

**EDMAR RAMOS DE OLIVEIRA FILHO**

**CONSTRUÇÃO DE MUTANTES DE *Pseudomonas* ABRIGANDO  
DIFERENTES PHA SINTASES EM SEU GENOMA, PARA PRODUÇÃO DE  
3HB-co-3HAMCL**

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 Ciências.

São Paulo  
2016

**EDMAR RAMOS DE OLIVEIRA FILHO**

**CONSTRUÇÃO DE MUTANTES DE *Pseudomonas* ABRIGANDO  
DIFERENTES PHA SINTASES EM SEU GENOMA, PARA PRODUÇÃO DE  
3HB-co-3HAMCL**

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 Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo  
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira-Filho, Edmar Ramos

Construção de mutantes de *Pseudomonas* abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma, para produção de 3HB-co-3HAMCL / Edmar Ramos Oliveira-Filho; orientadora Luiziana Ferreira Silva. -- São Paulo, 2016.

114 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Pseudomonas* sp.. 2. PHA sintase. 3. Polihidroxialcanoatos. 4. Biopolímeros. 5. mini-Tn7.  
I. Silva, Luiziana Ferreira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato: Edmar Ramos de Oliveira Filho

Título da Dissertação: Construção de mutantes de *Pseudomonas* abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma, para produção de 3HB-co-3HA<sub>MCL</sub>

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o candidato:

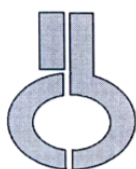
(    ) **Aprovado(a)**                      (    ) **Reprovado(a)**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:          Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **693/14** referente ao projeto intitulado: “*Construção de mutantes de Pseudomonas abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma, para produção de 3HB-co-3HAMCL*” sob a responsabilidade de **Edmar Ramos de Oliveira Filho**, 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 utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 21 de agosto de 2014.

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

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

*A meu pai,  
por uma vida de dedicação aos meus estudos.*

## AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Luiziana Ferreira da Silva pela orientação, confiança, incentivos e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Doutor José Gregório Cabrera Gomez pela orientação, apoio, críticas, sugestões e todos os ensinamentos passados.

Ao Doutor Pablo Iván Nickel pela prontidão, ajuda e orientação recebida na fase final deste trabalho.

À Doutora Marilda Keico Taciro por ter me aberto as portas do Laboratório de Bioprodutos e pelo carinho.

À Linda Guamán por todos os ensinamentos, paciência, companheirismo e toda sua dedicação.

À Doutora Thatiane Mendonça pela amizade, companhia e sugestões.

Ao Henrique Oliveira pela amizade e ajuda na finalização deste texto.

A todos os amigos que ganhei no Laboratório de Bioprodutos, em especial Aline Lemos, Aelson Santos, Thandara Ravelli, Letícia Veloso, Amanda Flora, Gabriela Sakalauskas, Jhoanne Hansen, Juliano Cherix, Karen Almeida, Vânia Novello, Juan Camilo, Marina Marone, Arthur Umeda, Matheus Arjona, Felipe Morillo, Andreas Silva, Mireia Recio, Juliana Cardinali e Kaique Josuel.

Aos familiares e amigos que me apoiaram em todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida (Processo FAPESP 2014/15448-0).

## RESUMO

OLIVEIRA, E. R. **Construção de mutantes de *Pseudomonas* abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma, para produção de 3HB-co-3HAMCL**. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Polihidroxialcanoatos (PHA) são biopolímeros naturalmente produzidos e acumulados por diversos organismos, como bactérias, archaeas e alguns eucariontes, como fungos e leveduras. São materiais termoplásticos, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, exibindo grande potencial para substituir plásticos produzidos a partir de recursos não renováveis. Copolímeros híbridos de PHA, que podem ser formados por monômeros de cadeia curta e média, como P(3HASCL-co-3HAMCL), apresentam características físico-químicas diferenciadas, semelhantes às dos plásticos derivados de petróleo, sendo por isso interessantes para a indústria de materiais. A PHA sintase é considerada a enzima chave na síntese de PHA, responsável por catalisar a polimerização de diferentes monômeros de (*R*)-hidroxiacil-CoA, influenciando a composição monomérica do polímero formado. Sistemas de recombinação baseados em transposons bacterianos são explorados como ferramentas moleculares para inserção de sequências gênicas no cromossomo de bactérias Gram-negativas. Por exemplo, elementos mini-Tn7 podem ser prontamente transferidos para a construção de cepas recombinantes. No presente trabalho, é apresentada a construção de diferentes linhagens recombinantes a partir de *Pseudomonas* sp. LFM046 e LFM461, abrigando em seus cromossomos genes de PHA sintase de *Ralstonia eutropha*, *Aeromonas hydrophila* ou *Aeromonas* sp. TSM 81. Clones candidatos foram triados quanto a inserção das sequências de interesse em seu cromossomo, sendo os positivos avaliados em relação à capacidade de produção de PHA em ensaios em agitador rotativo, com glicose como única fonte de carbono. Um dos recombinantes obtidos se mostrou produtor do copolímero P(3HB-co-3HHx-co-3HD), acumulando aproximadamente 2% de sua massa seca celular na forma de PHA.

**Palavras-chave:** *Pseudomonas* sp. PHA sintase. Polihidroxialcanoatos. Biopolímeros. Mini-Tn7.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, E. R. **Construction of recombinant *Pseudomonas* strains harboring different PHA synthases in its genome to produce 3HB-co-3HAMCL**. 2016. 114 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biopolymers naturally produced and accumulated by many organisms such as bacteria, archaeas and some eukaryotes, such as fungi and yeasts. As thermoplastics, biodegradable, biocompatible and possibly made from renewable resources, they exhibit great potential to replace oil-derived plastics. Hybrid PHA copolymers can be formed by short and medium-chain monomers, P(3HASCL-co-3HAMCL), and present industry desired physicochemical properties, becoming similar to conventional oil-based plastics. PHA synthase is the key enzyme in PHA biosynthesis, responsible for catalyzing the polymerization of (*R*)-hydroxyacyl-CoA molecules, influencing polymer monomeric composition. Tn7-based recombination strategies represent powerful molecular tools designed for gene delivery in Gram-negative bacteria, as mini-Tn7 elements can be readily transferred to recombinants production. In this work, its presented the constructions of recombinant *Pseudomonas* strains harboring PHA synthase genes from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas* strains in specific sites of its chromosome, and the production of P(3HB-co-3HHx-co-3HD). Obtained clones were screened to confirm chromosomic insertion of the *phaC* sequences. Positive clones PHA production and composition were evaluated in shaken-flasks assays using glucose as the only carbon source. One of the constructed recombinants accumulated P(3HB-co-3HHx-co-3HD), corresponding about to 2% of its Cell Dry Weight as PHA.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp. PHA synthase. Polyhydroxyalkanoates. Biopolymers. Mini-Tn7.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Células bacterianas contendo grânulos intracelulares de PHA. (Fonte: iGEM 2009 Duke Team - 2009.igem.org/Team:Duke). .....22
- Figura 2** - Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA (Fonte: Gomez, 2000).....24
- Figura 3** - Classificação das enzimas PhaC em quatro classes (Fonte: Rehm, 2003). .....24
- Figura 4** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm + promotor *phaPCJ<sub>Ah</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 29:** clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B); **C+**. Controle positivo (uso de DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*).....51
- Figura 5** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm::promotor + *phaC<sub>Ah</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **6 a 22:** clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B); **C+**. Controle positivo (uso de DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*).....52
- Figura 6** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm::promotor + *phaC<sub>Asp</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 13:** clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B). Não há controle positivo por se tratar da construção de um DNA recombinantes de espécies diferentes. ....52
- Figura 7** - Perfil eletroforético dos produtos de digestão simples com a enzima de restrição *HindIII*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1.** pUC18T-miniTn7T-Gm digerido com *HindIII*. **2.** pUC1818T-miniTn7T-Gm::*PphaPCJ<sub>Ah</sub>* digerido com *HindIII*; **3.** pUC18T-miniTn7T-Gm::*PphaPCJ<sub>Ah</sub>+phaC<sub>Ah</sub>* digerido com *HindIII*. Na imagem, observa-se que o tamanho dos plasmídeos com o inserto (canaletas 2 e 3) é maior que o plasmídeo vazio (canaleta 1), assim como esperado.....52

**Figura 8** - Perfil eletroforético dos produtos de digestão usados para confirmação da clonagem da sequência *phaC<sub>Re</sub>* em pBAMD1-6. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb; **1.** pBAMD1-6 não digerido; **2.** pBAMD 1-6 + *HindIII*; **3.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* não digerido; **4.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *BamHI*; **5.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *HindIII*; **6.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *BamHI/HindIII*. .....53

**Figura 9** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaC<sub>Re</sub>*, construído para transferir a sequência *phaC<sub>Re</sub>* para o genoma de *Pseudomonas*. .....54

**Figura 10** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaC<sub>Ah</sub>*, construído para transferir a sequência *phaC<sub>Ah</sub>*, juntamente com sua sequência promotora original para o genoma de *Pseudomonas*. .....54

**Figura 11** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaC<sub>Asp</sub>*, construído para transferir a sequência *phaC<sub>Asp</sub>*, juntamente com a sequência promotora da linhagem *Aeromonas hydrophila* para o genoma de *Pseudomonas*. .....55

**Figura 12** - Vetor de recombinação ao acaso pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>*, construído para inserção da sequência *phaC<sub>Re</sub>* em *Pseudomonas*. .....55

**Figura 13** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM046 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Re</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1.** Controle negativo; **2.** Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Ralstonia eutropha*); **3 a 6.** Clones candidatos. ....57

**Figura 14** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Re</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 8.** Clones candidatos; **9.** Controle negativo; **10.** Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Ralstonia eutropha*). .....57

**Figura 15** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM046 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Ah</sub>*, juntamente com sua sequência promotora original. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **C+**.

Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*); **1 a 3**. Clones candidatos. .... 57

**Figura 16** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Ah</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*); **1 e 2**. Clones candidatos. .... 58

**Figura 17** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Asp</sub>* a jusante da sequência promotora do operon *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como DNA molde plasmídeo construído em etapa anterior); **1 a 5**. Clones candidatos. .... 58

**Figura 18** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com um dos clones candidatos obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Re</sub>* por meio do sistema mini-Tn5. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como DNA molde plasmídeo construído em etapa anterior); **1**. Clone candidato. .... 58

**Figura 19** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com os recombinantes obtidos, resistentes e não resistentes à gentamicina, usando iniciadores desenhados para amplificação de bases inseridas entre as sequências Tn7R e Tn7L. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **1**. 046::*phaC<sub>Ah</sub>* Gm<sup>r</sup>; **2**. 046::*phaC<sub>Ah</sub>* Gm<sup>s</sup>; **3**. 461::*phaC<sub>Ah</sub>* Gm<sup>r</sup>; **4**. 461::*phaC<sub>Ah</sub>* Gm<sup>s</sup>; **5**. 461::*phaC<sub>Asp</sub>* Gm<sup>r</sup>; **6**. 461::*phaC<sub>Asp</sub>* Gm<sup>s</sup>. Linhagens Gm<sup>s</sup> apresentaram amplicon 500 pb menor que o de linhagens Gm<sup>r</sup>, assim como esperado. .... 59

**Figura 20.** Composição (em mol%) dos PHA produzidos por LFM046 e 046::*phaC<sub>Ah</sub>* a partir de glicose. .... 65

**Figura 21.** Composição (em mol%) dos PHA produzidos por LFM461 e 461::*phaC<sub>Ah</sub>* a partir de glicose. .... 66

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros (adaptado de Sudesh; Abe; Doi, 2000). .....27
- Tabela 2** - Linhagens bacterianas e vetores plasmidiais utilizados e produzidos neste trabalho. ....39
- Tabela 3** - Antibióticos utilizados e concentrações finais no meio de cultura.....42
- Tabela 4** - Iniciadores desenhados para amplificação das diferentes sequências de interesse por *PCR*. Os nucleotídeos em letra minúscula correspondem às regiões dos iniciadores não complementares ao DNA molde usado. O trecho sublinhado corresponde à sequência de restrição da enzima utilizada nos procedimentos de clonagem. Estão indicados o tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de bases). .....43
- Tabela 5** - Temperaturas de anelamento utilizadas nas reações de amplificação por *PCR*, para cada um dos fragmentos de DNA de interesse. ....51
- Tabela 6** - Médias das concentrações iniciais e finais (após 72 horas de experimento) de glicose em cada linhagem em ensaio de acúmulo de PHA. O desvio padrão dos valores da quantidade consumida está indicado. Os dados se referem à triplicata biológica e duplicata analítica. ....61
- Tabela 7** - Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes de *Pseudomonas*. São mostradas as médias e desvios padrão obtidos de triplicata biológica e duplicata analítica dos seguintes dados: pH final do cultivo (após 72 h), massa seca celular (MSC em g/L), quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%. .....63
- Tabela 8** - Acúmulo de copolímeros híbridos de PHA em linhagens recombinantes obtidas neste trabalho em comparação com a literatura.....69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PHA – polihidroxicanoatos

HA<sub>SCL</sub> – 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *short chain length*)

HA<sub>MCL</sub> – 3-hidroxiacil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *medium chain length*)

PhaC – enzima PHA sintase

HA – hidroxiacil-CoA

PhaE – subunidade da enzima PHA sintase de classe III

3HB – 3-hidroxi-β-butilirato

4HB – 4-hidroxi-β-butilirato

3HV – 3-hidroxi-β-valerato

3HHx – 3-hidroxi-β-hexanoato

3HHp – 3-hidroxi-β-heptanoato

3HO – 3-hidroxi-β-octanoato

3H4MV – 3-hidroxi-4-metilvalerato

PET – polietileno tereftalato

HDPE – polietileno de alta densidade

LDPE – polietileno de baixa densidade

T<sub>M</sub> – temperatura de fusão

T<sub>G</sub> – temperatura de transição vítrea

PHA<sub>MCL</sub> – polihidroxicanoatos com monômeros de cadeia média

P(3HB) – poli-3-hidroxi-β-butilirato

P(HA<sub>SCL</sub>-*co*-HA<sub>MCL</sub>) – polímero formado por monômeros de cadeia curta e média

PHA<sub>SCL</sub> – polihidroxicanoato com monômeros de cadeia curta

P(3HB-*co*-3HA<sub>MCL</sub>) – poli(3-hidroxi-β-butilirato-*co*-monômeros de cadeia média)

P(3HB-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxi-β-butilirato-*co*-3-hidroxi-β-hexanoato)

LFM – Laboratório de Fisiologia de Microrganismos

UV – ultra-violeta

PHA<sup>-</sup> – linhagem deficiente no acúmulo de polihidroxicanoatos

P(3HB-*co*-3HHx-*co*-3HO) – poli(3-hidroxi-β-butilirato-*co*-3-hidroxi-β-hexanoato-*co*-3-hidroxi-β-octanoato)

Tn7 – transposon bacteriano Tn7

Tn5 – transposon bacteriano Tn5

DNA – ácido desoxirribonucleico

*attTn7* – sítio de reconhecimento do transposon Tn7  
TnsD – proteína de transposição D  
TnsC – proteína de transposição C  
TnsA – proteína de transposição A  
TnsB – proteína de transposição B  
OE – *outside end*  
IE – *inside end*  
Tnp – proteína transposase  
Inh – proteína inibitória de transposição  
IS – sequências invertidas, do inglês *inverted sequences*  
P(3HB-*co*-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-*co*-3hidroxivalerato)  
PhaF – proteína regulatória associada ao grânulo de PHA  
IL-2 – interleucina 2  
MOG – glicoproteína da mielina de oligodendrócitos, do inglês *myelin oligodendrocyte glycoprotein*  
PhaC-GFP – proteína quimérica PHA sintase associada a proteína verde fluorescente  
LacZ – proteína  $\beta$ -galactosidase  
PhaC1 – enzima PHA sintase  
IgG – imunoglobulina G  
scFv – fragmento variável de cadeia simples, do inglês *single-chain variable fragment*  
GFP – proteína verde fluorescente, do inglês *green fluorescent protein*  
OpdA – proteína fosfotriesterase  
NemA – proteína *N*-etilmaleimida redutase  
ATCC – *American Type Cell Culture*  
Amp<sup>r</sup> – resistência à ampicilina  
Tet<sup>r</sup> – resistência à tetraciclina  
*PphaPCJ<sub>Ah</sub>* – sequência promotora do operon de síntese de PHA de *Aeromonas hydrophila*  
Gm<sup>r</sup> – resistência à gentamicina  
PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*  
TAE – tampão Tris-base, Ácido acético e EDTA  
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético  
LB – Luria Bertani

Flp-FRT – sistema Flp-recombinase associado a sítio de reconhecimento de flipase (do inglês *Flippase Recognition Target*)

MM – Meio Mineral

Gm<sup>s</sup> – sensibilidade à gentamicina

P(3HB-*co*-3H2MB) – poli(3-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-metilbutirato)

MSC – Massa seca celular

P(3HB-*co*-3H2MB-*co*-3HV-*co*-3HHx) – poli(3-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-metilbutirato-*co*-3-hidroxi-2-metilbutirato)

5'-UTR – região 5' não traduzida do DNA (do inglês *untranslated region*)

mRNA – RNA mensageiro

RBS – Sítio de ligação ao ribossomo (do inglês *Ribosome binding site*)

RNA – Ácido ribonucleico



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>21</b>
2.1	Polihidroxicanoatos, polímeros biodegradáveis .....	21
2.2	A enzima PHA sintase (PhaC) .....	23
2.3	Uso de <i>Pseudomonas</i> na produção de PHA .....	29
2.4	Sistemas de recombinação baseados nos transposons Tn7 e Tn5 .....	31
2.5	Potenciais usos de PHA sintases .....	33
2.6	Empresas produtoras de PHA .....	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
3.1	Objetivo geral.....	38
3.2	Objetivos específicos.....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Microrganismos, plasmídeos e condições de cultivo.....	39
4.2	Obtenção de linhagens recombinantes .....	42
4.2.1	Manipulação de DNA .....	42
4.2.2	Amplificação de genes de interesse por PCR.....	42
4.2.3	Construção de plasmídeos recombinantes .....	44
4.2.4	Transferência de plasmídeos recombinantes para linhagens hospedeiras .....	44
4.2.5	Recombinação sítio específica em <i>Pseudomonas</i> .....	45
4.2.6	Confirmação da inserção dos fragmentos no cromossomo de <i>Pseudomonas</i> .....	45
4.2.7	Excisão da Marca de Resistência à Gentamicina .....	45
4.3	Condições de cultivo para a produção de PHA pelos recombinantes.....	47
4.3.1	Meios de cultura .....	47
4.3.2	Experimentos em agitador rotativo .....	47
4.4	Metodologias analíticas .....	48

4.4.1 Massa seca celular .....	48
4.4.2 Carboidratos.....	48
4.4.3 Quantidade e composição de PHA.....	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Construção de DNA recombinante .....</b>	<b>50</b>
5.1.1 Padronização das condições das reações de amplificação por PCR para clonagem de sequências.....	50
5.1.2 Construção de plasmídeos recombinantes .....	51
<b>5.2 Avaliação de linhagens recombinantes de <i>Pseudomonas</i> .....</b>	<b>55</b>
5.2.1 Crescimento em gentamicina .....	55
5.2.2 Confirmação da inserção do DNA de interesse no cromossomo de LFM046 e LFM461 .....	56
5.2.3 Confirmação por PCR da perda do gene <i>aacCI</i> .....	59
5.2.4 Confirmação de clonagens por meio de alinhamento dos fragmentos de DNA amplificados e sequenciados .....	60
<b>5.3 Ensaio de acúmulo em agitador rotativo .....</b>	<b>60</b>
5.3.1 Consumo de fonte de carbono .....	61
5.3.2 Avaliação da produção de PHA .....	61
<b>6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1 Conclusões .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2 Perspectivas futuras .....</b>	<b>73</b>
6.1.1 Avaliação das capacidades de acúmulo das linhagens recombinantes obtidas via mini-Tn5.....	73
6.1.2 Construção de outras linhagens recombinantes de <i>Pseudomonas</i> sp. LFM461 por meio do sistema mini-Tn5 .....	73
6.1.3 Publicações em andamento .....	73
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>74</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>99</b>

<b>A – Sequenciamento de insertos .....</b>	<b>100</b>
<b>B – Dados obtidos em ensaio em agitador rotativo .....</b>	<b>107</b>
<b>C – Publicações científicas em andamento .....</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A sociedade moderna é dependente do uso de materiais plásticos em grandes quantidades. Plásticos são usados em embalagens e diversos produtos descartáveis, assim como em produtos de aplicações nobres, como fios de sutura, próteses e outros insumos cirúrgicos, por exemplo. Devido a seu uso em grandes quantidades, a sua difícil degradação no meio ambiente e dificuldades em seu processo de reciclagem, esse material está se acumulando, poluindo rios, praias e outros ambientes. Como alternativa ao uso de plásticos convencionais, derivados do petróleo, diversas famílias de bioplásticos vêm sendo estudadas, como as poliaminas, policaprolactonas, polilactato, guta-percha e polímeros da família dos polihidroxialcanoatos (PHA).

Neste contexto, os PHA, produtos naturais, produzidos e acumulados por diversas espécies bacterianas, dentre outros organismos, como reserva de energia, na forma de grânulos intracelulares, se destacam. Esses biopolímeros são biocompatíveis, naturalmente degradados por organismos no meio ambiente quando em condições favoráveis (pH, umidade, temperatura adequados, entre outros), e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis, como resíduos agroindustriais e urbanos.

A síntese dos PHA é influenciada por três fatores principais: vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, tipo de PHA sintase, considerada a enzima chave no metabolismo de PHA, e da fonte de carbono fornecida durante a fase de acúmulo. De acordo com o substrato fornecido, a bactéria dará origem a diferentes moléculas de 3-hidroxiacil-CoA, o que depende das vias metabólicas que apresenta. A incorporação ou não desses monômeros ao polímero nascente depende da especificidade da enzima PhaC que a bactéria apresenta.

A partir disso, dois principais grupos de monômeros de PHA foram definidos: monômeros de cadeia curta, formados por 3-hidroxiacil-CoA contendo de 3 a 5 átomos de carbono ( $HA_{SCL}$ ), sendo o poli-3-hidroxiabutirato P(3HB), seu principal representante, e monômeros de cadeia média, formados por 3-hidroxiacil-CoA contendo de 6 a 14 átomos de carbono em sua composição ( $HA_{MCL}$ ). Polímeros compostos apenas por monômeros de cadeia curta são pouco elásticos, enquanto os compostos apenas por monômeros de cadeia média são elastoméricos. Apesar do P(3HB) ser o PHA mais bem estudado, é um material muito quebradiço, fator que limita muito suas aplicações. Copolímeros híbridos de PHA, contendo em sua composição polimérica monômeros de cadeia curta e média, possuem características físicas e mecânicas intermediárias, consideradas semelhantes a certos plásticos petroquímicos, como polietileno de baixa densidade, por exemplo. Assim, a diversificação de sua composição

pode aumentar a sua gama de aplicações na indústria de materiais, sendo o desenvolvimento desses copolímeros alvo de diversas patentes recentes.

Algumas linhagens bacterianas são capazes de produzir naturalmente copolímeros híbridos, mas ainda é necessário desenvolver bactérias recombinantes capazes de produzi-los de forma mais eficiente ou a partir de apenas uma fonte de carbono ou até mesmo a partir de resíduos.

*Pseudomonas* sp. LFM046, linhagem que foi isolada em solo de canavial no estado de São Paulo, é considerada boa produtora de PHA contendo apenas monômeros de cadeia média a partir de glicose e frutose. Essa linhagem, que teve seu genoma recentemente sequenciado e analisado, sendo considerada não patogênica, é alvo de diversos estudos relacionados à biossíntese de PHA e análise de fluxos metabólicos. A partir dela, já foram gerados diversos mutantes, entre eles LFM461, deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose e octanoato.

Para possibilitar a produção de copolímeros híbridos a partir de glicose, estratégias envolvendo a inserção de genes de PHA sintase no cromossomo de *Pseudomonas* LFM046 e LFM461 foram adotadas. Genes de PHA sintase de classe I, proveniente de *Ralstonia eutropha* (linhagem modelo na produção de PHA) e de duas espécies de *Aeromonas*, capazes de produzir P(3HB-co-3HHx) a partir de óleos vegetais (substratos mais caros que açúcares), porém com baixo rendimento, foram usados. A inserção no cromossomo resultou em linhagens estáveis, com apenas uma cópia do gene de interesse e dispensa a necessidade de seleção contínua por antibióticos, características de grande interesse industrial.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Polihidroxialcanoatos, polímeros biodegradáveis**

Os plásticos são um dos materiais mais amplamente usados pela sociedade moderna, tendo papel importante na vida diária da humanidade, em embalagens e diversos produtos descartáveis. A maioria dos plásticos usados atualmente é de origem petroquímica, considerado por muitos investigadores uma reserva natural, porém finita, com preços cada vez maiores (FRADINHO; OEHMEN; REIS, 2014). Em 2015, foram produzidas 322 milhões de toneladas de plástico a partir de fontes não renováveis no mundo inteiro (PLASTICSEUROPE - ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS, 2016). A difícil degradação destes materiais no ambiente gera um problema ambiental crescente (CHEN; PATEL, 2012; LOO; SUDESH, 2007) devido ao acúmulo de lixo no meio ambiente (CHEE et al., 2012), resultando em problemas na gestão de descartes de resíduos sólidos (ABEDI et al., 2012) e em resíduos danosos que podem se infiltrar facilmente na cadeia alimentar (BROWNE et al., 2008). O acúmulo de resíduos plásticos no ambiente marinho leva a problemas de saúde pública, como demonstrado por estudo que evidenciou a presença de micropartículas de celofane, polietileno e polietileno tereftalato, plásticos derivados de petróleo, em amostras de sal de cozinha comercializado na China (YANG et al., 2015). Os autores ressaltam a capacidade dessas micropartículas em reter substâncias tóxicas a animais marinhos e seres humanos. Recentemente, o Fórum Econômico Mundial estimou que em 2050 os oceanos abrigarão maior quantidade de plásticos do que de peixes (JAMBECK et al., 2015). Com a problemática global em evidência, a França foi o primeiro país a banir o uso de pratos e talheres de materiais plásticos derivados de petróleo, valendo esta lei a partir de 2020. O uso de sacolas plásticas em supermercados também é proibido na França e em alguns estados dos Estados Unidos, mas ainda encontra resistência em alguns países, como no Brasil, por exemplo.

Devido a esses fatores e aos diversos impactos ambientais promovidos pelo uso de petróleo e seus derivados no contexto das mudanças climáticas, diversas alternativas ambientalmente corretas têm sido estudadas na busca de materiais que possam substituir os plásticos de origem petroquímica (CHUNG et al., 2015; GOMEZ et al., 2012; SILVA et al., 2007). Assim, materiais com propriedades similares aos plásticos convencionais, porém com a vantagem de serem biodegradáveis, biocompatíveis e produzidos a partir de fontes renováveis têm sido desenvolvidos, tais como polímeros de amido, policaprolactonas, polilactato, poliisoprenos, polihidroxialcanoatos (PHA), entre outros (SILVA et al., 2007; STEINBÜCHEL, 2001).

Os PHA, que foram descobertos pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne na década de 1920, apresentam diversas características que os apontam como potenciais substitutos dos plásticos produzidos a partir de petróleo, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, não toxicidade e o fato de poderem ser sintetizados a partir de fontes renováveis (KESHAVARZ; ROY, 2010; RAI et al., 2011b; STEINBÜCHEL, 2001). Quando expostos às condições favoráveis, esse biopolímeros são degradados em oligômeros e/ou monômeros, e então a vapor d'água, CH<sub>4</sub> ou CO<sub>2</sub>, sendo que este volta a ser absorvido no processo de fotossíntese (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; TRIPATHI et al., 2012). Podem ser usados para a produção de embalagens para alimentos, sacolas de mercado, sacolas compostáveis, copos descartáveis e garrafas de shampoo, por exemplo. Também podem ser usados para fabricação de filmes de recobrimento, aparelhos eletrônicos, aditivos para tintas e até mesmo para fins mais nobres, como insumos para cirurgias, sistemas de liberação controlada de fármacos, implantes médicos e na confecção de materiais usados em medicina regenerativa (ANSARI; ANNUAR; MURPHY, 2016; BRODNJAK, 2016; FRANCIS et al., 2016; JAIN; TIWARI, 2015; MICHALAK; KURCOK; HAKKARAINEN, 2016; SHISHATSKAYA et al., 2016; SHUMILOVA et al., 2016; VALAPPIL et al., 2006).

Esses biopolímeros são acumulados na forma de grânulos intracelulares (Figura 1) por várias linhagens bacterianas, quando em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de um nutriente essencial à multiplicação das células bacterianas (N, P, K, Mg, Fe, entre outros) (BHUWAL et al., 2013; GOMEZ, 2000; SIMON-COLIN et al., 2008; STEINBÜCHEL et al., 1998).



**Figura 1** - Células bacterianas contendo grânulos intracelulares de PHA. (Fonte: iGEM 2009 Duke Team - 2009.igem.org/Team:Duke).

Além disso, eles podem servir como reserva de energia e equivalentes redutores para o microrganismo quando na ausência de carbono externo (REDDY et al., 2003; REINECKE; STEINBÜCHEL, 2008). Assim, quando há limitação de carbono ou energia, mas não de outros

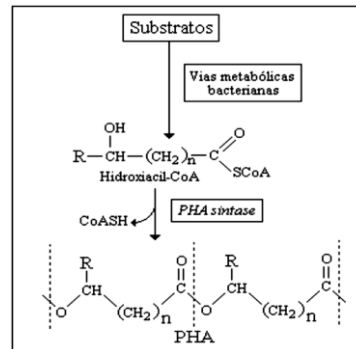
nutrientes, os PHA podem ser mobilizados para suprir essa necessidade (ANDERSON; DAWES, 1990; LEE et al., 2000).

Podem ser divididos em dois grupos principais, de acordo com o número de carbonos que compõem suas unidades monoméricas: PHA com monômeros de cadeia curta ( $HA_{SCL}$ ), com 3 a 5 átomos de carbono na cadeia monomérica, PHA com monômeros de cadeia média ( $HA_{MCL}$ ), contendo de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia monomérica. Mais de 150 monômeros diferentes de hidroxialcanoatos já foram identificados como possíveis constituintes de PHA (KESSLER et al., 2001; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). O tipo de monômero incorporado na cadeia de PHA é determinado pelas condições de cultivo, como fonte de carbono utilizada, e pelas características da linhagem bacteriana que o produz, isto é, seu metabolismo e enzima de PHA sintase (PhaC) que apresenta (QIU; HAN; CHEN, 2006; SIMON-COLIN et al., 2008).

## **2.2 A enzima PHA sintase (PhaC)**

A PHA sintase (PhaC) é considerada a enzima chave na biossíntese de PHA, responsável pela incorporação de moléculas de (*R*)-hidroxiacil-CoA na cadeia polimérica nascente (GRAGE et al., 2009; JENDROSSEK, 2009; MADISON; HUISMAN, 1999; REHM; STEINBÜCHEL, 2002). A reação de polimerização realizada por esta enzima está esquematizada na Figura 2 (GOMEZ, 2000). O processo de iniciação/polimerização dos grânulos de PHA já foi revisado por diversos autores, sendo demonstrado que as PHA sintases apresentam especificidades diferentes para monômeros de 3-hidroxiacil-CoA (HA), o que permitiu classificá-las em classes (ALDOR; KEASLING, 2003; JENDROSSEK, 2009; JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; REHM, 2003, 2006; VALAPPIL et al., 2006). O tipo de PHA sintase expresso pela bactéria influi fortemente na quantidade de biopolímero acumulado, assim como em sua composição monomérica e em seu peso molecular (HYAKUTAKE et al., 2015; MATSUMOTO et al., 2009).





**Figura 2** - Modelo metabólico genérico para a síntese de PHA (Fonte: Gomez, 2000).

Assim, as PHA sintases são classificadas em quatro classes, de acordo com sua afinidade por substratos e estrutura primária da proteína, assim como proposto por Rehm (2003). Na Figura 3 são mostradas quatro classes de PHA sintases, indicados seu número de subunidades, pesos moleculares, principal espécie que as apresenta e substratos pelos quais têm afinidade.

Class	Subunits	Species	Substrate
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA (-C3-C5) 4HA <sub>MCL</sub> -CoA 5HA <sub>SCL</sub> -CoA, 3MA <sub>SCL</sub> -CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA <sub>MCL</sub> -CoA (-C5)
III	PhaC-PhaE ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA (3HA <sub>MCL</sub> -CoA [-C6-C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	PhaC-PhaR ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA <sub>SCL</sub> -CoA

**Figura 3** - Classificação das enzimas PhaC em quatro classes (Fonte: Rehm, 2003).

Enzimas de classe I apresentam especificidade por monômeros de cadeia curta, contendo de 3 a 5 átomos de carbono (HA<sub>SCL</sub>), sendo composta por apenas uma unidade (PhaC). Já enzimas de classe II apresentam afinidade por monômeros de cadeia média, isto é, compostas por 6 a 14 átomos de carbono (HA<sub>MCL</sub>), também compostas por apenas uma unidade polipeptídica (PhaC1 ou PhaC2). Enzimas de classe III são formadas por duas subunidades proteicas (PhaC e PhaE), com especificidade tanto por HA<sub>SCL</sub> quanto por HA<sub>MCL</sub>. Por fim, enzimas de classe IV também são compostas por duas subunidades polipeptídicas (PhaC e PhaR) e são geralmente consideradas como específicas para HA<sub>SCL</sub>, apesar da literatura mostrar

que monômeros considerados como não usuais podem ser incorporados em sua estrutura como componentes menores (REHM, 2003; TSUGE; HYAKUTAKE; MIZUNO, 2015).

Apesar dessa classificação, certa flexibilidade das PHA sintases vêm sendo demonstrada. *Burkholderia sacchari* (ALEXANDRINO et al., 2015; BRÄMER et al., 2001) apresenta PhaC do tipo I, acumulando C4 e C5 (3-hidroxi-4-hidroxi-3-butanato – 3HB; 4-hidroxi-3-butanato – 4HB; 3-hidroxi-2-metil-3-butanato – 3HV), mas também é capaz de incorporar até 2 mol% de monômeros C6 (3-hidroxi-6-oxoheptanoato – 3HHx) (MENDONÇA et al., 2013). Volova e coautores reportaram que as linhagens de *Ralstonia eutropha* H16 e B5786, que também possuem PhaC de classe I, acumulam monômeros C4, C5, C6, C7 (3-hidroxi-7-oxooctanoato – 3HHp) e C8 (3-hidroxi-8-oxooctanoato – 3HO) quando CO<sub>2</sub> ou frutose e ácidos graxos são fornecidos como fontes de carbono (VOLOVA; KALACHEVA; STEINBÜCHEL, 2008). A PHA sintase de *Aeromonas caviae* apresenta afinidade por monômeros 3H4MV (3-hidroxi-4-metilvalerato), além de 3HB e 3HHx (LAU et al., 2010). A linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3 foi descrita como produtora natural de P(HA<sub>SCL-co</sub>-HA<sub>MCL</sub>) (ABE et al., 1994), exibindo uma PHA sintase com amplo espectro de substratos, que já foi alvo de diversos estudos de engenharia de proteínas.

PHA sintases de *Ralstonia eutropha* são classificadas como classe I, tendo apenas uma subunidade (PhaC) e afinidade por monômeros contendo de 3 a 5 átomos de carbono. O operon de síntese de PHA nessas bactérias é constituído pelo gene *phaC*, seguido de sequência codificante para  $\beta$ -cetiólase (*phaA*) e sequência codificante para acetoacetil-CoA redutase (*phaB*), organizado na forma *phaCAB* (REHM, 2003).

Já as PHA sintases de *Pseudomonas* são classificadas como classe II, também constituídas por apenas uma subunidade (PhaC), mas com afinidade por monômeros de (*R*)-hidroxiacil-CoA contendo de 6 a 14 átomos de carbono. Nesse gênero, o gene *phaC* está presente em duas cópias e o operon de síntese de PHA está organizado como *phaC1ZC2* (REHM, 2003), no qual os dois genes codificantes para PHA sintase (*phaC*) são intercalados por um gene codificante para enzima envolvida na despolimerização de PHA (*phaZ*).

Espécies do gênero *Aeromonas* apresentam PHA sintase com afinidade por monômeros com quatro, cinco e seis átomos de carbono (ZHANG et al., 2009), sendo capaz de produzir copolímeros mistos a partir de fontes de carbono relacionadas, como óleos vegetais ou ácidos graxos (DOI; KITAMURA; ABE, 1995; LU et al., 2003). O operon de síntese de PHA é composto por genes codificantes para PHAsina (*phaP*) e enoil-CoA hidratase (*phaJ*), além do gene *phaC*, estando organizado na forma do operon *phaPCJ* (FUKUI; DOI, 1997; HAN et al.,

2004; OUYANG et al., 2005). A PHA sintase dessa linhagem tem um único tipo de subunidade, classificada como tipo I (FUKUI; DOI, 1998; REHM, 2003).

De acordo com Cai e colaboradores (CAI et al., 2011), PhaC das classes I e II compartilham um ancestral comum, enquanto as classes III e IV foram originadas de um outro ancestral. Apesar disso, todas as PHA sintases exibem alguns resíduos de aminoácidos conservados, como cisteína, histidina e aspartato, em seu sítio catalítico. Alguns estudos sugerem que as PHA sintases apresentam dobramento do tipo  $\alpha/\beta$ -hidrolase (JENDROSSEK, 2009; NOMURA; TAGUCHI, 2007; PARK et al., 2012; REHM, 2003; REHM; STEINBÜCHEL, 2002; TAGUCHI; DOI, 2004). A estrutura cristalina e a reconstrução do modelo 3D da PHA sintase de *Ralstonia eutropha* foram recentemente elucidados, sendo propostas funções diferentes para os domínios C e N terminal. Os autores reportam as bases estruturais e detalham os mecanismos moleculares da síntese de PHA (CHEN, 2016; KIM et al., 2016a, 2016b).

A composição química, o tamanho da cadeia lateral de cada monômero, bem como sua massa molecular, determinam as propriedades físicas e mecânicas do polímero (comportamento elástico, resistência mecânica, cristalização) e, portanto, suas potenciais aplicações (CHEN, 2009; ESCAPA et al., 2011; IWATA, 2005; RAI et al., 2011a). Enquanto PHA com monômeros de cadeia curta apresentam propriedades termoplásticas (alongamento até a ruptura menor que 5%) e alta cristalinidade, PHA com monômeros de cadeia média se apresentam como elastômeros (alongamento até a ruptura maior que 1000%) e menor cristalinidade (Tabela 1) (SÁNCHEZ et al., 2003).

**Tabela 1** - Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros (adaptado de Sudesh; Abe; Doi, 2000).

Polímero	T <sub>M</sub> (°C)	T <sub>G</sub> (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para ruptura (%)
P(3HB)	177	4	43	5
P(3HB-co-10%HV)	150	-	25	20
P(3HB-co-20%HV)	135	-	20	100
P(3HB-co-3% 4HB)	166	-	28	45
P(3BH-co-10% 4HB)	159	-	24	242
P(3BH-co-64% 4HB)	50	-	17	591
P(3HB-co-10%HHx)	127	-1	21	400
P(3HB-co-15%HHx)	115	0	23	760
P(3HB-co-17%HHx)	120	-2	20	850
P(3HB-co-19%HHx)	111	-4	-	-
Polipropileno	170	-	34	400
Poliestireno	110	-	50	-
PET	262	-	56	730
HDPE	135	-	29	-
HLPE	130	-30	10	620

3HB: 3-hidroxibutirato; 4HB: 4-hidroxibutirato; HV: 3-hidroxivalerato; HHx: 3-hidroxihexanoato, PET – polietileno tereftalato, HDPE – polietileno de alta densidade, HLPE – polietileno de baixa densidade, T<sub>M</sub> – temperatura de fusão; T<sub>G</sub> temperatura de transição vítrea.

PHA compostos apenas por monômeros de 4 carbonos, como o P(3HB) (poli-3-hidroxibutirato) são materiais rígidos, enquanto PHA<sub>MCL</sub> podem ser mais flexíveis e também se apresentarem como materiais viscosos e aderentes, como é o caso dos PHA<sub>MCL</sub> contendo uma grande fração de monômeros insaturados (GOMEZ, 2000; STEINBÜCHEL; HEIN, 2001). Do ponto de vista industrial, o controle da composição monomérica se faz interessante, sendo possível obter-se PHA com propriedades intermediárias e, portanto, diferentes novas aplicações (NOMURA et al., 2004).

Apesar de todas as vantagens apresentadas, a produção comercial de polihidroxicanoatos ainda apresenta alguns desafios, como o alto custo de produção envolvido e pelo fato do P(3HB), o PHA mais comumente produzido, não apresentar as propriedades térmicas e mecânicas desejadas pela indústria de materiais (SINGH et al., 2015). A literatura reporta serem necessários esforços globais para desenvolver plataformas de produção de diversos tipos de PHA e em quantidades suficientes para facilitar e diversificar suas aplicações, o que tornaria a produção desses biopolímeros economicamente viável (CHEN et al., 2015; MOŽEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016; REDDY et al., 2003; SINGH et al., 2015).

Hazer e Steinbüchel (2007) relatam que as propriedades térmicas e mecânicas dos PHA devem ser diversificadas e melhoradas, para aumentar o espectro de aplicação dos poliésteres de origem bacteriana. Com isso, e devido às diferentes características apresentadas pelos

polímeros de cadeia curta e média, torna-se interessante a produção de copolímeros  $HA_{SCL-co-HA_{MCL}}$ , isto é, contendo em sua estrutura monômeros de cadeia curta e monômeros de cadeia média, como abordado recentemente pela literatura (MENDONÇA, 2014; MENDONÇA et al., 2017). A literatura aponta que o melhoramento de linhagens por meio de manipulações genéticas é a forma mais adequada para aprimorar a produção de copolímeros com características desejadas e em larga escala para fins industriais (ABEDI et al., 2012; WANG; YIN; CHEN, 2014). Keshavarz e Roy (2010) relatam que a produção de PHA diferenciados para aplicações consideradas nobres, como médicas e biomédicas, está se tornando uma realidade, apesar do alto custo envolvido e baixo rendimento das linhagens bacterianas que o produzem.

Há, entretanto, obstáculos relevantes a serem transpostos para se obter  $HA_{SCL-co-HA_{MCL}}$  em grandes teores de biomassa e com percentuais variados e ainda de forma controlada para modular suas propriedades. Usualmente, bactérias acumulam ou  $PHA_{SCL}$  ou  $PHA_{MCL}$ , sendo possível incorporar apenas um pequeno teor de monômeros híbridos na cadeia de PHA. Apesar disso, alguns exemplos da literatura mostram que PhaC pode apresentar certa inespecificidade (MENDONÇA et al., 2013).

Os copolímeros, formados por dois tipos de monômeros de cadeia curta ou uma mistura de monômeros de cadeia curta e cadeia média, por exemplo, apresentam características físicas melhoradas, quando comparados aos homopolímeros compostos apenas por  $HA_{SCL}$  ou  $HA_{MCL}$ , se tornando mais próximos dos polímeros convencionais derivados de petróleo, e sendo facilmente processados, o que aumenta suas chances de aplicação na indústria de materiais (NODA et al., 2005). Copolímeros de  $P(3HB-co-3HA_{MCL})$  com elevada fração de 3HB vêm despertando grande interesse da indústria por apresentar características mecânicas semelhantes ao polietileno de baixa densidade (MATSUSAKI; ABE; DOI, 2000; NODA et al., 2005). Mais especificamente, o copolímero  $P(3HB-co-3HHx)$  foi apontado como o PHA mais flexível e biocompatível, tendo propriedades únicas que favorecem sua aplicação em engenharia de tecidos biológicos (SUDESH; ABE; DOI, 2000) e propriedades semelhantes as apresentadas pelo polipropileno (FUKUI; ABE; DOI, 2002). Alguns trabalhos apontam a necessidade de desenvolver novas estratégias para a produção desse copolímero, já que poucas bactérias os produzem naturalmente (NOMURA et al., 2004; PHITHAKROTCHANAKOON et al., 2013).

Uma das estratégias utilizadas para diversificar a composição dos PHA e aumentar seu rendimento a partir de diversas fontes de carbono é a engenharia de bioprocessos (revisado por CHEN, 2009) e/ou a manipulação genética de *phaC*. Nesse sentido, as abordagens mais

estudadas envolvem a expressão heteróloga de *phaC* em diferentes organismos, evolução de proteínas e engenharia enzimática.

O histórico de manipulações genéticas de diferentes PHA sintases foi revisado por Nomura e Taguchi (2007), ressaltando sua aplicação na produção de PHA em linhagens recombinantes. A literatura aponta que a maioria dos estudos desse tipo foca na produção de mutações ao acaso e embaralhamento de sequências gênicas, devido à ausência de um modelo estrutural proteico para a PhaC até então (NOMURA; TAGUCHI, 2007; PARK et al., 2012; TAGUCHI; DOI, 2004). Isso ainda é válido para os últimos anos, nos quais grupos de pesquisa continuaram se utilizando de métodos de evolução de proteínas. Em 2006, Wahab e coautores (WAHAB et al., 2006) analisaram e predisseram, por meio de biologia computacional, parte da estrutura tridimensional de uma PHA sintase de classe II, elucidando alguns dos resíduos de aminoácidos componentes de seu sítio catalítico. Em 2015, Hooks e Rehm (HOOKS; REHM, 2015a) identificaram algumas regiões estruturais expostas que conferem flexibilidade à enzima PhaC, gerando dados que facilitam a funcionalização de grânulos de PHA como *bio-beads*, cuja importância será discutida posteriormente.

Nos últimos anos, a maioria dos estudos voltados a melhorar a produção de PHA com as propriedades desejadas fez uso da construção de linhagens recombinantes (JIANG et al., 2016; LU; TAPPEL; NOMURA, 2009), sendo uma série destes focados no uso de matérias-primas consideradas de baixo custo, como resíduos urbanos ou agrícolas (GOMEZ et al., 2012; KOLLER et al., 2005; REVELLES et al., 2016; SILVA et al., 2014). Organismos vegetais e leveduras também são plataformas para produção de PHA extensivamente estudadas por diversos grupos de pesquisa (CARLSON; FELL; SRIENC, 2002; CARLSON; SRIENC, 2006; GAO et al., 2015; MCQUALTER et al., 2014; PETRASOVITS et al., 2007, 2012, 2013; POIRIER; ERARD; MACDONALD-COMBER PETÉTOT, 2001; SNELL; SINGH; BRUMBLEY, 2015; SOMLEVA et al., 2008; SOMLEVA; PEOPLES; SNELL, 2013; ZHANG; CARLSON; SRIENC, 2006).

### **2.3 Uso de *Pseudomonas* na produção de PHA**

*Pseudomonas* spp. são bactérias Gram-negativas aeróbicas, capazes de produzir PHA<sub>MCL</sub>, a partir de monômeros de cadeia média, supridos pela via da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, a partir de várias fontes de carbono ou pela síntese de novo, quando a partir de açúcares (SUDESH; ABE; DOI, 2000). A literatura reporta que os genes de síntese de PHA estão organizados nesse gênero em um operon que contém duas cópias do gene codificante de PHA sintase (*phaC*), intercaladas por um gene codificante para despolimerase intracelular (*phaZ*),

sendo ambas as PHA sintases de classe II (REHM, 2003; VO; KO; RAMSAY, 2015). As vias envolvidas na regulação molecular da produção de PHA em *Pseudomonas* ainda não são completamente definidas, sendo semelhante às de *Ralstonia eutropha* em alguns pontos, mas muito diferente entre espécies de *Pseudomonas* (DE EUGENIO et al., 2010; PRIETO et al., 2016). Também é reportada a manipulação genética de *Pseudomonas* para produção de copolímeros mistos, funcionais e com controle da composição monomérica (CHEN; HAJNAL, 2015), sendo esse gênero apontado como boa plataforma para a produção de PHA e diversos bioprodutos devido à sua extraordinária diversidade metabólica, além de ser capaz de produzir monômeros de diversas composições a partir de carboidratos (MENG et al., 2014; NIKEL; MARTÍNEZ-GARCÍA; DE LORENZO, 2014).

*Pseudomonas* sp. LFM046 é uma linhagem brasileira, isolada de solo de canavial, descrita como boa produtora de PHA a partir de fontes de carbono não relacionadas, podendo acumular até 60% de sua massa seca celular em PHA quando em limitação de nitrogênio e fósforo (DINIZ et al., 2004; GOMEZ, 2000; SÁNCHEZ et al., 2003; SILVA-QUEIROZ et al., 2009; TACIRO, 2008). Essa linhagem teve suas rotas metabólicas relacionadas à produção de PHA avaliadas por meio de experimentos baseados em  $^{13}\text{C}$  (RIASCOS et al., 2013). Assim, LFM046 e sua mutante UV, deficiente no acúmulo de polihidroxicanoatos (PHA<sup>-</sup>), LFM461, são linhagens promissoras para a produção de copolímeros P(3HB-co-HA<sub>MCL</sub>). *Pseudomonas* sp. LFM046 teve seu genoma recentemente sequenciado e analisado (CARDINALI-REZENDE et al., 2015), sendo confirmada a organização gênica do operon de PHA sintase já descrito na literatura e a ausência de genes de virulência.

Em trabalho anterior (GOMES, 2009), a inserção de plasmídeo abrigando gene de PHA sintase de *R. eutropha* (*phaC<sub>Re</sub>*) em LFM046 resultou na produção de misturas de dois polímeros, com quantidades variáveis de 3HB. Quando o mesmo foi feito com sua mutante PHA<sup>-</sup> (incapaz de acumular polihidroxicanoatos a partir de glicose), foi observada produção de copolímeros de P(3HB-co-3HHx-co-3HO). Esses trabalhos indicam que *Pseudomonas* sp. LFM046 é capaz de suprir a síntese de monômeros 3HB.

Em vista disso, este trabalho se propôs a construir linhagens abrigando genes de PHA sintase em seu cromossomo, o que exclui inconvenientes inerentes em abrigar um plasmídeo na célula bacteriana, como o estado múltiplas cópias do gene e a necessidade de seleção contínua, usando antibióticos, fator que pode influenciar negativamente o crescimento celular e, conseqüentemente, o acúmulo de biopolímero (CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006; DE LORENZO et al., 1998; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2011).

## 2.4 Sistemas de recombinação baseados nos transposons Tn7 e Tn5

Para atingir o objetivo do presente trabalho, foram escolhidos sistemas de integração derivados de elementos transponíveis, os transposon. Esses sistemas permitem a integração de sequências de interesse no DNA cromossômico, assegurando maior estabilidade genética da linhagem produtora (TRAN; CHARLES, 2016). Linhagens livres de plasmídeos e de resistência a antibióticos eliminam a necessidade do uso de antibióticos, característica desejada em aplicações médicas e ambientais, já que a seleção constante usando antibióticos não é viável em processos industriais. Essa estratégia também evita a propagação e transferência de genes de resistência para linhagens patogênicas eventualmente presentes no meio ambiente (LEMUTH; STEUER; ALBERMANN, 2011; NIKEL; DE LORENZO, 2013; SODOYER et al., 2012).

Os elementos transponíveis foram descritos pela primeira vez na década de 1940, pela geneticista norte-americana Barbara McClintock em seus estudos com milho (MCCLINTOCK, 1950). Seus trabalhos a renderam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1983. Elementos transponíveis são definidos como segmentos específicos de DNA capazes de se mover como uma unidade de um *locus* gênico para outro, sendo encontrados em diversas espécies desde procaríotos até eucariotos mais complexos. A transposição ocorre sem a necessidade de sequências homólogas ou da expressão de genes *rec* (BERG; BERG, 1983). Alguns sistemas para inserção de sequências de interesse, geração de mutantes e construção de bibliotecas gênicas baseados em transposons bacterianos estão bem descritos na literatura, com protocolos bem estabelecidos (DE LORENZO et al., 1990; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2017; SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983).

O sistema baseado no transposon Tn7 escolhido é um sistema eficiente e de fácil manipulação. Elementos mini-Tn7 podem ser prontamente transferidos para formação de mutantes, têm biologia molecular amplamente conhecida, além de promover uma única inserção no cromossomo bacteriano, com local e orientação específica, o sítio *attTn7*, localizado em uma posição *downstream* do operon *glmUS*, que codifica duas proteínas, envolvidas na biossíntese da parede celular (BARTH; GRINTER, 1977; LAMBERTSEN; STERNBERG; MOLIN, 2004; LICHTENSTEIN; BRENNER, 1982).

No modelo de transposição revisado por Peters e Craig (2001), o transposon Tn7 se insere com alta frequência em uma região específica do cromossomo bacteriano, sendo que essa inserção não é deletéria ao hospedeiro, além de ser um sítio seguro para que ocorra sua inserção. Esse modelo de inserção em um sítio específico proporciona um mecanismo que promove a existência mútua de Tn7 e seu hospedeiro, promovendo sua transmissão às células-filhas. Tn7



é dito como um transposon inteligente, pois só se move quando reconhece duas sequências de DNA específicas, sendo o sítio *attTn7* uma delas.

A proteína TnsD, que no sistema usado no presente estudo, tem seu gene codificante no plasmídeo pTNS3, é a componente chave para a maquinaria de transposição funcionar, pois direciona a inserção do elemento Tn7 no sítio de ligação, chamado de *attTn7*. TnsD reconhece um segmento de DNA de 35 pb que pertence à região codificante do gene *glmS*, e recruta o restante da maquinaria de transposição para esse sítio (MITRA et al., 2010). A inserção de Tn7 ocorre na região terminadora de transcrição do operon *glmUS*, aproximadamente 25 pb distante do sítio de ligação de TnsD (DEBOY; CRAIG, 2000), garantindo que o quadro de leitura é conservado e a expressão de *glmS* é preservada (GAY; TYBULEWICZ; WALKER, 1986), o que não traz prejuízo ao hospedeiro (PETERS; CRAIG, 2001).

TnsD reconhece o sítio *attTn7* e recruta TnsC, que ativa e regula a ação das transposases de Tn7 (proteínas necessárias à recombinação que são codificadas pelo próprio transposon), TnsA e TnsB, que por sua vez medeiam a clivagem e ligação das terminações do transposon. TnsA é tida como a subunidade responsável por clivar a extremidade 5', enquanto TnsB cliva e une a extremidade 3' de Tn7 (RONNING et al., 2004).

O sistema de recombinação sítio específica que foi desenhado no plasmídeo pUC-18T-miniTn7-Gm<sup>r</sup> (AY599232) se baseia no fato da maquinaria de transposição agir apenas nas extremidades de Tn7, por isso qualquer segmento de DNA que estiver entre os sítios de terminação de Tn7 (Tn7-L e Tn7-R) pode ser transposto na presença das proteínas de transposição, que são codificadas pelo plasmídeo *helper* pTNS3.

O transposon procariótico Tn5, assim como o sistema de recombinação dele derivado também estão bem descritos na literatura como tendo alta frequência de inserção em diversos *loci* de cromossomos, plasmídios, fagos e de bactérias Gram-negativas (BERG; BERG, 1983). Este transposon é composto por dois elementos invertidos IS50, que são IS50R e IS50L. Esses elementos flanqueiam uma região central única que geralmente apresenta diversos genes de resistência a antibióticos. Ambas as IS50 são delimitadas por extremidades de 19 pb denominadas *outside ends* (OE) e *inside ends* (IE) de acordo com sua proximidade à região central. IS50R codifica duas proteínas, Tnp (transposase) e Inh (proteína inibitória), que medeiam e controlam a transposição de Tn5. Já IS50L codifica partes de Tnp e Inh que são inativas, devido a um códon de parada prematuro (DE LA CRUZ et al., 1993; JOHNSON; YIN; REZNIKOFF, 1982; SASAKAWA; CARLE; BERG, 1983). O sistema baseado em Tn5 usado neste trabalho, em contraste ao derivado de Tn7, possibilita a inserção de sequências gênicas

em locais aleatórios do cromossomo de *Pseudomonas* spp. e outras bactérias Gram-negativas (HERRERO; DE LORENZO; TIMMIS, 1990; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2011; REZNIKOFF, 2008).

Martínez-García e colaboradores desenvolveram vetores plasmidiais para integração de sequências, usando a estrutura sintética mínima do transposon Tn5. Nesse sistema, o vetor suicida abriga a sequência *tnpA*, codificante para a transposase que media a transposição do elemento Tn5, em um mecanismo de ‘recorta e cola’, sendo a sequência codificante para a transposase externa ao elemento móvel (mini-transposon), o que garante a manutenção deste no cromossomo bacteriano (ARTIGUENAVE; VILAGINÈS; DANGLLOT, 1997; DE LORENZO et al., 1993; DE LORENZO; TIMMIS, 1994; MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2014a). Inicialmente, TnpA monomérica se liga às sequências de DNA invertidas (IS) de 19 pb que flanqueiam a região a ser transposta. Em seguida, a dimerização da transposase ligada ao DNA cria um complexo sináptico. Ocorre a quebra (*nick*) de uma das fitas de DNA e a excisão do transposon, passando por uma série de intermediários. TnpA medeia a inserção da sequência em um novo local por transferência da cadeia de DNA (DE LA CRUZ et al., 1993).

Os autores validaram esse sistema em *P. putida* KT2440, gerando duplos e triplos mutantes transconjugantes. Também foram gerados diversos transconjugantes de *E. coli* abrigando o operon *phaCAB* de *R. eutropha*. Quando testados em relação ao acúmulo de PHA, os clones de *E. coli* mostraram diferentes capacidades de produção de PHA, de acordo com a localização genômica da sequência *phaCAB*. Isso indicou que a localização da inserção da sequência de interesse pode influenciar fortemente na expressão gênica.

Os vetores derivados de Tn5 usados nesse trabalho foram construídos de acordo com as regras do banco europeu *Standard European Vector Architecture* (SEVA), que propõe um formato padronizado de vetores plasmidiais usados em diversas manipulações genéticas (SILVA-ROCHA et al., 2013)

## 2.5 Potenciais usos de PHA sintases

Desde sua primeira descrição em 1926, os PHA vêm sendo estudados como potenciais substitutos aos plásticos derivados de petróleo. Polímeros compostos apenas por HA<sub>SCL</sub>, como P(3HB) e P(3HB-co-3HV), produzidos por linhagens selvagens de *Ralstonia eutropha* H16 vêm sendo produzidos em larga escala para fins comerciais, aplicados na fabricação de embalagens, moldagem, fibras e outras commodities (PRIETO et al., 2016). Já os PHA<sub>MCL</sub> têm aplicação potencial em embalagens de alimentos, adesivos de pressão, aditivos de tintas e borrachas biodegradáveis (WANG; YIN; CHEN, 2014).

Além de sua aplicação direta como polímero, na qual é evidente a importância da PHA sintase usada em sua polimerização, os monômeros de PHA também vêm sendo usados como *building blocks per se*, com finalidade de produção de biocombustíveis, por exemplo (CHEN, 2009; SANGKHARAK et al., 2016). Daí vêm a importância de desenvolver microrganismos recombinantes capazes de melhor produzir monômeros já conhecidos, ou mesmo novos monômeros, além de serem capazes de polimerizá-los, formando polímeros com novas propriedades e, portanto, novas aplicações.

Proteínas associadas aos grânulos de PHA vêm sendo exploradas para desenvolvimento de sistemas de imobilização e purificação de proteínas. Em 2004, Moldes e colaboradores desenvolveram um sistema de mobilização e purificação de proteínas *in vivo* modificando a extremidade N-terminal proteína PhaF de *Pseudomonas putida* GPo1 (MOLDES et al., 2004). Posteriormente, esse sistema foi adaptado para a produção de antígenos relevantes para diagnósticos clínicos, como IL-2 (interleucina 2) e MOG (glicoproteína da mielina de oligodendrócitos), em *Escherichia coli* (BÄCKSTRÖM; BROCKELBANK; REHM, 2007).

Após demonstrar que a proteína quimérica PhaC-GFP (GFP - proteína verde fluorescente - associada a porção N-terminal de PhaC de *Ralstonia eutropha* e de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1) não diminui a atividade de sintase nem afeta negativamente a formação de grânulos de PHA (PETERS; REHM, 2005), em 2006 Peters e Rehm apontaram uma interessante aplicação de PHA sintases modificadas como sistemas de imobilização e purificação de enzimas e proteínas (PETERS; REHM, 2006). Sequências gênicas de *phaC1* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e *lacZ* (codificante para a enzima  $\beta$ -galactosidase) de *Escherichia coli* S17-1 foram clonadas de forma conjunta em um plasmídeo de expressão, de modo a obter a proteína LacZ fundida à porção N-terminal da proteína PhaC1. Os autores confirmaram a capacidade de formação de grânulos de PHA dessa PHA sintase quimérica em uma linhagem de *P. aeruginosa* PAO1  $\Delta$ *phaC1-phaZ-phaC2*. Ensaio de ELISA mostraram que a enzima LacZ estava presente na superfície dos grânulos de PHA purificados, além de ter sua atividade enzimática preservada.

Esse sistema foi usado para produção de um sistema de purificação de anticorpos IgG, pela produção de uma proteína quimérica contendo o domínio ligante a IgG ZZ da proteína A de *Staphylococcus aureus*-PhaC de *Ralstonia eutropha* (ZZ-PhaC) em linhagens recombinantes de *Escherichia coli* (BROCKELBANK; PETERS; REHM, 2006) e *Lactococcus lactis* (MIFUNE; GRAGE; REHM, 2009). Os autores conseguiram aplicar com sucesso as *beads* para

purificação IgG humano (BROCKELBANK; PETERS; REHM, 2006) e IgG presente em sobrenadantes de cultura celular de hibridoma de camundongos (LEWIS; REHM, 2009).

A partir desses estudos iniciais de produção de bio-*beads* pela manipulação de genes *phaC*, juntamente com *phaA* e *phaB* de *R. eutropha* em *E. coli*, diversas aplicações já foram indicadas, como: *beads* anti- $\beta$ -galactosidase-scFv (fragmento variável de cadeia simples) (usado para purificação de  $\beta$ -galactosidase, como prova de conceito do sistema) (GRAGE; REHM, 2008); *beads* de proteínas de fusão streptavidina (PETERS; REHM, 2008); nano/micro-*beads* com capacidade de se ligar concomitantemente a compostos inorgânicos, como ouro e sílica, e a anticorpos (JAHNS; HAVERKAMP; REHM, 2008); *beads* de dupla função, contendo as proteínas PhaC e PhaP modificadas possibilitando purificação de anticorpos (antígenos MOG) e sua detecção (por meio de GFP) de forma simultânea (ATWOOD; REHM, 2009); *beads* para imobilização da proteína  $\alpha$ -amilase de *Bacillus licheniformis* (BLA) (RASIAH; REHM, 2009); *beads* como sistema de imobilização da enzima fosfotriesterase (OpdA) de *Agrobacterium radiobacter*, demonstrado pelos autores como tendo sua atividade anti-pesticida preservada, indicando seu potencial uso em processos de bioremediação (BLATCHFORD et al., 2012); sistema de imobilização das enzimas epimerase e aldolase, aplicadas na produção de ácido *N*-acetilneurâmico, tido como *fine-chemical* (HOOKS; BLATCHFORD; REHM, 2013); *beads* apresentando a proteína *N*-etilmaleimida redutase (NemA) de *E. coli*, aplicado na biorremediação de contaminações por crômio hexavalente (ROBINS et al., 2013); *beads* apresentando 3 antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (ESAT6, CFP10 e Rv3615c) e quatro antígenos *Mycobacterium* (Rv3615c, CFP10, ESAT6 e Rv3020c), usado como reagente em testes de pele para detecção de tuberculose (CHEN et al., 2014; PARLANE et al., 2009, 2014); *beads* para separação de proteínas alvo *in vivo*, indicando sua potencial aplicação como matriz de afinidade em processos de separação de moléculas de interesse sem a necessidade de ‘tags’ (HAY et al., 2015a); *beads* como sistema de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (JAHNS; REHM, 2015); *beads* como sistema de imobilização de anidrase carbônica de *Desulfovibrio vulgaris*, usado como sistema para sequestro de CO<sub>2</sub> atmosférico (HOOKS; REHM, 2015b).

O sistema de bio-*beads* de PHA foi demonstrado como válido na produção de proteínas que precisam ter sua extremidade C-terminal livre para apresentar atividade (JAHNS; REHM, 2009). A separação da molécula de interesse imobilizada do grânulo de PHA ao qual foi associada (suporte) é possível pela inserção de uma sequência de nucleotídeos que resulta em um sítio de clivagem por uma enteroquinase (GRAGE; PETERS; REHM, 2011). Estudos

mostram que fusão de sequências que codificam para PHA sintase e GFP resultam em proteínas quiméricas capazes de se agregar naturalmente formando um bio-bead proteico, mesmo sem que ocorra síntese de PHA (PhaC não funcional) (JAHNS et al., 2013; VENNING-SLATER; HOOKS; REHM, 2014). Para aprimorar o sistema de imobilização, foi demonstrada a possibilidade de inserção de sequências codificantes para peptídeos de auto-clivagem, facilitando a obtenção da proteína de interesse (HAY et al., 2015b).

Alguns estudos apontam uso desses bio-beads como sistemas de *delivery* de antígenos para vacinação. Bio-beads contendo antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* em sua superfície foram produzidos e tiveram sua capacidade de gerar resposta imune confirmada, representando uma potencial estratégia de vacinação considerada como segura, biocompatível e versátil (PARLANE et al., 2009). A produção de bio-beads de P(3HB) contendo em sua superfície antígenos do vírus Hepatite C (hepatitis C virus core (HCc) antigen) em *Lactococcus lactis* e em linhagem de *E. coli* livre de endotoxinas e seus efeitos imunogênicos em modelo animal foram abordadas por alguns autores (MARTÍNEZ-DONATO et al., 2016; PARLANE et al., 2011). Em relação à vacinas para tuberculose, foram produzidos em *E. coli* e *Lactococcus lactis* bio-beads contendo em sua superfície os antígenos 85A e ESAT-6 de *Mycobacterium tuberculosis*, sendo demonstrado que seu uso é tão efetivo quanto a aplicação de vacinas comerciais (PARLANE et al., 2012).

A literatura reforça o uso de proteínas quiméricas associadas a proteína PhaC como sistemas de purificação de anticorpos, proteínas, enzimas, antígenos para imunização, antígenos biomarcadores/biosensores usados em exames diagnósticos e sistemas de *drug delivery/drug targeting*, ressaltando seu baixo custo, eficiência, fácil produção e utilização (DRAPER; REHM, 2012; GRAGE et al., 2009; HOOKS et al., 2014; JAHNS; REHM, 2012; PARLANE et al., 2014).

## 2.6 Empresas produtoras de PHA

Mundialmente, várias companhias vêm tentando se estabelecer como produtoras de PHA em escala comercial. De acordo com o Bio Plastics Info (BPI) e outros bancos de dados consultados, as seguintes companhias estão atualmente produzindo PHA: Berlin Packaging Corporation (EUA), Biomatera (Canadá), Biomer (Alemanha), Bio-On (Itália), Biotechnologische Forschungsgesellschaft mbH (Áustria), BP (EUA), Green Bio/DSM (China), Imperial Chemical Industries (Reino Unido), Kaneka (Japão), Meridian Inc. MHG (EUA), Metabolix (EUA), Mitsubishi Gas Chemicals (Japão), P&G Chemical (EUA), PHB Industrial Brasil S. A. (Brasil), SIRIM (Malásia), Telles (EUA), Tephra (EUA), Tianjin GreenBio Material

Co. (China), Tianzhu (China), Tinan (China), Yikeman ShanDong (China), Zeneca BioProducts (Reino Unido), ZheJiang Tia An (China), Newlight Technologies (EUA), ttz Bremerhaven (Alemanha), Tianan Biologic Materials (China), Shenzhen Ecomann Biotechnology Co., Ltd (China), Veolia Water (França), Crystal Union (França) e Full Cycle Bioplastics (EUA).

Cada uma dessas empresas está focada na produção de PHA para um segmento do mercado, como por exemplo filmes para embalagens, aditivos químicos, revestimentos de papel, fibras, adesivos sensíveis à temperatura, resinas, produtos de aplicação médica e *bio-beads* funcionalizados.

PolyBatics Ltd. (Nova Zelândia) é uma companhia focada na produção de *bio-beads* de PHA para diversas aplicações, como sistemas de imobilização e purificação de enzimas, detecção de moléculas e diagnósticos biomédicos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral possibilitar a produção de copolímeros mistos em *Pseudomonas* sp. LFM046 ou sua mutante PHA<sup>-</sup>, LFM461, utilizando glicose como única fonte de carbono.

#### 3.2 Objetivos específicos

Para atingir o objetivo principal, foram estabelecidas as seguintes etapas:

- a- Construção de linhagens de *Pseudomonas* portando genes da PHA sintase (*phaC*) provenientes de *Ralstonia eutropha* H16, *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Aeromonas* sp. TSM 81, em seu DNA cromossômico via sistema mini-Tn7 e mini-Tn5;
- b- Avaliação quanto ao acúmulo de polihidroxialcanoatos por meio de experimentos em agitador rotativo, tendo glicose como fonte de carbono.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos, plasmídeos e condições de cultivo

As linhagens e vetores plasmidiais utilizados e produzidos neste trabalho estão descritos na Tabela 2. A preservação das linhagens produzidas foi feita por liofilização (SILVA et al., 1992) e suspensão em glicerol (20% m/v), mantida em freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 2** - Linhagens bacterianas e vetores plasmidiais utilizados e produzidos neste trabalho.

Bactéria/plasmídeo	Características relevantes	Origem/Referência
<b>Bactérias</b>		
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	Linhagem selvagem produtora de PHA <sub>SCL</sub>	Pohllmann et al., (2006); Schlegel; Gottschalk; von Bartha (1961)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	Linhagem selvagem produtora de P(3HB- <i>co</i> -3HHx) a partir de óleos	Seshadri et al., (2006)
<i>Aeromonas</i> sp. TSM 81	Linhagem isolada de lodo de esgoto proveniente de estação de tratamento no Estado de São Paulo; apresenta <i>phaC</i> de classe I, capaz de acumular P(3HB- <i>co</i> -3HHx) a partir de óleos vegetais	Matsuda (2009)
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	Linhagem selvagem, descrita como boa produtora de PHA <sub>MCL</sub> a partir de glicose e frutose; isolada de solo de canavial	Gomez (2000); Taciro (2008); Cardinali-Rezende et al., (2015)
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM461	Mutante UV de LFM046, incapaz de produzir polihidroxicanoatos a partir de glicose e octanoato (PHA <sup>-</sup> )	Gomez (2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. 046:: <i>phaC</i> <sub>Re</sub>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>R. eutropha</i> em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. 461:: <i>phaC</i> <sub>Re</sub>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>R. eutropha</i> em seu cromossomo	Este trabalho



<i>Pseudomonas</i> sp. 046:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>A. hydrophila</i> em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. 461:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>A. hydrophila</i> em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. 046:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>Aeromonas</i> sp. em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. 461:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	Linhagem abrigando o gene de PHA sintase de <i>Aeromonas</i> sp. em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Pseudomonas</i> sp. 461 tn5:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	Linhagem construída usando o sistema mini-tn5, abrigando o gene de PHA sintase de <i>R. eutropha</i> em seu cromossomo	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Linhagem usada para propagação plasmidial	Durfee et al., (2008)
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	Linhagem conjugativa, abriga o gene pir ( <i>lysogenized lpir phage lysogen</i> ), necessário à propagação de vetores com origem de replicação R6K	Simon et al., (1983)
<b>Plasmídeos</b>		
pUC18T-mini-Tn7T-Gm (AY599232)	Vetor suicida para recombinação sítio específica no sítio <i>attTn7</i> ; Amp <sup>r</sup> ; ColE1-derived <i>ori</i>	Choi; Schweizer (2006)
pTNS3 (EU215432)	Plasmídeo <i>helper</i> , abrigando os genes <i>TnsABC+D</i> ; Amp <sup>r</sup>	Choi et al., (2008)
pFLP2 (AF048702)	Plasmídeo usado para excisão da marca de resistência a gentamicina inserida no genoma; Amp <sup>r</sup>	Choi; Schweizer (2006)

---

pFLP3 (AY597273)	Plasmídeo usado para excisão da marca de resistência a gentamicina; Tet <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	Choi et al., (2005)
pUC18T-mini-Tn7T-Gm:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	Vetor suicida abrigando a sequência <i>phaC</i> de <i>Ralstonia eutropha</i>	Este trabalho
pUC18T-mini-Tn7T-Gm:: <i>PphaPCJ<sub>Ah</sub></i>	Vetor suicida abrigando a sequência promotora do operon <i>phaC</i> de <i>A. hydrophila</i>	Este trabalho
pUC18T-mini-Tn7T-Gm:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	Vetor suicida abrigando a sequência de <i>A. hydrophila</i> a jusante da sequência promotora da mesma linhagem	Este trabalho
pUC18T-mini-Tn7T-Gm:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	Vetor suicida abrigando a sequência de <i>Aeromonas</i> sp TSM81 a jusante da sequência promotora de <i>A. hydrophila</i> .	Este trabalho
pBAMD1-6 (KM403115)	Vetor suicida baseado no transposon Tn5; <i>ori</i> (R6K); Amp <sup>R</sup> Gm <sup>R</sup>	Martínez-García et al., (2014)
pBAMD1-6:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	Vetor suicida abrigando a sequência <i>phaC</i> de <i>Ralstonia eutropha</i>	Este trabalho

---

Os vetores pUC18T-mini-Tn7T-Gm, pTNS3 e pFLP2 foram gentilmente doados pela Profa. Dra. Regina Lucia Baldini, do Instituto de Química da USP.

O vetor pFLP3 foi gentilmente doado pelo Dr. Herbert Schweizer, Professor Associado do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia da Colorado State University.

O plasmídeo suicida pBAMD1-6 foi gentilmente cedido pelo Dr. Pablo Ivan Nickel, do agrupamento de Biologia de Sistemas e Biologia Sintética - Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC, Espanha).

Quando necessário, foram adicionados antibióticos, nas concentrações indicadas na tabela 3.

**Tabela 3** - Antibióticos utilizados e concentrações finais no meio de cultura.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Carbencilina</b>	200 µg/mL
<b>Gentamicina</b>	15 a 30 µg/mL
<b>Tetraciclina</b>	<i>Escherichia coli</i> - 10 µg/mL <i>Pseudomonas</i> spp. - 20 a 50 µg/mL

## 4.2 Obtenção de linhagens recombinantes

### 4.2.1 Manipulação de DNA

Todas as manipulações de DNA foram realizadas segundo protocolos de laboratório estabelecidos (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) ou segundo instruções dos fabricantes do material em uso.

### 4.2.2 Amplificação de genes de interesse por PCR

Para amplificação dos genes de PHA sintase foram desenhados iniciadores, usando como base as sequências de DNA de *Ralstonia eutropha* H16, *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966) e *Aeromonas* sp. (TSM 81), disponíveis na literatura.

Para *Ralstonia eutropha*, foram desenhados iniciadores para amplificação do gene da PHA sintase juntamente com sua provável região promotora. No caso de *Aeromonas hydrophila*, devido à organização do operon *phaPCJ*, foi determinado um par de iniciadores para amplificação da região promotora, que se encontra no início do operon, a montante da sequência de *phaP*, e outro par de iniciadores para amplificar o gene *phaCAh*. A sequência referente à região promotora (*PphaPCJAh*) foi clonada à montante do gene *phaC* de *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas* sp. TSM 81, no plasmídeo pUC18T-mini-Tn7T-Gm.

O desenho de iniciadores foi realizado no *software* SnapGene® V3.2.1 (GSL Biotech; disponível em [snapgene.com](http://snapgene.com); ADAMES et al., 2015). Neste mesmo programa foram testadas *in silico* as etapas da clonagem, como PCR, digestão com enzimas de restrição e ligação. As sequências de DNA obtidas *in silico* foram usadas para gerar esquemas dos plasmídeos construídos.

Os iniciadores desenhados estão mostrados na tabela 4. A amplificação foi realizada a partir de DNA genômico purificado a partir das linhagens de interesse, assim como descrito na literatura (CHOI; SCHWEIZER, 2006).

**Tabela 4** - Iniciadores desenhados para amplificação das diferentes sequências de interesse por PCR. Os nucleotídeos em letra minúscula correspondem às regiões dos iniciadores não complementares ao DNA molde usado. O trecho sublinhado corresponde à sequência de restrição da enzima utilizada nos procedimentos de clonagem. Estão indicados o tamanho dos fragmentos amplificados (em pares de bases).

Gene	Iniciador	Sequência	Amplicon (pb)
Promotor operon <i>phaC<sub>Ah</sub></i> ( <i>PphaC<sub>Ah</sub></i> )	<i>Forward</i>	5'- atcactag <u>t</u> GCGACCATAGAGCACAGAGGCT (sequência de restrição: <i>SpeI</i> )	465
	<i>Reverse</i>	5' – agtaag <u>ctt</u> GGGTATTGCAAAGGCCG (sequência de restrição: <i>HindIII</i> )	
<i>phaC<sub>Ah</sub></i>	<i>Forward</i>	5'-atgaag <u>ctt</u> ATGCTCCGTCACGACAGGCT (sequência de restrição: <i>HindIII</i> )	1875
	<i>Reverse</i>	5'-tactc <u>g</u> cggaACCTCGAAGGGAGGCATGCTC (sequência de restrição: <i>NruI</i> )	
<i>phaC<sub>Asp</sub></i>	<i>Forward</i>	5'-actaag <u>ctt</u> CCTGCAGTTCAAGGAAGA (sequência de restrição: <i>HindIII</i> )	2062
	<i>Reverse</i>	5'-agttc <u>g</u> cggaTTGAAGTCCTCGGACAGG (sequência de restrição: <i>NruI</i> )	
<i>phaC<sub>Re</sub></i>	<i>Forward</i>	5'-acatgtgga <u>tcc</u> GGTCCATTCGGATAGCATCT (sequência de restrição: <i>BamHI</i> )	1994
	<i>Reverse</i>	5'-acgatgaag <u>ctt</u> GATACGATGACAACGTCAGT (sequência de restrição: <i>HindIII</i> )	

As temperaturas de anelamento para cada par de iniciadores foram padronizadas, por meio de PCR com gradiente de temperaturas em termociclador (Eppendorf, Hamburg, Germany), usando *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, USA), seguindo instruções do fabricante (Desnaturação inicial: 95 °C – 5 min; Ciclos de desnaturação/anelamento/amplificação (x 30): 95 °C - 45 seg, temp anelamento definida – 25 seg, 72 °C – 1 min/kb; 72 °C – 7 min; 4 °C – hold), de modo a obter maior rendimento e

eficiência nas clonagens, sendo escolhidas temperaturas que resultaram em amplificação de bandas mais fortes e com menor quantidade de bandas inespecíficas.

Para visualização dos fragmentos de DNA de interesse, os produtos de *PCR* foram carregados em gel de agarose 1,0%, sendo corridas eletroforéticas realizadas a 80 V por 50 a 60 minutos, em tampão TAE 1X (Composição do tampão TAE: Tris-Base 0,04 M; Ácido acético glacial 1 M; EDTA – pH 8,0 50 mM).

Após a padronização, as clonagens foram realizadas utilizando a enzima de alta fidelidade *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), seguindo instruções do fabricante (Desnaturação inicial: 98 °C – 30 seg; Ciclos de desnaturação/anelamento/amplificação (x 30): 98 °C - 10 seg, temp anelamento definida – 15 seg, 72 °C – 20 seg/kb; 72 °C – 7 min; 4 °C – hold).

Para confirmação das sequências, os amplicons foram usados em reações de sequenciamento, realizados no Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (CEGH IB-USP).

#### 4.2.3 Construção de plasmídeos recombinantes

Todos os plasmídeos utilizados foram purificados por meio do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). O DNA plasmidial, assim como cada um dos genes amplificados anteriormente foram digeridos com enzimas de restrição adequadas (*FastDigest* - Thermo Scientific), por 5 a 15 minutos a 37 °C, seguindo instruções do fabricante. Os produtos de digestão foram aplicados em gel de agarose e purificados com kit *Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System* (Promega). Após purificação, foram ligados ao fragmento de pUC18T-mini-Tn7T-Gm digerido, usando a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

#### 4.2.4 Transferência de plasmídeos recombinantes para linhagens hospedeiras

Para estocagem e replicação do DNA plasmidial recombinante, os plasmídeos construídos foram transferidos para *Escherichia coli* DH10B (DURFEE et al., 2008), no caso de pUC18T-miniTn7T-Gm, e *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983), no caso de pBAMD1-6, eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento *Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). O produto de eletrotransformação foi recuperado em meio LB e mantido em agitador rotativo a 37 °C, por 1 hora. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico carbenicilina na concentração adequada.

Após o período de incubação, foi realizada *PCR* para selecionar os clones que possuíam a construção. As colônias foram fervidas e o lisado celular foi usado como fonte de DNA

cromossômico, para *PCR* com os iniciadores usados para amplificação dos fragmentos de interesse (Tabela 4), assim como descrito na literatura (CHOI; SCHWEIZER, 2006).

Após a confirmação da presença das sequências de interesse por *PCR*, todos os plasmídeos foram purificados das linhagens hospedeiras e digeridos com a enzima *HindIII*. O produto de digestão foi usado em eletroforese em gel de agarose, para comparar o tamanho do vetor final com o plasmídeo sem inserto, digerido com a mesma enzima.

#### 4.2.5 *Recombinação sítio específica em Pseudomonas*

A partir dessas linhagens, foi feita purificação de DNA plasmidial, sendo esse produto de extração usado para eletrotransformação em *Pseudomonas*. Quando usado o sistema baseado no transposon Tn7, juntamente com o plasmídeo *helper* pTNS3, que contém os genes *tnsABC+D*, codificante para as proteínas necessárias para a recombinação sítio específica.

Para inserir os fragmentos de interesse nas linhagens de *Pseudomonas*, foram preparadas células eletrocompetentes de acordo com protocolo já descrito na literatura (CHOI; SCHWEIZER, 2006; CHOI; KUMAR; SCHWEIZER, 2006). Nesse protocolo, 6 ml de um cultivo *overnight* da bactéria de interesse são lavados por duas vezes com 1 ml de solução de sacarose a 300 mM, para retirada dos sais do meio de cultura e torná-las eletricamente competentes. Após o choque elétrico, as células foram recuperadas em 1 mL de meio LB e crescidas por 2 horas à 37 °C. Passado esse período, o cultivo foi centrifugado, descartado o sobrenadante e as células precipitadas foram ressuspensas em 100 µL da solução de sacarose 300 mM e, por fim, semeadas em meio LB com gentamicina (10 µL/mL). As placas foram incubadas em estufa a 30 °C por no máximo sete dias, ou até o aparecimento de colônias. Os clones obtidos foram transferidos para placas de LB com gentamicina (30 µL/mL).

#### 4.2.6 *Confirmação da inserção dos fragmentos no cromossomo de Pseudomonas*

Para confirmar a inserção dos fragmentos de DNA de interesse no cromossomo de *Pseudomonas*, foram realizadas *PCR* usando os iniciadores dos genes de interesse previamente clonados. O DNA genômico das linhagens obtidas foi utilizado como DNA molde nas reações de amplificação. Os produtos de amplificação tiveram seu tamanho confirmado por corrida eletroforética em gel de agarose e foram submetidos à reação de sequenciamento, para confirmar a sequência do fragmento.

#### 4.2.7 *Excisão da Marca de Resistência à Gentamicina*

Quando usado o sistema mini-Tn7 foram realizadas etapas para a retirada da marca de resistência à gentamicina inserida no genoma por estar no cassete juntamente com o gene de interesse. Nessa etapa, foi usado sistema de recombinação mediada por Flp-*FRT*. Os plasmídeos

pFLP2 e pFLP3 contém o gene codificante para a enzima flipase, que age sobre as sequências *FRTs*. Quando estas estão orientadas no mesmo sentido, ocorre recombinação mediada por flipases, resultando na eliminação de toda a sequência entre elas. No sistema utilizado neste estudo, as sequências *FRTs* flanqueiam o gene *aacC1*, responsável por conferir resistência à gentamicina à linhagem que o abriga. Ambos os plasmídeos contém o gene *sacB*, sendo codificante para uma proteína responsável por converter sacarose a um produto tóxico para a célula (GAY et al., 1983). Com isso, é possível selecionar os clones que perderam o vetor plasmidial por meio de crescimento em meio de cultura contendo sacarose.

Inicialmente, foi testado o plasmídeo pFPL2, pois este já estava disponível em linhagem do banco de cepas do Laboratório de Bioprodutos (LFM1297). A seleção de clones *aacC1* obtidos usando esse vetor foi dificultada pois, a linhagem LFM046 e seus mutantes são naturalmente resistentes a ampicilina e seus derivados, como carbenicilina. Esse fenótipo foi confirmado por semeadura da linhagem LFM046 em meio de cultura contendo carbenicilina, que resultou em seu crescimento. Desse modo, foi solicitado ao grupo do Dr. Herbert Schweizer, Professor Associado do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Patologia da Colorado State University, o plasmídeo pFLP3, que apresenta marcadores de resistência à ampicilina (codificada pelo gene *bla*) e à tetraciclina (codificada pelo gene *tet*).

O plasmídeo pFLP3 foi transformado em linhagem de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  por eletrotransformação, para armazenamento e estocagem. Após purificação a partir dessa linhagem, pFLP3 foi inserido nas linhagens de *Pseudomonas* recombinantes construídas, também por eletrotransformação.

Com os clones obtidos de cada linhagem, foram feitos testes fenotípicos e genotípicos para verificar que a resistência à gentamicina foi perdida. Em relação aos testes fenotípicos, os clones foram semeados em LB gentamicina e LB, sendo realizada contra seleção das linhagens que apresentavam crescimento em LB, mas não em LB gentamicina. Os clones selecionados nesta etapa passaram por teste genotípico, com amplificação de toda a sequência entre os sítios Tn7, por *PCR*, para confirmar a perda do gene *aacC1*. Além disso, foram desenhados iniciadores para confirmar a ocorrência de recombinação sítio específica, assim como o tamanho da sequência de nucleotídeos inserida. O desenho foi feito com base na sequência do plasmídeo pUC18T-mini-Tn7T-Gm (AY599232), de modo a amplificar as bases entre os sítios Tn7-R e Tn7-L. As sequências dos iniciadores desenhados são:

*RecTn7R*: 5'-TGTGGGCGGACAATAAAGTCTTAAAC;

*RecTn7L*: 5'-GGAAGTAGATTTCACCTTATCTGGTT.

Os clones que não apresentaram fragmento no tamanho de *aacCI* (aproximadamente 500 pb) foram cultivados em meio LB contendo sacarose (5%), sendo possível selecionar as células que perderam o plasmídeo pFLP3, devido à toxicidade do produto gerado pela proteína resultante da expressão do gene *sacB*.

### 4.3 Condições de cultivo para a produção de PHA pelos recombinantes

#### 4.3.1 Meios de cultura

Os cultivos foram realizados em meio Luria Bertani (LB) (BERTANI, 1951) ou meio mineral (MM) (RAMSAY et al., 1990) modificado (ROCHA et al., 2008), cujas composições estão descritas abaixo:

LB – Triptona (10 g/L); Extrato de Levedura (5 g/L); NaCl (5 g/L);

MM – Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (3,5 g/L); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 g/L); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 g/L); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O Sol. 20% (1 mL/L); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O Sol. 1% (1 mL/L); Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6% (1 mL/L); Solução de elementos traços (1 mL/L). A solução de elementos traços é constituída por: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (0,30 g/L); CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,20 g/L); ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,10 g/L); MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O (0,03 g/L); NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,03 g/L); NiCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,02 g/L); CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,01 g/L).

Para induzir a perda do plasmídeo pFLP3 foi adicionado sacarose ao meio LB, em concentração final de 5%.

#### 4.3.2 Experimentos em agitador rotativo

As linhagens bacterianas foram cultivadas a 30 °C, sob agitação de 150 rpm durante 72 horas. Os cultivos foram realizados em triplicata, em meio mineral líquido desbalanceado, ou seja, com excesso de fonte de carbono (20 g/L) e limitação de nitrogênio (1 g/L). Essa condição favorece o acúmulo de PHA quando a concentração de nitrogênio é reduzida devido ao crescimento bacteriano. O pré-inóculo foi cultivado *overnight* em meio LB, sendo esta cultura transferida para meio mineral, de modo a representar 10% do volume final. Ao início e final do experimento foram tomadas amostras, em duplicata analítica, para determinação de massa seca celular (MCS), concentração de fonte de carbono (glicose), pH do meio de cultura e quantidade e composição dos PHA produzidos.

Como controle positivo do experimento foi usada a linhagem LFM046, boa produtora de PHA com monômeros de cadeia média, tendo capacidade de acúmulo de até 60% de sua



massa sua massa seca celular em agitador rotativo. Já como controle negativo foi usada a linhagem LFM461, deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose e octanoato.

#### 4.4 Metodologias analíticas

##### 4.4.1 Massa seca celular

A massa seca celular foi determinada por gravimetria, centrifugando-se 10 mL do cultivo (10600 x g, 10 min, 4 °C), liofilizando o precipitado que foi posteriormente pesado.

##### 4.4.2 Carboidratos

A concentração de glicose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os carboidratos foram detectados por meio de índice de refração (GOMEZ et al., 1996; MENDONÇA et al., 2013).

##### 4.4.3 Quantidade e composição de PHA

Um volume de 10 ml do cultivo foi centrifugado, sendo o precipitado de células liofilizado e submetido à reação de propanólise (RIIS; MAI, 1988), descrita abaixo:

- a. Reagentes: 1,2 dicloroetano; solução contendo 4 volumes de N-Propanol para 1 volume de Ácido Clorídrico concentrado; solução de Padrão Interno (PI): Ácido Benzoico a 4% (10 g em 250 ml de N-Propanol), seco à vácuo por 2 horas a 50 °C.
- b. Procedimentos: 0,1 ml da solução ácido benzoico (PI); 2 ml da solução de propanol-HCl; 2 ml de 1,2 dicloroetano. Fechar os tubos fortemente, agitar vigorosamente e colocar os tubos em Banho-Maria à 105 °C por 3 horas. Agitar na primeira meia hora. Após o resfriamento dos tubos, adicionar 4,0 ml de água destilada e agitar vigorosamente por 30 segundos. Recuperar a fase orgânica no fundo do tubo para análise. Adicionar sulfato de sódio anidro, até que não fique mais turvo, que indica a presença de água.

Os propil-ésteres obtidos foram analisados em Cromatografo Gasoso Agilent 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA), seguindo protocolo anteriormente descrito (MENDONÇA et al., 2013). Como padrão interno foi usado ácido benzoico. Os padrões externos usados foram P(3HB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e PHA<sub>MCL</sub> produzido por *P. putida* ATCC 29347 ou *Pseudomonas* sp.

Condições de operação do cromatógrafo:

Coluna Capilar, HP-1 (Agilent Technologies): 30 m.0,25 mm.0,25 µm.

Gás da fase móvel: Nitrogênio; Gás da chama do detector: Hidrogênio/Ar sintético; Gás do make-up: nitrogênio.

Temperatura do Injetor: 250 °C; Temperatura do detector (FID): 300 °C; Temperatura da coluna inicial: 100 °C; Tempo 1: 3 min; Velocidade de subida da temperatura: 6 °C/min; Temperatura 2: 180 °C; Tempo 2: 5 min; Velocidade de subida da temperatura: 6 °C/min; Temperatura: 240 °C; Vazão da coluna: 0,6 ml/min; Make-up: 25,0 ml/min; Hidrogênio: 30,0 ml/min; Ar sintético: 300,0 ml/min.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para obtenção de recombinantes abrigando PHA sintases em seu DNA cromossômico foram realizadas as seguintes etapas: 1. Desenho de iniciadores para clonagem dos genes, a partir de sequências disponíveis na literatura e bancos de dados; 2. Clonagem dos genes de interesse no plasmídeo pUC18T-miniTn7T-Gm e pBAMD1-6, que foram inseridos em *E. coli* DH10B e *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir, respectivamente; 3. Transferência dos plasmídeos para as linhagens *Pseudomonas* LFM046 e LFM461, juntamente com o vetor *helper* pTNS3, quando necessário, para integração das sequências de interesse em seu DNA cromossômico; 4. Seleção dos recombinantes em meio de cultura acrescido gentamicina, devido à presença do gene *aacC1*, que é inserido no cromossomo juntamente com o gene de interesse (diferentes *phaC*); 5. Excisão da marca de resistência à gentamicina por meio dos genes codificantes para flipases, presentes no vetor pFLP3, quando usado o sistema mini-Tn7; 6. Confirmação das sequências inseridas por meio de *PCR* e sequenciamento; 7. Ensaios em agitador rotativo para avaliação da quantidade e composição dos PHA acumulados.

### 5.1 Construção de DNA recombinante

#### 5.1.1 Padronização das condições das reações de amplificação por *PCR* para clonagem de sequências

A partir de sequências disponíveis na literatura e no *GenBank*, foram desenhados iniciadores para amplificação dos fragmentos de interesse por *PCR*, seguindo os passos para clonagem. Para isso aos iniciadores desenhados foram adicionados sítios de restrição adequados, isto é, presentes no sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo pUC18T-miniTn7T-Gm e pBAMD1-6 e que não fragmentam o DNA de interesse em regiões inadequadas. Foram escolhidas enzimas distintas e não complementares, para evitar a recircularização do vetor entre as etapas de digestão e ligação.

Foi realizado teste dos iniciadores desenhados e padronização da temperatura de anelamento para as sequências posteriormente clonadas: região promotora de *phaPCJ*, gene de PHA sintase de *Aeromonas hydrophila*, gene de PHA sintase de *Aeromonas* sp. TSM 81 e gene de PHA sintase de *Ralstonia eutropha*.

De acordo com a literatura e os resultados das amplificações realizadas *in silico*, concluiu-se que os iniciadores desenhados amplificam fragmentos de DNA do tamanho esperado (Tabela 4). As temperaturas escolhidas para cada par de iniciadores estão indicadas na tabela 5.

**Tabela 5** - Temperaturas de anelamento utilizadas nas reações de amplificação por *PCR*, para cada um dos fragmentos de DNA de interesse.

Fragmento de DNA	Temperatura de anelamento usada
<i>PphaC<sub>Ah</sub></i>	65 °C
<i>phaC<sub>Ah</sub></i>	65 °C
<i>phaC<sub>Asp</sub></i>	55,6 °C
<i>phaC<sub>Re</sub></i>	63 °C

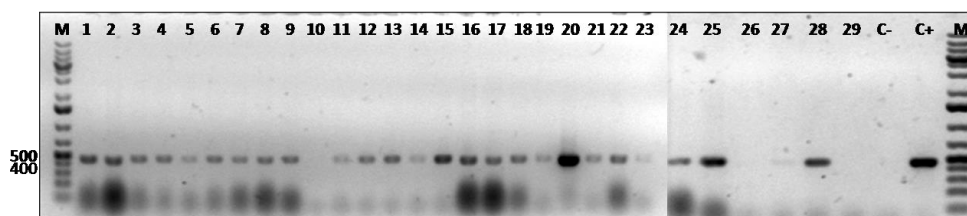
### 5.1.2 Construção de plasmídeos recombinantes

Após a inserção dos produtos de ligação em *E. coli* DH10B ou *E. coli* S17-1  $\lambda$ pir, por eletrotransformação, das colônias obtidas passaram por triagem mediante *PCR*, seguida de eletroforese em gel de agarose, para confirmar a presença de plasmídeo com os insertos de interesse.

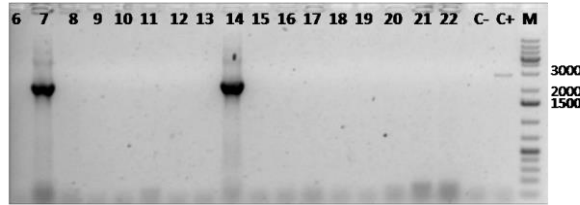
Nesta etapa, uma colônia por construção de interesse foi escolhida, sendo usada para as etapas seguintes.

A clonagem da sequência referente à região promotora do operon *phaPCJ* de *A. hydrophila* se mostrou eficiente, já que a maioria dos clones obtidos apresentou um fragmento do tamanho esperado. O plasmídeo obtido nesta etapa foi usado para as clonagens subsequentes dos genes *phaC<sub>Ah</sub>* e *phaC<sub>Asp</sub>*. Também foram facilmente obtidos clones positivos, porém em menor quantidade.

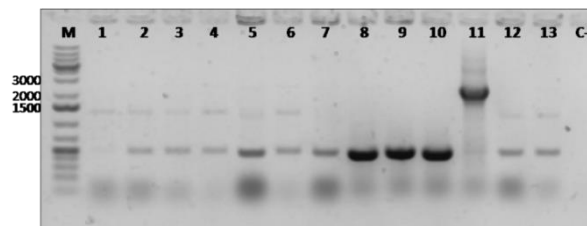
As figuras 4, 5 e 6 mostram os perfis eletroforéticos das triagens referentes à sequência promotora (Figura 4), aos genes de PHA sintase de *A. hydrophila* (Figura 5) e de *Aeromonas* sp. TSM81 (Figura 6). O mesmo foi realizado com o gene de *Ralstonia eutropha*, sendo o resultado de acordo com o esperado.



**Figura 4** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm + promotor *phaPCJ<sub>Ah</sub>*. **M**. Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 29**: clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B); **C+**. Controle positivo (uso de DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*).

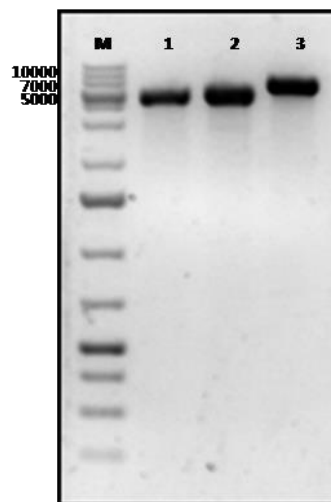


**Figura 5** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm::promotor + *phaCAh*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **6 a 22:** clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B); **C+**. Controle positivo (uso de DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*).



**Figura 6** - Perfil de migração em gel de agarose de produtos de *PCR* usando DNA total de colônias obtidas após eletrotransformação com a ligação pUC18T-miniTn7T-Gm::promotor + *phaCAsp*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 13:** clones candidatos; **C-**. Controle negativo (uso de DNA genômico de *E. coli* DH10B). Não há controle positivo por se tratar da construção de um DNA recombinantes de espécies diferentes.

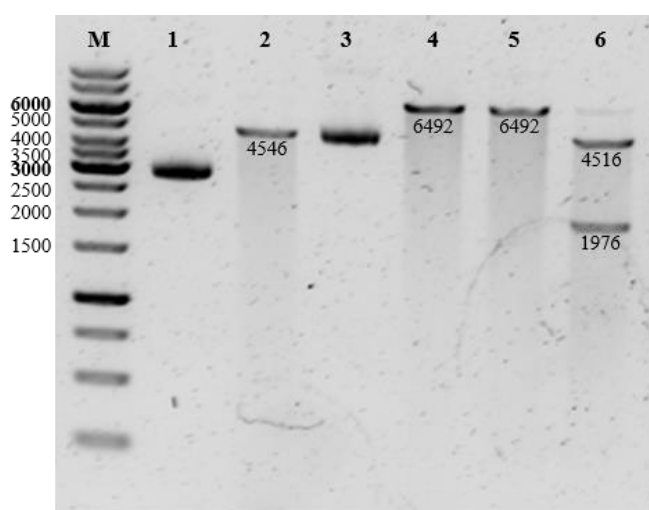
Como pode ser observado na figura 7, as construções plasmidiais apresentaram tamanho correspondente ao esperado para o vetor ligado às sequências de interesse.



**Figura 7** - Perfil eletroforético dos produtos de digestão simples com a enzima de restrição *HindIII*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1.** pUC18T-miniTn7T-Gm digerido com *HindIII*. **2.** pUC1818T-miniTn7T-Gm::*PphaPCJAh* digerido com *HindIII*; **3.** pUC18T-miniTn7T-Gm:: *PphaPCJAh+phaCAh* digerido com *HindIII*. Na imagem, observa-se que o tamanho dos plasmídeos com o inserto (canaletas 2 e 3) é maior que o plasmídeo vazio (canaleta 1), assim como esperado.

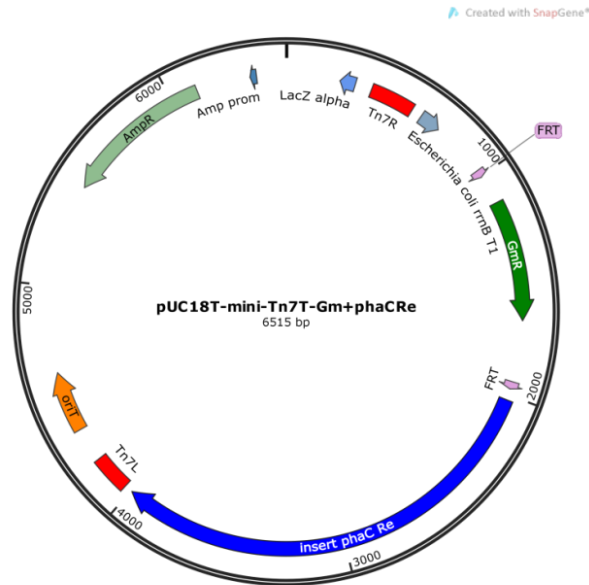
O mesmo foi feito com o plasmídeo pUC18T-miniTn7T-Gm::PphaPCJ<sub>Ah</sub>+phaC<sub>Asp</sub>, sendo confirmada a inserção da sequência promotora e da sequência do gene PHA sintase da linhagem *Aeromonas* sp. TSM81.

No caso do vetor pBAMD1-6, foi confirmada a inserção do gene *phaC<sub>Re</sub>* usando os mesmos iniciadores já descritos na tabela 4. Além disso, o vetor purificado foi submetido a digestão com enzimas de restrição, de modo a confirmar seu tamanho final e o tamanho do amplicon inserido. O perfil eletroforético dessa digestão está ilustrado na figura 8, a qual confirma os tamanhos esperados para o vetor ligado ao fragmento de interesse (tamanho total de 6540 pb).

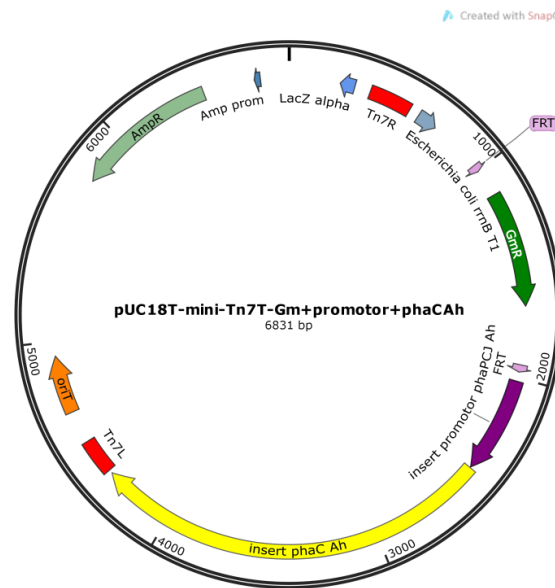


**Figura 8** - Perfil eletroforético dos produtos de digestão usados para confirmação da clonagem da sequência *phaC<sub>Re</sub>* em pBAMD1-6. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb; **1.** pBAMD1-6 não digerido; **2.** pBAMD 1-6 + *HindIII*; **3.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* não digerido; **4.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *BamHI*; **5.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *HindIII*; **6.** pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>* + *BamHI/HindIII*.

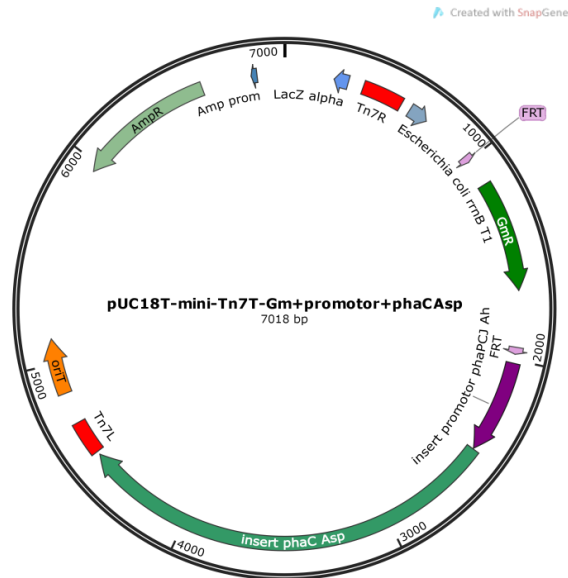
Os plasmídeos construídos neste trabalho estão esquematizados nas figuras 9, 10, 11 e 12. Em cada figura estão indicados os componentes de interesse do vetor pUC18T-mini-Tn7T-Gm e pBAMD1-6, assim como os fragmentos inseridos em cada uma das construções.



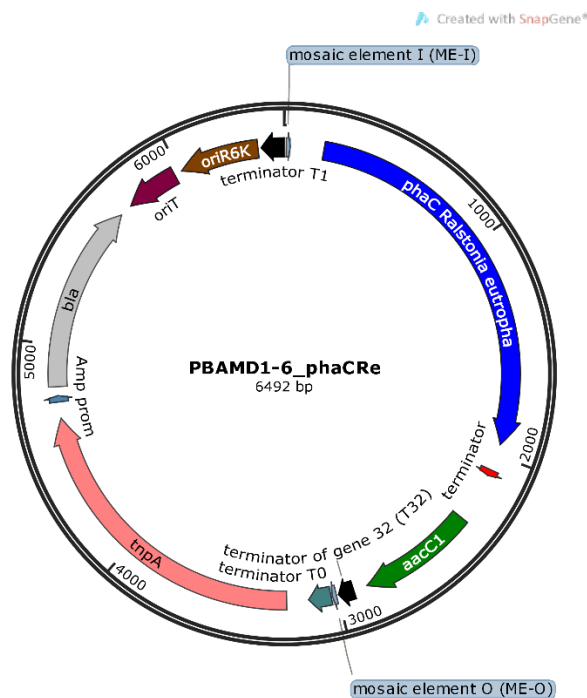
**Figura 9** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaC<sub>Re</sub>*, construído para transferir a sequência *phaC<sub>Re</sub>* para o genoma de *Pseudomonas*.



**Figura 10** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaCA<sub>h</sub>*, construído para transferir a sequência *phaCA<sub>h</sub>*, juntamente com sua sequência promotora original para o genoma de *Pseudomonas*.



**Figura 11** - Vetor de recombinação sítio específica pUC18T-mini-Tn7T-Gm::*phaC<sub>Asp</sub>*, construído para transferir a sequência *phaC<sub>Asp</sub>*, juntamente com a sequência promotora da linhagem *Aeromonas hydrophila* para o genoma de *Pseudomonas*.



**Figura 12** - Vetor de recombinação ao acaso pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>*, construído para inserção da sequência *phaC<sub>Re</sub>* em *Pseudomonas*.

## 5.2 Avaliação de linhagens recombinantes de *Pseudomonas*

### 5.2.1 Crescimento em gentamicina

Após eletrotransformação do vetor derivado de mini-Tn5 ou mini-Tn7 construído, juntamente com o plasmídeo *helper* pTNS3 quando necessário, nas linhagens LFM046 e



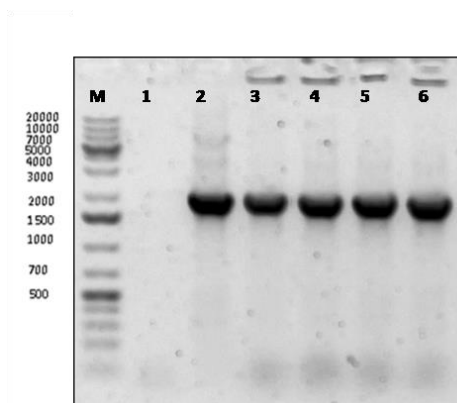
LFM461, as células foram recuperadas em LB por 2 horas, a 37 °C. Após esse período, as células foram semeadas em meio LB gentamicina (15 µg/mL). Optou-se por usar essa concentração final de antibiótico, pois após várias tentativas de recombinação com semeadura em meio contendo gentamicina a 30 µg/mL não foi observado crescimento de colônias. Os clones obtidos em LB gentamicina 15 µg/ml cresciam normalmente quando transferidos para LB gentamicina 30 µg/mL. As placas de Petri com meio de cultura foram mantidas em estufa a 30 °C por até 96 horas ou até ser observado crescimento de colônias.

Usando o sistema baseado em Tn7, poucos clones resistentes à gentamicina foram obtidos (entre um e quinze), porém todos foram confirmados como recombinantes. Especialmente em relação ao uso do sistema baseado em Tn5, neste trabalho o vetor pBAMD1-6::*phaC<sub>Re</sub>*, com o qual seria muito interessante obter diversos clones de modo a avaliar o melhor *loci* gênico para inserção da sequência *phaC*, foi obtido apenas um clone recombinante após diversas tentativas de eletrotransformação. Como forma de teste, o mesmo vetor, assim como pBAMD1-6, foram usados para transformação da cepa EM42 (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2014b), linhagem recombinante derivada de *P. putida* KT2440, sendo obtidos diversos clones candidatos resistentes à gentamicina. Em trabalho recentemente publicado pelo mesmo grupo de pesquisa que desenvolveu os vetores pBAMD, foi indicado que a obtenção de mutantes é mais eficiente quando realizada transferência do vetor suicida por conjugação (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2017). Utilizando o protocolo de conjugação descrito, foram obtidos cerca de 200 clones candidatos, resistentes à gentamicina.

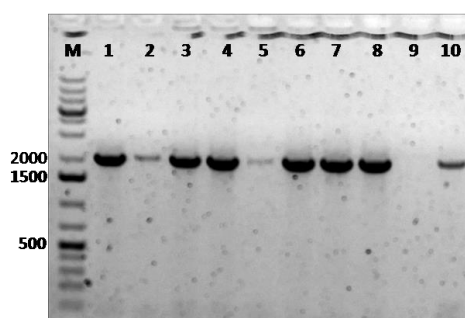
### 5.2.2 Confirmação da inserção do DNA de interesse no cromossomo de LFM046 e LFM461

Os clones obtidos na etapa anterior tiveram seu DNA genômico purificado e usado como DNA molde em reação de *PCR*, para confirmação da inserção das sequências de interesse no cromossomo. Os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para visualização dos fragmentos amplificados.

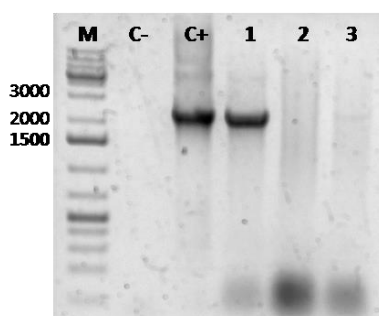
Os perfis eletroforéticos mostrados nas figuras 13 a 18 mostram os resultados obtidos para as linhagens 046::*phaC<sub>Re</sub>*, 461::*phaC<sub>Re</sub>*, 046::*phaC<sub>Ah</sub>*, 461::*phaC<sub>Ah</sub>*, 461::*phaC<sub>Asp</sub>* e 461 tn5::*phaC<sub>Re</sub>*, respectivamente. Foi construída, também, a linhagem *phaC<sub>Asp</sub>*, que teve a inserção da sequência *phaC<sub>Asp</sub>* confirmada do mesmo modo por *PCR*. Apenas os clones candidatos positivos na *PCR* foram utilizados nas seguintes etapas.



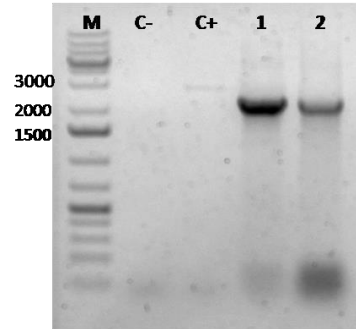
**Figura 13** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM046 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Re</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1.** Controle negativo; **2.** Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Ralstonia eutropha*); **3 a 6.** Clones candidatos.



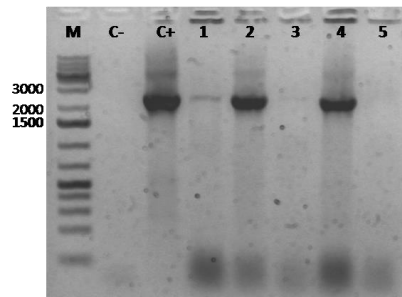
**Figura 14** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Re</sub>*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **1 a 8.** Clones candidatos; **9.** Controle negativo; **10.** Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Ralstonia eutropha*).



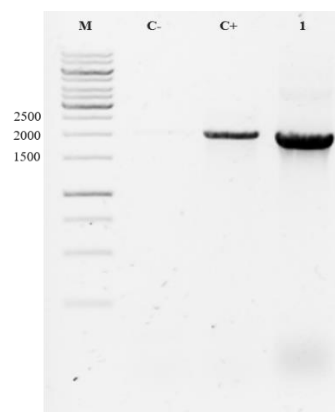
**Figura 15** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM046 em que foi inserido o gene *phaC<sub>Ah</sub>*, juntamente com sua sequência promotora original. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-.** Controle negativo; **C+.** Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*); **1 a 3.** Clones candidatos.



**Figura 16** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaCAh*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como molde DNA genômico de *Aeromonas hydrophila*); **1 e 2.** Clones candidatos.



**Figura 17** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com clones obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaCAsp* a jusante da sequência promotora do operon *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila*. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como DNA molde plasmídeo construído em etapa anterior); **1 a 5.** Clones candidatos.



**Figura 18** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com um dos clones candidatos obtidos da linhagem LFM461 em que foi inserido o gene *phaCRe* por meio do sistema mini-Tn5. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb; **C-**. Controle negativo; **C+**. Controle positivo (usado como DNA molde plasmídeo construído em etapa anterior); **1.** Clone candidato.

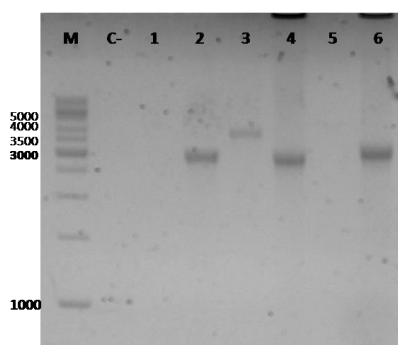
### 5.2.3 Confirmação por PCR da perda do gene *aacCI*

Inicialmente foi usado o plasmídeo pFLP2 para retirada da marca de resistência à gentamicina. Porém, pela dificuldade em obter recombinantes *aacCI*<sup>r</sup>, foi realizado teste de resistência com as linhagens LFM046 e LFM461, no qual verificou-se que ambas são naturalmente resistentes à ampicilina. Assim, optou-se pelo uso do vetor pFLP3, que confere resistência ao antibiótico tetraciclina, sendo que LFM046 e LFM461 são naturalmente sensíveis a este.

Com o uso de pFLP3, foram obtidos inúmeros clones, sendo necessário diluir de forma seriada até 10<sup>-5</sup> o produto de eletrotransformação antes de semear em LB. Os clones resultantes passaram por *screening* por *PCR*, com o qual confirmou-se a perda do gene *aacCI*.

Para confirmar que o fragmento perdido se tratava do inserido pelas manipulações genéticas realizadas para a inserção das diferentes PHA sintases, foi feita *PCR* com iniciadores desenhados, que amplificam tudo que está entre os sítios Tn7. O resultado da eletroforese em gel de agarose dos produtos das ampliações está mostrado na figura 19.

Neste perfil eletroforético foi verificado que as linhagens Gm<sup>r</sup> apresentavam amplicon aproximadamente 500 pb a mais que as linhagens Gm<sup>s</sup>. Esse fragmento de 500 pb a mais corresponde a sequência do gene *aacCI*. Esse perfil, juntamente com os testes fenotípicos realizados, confirma que a sequência *aacCI* foi excisada do cromossomo dos recombinantes construídos (canaletas 2, 4 e 6 da figura 19 – cepas Gm<sup>s</sup> têm fragmento 500 pb menor que a cepa Gm<sup>r</sup> na canaleta 3)



**Figura 19** - Perfil eletroforético de migração de produtos de *PCR* realizado com os recombinantes obtidos, resistentes e não resistentes à gentamicina, usando iniciadores desenhados para amplificação de bases inseridas entre as sequências Tn7R e Tn7L. **M.** Marcador de peso molecular 1 kb Plus; **C-.** Controle negativo; **1.** 046::*phaCAh* Gm<sup>r</sup>; **2.** 046::*phaCAh* Gm<sup>s</sup>; **3.** 461::*phaCAh* Gm<sup>r</sup>; **4.** 461::*phaCAh* Gm<sup>s</sup>; **5.** 461::*phaCAsp* Gm<sup>r</sup>; **6.** 461::*phaCAsp* Gm<sup>s</sup>. Linhagens Gm<sup>s</sup> apresentaram amplicon 500 pb menor que o de linhagens Gm<sup>r</sup>, assim como esperado.

As linhagens Gm<sup>s</sup> obtidas nessa etapa foram usadas nos experimentos posteriores, com objetivo de avaliar suas capacidades de acúmulo de polihidroxialcanoatos.

#### 5.2.4 Confirmação de clonagens por meio de alinhamento dos fragmentos de DNA amplificados e sequenciados

As linhagens recombinantes Gm<sup>s</sup> obtidas tiveram seu DNA cromossômico purificado e utilizado como molde em *PCR* usando os iniciadores específicos para cada um dos insertos. Os amplicons obtidos foram purificados e enviados para sequenciamento, de modo a confirmar suas seqüências. Os cromatogramas foram analisados no *software Staden Package* (BONFIELD; STADEN, 1996) e a seqüência consenso foi comparada com as bases de dados depositadas no *GenBank*, por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) do NCBI.

Apesar do tipo de sequenciamento realizado só permitir obter até aproximadamente 600 pb em cada sentido, as seqüências obtidas foram complementares às disponíveis na literatura, como se pode verificar no Apêndice A.

Os resultados do BLAST das seqüências obtidas com as linhagens em que foi inserido o gene *phaC* de *Aeromonas hydrophila* mostraram identidade de 100% e 99%, nos fragmentos *forward* e *reverse*, respectivamente, com o genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

Para o gene *phaC* de *Aeromonas* sp. TSM81, foi obtida similaridade de 100% com o genoma de *Aeromonas hydrophila* na seqüência *forward*, o que se explica pelo fato de ter sido usado o promotor dessa linhagem na clonagem. Na seqüência *reverse*, foi obtida similaridade de 88% com outras cepas de *Aeromonas*, já que o genoma de TSM81 não está disponível na literatura. Quando realizado BLAST com seqüência do operon *phaPCJ* de TSM81 disponível no Laboratório de Bioprodutos (CESPEDES, 2016; MENDONÇA, 2014), foi obtida identidade de 99%.

No caso do gene *phaC* de *Ralstonia eutropha*, foram obtidas identidade de 99% tanto na seqüência *forward*, quanto na *reverse*, com a seqüência de PHA sintase da linhagem *Ralstonia eutropha*.

Os valores de identidade obtidos indicam que as clonagens e recombinações sítio-específicas foram bem-sucedidas.

### 5.3 Ensaios de acúmulo em agitador rotativo

A capacidade de acúmulo de PHA pelas linhagens recombinantes obtidas usando o sistema baseado em Tn7 foi testada em ensaio em agitador rotativo, tendo glicose como única fonte de carbono. Os cultivos duraram 72 horas. Os 200 clones candidatos obtidos utilizando o sistema baseado em Tn5 não foram avaliados nesta etapa, estando assim pendente de avaliação quanto a sua capacidade de acúmulo de PHA.

### 5.3.1 Consumo de fonte de carbono

Após processamento das amostras, alíquotas de sobrenadante foram analisadas em HPLC para determinação da concentração de glicose no meio de cultura no início e ao final do experimento. Os dados obtidos para cada triplicada estão disponíveis no Apêndice B. As médias das concentrações de glicose de cada grupo experimental estão indicadas na tabela 6.

Foi verificado que a linhagem LFM046, assim como todas as recombinantes construídas a partir dela, esgotaram a fonte de carbono fornecida (cerca de 20 g/L de glicose) em 72 horas de experimento, usando-a como fonte de energia para crescimento e fonte de carbono para síntese de precursores e PHA.

Já a linhagem LFM461, PHA<sup>-</sup>, exibiu menor consumo de glicose, assim como suas recombinantes. Essas linhagens consomem menor quantidade de glicose pois não produzem PHA (Tabela 7), ou seja, a glicose consumida é usada para crescimento, geração de energia (ATP) e precursores do metabolismo. Dentre as linhagens recombinantes de LFM461, a linhagem abrigando o gene *phaC* de *A. hydrophila* (461::*phaC<sub>Ah</sub>*) foi a que apresentou maior consumo de glicose devido a seu melhor desempenho no acúmulo de PHA, como apresentado na Tabela 7 e explorado adiante.

**Tabela 6** - Médias das concentrações iniciais e finais (após 72 horas de experimento) de glicose em cada linhagem em ensaio de acúmulo de PHA. O desvio padrão dos valores da quantidade consumida está indicado. Os dados se referem à triplicata biológica e duplicata analítica.

Linhagem	Inicial	Final		Consumido
LFM046	20,00	0,00	±0,00	20,00
046:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	20,00	0,00	±0,00	20,00
046:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	20,00	0,00	±0,00	20,00
046:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	20,00	0,00	±0,00	20,00
LFM461	20,00	4,81	±0,27	15,19
461:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	20,00	4,11	±0,52	15,89
461:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	20,00	1,99	±0,64	18,01
461:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	20,00	3,97	±0,54	16,03

### 5.3.2 Avaliação da produção de PHA

A tabela 7 mostra as médias e desvios padrões dos valores obtidos de acúmulo de cada tipo de monômero da família dos polihidroxicanoatos para cada linhagem, em ensaio de 72

horas, com glicose como única fonte de carbono. Os dados obtidos para cada triplicada estão disponíveis no Apêndice B.

**Tabela 7** - Avaliação da produção de PHA por linhagens recombinantes de *Pseudomonas*. São mostradas as médias e desvios padrão obtidos de triplicata biológica e duplicata analítica dos seguintes dados: pH final do cultivo (após 72 h), massa seca celular (MSC em g/L), quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%.

Linhagem	MSC (g/L)		PHA (mol%)								PHA (%MSC)			
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd							
LFM046	6.19	±0.35	0.00	±0.00	2.50	±0.21	33.23	±0.62	59.57	0±.83	4.69	±0.40	43.79	±2.97
046:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	6.78	±0.53	0.00	±0.00	2.69	±0.23	33.77	±0.44	58.90	±0.48	4.56	±0.11	41.13	±0.70
046:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	7.48	±1.30	3.44	±0.29	2.34	±0.13	28.19	±0.49	60.01	±0.30	6.02	±0.49	32.62	±1.72
046:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	7.45	±1.40	0.00	±0.00	2.56	±0.17	32.31	±0.53	60.34	±0.38	4.79	±0.08	41.06	±6.03
LFM461	6.37	±2.36	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00
461:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	6.78	±0.53	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	100	±0.00	0.00	±0.00	0.51	±0.02
461:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	4.69	±0.76	84.2	±1.95	6.30	±0.95	0.00	±0.00	9.50	±1.14	0.00	±0.00	1.96	±0.36
461:: <i>phaC<sub>Asp</sub></i>	4.16	±0.97	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00	0.00	±0.00

Legenda: MSC: Massa seca celular; 3HB: 3-hidroxibutirato; 3HHx: 3-hidroxihexanoato; 3HO: 3-hidroxi octanoato; 3HD: 3-hidroxidecanoato; 3HDd: 3-hidroxidodecanoato.



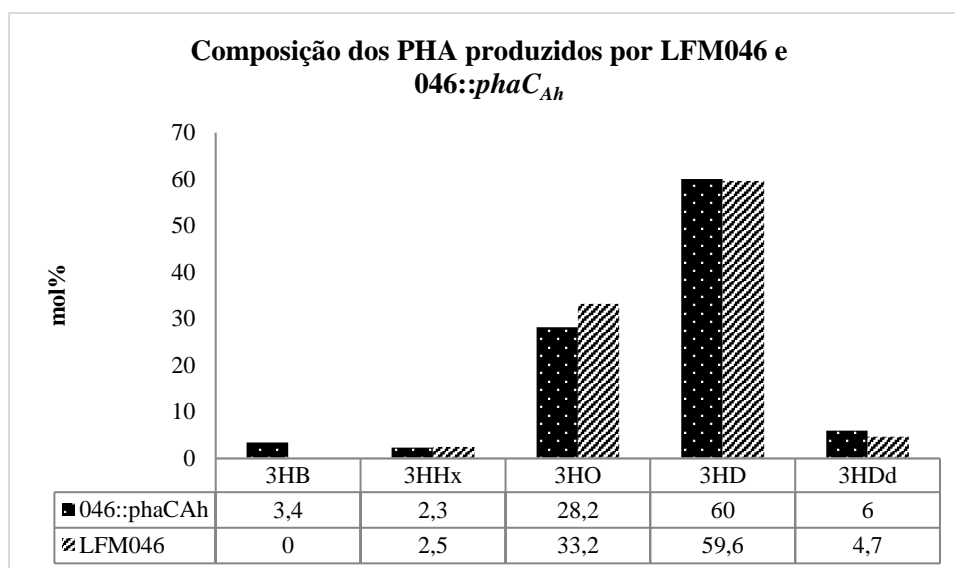
Verificou-se que *Pseudomonas* sp. LFM046 atingiu massa seca celular de 6,19 g/L, sendo destes, cerca de 44% de PHA. As análises por cromatografia gasosa dos propil-ésteres após reação de propanólise mostraram que a composição monomérica dos polímeros produzidos foi: 2,50 mol% de 3HHx, 33,23 mol% de 3HO, 59,57 mol% de 3HD e 4,69 mol% de HDd. Esses resultados são compatíveis com os reportados na literatura (GOMES, 2009; GOMEZ, 2000; TACIRO, 2008).

O recombinante 046::*phaC<sub>Re</sub>* apresentou massa seca celular de 6,78 g/L, sendo destes 41,13% de PHA, com a seguinte composição monomérica 2,69 mol% de 3HHx, 33,77 mol% de 3HO, 58,90 mol% de 3HD e 4,56 mol% de HDd.

O recombinante 046::*phaC<sub>Asp</sub>* apresentou massa seca celular de 7,45 g/L, sendo destes 41,06% de PHA, com a seguinte composição monomérica: 2,56 mol% de 3HHx, 32,31 mol% de 3HO, 60,34 mol% de 3HD e 4,79 mol% de 3HDd. Tanto a quantidade quanto a composição de PHA acumulados por estes dois recombinantes foram bastante semelhantes com os dados obtidos para a linhagem selvagem LFM046.

O recombinante 046::*phaC<sub>Ah</sub>* apresentou massa seca celular de 7,48 g/L, sendo destes 32,62% de PHA, com a seguinte composição monomérica: 3,44 mol% de 3HB, 2,34 mol% de 3HHx, 28,19 mol% de 3HO, 60,01 mol% de 3HD e 6,02 mol% de 3HDd. Dentre os recombinantes de LFM046, este foi o que apresentou acúmulo do polímero desejado, contendo o monômero 3HB em sua composição.

A análise dos polímeros produzidos mostra que sua constituição é de monômeros de cadeia curta e cadeia média. As linhagens recombinantes apresentam duas PHA sintases, sua original com afinidade por monômeros de cadeia média e a introduzida pelas técnicas moleculares com afinidade por monômeros de cadeia curta e média. De acordo com a literatura, linhagens com duas PHA sintases de classes diferentes produzem polímeros do tipo blenda, armazenados em grânulos separados (PREUSTING et al., 1993; TIMM; BYROM; STEINBÜCHEL, 1990). Na Figura 20 estão comparadas as composições dos PHA produzidos por LFM046, linhagem selvagem, e 046::*phaC<sub>Ah</sub>*, recombinante que produziu provável blenda de PHA com a composição de interesse.



**Figura 20.** Composição (em mol%) dos PHA produzidos por LFM046 e 046::*phaC<sub>Ah</sub>* a partir de glicose.

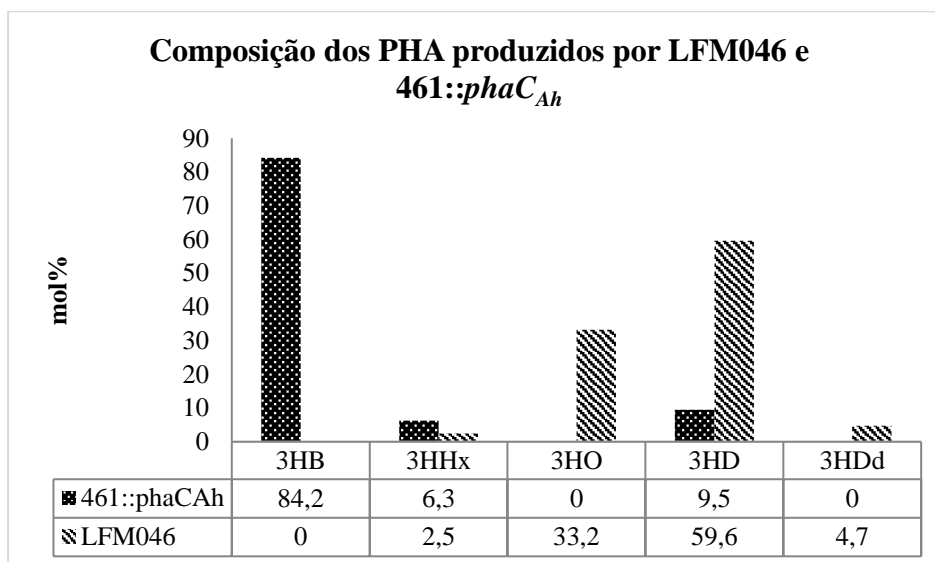
A quantidade total de PHA acumulada foi menor quando comparado com a linhagem selvagem LFM046, a qual teve acúmulo de 43,79% da massa seca celular na forma de PHA (GOMEZ, 2000; TACIRO, 2008).

Os resultados obtidos com a linhagem mutante LFM461 (mutante UV de LFM046), confirmam o fenótipo PHA<sup>-</sup> desta linhagem, quando fornecida glicose como única fonte de carbono (GOMEZ, 2000). Em relação aos recombinantes produzidos a partir dessa linhagem, os experimentos realizados indicam que a inserção do gene de PHA sintase de *Aeromonas hydrophila* reestabeleceu a capacidade de acúmulo de polihidroxialcanoatos tendo glicose como única fonte de carbono.

A linhagem recombinante 461::*phaC<sub>Re</sub>* atingiu 6,78 g/L em 72 horas, sendo destes, 0,51% de PHA, contendo apenas 3HD em sua composição. Em trabalho anterior, Gomes (2009) expressou o mesmo gene (*phaC<sub>Re</sub>*), na mesma linhagem (LFM461), mas em vetor com alto número de cópias e sob controle do promotor *lac*, obtendo os seguintes resultados: crescimento de 3,04 g/L, sendo 30,16% de PHA com a seguinte composição: 95,10 mol% 3HB, 1,75 mol% 3HHx, 1,44 mol% 3HO, 0,78 mol% 3HD e 0,92 mol% 3HDd.

O recombinante 461::*phaC<sub>Ah</sub>* apresentou crescimento de 4,69 g/L, sendo destes 1,96% de PHA, com a seguinte composição: 84,20 mol% de 3HB, 6,30 mol% de 3HHx e 9,50 mol% de 3HD. Han e colaboradores (2004) reportam a produção de copolímeros de 3HB e 15 mol% dos outros monômeros como 3HHx em *Aeromonas hydrophila* selvagem, usando extrato de levedura e o precursor ácido láurico (dodecanoato - C12)

como fontes de carbono. Neste trabalho, foi produzido o copolímero P(3HB-*co*-3HHx-*co*-3HD) usando um substrato não relacionado - glicose (C6) - como única fonte de carbono. Na Figura 21 estão comparadas as composições dos PHA produzidos por LFM046, linhagem selvagem, e 461::*phaCAh*, recombinante que produziu copolímeros de PHA com a composição de interesse.



**Figura 21.** Composição (em mol%) dos PHA produzidos por LFM461 e 461::*phaCAh* a partir de glicose.

No caso do recombinante 461::*phaCA<sub>sp</sub>*, o crescimento foi de 4,16 g/L em 72 horas, porém, não foi detectada a produção de PHA. A literatura indica que a expressão do gene de PHA sintase, juntamente com *phaP* e *phaJ* de *Aeromonas* sp. TSM 81, abrigado em plasmídeos com alto número de cópias, em LFM461 (CESPEDES, L. G. manuscrito em preparação), tendo glicose como fonte de carbono, e linhagens PHA<sup>-</sup> de *Burkholderia sacchari*, tendo glicose e ácidos orgânicos como fonte de carbono (MENDONÇA et al., 2017), levam à produção de copolímeros mistos, entre eles P(3HB-*co*-3HHx). Nos dois casos relatados o gene estava presente em alto número de cópias, no vetor plasmidial pBBR1-MCS2 (KOVACH et al., 1995), além de estarem, provavelmente, sob controle da sequência promotora do operon *lac*, que em *Pseudomonas* sp. e *B. sacchari* se torna constitutivo devido à ausência do gene codificante para a proteína LacI, relacionada à inibição do promotor *lac*. Neste trabalho, apenas uma cópia dos genes em questão foi inserida no cromossomo de *Pseudomonas*, sendo usada a sequência promotora nativa do operon *phaPCJ* de *Aeromonas hydrophila*. Isso também

pode explicar a diferença dos resultados obtidos com o recombinante 461::*phaC<sub>Re</sub>*, quando comparado com o trabalho de Gomes (2009).

Steinbüchel e Lütke-Eversloh (2003) relatam que para biossíntese de PHA em organismos recombinantes é preciso, além de transferir a sequência codificante da PHA sintase ao organismo desejado, garantir que essa sequência gênica esteja sendo transcrita e traduzida em taxas suficientes para resultar na formação de enzimas ativas. De acordo com os autores, o maior desafio consiste em garantir o suprimento de substratos dessa enzima em organismos não naturalmente produtores de PHA, o que no caso desse trabalho é contornado, por se tratar de uma linhagem naturalmente produtora desse biopolímero.

A partir das linhagens recombinantes construídas neste trabalho, foram obtidas taxas de acúmulo de PHA muito baixas ou até mesmo indetectáveis. Provavelmente, cultivos em maior escala permitiriam detectar alguma produção de PHA nas linhagens construídas a partir de LFM461 nas quais não foi observada produção considerável de polímero (461::*phaC<sub>Re</sub>* e 461::*phaC<sub>Asp</sub>*, principalmente). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, isto é, com relativa baixa produção de copolímeros em linhagens recombinantes expressando PHA sintases heteróloga, estão relatados na literatura em alguns comentados descritos a seguir.

Prieto e co-autores também fizeram uso de um sistema de integração ao cromossomo de linhagem PHA<sup>-</sup> de *P. putida*, baseado no transposon Tn5, para inserção do gene *phaCI* da linhagem *P. oleovorans* GPo1. Os autores acoplaram o gene a um sistema de indução de expressão, o que possibilitou bom acúmulo de PHA contendo monômeros de cadeia média (aproximadamente 50% da massa seca celular), quando cultivado em biorreator (PRIETO et al., 1999).

Em 2009, Aneja e colaboradores clonaram e expressaram as subunidades duas subunidades da PHA sintase de classe III proveniente de *Allochromatium vinosum* ATCC 35206 (*phaC* e *phaE*) em vetor plasmidial na linhagem *Ralstonia eutropha* PHB-4 (SCHLEGEL; LAFFERTY; KRAUSS, 1970). A linhagem recombinante obtida foi capaz de produzir um polímero do tipo blenda, contendo 3HB, 3HD e 3HDD, representando de 4 a 5% de sua massa seca celular, quando fornecida frutose como fonte de carbono (ANEJA; ASHBY; SOLAIMAN, 2009).

Gao e colaboradores obtiveram baixa produção de P(3HB-*co*-HA<sub>MCL</sub>) em uma linhagem recombinante de *E. coli* LS5218 expressando gene de PHA sintase de *Pseudomonas stutzeri* 1317 em vetor plasmidial. Para contornar esse problema, os autores

realizaram otimização de códon da sequência gênica e inserção de uma sequência que quando transcrita forma estrutura de grampo na região 5'-UTR de seu mRNA, aumentando sua estabilidade. Após essas duas alterações, verificou-se aumento da expressão de PhaC, o que refletiu em aumento no acúmulo de polímero em cerca de quatro vezes, a partir de dodecanoato (C12) (GAO et al., 2012).

Watanabe e colaboradores expressaram os genes de síntese de PHA de *A. caviae* (*phaPCJ<sub>Ac</sub>*) em vetor plasmidial em *E. coli* LS5218 para produção de polímeros de 3HB contendo 3-Hidroxi-2-metilbutirato - P(3HB-*co*-3H2MB). A produção desse polímero representou apenas 1% da massa seca celular do cultivo quando fornecidos glicose e ácido tíglico (C5) como fontes de carbono. Quando expresso o gene *phaC<sub>Ac</sub>* contendo mutações pontuais N149S e D171G, a quantidade do polímero de interesse aumentou para 2,4% MSC. Mutações ao acaso observadas no gene *phaP<sub>Ac</sub>* (D4N) levaram a maiores taxas de expressão de PHA sintase, também aumentando o teor de polímero P(3HB-*co*-3H2MB-*co*-3HV-*co*-3HHx) acumulado (6% MSC). A análise dos copolímeros produzidos mostrou características interessantes, apesar da baixa produção obtida (WATANABE et al., 2015).

Na Tabela 8 estão sumarizadas as principais informações destes trabalhos para comparação.

**Tabela 8** - Acúmulo de copolímeros híbridos de PHA em linhagens recombinantes obtidas neste trabalho em comparação com a literatura.

Linhagem hospedeira	Origem <i>phaC</i>	Plasmídeo/ Cromossomo	Fonte de carbono	PHA produzido	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	Observações	Referência
<i>P. oleovorans</i> POMC1	<i>P. oleovorans</i>	Cromossomo	Ác. Octanóico	P(3HHx-co-3HO-co-3HD)	1,67	53	miniTn5; Indutor ( <i>xylS/Pm</i> ); Cultivos em bioreator	Prieto et al., (1999)
LFM046	<i>R. eutropha</i> H16	pBBR1MCS- 2:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	Glicose	P(3HB-co-HAMCL)	3,77	43,8	Quantidades variáveis de 3HB	Gomes (2009)
LFM461	<i>R. eutropha</i> H16	pBBR1MCS- 2:: <i>phaC<sub>Re</sub></i>	Glicose	P(3HB-co-HAMCL)	3,04	30,1	-	
<i>R. eutropha</i> PHB-4	<i>A. vinosum</i> ATCC 35206	Plasmídeo (pBHR1)	Frutose	P(3HB-co-HAMCL)	2,1	3,5	-	Aneja; Ashby; Solaiman (2009)
<i>E. coli</i> LS5218	<i>P. stutzeri</i> 1317	Plasmídeo (pBHR69)	Gluconato e dodecanoato	P(3HB-co-3HO-co-3HD)	3,2	0,8	-	Gao et al., (2012)
<i>E. coli</i> LS5218	<i>P. stutzeri</i> 1317	Plasmídeo (pBHR69)	Gluconato e dodecanoato	P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co- 3HD-co-3HDd)	3,59	3,93	Optimização de códon; hairpin mRNA;	
<i>B. sacchari</i> PHA <sup>-</sup>	<i>Aeromonas</i> sp. TSM 81	pBBR1MCS- 2:: <i>phaPCJ<sub>Asp</sub></i>	Glicose e ác. Hexanóico	P(3HB-co-3HHx)	20,1	75,8	Cultivos em biorreator	Mendonça (2014); Mendonça et al., (2017)
<i>E. coli</i> BW25113	<i>R. eutropha</i> H16	Plasmídeo (pAeT41)	Glicose	P(3HB)	ND	60	-	Martínez-García et al., (2014a)
<i>E. coli</i> Δ <i>pta</i>	<i>R. eutropha</i> H16	Cromossomo	Glicose	P(3HB)	ND	38	<i>ykgH</i> :mini-Tn5	
<i>E. coli</i> LS5218	<i>A. cavie</i>	Plasmídeo (pBBR1)	Glicose e Ác. Tíglico	P(3HB-co-3H2MB)	2,2	1,0	<i>phaC<sub>Ac</sub></i> selvagem	Watanabe et al., (2015)
<i>E. coli</i> LS5218	<i>A. cavie</i>	Plasmídeo (pBBR1)	Glicose e Ác. Tíglico	P(3HB-co-3H2MB-co-3HV-co- 3HHx)	2,0	2,4	Mutação NSDG	
<i>E. coli</i> LS5218	<i>A. cavie</i>	Plasmídeo (pBBR1)	Glicose e Ác. Tíglico	P(3HB-co-3H2MB-co-3HV-co- 3HHx)	2,2	8,8	Mutação NSDG + <i>phaP<sub>Ac</sub></i> D4N	
LFM461	<i>Aeromonas</i> sp. TSM 81	pBBR1MCS- 2:: <i>phaPCJ<sub>Asp</sub></i>	Glicose	P(3HB-co-3HHx-co-3HO-co- 3HD)	2,83	26,8	-	Cespedes, LG (manuscrito em preparação)
LFM461	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	pBBR1MCS- 2:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	Glicose	-	2,36	0,00	-	
461:: <i>phaC<sub>Ah</sub></i>	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Cromossomo	Glicose	P(3HB-co-3HHx-co-3HD)	4,69	1,96	miniTn7	Este trabalho

Legenda: MSC: Massa seca celular; 3HB: 3-hidroxibutirato; 3HHx: 3-hidroxihexanoato; 3HO: 3-hidroxi octanoato; 3HD: 3-hidroxidodecanoato; 3HDd: 3-hidroxidodecanoato; 3H2MB: 3-hidroxibutirato-co-3-hidroxi-2-metilbutirato; 3HV: 3-hidroxivalerato; HAMCL: hidroxiaçil-CoA de cadeia média; ND: não disponível.

Além dos trabalhos envolvendo diretamente a produção de PHA, a literatura relata as funções e importância do promotor gênico bacteriano (CLANCY, 2008; MARQUES, 2012), sendo sua sequência determinante e essencial às primeiras etapas da transcrição gênica, e, portanto, um dos principais fatores relacionados à boa expressão de genes (BANDWAR et al., 2002; DAVIS; RUBIN; SAUER, 2011; GRAF; ALTENBUCHNER, 2014).

Em vista disso, as sequências promotoras de *R. eutropha* e *A. hydrophila* utilizadas podem não ser as ideais para a expressão dos genes clonados em *Pseudomonas*, já que pode não ser reconhecida tão bem pela RNA polimerase dessa linhagem. Para contornar esse problema, seria necessário usar sequências promotoras diferentes, mais adequadas por serem mais fortes e, portanto, promoverem maior expressão gênica (ANG et al., 2013; MUTALIK et al., 2013).

Além da transcrição, a tradução também pode estar afetada, pois a Sequência de Shine-Dalgarno, também chamada de RBS (Sítio de Ligação ao Ribossomo) de *A. hydrophila* ou *R. eutropha*, inseridas no cromossomo de *Pseudomonas*, podem não ser reconhecidas de forma ideal pelos ribossomos de *Pseudomonas*, por serem gêneros bacterianos distintos. O mau reconhecimento pode diminuir a produção de proteínas codificadas pela sequência gênica de interesse (SALIS; MIRSKY; VOIGT, 2009).

Em trabalho recente, Martínez-García e colaboradores (2014a) relatam que o local de inserção no cromossomo também é determinante. Foram realizadas inserções do gene de PHA sintase de *R. eutropha* em locais aleatórios do DNA cromossômico de *E. coli*. Cem clones abrigando *phaC<sub>Re</sub>* em diferentes locais de seu cromossomo tiveram a produção de PHA avaliada, sendo que apenas um clone entre todos os avaliados se mostrou bom produtor de PHA. A produção de PHA foi melhorada ainda mais quando o operon *phaCAB* foi inserido junto a sequência codificante para proteína de membrana interna (*ykgH*), em linhagem de *E. coli* fosfo-transcetilase negativa ( $\Delta$ *pta*), na qual há maior conversão de acetil-CoA em 3HB. Com isso, os autores propuseram que algumas regiões cromossômicas estão mais acessíveis à ação da RNA polimerase, e são, portanto, mais expressas. O sistema de recombinação citado foi explorado neste trabalho para inserção de *phaC<sub>Re</sub>* em LFM461, porém só foi obtido um clone recombinante. Desse modo, é necessário otimizar o sistema de recombinação em *Pseudomonas* sp. LFM461 para obter maior número de clones e conseguir avaliar a produção de copolímeros quando da inserção de *phaC* em diferentes locais de seu cromossomo.

Para melhorar a produção dos copolímeros de interesse ainda por meio do sistema mini-Tn7 poderiam ser exploradas as abordagens relatadas na literatura, que promoveriam aumento da expressão gênica e conseqüentemente da quantidade da enzima PhaC. Entre elas, a otimização de códon dos genes de PHA sintase de *R. eutropha*, *A. hydrophila* e *Aeromonas* sp. TSM 81, inserção de seqüências que aumentam a estabilidade do mRNA, uso de sistema de indução gênica, assim como uso de promotor gênico considerado forte em *Pseudomonas*, ou até mesmo o promotor de PHA sintase nativo de *Pseudomonas* sp. LFM046.



## 6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

### 6.1 Conclusões

- a. O sistema de recombinação sítio específica por meio do transposon mini-Tn7 se mostrou eficiente nas linhagens *Pseudomonas* sp. LFM046 e LFM461. Nesta etapa, foi estabelecido no Laboratório de Bioprodutos metodologia de inserção de sequências gênicas no DNA cromossômico de *Pseudomonas*;
- b. A inserção de gene de PHA sintase de *Ralstonia eutropha* em LFM461 reestabeleceu a capacidade de acúmulo de PHA, mas não resultou no acúmulo dos copolímeros mistos desejados;
- c. A inserção cromossômica do gene de PHA sintase de *Aeromonas* sp. TSM81 não reestabeleceu a capacidade de acúmulo de LFM461. Fatores relacionados à baixa expressão das sequências gênicas inseridas podem explicar o resultado observado;
- d. Foram produzidos copolímeros mistos quando o gene de PHA sintase de *A. hydrophila* ATCC 7966 foi inserido em LFM046. O mesmo foi observado em LFM461, sendo sua capacidade de acúmulo reestabelecida, porém a quantidade de polímero acumulada ainda é muito baixa quando comparada com a linhagem selvagem LFM046 (aproximadamente 4,5% da capacidade de acúmulo de LFM046).

## 6.2 Perspectivas futuras

### 6.1.1 Avaliação das capacidades de acúmulo das linhagens recombinantes obtidas via mini-Tn5

As linhagens obtidas a partir de *Pseudomonas* sp. LFM461 já tiveram confirmada a inserção do gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* em seu cromossomo. Ensaios de coloração com Sudan Black B serão realizados no Laboratório de Bioprodutos, de modo a selecionar os clones capazes de acumular PHA.

### 6.1.2 Construção de outras linhagens recombinantes de *Pseudomonas* sp. LFM461 por meio do sistema mini-Tn5

Sendo confirmadas como positivas as análises de quantidade e composição de PHA obtidas com a linhagem construída usando o sistema mini-Tn5, esse sistema (agora disponível no Laboratório de Bioprodutos nos vetores pBAMD) se mostra promissor para futuros estudos de inserção das demais sequências de PHA sintase estudadas neste trabalho (*Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas* sp. TSM81), assim como outros genes relacionados ao metabolismo de PHA.

### 6.1.3 Publicações em andamento

Com os dados obtidos neste projeto está sendo elaborado um artigo científico, cujo título será “**Production of hybrid PHA copolymers by a recombinant *Pseudomonas* strain harboring an *Aeromonas hydrophila* PHA synthase gene in its chromosome**”, sendo os autores Edmar Ramos de Oliveira Filho, Linda P. Guamán, Thatiane Teixeira Mendonça, Marilda Keico Taciro, José Gregório Cabrera Gomez e Luiziana Ferreira da Silva.

O levantamento de literatura bem como a atualização bibliográfica realizados para o desenvolvimento deste projeto gerou um artigo de revisão sobre PHA sintases, que está em fase final de correção para ser enviado ao periódico *Biotechnology Advances*. O título da publicação será “**PHA synthase as a key-feature in biotechnological advances and future prospects to develop new PHA as bioproducts**”, sendo os autores Edmar Ramos de Oliveira Filho, Thatiane Teixeira Mendonça, Gabriela Cazonato Lozano-Sakalauskas, Aline Carolina da Costa Lemos, José Gregório Cabrera Gomez e Luiziana Ferreira da Silva.

As folhas de rosto dos artigos estão disponíveis no Apêndice C.

**REFERÊNCIAS\***

- ABE, H. et al. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 3, p. 115–119, 1994.
- ABEDI, D. et al. Optimization of the expression of genes encoding poly (3-hydroxyalkanoate) synthase from *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1310 in *Escherichia coli*. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 47–51, 2012.
- ADAMES, N. R. et al. GenoLIB: a database of biological parts derived from a library of common plasmid features. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 10, p. 4823–4832, 2015.
- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. July 2009, p. 732–743, 2010.
- ALDOR, I. S.; KEASLING, J. D. Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 475–483, 2003.
- ALEXANDRINO, P. M. R. et al. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. 3–4, 2015.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450–472, dez. 1990.

---

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANEJA, K. K.; ASHBY, R. D.; SOLAIMAN, D. K. Y. Altered composition of *Ralstonia eutropha* poly(hydroxyalkanoate) through expression of PHA synthase from *Allochromatium vinosum* ATCC 35206. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 10, p. 1601–1612, 2009.

ANG, J. et al. Tuning Biological Response Curves for Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, v. 2, p. 547–567, 2013.

ANSARI, N. F.; ANNUAR, M. S. M.; MURPHY, B. P. A Porous Medium-Chain-Length Poly(3-Hydroxyalkanoates)/Hydroxyapatite Composite as Scaffold for Bone Tissue Engineering. **Engineering in Life Sciences**, v. 0, p. 1–10, 2016.

ARTIGUENAVE, F.; VILAGINÈS, R.; DANGLLOT, C. High-efficiency transposon mutagenesis by electroporation of a *Pseudomonas fluorescens* strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 363–369, 1997.

ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. A. Protein engineering towards biotechnological production of bifunctional polyester beads. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 1, p. 131–137, 2009.

BÄCKSTRÖM, B. T.; BROCKELBANK, J. A.; REHM, B. H. A. Recombinant *Escherichia coli* produces tailor-made biopolyester granules for applications in fluorescence activated cell sorting: functional display of the mouse interleukin-2 and myelin oligodendrocyte glycoprotein. **BMC biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 1–12, 2007.

BANDWAR, R. P. et al. Kinetic and thermodynamic basis of promoter strength: Multiple steps of transcription initiation by T7 RNA polymerase are modulated by the promoter sequence. **Biochemistry**, v. 41, n. 11, p. 3586–3595, 2002.

BARTH, P. T.; GRINTER, N. J. Map of plasmid RP4 derived by insertion of transposon C. **Journal of molecular biology**, v. 113, n. 3, p. 455–474, jul. 1977.

BERG, D. E.; BERG, C. M. The prokaryotic transposable element Tn5. **Nature biotechnology**, p. 417–435, 1983.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.

BHUWAL, A. K. et al. Isolation and screening of polyhydroxyalkanoates producing bacteria from pulp, paper, and cardboard industry wastes. **International Journal of Biomaterials**, v. 13, p. 1–10, 2013.

BLATCHFORD, P. A. et al. Immobilization of organophosphohydrolase OpdA from *Agrobacterium radiobacter* by overproduction at the surface of polyester inclusions inside engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 1101–1108, 2012.

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. Experiment files and their application during large-scale sequencing projects. **DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping**, v. 6, n. 2, p. 109–117, 1996.

BRÄMER, C. O. et al. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1709–1713, 2001.

BROCKELBANK, J. A.; PETERS, V.; REHM, B. H. A. Recombinant *Escherichia coli* strain produces a ZZ domain displaying biopolyester granules suitable for immunoglobulin G purification. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7394–7397, 2006.

BRODNJAK, U. V. Microorganism Based Biopolymer Materials for Packaging Applications: A Review. **Journal of Composites and Biodegradable Polymers**, v. 4, p. 32–40, 2016.

BROWNE, M. A. et al. Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 13, p. 5026–5031, 2008.

CAI, L. et al. Comparative genomics study of polyhydroxyalkanoates (PHA) and ectoine relevant genes from *Halomonas* sp. TD01 revealed extensive horizontal gene transfer events and co-evolutionary relationships. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 88, p. 1–15, 2011.

CARDINALI-REZENDE, J. et al. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp. Strain LFM046, a Producer of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. 45–46, 2015.

CARLSON, R.; FELL, D.; SRIENC, F. Metabolic Pathway Analysis of a Recombinant Yeast for Rational Strain Development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 2, p. 121–134, 2002.

CARLSON, R.; SRIENC, F. Effects of recombinant precursor pathway variations on poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 124, n. 3, p. 561–573, 2006.

CESPEDES, L. G. **Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461**. 2016. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

CHEE, J. Y. et al. Expression of *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase gene in *Burkholderia* sp. USM (JCM15050) enables the biosynthesis of SCL-MCL PHA from palm oil products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 45–54, 2012.

CHEN, G. et al. Engineering Biosynthesis Mechanisms for Diversifying Polyhydroxyalkanoates. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 565–574, 2015.

CHEN, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical Society reviews**, v. 38, p. 2434–2446, 2009.

CHEN, G.-Q. Unveiling the 30-year mystery of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase.

**Biotechnology Journal**, v. 11, 2016.

CHEN, G.-Q.; HAJNAL, I. The “PHAome”. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 10, p. 559–564, 2015.

CHEN, G. Q.; PATEL, M. K. Plastics derived from biological sources: Present and future: A technical and environmental review. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 2082–2099, 2012.

CHEN, Y. J. et al. Critical residues of class II PHA synthase for expanding the substrate specificity and enhancing the biosynthesis of polyhydroxyalkanoate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 56, p. 60–66, 2014.

CHOI, K.-H.; SCHWEIZER, H. P. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 153–161, 2006.

CHOI, K. H. et al. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. **Nature methods**, v. 2, n. 6, p. 443–448, 2005.

CHOI, K. H. et al. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 1064–1075, 2008.

CHOI, K. H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 391–397, 2006.

CHUNG, H. et al. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 36, p. 73–84, 2015.

CLANCY, S. DNA Transcription. **Nature Education**, v. 1, n. 41, p. 1–5, 2008.

DAVIS, J. H.; RUBIN, A. J.; SAUER, R. T. Design, construction and characterization of a set of insulated bacterial promoters. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 3, p. 1131–1141,

2011.

DE EUGENIO, L. I. et al. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 1591–1603, 2010.

DE LA CRUZ, N. B. et al. Characterization of the Tn5 transposase and inhibitor proteins: A model for the inhibition of transposition. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6932–6938, 1993.

DE LORENZO, V. et al. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6568–6572, 1990.

DE LORENZO, V. et al. Engineering of alkyl- and haloaromatic-responsive gene expression with mini-transposons containing regulated promoters of biodegradative pathways of *Pseudomonas*. **Gene**, v. 130, n. 1, p. 41–46, 1993.

DE LORENZO, V. et al. Mini-transposons in microbial ecology and environmental biotechnology. v. 27, 1998.

DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 386–405, 1994.

DEBOY, R. T.; CRAIG, N. L. Target Site Selection by Tn7: *attTn7* Transcription and Target Activity. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 11, p. 3310–3313, 2000.

DINIZ, S. C. et al. High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 119, n. 1, p. 51–70, 2004.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-



hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, n. 14, p. 4822–4828, 1995.

DRAPER, J. L.; REHM, B. H. Engineering bacteria to manufacture functionalized polyester beads. **Bioengineered**, v. 3, n. 4, p. 203–208, 2012.

DURFEE, T. et al. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597–2606, 2008.

ESCAPA, I. F. et al. Disruption of  $\beta$ -oxidation pathway in *Pseudomonas putida* KT2442 to produce new functionalized PHAs with thioester groups. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1583–1598, 2011.

FRADINHO, J. C.; OEHMEN, A.; REIS, M. A. M. Photosynthetic mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) production from individual and mixed volatile fatty acids (VFAs): Substrate preferences and co-substrate uptake. **Journal of Biotechnology**, v. 185, p. 19–27, 2014.

FRANCIS, L. et al. Novel P(3HB) Composite Films Containing Bioactive Glass Nanoparticles for Wound Healing Applications. **Polymer International**, v. 65, n. 6, p. 661–674, 2016.

FUKUI, T.; ABE, H.; DOI, Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 3, p. 618–624, 2002.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 15, p. 4821–4830, 1997.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 333–336, 1998.

GAO, C. et al. Exploring medium-chain-length polyhydroxyalkanoates production in the engineered yeast *Yarrowia lipolytica*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 9, p. 1255–1262, 2015.

GAO, X. et al. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *E. coli* containing an optimized PHA synthase gene. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 130, p. 1–10, 2012.

GAY, N. J.; TYBULEWICZ, V. L.; WALKER, J. E. Insertion of transposon Tn7 into the *Escherichia coli glmS* transcriptional terminator. **The Biochemical journal**, v. 234, n. 1, p. 111–117, 1986.

GAY, P. et al. Cloning structural gene *sacB*, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 153, n. 3, p. 1424–1431, 1 mar. 1983.

GOMES, R. DE S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica**. 2009. 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GOMEZ, J. G. C. et al. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 785–791, 1996.

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

GOMEZ, J. G. C. et al. Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-products. In: Petre, M.

(Org.). **Advances in Applied Biotechnology**. InTech Open Access Publisher; 2012, v. 1. p. 41–62.

GRAF, N.; ALTENBUCHNER, J. Genetic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for rapid and high-yield production of vanillin from ferulic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 137–149, 2014.

GRAGE, K. et al. Bacterial Polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 660–669, 2009.

GRAGE, K.; PETERS, V.; REHM, B. H. A. Recombinant protein production by *In Vivo* polymer inclusion display. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 18, p. 6706–6709, 2011.

GRAGE, K.; REHM, B. H. A. In vivo production of scFv-displaying biopolymer beads using a self-assembly-promoting fusion partner. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 254–262, 2008.

HAN, J. et al. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, n. 1, p. 195–201, 2004.

HAY, I. D. et al. In vivo polyester immobilized sortase for tagless protein purification. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 190, p. 1–7, 2015a.

HAY, I. D. et al. Bioengineering of bacteria to assemble custom-made polyester affinity resins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 282–291, 2015b.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2007.

HERRERO, M.; DE LORENZO, V.; TIMMIS, K. N. Transposon vectors containing non-

antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6557–6567, 1990.

HOOKS, D. O. et al. Polyhydroxyalkanoate synthase fusions as a strategy for oriented enzyme immobilisation. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 8629–8643, 2014.

HOOKS, D. O.; BLATCHFORD, P. A.; REHM, B. H. A. Bioengineering of bacterial polymer inclusions catalyzing the synthesis of N-acetylneuraminic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 3116–3121, 2013.

HOOKS, D. O.; REHM, B. H. A. Insights into the surface topology of polyhydroxyalkanoate synthase: self-assembly of functionalized inclusions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8045–8053, 2015a.

HOOKS, D. O.; REHM, B. H. A. Surface display of highly-stable *Desulfovibrio vulgaris* carbonic anhydrase on polyester beads for CO<sub>2</sub> capture. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 7, p. 1415–1420, 2015b.

HYAKUTAKE, M. et al. Carboxy-terminal modification of polyhydroxyalkanoate (PHA) via alcoholysis reaction catalyzed by Class IV PHA synthase. **Polymer Degradation and Stability**, v. 117, p. 90–96, 2015.

IWATA, T. Strong fibers and films of microbial polyesters. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 8, p. 689–701, 2005.

JAHNS, A. C. et al. In Vivo Self-Assembly of Fluorescent Protein Microparticles Displaying Specific Binding Domains. **Bioconjugate Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 1314–1323, 2013.

JAHNS, A. C.; HAVERKAMP, R. G.; REHM, B. H. A. Multifunctional inorganic-binding beads self-assembled inside engineered bacteria. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 2072–2080, 2008.

JAHNS, A. C.; REHM, B. H. A. Tolerance of the *Ralstonia eutropha* class I polyhydroxyalkanoate synthase for translational fusions to its C terminus reveals a new mode of functional display. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5461–5466, 2009.

JAHNS, A. C.; REHM, B. H. A. Relevant uses of surface proteins - display on self-organized biological structures. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 188–202, 2012.

JAHNS, A. C.; REHM, B. H. A. Immobilization of active lipase B from *Candida antarctica* on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 4, p. 831–835, 2015.

JAIN, R.; TIWARI, A. Role of polyhydroxyalkanoates in cancer and other drug delivery systems. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 2, p. 494–495, 2015.

JAMBECK, J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean. **Science**, v. 347, n. 6223, p. 768–770, 2015.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 10, p. 3195–3202, 2009.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 8, p. 2357–2373, 2014.

JIANG, G. et al. Carbon Sources for Polyhydroxyalkanoates and an Integrated Biorefinery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 1157, p. 1–21, 2016.

JOHNSON, R. C.; YIN, J. C. P.; REZNIKOFF, W. S. Control of Tn5 transposition in *Escherichia coli* is mediated by protein from the right repeat. **Cell**, v. 30, n. 3, p. 873–882, 1982.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–326, 2010.

KESSLER, B. et al. Production of Microbial Polyesters: Fermentation and Downstream Processes. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 71, p. 160–182, 2001.

KIM, J. et al. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. **Biotechnology Journal**, v. 1600648, p. 1–23, 2016a.

KIM, Y.-J. et al. Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. **Biotechnology Journal**, v. 1600649, p. 1–23, 2016b.

KOLLER, M. et al. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 561–565, 2005.

KOVACH, M. E. et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 175–176, dez. 1995.

LAMBERTSEN, L.; STERNBERG, C.; MOLIN, S. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 7, p. 726–732, 2004.

LAU, N. S. et al. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 20, p. 7916–7923, 2010.

LEE, S. H. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 67, n. 2, p. 240–244, jan. 2000.

LEMUTH, K.; STEUER, K.; ALBERMANN, C. Engineering of a plasmid-free *Escherichia coli* strain for improved *in vivo* biosynthesis of astaxanthin. **Microbial cell**

**factories**, v. 10, n. 29, p. 1–12, 2011.

LEWIS, J. G.; REHM, B. H. A. ZZ polyester beads: An efficient and simple method for purifying IgG from mouse hybridoma supernatants. **Journal of Immunological Methods**, v. 346, n. 1–2, p. 71–74, 2009.

LICHTENSTEIN, C.; BRENNER, S. Unique insertion site of Tn7 in the *E. coli* chromosome. **Nature**, v. 297, n. 5867, p. 601–603, jun. 1982.

LOO, C.-Y.; SUDESH, K. Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. **Malaysian Polymer Journal**, v. 2, n. 2, p. 31–57, 2007.

LU, J.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). **Polymer Reviews**, v. 49, n. 3, p. 226–248, 2009.

LU, X. et al. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in *E. coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 1, p. 97–101, abr. 2003.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MARQUES, M. DO V. **Biologia Molecular e Genética Bacteriana**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

MARTÍNEZ-DONATO, G. et al. Protective T cell and antibody immune response against Hepatitis C Virus using the biopolyester beads based vaccine delivery system. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 23, n. 4, p. 370–378, 2016.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E. et al. pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. **BMC microbiology**, v. 11, n. 38, p. 1–13, 2011.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E. et al. New transposon tools tailored for metabolic engineering of gram-negative microbial cell factories. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 2, n. 46, p. 1–13, 2014a.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E. et al. *Pseudomonas* 2.0: genetic upgrading of *P. putida* KT2440 as an enhanced host for heterologous gene expression. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2014b.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E. et al. Engineering Gram-Negative Microbial Cell Factories Using Transposon Vectors. In: **In Vitro Mutagenesis: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2017. v. 1498p. 273–293.

MATSUDA, T. S. **Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

MATSUMOTO, K. et al. Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of *Arabidopsis thaliana* using an engineered 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 686–690, 2009.

MATSUSAKI, H.; ABE, H.; DOI, Y. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 1, p. 17–22, 2000.

MCCLINTOCK, B. The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 36, n. 6, p. 344–355, 1950.

MCQUALTER, R. B. et al. Factors affecting polyhydroxybutyrate accumulation in mesophyll cells of sugarcane and switchgrass. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 83, p. 1–11, 2014.

MENDONÇA, T. T. et al. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce



polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 815–829, 2013.

MENDONÇA, T. T. **Estudo de bactérias recombinantes e análise de fluxos metabólicos para a biossíntese do copolímero biodegradável Poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]**. 2014. 254 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Biotecnologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MENDONÇA, T. T. et al. Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v 98, p. 654-663, 2017.

MENG, D.-C. et al. Engineering the diversity of polyesters. **Current opinion in biotechnology**, v. 29, p. 24–33, out. 2014.

MICHALAK, M.; KURCOK, P.; HAKKARAINEN, M. Poly(3-Hydroxyalkanoate) Based Drug Delivery Systems. **Polymer International**, v. 1, p. 1–15, 2016.

MIFUNE, J.; GRAGE, K.; REHM, B. H. A. Production of functionalized biopolyester granules by recombinant *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4668–4675, 2009.

MITRA, R. et al. Characterization of the TnsD- *attTn7* complex that promotes site-specific insertion of Tn7. **Mobile DNA**, v. 1, n. 18, p. 1–14, 2010.

MOLDES, C. et al. In vivo immobilization of fusion proteins on bioplastics by the novel tag BioF. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3205–3212, 2004.

MOŹEJKO-CIESIELSKA, J.; KIEWISZ, R. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? **Microbiological Research**, v. 192, p. 271–282, 2016.

MUTALIK, V. K. et al. Precise and reliable gene expression via standard transcription and translation initiation elements. **Nature methods**, v. 10, n. 4, p. 354–60, 2013.

NIKEL, P. I.; DE LORENZO, V. Implantation of unmarked regulatory and metabolic modules in Gram-negative bacteria with specialised mini-transposon delivery vectors. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 143–154, 2013.

NIKEL, P. I.; MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; DE LORENZO, V. Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 368–379, 2014.

NODA, I. et al. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymers. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 580–586, 2005.

NOMURA, C. T. et al. Effective enhancement of short-chain-length-Medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production by coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-acyl-carrier-protein synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthesis genes. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1457–1464, 2004.

NOMURA, C. T.; TAGUCHI, S. PHA synthase engineering toward superbicatalysts for custom-made biopolymers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 5, p. 969–979, 2007.

OUYANG, S. et al. Poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) Production in Recombinant *Aeromonas hydrophila* 4AK4 Harboring *phbA*, *phbB* and *vgb* Genes. **Macromolecular Symposia**, v. 224, n. 1, p. 21–34, 2005.

PARK, S. J. et al. Advanced bacterial polyhydroxyalkanoates: Towards a versatile and sustainable platform for unnatural tailor-made polyesters. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1196–1206, 2012.

PARLANE, N. A. et al. Bacterial polyester inclusions engineered to display vaccine candidate antigens for use as a novel class of safe and efficient vaccine delivery agents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 24, p. 7739–7744, 2009.

PARLANE, N. A. et al. Production of a particulate hepatitis C vaccine candidate by an engineered *Lactococcus lactis* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77,

n. 24, p. 8516–8522, 2011.

PARLANE, N. A. et al. Vaccines displaying mycobacterial proteins on biopolyester beads stimulate cellular immunity and induce protection against tuberculosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 1, p. 37–44, 2012.

PARLANE, N. A. et al. Novel particulate vaccines utilizing polyester nanoparticles (bio-beads) for protection against *Mycobacterium bovis* infection-A review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, p. 8–13, 2014.

PETERS, J. E.; CRAIG, N. L. Tn7: smarter than we thought. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 2, n. 11, p. 806–814, nov. 2001.

PETERS, V.; REHM, B. H. A. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 93–100, 2005.

PETERS, V.; REHM, B. H. A. In Vivo Enzyme Immobilization by Use of Engineered Polyhydroxyalkanoate Synthase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1777–1783, 2006.

PETERS, V.; REHM, B. H. A. Protein engineering of streptavidin for in vivo assembly of streptavidin beads. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 266–274, 2008.

PETRASOVITS, L. A. et al. Production of polyhydroxybutyrate in sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, n. 1, p. 162–172, 2007.

PETRASOVITS, L. A. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate production in transgenic sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 10, n. 5, p. 569–578, 2012.

PETRASOVITS, L. A. et al. Chemical inhibition of acetyl coenzyme A carboxylase as a strategy to increase polyhydroxybutyrate yields in transgenic sugarcane. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 9, p. 1146–1151, 2013.

PHITHAKROTCHANAKOON, C. et al. Engineered *Escherichia coli* for Short-Chain-

Length Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Copolymer Biosynthesis from Glycerol and Dodecanoate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 6, p. 1262–1268, 2013.

PLASTICSEUROPE - ASSOCIATION OF PLASTICS MANUFACTURERS. **Plastics – the Facts 2016**. Disponível em: <http://www.plasticseurope.org/Document/plastics--the-facts-2016-15787.aspx?FolID=2>.

POHLMANN, A. et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1257–1262, 2006.

POIRIER, Y.; ERARD, N.; MACDONALD-COMBER PETÉTOT, J. Synthesis of polyhydroxyalkanoate in the peroxisome of *Saccharomyces cerevisiae* by using intermediates of fatty acid  $\beta$ -oxidation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5254–5260, 2001.

PREUSTING, H. et al. Formation of polyester blends by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*: Different poly(3-hydroxyalkanoates) are stored in separate granules. **Journal of Environmental Polymer Degradation**, v. 1, n. 1, p. 11–21, 1993.

PRIETO, A. et al. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 341–357, 2016.

PRIETO, M. A. et al. Engineering of stable recombinant bacteria for production of chiral medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3265–3271, 1999.

QIU, Y.-Z.; HAN, J.; CHEN, G.-Q. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 537–542, 2006.

RAI, R. et al. Poly-3-hydroxyoctanoate P(3HO), a medium chain length polyhydroxyalkanoate homopolymer from *Pseudomonas mendocina*.

**Biomacromolecules**, v. 12, n. 6, p. 2126–2136, 2011a.

RAI, R. et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Materials Science and Engineering R**, v. 72, n. 3, p. 29–47, abr. 2011b.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-*co*- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 7, p. 2093–2098, 1990.

RASIAH, I. A.; REHM, B. H. A. One-step production of immobilized  $\alpha$ -amylase in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2012–2016, 2009.

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

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **The Biochemical journal**, v. 376, p. 15–33, 2003.

REHM, B. H. A. Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 4, p. 207–213, 2006.

REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: the key enzymes of PHA synthesis. **Biopolymers Online**, v. 1, p. 173–180, 2002.

REINECKE, F.; STEINBÜCHEL, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 91–108, 2008.

REVELLES, O. et al. Syngas obtained by microwave pyrolysis of household wastes as feedstock for polyhydroxyalkanoate production in *Rhodospirillum rubrum*. **Microbial Biotechnology**, v. 1, p. 1–6, 2016.

REZNIKOFF, W. S. Transposon Tn5. **Annual Review of Genetics**, v. 42, p. 269–286, 2008.

RIASCOS, C. A. M. et al. Metabolic pathways analysis in PHAs production by *Pseudomonas* with <sup>13</sup>C-labeling experiments. **Computer Aided Chemical Engineering**, v. 32, p. 121–126, 2013.

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

ROBINS, K. J. et al. *Escherichia coli* NemaA Is an Efficient Chromate Reductase That Can Be Biologically Immobilized to Provide a Cell Free System for Remediation of Hexavalent Chromium. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.

ROCHA, R. C. S. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 427–431, 2008.

RONNING, D. R. et al. The carboxy-terminal portion of TnsC activates the Tn7 transposase through a specific interaction with TnsA. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 15, p. 2972–2981, 2004.

SALIS, H. M.; MIRSKY, E. A; VOIGT, C. A. Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 10, p. 946–950, 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.] Cold Spring Harbour Press, 2001.

SÁNCHEZ, R. J. et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. **European Polymer**

**Journal**, v. 39, p. 1385–1394, 2003.

SANGKHARAK, K. et al. Biofuel Production, Characterization and Degradation of 3-hydroxybutyrate Methyl Ester from Polyhydroxybutyrate. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 43, n. 4, p. 808–817, 2016.

SASAKAWA, C.; CARLE, G. F.; BERG, D. E. Sequences essential for transposition at the termini of IS50. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 80, n. 23, p. 7293–7297, 1983.

SCHLEGEL, H. G.; GOTTSCHALK, G.; VON BARTHA, R. Formation and utilization of Poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). **Nature**, v. 191, p. 463–465, 1961.

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly-beta-hydroxybutyric acid. **Archiv fur Mikrobiologie**, v. 71, n. 3, p. 283–294, 1970.

SESHADRI, R. et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: Jack of all trades. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 8272–8282, 2006.

SHISHATSKAYA, E. I. et al. Experimental wound dressings of degradable PHA for skin defect repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 165, p. 1–16, 2016.

SHUMILOVA, A. A. et al. Porous 3D implants of degradable Poly-3-hydroxybutyrate used to enhance regeneration of rat cranial defect. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 1, p. 1–35, 2016.

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

SILVA-ROCHA, R. et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes.

**Nucleic Acids Research**, v. 1, p. 1–10, 2013.

SILVA, L. F. et al. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cell. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 117–122, 1992.

SILVA, L. F. et al. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1732–1743, 2007.

SILVA, L. F. et al. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 71, p. 2–7, 2014.

SIMON-COLIN, C. et al. A novel mcl PHA-producing bacterium, *Pseudomonas guezennei* sp. nov., isolated from a “kopara” mat located in Rangiroa, an atoll of French Polynesia. **Journal of applied microbiology**, v. 104, p. 581–586, fev. 2008.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Nature biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SINGH, M. et al. Challenges and Opportunities for Customizing Polyhydroxyalkanoates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 235–249, 2015.

SNELL, K. D.; SINGH, V.; BRUMBLEY, S. M. Production of novel biopolymers in plants: Recent technological advances and future prospects. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 68–75, 2015.

SODOYER, R. et al. Antibiotic-Free Selection for Bio-Production: Moving Towards a New „Gold Standard“. In: PANA, M. (Ed.). . **Antibiotic Resistant Bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium**. [s.l.] INTECH, 2012. p. 531–550.

SOMLEVA, M. N. et al. Production of polyhydroxybutyrate in switchgrass, a value-added co-product in an important lignocellulosic biomass crop. **Plant Biotechnology**



**Journal**, v. 6, n. 7, p. 663–678, 2008.

SOMLEVA, M. N.; PEOPLES, O. P.; SNELL, K. D. PHA Bioplastics, Biochemicals, and Energy from Crops. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 2, p. 233–252, 2013.

STEINBÜCHEL, A. et al. Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 177–182, 1998.

STEINBÜCHEL, A. Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example. **Macromolecular Bioscience**, v. 1, n. 1, p. 1–24, 2001.

STEINBÜCHEL, A.; HEIN, S. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 71, p. 81–123, 2001.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 2, p. 81–96, 2003.

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

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, p. 1503–1555, 2000.

TACIRO, M. K. **Processo contínuo de produção de polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHAmcl) sob limitação múltipla de nutrientes**. 2008. 101 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TAGUCHI, S.; DOI, Y. Evolution of Polyhydroxyalkanoate (PHA) production system by “enzyme evolution”: Successful case studies of directed evolution. **Macromolecular**

**Bioscience**, v. 4, n. 3, p. 145–156, 2004.

TIMM, A.; BYROM, D.; STEINBÜCHEL, A. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 3, p. 296–301, 1990.

TRAN, T. T.; CHARLES, T. C. Genome-engineered *Sinorhizobium meliloti* for the production of poly(lactic-co-3-hydroxybutyric) acid copolymer. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 130–138, 2016.

TRIPATHI, L. et al. Synthesis of Diblock copolymer poly-3-hydroxybutyrate -block-poly-3-hydroxyhexanoate [PHB-*b*-PHHx] by a  $\beta$ -oxidation weakened *Pseudomonas putida* KT2442. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 44, p. 1–14, 2012.

TSUGE, T.; HYAKUTAKE, M.; MIZUNO, K. Class IV polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases and PHA-producing *Bacillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 15, p. 6231–6240, 2015.

VALAPPIL, S. P. et al. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoates, an overview of animal testing and in vivo responses. **Expert Review of Medical Devices**, v. 3, n. 6, p. 853–868, 1 nov. 2006.

VENNING-SLATER, M.; HOOKS, D. O.; REHM, B. H. A. In vivo self-assembly of stable green fluorescent protein fusion particles and their uses in enzyme immobilization. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 10, p. 3062–3071, 2014.

VO, M. T.; KO, K.; RAMSAY, B. Carbon-limited fed-batch production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by a *phaZ*-knockout strain of *Pseudomonas putida* KT2440. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 637–646, 2015.

VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the bacterium *Wautersia eutropha*. **Macromolecular Symposia**, v. 269, n. 1, p. 1–7, 2008.

WAHAB, H. A. et al. Sequence analysis and structure prediction of type II *Pseudomonas* sp. USM 4-55 PHA synthase and an insight into its catalytic mechanism. **BMC structural biology**, v. 6, n. 23, p. 1–14, 2006.

WANG, Y.; YIN, J.; CHEN, G. Q. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 30, p. 59–65, 2014.

WATANABE, Y. et al. Biosynthesis and characterization of novel poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-2-methylbutyrate): thermal behavior associated with  $\alpha$ -carbon methylation. **RSC Adv.**, v. 5, n. 72, p. 58679–58685, 2015.

YANG, D. et al. Microplastic Pollution in Table Salts from China. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 22, p. 13622–13627, 2015.

ZHANG, B.; CARLSON, R.; SRIENC, F. Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 536–543, 2006.

ZHANG, H.-F. et al. Biosynthesis and characterization of 3-hydroxyalkanoate terpolyesters with adjustable properties by *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 104, n. 3, p. 582–589, 2009.

## **APÊNDICES**

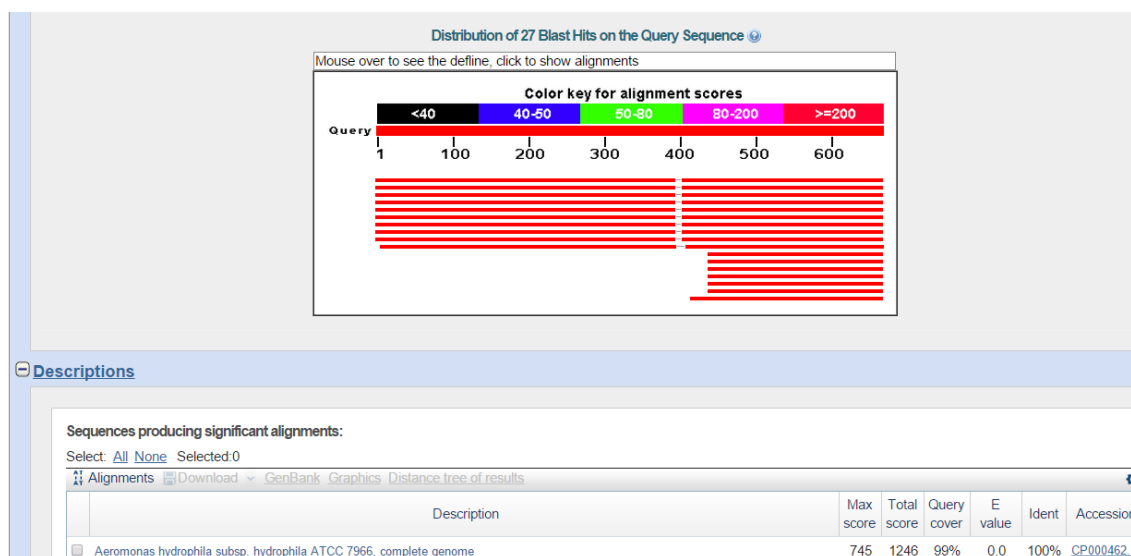
## APÊNDICE A – Sequenciamento de insertos

Sequências dos fragmentos de DNA inseridos no DNA cromossômico das linhagens de *Pseudomonas* (LFM046 e LFM461) utilizadas neste trabalho.

Abaixo, estão apresentados os dados obtidos em reação de sequenciamento, assim como os resultados do BLAST realizado com as sequências obtidas.

### Sequência *forward* obtida com a linhagem 046::*phaC<sub>Ah</sub>*

```
ACGCGGGCAGATTGACGCCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGTACTGGCGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCC
CCATGGCAAGCAGCAGGGCAGCAGGTTTCATCGATGCATTCCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCG
GCGGCCCTGGGAACGAGACCCGACGACGCTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAACTGGACAGACCA
GAATCAATATTTCCGCAAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCATTTGGTAACACAATGCCTAAACGTGC
GTTTGAACAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGGATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAATGGGCCCATCGGCC
TTTTGCAATACCCAAGCTTATGCTCCGTACGACAGGCTCGCCCTGCGCCGGGGATGGGTGAAGGAGAGAACATGAGC
CAATCATCTTACGGCCCGCTGTTTCGAGGCCCTGGCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGCGCAGACC
GAGCGCACGGCCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTCGGCCAGGTGCTGGAACAGGGTAGCCAACAGCCC
TGGCAACTGATCAATGCCAGATGAACTGGTGGCAGGATCAGCTCAAACCTGATGCA
```

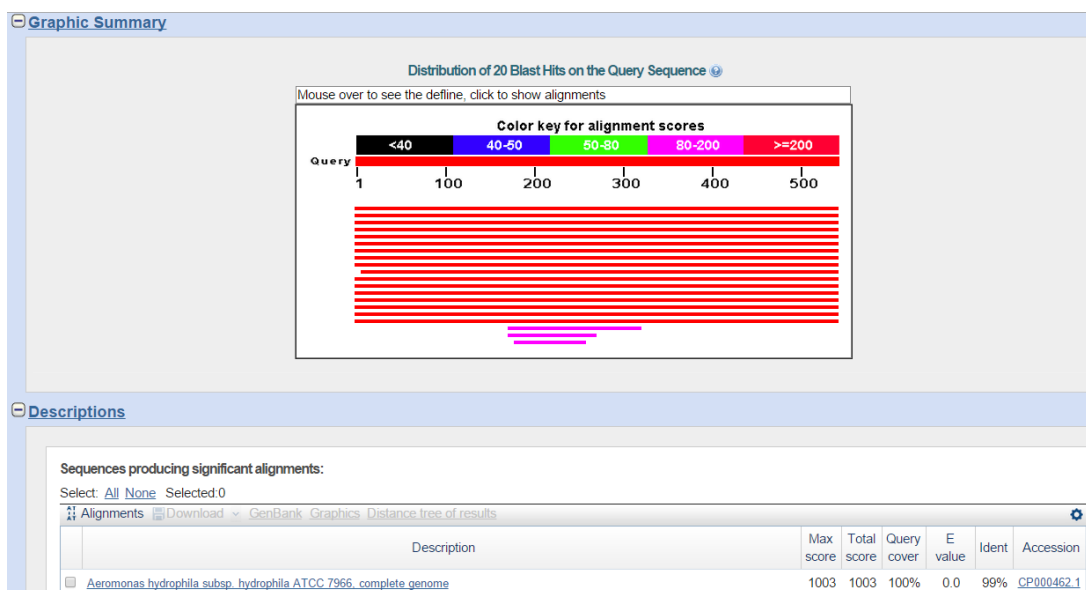


**Figura A1** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 100% com o genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

### Sequência *reverse* obtida com a linhagem 046::*phaC<sub>Ah</sub>*

```
GAGCCTTACCTTGACGTAGCTACCGGGGGCCGCTTCCAGCCCTTCGCTCGGGATGCGGGCAGGGAGGGGGCGGGATC
CTCTTCCCGGCTCTGGATGAAGGCGGCCATCTGCGGCCACCAGGAGCCTGGGGTGTGGCTTGCGCCGGCGAGCCACGC
CTCGGGGCTGATGGCTCGGCGTCGTTCTGCCAGAAGCCGTA CTGTTGGCGTCCGGCGGATGACGATGCCGGCGAT
GTGGCCCGATTACGCCAGGATGAAGCGCTGCTCGCCACCGAACAGCTTCATGCCCTGCCAGGTCCCTTGCCAGAGGGC
GATGTGATCGTCCATGGCCGAGACCAGCAGCACCGGGTCTTCACTTGCCGAGATCGATGCGGGTGTGGCGGATCTT
GAGCTCCCCCTTCYYYAGCTGGTTCTCCAGATAGAGCCGGCGCAGCAGGCTGCTGTGGGTCTTGCCCGCCACGTTGGT
```

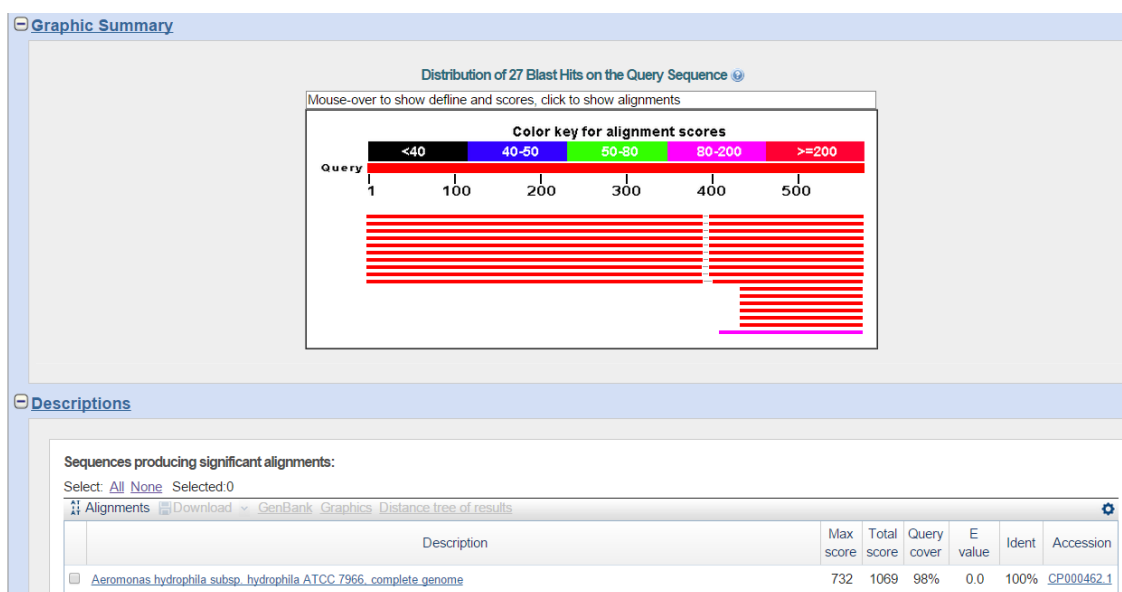
GCTGTCGCTGTTCCAGTGCAGCAGATCGAACGCCACCGGGCTCTGCCCTTGAGGTAGCTGTCGATGTAGTAATTCCA  
GTA



**Figura A2** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

### Sequência *forward* obtida com a linhagem 461::*phaCA<sub>h</sub>*

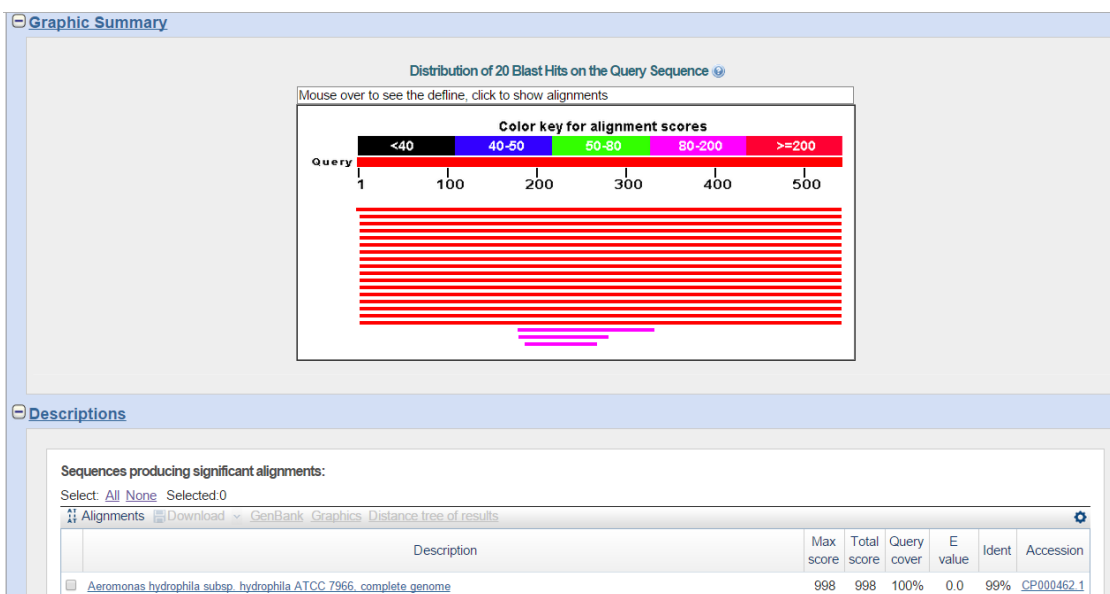
CAGATTGACCCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGGTACTGGCGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGC  
AAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCATCGATGCATTCCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCC GGCGCCCT  
GGGAACGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAAACTGGACAGACCAGAATCAA  
TATTTCCGCAAAAATTAACATTTATATTTTACATCAAGCCTCATTTGGTAACACAATGCCTAAACGTGCGTTTGAA  
CAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGGATGTAGTCGAACGGATGTAACCGAAGAATGGGCCCATCGGCCTTTTGCA  
ATACCCAAGCTTATGCTCCGTCACGACAGGCTCGCCCTGCGCCGGGGATGGGTGAAGGAGAGAACATGAGCCAATCAT  
CTTACGGCCCCTGTTTCGAGGCCCTGGCCCACTACAACGACAAGCTGCTGGACATGGCCAAGGGCGACCCGAGCGCA  
CGGCCAAGCCCTGCTGCAGACCAATCTCGACGATCTC



**Figura A3** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 100% com o genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

#### Sequência reverse obtida com a linhagem 461::*phaC<sub>Ah</sub>*

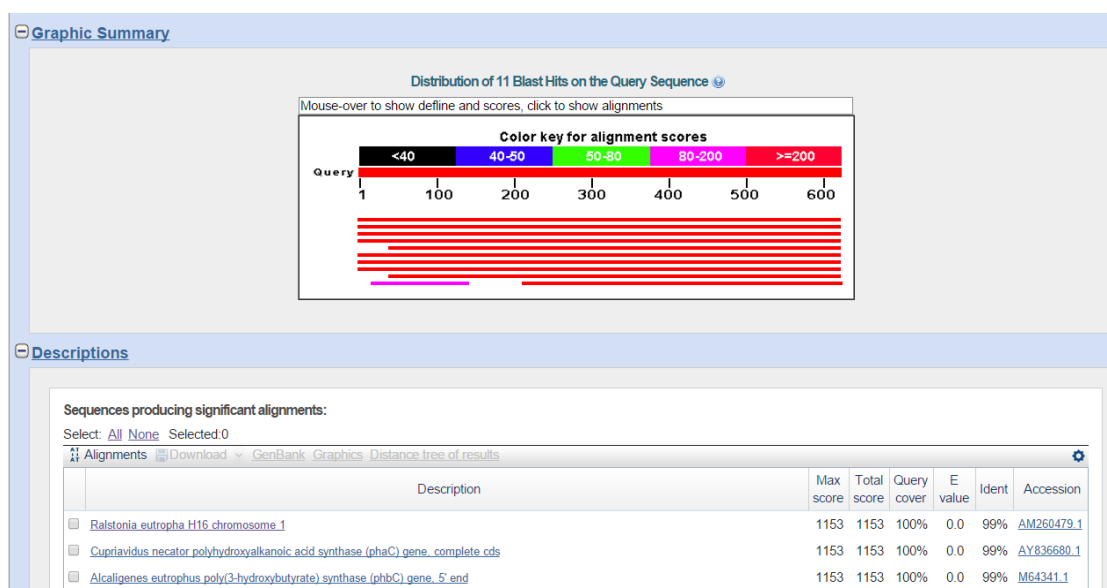
```
ACTGGGTTGAGCCTTACCTTGACGTAGCTACCGGGGGCCGCTTCCAGCCCTTCGCTCGGGATGCGGGCAGGGAGGGGG
GCGGGATCCTCTTCCCGGCTCTGGATGAAGGCGGCCATCTGCGGCCACCAGGAGCCTGGGGTGTGGCTTGCGCCGGCG
AGCCACGCCTCGGGGCTGATGGCCTCGGCGTCGTTCTGCCAGAAGCCGTACTTGTGGCGTCCGGCGGATTGACGATG
CCGGCGATGTGGCCCGATTCAGCCAGGATGAAGCGCTGCTCGCCACCGAACAGCTTCATGCCCTGCCAGGTCCCTTGC
CAGAGGGCGATGTGATCGTCCATGGCCGAGACCAGCAGCACCGGGGTCTTACCTTGCCGAGATCGATGCGGGTGTGG
CGGATCTTGAGCTCCCCCTTCYCYAGCTGGTTCTCCAGATAGAGCCGGCGCAGCAGGCTGCTGTGGGTCTTGCCCGCC
ACGTTGGTGCTGTCGCTGTTCCAGTGCAGCAGATCGAACGCCACCGGGCTCTGCCCTTGAGGTAGCTGTTCGATGT
```



**Figura A4** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o genoma de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966.

### Sequência *forward* obtida com a linhagem 046::*phaC<sub>Re</sub>*

AGCCGGTTCGAATAGTGACGGCAGAGAGACAATCAAATCATGGCGACCGGCAAAGGCGGGCAGCTTCCACGCAGGAA  
 GGCAAGTCCCAACCATTTCAAGGTCACGCCGGGGCCATTCGATCCAGCCACATGGCTGGAATGGTCCCGCCAGTGGCAG  
 GGCACCTGAAGGCAACGGCCACGCGGCCGCTCCGGCATTCGGGGCTGGATGCGCTGGCAGGCGTCAAGATCGCGCCG  
 GCGCAGCTGGGTGGTATCCAGCAGCGCTACATGAAGGACTTCTCAGCGCTGTGGCAGGCCATGGCCGAGGGCAAGGCC  
 GAGGCCACCGGTCCGCTGCACGACCGGCGCTTCGCCGGGACGCATGGCGCACCAACCTCCCATATCGCTTCGCTGCC  
 GCGTTCTACCTGCTCAATGCGCGCGCCTTGACCGAGCTGGCCGATGCCGTCGAGGCCGATGCCAAGACCCGCCAGCGC  
 ATCCGCTTCGCGATCTCGCAATGGGTGATGCGATGTCGCCCGCCAACCTTCCCTTGCCACCAATCCCAGGGCGCAGCGC  
 CTGCTGATCGAGTCGGGCGGCGAATCGCTGCGTGCCGGCTGCGCAACATGATGGAAGACCTGACACGCGGCAAGATC  
 TCG

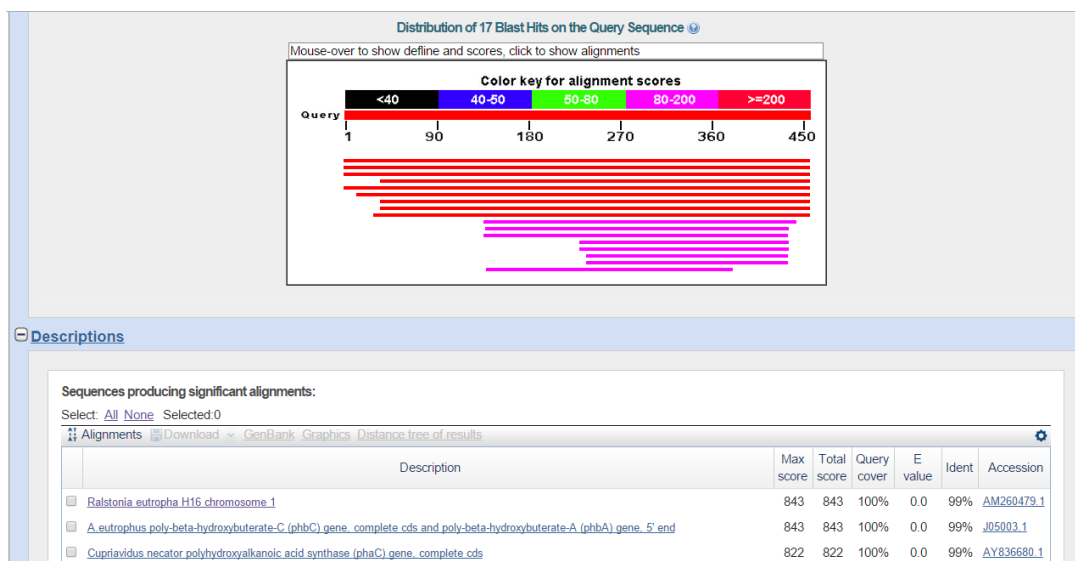


**Figura A5** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o gene da PHA sintase de *Cupriavidus necator* (nome atual da linhagem *Ralstonia eutropha*).

### Sequência *reverse* obtida com a linhagem 046::*phaC<sub>Re</sub>*

CGCCGTGCATGACGCACGCCSGCAYTCATGCAAGCGTCATGCCTTGCTTTGACGTATCGCCAGGCGGGTTCGAT  
 TGCGGATAGCGCGCATTGCCATAGTTGGCGGGCGCGCGCTTCGCGCCGGCTGCCCGCCAGCCATGCGGTCCA  
 GTCCGGCCACCAGCTGCCGTGATGCTCGATGGCGCCGGCCAGCCATTGCTGCGGGACTCCGGCAGCGCATCGTTAGT  
 CCAGTGGCTGCGCTTGTCTTGGCCGGCGGGTTGATCACACCGCGATATGGCCGACGCACCCAGCACGAAGCGCAG  
 CTTGTTCCGACAGCGCGGTTCGAGGCATAGGCCGCGTCCACGGCAGCATATGGTCTTCGCGCGAGCCGTAGATATA  
 GGTGCGCAGTCGATGCTGGCCAGGTCCACCGGCACCGGCACACGGTCAGCTTGCCCGGTACCTTGAGCTCG

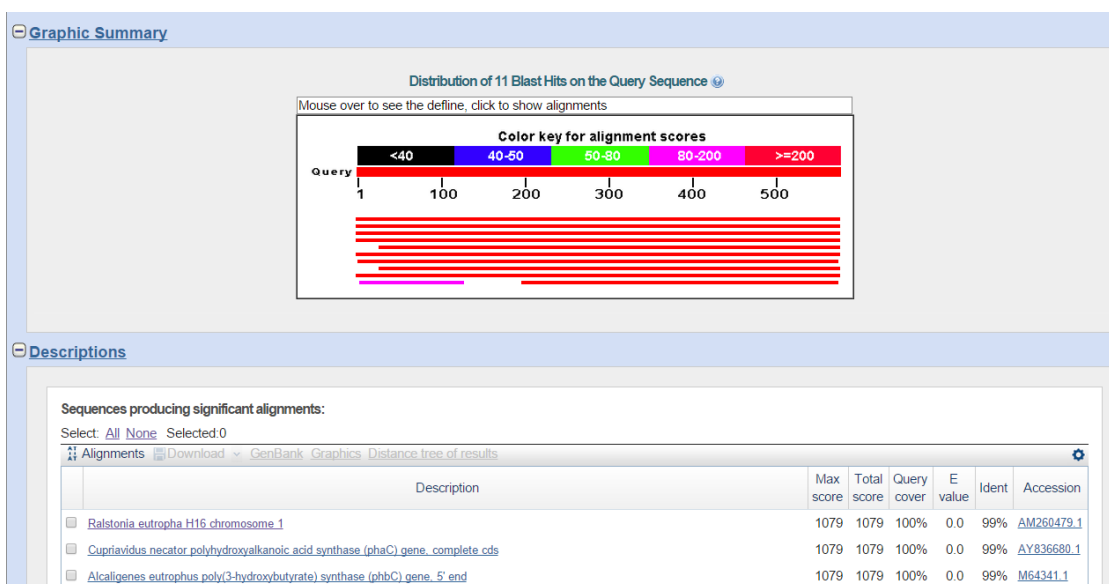




**Figura A6** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o gene da PHA sintase de *Cupriavidus necator* (nome atual da linhagem *Ralstonia eutropha*).

### Sequência *forward* obtida com a linhagem 461::*phaC<sub>Re</sub>*

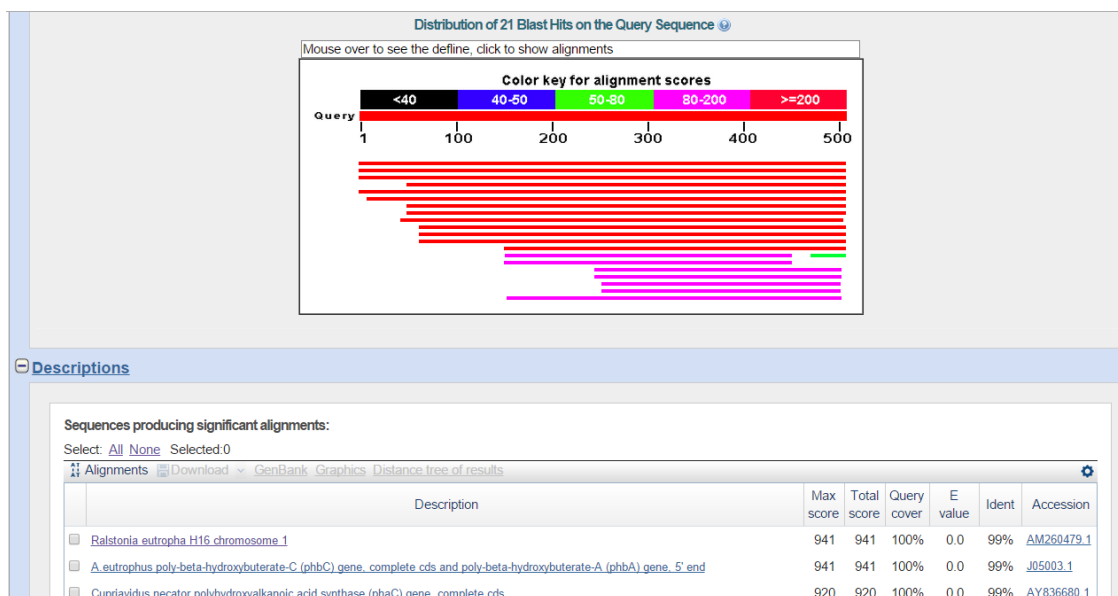
TAGTGACGGCAGAGACAATCAAATCATGGCGACCGCAAAGGCGCGGCAGCTTCCACGCAGGAAGGCAAGTCCCAA  
 CCATTCAAGGTCACGCCGGGGCCATTCGATCCAGCCACATGGCTGGAATGGTCCCGCCAGTGGCAGGGCACTGAAGGC  
 AACGGCCACGGCGCCGCTCCGGCATTCCGGCCTGGATGCGCTGGCAGGGCTCAAGATCGCGCCGGCGCAGCTGGGT  
 GGTATCCAGCAGCGCTACATGAAGGACTTCTCAGCGCTGTGGCAGGCCATGGCCGAGGGCAAGGCCGAGGCCACCGGT  
 CCGCTGCACGACCGGCGCTTCGCCGGCGACGCATGGCGCACCAACCTCCCATATCGCTTCGCTGCCGCTTCTACCTG  
 CTCAATGCGCGGCCTTGACCGAGCTGGCCGATGCCGTGAGGCCGATGCCAAGACCCGCCAGCGCATCCGCTTCGG  
 ATCTCGCAATGGGTGCATGCGATGTCGCCGCCAACTTCTTGCCACCAATCCCGAGGGCGCAGCGCCTGCTGATCGAG  
 TCGGGCGGCGAATCGCTGCGTGCCGGCGTGCCGAACATGAT



**Figura A7** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o gene da PHA sintase de *Cupriavidus necator* (nome atual da linhagem *Ralstonia eutropha*).

### Sequência *reverse* obtida com a linhagem 461::*phaC<sub>Re</sub>*

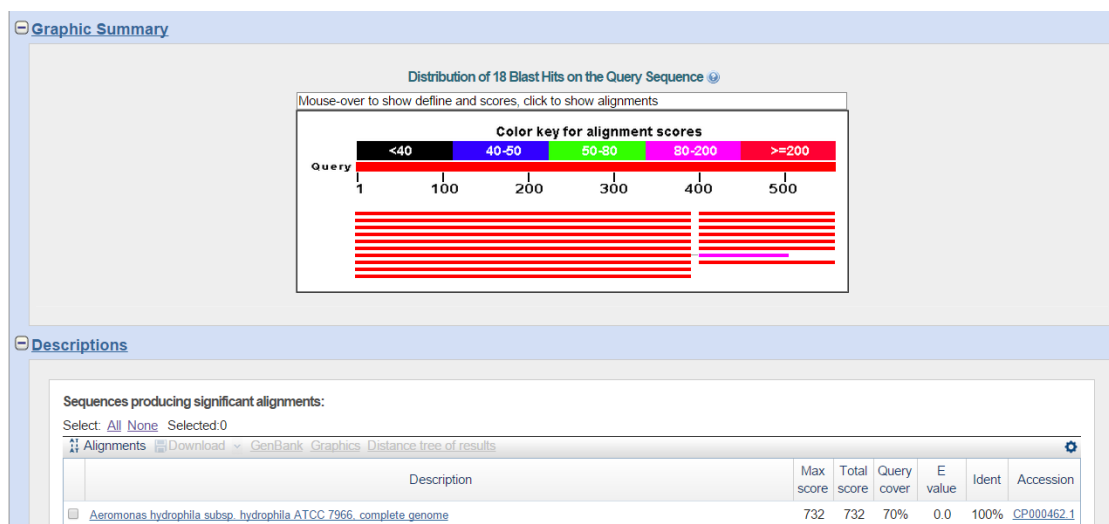
TGCAGGCCTGCCGGCGCCGTGCATGACGCACGCCGGCACTCATGCAAGCGTCATGCCTTGGCTTTGACGTATCGCCCA  
 GGCGCGGGTTCGATTGCGCGATAGCGCGCATTGCCATAGTTGGCGGGCGCGCGCTTCGCGCCGGCCTGCCCGGCC  
 AGCCATGCGGTCCAGTCCGGCCACCAGCTGCCGTGATGCTCGATGGCGCCGGCCAGCCATTGCTGCGGGCACTCCGGC  
 AGCGCATCGTTAGTCCAGTGGCTGCGCTTGTCTTGGCCGGCGGGTTGATCACACCGGCGATATGGCCCGACGCACCC  
 AGCACGAAGCGCAGCTTGTTCGCCAGCAGCGGGTCGAGGCATAGGCCCGGGTCCACGGCAGATATGGTCTTCGCGC  
 GAGCCGTAGATATAGGTCGGCAGTCGATGCTGGCCAGGTCCACCGGCACGCCGCACACGGTCAGCTTGCCCGGTACC  
 TTGAGCTCGTTCTGCAGGTAGGTGTGGCGCAGGTACCAGCAGTA



**Figura A8** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 99% com o gene da PHA sintase de *Cupriavidus necator* (nome atual da linhagem *Ralstonia eutropha*).

### Sequência *forward* obtida com a linhagem 461::*phaC<sub>Asp</sub>*

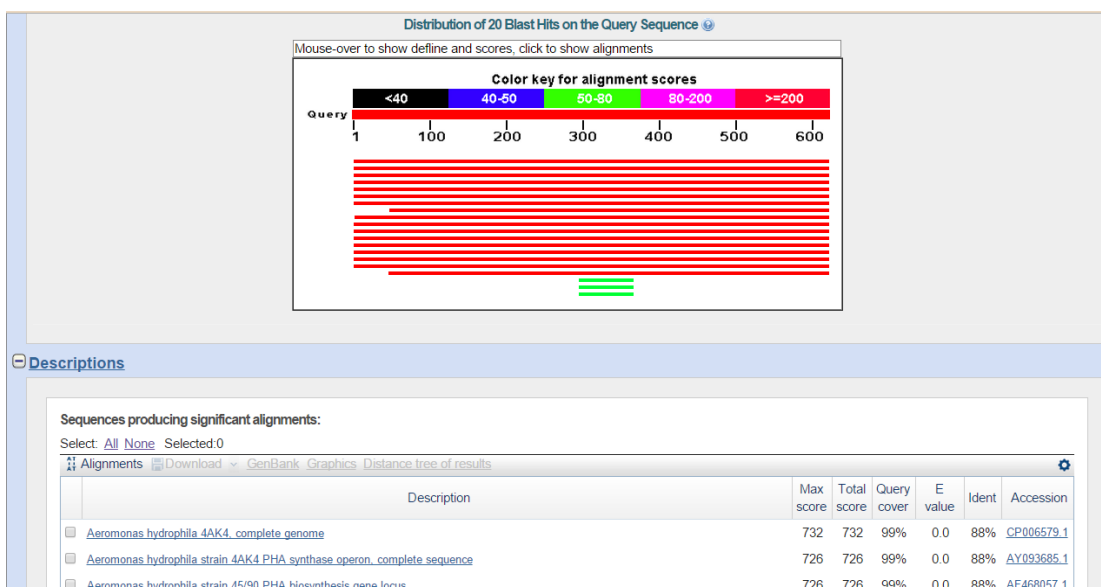
CAGATTGACGCCGGGCAAGGAGAGCTGGACAGGGTACTGGCGTGGGCAACGCCACCAAGGGCCACAGCCCCCATGGC  
 AAGCAGCAGGCGAGCAGGTTTCATCGATGCATTCCTCAAGACTCAGGGAGTGGCGTCAGCCTACCAGCCCCGGCGGCT  
 GGAACGAGACCCGACGGACGTGGCTGCGTCACCCCTCGTCTGAATCGGGCCAGCCAACTGGACAGACCAGAATCAA  
 TATTTGCCCCAAAATTAACATTTATATTATTACATCAAGCCTCATTTGGTAACACAATGCCTAAACGTGCGTTTGAA  
 CAGAGCAAACGACACGCAACGACTTAAGGATGTAGTGAACGGATGTAACCGAAGAATGGGCCCATCGGCCTTTGCA  
 ATACCCAAGCTTCTGCAGTTCAAGGAAGAGCTGGATGCCCTGACCGCGGACGGCATCAAGAAGAGMACGGGCAAGGC  
 CTGATAACCCCTGGCTGCCCGTCCGGGCAGCCACATCTCCCCACGACACGAGTGCAGGGGCCCTGCCCGCTCGGGT  
 GTGGGTGAAGGAGAACACA



**Figura A9** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 100% com o genoma da linhagem *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966. Isso era esperado, pois foi usada a sequência promotora dessa linhagem para a construção do DNA recombinante.

### Sequência *reverse* obtida com a linhagem 461::*phaC*<sub>Asp</sub>

TGACCGCTTGGTCAGACGCGCCTTCTGGCCACGGCGAGGGCTGGTASATTCATGCTGCGTCTCTGCTGGGCGCTG  
 GCAAACACCGGGTTGAGCCGCACCTTGACGTAGCTGCCTGGCGCAGCCTCCAGCCCTTCGGCCGGCAGCGTGC  
 ACGGGCTCGGCCCCCTCGTCACGGCCCTGGATGAAACGGATCATCTCGGGCCACCAGGAGCCGGTGCCGTGGGTCGG  
 CCCGCCAGCCACGCCTCTGGGCTGCCGGCTCGATCTCGTCTGCCAGAAGCCGTATTTGTTGGCTGCCGGCGGGTTG  
 ATGATGCCGGCGATGTGGCCGACTCGGCCAGGATGAAGCGCGCTCGCCGCCGAACAGCGCCATGCCCTGCCAGGTG  
 CCCTGCCAGAGGGCGATGTGATCGTCCACGGCCGACACCAGCAGCACCAGGGGCTTTCACCTTGCGGAGCTCGATGCGG  
 GTGTTGGCGATCTGAGCTCCCCCTTACCAGCTGGTTCTCCAGGTAGAGACGGCGCAGCAGACTGCTGTGGGCTTGG  
 CCCGCCACATGGGTGCTGTGCTGTTCCAGTGCAGCAGATCGAAGGCCACCGGGCTCTGGCCCTTGAGGTAGCTGTGCG  
 ATGT



**Figura A10** - Resultado do alinhamento da sequência obtida. Há identidade de 88% com sequências de PHA sintases de linhagens do gênero *Aeromonas*.

### APÊNDICE B – Dados obtidos em ensaio em agitador rotativo

Dados, obtidos em cada triplicada, de concentração de glicose, pH, MSC e acúmulo de biopolímeros obtidos nos ensaios em agitador rotativo.

**Tabela B1** - Dados obtidos para cada triplicata, em duplicata analítica, em ensaio de acúmulo de 72 horas. Estão apresentadas a concentração de glicose (g/L), massa seca celular (MSC em g/L), a porcentagem de massa seca referente aos polihidroxialcanoatos (PHA - %MSC) e o pH final do meio de cultura.

Linagem	Glicose (g/L)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)	pH
046 WT 0h 1	20,0	0,56	-	7,03
046 WT 0h 2	20,0	0,80	-	7,03
046 WT 0h 3	20,0	0,60	-	7,04
046 WT 0h 1'	20,0	0,52	-	7,02
046 WT 0h 2'	20,0	0,52	-	7,03
046 WT 0h 3'	20,0	0,56	-	7,04
461 0h 1	20,0	0,68	-	7,06
461 0h 2	20,0	0,76	-	7,10
461 0h 3	20,0	0,72	-	7,08
461 0h 1'	20,0	0,48	-	7,05
461 0h 2'	20,0	0,52	-	7,10
461 0h 3'	20,0	0,52	-	7,10
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 1	20,0	0,36	-	-
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 2	20,0	0,36	-	-
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 3	20,0	0,72	-	-
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 1'	20,0	0,52	-	7,00
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 2'	20,0	0,64	-	7,06
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 3'	20,0	0,40	-	7,00
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 1	20,0	0,32	-	7,09
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 2	20,0	0,28	-	7,07
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 3	20,0	0,48	-	7,09
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 1'	20,0	0,36	-	7,06
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 2'	20,0	0,56	-	7,08

461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 0h 3'	20,0	0,48	-	7,10
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 1	20,0	0,60	-	7,02
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 2	20,0	0,68	-	7,06
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 3	20,0	0,52	-	7,03
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 1'	20,0	0,76	-	7,02
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 2'	20,0	0,72	-	7,05
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 3'	20,0	0,60	-	7,02
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 1	20,0	0,52	-	7,12
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 2	20,0	0,56	-	7,02
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 3	20,0	0,60	-	7,05
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 1'	20,0	0,64	-	7,11
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 2'	20,0	0,44	-	7,02
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 0h 3'	20,0	0,48	-	7,06
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 1	20,0	0,68	-	7,11
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 2	20,0	0,68	-	7,06
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 3	20,0	0,60	-	7,06
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 1'	20,0	0,68	-	7,10
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 2'	20,0	0,72	-	7,05
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 3'	20,0	1,04	-	7,06
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 1	20,0	0,68	-	7,12
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 2	20,0	0,96	-	7,08
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 3	20,0	1,00	-	7,13
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 1'	20,0	0,64	-	7,11
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 2'	20,0	0,52	-	7,10
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 0h 3'	20,0	0,60	-	7,15
046 WT 72h 1	0,00	6,42	39,50426026	6,52
046 WT 72h 2	0,00	16,62	42,67204174	6,54
046 WT 72h 3	0,00	6,48	44,94470482	6,53
046 WT 72h 1'	0,00	6,44	42,21005651	6,54
046 WT 72h 2'	0,00	5,82	48,08185765	6,52
046 WT 72h 3'	0,00	5,80	45,33359806	6,53
461 72h 1	4,91	9,36	1,603553383	5,45
461 72h 2	4,52	4,30	2,014938337	5,38
461 72h 3	4,87	6,74	1,869040418	5,28

461 72h 1'	5,12	8,24	1,786068722	5,45
461 72h 2'	4,44	6,52	2,125263441	5,37
461 72h 3'	4,99	3,06	2,015252709	5,29
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 1	0,00	7,48	41,21000838	6,57
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 2	0,00	6,26	40,36417881	6,56
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 3	0,00	10,28	40,23393325	6,57
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 1'	0,00	6,24	42,01334658	6,55
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 2'	0,00	7,06	41,59454182	6,55
046 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 3'	0,00	6,84	41,36047924	6,56
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 1	4,33	5,46	0,520103127	5,77
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 2	4,51	8,22	0,474337389	5,57
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 3	3,50	3,72	0,537900381	5,64
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 1'	4,28	4,56	0,501348413	5,78
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 2'	4,64	4,34	0,518014665	5,59
461 <i>phaC<sub>Re</sub></i> 72h 3'	3,42	3,94	0,522514191	5,64
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 1	0,00	6,74	34,30489603	6,53
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 2	0,00	8,9	33,38210522	6,54
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 3	0,00	8,2	33,12464701	6,55
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 1'	0,00	3,6	29,39125988	6,55
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 2'	0,00	10,72	33,32105796	6,51
046 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 3'	0,00	6,06	32,21784811	6,55
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 1	2,10	4,06	1,783164962	6,48
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 2	2,68	5,66	1,311623253	6,48
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 3	1,28	3,88	2,178539498	6,47
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 1'	1,83	5,38	2,086886667	6,48
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 2'	2,74	5,04	2,116850218	6,46
461 <i>phaC<sub>Ah</sub></i> 72h 3'	1,29	4,14	2,302154895	6,46
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 1	0,00	9,44	38,60790299	6,53
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 2	0,00	8,68	38,5047043	6,57
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 3	0,00	6,24	37,77650439	6,56
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 1'	0,00	6,62	37,94668195	6,53
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 2'	0,00	7,74	40,30575393	6,57
046 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 3'	0,00	6	53,2263862	6,56
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 1	4,57	3,14	0	5,50

461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 2	4,01	5,76	0	5,66
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 3	3,34	3,58	0	5,83
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 1'	4,54	3,7	0	5,47
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 2'	4,00	3,94	0	5,66
461 <i>phaC<sub>Asp</sub></i> 72h 3'	3,35	4,86	0	5,82

---

**Tabela B2** - Dados obtidos para cada triplicata, em duplicata analítica, em ensaio de acúmulo de 72 horas. Estão apresentadas as quantidades detectadas, em mol%, dos monômeros de cadeia curta e média. 3HB: 3-hidroxi butirato; 3HHx: 3-hidroxi hexanoato; 3HO: 3-hidroxi octanoato; 3HD: 3-hidroxi decanoato; 3HDd: 3-hidroxi dodecanoato.

<b>Produção de PHA</b>							
<b>Amostras</b>	<b>%PHA</b>	<b>3HB mol%</b>	<b>3HHx mol%</b>	<b>3HO mol%</b>	<b>3HD mol%</b>	<b>3HDd mol%</b>	<b>Total</b>
<b>046 WT 1</b>	39,504	0,000	2,360	33,281	59,712	4,647	100,000
<b>046 WT 1'</b>	42,672	0,000	2,528	33,283	59,603	4,586	100,000
<b>046 WT 2</b>	44,945	0,000	2,584	32,179	61,006	4,231	100,000
<b>046 WT 2'</b>	42,210	0,000	2,360	33,071	59,416	5,153	100,000
<b>046 WT 3</b>	48,082	0,000	2,320	34,055	58,454	5,171	100,000
<b>046 WT 3'</b>	45,334	0,000	2,873	33,538	59,239	4,349	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 1</b>	41,210	0,000	2,763	33,652	59,153	4,432	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 1'</b>	40,364	0,000	2,811	34,006	58,777	4,406	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 2</b>	40,234	0,000	2,228	33,914	59,245	4,613	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 2'</b>	42,013	0,000	2,891	34,407	58,133	4,568	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 3</b>	41,595	0,000	2,703	33,141	59,520	4,636	100,000
<b>046 phaC<sub>Re</sub> 3'</b>	41,360	0,000	2,718	33,491	59,110	4,681	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 1</b>	34,305	3,785	2,362	28,422	59,859	5,572	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 1'</b>	33,382	3,757	2,489	28,460	59,726	5,567	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 2</b>	33,125	3,281	2,126	27,302	60,494	6,797	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 2'</b>	29,391	3,054	2,377	28,093	60,263	6,213	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 3</b>	33,321	3,441	2,255	28,138	59,936	6,231	100,000
<b>046 phaC<sub>Ah</sub> 3'</b>	32,218	3,329	2,434	28,718	59,800	5,718	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 1</b>	38,608	0,000	2,611	31,714	60,838	4,837	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 1'</b>	38,505	0,000	2,653	31,899	60,522	4,926	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 2</b>	37,777	0,000	2,707	32,211	60,328	4,754	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 2'</b>	37,947	0,000	2,695	32,395	60,147	4,763	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 3</b>	40,306	0,000	2,348	33,221	59,732	4,700	100,000
<b>046 phaC<sub>Asp</sub> 3'</b>	53,226	0,000	2,344	32,411	60,500	4,745	100,000
<b>461 1</b>	1,604	0,000	0,000	0,000	32,276	67,724	100,000
<b>461 1'</b>	2,015	0,000	0,000	0,000	28,175	71,825	100,000





**APÊNDICE C – Publicações científicas em andamento**

Páginas de rosto dos artigos decorrentes desse trabalho (em preparação).

**Production of hybrid PHA copolymers by a recombinant *Pseudomonas* strain harboring an *Aeromonas hydrophila* PHA synthase gene in its chromosome**

Edmar Ramos de Oliveira-Filho<sup>1</sup>, Linda P. Guamán<sup>1,\*</sup>, Thátiane Teixeira Mendonça<sup>1</sup>, Marilda Keico Taciro<sup>1</sup>, José Gregório Cabrera Gomez<sup>1\*</sup>, Luíziana Ferreira da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Bioproducts, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

\*Present address: Faculty of Science and Food Engineering, Technical University of Ambato, Ambato, Ecuador.

\*corresponding authors – mailing address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Lab 148, Cidade Universitária – CEP 05508-000 – São Paulo, SP- Brazil. Phone: +55 11 30917730; Fax: +55 11 30917354. e-mail: [luizneif@usp.br](mailto:luizneif@usp.br); [jcgomez@usp.br](mailto:jcgomez@usp.br)

**Abstract**

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are biopolymers naturally produced and accumulated by many organisms such as bacteria, archaeans and eukaryotes. As thermoplastics, biodegradable, biocompatible and possibly made from renewable resources, they exhibit great potential as an alternative to oil-derived plastics. Hybrid PHA copolymers can be formed by short and medium-chain monomers, P(3HB-co-3HA<sub>med</sub>), and present industry desired physicochemical properties, becoming similar to conventional oil-based plastics as polyethylene terephthalate and low-density polyethylene. PHA synthase is the key enzyme in PHA biosynthesis, responsible for catalyzing the polymerization of (*R*)-hydroxyacyl-CoA molecules, influencing polymer monomeric composition. In this work, the construction of resistance-free recombinant *Pseudomonas* harboring PHA synthase genes from *Ralstonia eutropha* and *Aeromonas* strains in specific sites of its chromosome is described. Obtained clones were screened to detect chromosomal insertion and its PHA production and composition was evaluated in shaken-flasks assays, in which P(3HB-co-3HHx-co-3HD) production was achieved.

**Keywords:** *Pseudomonas* sp.; polyhydroxyalkanoates; PHA synthase; biopolymers; mini-Tn7.

## **PHA synthase as a key-feature in biotechnological advances and future prospects to develop new PHA as bioproducts**

Edmar Ramos de Oliveira Filho<sup>1</sup>, Thatiane Teixeira Mendonça<sup>1</sup>, Gabriela Cazonato Lozano-Sakalauskas<sup>1</sup>, Aline Carolina da Costa Lemos<sup>1</sup>, José Gregório Cabrera Gomez<sup>1</sup>, Luiziana Ferreira da Silva<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Bioproducts, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, Brazil

\* corresponding author – mailing address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária – CEP 05508-000 – São Paulo, SP- Brazil. Phone 55(11) 30917730 Fax: 55(11) 30917354. e-mail: lukneif@usp.br

### **Abstract**

PHA synthase (PhaC) has been one of the most important targets in studies aiming to improve the production of the biodegradable and biocompatible polyester belonging to the polyhydroxyalkanoate (PHA) family. PhaC catalyzes the polymerization of 3-hydroxyacyl-CoA monomers to PHA, which are then accumulated as intracellular granules by some bacteria. Strategies adopted to diversify PHA composition and to improve polymer production involve bioprocess engineering and/or PHA synthase manipulation. In this sense, some of the most studied approaches have involved *phaC* heterologous expression in different hosts, protein evolution and enzyme engineering. This review focuses on recent approaches on the heterologous expression of some widely known PhaC (and also newly described ones) in bacterial hosts especially *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* and other more recently used hosts to produce PHA and other bioproducts, comparing plasmid and chromosomal expressions. Patents based on the use of PhaC were widely searched to draw the current scenario of biotechnological advances to produce PHA.