KARINNA CHOUMAN

**Produção de polímeros biodegradáveis por *Escherichia coli*
recombinante a partir de açúcares derivados do hidrolisado do
bagaço de cana-de-açúcar**

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

São Paulo
2012

KARINNA CHOUMAN

**Produção de polímeros biodegradáveis por *Escherichia coli*
recombinante a partir de açúcares derivados do hidrolisado do
bagaço de cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para a 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
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Chouman, Karinna.

Produção de polímeros biodegradáveis por *Escherichia coli* recombinante a partir de açúcares do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar / Karinna Chouman. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

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

Versão do título para o inglês: Production of biodegradable polymers by recombinant *Escherichia coli* from sugars present on sugar cane bagasse hydrolysate.

1. Biopolímeros 2. Repressão catabólica 3. Bagaço de cana-de-açúcar 4. Xilose I. Silva, Profa. Dra. Luiziana Ferreira da II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0163/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karinna Chouman.

Título da Dissertação: Produção de polímeros biodegradáveis por *Escherichia coli* recombinante a partir de açúcares do hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar.

Orientador(a): Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 374/10 referente ao projeto intitulado: *“Produção de polímeros biodegradáveis por Escherichia coli recombinante a partir de hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar”* sob a responsabilidade de **Karina Chouman**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 20 de abril de 2010.

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

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

À minha mãe, motivadora de todas as
minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Luiziana Ferreira da Silva, por ter me dado a oportunidade de fazer este trabalho, por me ensinar tudo que sei hoje e pela paciência.

Ao Professor Doutor José Gregório Gomez, pela grande ajuda na realização deste trabalho. Não somente professor, mas pessoa ilustre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Mateus, à Johana, ao Rogério e à Paola, que me ensinaram as técnicas de laboratório no início do trabalho.

Aos colegas do laboratório que sempre estavam prontos a ajudar quando necessário.

Aos meus avós Antenor e Dalva, que sempre me apoiaram financeiramente para que eu pudesse estar aqui quando estava sem bolsa, e ao meu pai Kassem que também contribuiu para que eu pudesse ficar aqui em São Paulo para a finalização deste trabalho.

Às pessoas que me acolheram em suas casas quando precisei, Dna Mariazinha, Marcos e Valquíria, Eduardo e Luciana, Célia. Obrigada por tudo.

Ao Jair, por me fazer acreditar que seria possível a realização deste sonho.

À Dna Edna, que foi como uma segunda mãe.

À minha mãe, que sempre acreditou no meu potencial, me incentivando e apoiando nos momentos mais difíceis.

A Deus, por permitir que eu levante a cada dia e continue a caminhada.

“Para cultivar a sabedoria é preciso força interior. Sem crescimento interno, é difícil conquistar a autoconfiança e a coragem necessárias. Sem elas, nossa vida se complica. O impossível torna-se possível com a força de vontade.”

RESUMO

CHOUMAN, K. **Produção de polímeros biodegradáveis por *Escherichia coli* recombinante a partir de açúcares do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar.** 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Poli-hidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres naturais, acumulados por muitas bactérias sob condições de estresse nutricional, que atuam como reserva de carbono e energia. Poli (R)-3-hidroxibutirato (PHB), o PHA mais estudado, é bastante promissor como plástico biodegradável, devido às suas propriedades que são comparáveis às do polipropileno. No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um importante resíduo lignocelulósico associado às usinas de açúcar e álcool. Este resíduo tem sido utilizado para gerar energia nas usinas de produção de açúcar e álcool, porém este bagaço ainda contém açúcares, como glicose e xilose, que podem ser utilizadas como precursores de outros produtos como os PHA. Para que estes açúcares sejam utilizados como matéria-prima por microrganismos, faz-se uma hidrólise ácida. Em mistura de açúcares, diversas bactérias são capazes de selecionar aquele que promove a melhor velocidade de crescimento, consumindo preferencialmente a glicose depois os outros açúcares. Esta resposta, denominada repressão catabólica (RC), é um fenômeno mediado pelo sistema PTS (phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system) em *Escherichia coli*. Embora *E. coli* naturalmente não consiga acumular PHA, algumas linhagens já tem seu genoma sequenciado e, com isso, conseguimos modificá-la geneticamente para produzir PHA e também driblar o problema da repressão catabólica. Neste trabalho foram estudadas estratégias pra reduzir o processo de RC, para que os açúcares em mistura sejam consumidos simultaneamente e inserir genes que permitam a síntese de polihidroxialcanoatos (PHA) em *E. coli* VH33 e W3110, fatores relevantes para melhorar a produtividade de PHA a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Para capacitar as cepas a acumular PHA, os genes *phaCAB* de *Cupriavidus necator* foram obtidos por digestão do pJM9131::*phaCAB* e extração do fragmento *phaCAB* a partir do gel de agarose. Os genes foram ligados ao vetor pBluescript SK⁻ e transferidos para as linhagens W3110 e VH33. Estas construções deram origem às linhagens LFM 862 (*E. coli* VH33 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn}) e LFM 863 (*E. coli* W3110 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn}). Para selecionar meios para avaliar o desempenho dos recombinantes, foi realizado um teste preliminar para verificar as diferentes velocidades específicas máximas de crescimento obtidas pela bactéria VH33 quando cultivada em meio M9 com diferentes suplementações. O meio M9 sem suplementação foi selecionado e foi utilizado em ensaio de acúmulo em biorreator. Neste ensaio a linhagem mutante VH33 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn} chegou a acumular um pouco mais de 27% de sua biomassa seca em forma de PHA. Ao fazer a análise de fluxos metabólicos foi observado que a linhagem já estava em sua capacidade máxima teórica. Nestes ensaios a repressão catabólica ainda estava presente, embora em baixo grau, sendo que a glicose e a xilose estavam sendo consumidas quase ao mesmo tempo. Foram realizados ensaios em biorreator com hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar, porém pelo fato da hidrólise liberar um valor alto de furfural e outros compostos tóxicos a bactéria não foi capaz de crescer. Processo FAPESP: 2010/02165-9.

Palavras-chave: Biopolímeros. Repressão catabólica. Bagaço de cana-de-açúcar. Xilose.

ABSTRACT

CHOUMAN, K. **Production of biodegradable polymers by recombinant *Escherichia coli* from sugars present on sugar cane bagasse hydrolysate.** 2012. 113 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are natural polyesters accumulated by many bacteria under nutritional stress conditions; with the role of as carbon and energy sources. Polyhydroxybutyrate (PHB) is the most studied PHA and has been largely used as bioproducts whose properties are similar to polypropylene. In Brazil, the sugarcane bagasse is an important lignocellulosic crop associated to sugar and alcohol industries. It has been used to generate energy for industries, but there are many pentoses that can be used as precursors for other products, for instance, PHAs. For sugar utilization, an acid hydrolysis is necessary. *Escherichia coli* can not naturally accumulate PHA. However, it is a promising strain in this study, because its genome is sequenced, thus easily genetically modified for the production of PHA. Also, it does not have the repression catabolite problem. *E. coli* are capable to select, in a mixture of sources of carbon, that promotes the best bacterial growth rate, preferring glucose and then, the other sources of carbon. This phenomenon is known as catabolite repression (CR) that is mediated by phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). The aim of this work is to create strategies to reduce the repression catabolite process. During this project, sugar mixtures have been simultaneously consumed. Genes were inserted in *E. coli* VH33 and the wild type W3110 in order to increase the PHA productivity from sugar cane hydrolysate. To enable the strains to accumulate PHA, the *Cupriavidus necator phaCAB* gene was obtained from the digestion of pJM9131 plasmid and the *phaCAB* was extracted from agarose gel. The genes are linked to pBluescript SK⁻ vector and were transferred to W3110 and VH33 strains. These constructions generate the LFM 862 (*E. coli* VH33 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn}) and LFM 863 (*E. coli* W3110 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn}) strains respectively. In order to evaluate the performance of recombinant strains, a preliminary test was done to check the different maximum specific growth obtained by strain VH33 when growth in M9 medium with different kinds of supplementations. The M9 medium without supplementation was selected and used to accumulate bioreactor assay. The mutant strain VH33 pSK⁻::*phaCAB*_{Cn} accumulated up to 27% of PHA. In the metabolic flux analysis, it was observed that LFM 862 strain was already in the theoretical maximum capacity. The catabolic repression was practically abolished in this assay, and glucose and xylose were consumed at the same time. Bioreactor assays were made using sugarcane hydrolysate, but because the high level of furfural and other toxic compounds liberated with the hydrolysis, the strain was not capable to grow. Process FAPESP: 2010/02165-9.

Keywords: Biopolymers. Catabolite repression. Sugarcane bagasse hydrolysate. Xylose.

LISTA DE FIGURAS

Figura1- Microscopia eletrônica de uma célula de <i>Wautersia eutropha</i> após acúmulo de polímero na forma de grânulos.....	26
Figura 2- Estrutura dos PHA de cadeia curta (PHAscl) que consiste em polímeros que contêm monômeros de HAscl (short chain length) de 3 a 5 carbonos situados da cadeia principale os (PHAmcl) que são polímeros que contêm monômeros de HAmcl (médium chain length) de 6 a 14 carbonos em sua cadeia principal.....	27
Figura 3- Síntese de PHB a partir de carboidratos.....	28
Figura 4- Lignocelulose e seus componentes celulose, lignina e hemicelulose que se combinam para armazenar açúcar como fonte energética.....	30
Figura 5- O sistema PTS e a repressão catabólica em <i>E. coli</i> . A partir do fosfosenolpiruvato (PEP) como doador de fosfato, ocorre a fosforilação sequencial através da Enzima I (EI), Hpr até Enzima II, específica para o transporte de glicose (EII ^{Glc}). Na presença de glicose, o grupo fosfato é transferido para a glicose ocorrendo o transporte e fosforilação simultânea do açúcar. No caso da ausência de glicose, IIA ^{Glc} ativa a produção de AMPc pela adenilatociclase (AC) e o AMPc se liga à proteína receptora de AMPc (CRP) para ativar a transcrição dos genes catabolicamente reprimidos. O sistema PTS também está envolvido com a regulação de outros processos e proteínas, como: glicogênio fosforilase (GP), a proteína de quimiotaxia CheA, a glicerol quinase (GK), ao repressor Mlc envolvidos na captação de glicose e do ativador de transcrição BglG envolvido na captação e utilização de açúcares glicosídicos.	33
Figura 6- Crescimento das linhagens W3110 e VH33 em meio mínimo M9 e as seguintes fontes de carbono: 1-W3110 glicose; 2- W3110 xilose; 3- W3110 arabinose; 4- W3110 glicose, xilose e arabinose; 5- VH33 glicose; 6- VH33 xilose; 7- VH33 arabinose; 8- VH33 glicose, xilose e arabinose.....	56

Figura 7- Clones de *E. coli* VH33 transdutantes crescidos em meio LB com tetraciclina. A transdução apresentou mais de 50 transdutantes, ou seja, células que passaram a apresentar resistência à tetraciclina que se encontra próximo ao gene *crp**.58

Figura 8- Clones de *E. coli* W3110 transdutantes crescidos em meio LB com tetraciclina. A transdução apresentou mais de 50 transdutantes, ou seja, células que passaram a apresentar resistência à tetraciclina que se encontra próximo ao gene *crp**.58

Figura 9- Resultado do teste de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolium) o consumo de xilose faz com que haja a redução do TTC resultando em coloração vermelha. 1 é a linhagem ET25 que tem o gene *crp** que deveria ter apresentado coloração vermelha e se mostrou translúcida; 2 é a linhagem W3110 selvagem, que não deveria ter apresentado coloração vermelha por não possuir o gene *crp**.....59

Figura 10- Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos à eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do gene *crp**. 1 Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; 2, 3, 4, 5 e 6 são os fragmento *crp** amplificado das bactérias transduzidas 1, 5, 3, 10 e 14 respectivamente.....60

Figura 11- Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos à eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do gene *crp**. 1 Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; 2 fragmento *crp** amplificado.61

Figura 12- Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose.mostrando a inserção do gene *crp** nas linhagens. Em que: 1Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; 2 W3110 pBBR1MCS-3; 3 W3110 pBBR1MCS-3::*crp**; 4 VH33pBBR1MCS-3::*crp**; 5 VH33pBBR1MCS-3.62

Figura 13- A partir do gene *crp** do DNA da bactéria *E. coli* ET25, foi feita a amplificação desse gene por PCR. Com o amplicon obtido, foi feito um gel de agarose. O gene foi extraído a partir desse gel e ligado ao pGEM com a enzima T4 DNA ligase. Este inserto foi digerido com as enzimas *XhoI* e *SacII* ligado ao plasmídeo pBBR1MCS-3, também digerido com as

mesmas enzimas, pela enzima T4 DNA ligase. A construção pBBR1MCS-3::crp* foi inserida nas linhagens *E. coli* W3110 e VH33.....63

Figura 14- Curvas de crescimento e consumo de açúcar das linhagens W3110::pBBR1MCS3crp* e VH33::pBBR1MCS3crp* em meio mínimo M9 contendo 10 g/L de fonte de carbono e das linhagens W3110 e VH33 em meio mínimo contendo 2 g/L do total das misturas de açúcares. Nas figuras o losango azul significa o consumo de glicose, o losango verde o consumo de xilose e o quadrado vermelho representa o crescimento celular medido por densidade óptica (DO_{610nm}) e apresentado em logaritmo Neperiano.....65

Figura 15- A partir do plasmídeo pJM9131 contendo os genes de *Cupriavidus necator* *phaCAB_{Cn}*, digerido com a enzima *HindIII*, o fragmento *phaCAB_{Cn}* foi extraído de um gel de agarose e ligado ao vetor pSK⁻, também digerido com *HindIII*, com a enzima T4 DNA ligase. Essas construções foram inseridas em *E. coli* W3110 e VH33.....67

Figura 16- Perfil de migração de fragmento de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose. 1 padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); 2 pSK⁻ digerido com *HindIII*; 3 pJM9131::*phaCAB_{Cn}* digerido com *Hind III*.....68

Figura 17- Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose. 1- Padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences), 2- LFM 867 (W3110 pSK⁻::*phaCAB_{Cn}*), 3- LFM 868 (VH33 pSK⁻::*phaCAB_{Cn}*).....69

Figura 18- Teste de crescimento feito com Sudan Black B. Linhagem utilizada como controle positivo: LFM 101. Linhagem utilizada como controle negativo: *E. coli* XL1 Blue. *E. coli* VH33 e W3110 são linhagens antecessoras à mutação. E as linhagens recombinantes *E. coli* W3110::*phaCAB_{Re}*, VH33::*phaCAB_{Re}* são linhagens modificadas.....70

Figura 19- Esquema representando a digestão do vetor pJM9131 pela enzima *HindIII* e a ligação do fragmento *phaCAB* no plasmídeo pBBR1MCS5 pela T4DNA ligase formando pBBR1MCS5::*phaCAB*.....73

Figura 20- Teste de acúmulo feito com Sudan Black B. Linhagem utilizada como controle positivo: LFM 101. Linhagem utilizada como controle negativo: *E. coli* XL1 Blue. *E. coli* VH33 e W3110 são linhagens antecessoras à mutação. E as linhagens recombinantes *E. coli* W3110pBBR1MCS5::*phaCAB*_{Re}, VH33 pBBR1MCS5::*phaCAB*_{Re} são linhagens modificadas representadas por VH33 CAB e W3110 CAB. Apenas as linhagens com o plasmídeo sem o inserto também foram testadas (VH33 R5, W3110 R5).....73

Figura 21- Cultivo de *E. coli* VH33 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS5::*phaCAB* em meio mineral contendo a mistura de açúcares glicose e xilose. O oxigênio foi limitado mantendo-se a 1%. A figuraA mostra a biomassa total produzida (Xt), biomassa residual produzida (Xr), PHB acumulado, a produção de lactato e acetato. A figuraB mostra o consumo dos açúcares glicose e xilose, nitrogênio consumido durante o ensaio. A figuraC mostra a taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa de produção de gás carbônico (CER).....77

Figura 22- Cultivo de *E. coli* W3110 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS5::*phaCAB* em meio mineral contendo a mistura de açúcares glicose e xilose. O oxigênio foi limitado mantendo-se a 1%. A figuraA mostra a biomassa total produzida (Xt), biomassa residual produzida (Xr), PHB acumulado, a produção de lactato e acetato. A figuraB mostra o consumo dos açúcares glicose e xilose, nitrogênio consumido durante o ensaio. A figuraC mostra a taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa de produção de gás carbônico (CER).....78

Figura 23- Rede metabólica representativa da produção de PHB por *Escherichia coli* a partir de glicose e xilose como fonte de carbono.82

Figura 24- Distribuição de fluxos observado pela linhagem de *E. coli* LFM 862.84

Figura 25- Distribuição de fluxos observado pela linhagem de *E. coli* LFM 86386

Figura 26- Esquema de fluxos em que a linhagem de *E. coli* LFM 863 deveria fazer para atingir a atividade máxima teórica.88

Figura 27- Esquema do ensaio em shaker utilizando as linhagens de *E. coli* LFM 862 e LFM863. As culturas foram testadas em hidrolisados obtidos a partir de tratamentos com

diferentes concentrações de ácido sulfúrico, suplementando ou não o cultivo.....90

Figura 28- Resultado de um cultivo de uma amostra do hidrolisado em meio sólido LB para confirmação de esterilização antes do ensaio.....91

Figura 29- Cultivo em meio LB sólido (A) e lâmina corada pelo Gram (B) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 no tempo 0. O cultivo em meio LB sólido (C) e lâmina corada pelo Gram (D) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 no tempo 8h.....91

Figura 30- Cultivo em meio LB sólido(A) e lâmina corada pelo Gram (B) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 retirada após 27 horas de cultivo em biorreator.....92

Figura 31- Presença de cristais formados no hidrolisado do bagaço de cana- de- açúcar com o pH regulado quando submetido ao armazenamento em refrigerador domestico.....93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Linhagens e vetores utilizados.....	38
Quadro 2- Plasmídeos, resistências e características relevantes destes plasmídeos utilizados neste trabalho.	38
Quadro 3- Meio de cultura Luria Bertani (LB).....	39
Quadro 4- Meio de cultura mínimo M9.....	39
Quadro 5- Meio de cultura mínimo M9	39
Quadro 6- Meio mineral (MM)	40
Quadro 7- Antibióticos utilizados	41
Quadro 8- Composição do meio de cultura utilizado em biorreator	43
Quadro 9- Solução TAE	45
Quadro 10- Tampão de transformação	46
Quadro 11- Tampão MC	47
Quadro 12- Primers utilizados neste trabalho.....	48
Quadro 13- Concentrações dos componentes utilizados para amplificação.....	49
Quadro 14- Combinações de suplementação utilizadas para avaliar o crescimento em diferentes condições de cultivo.....	51
Quadro 15- Crescimento celular observado em cultivos de <i>E. coli</i> W3110 e VH33 em meio mínimo M9 acrescidos de diferentes tipos de açúcar.....	55

Quadro 16-Meio mínimo M9 descrito por Pablos, 2011 modificado.....74

Quadro 17- Meio mínimo M9 descrito por Pablos, 2011 modificado.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Diferentes tipos de suplementação utilizando a linhagem *E. coli* VH33 em meio mínimo M9 com glicose como fonte de carbono. A tabela apresenta a média da velocidade específica do crescimento celular e o desvio padrão das duplicatas.57

Tabela 2- Valores médios da velocidade específica do crescimento celular e o desvio padrão das duplicatas de diferentes linhagens cultivadas em glicose e xilose nas condições indicadas na figura 17.....66

Tabela 3- Consumo de açúcares, produtividade de PHB, crescimento celular e pH observado no início e ao final do cultivo das linhagens de *E. coli* W3110pSK⁺::*phaCAB* e VH33pSK⁺::*phaCAB*. Estas linhagens foram cultivadas em meio mínimo M9 com glicose e glicose, xilose como fonte de carbono.....72

Tabela 4- Resultados do cultivo de diferentes linhagens em meio M9 modificado a partir da referência Pablos et al., 2011. Estão apresentadas as linhagens que foram utilizadas com as respectivas fontes de carbono (15g/L no total, para cada experimento, ou para cada açúcar 7,5 g/L). Os resultados da média da porcentagem de PHA, média da massa, PHA e Xr obtidos em 72 horas de ensaio.....75

Tabela 5- Resultados do cultivo de diferentes linhagens em meio M9 modificado a partir da referência Pablos et al., 2011. Estão apresentadas as linhagens que foram utilizadas com as respectivas fontes de carbono (15g/L no total, para cada experimento, ou para cada açúcar 7,5 g/L). Os resultados da média da porcentagem de PHA, média da massa, PHA e Xr obtidos em 72 horas de ensaio.....76

Tabela 6- Consumo de substratos e formação de bioprodutos em cultivo de *E.coli* em biorreator visando à produção de PHB. Dados referentes à região de estado pseudo-estacionário consideradas para a análise de fluxos metabólicos.....81

Tabela 7- Reações globais descrevendo os modos elementares obtidos pelo programa *Metatool* da linhagem LFM 862. CC – fonte de carbono (glicose e xilose), PF- produto final,

PF/CC- produto final dividido pela fonte de carbono, Desv 10% - desvio padrão de 10% a mais nos cálculos.....85

Tabela 8- Reações globais descrevendo os modos elementares obtidos pelo programa *Metatool* da linhagem LFM 863.....87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	21
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1 A busca por polímeros biodegradáveis	24
2.2 Polihidroxialcanoatos	25
2.3 Uso de matérias primas renováveis	29
2.4 Repressão catabólica carbônica	32
2.5 Hidrolisado de cana- de- açúcar.....	34
2.6 Análise de fluxos metabólicos	35
3 OBJETIVO GERAL	37
3.1 Objetivo específico	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Linhagens e condições de cultivo	38
4.2 Condições de cultivo.....	38
4.3 Composição dos meios de cultura	39
4.3.1 Luria Bertani.....	39
4.3.2 Meio mínimo M9.....	39
4.3.3 Meio mínimo M9 de acordo com Pablos et al (2011)	39
4.3.4 Meio mineral MM	40
4.4 Antibióticos.....	40
4.5 Preservação das linhagens bacterianas	41
4.6 Cultivos em biorreator	41
4.6.1 Preparo do inóculo.....	41
4.6.2 Condições do cultivo em biorreator.....	42
4.6.3 Avaliação de fluxos metabólicos.....	42
4.6.4 Concentração de nitrogênio amoniacal.....	43
4.6.5 Concentração de ácidos	43
4.6.6 Obtenção do hidrolisado de cana- de- açúcar	44
4.7 Métodos de Manipulação de DNA	44
4.7.1 Isolamento de DNA genômico	44
4.7.2 Isolamento de DNA plasmidial (miniprep)	44
4.7.3 Digestão de DNA	44
4.7.4 Ligação dos fragmentos de DNA	45
4.7.5 Eletroforese em gel de agarose.....	45
4.7.6 Transformação	45
4.7.7 Seleção dos transformantes	46
4.8 Transdução do gene <i>crp*</i> de <i>E. coli</i> ET25	46
4.8.1 Conceitos gerais.....	46
4.8.2 Preparação do lisado do fago P1.....	47
4.8.3 Transdução utilizando o fago P1	47
4.8.4 Teste de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolium)	48
4.8.5 Construção dos iniciadores	48
4.8.6 Amplificação do gene <i>crp*</i>	49
4.8.7 Clonagem nos vetores de interesse.....	50

4.9 Avaliação do crescimento em diferentes meios.....	50
4.10 Avaliação da capacidade de acúmulo de PHA pelas linhagens obtidas por transformação.....	51
4.11 Determinação analítica e cálculos de parâmetros.....	52
4.11.1 Determinação do pH.....	52
4.11.2 Determinação de biomassa	52
4.11.3 Determinação quantitativa por cromatografia gasosa	52
4.11.4 Cálculos de parâmetros.....	53
4.11.5 Determinação de açúcares	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Avaliação das linhagens de <i>E. coli</i> W3110 e VH33	55
5.1.1 Avaliação da capacidade das cepas em estudo crescerem em diferentes tipos de açúcares	55
5.1.2 Avaliação do crescimento da cepa VH33 em diferentes tipos de suplementações	56
5.2 Avaliação da expressão do gene <i>crp*</i> nas linhagens de <i>E. coli</i> W3110 e VH33	57
5.2.1 Obtenção e seleção dos transdutantes com o gene <i>crp*</i>	57
5.2.2 Construção do vetor de clonagem contendo o gene <i>crp*</i> e avaliação da expressão do gene nos recombinantes obtidos	61
5.2.3 Teste de crescimento em mistura de açúcares com as cepas <i>crp*</i>	64
5.3 Expressão do operon <i>phaCAB</i> nas linhagens de <i>E. coli</i> W3110 e <i>E. coli</i> VH33	66
5.3.1 Construção do vetor pSK ⁺ :: <i>phaCAB</i>	66
5.3.2 Teste de sensibilidade das <i>E. coli</i> ao antibiótico e inserção, por transformação, do plasmídeo construído.....	68
5.3.2 Avaliação qualitativa de capacidade de acúmulo de PHA pelos transformantes	69
5.3.3 Avaliação da capacidade de acúmulo das cepas em estudo com o gene <i>phaCAB</i> em mistura de açúcares.....	70
5.3.4 Cultivo das linhagens de <i>E. coli</i> W3110 e VH33 contendo o inserto <i>phaCAB</i> _{Cn}	76
5.4 Análise de fluxos metabólicos	80
5.5 Teste das linhagens frente ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	89
5.5.1 Dificuldades encontradas no preparo e manejo do hidrolisado de cana-de-açúcar	93
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS	97
ANEXO A - Desenho dos iniciadores (CRP*).....	106
ANEXO B- Substituição que deveria ocorrer para obter transdutantes	107
ANEXO C- Ensaio de crescimento com transdutantes de <i>E. coli</i> W3110.....	109
ANEXO D- Sequenciamento dos possíveis transdutantes	111
ANEXO E- Avaliação do crescimento da cepa VH33 em diferentes tipos de suplementação	114
ANEXO F- Arquivo de entrada para o programa <i>Metatool</i> com a linhagem LFM 862	115
ANEXO G - Arquivo de entrada para o programa <i>Metatool</i> com a linhagem LFM 863.....	118
ANEXO H – Modos elementares gerados pelo programa <i>Metatool</i> conforme os dados do ensaio com a linhagem W3110 pBBR1MCS5::<i>phaCAB</i>.....	121
ANEXO I - Modos elementares gerados pelo programa <i>Metatool</i> conforme os dados do ensaio com a linhagem VH33 pBBR1MCS5::<i>phaCAB</i>.....	125

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

Nos últimos anos tem havido uma maior preocupação com os descartes de materiais plásticos, como embalagens e outros materiais que são jogados em lugares inapropriados ocasionando sérios problemas para o meio ambiente e para vida selvagem (THOMPSON et al., 2009). A fim de solucionar este problema, tem-se optado pela substituição desses materiais por outros como materiais biodegradáveis, conhecidos também como bioplásticos. Os plásticos biodegradáveis são capazes de se decompor em dióxido de carbono, metano, água, compostos inorgânicos ou biomassa. De modo geral, o mecanismo de decomposição é feito por ação enzimática dos microrganismos presentes no meio (AMASS; AMASS; TIGHE, 1998). Neste grupo de plásticos biodegradáveis se encontram os polihidroxialcanoatos (PHA).

PHA são materiais poliméricos que constituem uma grande família de compostos armazenados intracelularmente por bactérias, que apresentam propriedades termoplásticas que os tornam aplicáveis na produção de plásticos com a vantagem de serem biodegradáveis (REDDY; GHAI; RASHIMI, 2003). Polihidroxibutirato (PHB) é um dos PHA mais estudados, cujas propriedades são comparáveis às do polipropileno (TOKIWA; UGWU, 2007).

Um dos grandes fatores limitantes para a produção industrial de PHA é o custo associado à fonte de carbono, que pode chegar a cerca de 30% do custo total de produção, mesmo se esta for integrada a usinas de açúcar e álcool (NONATO; MANTELATO; ROSSEL, 2001). Assim, têm sido desenvolvidos diversos estudos para produzir PHA a partir de matérias-primas de baixo custo como, por exemplo, materiais lignocelulósicos (LOPES, 2010; SILVA et al., 2004; YANCHAK, 2011).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), açúcar e etanol do mundo a partir de cana de açúcar. Em Novembro de 2010, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) divulgou que o cultivo de cana-de-açúcar ocupou uma área de 430 mil hectares, um aumento de 32,8% em relação à safra passada. A produção saltou de 28,6 mil toneladas, em 2009, para 37,8 mil toneladas em 2010, um crescimento de 32,5% (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010). O bagaço representa 30% deste montante, tornando-se um subproduto importante da agroindústria brasileira do ponto de vista econômico e ambiental (ALTERTHUM, 1998). Em 2010/2011 o excedente de bagaço de cana-de-açúcar produzido no Brasil foi calculado em torno de 625 Mton segundo o site da

agricultura (<http://www.agricultura.gov.br/politica-agricola/noticias/2011/01/safra-20102011-de-cana-e-recorde>).

Para esse bagaço de cana-de-açúcar ser aproveitado ele necessita de um pré-tratamento, esse pré- tratamento é chamado de hidrólise. A hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar resulta na liberação da celulose e hemicelulose do complexo formado com a lignina, com posterior quebra dos polímeros de açúcares e liberação de uma mistura de hexoses e pentoses, principalmente glicose e xilose (LEE; CHANG, 1995). Em razão disso, qualquer processo de produção que utilize essa biomassa de modo completo requer microrganismos que consumam esses dois tipos de açúcares (MARGEOT et al., 2009; NICHOLS; DIEN; BOTHAST, 2001; XIA; EITEMAN; ALTMAN, 2012). No entanto, tem sido constatado que o crescimento bacteriano é mais lento em xilose do que em glicose e isso é recorrente em vários processos biotecnológicos que utilizam materiais celulósicos para bioprodução, inclusive, para produção de etanol (GONZÁLEZ et al., 2002), xilitol (CARVALHO et al., 2002) e PHA (LOPES; GOMEZ; SILVA, 2010; SILVA et al., 2004, SILVA et al., 2007). O consumo preferencial de glicose quando em mistura com xilose pode ser observado nos experimentos de produção de PHA, etanol e outros que utilizam o hidrolisado do bagaço da cana-de-açúcar. Esse consumo preferencial pelos diferentes açúcares presentes no meio se chama repressão catabólica carbônica (RC). Na tentativa de driblar a RC foi criada uma linhagem de *E. coli* com repressão catabólica parcialmente abolida (*E. coli* VH32 PTS⁻ GalP⁺). Foi construída a partir da linhagem selvagem W3110 por deleção do gene *ptsH* e *ptsI* e superexpressão do gene *galP*⁺ capaz de modular a internalização da glicose e reduzir a produção de acetato, para melhorar a produção de proteínas recombinantes (FLORES et al., 1996; HERNANDEZ- MONTALVO; BOLIVAR; GOSSET, 2001). Hernández-Montalvo et al. (2003), em trabalhos posteriores, demonstraram que estes mutantes possuem a capacidade de consumir simultaneamente misturas de açúcares como a glicose, xilose e arabinose e observaram que a velocidade crescimento aumentou, sendo que o tempo de consumo de açúcares diminuiu.

Dessa maneira, esta linhagem se apresenta como um promissor hospedeiro de genes da biossíntese de PHA, oriundos de cepas produtoras deste material, para estudos da sua produção a partir de misturas de açúcares derivados da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

A produção de PHA utilizando *Escherichia coli* tem muitas vantagens sobre outras bactérias, incluindo o fato de que seu genoma tem sido amplamente estudado (LI et al.,

2007). *E. coli* é considerada uma receptora ideal para a produção de PHA e alguns trabalhos já levaram à produção de PHB por essa bactéria, atingindo até cerca de 90% da massa seca a partir de açúcares simples (LEE; CHANG, 1995). *E. coli* não possui enzimas despolimerases intracelulares que possam vir a degradar o PHA acumulado (HAHN; CHANG; LEE, 1995).

Outra estratégia tem sido superexpressar genes envolvidos no catabolismo de xilose e na via das pentoses, bem como verificar seu impacto sobre a produção do biopolímero (LOPES, 2009). Dentro deste contexto é proposto este trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A busca por polímeros biodegradáveis

Nas últimas décadas tem tido um aumento significativo na quantidade de plásticos usados em vários setores principalmente em embalagens alimentícias por apresentarem versatilidade e multifuncionalidade (LAGARON; LOPEZ-RUBIO, 2010). O uso desses materiais derivados do petróleo cresceu muito nos últimos anos devido ao baixo custo e a facilidade de obtenção dos mesmos. Essa matéria-prima é responsável pela geração de grande quantidade de combustíveis e materiais plásticos que resultam em impactos cada vez mais prejudiciais ao meio-ambiente. Esses fatores associados à crescente preocupação acerca do custo oscilante do petróleo têm estimulado o desenvolvimento de tecnologias para a produção de combustíveis alternativos, como o etanol, e diversos produtos ambientalmente corretos, como os plásticos biodegradáveis, que podem ser gerados a partir de fontes renováveis (PATEL et al., 2006; THOMPSON et al., 2009).

Apesar de alguns plásticos de origem petroquímica ser recicláveis, grande volume de materiais plásticos ainda são descartados de maneira indevida, sendo encontrados nos mais variados habitats, incluindo marinho e pólos terrestres ocasionando sérios problemas para o ambiente e para os seres vivos. Possatto et al. (2011) observaram três espécies de bagre nos estuários tropicais do nordeste do Brasil e observaram que estas três espécies haviam ingerido detritos plásticos. São conhecidas mais de 260 espécies que acidentalmente ingerem ou ficam emaranhadas em detritos plásticos descartados incorretamente, sendo que a ingestão de plásticos pode estar amplamente distribuída em certas populações (chegando a 95% dos indivíduos) comprometendo a alimentação e sobrevivência desses animais. Por outro lado, o emaranhamento por detritos plásticos pode causar ferimentos graves e até a morte para diversas espécies (DERRAIK, 2002; GREGORY 2009; LOPES, 2010).

Neste contexto a sociedade tem se manifestado a cerca da necessidade de buscar alternativas aos materiais derivados do petróleo, buscando por fontes plásticas de base biológica, preferencialmente utilizando recursos renováveis pela agricultura que reduzem a dependência do petróleo (TIWARI et al., 2012). Em muitos casos, os plásticos de base biológica são o que facilita a sua decomposição pela microbiota em ambientes com umidade e condições adequadas. Entre os materiais de base biológica três famílias são consideradas. A primeira inclui os polímeros extraídos diretamente da biomassa, como os polissacarídeos, féculas, celulose, e proteínas como o glúten e o milho. A segunda família faz uso de

monômeros derivados de biomassa, que aplica a rotas sintéticas básicas para obter polímeros de base biológica e/ou renováveis. Um exemplo é o ácido polilático (PLA) (PETERSEN et al., 1999). A terceira família inclui os PHA que são biopolímeros produzidos por microrganismos naturais ou pela modificação destes (REGUERA et al., 2003). PHA são excelentes candidatos para substituição dos plásticos convencionais e tem atraído interesses para aplicações em varias indústrias incluindo, médicas, farmacológicas, agricultura, embalagens e cosméticos (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001). Recentemente foi desenvolvido um bioplástico, também denominado plástico verde que resulta da polimerização de derivados do etanol de cana- de- açúcar, gerando o polietileno, entretanto, embora a fonte da matéria-prima seja verde, a característica de biodegradabilidade não é diferente do polietileno de origem petroquímica (PITT; BOING; BARROS, 2011).

2.2 Polihidroxialcanoatos

PHA constituem uma família de poliésteres produzidos e armazenados por diversos microrganismos sob a forma de grânulos intracelulares como forma de armazenar energia, carbono e poder redutor (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

Os PHA podem ser acumulados em grande quantidade sem afetar a pressão osmótica das células, chegando a participar de até 80% do peso seco celular. Como podemos observar na Figura 1, os grânulos de PHA são formados quando há limitação de um ou mais elementos essenciais ao crescimento bacteriano, como o nitrogênio, fósforo, magnésio ou oxigênio. São usados como fonte de energia e de carbono, quando esses elementos voltam a ser disponíveis (BRANDL; GROSS; LENZ, 1990).

Figura 1 - Microscopia eletrônica de uma célula de *Wautersia eutropha* após acúmulo de polímero na forma de grânulos.

Fonte: (Alli, 1999)

Os biopolímeros derivados de recursos naturais são muito vantajosos pelo fato de serem sustentáveis, renováveis, por serem biodegradáveis e biocompatíveis. Por isso se tornam atraentes em vista de substituir os plásticos convencionais de origem petroquímica. Quando expostos ao meio ambiente esses biopolímeros são degradados a CO_2 e H_2O pela microbiota presente no ambiente (REHM, 2010).

A descoberta desse grupo dos biopolímeros é atribuída ao microbiologista Maurice Lemoigne do Instituto Pasteur de Paris e data de 1923, quando a presença de PHB foi observada em bactéria do gênero *Bacillus* (LEMOIGNE, 1926; REHM, 2010). Essa descoberta passou por muitas décadas como curiosidade acadêmica, mas em 1962 foram publicadas as primeiras patentes apresentando as propriedades termoplásticas destes materiais (BAPTIST, 1962a,b).

Já foram identificados cerca de 150 monômeros diferentes como constituintes de PHA bacterianos (HAZER; STEINBÜCHEL, 2007; LU et al., 2009). Levando em consideração as estruturas monoméricas, como podemos observar na Figura 2, os PHA são divididos em PHA_{scl} (short-chain-length) que são constituídos por monômeros de cadeia curta, geralmente formados por 3-hidroxipropionato (HP), 3-hidroxibutirato (HB) e 3- hidroxivalerato (HV); PHA_{mcl} (medium-chain-length) são PHA compostos por monômeros de cadeia média contendo 3- hidroxihexanoato (HHx) 3- hidroxieptanoato (HHp) e até 3- hidroxitetradecanoato (HTD). Cadeias insaturadas são comuns em alguns casos, principalmente 3- hidroxidodecenoato (C12: 1) (REDDY; GHAI; RASHIMI, 2003; WANG et al., 2011). A figura 2 esquematiza os dois tipos de PHA indicados.

Figura 2 - Estrutura dos PHA de cadeia curta (PHAscl) que consiste em polímeros que contêm monômeros de HAscl (short chain length) de 3 a 5 carbonos situados da cadeia principal e os (PHAmcl) que são polímeros que contêm monômeros de HAMcl (medium chain length) de 6 a 14 carbonos em sua cadeia principal.

Em *Ralstonia eutropha*, uma das bactérias mais estudadas sobre a produção desses materiais, a biossíntese de poli-hidroxibutirato (PHB) ocorre pela ação de três enzimas: β -cetotiolase (codificada pelo gene *phaA*), acetoacetyl-coenzima A redutase NADPH dependente (codificada pelo gene *phaB*), e PHA sintase (codificada por *phaC*). A enzima β -cetotiolase condensa duas moléculas de acetil-CoA a acetoacetyl-CoA, que é reduzido pela acetoacetyl-CoA redutase a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA. A subsequente polimerização do PHB é catalisada pela PHA sintase como indicado na figura 3 (OEDING; SCHLEGEL, 1973; SENIOR; DAWES, 1973).

2.3 Uso de matérias primas renováveis

O Brasil é o maior produtor de açúcar e álcool do mundo. Essa produção gera resíduo de bagaço de cana-de-açúcar que está sendo utilizado para geração de energia e suplementação em ração animal, porém esse bagaço pode ser aproveitado para produção de biopolímeros, etanol e outros produtos renováveis. Em Janeiro de 2011 o IBGE publicou que a produção de cana de açúcar por hectare no Brasil na safra de 2010 foi de 729.559.596 t. Tendo em vista que o rendimento por hectare em 2001 foi de 69.443 kg/ha em 2010 chegou a 79.375 kg/ha, houve um aumento de 12,51% em 9 anos. O bagaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por lignocelulose. Os materiais lignocelulósicos são vantajosos por consistirem em matérias-primas renováveis, de baixo custo e por estarem disponíveis em grandes quantidades (BOTHAST; NICHOLS; DIEN, 1999; MOE et al., 2012).

A lignocelulose corresponde a uma mistura de lignina e polímeros de carboidratos (celulose, hemicelulose e pectina), sendo a glicose e a xilose seus principais açúcares constituintes, além de menores quantidades de arabinose, manose, galactose, ramnose e outros (DORAN-PETERSON; COOK; BRANDON, 2008). A composição química da lignocelulose apresenta basicamente 35-50% de celulose, 20-35% de hemicelulose e 10-15% de lignina em forma de peso de massa seca, dependendo da espécie de planta e das condições de cultivo (BOTHAST; NICHOLS; DIEN, 1999). A Figura 4 ilustra a composição da lignocelulose.

Figura 4 - Lignocelulose e seus componentes celulose, lignina e hemicelulose que se combinam para armazenar açúcar como fonte energética.

Fonte: Wyman (2009)

A celulose é o polímero mais abundante da natureza e sua composição consiste em unidades de anidroglicose interligadas por ligação β -1,4-glicosídica (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). As microfibrilas de estrutura cristalina da celulose são circundadas por hemicelulose amorfa, que é totalmente embebida pela matriz de lignina (PÉREZ; MUÑOZ-DOURADO; RUBIA, 2002). A hemicelulose é um heteropolímero que contém resíduos de hexoses (galactose, manose, ramnose e fucose), pentoses (arabinose e xilose) e ácido *D*-glucurônico (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). A lignina, o mais abundante polímero aromático da natureza, é formada por unidades de fenil-propano interligadas por diferentes tipos de ligações (PÉREZ; MUÑOZ-DOURADO; RUBIA, 2002).

A fim de que esta biomassa seja utilizada por microrganismos para a produção de

PHA e outros materiais, os resíduos lignocelulósicos necessitam ser submetidos a um pré-tratamento podendo ser através da água quente (solvólise não catalítica), processos alcalinos (soda ou cal) para depois passar pelo processo de hidrólise, processo que pode ser catalisado por ácidos ou enzimas celulolíticas (MARTIN et al., 2002; XING et al., 2012). Enquanto este último processo depende de enzimas comerciais, que representam um custo significativo para o processo, a hidrólise mediada por ácidos gera uma mistura complexa de substâncias tóxicas aos microrganismos, na qual se incluem acetatos, furanos, ácidos alifáticos, compostos fenólicos e aromáticos (CARVALHO LIMA, 2001; FELIPE et al., 1997; ZHA et al., 2012). Esses resíduos tóxicos reduzem a produtividade, consistindo em uma barreira na utilização de materiais lignocelulósicos (DORAN-PETERSON; COOK; BRANDON, 2008; INGRAM et al., 1999). Diversos tratamentos têm sido aplicados para reduzir a toxicidade dos hidrolisados, como o tratamento químico e o uso de carvão ativado (KENEALY et al., 2007; SILVA et al., 2004; SUN; CHENG, 2002). A hidrólise por explosão a vapor que tem sido citada como a mais promissora por gerar menos compostos tóxicos e por não utilizar produtos corrosivos. Há também outro método como a oxidação úmida, a deslignificação alcalina e com solventes orgânicos (BAUDEL, 2006; TANAHASHI; KARINA; HIGUCHI, 1990).

Em resumo, embora a hidrólise libere os açúcares dos materiais lignocelulósicos, disponibilizando para o uso por microrganismos, um problema adicional surge para o seu emprego como matéria prima em processos industriais, que será apresentado a seguir.

A maioria das bactérias pode utilizar vários compostos como fonte de carbono. Estas fontes de carbono podem ser co-metabolizadas ou serem utilizadas pelas bactérias dando preferência as que são mais acessíveis ou que permitam o seu rápido crescimento. A preferência pelos açúcares foi descoberta pelo crescimento diáuxico observado primeiramente em *E. coli* por Jacques Monod em 1942. Pesquisas subseqüentes com as bactérias e organismos superiores revelaram que a seletiva utilização de fontes de carbono é comum, e que a glicose é a fonte de carbono preferencial em muitos dos modelos de organismos que foram estudados (GÖRKE; STÜLKE, 2008).

2.4 Repressão catabólica carbônica

O consumo preferencial de certos carboidratos em uma mistura de fontes de carbono é chamado repressão catabólica carbônica (RCC). Em *E. coli*, bem como em outros Gram negativos e alguns Gram positivos, RCC é mediada por proteínas do sistema fosfotransferase (PTS) (WHITE, 2000).

O fosfenolpiruvato funciona como um doador de grupos fosforil para o processo de transporte e fosforilação de açúcares para o interior da célula. O sistema PTS é complexo e consiste de proteínas citoplasmáticas acopladoras de energia, Enzima I (EI) e Hpr, que não possuem especificidade aos açúcares, e um complexo enzimático de membrana, a Enzima II (EII), sendo específica para alguns açúcares. O complexo EII possui três domínios de proteínas, sendo eles IIA, IIB e IIC. No transporte de uma molécula de açúcar para dentro de uma célula, uma cascata de fosforilação partindo do fosfenolpiruvato (PEP) cedendo grupos fosforil para EI, Hpr, IIA, IIB e finalmente, o açúcar internalizado é transportado através da membrana pela proteína integral de membrana IIC (BARBAROTE; SAIER, 2005). A Figura 5 representa esse transporte através do sistema PTS e a fosforilação dos açúcares para o interior de uma célula.

Figura 5 - O sistema PTS e a repressão catabólica em *E. coli*. A partir do fosfosenolpiruvato (PEP) como doador de fosfato, ocorre a fosforilação sequencial através da Enzima I (EI), Hpr até Enzima II, específica para o transporte de glicose (EII^{Glc}). Na presença de glicose, o grupo fosfato é transferido para a glicose ocorrendo o transporte e fosforilação simultânea do açúcar. No caso da ausência de glicose, IIA^{Glc} ativa a produção de AMPc pela adenilato ciclase (AC) e o AMPc se liga à proteína receptora de AMPc (CRP) para ativar a transcrição dos genes catabolicamente reprimidos. O sistema PTS também está envolvido com a regulação de outros processos e proteínas, como: glicogênio fosforilase (GP), a proteína de quimiotaxia CheA, a glicerol quinase (GK), ao repressor Mlc envolvidos na captação de glicose e do ativador de transcrição BglG envolvido na captação e utilização de açúcares glicosídicos.

Fonte: Gosset (2005)

Em *E. coli*, EI é codificada pelo gene *ptsI* e a proteína Hpr por *ptsH*. Na mesma bactéria, o complexo glicose específico EII^{Glc} é composto por uma enzima solúvel e citoplasmática IIA^{Glc} e uma permease integral de membrana $IICB^{Glc}$, codificadas pelos genes *crr* e *ptsG* respectivamente (GOSSET, 2005). Sabe-se que o sistema PTS está relacionado com o consumo preferencial de fontes de carbono. Quando a glicose está ausente no meio, IIA^{Glc} -P estimula a adenilato ciclase a sintetizar AMP cíclico (AMPc). A união do AMPc a uma proteína receptora Cyclic AMP Receptor Protein (CRP), estimula a transcrição dos genes dependentes de AMPc relacionados ao consumo de açúcares não-PTS. Ao contrário, durante o transporte de glicose, a EII^{Glc} é

desfosforilada e não estimula mais a adenilato ciclase (DEUTSCHER, FRANCKE, POTSMAN, 2006; GOSSET, 2005; WHITE, 2000).

A RCC contribui para a redução da produtividade em processos industriais, devido ao consumo seqüencial dos açúcares, o que tem levado a modificação genética de linhagens diversas com o objetivo de abolir este fenômeno, a fim de permitir o consumo simultâneo de mistura de açúcares, aumentando a produtividade (GOSSET, 2005; LI et al., 2007; LOPES, 2009; LOPES, 2010).

Com o intuito de abolir a repressão catabólica e aumentar o consumo de xilose Eppler e Boos (1999) construíram uma linhagem de *E. coli* que sintetiza Crp independente de AMP cíclico (crp*). Cirino et al. (2006) testaram o crescimento desta linhagem em mistura de açúcares e observaram que houve consumo simultâneo de glicose e xilose, e ainda, que o consumo de xilose foi maior do que o de glicose.

Li et al. (2007) construíram *E. coli* LR1010 recombinante com os genes de produção de PHA de *Ralstonia eutropha* e com repressão catabólica parcialmente abolida pela inativação do gene *ptsG*. Foi verificado o consumo simultâneo de açúcares e taxa maior de produção de PHB em relação a parental, *E. coli* MG1655. Entretanto, esta linhagem foi testada somente em mistura de glicose e xilose. Outros estudos sobre a produção de PHA por bactérias com repressão catabólica parcialmente abolida têm empregado, além desses dois açúcares, a arabinose, avaliando a presença de RCC na presença nesses três açúcares, bem como sua influência sobre a produção de PHA. Outro método, a análise de fluxos metabólicos, tem sido utilizado como ferramenta para avaliar possíveis rotas metabólicas alternativas para o melhoramento de processos biológicos. Essas possibilidades podem auxiliar no processo de produção de PHA. Este método está esclarecido no item abaixo (LOPES, 2009; LOPES et al., 2009).

2.5 Hidrolisado de cana-de-açúcar

Materiais lignocelulósicos são recursos inesgotáveis e abundantes. O Brasil é um grande produtor de açúcar e álcool. O bagaço representa grande parte deste montante, tornando-se um subproduto importante da agroindústria brasileira do ponto de vista econômico e ambiental (ALTERTHUM, 1998).

Para separar a celulose e a hemicelulose do complexo formado com a lignina, chegando assim, nas pentoses que serão utilizadas como fonte de carbono por alguns

microrganismos, é necessária a passagem destes materiais lignocelulósicos por processos biológicos (CHANDRAKANT e BISARIA, 1998). A liberação destas pentoses pode ser feita através de um processo chamado hidrólise. Este procedimento pode ser realizado através de ácidos, pela ação de enzimas ou a vapor (GROHMANN, 1993; MOSIER *et al.*, 2005).

2.6 Análise de fluxos metabólicos

Uma das formas de obter uma melhora na caracterização da fisiologia celular é a avaliação das velocidades de reação de suas vias metabólicas, conhecida por Análise de Fluxos Metabólicos (AFM). A AFM reflete a integração das regulações genéticas e metabólicas, preocupando-se em modelar os sistemas biológicos de uma forma mais estruturada, realizando balanços de massa para calcular os seus fluxos através de toda a rede metabólica, nem sempre considerada na modelagem matemática convencional (STEPHANOPOULOS *et al.*, 1999).

A compreensão detalhada e quantitativa das vias de reações bioquímicas requer não somente conhecimento sobre seus componentes individuais, mas também informação sobre o comportamento da rede metabólica em sua totalidade (FONSECA, 2007). A Análise de Fluxos Metabólicos se baseia, numa primeira instância, num balanço dos fluxos de consumo e de excreção de metabólitos, dentro de um modelo estequiométrico reacional. Assim, por meio de AFM, pode-se primeiramente estabelecer os fluxos reais ocorrendo em uma dada rede metabólica e, depois, propor alternativas de fluxos metabólicos que permitiriam aumentar a produção de um metabólito de interesse.

A partir destas alternativas, nem sempre óbvias pela análise apenas dos genes diretamente envolvidos em um dado passo, é possível propor modificações genéticas teoricamente promissoras. Por exemplo, nos trabalhos desenvolvidos por Lopes (2010), o autor isolou mais de 5000 bactérias sendo que duas se destacaram para a produção de PHA a partir de xilose, *Bacillus* sp. MA3.3 e *Burkholderia sacchari* LFM101. Ele também identificou problemas de repressão catabólica. Então para superar este problema ele superexpressou um gene para xilose isomerase, porém isso não resultou no incremento do crescimento de LFM101. Após isso ele utilizou a análise de balanços estequiométricos e análises de fluxos metabólicos *in silico* para estudar a biosíntese de PHB a partir de xilose. O uso desta AFM indicou 13 possíveis soluções para produzir PHB a partir de xilose. A solução próxima da experimental gerou um rendimento de

0,25 g g⁻¹. Das soluções propostas pela análise *in silico* havia pelo menos uma mostrando que outras rotas elevariam o rendimento para 0,40 g g⁻¹. Estas soluções indicavam outras modificações genéticas que poderiam levar a este aumento e que estas não se baseavam simplesmente na expressão do gene *xylA*.

Diante disso, uma abordagem semelhante será adotada com *E. coli* neste trabalho para verificar possíveis rotas metabólicas que aumentem o rendimento de PHA e reduzam o processo de repressão catabólica.

3 OBJETIVO GERAL

Aplicar estratégias para reduzir o processo de repressão catabólica, para que os açúcares em mistura sejam consumidos simultaneamente e inserir genes que permitam a síntese de polihidroxialcanoatos (PHA) em *E. coli* VH33 e W3110, para capacitá-las para produzir PHA a partir de açúcares derivados do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

3.1 Objetivo específico

- Inserir os genes de produção de PHA de *Ralstonia eutropha* *phaCAB* que estavam presentes na *E. coli* XL1 Blue::pJM9131*phaCAB_{Re}*;
- Inserir o gene *crp** independente de AMPc presente na linhagem ET25 que, em teoria, diminui a repressão catabólica carbônica;
- Fazer ensaios de crescimento e acúmulo com os recombinantes para verificar se houve mudanças como a diminuição da repressão catabólica e aumento da produtividade de PHA;
- Analisar a distribuição de fluxos metabólicos através do programa *Metatool*, para assim, verificar possíveis alternativas a fim de melhorar o rendimento e a produtividade celular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens e condições de cultivo

As linhagens utilizadas neste trabalho estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Linhagens e vetores utilizados

Linhagem	Genótipo	Referência
<i>E. coli</i> VH33	VH32 <i>galP</i> ⁺ $\Delta P_{galP}::P_{trc}$	Meza et al., 2012*
<i>E. coli</i> W3110 ATCC 27325	F λ INV (<i>rrnD-rrnE</i>)1	Bachmann, 1972
<i>E. coli</i> ET25	<i>E. coli</i> K-12, <i>crp</i> [*] Tn10 (TetR) próximo ao <i>crp</i>	Eppler and Boos, 1999**
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Tc ^r , <i>lacIZ</i> , $\Delta M15$, Tn10	Stratagene Cloning System
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	Sac ⁺ , PHA ⁺ , <i>prp</i> ⁺ , <i>Kan</i> ^S , <i>Amp</i> ^S , <i>Tc</i> ^S	Gomez et al., 1996; Bramer et al., 2001
LFM 862	VH33 pSK ⁻ :: <i>phaCAB</i> _{Re}	Este trabalho
LFM 863	W3110 pSK ⁻ :: <i>phaCAB</i> _{Re}	Este trabalho
LFM163	VH33 pBBR1MCS-3:: <i>crp</i> [*]	Este trabalho
LFM162	W3110 pBBR1MCS-3:: <i>crp</i> [*]	Este trabalho

Legenda da Referência: * Esta linhagem foi cedida pelo Professor Guillermo Gosset da Universidade Nacional Autônoma do México. ** Esta linhagem foi cedida pelo Professor Winfried Boos da Universidade Konstanz, Alemanha.

Os plasmídeos utilizados neste trabalho estão apresentados no Quadro 2 com as características principais e as respectivas marcas de resistência.

Quadro 2 - Plasmídeos, resistências e características relevantes destes plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeos utilizados	Características	Referência
pBBR1MCS-3	Tc ^r , lac POZ, MCS, Mob	Kovach et al., 1995
pBluescript II (SK) ⁻	Ap ^r , lac POZ, MCS	Stratagene Cloning System
pJM9131:: <i>phaCAB</i> _{Re}	<i>Km</i> ^r <i>phaCAB</i> _{Re}	Kidwell et al., 1995
pBluescript II (SK) ⁻ :: <i>phaCAB</i> _{Re}	<i>Amp</i> ^r pSK ⁻ contendo fragmento <i>phaCAB</i> _{Re}	Este trabalho
pBluescript II (SK) ⁻ :: <i>phaCAB</i> _{Re}	<i>Amp</i> ^r pSK ⁻ contendo fragmento <i>phaCAB</i> _{Re}	Este trabalho
pBBR1MCS-3:: <i>crp</i> [*]	Tc ^r pBBR1MCS-3 contendo <i>crp</i> [*]	Este trabalho
pBBR1MCS-3:: <i>crp</i> [*]	Tc ^r pBBR1MCS-3 contendo <i>crp</i> [*]	Este trabalho

4.2 Condições de cultivo

Os cultivos de *E. coli* foram realizados em meio líquidos e/ou sólido: Luria Bertani (LB), meio mínimo M9 (SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS, 1989) ou meio mineral (MM) (ROCHA et al., 2008) puro ou com adição de antibiótico conforme a necessidade e a linhagem do microrganismo a ser cultivada. As células foram cultivadas a 37 °C sob agitação de 150 rpm.

4.3 Composição dos meios de cultura

4.3.1 Luria Bertani

Quadro 3 - Meio de cultura Luria Bertani (LB)

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L

Fonte: Sambrook; Frithsch e Maniatis (1989)

4.3.2 Meio mínimo M9

Quadro 4 - Meio de cultura mínimo M9

Na ₂ HPO ₄	6 g/L
KH ₂ PO ₄	3 g/L
NH ₄ Cl	1 g/L
NaCl	0,5 g/L
Após esterilização adiciona-se	
MgSO ₄ 1M	2 ml/L
CaCl ₂ 1M	0,1 ml/L

Fonte: Sambrook; Frithsch e Maniatis (1989)

4.3.3 Meio mínimo M9 de acordo com Pablos et al (2011)

Quadro 5 - Meio de cultura mínimo M9

K ₂ HPO ₄	17 g/L
KH ₂ PO ₄	5,3 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 g/L
(NH ₄)Cl	1,0 g/L
Citrato de Sódio	1,0 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O 20%	1,0 mL
Solução de elementos traços	2,0 mL
Extrato de levedura	4 g/L

4.3.4 Meio mineral MM

Quadro 6 - Meio mineral (MM)

Na ₂ HPO ₄	3,5 g/L
KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O Sol. 20%	1,0 mL/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O Sol. 1%	1,0 mL/L
Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6%	1,0 mL/L
Solução de elementos traços	1,0 mL/L

Fonte: Sambrook; Frithsch e Maniatis (1989)

A solução de elementos traços continha: H₃BO₃ 0,30 g/L; CoCl₂. 6H₂O 0,20 g/L; ZnSO₄. 7H₂O 0,10 g/L; MnCl₂. 4H₂O 0,03 g/L; NaMoO₄. 2H₂O 0,03 g/L; NiCl₂. 6H₂O 0,02 g/L; CuSO₄. 5H₂O 0,01 g/L.

Os meios de cultura sólidos foram obtidos pela adição 15-20 g/L de ágar à composição dos meios líquidos acima citados. As fontes de carbono sendo elas glicose, xilose e arabinose, ou a mistura das três foram adicionadas dependendo das condições testadas. Quando se testou crescimento foram colocados 5 g/L de glicose como fonte de carbono, enquanto em ensaios de acúmulo, foram colocados 15 g/L de fonte de carbono sendo 5 g/L de cada uma nas misturas.

Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C, exceto algumas soluções, como antibióticos, esterilizadas por filtração em membrana de nitrocelulose com porosidade 0,22 µm.

4.4 Antibióticos

As soluções de antibióticos utilizadas foram preparadas de acordo com Sambrook; Frithsch e Maniatis (1989) e esterilizadas em filtro de porosidade 0,22 µm estéril, exceto a solução de tetraciclina que foi preparada em etanol 70%. As soluções estoques foram mantidas em freezer – 20 °C, e adicionadas aos meios de cultura, após esterilização e resfriamento. O Quadro 7 abaixo mostra os antibióticos utilizados neste trabalho com as respectivas concentrações e soluções estoque.

Quadro 7 - Antibióticos utilizados

Antibiótico	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (Ap) sal sódico	100 (em H ₂ O)	100
Tetraciclina (Tc) hidrocloreto	12,5 (em etanol 70%)	12,5
Canamicina (Kan)	50 (em H ₂ O)	50
Gentamicina (Gm)	15 (em H ₂ O)	15

Fonte: Sambrook; Frithsch e Maniatis (1989)

4.5 Preservação das linhagens bacterianas

A preservação foi feita por liofilização (SILVA et al., 1992) ou suspensão em glicerol (20% v/v) e estoque em freezer a -80 °C descrito a seguir.

Para preservação sob congelamento, foram utilizados estoques liofilizados. Estes foram recuperados em meio sólidos: LB contendo antibiótico ou não (conforme a linhagem do microrganismo a ser cultivada), sendo incubados por 72 horas, para verificação da existência de contaminação. Cerca de 20 colônias foram inoculadas em 100 mL de LB contendo antibiótico adequado se necessário, sendo incubadas por 24h. Após este período, foram adicionados 100 mL de uma solução de glicerol a 20% a essa cultura e a mistura foi distribuída em tubos de polipropileno esterilizados num volume de 1 mL, se armazenado em congelador doméstico por 40 minutos e depois congeladas e conservadas em freezer -80 °C.

*4.6 Cultivos em biorreator**4.6.1 Preparo do inóculo*

Pre-inóculo: culturas mantidas em freezer a -80 °C foram estriadas em LB sólido e cultivadas por 24 h em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram utilizadas para inocular 25 ml de meio LB e foram cultivadas a 37 °C durante 12 horas a 150 rpm em agitador rotativo.

Inóculo: o volume total do pré-inóculo foi utilizado para inocular 250 ml de MM, sendo adicionado diretamente ao meio de cultura. Foi adicionada uma solução concentrada de glicose para obter uma concentração final de 15 g/L. As células foram, então, cultivadas a 37 °C, durante 14 horas a 150 rpm em agitador rotativo. Após o crescimento, o cultivo foi utilizado para inocular o meio do biorreator, representando uma fração de inóculo de 10 %.

4.6.2 Condições do cultivo em biorreator

Todos os ensaios em biorreator foram realizados com pH e temperatura controlados a 7,0 e 37 °C, respectivamente. Para o controle de pH foram utilizadas soluções de NaOH e H₂SO₄ 0,5 N, sendo o consumo acompanhado com auxílio de balança. Os ensaios foram realizados em biorreator B. Braun modelo Biostat B com dorna de 4 litros. Amostragens periódicas foram realizadas para a análise de: biomassa celular, teor e composição de PHA, concentração das fontes de carbono, nitrogênio e ácidos. O controle de possíveis contaminantes, ao longo dos ensaios, também foi realizado através de observação microscópica de lâminas coradas (coloração de Gram), e estriadas em placas com meio solido LB e o respectivo antibiótico.

Para esses cultivos, o biorreator foi acoplado a analisadores de CO₂ e O₂ do gás de saída do biorreator, da marca Applikon, para realização do balanço gasoso e a um fluxômetro de massa marca Bronkhorst- Tech B. V serie E-7000, para o controle da vazão de ar comprimido. O oxigênio dissolvido a 1% foi controlado mediante aumento da agitação, de forma automática (1%), bem como o fornecimento de ar atmosférico foi controlado em 1 lpm pelo fluxometro de massa.

Conforme o açúcar do meio era consumido, eram realizadas as alimentações calculando que a fonte de carbono final fosse 15 g/L dentro do biorreator. A concentração da solução de alimentação era: glicose 250 g/L e xilose 250 g/L resultando em 500 g/L de fonte de carbono total.

4.6.3 Avaliação de fluxos metabólicos

A rede metabólica foi constituída, considerando as seguintes vias metabólicas: via Embden- Meyerhof –Parnas, via das Pentoses, complexo piruvato desidrogenase, ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato, carboxilação do piruvato, descarboxilação do oxaloacetato, síntese de acetato e P3HB a partir de acetyl-CoA, síntese de biomassa residual. A composição da biomassa residual foi aquela apresentada por Neidhardt et al. (1996). Para a determinação dos modos elementares foi utilizado o programa Metatool (PFEIFFER et al., 1999). Para o cultivo, foi utilizado meio mineral proposto por Bocanegra- Rodriguez (2012). O Quadro 8 abaixo mostra as concentrações de cada componente do meio de cultura.

Quadro 8 - Composição do meio de cultura utilizado em biorreator

Na ₂ HPO ₄	0,512 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,37 g/L
NaCl	0,5 g/L
Extrato de levedura	1,0 g/L
KH ₂ PO ₄	0,488 g/L
MgSO ₄ 7H ₂ O 20%	1,0 ml
CaCl ₂ 2H ₂ O 1%	1,0 ml
Sl. Elm. Traços	2,0 ml
Glicose inicial	15 g/L

Fonte: Bocanegra- Rodriguez (2012)

4.6.4 Concentração de nitrogênio amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada em potenciômetro (Orion 4 STAR), com eletrodo específico para detecção de amônia (Orion 9512HPBNWP), após alcalinização da amostra (pH>9) com NaOH 10 M. Soluções de (NH₄)₂SO₄, contendo cerca de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ppm de nitrogênio foram utilizadas para obtenção da curva de calibração.

4.6.5 Concentração de ácidos

A concentração de ácidos acético e láctico foi determinada por cromatografia de fase líquida (HPLC). Um volume de 10 µl de amostra, adequadamente diluída para uma concentração entre 0 e 1,2 g/L, filtrada em membrana de poro 0,45 µm (Millipore), foi injetado em cromatógrafo Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector UV (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ 5mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 µL. Padrões foram preparados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de cada ácido e as amostras foram diluídas até concentrações compreendidas no intervalo da curva de calibração construída.

4.6.6 Obtenção do hidrolisado de cana-de-açúcar

Para obter hidrolisado a 1% foram pesados 100g de bagaço de cana-de-açúcar (fornecido por uma usina de açúcar e álcool já triturado) para serem imersos em 600 ml de H_2SO_4 . Essa mistura ficou durante 12 horas em uma estufa a 60 °C e foi posteriormente autoclavada a 121 °C por 40 min. Ao sair da autoclave, depois de frio, o bagaço foi espremido manualmente com a ajuda de um espremedor de batatas industrial. O que resultou passou por um processo de *overliming*, onde o pH é elevado a 10 com NaOH e depois corrigido com H_2SO_4 e alguns compostos tóxicos são eliminados por decantação. Para ser utilizado, o hidrolisado passa por filtração e concentração por evaporação do líquido para obter maior quantidade de fonte de carbono.

4.7 Métodos de Manipulação de DNA

4.7.1 Isolamento de DNA genômico

Utilizou-se o kit de purificação de DNA genômico Dneasy Blood & Tissue da Qiagen (número do catálogo: 69504), conforme instruções do fabricante.

4.7.2 Isolamento de DNA plasmidial (miniprep)

Para a extração de DNA plasmidial utilizou-se o kit de extração da Qiagen (QIA prep Spin Miniprep Kit) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

4.7.3 Digestão de DNA

Para a digestão de DNA, adicionou-se a enzima de restrição segundo instruções do fabricante (Invitrogen Corporation). Para cada 1 µL de DNA utilizaram-se 1-2 unidades da enzima, de forma que esta representasse no máximo 10 % do volume. A digestão do DNA foi incubada a 37 °C, “overnight”. Após a digestão, algumas enzimas de restrição foram inativadas a 65 °C por 10 min.

4.7.4 Ligação dos fragmentos de DNA

Para a ligação das moléculas de DNA, utilizou-se a enzima DNA ligase do bacteriófago T4 com seu respectivo tampão de acordo com a indicação do fabricante (Invitrogen Corporation). Após a ligação, a T4 DNA ligase foi inativada a 65 °C por 10 min.

4.7.5 Eletroforese em gel de agarose

As construções envolvendo a inserção de fragmentos de DNA nos vetores foram confirmados pelo perfil de migração dos mesmos, adequadamente digeridos quando necessário, em gel de agarose a 0,8 % (m/v) submetido a eletroforese. Como tampão de corrida utilizamos a solução TAE (0,5%) (SAMBROOK; FRITHSCH E MANIATIS, 1989). As amostras de DNA foram aplicadas nos géis com 1/10 do volume de corante de corrida. As corridas eletroforéticas em mini-géis foram realizadas a 60 V, 90 mA, 90 W por 70 min. Os fragmentos de DNA foram corados em brometo de etídeo (0,1 mg/100 mL de TAE) por 20 minutos e visualizado sob luz UV (254 nm) em transluminador (Ultralum 100).

Quadro 9 - Solução TAE

Tris base (Tris hidroximetilaminometano)	242 g
Ácido acético glacial	57,1 ml
EDTA (etilenodiamino tetra acetato de sódio) 0,5M	100 ml
H ₂ O q.s.p	1000 ml

Fonte: Pereira (2007)

4.7.6 Transformação

As linhagens que receberam o DNA exógeno por transformação foram inoculadas em 25 ml de meio LB, contendo MgCl₂ 1M e MgSO₄ 1Me sempre que necessário, o antibiótico apropriado. Foram incubadas em agitador rotativo a 37°C até uma DO₆₅₀ = 0,3-0,5. Em tubos esterilizados foram centrifugados 8 ml da cultura por 15 min, 5000 rpm, 4 °C, o “pellet” foi ressuspensão com 4 ml de tampão de transformação, as células foram mantidas por 15 min em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, o “pellet” foi ressuspensão em 0,8 ml do tampão de transformação, divididos em alíquotas de 200 µl e mantidos em banho de gelo. As

células foram imediatamente utilizadas ou estocadas até o dia seguinte em refrigerador doméstico.

Quadro 10-Tampão de transformação

Tris (hidroximetilaminometano)	10 mM
CaCl ₂	50 mM
MgSO ₄	10 mM
MgCl ₂	10 mM
pH	8,0

Fonte: Pereira (2007)

Para cada 200 µl de células competentes, adicionaram-se 5 µl de DNA (~250 ng), incubou-se em banho de gelo por 30 min e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 90s e imediatamente resfriada em gelo. Adicionaram-se 600 µl de meio LB, e incubou-se por 1 hora a 37 °C.

4.7.7 Seleção dos transformantes

Os clones foram selecionados em meio de cultura contendo os antibióticos apropriados. IPTG (isopropil-tio-β-*D*-galactosídeo) 2 mg/ml e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-*D*-galactosídeo) 20 mg/ml foram adicionados ao meio de cultura quando necessário para diferenciar clones recombinantes contendo ou não o inserto de DNA.

4.8 Transdução do gene *crp** de *E. coli* ET25

4.8.1 Conceitos gerais

Na transdução o vírus pode transferir os genes de uma bactéria para outra de duas maneiras diferentes. A primeira é a transdução generalizada, que qualquer região da bactéria é empacotada juntamente com o genoma viral. E a segunda é a transdução especializada em que uma região específica da bactéria é incorporada ao genoma viral. O fago P1 é um fago de transdução generalizada, pois ele não é capaz de se replicar independentemente e já não tem a parte do cromossomo viral, portanto se os DNAs dos fagos não se recombinarem com o cromossomo bacteriano, os mesmos serão perdidos (MADIGAN et al., 2010). Quando o fago P1 infecta uma bactéria como a *E. coli* ET25, o ciclo lítico pode ser iniciado. Porém, as enzimas responsáveis pelo empacotamento do

DNA viral do fago podem empacotar o DNA desta bactéria. O meu lisado de células, portanto, tem uma mistura de vírions com o genoma viral e partículas transdutoras que contêm o DNA da bactéria que eu tenho interesse em transduzir, neste caso o gene alvo é o *crp**. Ao adicionar o lisado de *E. coli* ET25 nas minhas culturas de *E. coli* W3110 e VH33, a maioria das células são infectadas por vírus normais, contudo uma pequena parte recebe a partícula transdutora de interesse. Como a marca de resistência fica próxima ao gene *crp**, os transdutantes são selecionados com o antibiótico tetraciclina.

4.8.2 Preparação do lisado do fago P1

A célula a ser lisada *E. coli* ET25, foi cultivada em LB 24 horas, depois disso foi feita uma diluição de 1:100 em 10 mL de LB contendo 5mM CaCl₂ e 0,2 % de glicose. Quando o cultivo alcançou A₅₄₀ = 0,3- 0,5 foi adicionado 0,1- 0,2 mL de um lisado previamente obtido em bactérias sem resistência a tetraciclina. As células foram incubadas por 2- 3 horas a 37 °C (observação visual de lise pela formação de grumos no fundo do cultivo e maior transparência do meio LB). Após este período, foram adicionados ao cultivo 100 µL de clorofórmio e agitou-se em vortex. Finalmente, as células foram centrifugadas por 10 min a 5000 rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo, em que se adicionou 100 µL de clorofórmio.

4.8.3 Transdução utilizando o fago P1

As bactérias de interesse W3110 e VH33 foram cultivadas em 3 mL de LB 24 horas, depois disso centrifugou-se essa cultura por 10 min a 5000 rpm e a massa celular foi ressuspensa com 3 mL de tampão MC.

Em um microtubo foi colocado 0,2 mL de bactérias e 0,2 ml de lisado. Em um segundo tubo, adicionou-se somente 0,2 mL de bactérias, sendo o controle negativo da reação. Esses tubos foram incubados por 20 min a 37 °C. Finalmente, 0,2 mL dos cultivos foram semeados em meio LB servido contendo o antibiótico tetraciclina a fim de selecionar os transdutantes.

Quadro 11 - Tampão MC

0,1 M MgSO ₄
5,0 mM CaCl ₂

Fonte: Cirino et al. (2006)

4.8.4 Teste de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolium)

Em um tubo de ensaio foram colocados 2 mL de LB contendo glicose 1% e xilose 1%. Após o cultivo alcançar a fase exponencial de crescimento medido por densidade óptica (DO_{610nm}), as células foram centrifugadas em microtubo de 2ml e lavadas por duas vezes com meio M9 com canamicina (50µg/mL). Por último, as células foram ressuspensas com M9 com canamicina, 1% de TTC e 1% de xilose. De acordo com o teste, a redução do TTC faz com que a solução assuma coloração vermelha, indicando o consumo constitutivo de xilose (CIRINO et al., 2006). Foi utilizada como controle positivo a linhagem ET25 e como controle negativo a W3110. Para confirmar o fenótipo *crp**, foram feitos experimentos de crescimento com as linhagens transduzidas em meio M9 contendo 1% de xilose. As linhagens que apresentaram maior velocidade específica máxima de crescimento foram enviadas para sequenciamento.

4.8.5 Construção dos iniciadores

O desenho dos iniciadores foi feito a partir de seqüências descritas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) (ANEXO A). Foi utilizada a linhagem K-12, pelo fato dela ter dado origem a ET25, a partir da qual foi obtida a seqüência referente ao gene *crp** (757 pb), bem como regiões à montante e à jusante destas. Essas seqüências foram alinhadas no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) do NCBI e analisadas *in silico*, utilizando-se para isso o programa FastPCR. Com esse programa foi possível saber quais sítios de restrição e possíveis iniciadores forward e reverse a serem trabalhados. Os primers escolhidos para serem utilizados neste trabalho estão no Quadro 12.

Quadro 12 - Primers utilizados neste trabalho.

Primers	Seqüência 5'→ 3'	Restrição
CRP1	CCGCGGCTTCCCAGGTAGCGGGAAGC	<i>SacII</i>
CRP2	CTCGAGCGCGCTACCAGGTAACGCGCC	<i>XhoI</i>

Legenda: Destacados em amarelo, estão as seqüências dos sítios de restrição.

4.8.6 Amplificação do gene *crp**

O gene *crp** foi obtido através de amplificação utilizando a técnica de PCR com os iniciadores específicos construídos como demonstrado no item anterior. Essa amplificação foi realizada com termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf®), utilizando-se a enzima Platinum® TaqDNA Polimerase High Fidelity (Invitrogen). Esta enzima, além da atividade de polimerização de DNA, possui a habilidade de revisar as sequências de bases recém- preenchidas na fita de DNA, através de sua atividade de exonuclease (Manual Platinum® Taq DNA Polimerase High Fidelity, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições, para um volume final de 50 µl:

Quadro 13 - Concentrações dos componentes utilizados para amplificação.

Taq DNA Polimerase High Fidelity (1U)	0,2 µL
Tampão Taq DNA Polimerase High Fidelity (10x)	5,0µL
Sulfato de magnésio (50mM)	2,0µL
dNTP (10mM)	1,0 µL
Primer Forward (10 mM)	1,0 µL
Primer Reverse (10 mM)	1,0µL
DNA genômico (80 ng/mL)	1,0µL
Água livre de nuclease	38,8µL

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, seguidas de subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 62 °C por 2 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos. Esse ciclo foi repetido 35 vezes. Os amplicons foram purificados utilizando-se para isso o kit PCR Purification da Qiagen, conforme as instruções descritas pelo fabricante (número do catálogo: 28104). O produto *crp** amplificado e purificado foi então encaminhado para seqüenciamento. As reações foram executadas no Centro de Estudos do Genoma Humano conforme o protocolo descrito no site da instituição (<http://genoma.ib.usp.br/>). O resultado do seqüenciamento foi alinhado com a sequência disponível no banco de dados do NCBI.

4.8.7 Clonagem nos vetores de interesse

O amplicon *crp** foi primeiramente ligado ao vetor pGEM (pGEM®-T Easy Vector, Promega Corporation) por uma T4 DNA ligase, incubados 18-24 horas em banho-maria a 14 °C e inseridos em *E. coli* XL1-Blue por transformação (SAMBROOK; FRITHSCH E MANIATIS, 1989). A seleção dos clones foi feita pela adição de IPTG (isopropil-tio-β-D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) em meio LB sólido com ampicilina (LBA). O plasmídeo foi então extraído do transformante, digerido com o par de enzimas de restrição cujos sítios foram inseridos nos iniciadores e as amostras foram analisadas em gel de agarose 0,8 %. O kit Qiaquick Gel Extraction da marca Qiagen (número do catálogo: 28704) foi utilizado quando necessária a extração de DNA do gel de agarose. Confirmada a inserção do *crp** no pGEM T-Easy, foi feita a ligação deste inserto no plasmídeo pBBR1MCS-3. A ligação foi feita utilizando a enzima T4 DNA Ligase, de acordo com o protocolo do fabricante (T4 DNA Ligase Blue/White cloningqualified, Promega, Madison, EUA) e utilizando a seguinte relação: massa do inserto (ng) = tamanho do inserto (pb)/tamanho do vetor (pb) x massa do vetor (ng). A concentração de DNA das amostras foi analisada com o aparelho Nano Vue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

A construção foi transferida para as *E. coli* W3110 e VH33 por técnica de transformação, e os clones transformantes foram selecionados em meio LB contendo tetraciclina.

4.9 Avaliação do crescimento em diferentes meios

Para avaliar o crescimento celular em diferentes condições de cultivo foram utilizados o meio mínimo M9 com 5 g/L de glicose e combinações de suplementação. Ao meio mínimo M9 com glicose foi adicionada tiamina a 0,01 g/L e/ou extrato de levedura a 1 g/L e/ou citrato férrico a 0,12 g/L, como pode ser observado no Quadro 14. Foram retiradas amostras dos cultivos a cada duas horas, medindo-se a densidade óptica (DO_{610nm}). Os dados foram plotados em uma curva de crescimento e calculou-se a velocidade específica de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$) para cada condição testada.

Quadro 14 - Combinações de suplementação utilizadas para avaliar o crescimento em diferentes condições de cultivo.

Meio de cultura	Suplementação
M9 + Glicose	Sem suplementação
M9 + Glicose	Extrato de levedura
M9 + Glicose	Extrato de levedura + Citrato férrico
M9 + Glicose	Extrato de levedura + Tiamina + Citrato férrico
M9 + Glicose	Tiamina + Citrato férrico

4.10 Avaliação da capacidade de acúmulo de PHA pelas linhagens obtidas por transformação

A capacidade das linhagens obtidas acumularem polímero foi avaliada inicialmente pelo modo qualitativo por teste de coloração Sudan Black B. As linhagens recombinantes VH33::pSK $\bar{pha}CAB_{Cn}$, W3110::pSK $\bar{pha}CAB_{Cn}$ e as parentais VH33 e W3110 foram cultivadas em meio sólido contendo meio M9, xilose 0,5 % e cloreto de amônio a 0,005 %. Como controle positivo foi utilizada a *Burkholderia sacchari* LFM101, e como controle negativo a *E. coli* XL1Blue. Após 72 horas de crescimento, em uma estufa a 30 °C, as colônias foram cobertas com solução de Sudan Black B (0.02 % de Sudan Black B em 96 % etanol). A solução foi removida após um período de 20 min. Depois disso, cobriu-se a placa com 10 ml de etanol a 96 % por 1 min de acordo com Schlegel (1970). As colônias que estavam ricas em PHA se tornaram azuis escuras por reterem a solução, as que não acumularam PHA não fixaram a solução de Sudan Black B permanecendo da cor branca. Para poder avaliá-las por modo quantitativo foram feitos experimentos em frascos agitados em meio apropriado contendo mistura de glicose, xilose e arabinose (LOPES et al., 2009; ROCHA et al., 2008). O volume de meio utilizado para os cultivos não excedeu a 20 % da capacidade volumétrica dos frascos de erlemeyer, para melhorar a aeração dos cultivos. Foram retiradas amostras de 10 mL aos 0 e 72 horas para verificar pH, biomassa, concentração de açúcares e quantidade de PHA (SILVA et al., 2004).

4.11 Determinação analítica e calculos de parâmetros

4.11.1 Determinação do pH

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Mettler – modelo Delta 350) utilizando padrões de pH 4,0: 7,0: 9,0 a 25 °C (Ingold) para calibração.

4.11.2 Determinação de biomassa

A biomassa foi determinada ao final dos experimentos de acúmulo. Cerca de 10 mL da suspensão celular foram centrifugadas (8000 rpm 10 min e 4 °C), o sobrenadante foi descartado e as células foram liofilizadas no liofilizador (Labconco- Triad) e pesadas devidamente na balança analítica.

4.11.3 Determinação quantitativa por cromatografia gasosa

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS e MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2–dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados firmemente e homogeneizados vigorosamente antes de colocar a mistura em um banho (100 °C por 3 horas). Depois de decorridos os primeiros 30 minutos os tubos foram retirados e agitados, voltando ao banho e deixando, até o tempo final. Ao final do tempo de incubação, os tubos foram resfriados e, adicionou-se 4 mL de água destilada, agitando-se e deixando em repouso até haver uma separação das fases aquosa e orgânica, que contém os propil-ésteres. A fase aquosa foi retirada com ajuda de uma pipeta e vácuo e, na mistura restante, foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase contendo os propil-ésteres. Feito isso, o restante foi transferido para frascos apropriados e analisado no cromatógrafo. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5%

fenil-metil-siloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/ min)

Temperatura do injetor: 250 °C.

Temperatura do detector: 300 °C.

Sistema de detecção: ionização de chama (FID).

Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 185 °C a 8 °C/min e 185 °C por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno.

4.11.4 Cálculos de parâmetros

As velocidades de crescimento, consumo de substrato e produção de polímero foram calculados de acordo com Hiss (2001). A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) como descrito a seguir: os pontos obtidos por densidade óptica, foram convertidos a Logaritmo Neperiano. Construiu-se um gráfico de variação destes valores (LN_{DO}) em função do tempo. Com estes valores foi traçada uma regressão linear dos pontos selecionados por inspeção visual. A equação a seguir representa a concentração celular em função do tempo de cultivo resultando em uma reta denominada tempo crítico.

$$\text{Ln} \frac{x}{x_i} = \mu \cdot t$$

Ln= logaritmo Neperiano

X= concentração celular

μ = velocidade específica de crescimento

t= tempo

4.11.5 Determinação de açúcares

A concentração de açúcares foi determinada por cromatografia de fase líquida de alto desempenho (HPLC). Um volume de 10 µL do sobrenadante da amostra, adequadamente diluído em água purificada (foram utilizadas diluições de 20 vezes para amostras de 24 h e 10 vezes para amostras de 72 h), contendo 0-1g/L do carboidrato, foi filtrada em membrana de poro 0,22 µm e injetado em UltiMate 3000 Diode Array Detector (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector RI (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 40 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA,

Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ 5mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 µL, Dionex.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação das linhagens de *E. coli* W3110 e VH33

Foi Avaliada a capacidade de crescimento das linhagens de *E. coli* W3110 selvagem e a *E. coli* VH33 que é PTS⁻GalP⁺ (HERNÁNDEZ-MONTALVO; BOLIVAR; GOSSET, 2001), através da observação da turvação dos meios com diferentes tipos de fontes de carbono, assim como em diferentes meios de cultura específicos para o acúmulo de P-3HB.

5.1.1 Avaliação da capacidade das cepas em estudo crescerem em diferentes tipos de açúcares

Um teste de crescimento foi feito para saber se as linhagens W3110 e VH33 consumiam realmente glicose, xilose e arabinose. Para isso foi feito inóculo direto com alça de platina em tubos de ensaio contendo meio M9 com cada um dos açúcares a 5g/L em cada um dos tubos. Esses tubos foram incubados a 37 °C sob agitação, como descrito em material e métodos. Como podemos observar no quadro 15 e na figura 6, após 24 horas de incubação observamos o crescimento celular em todos os tubos exceto nos tubos contendo apenas arabinose como fonte de carbono. Este ensaio visava verificar se as cepas cresciam nestes açúcares ou não, antes de avaliar os recombinantes.

Quadro 15 - Crescimento celular observado em cultivos de *E. coli* W3110 e VH33 em meio mínimo M9 acrescidos de diferentes tipos de açúcar.

	Glicose	Xilose	Arabinose
W3110	+	+	-
VH33	+	+	-

O sinal + reporta crescimento celular observado nos cultivos. Quando não houve crescimento foi representado pelo sinal -.

Figura 6 - Crescimento das linhagens W3110 e VH33 em meio mínimo M9 e as seguintes fontes de carbono: 1-W3110 glicose; 2- W3110 xilose; 3- W3110 arabinose; 4- W3110 glicose, xilose e arabinose; 5- VH33 glicose; 6- VH33 xilose; 7- VH33 arabinose; 8- VH33 glicose, xilose e arabinose.

Em um trabalho realizado com linhagens de *E. coli* NF9 que é $PTS^- GalP^+$ e a parental PB103 em meio M9 com mistura de glicose, xilose e arabinose, os autores observaram que a presença de arabinose inibiu completamente o co-metabolismo de glicose e xilose. Nesta linhagem de *E. coli* NF9, havia sido verificado anteriormente um consumo preferencial de pentose, e uma repressão do operon *xyl* por L- arabinose (KANG; SONG; PARK, 1998). Dessa forma, optamos por utilizar glicose e xilose como fonte de carbono.

5.1.2 Avaliação do crescimento da cepa VH33 em diferentes tipos de suplementações

Foi feito um ensaio em duplicata para seleção de melhor meio para verificar se em outras condições de suplementação a linhagem de *E. coli* VH33 teria um crescimento significativamente maior. Esse ensaio foi feito em meio mínimo M9 contendo glicose 5 g/L suplementado com variações de extrato de levedura 1 g/L, tiamina 0,01 g/L e ferro 0,12 g/L. Na Tabela 1 podemos observar as diferentes combinações utilizadas as médias de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidas e o desvio padrão entre as duplicatas analisadas. No ANEXO E temos os gráficos com as velocidades específicas de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$) obtidas em cada tipo de suplementação.

Tabela 1 - Diferentes tipos de suplementação utilizando a linhagem *E. coli* VH33 em meio mínimo M9 com glicose como fonte de carbono. A tabela apresenta a média da velocidade específica do crescimento celular e o desvio padrão das duplicatas.

Tipo de suplementação	Sigla	Média de $\mu_{m\acute{a}x}(h^{-1})$	Desvio padrão
Nenhum tipo de suplementação	M9	0,24	0,003
Extrato de levedura	M9+EL	0,24	0,003
Extrato de levedura + Ferro	M9+EL+Fe	0,27	0,005
Ferro	M9+Fe	0,26	0,001
Extrato de levedura+ Tiamina + Ferro	M9+EL+T+Fe	0,26	0,008
Tiamina e Ferro	M9+T+Fe	0,26	0,008

Os resultados obtidos mostram que as melhores velocidades de crescimento foram observadas nas células cultivadas em meio suplementado com extrato de levedura e ferro. Entretanto, a presença do extrato de levedura, um componente caro e complexo (aminoácidos, vitaminas, carboidratos, etc), dificulta a definição clara das vias metabólicas utilizadas. Ao contrário, no meio quimicamente definido M9 isto não ocorre, facilitando a alimentação do programa *Metatool* com vias metabólicas definidas, para que este possa identificar a rede metabólica que a bactéria está utilizando e tentar melhorar o seu rendimento, se for necessário.

5.2 Avaliação da expressão do gene *crp** nas linhagens de *E. coli* W3110 e VH33

O gene *crp** apresenta modificação nas seguintes seqüências dos aminoácidos: I112L, T127I e A144T (KHANKAL et al., 2009). Esta modificação codifica uma proteína CRP* que é independente de AMP cíclico. Dessa forma, ter ou não glicose no meio não faria diferença, fazendo com que a mistura de glicose e xilose fosse consumida ao mesmo tempo (CIRINO et al., 2006).

5.2.1 Obtenção e seleção dos transdutantes com o gene *crp**

A transdução foi feita com a intenção de se obter a mutação do gene *crp** no genoma das linhagens de *E. coli* VH33 e W3110. Obtivemos mais de 50 transdutantes para cada transdução (Figura 7 e a Figura 8), ou seja, aqueles que cresceram no meio

sólido com o antibiótico, para o qual existe um gene codificando resistência (tetraciclina) que está próximo ao gene *crp**.

Figura 7 - Clones de *E. coli* VH33 transdutantes crescidos em meio LB com tetraciclina. A transdução apresentou mais de 50 transdutantes, ou seja, células que passaram a apresentar resistência à tetraciclina que se encontra próximo ao gene *crp**.

Figura 8 - Clones de *E. coli* W3110 transdutantes crescidos em meio LB com tetraciclina. A transdução apresentou mais de 50 transdutantes, ou seja, células que passaram a apresentar resistência à tetraciclina que se encontra próximo ao gene *crp**.

Dentre estes mutantes, 10 escolhidos aleatoriamente foram analisados pelo teste do TTC. De acordo com o teste, a célula com resultado positivo para a transdução apresenta coloração vermelha pela redução do TTC a TPF (1,3,5- trifenilformazam) pela atividade das enzimas desidrogenases. O metabolismo da xilose teoricamente faz com que sejam liberados elétrons que vão reduzir o composto (CIRINO et al., 2006). Ao fazer o teste em 10 mutantes que haviam crescido em meio LB sólido com

tetraciclina como um marcador de seleção, apenas dois apresentaram a coloração vermelha.

O DNA destes dois transdutantes foi extraído e submetido a uma amplificação por PCR utilizando os primers do *crp**, como definido em material e métodos, para verificar se este havia sido incorporado em seu genoma. Os amplicons foram enviados para seqüenciamento juntamente com o DNA amplificado de *E. coli* ET25 como controle positivo. Os resultados da análise de seqüenciamento estão no Anexo B. As seqüências a serem modificadas deveriam ser aquelas que codificam I112L, T127I e A144T (KHANKAL et al., 2009). Contudo, ao se fazer análise do seqüenciamento dos mutantes positivos para o teste do TTC, verificou-se que não havia as modificações esperadas, o que nos levou a concluir que o teste do TTC não é um teste eficiente para avaliar se o gene *crp** tinha sido transduzido com sucesso nas linhagens ou que a transdução não havia sido eficiente.

Para avaliar a confiabilidade do teste, foram feitos experimentos com a linhagem ET25 como controle positivo e a parental W3110 como controle negativo. Cultivamos as bactérias da mesma maneira que foram cultivadas as transdutantes conforme descrito em material e métodos. Como podemos observar na Figura 9, os resultados dos experimentos demonstraram que a própria ET25 que possui o gene *crp** se manteve com a coloração translúcida, enquanto a *E. coli* W3110 selvagem na fase exponencial se tornou vermelha. Sugere-se, com base nestes resultados, que este teste seja utilizado com cautela.

Figura 9 - Resultado do teste de TTC (Cloreto de Trifeniltetrazolium) o consumo de xilose faz com que haja a redução do TTC resultando em coloração vermelha. 1 é a linhagem ET25 que tem o gene *crp** que deveria ter apresentado coloração vermelha e se mostrou translúcida; 2 é a linhagem W3110 selvagem, que não deveria ter apresentado coloração vermelha por não possuir o gene *crp**.

Na tentativa de observar alguma modificação no crescimento, foi feito um ensaio com transdutantes de *E. coli* W3110 escolhidos aleatoriamente. Foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio LB líquido com xilose 1% e

glicose a 1%, 16 transdutantes e a *E. coli* W3110 como controle. Esses tubos foram incubados a 37 °C e agitados a 150 rpm por quatro horas. Após esse período, o conteúdo foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugados a 6000 rpm por 10 min e lavados com meio M9. As células foram ressuspensas com 5 mL de meio M9 com xilose 1%. O comportamento celular foi observado por espectrofotometria a cada duas horas. Foram observadas as seguintes curvas de crescimento em Logaritmo Neperiano da DO em função do tempo (h) (Anexo C). Com base nas velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) apresentados nos gráficos apresentados no Anexo C, 5 transdutantes foram escolhidos para sequenciamento. Dentre os 16 transdutantes analisados, os escolhidos foram os de número 1, 5, 6, 10 e 14, cujos valores de $\mu_{\text{máx}}$ são 0,127; 0,202; 0,218; 0,178; 0,173 h⁻¹ respectivamente, sendo que o controle apresentou $\mu_{\text{máx}}$ igual a 0,045 h⁻¹.

O DNA destes transdutantes foi extraído e submetido à amplificação por PCR utilizando os primers do *crp**, como definido por material e métodos, para verificar se nestes transdutantes havia sido incorporado o gene *crp** em seu genoma. A figura 10 abaixo mostra o gel com os resultados da amplificação. Os amplicons foram enviados para análise de sequenciamento, porém como podemos ver no Anexo D, também não foi observada a modificação esperada.

Figura 10 - Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos à eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do gene *crp**. 1 Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; 2, 3, 4, 5 e 6 são os fragmento *crp** amplificado das bactérias transduzidas 1, 5, 3, 10 e 14 respectivamente.

Pelas dificuldades operacionais foram encontradas como a inespecificidade do teste de TTC na detecção de clones com *crp**, optou-se por testar a expressão desse

gene por transformação mediante o vetor pBBR1MCS-3 nas linhagens de *E. coli* selvagem W3110 e na mutante VH33.

5.2.2 Construção do vetor de clonagem contendo o gene *crp** e avaliação da expressão do gene nos recombinantes obtidos

O gene *crp** foi amplificado a partir do genoma da bactéria *E. coli* ET25 conforme descrito em material e métodos. A figura 11 mostra o fragmento *crp** resultante da amplificação.

Figura 11 - Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos à eletroforese em gel de agarose mostrando a amplificação do gene *crp**. 1 Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; 2 fragmento *crp** amplificado.

Este fragmento foi sequenciado como podemos observar no Anexo B. O fragmento obtido foi inserido no plasmídeo pBBR1MCS-3 e transferido para as linhagens de *E. coli* W3110 e VH33 PTS^-GalP^+ por transformação. Para verificar a presença do plasmídeo com o inserto nas linhagens foi feito um gel de agarose 0,8% dos plasmídeos extraídos dos transformantes e digeridos com a enzima *Hind III* (figura 12).

Figura 12 - Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose, mostrando a inserção do gene *crp** nas linhagens. Em que: **1** Padrão de peso molecular DNA de λ digerido com *HindIII*; **2** W3110 pBBR1MCS-3; **3** W3110 pBBR1MCS-3::*crp**; **4** VH33pBBR1MCS-3::*crp**; **5** VH33pBBR1MCS-3.

De acordo com o perfil de migração apresentado no gel verifica-se a presença de duas bandas, uma de aproximadamente 5 kb referente ao plasmídeo pBBR1MCS-3 e outra de aproximadamente 0,7 kb referente ao fragmento *crp**. Dessa forma, o plasmídeo pBBR1MCS-3::*crp** foi inserido com sucesso nas linhagens de *E. coli* W3110 e VH33 PTS⁻GalP⁺.

No esquema abaixo (figura 13) está representada a construção do vetor contendo o gene *crp**.

Figura 13 - A partir do gene *crp** do DNA da bactéria *E. coli* ET25, foi feita a amplificação desse gene por PCR. Com o amplicon obtido, foi feito um gel de agarose. O gene foi extraído a partir desse gel e ligado ao pGEM com a enzima T4 DNA ligase. Este inserto foi digerido com as enzimas *XhoI* e *SacII* ligado ao plasmídeo pBBR1MCS-3, também digerido com as mesmas enzimas, pela enzima T4 DNA ligase. A construção pBBR1MCS-3::*crp** foi inserida nas linhagens *E. coli* W3110 e VH33.

5.2.3 Teste de crescimento em mistura de açúcares com as cepas *crp*^{*}

A fim de verificar o desempenho que o gene *crp*^{*} teria ao ser inserido a linhagem mutante *PTS⁻GalP⁺* e se haveria algum efeito adicional sobre a repressão catabólica, foi feito um ensaio em meio M9 (SAMBROOK; FRITHSCH E MANIATIS, 1989) com a linhagem selvagem e a mutante portando o vetor com o inserto *crp*^{*} (W3110::pBBR1MCS3*crp*^{*}, VH33::pBBR1MCS3*crp*^{*}). Esse meio foi suplementado com 0,06 g/L de citrato férrico e 10 g/L de fonte de carbono. Foram retiradas amostras para medir densidade óptica (D.O.) a cada 2 horas.

A figura 14 abaixo mostra as curvas de crescimento obtidas neste ensaio em que foram plotados logaritmo Neperiano da densidade óptica (DO_{610nm}) das linhagens recombinantes, e o consumo de açúcar observado ao longo do tempo.

A Tabela 2 mostra as médias das velocidades específicas máximas ($\mu_{\text{máx}}$) observados no ensaio de crescimento celular dos mutantes. Podemos observar que o maior valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi de 0,78 h⁻¹ da linhagem W3110::pBBR1MSC3*crp*^{*} com glicose. Sendo que o menor valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi da mesma linhagem com xilose como fonte de carbono.

Linhagens de *E. coli* *PTS⁻GalP⁺* já foram testadas em experimentos anteriores como aqueles reportados em Baldeiras-Hernández (2011) onde foi demonstrado que elas apresentam um consumo simultâneo da mistura de açúcares glicose e xilose. Neste caso, o nosso controle foi a linhagem selvagem W3110, que não teve melhora no consumo de xilose, dessa forma, isso pode indicar que o fato da célula ter o gene *crp*^{*} e ser independente de cAMP não favorece o seu crescimento em xilose.

Hernández-Montalvo et al. (2001) testaram linhagens de *E. coli* NF9 que é *PTS⁻GalP⁺* e a parental PB103 em meio M9 com mistura de glicose, xilose e arabinose. Eles observaram que não houve repressão catabólica em mistura de glicose e arabinose, enquanto em mistura de glicose e xilose a repressão ainda podia ser observada. Os autores mostraram que, dependendo do background genético, a glicose exerce vários níveis de inibição do transporte de xilose e foi sugerido que na cepa estudada por eles a captação de xilose é dependente a captação de glicose intracelular. Contudo, eles não elucidaram o mecanismo responsável por essa inibição.

Figura 14 - Curvas de crescimento e consumo de açúcar das linhagens W3110::pBBR1MCS3crp* e VH33::pBBR1MCS3crp* em meio mínimo M9 contendo 10 g/L de fonte de carbono e das linhagens W3110 e VH33 em meio mínimo contendo 2g/L do total das misturas de açúcares. Nas figuras o losango azul significa o consumo de glicose, o losango verde o consumo de xilose e o quadrado vermelho representa o crescimento celular medido por densidade óptica (DO_{610nm}) e apresentado em logaritmo Neperiano.

Tabela 2 - Valores médios da velocidade específica do crescimento celular e o desvio padrão das duplicatas de diferentes linhagens cultivadas em glicose e xilose nas condições indicadas na figura 17.

Linhagem e fonte de carbono	Média $\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$	Desvio padrão das duplicatas
W3110R3crp*Glicose	0,78	0,01
W3110R3crp*Xilose	0,03	0,00
W3110R3crp*Glicose Xilose	0,78	0,02
VH33R3crp*Glicose	0,46	0,00
VH33R3crp*Xilose	0,45	0,02
VH33R3crp*Glicose Xilose	0,62	0,00

5.3 Expressão do operon *phaCAB* nas linhagens de *E. coli* W3110 e *E. coli* VH33

O operon *phaCAB* que expressa as enzimas necessárias para a biosíntese de P-3HB, foi transferido para as linhagens de *E. coli* W3110 e *E. coli* VH33 por transformação.

5.3.1 Construção do vetor pSK⁻::*phaCAB*

A linhagem *E. coli* XL1Blue pJM::*phaCAB* foi cultivada em meio LB com canamicina a 100 mg/mL. O plasmídeo pJM9131::*phaCAB*_{Cn} foi extraído dessa linhagem com o kit de extração plasmidial (Quiagen) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Depois disso o plasmídeo foi digerido com a enzima *HindIII* gerando um fragmento de 3 kb para o pJM9131 e 6 kb para o fragmento *phaCAB*_{Cn}. O fragmento *phaCAB*_{Cn} foi extraído do gel de agarose com o kit de extração apropriado (Quiagen) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. O fragmento obtido da extração a partir do gel foi ligado ao vetor pBluescript SK⁻ (Stratagene Cloning System) pela enzima T4 DNA ligase. No esquema abaixo (figura 15) esta representada a construção do vetor contendo o gene *phaCAB*_{Cn}.

Figura 15 - A partir do plasmídeo pJM9131 contendo os genes de *Cupriavidus necator* *phaCAB_{Cn}*, digerido com a enzima *HindIII*, o fragmento *phaCAB_{Cn}* foi extraído de um gel de agarose e ligado ao vetor pSK⁻, também digerido com *HindIII*, com a enzima T4 DNA ligase. Essas construções foram inseridas em *E. coli* W3110 e VH33.

A Figura 16 abaixo mostra o perfil de migração dos fragmentos quando submetidos à eletroforese em gel de agarose e confirmam a extração e digestão com a enzima *HindIII* do vetor pBluescript SK⁻, e do plasmídeo pJM9131::*phaCAB_{Cn}* digerido também pela enzima *HindIII*.

Figura 16 - Perfil de migração de fragmento de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose. 1 padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); 2 pSK⁻ digerido com *HindIII*; 3 pJM9131::*phaCAB_{Cn}* digerido com *Hind III*.

5.3.2 Teste de sensibilidade das *E. coli* ao antibiótico e inserção, por transformação, do plasmídeo construído

Previamente à inserção do plasmídeo por transformação foi feito um teste demonstrando que as células hospedeiras *E. coli* VH32 e W3110 eram sensíveis ao antibiótico ampicilina. Para isso foram espalhadas com alça Drigalski as cepas sem o plasmídeo em todo o meio LB sólido com o antibiótico e em meio LB sem o antibiótico. O mesmo foi feito com as cepas que receberam o plasmídeo. Sendo assim, as cepas que não tinham o plasmídeo cresceram apenas em meio LB, e as cepas que receberam o plasmídeo cresceram em ambos os meios. Para comprovar o sucesso da transformação, os transformantes foram cultivados em meio LB com o antibiótico ampicilina e a partir deste cultivo, foi feita uma extração de DNA plasmidial das culturas conforme indicado em material e métodos. Os possíveis plasmídeos foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e analisados por eletroforese em gel de agarose. A Figura 17 mostra que os plasmídeos extraídos das cepas W3110 e VH33 apresentam tamanhos correspondentes ao plasmídeo pSK⁻::*phaCAB_{Cn}*.

Figura 17 - Perfil de migração de fragmentos de DNA submetidos a eletroforese em gel de agarose. 1- Padrão de peso molecular 1kb Plus DNA Ladder (Fermentas Life Sciences), 2- LFM 867 (W3110 pSK⁻::*phaCAB_{Cn}*), 3- LFM 868 (VH33 pSK⁻::*phaCAB_{Cn}*).

5.3.2 Avaliação qualitativa de capacidade de acúmulo de PHA pelos transformantes

Foi empregado o teste de coloração com Sudan Black B para verificar qualitativamente se a inserção dos genes *phaCAB_{Cn}* conferiu a capacidade de acúmulo aos transformantes de *E.coli*. Para fazer este teste, as células foram cultivadas em meio M9 sólido sob condições que favorecem o acúmulo de PHA, como descrito em materiais e métodos. A coloração com Sudan Black B utiliza um corante lipofílico capaz de indicar que as colônias produzem PHA porque reagem com fosfolipídeos, gorduras neutras e esteróis, o que permite a visualização das membranas fosfolipídicas dos grânulos. A Figura 18 mostra os controles utilizados e as linhagens que foram testadas. Como controle positivo *Burkholderia sacchari* LFM 101 que é capaz de acumular até 75% do seu peso seco de PHA, como controle negativo usou-se a *E.coli* XL1 Blue que é incapaz de acumular PHA porque não possui os genes de síntese de PHA, e as células a serem testadas são as *E. coli* VH33, W3110 sem o inserto pBluescriptSK⁻::*phaCAB*, e as *E. coli* contendo o inserto VH33 pSK⁻::*phaCAB* e W3110 pSK⁻::*phaCAB*. Com esse teste podemos observar que as linhagens transformantes se tornaram capazes de acumular, ao passo que as *E. coli* precedentes não acumulavam.

Figura 18 - Teste de acúmulo feito com Sudan Black B. Linhagem utilizada como controle positivo: LFM 101. Linhagem utilizada como controle negativo: *E. coli* XL1 Blue. *E. coli* VH33 e W3110 são linhagens antecessoras às parentais. E as linhagens recombinantes *E. coli* W3110::*phaCAB_{Cn}*, VH33::*phaCAB_{Cn}* são linhagens modificadas.

5.3.3 Avaliação da capacidade de acúmulo das cepas em estudo com o gene *phaCAB* em mistura de açúcares

Para verificar o quanto as cepas obtidas pela técnica de transformação acumulavam PHA, estas foram cultivadas em meio mínimo M9 (SAMBROOK; FRITHSCH E MANIATIS, 1989) pré-selecionado no experimento anterior. Foram retiradas quadruplicatas das amostras. As linhagens testadas foram *E. coli* W3110pSK⁺::*phaCAB* e VH32pSK⁺::*phaCAB*. Em cada uma delas foi testado o acúmulo de PHA ao serem cultivadas com glicose (15 g/L) como fonte de carbono, comparado ao acúmulo de PHA em mistura de glicose, xilose (5 g/L de cada fonte de carbono). Foram medidos dois pontos, 0 e 72 horas. Para análise, foram centrifugados 10 mL de cada amostra a 6000 rpm por 15 min. Com o sobrenadante foi analisado açúcar por HPLC como descrito em materiais e métodos. O pellet foi liofilizado (Labconco, Triade) e o produto da liofilização foi pesado resultando na massa seca celular (MSC em miligramas)/10mL que foi convertido a g/L. A produção de PHA foi verificada em cada uma das amostras. Com o sobrenadante pudemos analisar o pH inicial e final do cultivo. Como podemos observar na Tabela 3, o pH diminui bastante, podendo ser um agravante ao crescimento celular. Em 72 horas de crescimento as células não consumiram totalmente a fonte de carbono do meio. Em mistura de açúcares, a xilose não foi totalmente consumida, ao passo que a glicose foi consumida por completo. A produção de PHB foi muito baixa em torno de 6,9 % comparada com a produção observada na literatura. E o

crescimento celular foi muito inferior ao observado na literatura. Bocanegra- Rodriguez (2012) estudou uma linhagem de *E. coli* LS5218 utilizando o vetor de expressão pSK⁻::*phaCAB* e conseguiu valores de aproximadamente 17 % de PHB em meio mínimo contendo glicose como fonte de carbono. Em sua discussão, estes valores foram considerados baixos comparados aos dados da literatura que dizem que a mesma linhagem é capaz de produzir até 80 % da massa seca celular. Yang et al. (2012) utilizaram a mesma linhagem selvagem, W3110, contendo o plasmídio pLW487 contendo os genes de produção de PHA de *Cupriavidus necator* e obtiveram um acúmulo de 50 % de PHA.

Nikel et al. (2006) testaram uma linhagem de *E. coli* K24 contendo plasmídeo pJP24 com o inserto *phaBAC* de *Azotobacter sp*, em cultivo de batelada alimentada em resíduos de milho e trigo. Durante o cultivo foram medidos biomassa, acúmulo de polímero e estabilidade do plasmídeo. Verificaram que a biomassa atingiu 58,2 g/L em 24 horas, sendo que em 20 horas de cultivo o acúmulo baixou 30%. Neste ensaio eles perceberam que o plasmídeo que continha a resistência a ampicilina foi perdido, por ausência de pressão seletiva durante o ensaio. O crescimento celular e a produção de β -lactamases degradavam o antibiótico fazendo com que, após as 20 horas, a quantidade de polímero caísse. Por essa razão, os autores optaram por adicionar a resistência a canamicina no plasmídeo pJP24.

Com base nos dados indicados na literatura acima, ao final do experimento uma amostra de cada cultura foi retirada e estriada em meio sólido LB com ampicilina. Após 24 horas de incubação a 37 °C não houve crescimento. Portanto, provavelmente a célula expulsou o plasmídeo após um determinado período de cultivo por ausência de pressão seletiva, perdendo a capacidade de acúmulo de PHB.

Tabela 3 - Consumo de açúcares, produtividade de PHB, crescimento celular e pH observado no início e ao final do cultivo das linhagens de *E. coli* W3110pSK::*phaCAB* e VH33pSK::*phaCAB*. Estas linhagens foram cultivadas em meio mínimo M9 com glicose e glicose, xilose como fonte de carbono.

	tempo	Fonte de C	pH	Glicose(g/L)	Xilose (g/L)	Xt (g/L)	%PHB	PHB (g/L)	XR (g/L)
W3110	0	Gli	7,2	15	0	0,03	0	0	0
	72		4,95	7,15	0	0,78	3	0,023	0,75
W3110	0	gli + xil	7,22	5	5	0,03	0	0	0
	72		5,41	0	0,66	0,89	3,2	0,028	0,86
VH33	0	Gli	7,2	15	0	0,03	0	0	0
	72		5,09	6,01	0	0,99	6,9	0,068	0,92
VH33	0	gli + xil	7,22	5	5	0,03	0	0	0
	72		5,23	0	0,32	0,95	6,2	0,059	0,89

Como os resultados obtidos não atingiram as expectativas de produção de PHA, optou-se por trocar o vetor de clonagem dos genes *phaCAB*. Bocanegra- Rodriguez (2012) realizou ensaios utilizando uma linhagem de *E. coli* contendo os genes *phaCAB* inseridos no plasmídeo pSK⁻, e estas também demonstraram um baixo acúmulo de polímero, em torno de 16 % da massa seca celular. Vários fatores podem influenciar na quantidade de polímero acumulado nas linhagens recombinantes, como por exemplo, o vetor utilizado para a expressão dos genes (LEE et al., 1994), as características metabólicas da linhagem utilizada (HO et al., 1999) e o meio de cultura empregado, que pode limitar o crescimento, restringindo a massa celular disponível para o acúmulo, entre outros.

Por esse motivo, os genes *phaCAB* que se encontravam no vetor pJM9131 (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012), foram digeridos com a enzima Hind III, inseridos por ligação no plasmídeo pBBR1MCS-5 com a enzima T4-DNA ligase como podemos ver na figura 19. Esse vetor obtido foi inserido por transformação nas linhagens W3110 e VH33 gerando os recombinantes W3110pBBR1MCS-5::*phaCAB* e VH33pBBR1MCS-5::*phaCAB*, que foram denominadas LFM 863 e LFM 862, respectivamente.

Figura 19 - Esquema representando a digestão do plasmídeo pJM9131 pela enzima *HindIII* e a ligação do fragmento *phaCAB* no plasmídeo pBBR1MCS5 pela T4DNA ligase formando pBBR1MCS5::*phaCAB*.

Antes de fazer qualquer ensaio, foi feito um teste quantitativo de acúmulo figura 20 visando verificar se as linhagens obtidas eram capazes de acumular PHA.

Figura 20 - Teste de acúmulo feito com Sudan Black B. Linhagem utilizada como controle positivo: LFM 101. Linhagem utilizada como controle negativo: *E. coli* XL1 Blue. *E. coli* VH33 e W3110 são linhagens antecessoras às parentais. E as linhagens recombinantes *E. coli* W3110pBBR1MCS5::*phaCAB*_{Cn}, VH33 pBBR1MCS5::*phaCAB*_{Cn} são linhagens modificadas representadas por VH33 CAB e W3110 CAB. Apenas as linhagens com o vetor também foram testadas (VH33 R5, W3110 R5).

Pelo fato do pH ter caído muito nos cultivos anteriores realizados em meio mínimo M9 (SAMBROOK et al., 1989) para avaliar o desempenho das linhagens recombinantes LFM 862 e LFM 863 testou-se o meio de cultivo mínimo de acordo com Pablos et al. (2011) com algumas modificações. Os meios utilizados estão descritos abaixo.

No ensaio que segue, o quadro 16 abaixo mostra que foram modificadas as concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 2,5 g/L para 1,0 g/L, extrato de levedura de 4,0 g/L para 1,0 g/L, MgSO_4 de 1,0 ml para 0,2 ml, e a solução de elementos traços de 2,0 ml para 1,0 ml, foi adicionado ao meio 1,0 ml de citrato férrico a 6%. Essas modificações foram feitas com a finalidade de se obter maiores concentrações de polímero e crescimento celular, diminuindo a quantidade de nitrogênio cedido para a célula. A concentração de extrato de levedura foi reduzida por ser uma mistura quimicamente não definida, o que dificultaria as análises de fluxo metabólico.

Quadro 16 - Meio mínimo M9 descrito por Pablos et al., 2011 modificado.

M9	
K_2HPO_4	17,0 g/L
KH_2PO_4	5,3 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g/L
Citrato de sódio	1,0 g/L
Extrato de levedura	1,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20%)	0,2 mL
Solução de elementos traços mL/L*	1,0 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1%)	1,0 mL
Citrato férrico amoniacal $\text{C}_6\text{H}_8\text{FeNO}_7$ (6%)	1,0 mL

*Indicado por material e métodos na sessão 4.3.4

Os resultados obtidos no ensaio descrito acima estão apresentados na Tabela 4. As concentrações de massa seca celular residual (X_r , ou seja, massa celular descontando-se a massa do polímero) neste experimento com M9 alcançaram 1,65 g/L. Estes dados foram maiores que aqueles apresentados pelo ensaio utilizando meio M9 (SAMBROOK; FRITHSCH E MANIATIS, 1989), cujo X_r máximo foi de 0,92 g/L. Porém, a produção de P-3HB máxima obtida no ensaio anterior foi de 6,9% enquanto neste ensaio a produção caiu para 1,35% .

Tabela 4 - Resultados do cultivo de diferentes linhagens em meio M9 modificado a partir da referência Pablos et al., 2011. Estão apresentadas as linhagens que foram utilizadas com as respectivas fontes de carbono (15g/L no total, para cada experimento, ou para cada açúcar 7,5 g/L). Os resultados da média da porcentagem de PHA, média da massa, PHA e Xr obtidos em 72 horas de ensaio.

Linhagem/Fonte de Carbono	Média da % PHA 72h	Média da massa (g/l)	PHA (g/l)	Xr (g/l)
LFM863/Glicose	0,48± 0,05	1,66	0,007	1,65
LFM863/Xilose	1,35± 0,68	1,56	0,021	1,53
LFM863/Gli+Xil	0,56± 0,24	1,56	0,008	1,55
LFM862/Glicose	1,04± 0,09	1,60	0,016	1,58
LFM862/Xilose	0,76± 0,46	1,32	0,010	1,31
LFM862/Gli+Xil	0,88± 0,68	1,51	0,013	1,49

Como a quantidade de PHA ainda não foi satisfatória, resolvemos modificar o meio novamente, retirando o citrato férrico amoniacal, CaCl_2 , e extrato de levedura. O meio utilizado está descrito no quadro 17 abaixo.

Quadro 17 - Meio mínimo M9 descrito por Pablos et al., 2011 modificado.

M9	
K_2HPO_4	17,0 g/L
KH_2PO_4	5,3 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g/L
Citrato de sódio	1,0 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (20%)	0,2 mL
Solução de elementos traços*	1,0mL

*Descrito no item 4.3.4

Como podemos ver na Tabela 5, os resultados mostram que a concentração da massa seca residual (Xr) teve um aumento de aproximadamente 16% em relação ao ensaio anterior. A produção de PHA foi maior que os resultados apresentados anteriormente, tendo atingido 14,59%. Apesar da linhagem LFM 862 ter tido um Xr maior do que a LFM 863, esta por sua vez acumulou mais PHA do que a LFM 862.

Tabela 5 - Resultados do cultivo de diferentes linhagens em meio M9 modificado a partir da referência Pablos et al., 2011. Estão apresentadas as linhagens que foram utilizadas com as respectivas fontes de carbono (15g/L no total, para cada experimento, ou para cada açúcar 7,5 g/L). Os resultados da média da porcentagem de PHA, média da massa, PHA e Xr obtidos em 72 horas de ensaio.

Linhagem/Fonte de Carbono	Média da massa (g/l)	Média % PHA	PHA (g/l)	Xr (g/l)
863/Glicose	1,84± 0,05	14,15	0,26	1,57
863/Xilose	1,91± 0,007	14,59	0,27	1,63
863/Gli+Xil	1,84± 0,02	12,27	0,22	1,61
862/Glicose	2,11± 0,03	7	0,14	1,96
862/Xilose	1,98± 0,04	11,87	0,23	1,74
862/Gli+Xil	1,96± 0,04	12,96	0,25	1,71

5.3.4 Cultivo das linhagens de *E. coli* W3110 e VH33 contendo o inserto *phaCAB_{Cn}*

Nos cultivos em frascos agitados, foi posto uma concentração alta de tampão (K_2HPO_4 em torno de 20 g/L) para que o pH se mantesse o mais estável possível. A disponibilidade do oxigênio dissolvido era limitada pela área disponível do frasco e pela sua velocidade de rotação.

Visando um melhor entendimento das linhagens modificadas LFM 862 e LFM863, foram feitos ensaios em biorreator. Bocanegra- Rodriguez (2012) fez um cultivo em biorreator limitando o oxigênio a 1% de saturação com outra linhagem de *E. coli*, e esta condição favoreceu a produção de PHA. Dessa forma, neste trabalho, o ensaio em biorreator foi feito nas mesmas condições indicadas por Bocanegra-Rodriguez e descritas no item material e métodos com as linhagens LFM 862 e LFM 863.

Em biorreator, o oxigênio dissolvido foi mantido a 1% de saturação pelo controle automático, variando a agitação e a vazão de ar foi mantida a 1 litro por minuto. O pH e a temperatura foram mantidos automaticamente a 7,0 e 37 °C respectivamente, sendo que o pH também foi verificado a cada amostragem para certificação do bom funcionamento da sonda.

A linhagem LFM 862 apresentou um crescimento exponencial, por um período de tempo de 0 a 7 horas. Após a escassez e/ou falta deste oxigênio dissolvido (figura 21A) não houve mais crescimento exponencial, passando para um crescimento linear. E então, após 20 horas de cultivo, o nitrogênio passa a ser limitante, podendo ser observada uma linearidade até o final do cultivo.

Figura 21 - Cultivo de *E. coli* VH33 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS5::*phaCAB* em meio mineral contendo a mistura de açúcares glicose e xilose. O oxigênio foi limitado mantendo-se a 1%. A figura A mostra a biomassa total produzida (X_t), biomassa residual produzida (X_r), PHB acumulado, a produção de lactato e acetato. A figura B mostra o consumo dos açúcares glicose e xilose, nitrogênio consumido durante o ensaio. A figura C mostra a taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa de produção de gás carbônico (CER).

A linhagem LFM 863 apresentou um crescimento exponencial por um período de tempo de 0 a 5 horas (figura 22A). Após 2 horas de cultivo o oxigênio dissolvido foi baixado para 1%, assim podemos observar um crescimento linear enquanto o oxigênio dissolvido vai se limitando. Após aproximadamente 15 horas de cultivo o crescimento cessa apresentando uma linearidade até o final do cultivo.

Figura 22 - Cultivo de *E. coli* W3110 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS5::*phaCAB* em meio mineral contendo a mistura de açúcares glicose e xilose. O oxigênio foi limitado mantendo-se a 1%. A figuraA mostra a biomassa total produzida (Xt), biomassa residual produzida (Xr), PHB acumulado, a produção de lactato e acetato. A figuraB mostra o consumo dos açúcares glicose e xilose, nitrogênio consumido durante o ensaio. A figuraC mostra a taxa de consumo de oxigênio (OUR), taxa de produção de gás carbônico (CER).

Pode ser observado em ambos os cultivos que o acúmulo de PHA foi acentuado ao limitar-se o oxigênio. Após o término do nitrogênio também houve acúmulo, porém o acúmulo maior é quando o oxigênio é limitado.

A biomassa total produzida (Xt), em gramas, pela LFM 862 foi de 15,85 g, sendo que 13,75 g corresponderam à biomassa residual (Xr) produzida e 2,10 g ao PHA acumulado. A quantidade de açúcares consumidos foi de 72,43 g de xilose e 61,83 g de glicose, um valor total de aproximadamente 134,26 g de fonte de carbono, sendo que a célula também produziu 3,2 g de ácido lático e 40,52 g de ácido acético. Estes valores correspondem a um fator de conversão da fonte de carbono em biomassa residual ou PHA de 0,10 g/g e 0,01 g/g, respectivamente.

A biomassa total produzida (Xt), em gramas, pela LFM 863 foi de 14,26 g, sendo que 12,64 g corresponderam à biomassa residual (Xr) produzida e 1,62 g ao PHA acumulado. A quantidade de açúcares consumidos foi de 70,46 g de xilose e 70,29 g de glicose, um valor total de aproximadamente 140,75 g de fonte de carbono. Sendo que a célula também produziu 9,17 g de ácido lático e 48,6 g de ácido acético. Estes valores correspondem a um fator de conversão da fonte de carbono em biomassa residual ou PHA de 0,08 g/g e 0,01 g/g, respectivamente.

Estes resultados são bem parecidos com os resultados reportados por Bocanegra-Rodriguez (2012) cujos experimentos foram conduzidos nas mesmas condições de cultivo, utilizando a linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*, obteve 16 g de Xt, sendo que 11,5 g correspondiam a Xr e 4,5 g de PHB. Para isso foram consumidos 145 g de fonte de carbono e produzido 37 g de ácido acético.

Com relação à avaliação dos recombinantes construídos neste trabalho, Li et al. (2007) construíram *E. coli* LR1010 recombinante com os genes de produção de PHA de *Cupriavidus necator* e com repressão catabólica parcialmente abolida pela inativação do gene *ptsG*. O mutante acumulou 11,5% da massa celular na forma de PHB (um total de 2,3 g/L) em meio contendo xilose e glicose (concentração total de açúcares 7 g/L) com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Para a cepa parental PTS⁺ a produção de PHB foi de 7,1 % da biomassa (2,1 g/L). Foi verificado o consumo simultâneo de açúcares em relação à parental, *E. coli* MG1655.

Xia; Eiteman; Altman, (2012) para tentar abolir a repressão catabólica, pensaram em uma outra estratégia. Foram construídas quatro linhagens de *E. coli*, uma que somente consumia acetato, uma que era capaz de consumir apenas xilose, outra que consumia só glicose e a última que consumia apenas arabinose. Eles fizeram um teste

colocando todas juntas menos a que consumia acetato em meio mínimo, e observaram que em 8 horas os açúcares tinham sido consumidos. A velocidade de crescimento específica máxima que elas obtiveram foi de $0,71 \text{ h}^{-1}$. Ainda neste trabalho eles cresceram a linhagem que consumia apenas acetato em meio mínimo contendo só acetato e outro contendo acetato e os açúcares glicose, xilose e arabinose. Observaram que em ambos os experimentos as velocidades de crescimento eram iguais. Sendo assim, ele fez um ensaio colocando as quatro linhagens juntas, assim, o acetato era consumido, não interferindo no crescimento das células e as outras consumiam os açúcares ao mesmo tempo.

5.4 Análise de fluxos metabólicos

Com o objetivo de avaliar as a distribuição de fluxos foram escolhidas as regiões pseudo-estacionárias, ou seja, regiões em que o metabolismo deve fluir com uma partição de fluxos constante. Nesses cultivos, este período corresponde a intervalos de tempo em que o consumo de substratos e a formação de produtos ocorrem com velocidade constante. A partir dos dados destas regiões foram calculados os balanços carbônicos. Estes cálculos foram realizados para que o total de carbonos presentes nos produtos formados deva corresponder ao total de carbonos consumidos nos substratos. Caso esta condição não seja atendida, a rede metabólica não representa adequadamente o processo, pois algum produto pode não estar sendo detectado, ou ainda há erros expressivos nas medidas de consumo de substratos ou formação de produtos. Foi considerado um balanço adequado quando os carbonos dos produtos corresponderem entre 95 e 105 % dos carbonos dos substratos.

O período de tempo escolhido foi entre 11 e 15 horas em ambos os cultivos (linhagem LFM 862 e LFM 863) a fim de possibilitar a melhor comparação das linhagens, pois estariam em condições semelhantes.

A tabela 6 abaixo mostra os dados da velocidade de produção de biomassa residual, PHB, acetato e CO_2 , bem como o consumo de glicose, xilose e lactato neste período. Levando em consideração os desvios experimentais, o balanço carbônico é matematicamente satisfatório, fazendo com que a rede metabólica contenha esses substratos e produtos.

Tabela 6 - Consumo de substratos e formação de bioprodutos em cultivo de *E.coli* em biorreator visando à produção de PHB. Dados referentes à região de estado pseudo-estacionário consideradas para a análise de fluxos metabólicos.

LFM 862	Glicose	Xilose	Xr	PHB	Acetato	Lactato	CO ₂
g/L.h	1,89	1,34	0,91	0,18	1,40	-0,11	0,68
mmol/L.h	10,50	8,92	38,12	2,18	23,72	-1,22	15,56
Cmmol/L.h	63,00	44,62	38,12	8,74	47,45	-3,66	15,56
	107,62						105,50

LFM 863	Glicose	Xilose	Xr	PHB	Acetato	Lactato	CO ₂
g/L.h	0,51	1,82	0,60	0,07	0,85	-0,01	0,96
mmol/L.h	2,83	12,12	25,00	0,81	14,40	-0,07	21,98
Cmmol/L.h	17,00	60,61	25,00	3,25	28,81	-0,23	21,98
	77,61						102,14

Foi construída uma rede metabólica para representar os processos observados com as linhagens de *E. coli* LFM 862 e LFM 863. Foram consideradas as vias de Embden- Meyerhof- Parnas, via das Pentoses, isomerização da xilose, complexo piruvato desidrogenase, ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato, carboxilação do piruvato, descarboxilação do oxaloacetato, síntese de acetato e PHB a partir de acetil- CoA e síntese de biomassa residual. Foi considerado ainda o consumo de glicose pelo sistema PTS e pelo produto do gene *GalP* na linhagem LFM 862. Como o lactato foi consumido e não produzido no intervalo pseudo-estacionário analisado, considerou-se sua conversão a piruvato com a redução simultânea de NAD⁺. A figura 23 esquematiza o metabolismo de uma *E. coli*, sem os valores de fluxo, para entendermos as vias que ela utiliza, onde Xr é a massa residual, Xt representa a massa total e 3-HB significa o PHA.

Figura 23-Rede metabólica representativa da produção de PHB por *E. coli* a partir de glicose e xilose como fonte de carbono.

A figura 24 representa a rede metabólica para a linhagem LFM 862. A rede metabólica foi utilizada para a construção do arquivo de entrada do programa *Metatool* (PFEIFFER et al., 1999). Foram incluídas duas estequiometrias correspondentes a produção de substratos consumidos e a produção de produtos formados de forma a buscar as soluções de modos elementares que atendam essas restrições.

Figura 24-Distribuição de fluxo observado pela linhagem de *E. coli* LFM 862.

Para a linhagem LFM 862, foram obtidos 10 modos elementares. Um deles corresponde à oxidação da fonte de carbono em CO₂, e os restantes correspondem à formação dos produtos e o consumo dos substratos na proporção observada experimentalmente. O arquivo de entrada para o *Metatool* pode ser consultado no ANEXO F.

Foram calculados fatores de conversão/correlação para os dados experimentais e comparados aos valores calculados a partir das reações globais dos modos elementares. Considerando um desvio de 10% nesses cálculos pudemos observar na Tabela 7 abaixo que o modo elementar 7 é o que melhor representa os dados experimentais obtidos nesse cultivo.

Tabela 7 - Reações globais descrevendo os modos elementares obtidos pelo programa *Metatool* da linhagem LFM 862. CC – fonte de carbono (glicose e xilose), PF- produto final, PF/CC- produto final dividido pela fonte de carbono, Desv 10% - desvio padrão de 10% a mais nos cálculos.

Desv 10% desv 10% desv 10% desv 10% desv 10% desv 10% desv 10% desv 10% desv 10%														
Overall Reaction														
	CC		ADP		O		ATP		CO2		PF		PF/CC	Desv 10%
3	1	+	6460	+	2222	=	6460		1111	+	0		0	0
4	140,107	+	466395	+	152893	=	466395		78796	+	1		0,41	0,50
5	147,846	+	519255	+	170089	=	519255		87394	+	1		0,39	0,48
6	961,512	+	162906	+	55223	=	162906		29961	+	1		0,06	0,07
7	103,890	+	215766	+	72419	=	215766		38559	+	1		0,56	0,68
8	195,270	+	806077	+	275464	=	806077		140082	+	1		0,29	0,36
9	112,690	+	277093	+	91971,2	=	277093		48335,1	+	1		0,51	0,63
10	119,137	+	321037	+	106298	=	321037		55498,5	+	1		0,49	0,59

Legenda: em amarelo o modo elementar 7 mostra a reação global que a linhagem esta fazendo.

A análise dos outros modos elementares revela que apenas eficiências menores de conversão dos substratos consumidos nos produtos formados poderiam ser obtidas. Estes resultados indicam que com a formação dos produtos considerados, a linhagem 862 já está em sua capacidade máxima teórica. A distribuição de fluxos que representa esta condição pseudo-estacionária esta apresentada na figura 25.

Figura 25 - Distribuição de fluxo observado pela linhagem E. coli LFM 863.

Para a linhagem LFM 863, foram obtidos 12 modos elementares. Um deles corresponde oxidação da fonte de carbono em CO₂, e os restantes correspondem ao consumo de substrato e formação dos produtos na proporção observada experimentalmente. O arquivo de entrada está no Anexo G.

Foram calculados fatores de conversão/correlação para os dados experimentais e comparados aos valores calculados pelas reações globais dos modos elementares. Como podemos observar na Tabela 8 verificou-se que o modo elementar 7 é o que melhor se ajustava aos dados experimentais obtidos e correspondia a 92% da eficiência de conversão de substratos em produtos obtida com o modo elementar que correspondia a eficiência máxima teórica.

Tabela 8 - Reações globais descrevendo os modos elementares obtidos pelo programa *Metatool* da linhagem LFM 863.

Overall Reaction										
	CC		ADP		O		ATP		CO ₂	PF PF/CC DESV 10%
3	1	+	45455	+	15558	=	45455	+	7779	+ 0 0,000 0,000
4	18,6746	+	438681	+	142913	=	438681	+	73297	+ 1 0,421 0,515
5	19,7799	+	491787	+	160109	=	491787	+	81895	+ 1 0,398 0,486
6	12,724	+	149678	+	50333	=	149678	+	27007	+ 1 0,618 0,756
7	13,8293	+	202785	+	67529	=	202785	+	35605	+ 1 0,569 0,695
8	33,4382	+	1,09E+06	+	372604	=	1,09E+06	+	188142	+ 1 0,235 0,288
9	13,4992	+	186924	+	62393,2	=	186924	+	33037,1	+ 1 0,583 0,712
10	15,912	+	304509	+	99932	=	304509	+	51806,5	+ 1 0,494 0,604
11	12,9413	+	160232	+	53713,7	=	160232	+	28697,4	+ 1 0,608 0,743
12	16,8472	+	349354	+	114481	=	349354	+	59081,2	+ 1 0,467 0,571

Legenda: em verde a equação 6 refere-se a equação que a linhagem deveria estar fazendo, e em amarelo a equação 7, é a reação global que a linhagem faz.

A principal diferença entre estas duas distribuições é uma redução do fluxo no ciclo de Krebs (Figura 26).

Os resultados obtidos demonstram que, considerando os produtos formados, tanto a linhagem selvagem (LFM 863- W3110) como seu mutante com sistema alternativo para tomada de carboidratos (LFM 862- VH33) apresentaram desempenho metabólico muito próximo ao valor máximo teórico, indicando que alterações na distribuição de fluxos no metabolismo central não deverão resultar em ganhos expressivos no desempenho. Por outro lado, a redução na quantidade de subprodutos formados, principalmente acetato deverá representar a estratégia mais promissora para aumentar o desempenho na produção de P-3HB.

5.5 Teste das linhagens frente ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Tudo isso foi feito para o melhor entendimento da cepa mutante *E.coli* LFM 862, antes de submetê-la ao cultivo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Em Lopes (2010), são descritos vários procedimentos de hidrólises com diferentes concentrações de ácido sulfúrico. Foi demonstrado que a hidrólise a 2% de ácido sulfúrico foi mais eficiente, liberando glicose (2 g/L), xilose (17 g/L), além de uma grande quantidade de compostos tóxicos. Pela hidrólise liberar estes compostos tóxicos, o autor ressalta que deve ser usada uma grande concentração de células para inóculo.

Primeiramente foi feito um teste de crescimento em frascos agitados com o hidrolisado de cana de açúcar. Neste caso, o hidrolisado não foi submetido ao procedimento de concentração para obtenção de mais fonte de carbono.

Para saber se a linhagem era capaz de sobreviver e crescer no meio, foi feita hidrólise a 0,5% e a 2% de concentração de ácido sulfúrico. E para saber se somente o hidrolisado era eficiente no crescimento celular, foram testadas essas concentrações sem suplementações e com suplementação de KH_2PO_4 (40 g/L), citrato férrico (1,2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), MgSO_4 (26 g/L) e solução de elementos traços (6 mL/L). A hidrólise a 0,5% apresentava uma concentração de xilose e glicose, respectivamente de 6 g/L e 1,5 g/L, enquanto a hidólise a 2% levou a uma concentração de 10 g/L e 1,7 g/L, respectivamente.

Para melhor entendimento do que foi feito o ensaio foi esquematizado na figura 27 abaixo.

Figura 27 - Esquema do ensaio em shaker utilizando as linhagens de *E. coli* LFM 862 e LFM863. As culturas foram testadas em hidrolisados obtidos a partir de tratamentos com diferentes concentrações de ácido sulfúrico, suplementando ou não o cultivo.

Após 48 horas, o crescimento foi observado através da turvação do meio. Em todos os frascos os meios apresentaram turbidez. Sendo assim, foi feita uma análise através do procedimento de propanólise (descrito no item 4.11.3), os resultados apontavam que a maior produção de polímero, aproximadamente 21% de P-3HB, foi no frasco com o hidrolisado tratado com ácido a 2% de concentração sem suplementação.

Sabendo-se que é possível crescimento em hidrolisado com as linhagens de *E. coli*, foi feito um ensaio em biorreator com a linhagem LFM 862. Neste ensaio o hidrolisado foi concentrado para que atingisse 15 g/L de fonte de carbono. Suplementamos o meio com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,5 g/L), KH_2PO_4 (0,75 g/L), citrato férrico amoniacal (0,09g/L), extrato de levedura (1,5 g/L), MgSO_4 (0,3 g/L) e solução de elementos traços (3 mL/L).

Foi feito um inóculo em meio LB líquido que, após 15 horas de cultivo foi lavado com solução salina 0,85% e inoculado em 200 ml de meio mineral líquido que, por sua vez após 12 horas foi inoculado no biorreator. Não houve crescimento celular num período de 48 horas após o inóculo.

O ensaio foi refeito com algumas modificações. Neste ensaio o hidrolisado foi concentrado para que a fonte de carbono atingisse 60 g/L, para que pudéssemos alimentar o biorreator quando os açúcares fossem consumidos.

No biorreator diluímos o hidrolisado para que a fonte de carbono disponível chegasse a 15 g/L e suplementamos o meio com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), KH_2PO_4 (40 g/L), citrato férrico amoniacal (1,2 g/L), MgSO_4 (26 g/L) e solução de elementos traços (6 mL/L). Antes de inocular o meio do biorreator foi feita uma placa do hidrolisado em meio LB para saber se a filtração foi eficiente na esterilização. De acordo com a figura 28 podemos observar que o meio estava estéril.

Figura 28 - Resultado de um cultivo de uma amostra do hidrolisado em meio sólido LB para confirmação de esterilização antes do ensaio.

Foi feito um inóculo em meio LB líquido, após 15 horas de cultivo foi lavado com solução salina 0,85% e inoculado em 200 mL do mesmo hidrolisado suplementado que havia no biorreator e após 12 horas foi feito o inóculo no biorreator. Foi feito o cultivo, em meio LB sólido, de uma amostra do biorreator retirada no tempo 0 e uma após 8 horas de cultivo. Foram feitas lâminas dessas culturas que foram coradas pelo método de Gram.

Figura 29 - Cultivo em meio LB sólido (A) e lâmina corada pelo Gram (B) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 no tempo 0. O cultivo em meio LB sólido (C) e lâmina corada pelo Gram (D) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 no tempo 8h.

Após 27 horas de cultivo não foi observado crescimento celular, sendo que ao fazer uma nova cultura em meio LB houve o crescimento da linhagem como se pode observar na figura 30. A partir dessa cultura foi feita uma lâmina e corada por Gram.

Figura 30 - Cultivo em meio LB sólido(A) e lâmina corada pelo Gram (B) de amostras da cultura da linhagem de *E. coli* LFM 862 retirada após 27 horas de cultivo em biorreator.

O que podemos concluir destes resultados é que, com o processo de concentração integrado, os compostos tóxicos também se concentram, assim, as células não conseguem sair da fase lag. Outro fator importante é a quantidade de células do inóculo. De acordo com Lopes (2010), o ensaio deve ser iniciado com uma quantidade de células de 1,5 g/L ou mais. Talvez apesar do inóculo ter 10% do volume final, pode não ter sido suficiente.

Miller et al. (2009) mutaram uma *E. coli* após submetê-la a estresse por 54 transferências em furfural. Esta linhagem só cresceu após uma fase lag de 48 horas em hidrolisado contendo 0,42 g/L de furfural. Wang et al. (2012) criaram mutantes de *E. coli* usando um regulador global exógeno irrE, de *Deinococcus radiodurans* que tornava as cepas tolerantes a alcoóis e acetatos. Essas puderam crescer em LB suplementado com hidrolisado de milho exibiram uma fase lag de 24 a 44 horas. NDUKO et al. (2011) conseguiram produzir PHB- co-3HV com uma *E. coli* LS5218::*phaCAB* a partir de hidrolisado de celulose catalizado por ruthenium e propionato. A linhagem era resistente a 5- hidroximetilfurfural (5-HMF), que é o maior inibidor gerado pela hidrólise.

Porém Lopes (2010) observou que nos resultados obtidos com *Burkholderia sp.* F24 em hidrolisado de cana-de-açúcar indicaram que o furfural e o 5-hidroximetilfurfural inibem não somente a principal via metabólica de crescimento, mas também a formação de PHA na célula. Mas também revela que ao serem feitas análises do meio em HPLC, o real inibidor não são o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, e sim a

conversão destes em outros compostos cujo tempo de retenção era diferente, em torno de 19,6 e 14,2 minutos. Ele conclui que o acúmulo destes metabólitos no meio de cultura pode inibir o crescimento celular resultando na alta concentração de xilose residual. Zaldivar et al., (1999) observaram que os inibidores formados pela hidrólise são mais letais aos microrganismos quando estão juntos do que separadamente.

Chandel et al (2007), Mussatto e Roberto (2004) e Parawira e Tekere (2011) sugerem estratégias de destoxificação como a aplicação de resinas de permuta iônicas, carvão ativado, destoxificação usando a enzima laccase, tratamentos alcalinos, *overliming* usando hidróxido de cálcio. Porém estas etapas possuem limitações, incluindo afinidades específicas de destoxificação, perda de açúcares e filtragens adicionais.

5.5.1 Dificuldades encontradas no preparo e manejo do hidrolisado de cana-de-açúcar

Durante o preparo do hidrolisado houve algumas dificuldades como armazenamento do mesmo até que fosse concentrado. Ao ser colocado na geladeira para evitar possíveis contaminações ele formava cristais como mostra a figura 31, os quais eram eliminados ao aquecer o frasco em banho maria a 37 °C.

Figura 31 - Presença de cristais formados no hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar com o pH regulado quando submetido ao armazenamento em refrigerador doméstico.

Para concentrar o hidrolisado foi escolhido o método de liofilização, por ser o mais eficiente. Para ser liofilizada, a amostra deve ser congelada e depois submetida ao vácuo para retirada de água. Nesse processo, ocorre a concentração dos açúcares e

demais constituintes da amostra, o que gerava uma amostra liofilizada de cor escura, sobretudo quando se liofilizavam pequenos volumes de amostra. Maiores volumes apresentavam dificuldade de congelamento e de liofilização, resultando na expansão e turbulência da amostra, que teve de ser protegida com filme plástico com pequenos furos.

Por causa do processo de destoxificação por *overliming*, o hidrolisado ficava viscoso e com resíduos. Para ser esterilizado em membrana de 0,22 µm de diâmetro esterilizadas, o hidrolisado tinha que ser centrifugado.

O hidrolisado não podia ser autoclavado devido a possíveis modificações, como aumento de compostos tóxicos ou até a degradação dos açúcares contidos nele. Por esse motivo, o a dorna do biorreator era esterilizada com água ao invés de hidrolisado. Após a dorna ser esterilizada, a água que estava dentro era substituída por hidrolisado (esterilizado por filtração). Esse processo é posto aqui como uma dificuldade pelo fato da contaminação ser um fator presente pelo manejo do meio de cultura.

6 CONCLUSÕES

Vetores de clonagem foram obtidos contendo o gene *crp**, amplificado a partir da linhagem *E. coli* ET25. A sequência de *crp** foi confirmada. O vetor construído, pBBR1MCS-3::*crp**, foi transferido para as linhagens *E. coli* W3110 e *E. coli* VH33. Estes transformantes foram avaliados com o intuito de determinar a influência deste gene na repressão catabólica. As linhagens transformantes avaliadas não diminuíram o fenômeno de repressão catabólica, sendo o perfil de consumo de substratos similar aos das linhagens não transformantes. Possivelmente, pelo fato do *crp** ser um regulador global não específico para o operon *xyl*, o consumo simultâneo de glicose e xilose não foi favorecido. Outra possibilidade, é o fato do promotor *lacZ*, presente no vetor utilizado, ser dependente de CRP. Como perspectivas futuras pode ser clonado este gene em um plasmídeo com um promotor diferente do *lacZ*.

Foram obtidas duas linhagens recombinantes, a partir da inserção do plasmídeo pBBR1MCS-5::*phaCAB*, por transformação nas linhagens *E. coli* W3110 e *E. coli* VH33. Estas linhagens foram denominadas *E. coli* LFM 863 e *E. coli* LFM 862, respectivamente. O perfil de acúmulo observado pelas linhagens recombinantes, demonstrou que estas linhagens conseguiram atingir um acúmulo em torno de 28% da massa seca celular em forma de P-3HB resultados comparáveis aos dados da literatura.

A análise de fluxo metabólico realizada, a partir dos resultados do perfil de consumo de substratos e produção de metabolitos, para as linhagens *E. coli* LFM 862 e LFM 863, permitiu conhecer a distribuição de fluxos de carbono realizada por estas linhagens para a produção do biopolímero. A partir da análise de fluxos, foram obtidos dez modos elementares que representaram o metabolismo da *E. coli* neste caso. Estes resultados demonstraram que a recombinante LFM 862 conseguia produzir o polímero em valores máximos teóricos da fonte de carbono em P-3HB. Desta forma, para aumentar o percentual de acúmulo do polímero nesta recombinante, uma alternativa seria a inativação da via da produção de ácido acético para aumentar a disponibilidade de carbono para a produção de P-3HB.

Nos ensaios realizados com hidrolisado de cana de açúcar a linhagem recombinante LFM 862 não atingiu concentrações representativas de crescimento, devido, provavelmente, à presença de compostos tóxicos liberados durante a hidrólise, como o furfural e o hidroximetilfurfural, que também foram concentrados dificultaram o crescimento e acúmulo. Para driblar estes compostos tóxicos, algumas estratégias

podem ser utilizadas como perspectivas futuras, entre elas, alterações genéticas, uso de agentes destoxificantes, evolução dirigida e seleção bacteriana para o consumo destes compostos tóxicos.

Neste estudo, assim como em outros trabalhos realizados no nosso laboratório, foi demonstrado que a obtenção de porcentagens elevadas de polímero em linhagens recombinantes de *E. coli* não é simples como muitas publicações podem sugerir, apresentando diversos gargalos ainda a serem resolvidos.

REFERÊNCIAS¹

ALTERTHUM, F. Produção de etanol utilizando bactéria recombinante. **Revista FAPESP**, 1998.

AMASS, W.; AMASS, A.; TIGHE, B. A Review of biodegradable polymers: uses, current developments in the synthesis and characterization of biodegradable polyesters, blends of biodegradable polymers and recent advances in biodegradation studies. **Polymer International**, v. 47, p. 89, 1998.

BACHMANN, B. J. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. p. 1191- 1219, 1987.

BALDEIRAS-HERNÁNDEZ, V. E.; HERNÁNDEZ- MONTALVO, V.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G.; MARTÍNEZ, A. Adaptive evolution of *Escherichia coli* inactivated in the phosphotransferase system operon improves co- utilization of xylose and glucose under anaerobic conditions. **Appl. Biochem Biotechnol.**, v. 163, p. 485-496, 2011.

BAPTIST, J. N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. US Patent 3036959, 1962a.

BAPTIST, J.N. Process for preparing poly- β -hydroxybutyric acid. US Patent 3044942, 1962b.

BARBAROTE, R. D.; SAIER, M. H. Jr. Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 69, p. 608-634, 2005.

BAUDEL, H. M. Pré tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SEBRE: HIDRÓLISE PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL, São Paulo, dez. 2006.

BOCANEGRA- RODRIGUEZ, J. K. B. **Produção de polihidroxicanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli***. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BOTHAST, R. J.; NICHOLS, N. N.; DIEN, D. S. Fermentations with new recombinant organisms. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 867-875, 1999.

BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J. G. C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. Nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93, 1990.

¹ De acordo com:

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

CARVALHO LIMA, K. G. **Fermentação de resíduos por *Escherichia coli* KO11: influência do inoculo, suplemento nutricional e neutralização do hidrolizado.** 2001. 122 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

CARVALHO, S.; SILVA, S. S.; COVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolysate. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 79, p. 165-169, 2002.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresour Technol.**, v. 98, p. 1947–1950, 2007.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 18, p. 295- 331, 1998.

CIRINO, P. C.; CHIN, J. W.; INGRAM, L. O. Engineering *Escherichia coli* for xylitol production from glucose-xylose mixtures. **Biotech. Bioeng.**, v. 95, p. 1167-1176, 2006.

DERRAIK, J. G. B. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 44, p. 842–852, 2002.

DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POTSMA, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, p. 939-1031, 2006.

DORAN-PETERSON, J.; COOK, D. M.; BRANDON, S. K. Microbial conversion of sugars from plant biomass to lactic acid or ethanol. **The Plant Journal**, v. 54, p. 582–592, 2008.

EPPLER, T.; BOOS, W. Glycerol-3-phosphate-mediated repression of malT in *Escherichia coli* does not require metabolism, depends on enzyme IIAGlc and is mediated by cAMP levels. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 1221-1231, 1999.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosichydrolysate by *Candida quilliermondii*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 251-254, 1997.

FLORES, N.; XIAO, J.; BERRY, A.; BOLIVAR, F.; VALLE, F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. **Nat. Biotechnol.** v. 14, p. 620-623, 1996.

FONSECA, G. G. **Análise de fluxos metabólicos em *Kluyveromyces marxianus* utilizando substratos marcados com ¹³C.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram- negative bactéria yelding polyhydroxyalkacoic acids from carbohydratis and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômero de cadeia media 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.; BUENO NETTO C. L., . Produção de poliésteres bacterianos In: AQUARONE L.; SCHMIDELL B. (Ed.). **Biotecnologia industrial:** processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001. vol. 3.

GONZALEZ, R.; TAO, H.; SHANMUGAM, K.T.; YORK, S.W.; INGRAM, L.O. Global Gene Expression Differences Associated with Changes in Glycolytic Flux and Growth Rate in *Escherichia coli* during the Fermentation of Glucose and Xylose. **Biotech.Prog.**, v. 18, n. 1, p. 6-20, 2002.

GÖRKE, B.; ESTÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Rev.**, v. 6, p. 613-624, 2008.

GOSSET, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. **Microb. Cell Fact.**, v. 4, p. 14-39, 2005.

GREGORY, M. R. Environmental implications of plastic debris in marine settings entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitch-hiking and alien invasions. **Philos. Trans. R. Soc. B.**, v. 364, p. 2013–2025, 2009.

GROHMANN, K. Simultaneous saccharification and fermen-tation of cellulosic substrates to ethanol. In: Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues. J. N. Saddler., ed., p. 183–209, 1993.

HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly (3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1- 34, 1995.

HAZER, B.; STAINBUHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoatos by modification reactions for industrial and medical applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 74, p. 1- 12, 2007.

HERNÁNDEZ-MONTALVO, V.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of sugar mixtures utilization by an *Escherichia coli* mutant devoid of the phosphotransferase system. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 57, p. 186-191, 2001.

HERNÁNDEZ-MONTALVO, V.; MARTINEZ, A.; HERNANDEZ-CHAVEZ, G.; BOLIVAR, F.; VALLE, F.; GOSSET, G. Expression of *galP* and *glk* in an *Escherichia*

coli PTS mutant restores glucose transport and increases glycolytic flux to fermentation products. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 83, p. 687–694, 2003.

HO, W.; WEGENR, CHOI, J.; LEE, S. MIDDELBERG, A. Metabolic analysis of poly (3- hydroxybutyrate) production by recombinant *E. coli*. **J Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, p. 593-603, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção agrícola municipal**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

INGRAM, L. O. et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnol. Prog.**, v. 15, p. 855-866, 1999.

KANG, H.; SONG, S.; PARK, C. Priority of pentose utilization at the level of transcription: arabinose, xylose, and ribose operons. **Molecules Cells**, v. 8, p. 318-323, 1998.

KENEALY, W. R.; HOUTMAN, C. J.; LAPLAZA, J.; JEFFRIES, T. W.; HORN, E. G. Pretreatments for converting wood into paper and chemicals. In: ARGYROPOULOS, D. S. (Ed.). **Materials, chemicals, and energy from forest biomass**. Washington, DC: American Chemical Society, 2007. p. 392–408.

KHANKAL, R.; CHIN, J. W.; GHOSH, D.; CIRINO, P. C. Transcriptional effects of *crp** expression in *Escherichia coli*. **Jornal of Biological Engineering**, 2009.

KIDWELL, J.; VALENTIN, H.; DENNIS, D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4. p. 1391-1398, 1995.

KOVACH, M.E.; ELZER, P.H.; HILL, D.S. **Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes**. *Gene*. v. 66, p. 175-176, 1995.

LAGARON, J .M. AND LOPEZ-RUBIO, A. Latest developments and future trends in food packaging and biopackaging. In: PASSOS, L. M.; RIBEIRO, C. P. (Ed.). **Innovation in food engineering new techniques and products**. CRC Press, 2010. p. 485-508.

LEE, S.; YIM, K. S.; CHANG, H. M.; CHANG, Y. K. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability and use of stable plasmids for the production of poly (3- hydroxybutyric acid) by recombinant *E. coli*. **J. Biotechnol.**, v. 32, p. 203- 211, 1994.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(hydroxyalkanoic acid). **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 52, p. 27–58, 1995.

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of γ -hydroxybutyric acid. **Bull. Soc.Chim. Biol.** v. 8, p. 770-782, 1926.

LI, R.; CHEN, Q.; WANG, P. G.; QI, Q. A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. **Appl Microbial. Biotechnol.**, v. 75, p. 1103-1109, 2007.

LOPES, M. S. G. **Construção de linhagens recombinantes para a produção de plástico biodegradável a partir do hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar.** Relatório. Processo FAPESP: 04/15369-0, 2009.

LOPES, M. S. G.; GOMEZ J. G. C.; SILVA L. F. Polyhydroxybutyrate production from *Burkholderia sacchari* with catabolite repression partially released. **J. Biotechnol.**, 2010 (enviado).

LOPES, M. S. G.; GOMEZ J. G. C.; SILVA L.F. Cloning and over-expression of xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate (PHB) from xylose, **Can. J. Microbiol.**, 2009.

LOPES, M. S. G. **Produção de plásticos biodegradáveis utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 131 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LU, J. N.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-review: biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). **Polym. Rev.** v. 49, p. 226–248, 2009.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**, ed.12, Artmed, 2010.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 1-9, 2009.

MARTIN, C.; GALBE, M.; WAHLBOM, C. F., HAHN-HÄGERDAL, B; JÖNSEN, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 274-282, 2002.

MEZA, E.; BECKER, J.; BOLIVAR, F.; GOSSET, G.; WITTMANN, C. Consequences of phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system and pyruvate kinase isozymes inactivation in central carbon metabolism flux distribution in *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 127, 2012.

MILLER, E. N.; JARBOE, L. R.; YOMANO, L. P.; YORK, S. W.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Silencing of NADPH-dependent oxidoreductase genes (yqhD and dkgA) in furfural-resistant ethanologenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 4315–4323, 2009.

MOE, S. T.; JANGA, K. K.; HERTZBERG, T.; HÄGG, M. B.; OYAAS, K.; DYRSET, N. Saccharification of lignocellulosic biomass for biofuel and biorefinery applications – A renaissance for the concentrated acid hydrolysis? Renewable Energy Research Conference (RERC2012). v. 20, p. 50- 58, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising Technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technol.**, v. 96, p. 673- 686, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresour Technol.**, v. 93, p. 1–10. 2004.

NICHOLS, N. N.; DIEN, B. S.; BOTHAST, R. J. Use of catabolite repression mutants for fermentation of sugar mixtures to ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 120-125, 2001.

NDUKO, J. M.; SUZUKI, W.; MATSUMOTO, K.; KOBAYASHI, H.; OOI, T.; FUKUOKA, A.; TAGUSHI, S. Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance to 5-hydroxymethylfurfural. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 113, p. 70-72, 2011.

NEIDHARDT, F. C.; CURTIS, R.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; RESNIKOFF, W. S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. *Escherichia coli* and *Salmonella*. Washington DC: ASM Press, 1996. vol. 2.

NIKEL, P. I.; ALMEIDA, A.; MELILLO, E. C.; GALVAGNO, M. A.; PETTINARI, M. J. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly (3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 3949-3954, 2006.

NONATO, R. V.; MANTELATO, P. E.; ROSSEL, C. E. V. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl. Biotechnol.**, v. 57, p. 1-5, 2001.

OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G. β -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism. **Biochem. J.**, v. 134, p. 239–248, 1973.

PABLOS, T. E.; SOTO, R.; MORA, E. M.; BORGNE, S. L.; RAMÍREZ, O. T.; GOSSET, G.; LARA, A. R. Enhanced production of plasmid DNA by engineered *Escherichia coli* strains. **Jornal of Biotechnology**, 2011.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 31, p. 20–31. 2011.

PATEL, M. K.; CRANK, M.; DORNBURG, V.; HERMANN, B. G.; ROES, A. L.; HUSING, B.; OVERBUK, L.; TERRAGNI, F.; RECCHIA, E. **Medium and long-term opportunities and risks of the biotechnological production of buck chemicals from renewable resouces**. Universiteit Utrecht, 2006.

PEREIRA, E.M. **Avaliação da influência de genes do catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *B. sacchari* e outras bactérias**. Doutorado, Biotecnologia USP, 113 p., 2007.

PÉREZ, J.; MUÑOZ- DOURADO, J.; RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicelluloses and lignin: an overview. **International Microbiology**, v. 5, p. 53-63, 2002.

PETERSEN, K.; NIELSEN, P. K.; BERTELSEN, G.; LAWOTHER, M.; OLSEN, M. B.; NILSSON, N. H. Potential of biobased materials for food packaging. **Trends in Food Science and Technology**, p. 10, p. 52-68, 1999.

PFEIFFER, T. et al. METATOOL: for studying metabolic networks. **Bioinformatics**, v. 15, p. 251-257, 1999.

PITT, F. D.; BOING, D.; BARROS, A. A. C. Desenvolvimento histórico, científico e tecnológico de polímeros sintéticos e de fontes renováveis. **Revista da Unifebe**, v. 9, 2011.

POSSATTO, F. E.; BARLETTA, M.; COSTA, M. F.; IVAR do SUL, J. A.; DANTAS, D. V. Plastic debris ingestion by marine catfish: An unexpected fisheries impact. **Elsevier**. v. 62. p. 1098- 1102, 2011.

REDDY, C. S. K.; GHAI, R.; RASHIMI, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresour Technol.**, v. 87, p. 137-146, 2003.

REGUERA, J.; LAGARON, J. M.; ALONSO, M.; REBOTO, V.; CALVO, B.; BOCANEGRA- RODRIGUEZ-CABELLO, J. C. Thermal behavior and kinetic analysis of the chain unfolding and refolding and of the concomitant nonpolar solvation and desolvation of two elastin- like polymers. **Macromolecules**, v. 36, p. 8470-8476, 2003.

RHEM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Applied and Industrial microbiology**. v. 8, p. 578- 592, 2010.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass-ester hydrochloric acid propanolysis. **J. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R. C. S.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. 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 J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 427-431, 2008.

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

SCHLEGEL, H. G.; LAFFERTY, R.; KRAUSS, I. The isolation of mutants not accumulating poly- β - hydroxybutyric acid. **Arch. Mikrobiol.**, v. 38, p. 209- 222.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. The regulation of poly-b-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochem. J.**, v. 134, p. 225–238, 1973.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cell. **Rev. Microbiol.**, v. 23, p. 117-122, 1992.

SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; MICHELIN, M. E. R.; CARTER, J. M.; PRADELLA, J. G. C.; GOMEZ, J. G. C. Poly-3-hydroxybutyrate (P3HB) production by bacteria from xilose, glucose and sugarcane bagasse hydrolysis. **Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 31, p. 245-254, 2004.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA, J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quim. Nova**, v. 30, p. 1732-1743, 2007.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 128, p. 219-228, 1995.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 1, p. 1-11, 1999.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.

TANAHASHI, M.; KARINA, M.; HIGUCHI, T. Degradation Mechanism of Lignin Accompanying Steam Explosion II. High-pressure steam treatment of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether. **Mokusai Gakkaishi**, v. 36, p. 380, 1990.

TIWARI, A.; RAMIREZ, A. M.; JAIN, R.; SAXENA, A. Green chemistry for the production of biodegradable polymers as solid substrate and the formation of sustainable biofilm. **Key Engineering Materials**, v. 517, p. 755-762, 2012.

THOMPSON, R. C.; MOORE, C. J.; VOM SAAL, F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. **Philos. Trans. R. Soc. B.**, v. 364, p. 2153-2166, 2009.

TOKIWA, Y.; UGWU, C. U. Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomer. **J. Biotechnol.**, v. 132, p. 264-272, 2007.

WANG, H.; ZHOU, X.; LIU, Q.; CHEN, G. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p. 1497-1507, 2011.

WANG, J.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; LIN, M.; LIN, Z. Global regulator engineering significantly improved *Escherichia coli* tolerances toward inhibitors of lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, 2012.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. vol. 56.

WYMAN, C. E. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuels needs. **California Agriculture**. v. 63, p. 185- 190, 2009.

YANCHAK, J. Enhancements in the profitability of PHA production. **Renewable Resources**, 2011.

XIA, T.; EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Simultaneous utilization of glucose, xylose and arabinose in the presence of acetate by a consortium of *Escherichia coli* strain. **Microbial. Cell Factories**, v. 11, 2012.

XING, Y.; BU, L. X.; WANG, K.; JIANG, J. X. Pretreatment of furfural residues with alkaline peroxide to improve cellulose hydrolyses. Characterization of isolated lignin. **Cellulose Chem. Technol.**, v. 46, p. 249-260. 2012.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng.**, v. 65, p. 24–33, 1999.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, p. 17-34, 2001.

ZHA, Y.; MUILWIJK, B.; COULIER, L.; PUNT, P. J. Inhibitory compounds in lignocellulosic biomass Hydrolydates during hydrolysate fermentation processes. **Bioproc. Biotechniq.**, v. 2, 2012.

ZINN, M. ; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Adv. Drug Deliv.Rev.**, v. 53, p. 5–21, 2001.

ANEXO A - Desenho dos iniciadores (CRP*)

> E. coli K12 CRP +/- 150bp

```
CTGCATGTATGCAAAGGACGTCACATTACCGTGCAGTACAGTTGATAGCCCCTTCCCAGGTAGC
GGGAAGCATATTTTCGGCAATCCAGAGACAGCGGCGTTATCTGGCTCTGGAGAAAGCTTATAACA
GAGGATAACCGCGCATGGTGCTTGGCAAACCGCAAACAGACCCGACTCTCGAATGGTTCTTGTC
TCATTGCCACATTCATAAGTACCCATCCAAGAGCACGCTTATTCACCAGGGTGAAAAAGCGGAA
ACGCTGTACTACATCGTTAAAGGCTCTGTGGCAGTGCTGATCAAAGACGAAGAGGGTAAAGAAA
TGATCCTCTCCTATCTGAATCAGGGTGATTTTATTGGCGAACTGGGCCTGTTTGAAGAGGGCCA
GGAACGTAGCGCATGGGTACGTGCGAAAACCGCCTGTGAAGTGGCTGAAATTTTCGTACAAAAA
TTTCGCCAATTGATTCAGGTAAACCCGGACATTCTGATGCGTTTGTCTGCACAGATGGCGCGTC
GTCTGCAAGTCACCTCAGAGAAAGTGGGCAACCTGGCGTTCCTCGACGTGACGGGCCGCATTGC
ACAGACTCTGCTGAATCTGGCAAAACAACCAGACGCTATGACTCACCCGGACGGTATGCAAATC
AAAATTACCCGTCAGGAAATTGGTCAGATTGTCGGCTGTTCTCGTGAAACCGTGGGACGCATTC
TGAAGATGCTGGAAGATCAGAACCTGATCTCCGCACACGGTAAACCATCGTCGTTTACGGCAC
TCGTTAATCCCGTCGGAGTGGCGCGTTACCTGGTAGCGCGCCCATTTTGTTCCTCCCGATGTGGC
GCAGACTGATTTATCACCCCGATATCAACTATGCACTTCGACAAACGCTGGTGCTATGTTTGCC
CGTGGCCGTTGGGTTAATGCTTGGCGAATTACGATTCGGTCTGCTCTTCTCCCTCGTTCCTGCC
TGTTGCAATATTGCGGGCCTTGATACGCCTCATAAACGTTT
```

>CRP1

SacII

CCGCGGCTTCCCAGGTAGCGGGAAGC

>CRP2

XhoI

CTCGAGCGCGCTACCAGGTAACGCGCC

>CRP1

CTTCCCAGGTAGCGGGAAGC

>CRP2

CGCGCTACCAGGTAACGCGCC

ANEXO B- Substituição que deveria ocorrer para obter transdutantes

De acordo com khankal *et al.*, 2009 as seqüências devem apresentar as seguintes substituições dos aminoácidos: I112L, T127I e A144T.

O seguinte resultado de seqüenciamento mostra as modificações no controle pela amplificação do gene *crp** da bactéria *E. coli* ET25.

```
> gb|EFZ50703.1|catabolite gene activator [Shigella sonnei 53G]
Length=210

Score = 355 bits (912), Expect = 1e-96
Identities = 180/184 (98%), Positives = 181/184 (98%), Gaps = 0/184 (0%)
Frame = -3

Query 553 LSHCHIHKYPSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELG 374
          LSHCHIHKYPSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELG
Sbjct 16 LSHCHIHKYPSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELG 75

Query 373 LFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDLMLRLSAQMARRLQVISEKVGNL 194
          LFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDLMLRLSAQMARRLQV SEKVGNL
Sbjct 76 LFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDLMLRLSAQMARRLQVISEKVGNL 135

Query 193 AFLDVTGRIQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILKMXEDQN 14
          AFLDVTGRI QTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILKM EDQN
Sbjct136 AFLDVTGRIQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILKMLEDN 195

Query13 LISA 2
          LISA
Sbjct196 LISA 199
```

Os transdutantes selecionados pelo teste TTC que haviam ficado vermelho não apresentaram as modificações exigidas.

W3110 *crp**

```
> ref|ZP\_07161146.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
ref|ZP\_07169157.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFJ66093.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFK17054.1|catabolite protein activator [Escherichia coli MS 116-1]
Length=210

Score = 281 bits (719), Expect = 2e-74
Identities = 144/145 (99%), Positives = 144/145 (99%), Gaps = 0/145 (0%)
Frame = -2

Query 435 AVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQ 256
          AVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQ
Sbjct 49 AVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQ 108

Query 255 VNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVGNL AFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKI 76
          VNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVGNL AFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKI
Sbjct 109 VNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVGNL AFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKI 168

Query 75 TRQEIGQIVGCSRETVGRILKMXED 1
          TRQEIGQIVGCSRETVGRILKM ED
Sbjct169 TRQEIGQIVGCSRETVGRILKMLED 193
```

VH32crp*

```

> ref|ZP\_07161146.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
ref|ZP\_07169157.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFJ66093.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFK17054.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
Length=210

Score = 249 bits (636), Expect = 1e-64
Identities = 127/128 (99%), Positives = 127/128 (99%), Gaps = 0/128 (0%)
Frame = -3

Query 384 ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ 205
          ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ
Sbjct 61 ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ 120

Query 204 MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQXVGCS 25
          MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQ VGCS
Sbjct 121 MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS 180

Query 24 RETVGRIL 1
      RETVGRIL
Sbjct181 RETVGRIL 188

```

ANEXO C- Ensaio de crescimento com transdutantes de E. coli W3110

ANEXO D- Sequenciamento dos possíveis transdutantes

Os transdutantes selecionados pelos $\mu_{\text{máx}}$ obtidos das curva de crescimento não apresentaram as modificações exigidas.

W3110crp*

```
> gb|AAZ80073.1 Crp variant [Escherichia coli LW1655F+]
Length=210

Score = 384 bits (986), Expect = 4e-105
Identities = 193/195 (99%), Positives = 193/195 (99%), Gaps = 0/195 (0%)
Frame = -1

Query 585 MVLGKPQTDPTLEWFLSHCHIHKYPSSKLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEM 406
          MVLGKPQTDPTLEWFLSHCHIHKYPSSK LIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEM
Sbjct 1 MVLGKPQTDPTLEWFLSHCHIHKYPSSKSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEM 60

Query 405 ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ 226
          ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ
Sbjct 61 ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ 120

Query 225 MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS 46
          MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS
Sbjct 121 MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS 180

Query 45 RETVGRILKRLEDQN 1
          RETVGRILK LEDQN
Sbjct181 RETVGRILKMLEDN 195
```

W3110crp*

```
> ref|AP\_004432.1 DNA-bindingtranscriptional dual regulator [Escherichia coli str. K-12 substr. W3110]
          dbj|BAE77933.1 DNA-bindingtranscriptional dual regulator [Escherichia coli str. K12 substr. W3110]
Length=210

Score = 282 bits (721), Expect = 1e-74
Identities = 144/145 (99%), Positives = 144/145 (99%), Gaps = 0/145 (0%)
Frame = -2

Query 436 TLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEI 257
          TLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEI
Sbjct 39 TLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEI 98

Query 256 SYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQMARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAM 77
          SYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQMARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAM
Sbjct 99 SYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQMARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAM 158

Query 76 THPDGMQIKITRQEIGQXVGCSRET 2
          THPDGMQIKITRQEIGQ VGCSRET
```


Sbjct159 THPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRET 183

W3110crp*

```
> ref|ZP\_07161146.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
ref|ZP\_07169157.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFJ66093.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFK17054.1|catabolite protein activator [Escherichia coli MS 116-1]
Length=210
```

Score = 365 bits (937), Expect = 2e-99
 Identities = 185/187 (99%), Positives = 185/187 (99%), Gaps = 0/187 (0%)
 Frame = -3

```
Query 563 SHCHIHKYPSPKSLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGL 384
SHCHIHKYPSPKS LIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGL
Sbjct 17 SHCHIHKYPSPKSTLIHQGEKAETLYYIVKGSVAVLIKDEEGKEMILSYLNQGDFIGELGL 76

Query 383 FEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVG NLA 204
FEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVG NLA
Sbjct 77 FEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMARRLQVTSEKVG NLA 136

Query 203 FLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILKXLEDQNL 24
FLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILK LEDQNL
Sbjct 137 FLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRETVGRILKMLEDQNL 196

Query 23 ISAHGKT 3
SAHGKT
Sbjct 197 ISAHGKT 203
```

W3110crp*

```
> ref|ZP\_07161146.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
ref|ZP\_07169157.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFJ66093.1|cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
gb|EFK17054.1|catabolite protein activator [Escherichia coli MS 116-1]
Length=210
```

Score = 240 bits (613), Expect = 5e-62
 Identities = 122/123 (99%), Positives = 122/123 (99%), Gaps = 0/123 (0%)
 Frame = -1

```
Query 371 SYLNQXDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMA 192
SYLNQ DFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMA
Sbjct 63 SYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDI MLRLSAQMA 122

Query 191 RRLQVTSEKVG NLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRE 12
RRLQVTSEKVG NLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRE
Sbjct 123 RRLQVTSEKVG NLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCSRE 182

Query 11 TVG 3
TVG
Sbjct 183 TVG 185
```

W3110crp*

> [ref|ZP_07161146.1|](#)cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 116-1]
[ref|ZP_07169157.1|](#)cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
[gb|EFJ66093.1|](#)cataboliteproteinactivator [Escherichia coli MS 175-1]
[gb|EFK17054.1|](#)catabolite protein activator [Escherichia coli MS 116-1]
Length=210

Score = 271 bits (693), Expect = 2e-71
Identities = 139/139 (100%), Positives = 139/139 (100%), Gaps = 0/139 (0%)
Frame = -2

Query	417	ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ	238
		ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ	
Sbjct	61	ILSYLNQGDFIGELGLFEEGQERSAWVRAKTACEVAEISYKKFRQLIQVNPDILMRLSAQ	120
Query	237	MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS	58
		MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS	
Sbjct	121	MARRLQVTSEKVGNLAFLDVTGRIAQTLLNLAKQPDAMTHPDGMQIKITRQEIGQIVGCS	180

Query	57	RETVGRILKMLEDQNLISA	1
		RETVGRILKMLEDQNLISA	
Sbjct	181	RETVGRILKMLEDQNLISA	199

ANEXO E- Avaliação do crescimento da cepa VH33 em diferentes tipos de suplementação

ANEXO F- ARQUIVO DE ENTRADA PARA O PROGRAMA METATOOL COM A LINHAGEM LFM 862

Arquivos de entrada metatool:

LFM 862

-ENZREV

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

XIL1 XIL2 XIL3 Galp EMP3 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6
CK7 CK8 CGLX1 CGLX2 GLN3 ACETATO2 ACETATO1 AD1 AD2 P3HB
BIOMASSA OXFAD OXNAD PRODFIN LACTATO CARBONO

-METINT

GLIext XILext LAC XIL XLL X5P G6P F6P F16P DHP G3P BPG13 PG3 PG2 PEP
PIR AcCoA CoASH NAD NADH PG6 NADP NADPH Rb15P Rb5P S7P E4P OAA
Cit IsoCit KG2 SucCoA Suc Fum Mal FAD FADH2 GLX AcP HB ACET XR

-METEXT

CC ADP ATP CO2 O PF

-CAT

CARBONO : $CC = 105 \text{ GLIext} + 89 \text{ XILext} + 12 \text{ LAC}$.

XIL1 : $\text{XILext} + \text{ATP} = \text{XIL} + \text{ADP}$.

XIL2 : $\text{XIL} = \text{XLL}$.

XIL3 : $\text{XLL} + \text{ATP} = \text{X5P} + \text{ADP}$.

Galp : $\text{GLIext} + 2 \text{ ATP} = \text{G6P} + 2 \text{ ADP}$.

EMP2 : $\text{G6P} = \text{F6P}$.

EMP3 : $\text{F6P} + \text{ATP} = \text{F16P} + \text{ADP}$.

EMP4 : $\text{F16P} = \text{G3P} + \text{DHP}$.

EMP5 : $\text{DHP} = \text{G3P}$.

EMP6 : $\text{G3P} + \text{NAD} = \text{BPG13} + \text{NADH}$.

EMP7 : $\text{BPG13} + \text{ADP} = \text{PG3} + \text{ATP}$.

EMP8 : $PG3 = PG2$.

EMP9 : $PG2 = PEP$.

EMP10 : $PEP + ADP = PIR + ATP$.

CPD : $PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO_2$.

VP1 : $G6P + NADP = PG6 + NADPH$.

VP5 : $PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO_2$.

VP6 : $Rb15P = Rb5P$.

VP7 : $Rb15P = X5P$.

VP8 : $Rb5P + X5P = S7P + G3P$.

VP9 : $G3P + S7P = E4P + F6P$.

VP10 : $X5P + E4P = F6P + G3P$.

CK1 : $OAA + AcCoA = Cit + CoASH$.

CK2 : $Cit = IsoCit$.

CK3 : $IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO_2$.

CK4 : $KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO_2$.

CK5 : $SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH$.

CK6 : $Suc + FAD = Fum + FADH_2$.

CK7 : $Fum = Mal$.

CK8 : $Mal + NAD = OAA + NADH$.

CGLX1 : $IsoCit = GLX + Suc$.

CGLX2 : $GLX + AcCoA = Mal + CoASH$.

GLN3 : $F16P = F6P$.

ACETATO1 : $AcCoA = AcP + CoASH$.

ACETATO2 : $AcP + ADP = ACET + ATP$.

LACTATO : $LAC + NAD = PIR + NADH$.

AD1 : $PIR + CO_2 + ATP = OAA + ADP$.

AD2 : $OAA + ATP = PEP + ADP + CO_2$.

P3HB : $2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP$.

BIOMASSA : $205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 1 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH$.

OXFAD : $FADH_2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP$.

OXNAD : $NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP$.

PRODFIN : 2388 HB + 12378 ACET + XR = PF .

ANEXO G - Arquivo de entrada para o programa *Metatool* com a linhagem LFM 863

Arquivo de entrada metatool:

LFM 863

-ENZREV

EMP2 EMP4 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

XIL1 XIL2 XIL3 EMP1 EMP3 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6
CK7 CK8 CGLX1 CGLX2 GLN3 ACETATO2 ACETATO1 AD1 AD2 P3HB
BIOMASSA OXFAD OXNAD PRODFIN LACTATO CARBONO

-METINT

GLIext XILext LAC XIL XLL X5P G6P F6P F16P DHP G3P BPG13 PG3 PG2 PEP
PIR AcCoA CoASH NAD NADH PG6 NADP NADPH Rb15P Rb5P S7P E4P OAA
Cit IsoCit KG2 SucCoA Suc Fum Mal FAD FADH2 GLX AcP HB ACET XR

-METEXT

CC ADP ATP CO2 O PF

-CAT

CARBONO : $CC = 105 \text{ GLIext} + 89 \text{ XILext} + 12 \text{ LAC}$.

XIL1 : $\text{XILext} + \text{ATP} = \text{XIL} + \text{ADP}$.

XIL2 : $\text{XIL} = \text{XLL}$.

XIL3 : $\text{XLL} + \text{ATP} = \text{X5P} + \text{ADP}$.

EMP1 : $\text{GLIext} + \text{ATP} = \text{G6P} + \text{ADP}$.

EMP2 : $\text{G6P} = \text{F6P}$.

EMP3 : $\text{F6P} + \text{ATP} = \text{F16P} + \text{ADP}$.

EMP4 : $\text{F16P} = \text{G3P} + \text{DHP}$.

EMP5 : $\text{DHP} = \text{G3P}$.

EMP6 : $\text{G3P} + \text{NAD} = \text{BPG13} + \text{NADH}$.

EMP7 : $\text{BPG13} + \text{ADP} = \text{PG3} + \text{ATP}$.

EMP8 : $PG3 = PG2$.

EMP9 : $PG2 = PEP$.

EMP10 : $PEP + ADP = PIR + ATP$.

CPD : $PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO_2$.

VP1 : $G6P + NADP = PG6 + NADPH$.

VP5 : $PG6 + NADP = NADPH + Rb15P + CO_2$.

VP6 : $Rb15P = Rb5P$.

VP7 : $Rb15P = X5P$.

VP8 : $Rb5P + X5P = S7P + G3P$.

VP9 : $G3P + S7P = E4P + F6P$.

VP10 : $X5P + E4P = F6P + G3P$.

CK1 : $OAA + AcCoA = Cit + CoASH$.

CK2 : $Cit = IsoCit$.

CK3 : $IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO_2$.

CK4 : $KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO_2$.

CK5 : $SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH$.

CK6 : $Suc + FAD = Fum + FADH_2$.

CK7 : $Fum = Mal$.

CK8 : $Mal + NAD = OAA + NADH$.

CGLX1 : $IsoCit = GLX + Suc$.

CGLX2 : $GLX + AcCoA = Mal + CoASH$.

GLN3 : $F16P = F6P$.

ACETATO1 : $AcCoA = AcP + CoASH$.

ACETATO2 : $AcP + ADP = ACET + ATP$.

LACTATO : $LAC + NAD = PIR + NADH$.

AD1 : $PIR + CO_2 + ATP = OAA + ADP$.

AD2 : $OAA + ATP = PEP + ADP + CO_2$.

P3HB : $2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP$.

BIOMASSA : $205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 1 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH$.

OXFAD : $FADH_2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP$.

OXNAD : $NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP$.

PRODFIN : 1370 HB + 11969 ACET + XR = PF .

ANEXO H – Modos elementares gerados pelo programa *Metatool* conforme os dados do ensaio com a linhagem W3110 pBBR1MCS5:*phaCAB*.

	XIL1	XIL2	XIL3	EMP1	EMP2	EMP3	EMP4	EMP5	EMP6	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10
3	0,09	0,09	0,09	0,02	0,02	0,08	0,08	0,08	0,20	0,20	0,20	0,20	0,40
4	0,18	0,18	0,18	0,04	0,04	0,16	0,16	0,16	0,37	0,37	0,35	0,35	0,35
5	0,17	0,17	0,17	0,04	0,04	0,15	0,15	0,15	0,35	0,35	0,34	0,34	0,34
6	0,31	0,31	0,31	0,07	-0,12	0,19	0,19	0,19	0,54	0,54	0,51	0,51	0,50
7	0,26	0,26	0,26	0,06	-0,09	0,17	0,17	0,17	0,46	0,46	0,44	0,44	0,43
8	7,30	7,30	7,30	1,71		5,84	5,84	5,84	14,55	14,55	14,28	14,28	23,35
9	174,92	174,92	174,92	40,84	-60,33	113,83	113,83	113,83	311,82	311,82	295,83	295,83	290,28
10	7,09	7,09	7,09	1,65		5,49	5,49	5,49	13,62	13,62	13,07	13,07	12,88
11	51,98	51,98	51,98	12,14	-18,10	33,64	33,64	33,64	92,25	92,25	87,29	87,29	85,57
12	7,47	7,47	7,47	1,74		5,80	5,80	5,80	14,40	14,40	13,86	13,86	13,67
NORMALISANDO													
	XIL1	XIL2	XIL3	EMP1	EMP2	EMP3	EMP4	EMP5	EMP6	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10
3	4,282687	4,282687	4,282687	1	1	3,855122	3,855122	3,855122	9,137805	9,137805	9,137805	9,137805	18,30035
4	4,282688	4,282688	4,282688	1	0,961212	3,666978	3,666978	3,666978	8,635002	8,635002	8,351932	8,351932	8,253731
5	4,282687	4,282687	4,282687	1	0,963378	3,677492	3,677492	3,677492	8,663093	8,663093	8,395836	8,395836	8,303123
6	4,282681	4,282681	4,282681	1	-1,627952	2,721976	2,721976	2,721976	7,542835	7,542835	7,127384	7,127384	6,983243
7	4,282686	4,282686	4,282686	1	-1,417924	2,812535	2,812535	2,812535	7,670311	7,670311	7,288052	7,288052	7,155445
8	4,282678	4,282678	4,282678	1	0	3,423929	3,423929	3,423929	8,53084	8,53084	8,372799	8,372799	13,69105
9	4,282675	4,282675	4,282675	1	-1,477051	2,787037	2,787037	2,787037	7,63442	7,63442	7,242833	7,242833	7,106975
10	4,282687	4,282687	4,282687	1	0	3,316157	3,316157	3,316157	8,229563	8,229563	7,897342	7,897342	7,782089
11	4,282679	4,282679	4,282679	1	-1,491522	2,771771	2,771771	2,771771	7,600372	7,600372	7,191896	7,191896	7,05019
12	4,282687	4,282687	4,282687	1	0	3,327568	3,327568	3,327568	8,261428	8,261428	7,947707	7,947707	7,838832

CPD	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6
0,40			0,03	-0,03	0,03	0,03	0,03	0,20	0,20				0,20
0,31			0,07	-0,07	0,06	0,06	0,06	0,16	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15
0,32			0,06	-0,06	0,06	0,06	0,05	0,16	0,16	0,14	0,13	0,13	0,15
0,39	0,18	0,18	0,18	0,01	0,16	0,16	0,15	0,02	0,02	0,02			
0,39	0,14	0,14	0,15	0,00	0,13	0,13	0,13	0,06	0,06	0,02			0,04
22,88	1,67	1,67	3,12	-1,45	2,96	2,96	2,89	9,87	9,87	0,19			9,68
251,85	98,98	98,98	98,98		89,39	89,39	85,53	33,03	33,03	11,54			21,49
10,82	1,58	1,58	3,15	-1,57	2,82	2,82	2,69	4,04	4,04	4,04	3,64	3,64	3,64
66,99	29,56	29,56	29,56		26,59	26,59	25,39	5,82	5,82	5,82	2,24	2,24	2,24
12,67	1,67	1,67	3,31	-1,64	2,98	2,98	2,85	4,88	4,88	3,83	3,43	3,43	4,48
CPD	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6
18,32509	0	0	1,427561	-1,427561	1,427561	1,427561	1,427561	9,162544	9,162544	0	0	0	9,162544
7,200119	0	0	1,563483	-1,563483	1,393755	1,393755	1,325447	3,707723	3,707723	3,707723	3,503553	3,503553	3,503553
7,821767	0	0	1,555888	-1,555888	1,395645	1,395645	1,331152	4,01253	4,01253	3,500543	3,307782	3,307782	3,81977
5,42532	2,571029	2,571029	2,484058	0,08697	2,234958	2,234958	2,134694	0,299647	0,299647	0,299647	0	0	0
6,456305	2,365542	2,365542	2,399627	-0,034076	2,17043	2,17043	2,078187	1,008	1,008	0,275699	0	0	0,732301
13,41637	0,978332	0,978332	1,82958	-0,851243	1,734791	1,734791	1,696639	5,789991	5,789991	0,114022	0	0	5,675967
6,16608	2,42339	2,42339	2,42339	0	2,18859	2,18859	2,094094	0,808589	0,808589	0,28244	0	0	0,526147
6,54126	0,954479	0,954479	1,905241	-0,950762	1,706047	1,706047	1,625878	2,4425	2,4425	2,4425	2,202886	2,202886	2,202886
5,518834	2,435548	2,435548	2,435548	0	2,190628	2,190628	2,092051	0,479235	0,479235	0,479235	0,184618	0,184618	0,184618
7,269385	0,957	0,957	1,897228	-0,940227	1,709087	1,709087	1,633373	2,797019	2,797019	2,195896	1,969586	1,969586	2,570709

CK7	CK8	CGLX1	CGLX2	ACETATO1	ACETATO2	AD1	AD2	P3HB	BIOMASSA	OXFAD	OXNAD
0,20	0,40	0,20	0,20				0,20			0,20	1,00
0,15	0,15			0,10	0,10	0,02		0,01	0,00	0,15	1,00
0,15	0,17	0,02	0,02	0,09	0,09			0,01	0,00	0,15	1,00
				0,24	0,24	0,06		0,03	0,00		1,00
0,04	0,09	0,04	0,04	0,19	0,19			0,02	0,00	0,04	1,00
9,68	19,36	9,68	9,68	2,16	2,16		9,16	0,25	0,00	9,68	57,47
21,49	42,98	21,49	21,49	127,97	127,97			14,65	0,01	21,49	645,58
3,64	3,64			4,40	4,40	9,15		0,50	0,00	3,64	33,07
2,24	2,24			39,67	39,67	1,05		4,54	0,00	2,24	175,78
4,48	5,53	1,05	1,05	4,38	4,38	9,50		0,50	0,00	4,48	37,38
CK7	CK8	CGLX1	CGLX2	ACETATO1	ACETATO2	AD1	AD2	P3HB	BIOMASSA	OXFAD	OXNAD
9,162544	18,32509	9,162544	9,162544	0	0	0	9,162543522	0	0	9,16254352	45,8127176
3,503553	3,503553	0	0	2,26474486	2,26474486	0,542296801	0	0,25922753	0,00018922	3,50355308	23,538107
3,81977	4,331757	0,511995	0,511995	2,13819373	2,13819373	0	0	0,24474258	0,00017864	3,81976972	24,7827789
0	0	0	0	3,32389358	3,32389358	0,795913974	0	0,38046082	0,00027771	0	13,9779205
0,732301	1,464603	0,732301	0,732301	3,05823767	3,05823767	0	0	0,35005386	0,00025551	0,73230135	16,5222621
5,675967	11,35193	5,675967	5,675967	1,26481592	1,26481592	0	5,373104395	0,14477382	0,00010567	5,6759673	33,6987908
0,526147	1,052296	0,526147	0,526147	3,13303513	3,13303513	0	0	0,35861238	0,00026176	0,52614698	15,8060038
2,202886	2,202886	0	0	2,65795167	2,65795167	5,530919486	0	0,30423541	0,00022207	2,20288646	19,9889401
0,184618	0,184618	0	0	3,26807988	3,26807988	0,086760368	0	0,37407273	0,00027305	0,1846183	14,4817018
2,570709	3,171832	0,601123	0,601123	2,5104086	2,5104086	5,448622416	0	0,28734734	0,00020974	2,57070907	21,4409128

PRODFIN	LACTATO	CARBONO
	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,00	0,00
0,00	0,04	0,01
0,01	1,01	0,14
0,00	0,04	0,01
0,00	0,30	0,04
0,00	0,04	0,01

PRODFIN	LACTATO	CARBONO
0	0,02473497	0,00353357
0,00018922	0,02473502	0,00353356
0,00017864	0,02473497	0,00353358
0,00027771	0,02473491	0,00353356
0,00025551	0,02473498	0,00353357
0,00010567	0,02473494	0,00353356
0,00026176	0,02473503	0,00353356
0,00022207	0,02473498	0,00353357
0,00027305	0,02473496	0,00353356
0,00020974	0,02473501	0,00353357

ANEXO I - Modos elementares gerados pelo programa *Metatool* conforme os dados do ensaio com a linhagem VH33 pBBR1MCS5:*phaCAB*.

	XIL1	XIL2	XIL3	Galp	EMP2	EMP3	EMP4	EMP5	EMP6	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10)
3	0,048065	0,048065	0,048065	0,056706	0,056706	0,088749	0,088749	0,088749	0,193519	0,193519	0,193519	0,193519	0,393519
4	0,093504	0,093504	0,093504	0,110313	0,108776	0,165193	0,165193	0,165193	0,356539	0,356539	0,345321	0,345321	0,34143
5	0,089095	0,089095	0,089095	0,105112	0,103724	0,157776	0,157776	0,157776	0,340722	0,340722	0,330592	0,330592	0,327078
6	0,154962	0,154962	0,154962	0,18282	0,002243	0,209167	0,209167	0,209167	0,516835	0,516835	0,489745	0,489745	0,480347
7	0,132938	0,132938	0,132938	0,156837	0,013464	0,184358	0,184358	0,184358	0,450222	0,450222	0,428714	0,428714	0,421252
8	6,41073	6,41073	6,41073	7,56322	3,88477	10,2693	10,2693	10,2693	23,6298	23,6298	23,078	23,078	35,3697
9	5,46813	5,46813	5,46813	6,45116	3,01786	8,44728	8,44728	8,44728	19,4599	19,4599	18,6442	18,6442	18,3613
10	5,98855	5,98855	5,98855	7,06514	3,34653	9,29497	9,29497	9,29497	21,4094	21,4094	20,5645	20,5645	20,2714
normalizando													
	XIL1	XIL2	XIL3	Galp	EMP2	EMP3	EMP4	EMP5	EMP6	EMP7	EMP8	EMP9	EMP10)
3	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	1,0000	1,5651	1,5651	1,5651	3,4127	3,4127	3,4127	3,4127	6,9397
4	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,9861	1,4975	1,4975	1,4975	3,2321	3,2321	3,1304	3,1304	3,0951
5	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,9868	1,5010	1,5010	1,5010	3,2415	3,2415	3,1451	3,1451	3,1117
6	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,0123	1,1441	1,1441	1,1441	2,8270	2,8270	2,6788	2,6788	2,6274
7	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,0858	1,1755	1,1755	1,1755	2,8706	2,8706	2,7335	2,7335	2,6859
8	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,5136	1,3578	1,3578	1,3578	3,1243	3,1243	3,0513	3,0513	4,6765
9	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,4678	1,3094	1,3094	1,3094	3,0165	3,0165	2,8901	2,8901	2,8462
10	0,8476	0,8476	0,8476	1,0000	0,4737	1,3156	1,3156	1,3156	3,0303	3,0303	2,9107	2,9107	2,8692

CPD	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6
0,4			0,016022	-0,01602	0,016022	0,016022	0,016022	0,2	0,2				0,2
0,311303			0,036554	-0,03655	0,029828	0,029828	0,027121	0,154568	0,154568	0,154568	0,146477	0,146477	0,146477
0,319909			0,034562	-0,03456	0,028489	0,028489	0,026044	0,158976	0,158976	0,13957	0,132264	0,132264	0,15167
0,398041	0,176865	0,176865	0,123617	0,053248	0,107373	0,107373	0,100836	0,019539	0,019539	0,019539			
0,398444	0,140425	0,140425	0,101449	0,038976	0,088552	0,088552	0,083362	0,056719	0,056719	0,015513			0,041206
35,189	3,60283	3,60283	3,60283		3,27195	3,27195	3,13878	13,9384	13,9384	0,398019			13,5404
15,9914	3,32153	3,32153	3,32153		2,83247	2,83247	2,63565	4,59539	4,59539	4,59539	4,0071	4,0071	4,0071
19,4788	3,60283	3,60283	3,60283		3,09622	3,09622	2,89233	6,05495	6,05495	4,43627	3,82687	3,82687	5,44555
CPD	VP1	VP5	VP6	VP7	VP8	VP9	VP10	CK1	CK2	CK3	CK4	CK5	CK6
7,0540	0,0000	0,0000	0,2825	-0,2825	0,2825	0,2825	0,2825	3,5270	3,5270	0,0000	0,0000	0,0000	3,5270
2,8220	0,0000	0,0000	0,3314	-0,3314	0,2704	0,2704	0,2459	1,4012	1,4012	1,4012	1,3278	1,3278	1,3278
3,0435	0,0000	0,0000	0,3288	-0,3288	0,2710	0,2710	0,2478	1,5124	1,5124	1,3278	1,2583	1,2583	1,4429
2,1772	0,9674	0,9674	0,6762	0,2913	0,5873	0,5873	0,5516	0,1069	0,1069	0,1069	0,0000	0,0000	0,0000
2,5405	0,8954	0,8954	0,6468	0,2485	0,5646	0,5646	0,5315	0,3616	0,3616	0,0989	0,0000	0,0000	0,2627
4,6526	0,4764	0,4764	0,4764	0,0000	0,4326	0,4326	0,4150	1,8429	1,8429	0,0526	0,0000	0,0000	1,7903
2,4788	0,5149	0,5149	0,5149	0,0000	0,4391	0,4391	0,4086	0,7123	0,7123	0,7123	0,6211	0,6211	0,6211
2,7570	0,5099	0,5099	0,5099	0,0000	0,4382	0,4382	0,4094	0,8570	0,8570	0,6279	0,5417	0,5417	0,7708

CK7	CK8)	CGLX1	CGLX2	ACET1	ACET2	AD1	AD2	P3HB	BIOMASSA	OXFAD	OXNAD	PRODFIN	LACTATO
0,2	0,4	0,2	0,2				0,2			0,2	1		0,006481
0,146477	0,146477			0,092817	0,092817	0,021491		0,017907	7,50E-06	0,146477	1	7,50E-06	0,012607
0,15167	0,171076	0,019406	0,019406	0,083811	0,083811			0,016169	6,77E-06	0,15167	1	6,77E-06	0,012013
				0,224146	0,224146	0,051899		0,043243	1,81E-05		1	1,81E-05	0,020894
0,041206	0,082412	0,041206	0,041206	0,177965	0,177965			0,034334	1,44E-05	0,041206	1	1,44E-05	0,017924
13,5404	27,0807	13,5404	13,5404	4,56597	4,56597		12,4831	0,88088	0,0003689	13,5404	88,0723	0,00036888	0,864368
4,0071	4,0071			6,74863	6,74863	1,56258		1,30196	0,0005452	4,0071	46,1366	0,00054521	0,737275
5,44555	7,06422	1,61868	1,61868	6,99092	6,99092			1,34871	0,0005648	5,44555	54,59	0,00056479	0,807444
CK7	CK8)	CGLX1	CGLX2	ACET1	ACET2	AD1	AD2	P3HB	BIOMASSA	OXFAD	OXNAD	PRODFIN	LACTATO
3,5270	7,0540	3,5270	3,5270	0,0000	0,0000	0,0000	3,5270	0,0000	0,00000000	3,5270	17,6349	0,000000000	0,1143
1,3278	1,3278	0,0000	0,0000	0,8414	0,8414	0,1948	0,0000	0,1623	0,00006798	1,3278	9,0651	0,000067975	0,1143
1,4429	1,6276	0,1846	0,1846	0,7974	0,7974	0,0000	0,0000	0,1538	0,00006442	1,4429	9,5137	0,000064417	0,1143
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,2260	1,2260	0,2839	0,0000	0,2365	0,00009905	0,0000	5,4699	0,000099050	0,1143
0,2627	0,5255	0,2627	0,2627	1,1347	1,1347	0,0000	0,0000	0,2189	0,00009167	0,2627	6,3760	0,000091672	0,1143
1,7903	3,5806	1,7903	1,7903	0,6037	0,6037	0,0000	1,6505	0,1165	0,00004877	1,7903	11,6448	0,000048773	0,1143
0,6211	0,6211	0,0000	0,0000	1,0461	1,0461	0,2422	0,0000	0,2018	0,00008451	0,6211	7,1517	0,000084514	0,1143
0,7708	0,9999	0,2291	0,2291	0,9895	0,9895	0,0000	0,0000	0,1909	0,00007994	0,7708	7,7267	0,000079940	0,1143