3,47	13,24	0,50	0,16	0,00	0,00	4,07	1,68	29,58	5,02	52,66	3,72	3,26	30,41	0,20
	3,38	12,98		0,28	0,00	0,00	0,00	0,14	30,68	5,07	57,09	3,72	3,31	41,82	0,12
	Média	3,43	13,11	0,22	0,00	0,00	2,04	0,91	30,13	5,04	54,88	3,72	3,29	36,11	0,16
	Desv.Pad.	±0,06	±0,18	±0,08	±0,00	±0,00	±2,88	±1,09	±0,78	±0,03	±3,13	±0,00	±0,04	±8,07	±0,06

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 5 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 5. (continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
LFM046	4,37	15,78	0,00	0,00	0,00	0,00	5,02	0,00	36,06	0,00	53,99	2,76	2,17	33,92	-
	3,95	15,01		0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	33,46	0,00	62,67	0,83	2,90	29,37	-
	Média	4,16	15,39	0,00	0,00	0,00	2,58	0,00	34,76	0,00	58,33	1,79	2,53	31,65	-
	Desv.Pad.	±0,29	±0,55	±0,00	±0,00	±0,00	±3,45	±0,00	±1,84	±0,00	±6,14	±1,37	±0,51	±3,21	-
	3,90	14,90	0,25	0,09	0,00	0,00	0,00	0,07	33,99	0,30	54,33	1,80	9,51	27,22	0,02
	3,87	14,60		0,09	0,00	0,00	0,00	0,21	33,07	0,34	61,85	3,60	0,94	23,44	0,02
	Média	3,88	14,75	0,09	0,00	0,00	0,00	0,14	33,53	0,32	58,09	2,70	5,23	25,33	0,02
	Desv.Pad.	±0,02	±0,21	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,10	±0,65	±0,02	±5,32	±1,27	±6,06	±2,68	±0,00
	3,25	16,07	0,50	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	34,14	2,71	59,06	3,52	0,57	29,83	0,05
	3,55	16,21		0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	34,53	2,68	58,60	3,64	0,55	45,42	0,05
Média	3,40	16,14	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	34,33	2,69	58,83	3,58	0,56	37,63	0,05	
Desv.Pad.	±0,21	±0,10	±0,10	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,28	±0,02	±0,33	±0,09	±0,01	±11,03	±0,00	
LFM 483	4,27	16,57	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	37,43	0,00	59,08	3,11	0,38	45,77	-
	4,43	15,00		0,00	0,00	0,00	4,63	0,00	34,77	0,00	57,09	3,18	0,33	34,70	-
	Média	4,35	15,78	0,00	0,00	0,00	2,31	0,00	36,10	0,00	58,08	3,14	0,36	40,24	-
	Desv.Pad.	±0,12	±1,11	±0,00	±0,00	±0,00	±3,27	±0,00	±1,88	±0,00	±1,41	±0,05	±0,03	±7,83	-
	2,38	4,31	0,25	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	25,77	0,00	64,93	6,91	2,38	6,50	0,00
	1,82	6,76		0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	23,32	0,00	58,78	15,59	2,32	5,99	0,00
	Média	2,10	5,54	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	24,54	0,00	61,86	11,25	2,35	6,25	0,00
	Desv.Pad.	±0,40	±1,73	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±1,74	±0,00	±4,35	±6,13	±0,05	±0,36	±0,00
	2,37	4,00	0,50	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	23,91	0,00	57,29	16,14	2,66	4,83	0,00
	2,40	6,36		0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	28,83	0,00	62,47	5,51	3,19	4,55	0,00
Média	2,38	5,18	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	26,37	0,00	59,88	10,82	2,93	4,69	0,00	
Desv.Pad.	±0,02	±1,67	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±3,48	±0,00	±3,66	±7,51	±0,37	±0,20	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxivalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxioctanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 5 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 5. (conclusão)

.Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	3,57	12,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	33,74	0,00	62,68	3,39	0,19	52,58	-
	3,85	13,42		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	31,81	0,00	64,38	3,51	0,30	32,96	-
	Média	3,71	12,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	32,77	0,00	63,53	3,45	0,24	42,77	-
	Desv.Pad.	±0,20	±0,71	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±1,37	±0,00	±1,21	±0,08	±0,08	±13,87	-
LFM485	2,80	7,78	0,25	0,12	0,00	0,00	1,97	0,00	16,62	0,00	45,15	21,61	14,65	4,11	0,00
	2,48	7,04		0,12	0,00	0,00	2,48	0,00	16,67	0,00	51,87	24,59	4,39	3,79	0,00
	Média	2,64	7,41	0,12	0,00	0,00	2,22	0,00	16,65	0,00	48,51	23,10	9,52	3,95	0,00
	Desv.Pad.	±0,22	±0,52	±0,00	±0,00	±0,00	±0,36	±0,00	±0,03	±0,00	±4,75	±2,11	±7,25	±0,22	±0,00
	2,13	6,41	0,50	0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	17,76	0,00	51,92	25,88	4,44	3,50	0,00
	2,03	8,48		0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	30,88	0,00	63,02	4,60	1,51	7,02	0,00
	Média	2,08	7,45	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	24,32	0,00	57,47	15,24	2,97	5,26	0,00
	Desv.Pad.	±0,07	±1,46	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±9,28	±0,00	±7,84	±15,05	±2,07	±2,48	±0,00
	2,97	16,80	0,00	0,00	0,00	0,00	4,63	0,00	34,51	0,00	57,37	3,21	0,28	38,28	-
	5,12	15,53		0,00	0,00	0,00	4,37	0,00	34,07	0,00	58,50	2,72	0,33	47,47	-
	Média	4,04	16,16	0,00	0,00	0,00	4,50	0,00	34,29	0,00	57,93	2,96	0,31	42,87	-
	Desv.Pad.	±1,52	±0,90	±0,00	±0,00	±0,00	±0,18	±0,00	±0,31	±0,00	±0,80	±0,34	±0,04	±6,50	-
LFM487	2,48	11,98	0,25	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	18,03	0,00	54,75	14,00	13,21	10,95	0,00
	5,08	19,44		0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	35,07	0,00	62,92	1,81	0,20	39,20	0,00
	Média	3,78	15,71	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	26,55	0,00	58,84	7,90	6,71	25,08	0,00
	Desv.Pad.	±1,84	±5,28	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±12,04	±0,00	±5,78	±8,62	±9,20	±19,98	±0,00
	2,77	15,01	0,50	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	21,73	0,00	59,45	13,39	5,42	11,00	0,00
	1,32	13,29		0,30	0,00	0,00	0,00	0,00	29,01	0,00	65,60	4,22	1,17	13,95	0,00
	Média	2,04	14,15	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	25,37	0,00	62,53	8,81	3,30	12,47	0,00
	Desv.Pad.	±1,03	±1,22	±0,11	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±5,15	±0,00	±4,35	±6,49	±3,01	±2,08	±0,00

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcenoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 6 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 6. (continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
LFM046	7,05	17,28	0,00	0,00	0,00	0,00	4,04	0,00	33,22	0,00	60,82	1,19	0,73	25,37	-	
	4,23	10,57	0,25	0,30	0,00	0,00	3,66	0,61	28,81	1,15	60,97	4,40	0,39	23,22	0,03	
	7,25	11,81	0,50	0,56	0,00	0,00	0,00	4,82	29,61	2,82	55,52	5,81	1,41	12,07	0,05	
	6,60	16,04		0,40	0,00	0,00	0,00	0,00	27,53	7,41	58,62	5,42	1,02	18,19	0,10	
	Média	6,93	13,93		0,48	0,00	0,00	0,00	2,41	28,57	5,12	57,07	5,62	1,22	15,13	0,08
	Desv.Pad.	±0,46	±2,99		±0,11	±0,00	±0,00	±0,00	±3,41	±1,47	±3,25	±2,19	±0,28	±0,28	±4,32	±0,03
LFM 488	5,57	16,40	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	38,82	0,00	53,30	5,23	2,33	21,99	-	
	6,07	12,50		0,00	0,00	0,00	6,04	0,00	38,39	0,00	47,74	5,35	2,48	19,62	-	
	Média	5,82	14,45		0,00	0,00	0,00	3,02	1,16	37,61	0,00	50,52	5,29	2,40	20,81	-
	Desv.Pad.	±0,35	±2,76		±0,00	±0,00	±0,00	±4,27	±1,64	±1,11	±0,00	±3,94	±0,08	±0,11	±1,67	-
	5,23	14,99	0,25	0,23	0,00	0,00	3,86	0,00	28,42	0,00	59,25	7,17	1,29	17,62	0,00	
	6,53	13,21		0,26	0,00	0,00	4,67	0,00	31,49	0,00	57,69	4,78	1,37	26,67	0,00	
Média	5,88	14,10		0,24	0,00	0,00	4,27	0,00	29,96	0,00	58,47	5,98	1,33	22,15	0,00	
Desv.Pad.	±0,92	±1,25		±0,02	±0,00	±0,00	±0,57	±0,00	±2,17	±0,00	±1,11	±1,69	±0,05	±6,40	±0,00	
4,45	7,78	0,50	0,09	0,00	0,00	3,33	0,00	24,97	0,00	54,09	14,16	3,45	11,79	0,00		
4,08	8,35		0,10	0,00	0,00	3,55	0,00	26,21	0,00	55,93	10,46	3,85	9,35	0,00		
Média	4,27	8,06		0,10	0,00	0,00	3,44	0,00	25,59	0,00	55,01	12,31	3,65	10,57	0,00	
Desv.Pad.	±0,26	±0,40		±0,01	±0,00	±0,00	±0,15	±0,00	±0,88	±0,00	±1,30	±2,61	±0,28	±1,72	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcenoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 6 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 6. (conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	5,13	11,50	0,00	0,00	0,00	0,00	3,75	0,00	26,83	0,00	63,34	5,16	0,92	21,28	-
	5,37	13,25		0,00	0,00	0,00	0,93	0,00	27,09	0,00	62,61	7,87	1,50	18,34	-
	Média	5,25	12,38	0,00	0,00	0,00	2,34	0,00	26,96	0,00	62,98	6,52	1,21	19,81	-
	Desv.Pad.	±0,16	±1,23	±0,00	±0,00	±0,00	±2,00	±0,00	±0,19	±0,00	±0,52	±1,92	±0,41	±2,08	-
LFM489	4,33	14,54	0,25	0,27	0,00	0,00	3,57	0,00	26,51	0,00	63,45	5,68	0,80	19,95	0,00
	3,27	13,46		0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	27,84	0,00	63,82	7,33	1,01	21,50	0,00
	Média	3,80	14,00	0,19	0,00	0,00	1,78	0,00	27,17	0,00	63,63	6,51	0,90	20,73	0,00
	Desv.Pad.	±0,75	±0,76	±0,11	±0,00	±0,00	±2,52	±0,00	±0,94	±0,00	±0,26	±1,16	±0,15	±1,09	±0,00
	3,12	6,50	0,50	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	11,29	0,00	51,92	31,53	5,26	2,76	0,00
	3,60	4,73		0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	16,46	0,00	53,69	26,18	3,67	3,23	0,00
	Média	3,36	5,61	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	13,88	0,00	52,81	28,85	4,46	3,00	0,00
	Desv.Pad.	±0,34	±1,25	±0,09	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±3,65	±0,00	±1,25	±3,78	±1,13	±0,33	±0,00
	5,92	15,30	0,00	0,00	0,00	0,00	5,21	0,00	34,53	0,00	55,60	4,27	0,40	22,52	-
	7,27	17,10		0,00	0,00	0,00	5,25	0,00	35,38	0,00	53,93	5,03	0,41	30,51	-
	Média	6,59	16,20	0,00	0,00	0,00	5,23	0,00	34,95	0,00	54,76	4,65	0,41	26,51	-
	Desv.Pad.	±0,95	±1,27	±0,00	±0,00	±0,00	±0,03	±0,00	±0,60	±0,00	±1,18	±0,54	±0,01	±5,65	-
LFM490	6,03	16,55	0,25	0,22	0,00	0,00	5,02	0,34	33,37	1,07	55,09	4,63	0,48	28,42	0,02
	6,65	13,94		ND	0,00	0,00	3,77	0,23	30,47	0,89	58,10	6,19	0,37	24,83	ND
	Média	6,34	15,24	0,22	0,00	0,00	4,39	0,28	31,92	0,98	56,59	5,41	0,42	26,63	0,02
	Desv.Pad.	±0,44	±1,85	-	±0,00	±0,00	±0,89	±0,08	±2,05	±0,13	±2,13	±1,10	±0,08	±2,54	-
	5,45	16,36	0,50	0,01	0,00	0,00	4,65	0,54	31,12	1,55	56,65	5,15	0,34	29,04	0,03
	3,93	16,08		ND	0,00	0,00	5,78	2,86	30,64	1,58	54,97	3,85	0,32	24,78	ND
	Média	4,69	16,22	0,01	0,00	0,00	5,22	1,70	30,88	1,56	55,81	4,50	0,33	26,91	0,03
	Desv.Pad.	±1,07	±0,20	-	±0,00	±0,00	±0,80	±1,64	±0,34	±0,02	±1,19	±0,92	±0,01	±3,01	-

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxicvalerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato; 3HDD – 3-hidroxidodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxidodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxialcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 7 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 7. (continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
LFM046	3,47	15,04	0,00	0,00	0,00	0,00	5,26	0,00	36,98	0,00	54,05	3,16	0,55	26,50	-
	3,12	14,73		0,00	0,00	0,00	4,99	0,00	34,90	0,00	53,44	5,17	1,50	25,27	-
	Média	3,29	14,88	0,00	0,00	0,00	5,13	0,00	35,94	0,00	53,75	4,16	1,02	25,89	-
	Desv.Pad.	±0,25	±0,22	±0,00	±0,00	±0,00	±0,19	±0,00	±1,47	±0,00	±0,43	±1,42	±0,67	±0,87	-
	2,82	15,08	0,25	0,39	0,00	0,00	5,15	0,36	34,98	0,95	52,83	4,78	0,95	22,98	0,01
	3,83	16,03		0,39	0,00	0,00	0,00	3,15	34,15	0,86	55,69	5,19	0,95	25,20	0,05
Média	3,33	15,55	0,39	0,00	0,00	2,58	1,76	34,57	0,90	54,26	4,99	0,95	24,09	0,03	
Desv.Pad.	±0,72	±0,68	±0,00	±0,00	±0,00	±3,64	±1,98	±0,58	±0,06	±2,03	±0,29	±0,00	±1,57	±0,03	
LFM 495	3,80	16,75	0,50	0,52	0,00	0,00	0,00	4,14	31,58	1,84	54,92	6,55	0,98	24,01	0,05
	3,70	12,58		0,49	0,00	0,00	0,00	6,94	32,77	1,83	51,31	6,44	0,73	16,53	0,05
	Média	3,75	14,66	0,50	0,00	0,00	0,00	5,54	32,18	1,83	53,11	6,49	0,85	20,27	0,05
	Desv.Pad.	±0,07	±2,94	±0,02	±0,00	±0,00	±0,00	±1,98	±0,84	±0,01	±2,55	±0,08	±0,18	±5,29	±0,00
	1,75	2,16	0,00	0,00	0,00	0,00	1,67	0,00	12,41	0,00	51,54	30,24	4,13	9,31	-
	2,47	9,15		0,00	0,00	0,00	2,35	0,00	19,38	0,00	62,12	13,75	2,40	11,33	-
Média	2,11	5,65	0,00	0,00	0,00	2,01	0,00	15,90	0,00	56,83	21,99	3,26	10,32	-	
Desv.Pad.	±0,51	±4,95	±0,00	±0,00	±0,00	±0,48	±0,00	±4,93	±0,00	±7,48	±11,66	±1,23	±1,43	-	
LFM 495	1,42	5,03	0,25	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	34,14	56,67	9,20	2,82	0,00
	1,55	4,88		0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	47,75	46,26	5,99	2,28	0,00
	Média	1,48	4,96	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,94	51,46	7,59	2,55	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±0,11	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±9,63	±7,36	±2,27	±0,38	±0,00
	1,25	5,69	0,50	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	46,48	45,09	8,44	2,38	0,00
	1,40	6,13		0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	40,60	37,97	21,43	2,93	0,00
Média	1,33	5,91	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	43,54	41,53	14,93	2,65	0,00	
Desv.Pad.	±0,11	±0,31	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,16	±5,03	±9,19	±0,39	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HHp – 3-hidroxieptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxinonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 7 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 7. (conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)
	4,37	15,29	0,00	0,00	0,00	0,00	5,16	0,00	35,45	0,00	55,92	2,87	0,60	31,58	-
	4,00	15,69		0,00	0,00	0,00	4,89	0,00	34,43	0,00	54,67	4,98	1,03	32,53	-
	Média	4,18	15,49	0,00	0,00	0,00	5,02	0,00	34,94	0,00	55,29	3,93	0,81	32,06	-
	Desv.Pad.	±0,26	±0,28	±0,00	±0,00	±0,00	±0,19	±0,00	±0,72	±0,00	±0,89	±1,49	±0,31	±0,67	-
	LFM496	1,78	8,71	0,25	0,21	0,00	0,00	3,42	0,00	26,34	0,00	52,33	16,62	1,29	14,67
2,87		8,13	0,15		0,00	0,00	3,69	0,00	29,00	0,00	57,96	8,20	1,15	10,13	0,00
Média		2,33	8,42	0,18	0,00	0,00	3,56	0,00	27,67	0,00	55,14	12,41	1,22	12,40	0,00
Desv.Pad.		±0,77	±0,41	±0,04	±0,00	±0,00	±0,19	±0,00	±1,88	±0,00	±3,98	±5,95	±0,10	±3,21	±0,00
		2,32	6,49	0,50	0,29	0,00	0,00	3,38	0,00	28,34	0,00	57,93	8,25	2,10	12,85
	2,18	7,21	0,46		0,00	0,00	3,47	0,00	26,96	0,00	57,89	8,84	2,83	13,52	0,00
	Média	2,25	6,85	0,37	0,00	0,00	3,43	0,00	27,65	0,00	57,91	8,54	2,46	13,19	0,00
	Desv.Pad.	±0,09	±0,50	±0,13	±0,00	±0,00	±0,06	±0,00	±0,97	±0,00	±0,03	±0,42	±0,52	±0,47	±0,00
	LFM499	3,90	15,29	0,00	0,00	0,00	0,00	4,91	0,00	35,63	0,00	55,38	3,60	0,49	30,88
2,23		14,97	0,00		0,00	0,00	4,79	0,00	34,65	0,00	53,32	6,50	0,74	29,55	-
Média		3,07	15,13	0,00	0,00	0,00	4,85	0,00	35,14	0,00	54,35	5,05	0,61	30,22	-
Desv.Pad.		±1,18	±0,23	±0,00	±0,00	±0,00	±0,08	±0,00	±0,69	±0,00	±1,45	±2,05	±0,18	±0,94	-
		2,07	8,66	0,25	0,26	0,00	0,00	3,50	0,00	25,21	0,00	52,07	16,83	2,39	11,10
	2,02	7,59	0,14		0,00	0,00	3,70	0,00	28,21	0,00	56,95	9,02	2,12	13,00	0,00
	Média	2,04	8,13	0,20	0,00	0,00	3,60	0,00	26,71	0,00	54,51	12,93	2,26	12,05	0,00
	Desv.Pad.	±0,04	±0,76	±0,08	±0,00	±0,00	±0,14	±0,00	±2,12	±0,00	±3,45	±5,52	±0,19	±1,34	±0,00
		2,07	9,02	0,50	0,56	0,00	0,00	3,39	0,00	26,73	0,00	56,65	11,21	2,02	10,27

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcenoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbon

Tabela 8 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 8. (continua)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
LFM046	4,35	17,45	0,00	0,00	0,00	0,00	4,19	0,00	29,97	0,00	46,30	16,23	3,31	68,54	-	
	4,38	16,71		0,00	0,00	0,00	5,07	0,00	35,51	0,00	54,05	3,29	2,08	40,05	-	
	Média	4,37	17,08	0,00	0,00	0,00	4,63	0,00	32,74	0,00	50,17	9,76	2,69	54,29	-	
	Desv.Pad.	±0,02	±0,52	±0,00	±0,00	±0,00	±0,62	±0,00	±3,92	±0,00	±5,48	±9,15	±0,87	±20,15	-	
		4,23	17,30	0,25	0,27	0,00	0,00	5,73	0,31	37,15	0,31	51,42	2,89	2,19	37,00	0,02
		4,03	16,97	0,50	0,33	0,00	0,00	4,90	0,99	32,36	0,57	56,10	3,01	2,09	56,03	0,05
		2,90	15,57		0,45	0,00	0,00	1,87	0,79	12,18	1,75	33,84	0,00	49,57	21,21	0,01
		Média	3,47	16,27	0,39	0,00	0,00	3,38	0,89	22,27	1,16	44,97	1,50	25,83	38,62	0,03
		Desv.Pad.	±0,80	±0,99	±0,09	±0,00	±0,00	±2,14	±0,14	±14,27	±0,83	±15,74	±2,13	±33,58	±24,62	±0,02
	LFM 500	4,07	18,29	0,00	0,00	0,00	0,00	4,67	0,00	33,61	0,00	56,05	3,20	2,48	68,81	-
4,23		16,75	0,00		0,00	0,00	2,88	0,00	17,53	0,00	32,77	42,61	4,21	10,39	-	
Média		4,15	17,52	0,00	0,00	0,00	3,77	0,00	25,57	0,00	44,41	22,90	3,34	39,60	-	
Desv.Pad.		±0,12	±1,09	±0,00	±0,00	±0,00	±1,27	±0,00	±11,36	±0,00	±16,46	±27,86	±1,23	±41,31	-	
		1,75	10,74	0,25	0,00	0,00	0,00	2,71	0,00	13,16	0,00	31,26	45,57	7,30	13,19	0,00
		1,77	ND		0,00	0,00	0,00	3,20	0,00	15,41	0,00	39,04	32,55	9,81	10,80	0,00
		Média	1,76	10,74	0,00	0,00	0,00	2,95	0,00	14,29	0,00	35,15	39,06	8,55	12,00	0,00
		Desv.Pad.	±0,01	-	±0,00	±0,00	±0,00	±0,34	±0,00	±1,59	±0,00	±5,50	±9,21	±1,77	±1,69	±0,00
		1,73	7,76	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	8,21	0,00	59,26	0,00	32,54	3,56	0,00
		1,77	7,46		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,47	0,00	13,46	77,42	6,65	13,19	0,00
	Média	1,75	7,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	5,34	0,00	36,36	38,71	19,59	8,38	0,00	
	Desv.Pad.	±0,02	±0,21	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±4,05	±0,00	±32,39	±54,75	±18,31	±6,81	±0,00	

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcanoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono

Tabela 8 - Teor e composição de PHA produzido por *Pseudomonas* sp. LFM046 e seus mutantes e fator de conversão de propionato em monômeros ímpares no Ensaio 8. (conclusão)

Linhagem Bacteriana	Xt (g/L)	Glicose (g/L)	C3 forn. (g/L)	C3 cons. (g/L)	3HB (mol%)	3HV (mol%)	3HHx (mol%)	3HHp (mol%)	3HO (mol%)	3HN (mol%)	3HD (mol%)	3HDD (mol%)	3HDDΔ5 (mol%)	PHA (%MSC)	YHAI/P (mol/mol)	
LFM501	2,12	11,13	0,00	0,00	0,00	0,00	3,25	0,00	21,86	0,00	63,62	5,82	5,45	19,50	-	
	2,02	8,74		0,00	0,00	0,00	1,56	0,00	6,63	0,00	26,43	57,90	7,48	11,20	-	
	Média	2,07	9,93	0,00	0,00	0,00	2,40	0,00	14,24	0,00	45,03	31,86	6,47	15,35	-	
	Desv.Pad.	±0,07	±1,69	±0,00	±0,00	±0,00	±1,19	±0,00	±10,77	±0,00	±26,30	±36,83	±1,44	±5,87	-	
	1,23	4,29	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,81	64,13	17,06	7,46	0,00
	1,38	8,41		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	27,03	47,27	25,70	4,51	0,00
Média	1,31	6,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	22,92	55,70	21,38	5,98	0,00	
Desv.Pad.	±0,11	±2,92	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±5,81	±11,92	±6,11	±2,08	±0,00	
IP18	1,37	8,54	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	14,59	75,62	9,78	7,08	0,00	
	1,43	4,96		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	1,87	0,00
	Média	1,40	6,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	57,30	37,81	4,89	4,48	0,00	
	Desv.Pad.	±0,05	±2,53	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±60,39	±53,47	±6,92	±3,68	±0,00	
	4,08	15,83	0,00	0,00	0,00	0,00	4,45	0,00	31,85	0,00	55,81	3,32	4,57	13,13	-	
	4,15	16,05		0,00	0,00	0,00	2,63	0,00	15,28	0,00	25,03	1,63	55,43	14,79	-	
Média	4,12	15,94	0,00	0,00	0,00	3,54	0,00	23,56	0,00	40,42	2,47	30,00	13,96	-		
Desv.Pad.	±0,05	±0,16	±0,00	±0,00	±0,00	±1,29	±0,00	±11,72	±0,00	±21,77	±1,19	±35,97	±1,17	-		
IP18	3,12	12,29	0,25	0,22	0,00	0,00	0,60	0,00	9,37	0,00	21,80	64,60	3,62	38,28	0,00	
	3,95	15,43		0,20	0,00	0,00	3,99	0,00	25,04	0,00	47,57	17,51	5,89	11,31	0,00	
	Média	3,53	13,86	0,21	0,00	0,00	2,30	0,00	17,21	0,00	34,69	41,06	4,75	24,80	0,00	
	Desv.Pad.	±0,59	±2,22	±0,02	±0,00	±0,00	±2,39	±0,00	±11,08	±0,00	±18,22	±33,30	±1,60	±19,07	±0,00	
	2,50	12,59	0,50	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	9,96	0,00	23,80	59,70	6,53	17,77	0,00	
	2,47	16,76		0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	11,14	0,00	41,19	36,58	11,09	13,81	0,00	
Média	2,48	14,68	0,32	0,00	0,00	0,00	0,00	10,55	0,00	32,49	48,14	8,81	15,79	0,00		
Desv.Pad.	±0,02	±2,95	±0,07	±0,00	±0,00	±0,00	±0,00	±0,83	±0,00	±12,29	±16,35	±3,22	±2,80	±0,00		

Xt – massa seca celular; Glicose – consumo de glicose; C3 forn – ácido propiônico fornecido; C3 cons. - ácido propiônico consumido; 3HB – 3-hidroxi butirato; 3HV – 3-hidroxi valerato; 3HHx – 3-hidroxi hexanoato; 3HHp – 3-hidroxi heptanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HN – 3-hidroxi nonanoato; 3HD – 3-hidroxi decanoato; 3HDD – 3-hidroxi dodecanoato; 3HDDΔ5 – 3-hidroxi dodecanoatoΔ5; mol% - número de mols de monômeros; PHA – polihidroxi alcenoatos; YHAI/P – fator de conversão do ácido propiônico em monômeros contendo número ímpar de carbono