

ALINE CAROLINA DA COSTA LEMOS

**IDENTIFICAÇÃO EM BASES MOLECULARES DE GENES DE
Burkholderia sacchari ENVOLVIDOS NO CATABOLISMO DE
PROPIONATO VIA α -OXIDAÇÃO**

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

São Paulo
2017

ALINE CAROLINA DA COSTA LEMOS

Identificação em bases moleculares de genes de *Burkholderia sacchari* envolvidos no catabolismo de propionato via da α -oxidação.

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

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

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Lemos, Aline Carolina da Costa
Identificação em bases moleculares de genes de
Burkholderia sacchari envolvidos no catabolismo de
propionato via da alfa-oxidação. / Aline Carolina da
Costa Lemos; orientadora Luiziana Ferreira da
Silva. -- São Paulo, 2017.
111 p.

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

1. Burkholderia sacchari. 2. metabolismo
propionato. 3. alfa-oxidação no consumo de
propionato. 4. copolímero P3HB-co-3HV. 5.
polihidroxialcanoato. I. da Silva, Luiziana
Ferreira , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Aline Carolina da Costa Lemos

Título da Dissertação/Tese: Identificação em bases moleculares de genes de *Burkholderia sacchari* envolvidos no catabolismo de propionato via da α -oxidação.

Orientador: Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail cep@icb.usp.br

Decl. CEP SH.005.2017

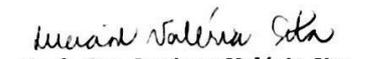
DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção CEP-ICB nº 701/2014, de 13/11/2014, e por solicitação da Profa. Dra. *Luiziana Ferreira da Silva*, do departamento de Microbiologia, informo que o título do projeto da aluna *Aline Carolina da Costa Lemos* foi alterado para "**Identificação em bases moleculares de genes *Burkholderia sacchari* envolvidos na catabolismo de propionato via α -oxidação**". O projeto não sofreu nenhuma modificação, somente o título para melhorar a compreensão do texto.

São Paulo, 31 de março de 2017.



Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora 3 CEP SH-ICB/USP



Prof. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Vice-coordenadora CEUA-ICB/USP

Aos meus pais,

Sem o apoio e o amor não seria possível chegar até aqui.

Ao Paulo,

Meu amor, que me compreende e incentiva em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

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

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

À Doutora Thatiane Mendonça pelos ensinamentos, amizade, companhia e sugestões.

Ao Mestre Edmar Ramos de Oliveira pela amizade e grande ajuda nos experimentos.

A todos os colegas de trabalho pela ajuda e compreensão em todos os momentos.

Aos amigos que o Laboratório de Bioprodutos me trouxe, em especial Aelson Luis dos Santos, Marilda Keico Taciro, Thandara Ravelli, Gabriela Sakalauskas, Jhoanne Hansen, Amanda Flora, Felipe Morillo, Henrique Oliveira e Kaique Josuel.

Aos meus pais, Everton e Romilda, que em sua simplicidade sempre demonstraram o valor do conhecimento e do caráter, que sempre fizeram de tudo, com muita perseverança e dedicação, para que eu pudesse estudar e chegar até aqui.

Ao meu marido Paulo, grande incentivador e cúmplice dos meus sonhos, que teve a calma e paciência necessária para que eu concluísse este projeto, juntamente com a chegada de nossa tão amada primogênita Luíza, que alegrará ainda mais nossos dias.

Ao meu irmão Alan, pelo apoio incondicional nas minhas escolhas.

Aos familiares e amigos que me apoiaram em todos os momentos bons e ruins deste projeto.

Ao departamento de Microbiologia pelo apoio durante minha dupla jornada como mestranda e funcionária.

A Deus, pelas oportunidades em minha vida e pelas vidas que cruzaram com a minha, me moldando para chegar até aqui.

Resumo

LEMOS, A.C.C. **Identificação em bases moleculares da via da α -oxidação no consumo de propionato em *Burkholderia sacchari***. 2017. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Burkholderia sacchari, metabolismo do propionato, alfa-oxidação de propionato, copolímero P3HB-co-3HV, polihidroxicanoato.

Burkholderia sacchari é uma espécie de bactéria descrita em 2001, isolada nos anos 90, de solo de canavial em São Paulo, capaz de acumular polihidroxicanoatos (PHA). A partir do substrato sacarose, acumula o homopolímero poli-3-hidroxi-butarato (P3HB), poliéster biodegradável de propriedades semelhantes às dos plásticos de origem petroquímica. Esta bactéria é capaz de produzir diferentes tipos de copolímeros, quando suprida com fontes de carbono variadas de acordo com o co-substrato fornecido. Utilizando-se sacarose e ácido propiônico como fontes de carbono, a bactéria é capaz de acumular o copolímero poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV), que é mais maleável que o P3HB, apresentando, portanto, uma maior variedade de aplicações. No entanto, apenas uma pequena porcentagem do ácido propiônico fornecido é convertida em unidades 3HV. Isto se deve à presença de vias de catabolismo deste ácido muito eficientes e que o transformam preferencialmente em biomassa, CO₂ e água, reduzindo a eficiência na produção do copolímero biodegradável. Estudos em mutantes UV prp⁻, indicaram que pelo menos duas vias de catabolismo de propionato podem atuar em *B. sacchari*: a via da α -oxidação e o ciclo de 2-metilcitrato (2MCC). A presença dos genes e a funcionalidade do 2MCC foi constatada, entretanto a α -oxidação permaneceu sem comprovação. Alguns dos mutantes prp⁻ afetados no consumo de intermediários da α -oxidação foram complementados com a inserção de fragmentos, obtidos de uma biblioteca genômica de *B. sacchari* os quais, após sequenciamento e comparação do banco de dados BLASTX, verificou-se codificarem um regulador transcricional LysR. A análise dos genes adjacentes, em genomas de outras bactérias, sugeriu que poderiam compor um operon de uma possível via de α -oxidação. A partir desses dados, este trabalho buscou evidências adicionais para a comprovação molecular da presença e atuação da via da α -oxidação para o catabolismo de propionato em *B. sacchari*. Foi feita uma busca *in silico* por genes adjacentes à região similar a lysR, a partir do draft do genoma da bactéria, recém-publicado, avaliando-se sua organização, comparando-a com uma busca realizada em *Ralstonia eutropha* H16, uma bactéria de referência, também produtora de copolímero (P3HB-co-3HV). Foi observada a organização na forma de um operon contendo três genes acil CoA desidrogenase, CoA transferase/L-carnitina desidratase e transportador MFS, de maneira semelhante a encontrada em *B. sacchari*. A detecção deste possível operon *in silico* permitiu a clonagem desses genes para expressão nos mutantes UV prp⁻ de *B. sacchari*, para corroborar o seu papel no catabolismo de propionato, pela demonstração de sua capacidade de restituir o fenótipo selvagem a mutantes prp⁻ afetados no consumo de intermediários de uma possível α -oxidação de propionato. Esta complementação fenotípica foi confirmada qualitativamente pela demonstração

do crescimento em meio mineral sólido contendo propionato como única fonte de carbono. A comprovação quantitativa foi obtida por meio de experimentos de acúmulo do copolímero em frascos agitados, tendo-se observado que, aos mutantes complementados com genes do operon detectado, foi restituído o valor de eficiência de conversão de propionato a unidades 3HV observada para a linhagem selvagem ($Y_{3HV/prp}$). Assim, uma vez demonstrado que genes deste operon exercem um papel na α -oxidação de propionato, foram testadas diferentes ferramentas e estratégias para a construção de mutantes especificamente inativados nas regiões deste operon, com o objetivo de se verificar a possibilidade de obter clones capazes de atingir o valor máximo teórico ($Y_{3HV/prp} = 1,35 \text{ g/g}$) por inativação de genes chave do 2MCC e da α -oxidação. Foram testadas técnicas para obtenção de mutantes sitio dirigidos, empregando três plasmídeos suicidas e o sistema de recombinação sitio dirigida CRISPR. As vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas são discutidas ao longo deste projeto.

Abstract

LEMOS, A.C.C. **Identification on a molecular basis of the α -oxidation pathway in the consumption of propionate in *Burkholderia sacchari*.** 2017. 83 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Burkholderia sacchari. Pathway propionate. Alfa-oxidation of propionate. Copolymer P3HB-co-3HV. Polyhydroxyalkanoate.

Burkholderia sacchari is a species of bacteria described in 2001, isolated in the 1990s, from sugarcane fields in São Paulo, capable of accumulating polyhydroxyalkanoates (PHA). From sucrose, it accumulates the homopolymer poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), a biodegradable polyester with properties similar to those of petrochemical plastics. This bacterium is capable of producing different types of copolymers when supplied with varying carbon sources according to the supplied co-substrate. Using sucrose and propionic acid as carbon sources, the bacterium is able to accumulate the poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) copolymer, which is more malleable than P3HB, presenting, therefore, a greater variety of applications. However, only a small percentage of the supplied propionic acid is converted into 3HV units. This is due to the presence of very efficient catabolic pathways that preferentially transform propionate into biomass, CO₂ and water, reducing the efficiency in the production of 3HV. Studies on *prp*- UV mutants have indicated that at least two pathways of propionate catabolism may act on *B. sacchari*: the α -oxidation pathway and the 2-methylcitrate cycle (2MCC). The presence of the genes and the functionality of 2MCC were observed, however the α -oxidation remained unproven. Some of the mutants *prp*- affected in the consumption of α -oxidation intermediates were complemented with the insertion of fragments obtained from a *B. sacchari* genomic library which, after sequencing and comparison of the BLASTX database, were found to encode a regulator transcriptional *lysR*. Analysis of the adjacent genes in genomes of other bacteria suggested that they could compose an operon of a possible α -oxidation pathway. From this data, this work searched for additional molecular evidence of the presence and performance of the α -oxidation pathway on propionate catabolism in *B. sacchari*. A search *in silico* in the *B. sacchari* draft-genome, for genes neighboring the region similar to *lysR*, detected a putative operon. Its organization was evaluated and compared to a similar search in *Ralstonia eutropha* H16 genome, a reference PHA –producing strain. A typical operon organization was observed in which three genes were organized, annotated as encoding for acyl CoA dehydrogenase, CoA transferase/L-carnitine dehydratase and a major facilitator superfamily transporter (MFS). The detection of this possible operon *in silico* permitted the cloning of these genes for expression in the *B. sacchari* *prp*- UV mutant to corroborate their role in propionate catabolism by demonstrating their ability to restore the wild-type phenotype to *prp*- mutants affected in the consumption of intermediates of a possible α -oxidation of propionate. This phenotypic complementation was confirmed qualitatively by the demonstration of growth in solid mineral medium containing propionate as the only carbon source. The quantitative confirmation was obtained by experiments of

copolymer accumulation in shaken flasks. For mutants complemented with genes of the detected operon, the value of conversion efficiency of propionate to 3HV units observed for the wild strain ($Y_{3HV / prp}$) was restored. Thus, once demonstrated that genes of this operon play a role in the α -oxidation of propionate, different tools and strategies were tested for the construction of mutants specifically inactivated in specific regions of this operon, in order to verify the possibility of obtaining clones capable of reaching the theoretical maximum value ($Y_{3HV / prp} = 1.35 \text{ g / g}$) by inactivation of key genes of 2MCC and α -oxidation. Techniques for site-directed mutation tested applied tree suicide vector and the CRISPR system. As advantages and drawbacks of each of the techniques are discussed throughout this project.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias de formação do copolímero de poli-3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-<i>valerato</i></i> (P3HB-co-3HV).	24
Figura 2- Possíveis vias para oxidação do propionato: a α -oxidação, b β -oxidação, c α -carboxilação, d carboxilação redutiva, e e – g condensação de Claisen (TEXTOR, 1997) ..	26
Figura 3- Via proposta para catabolismo de propionato para <i>S. propionica</i> (BOK ET AL., 2001).....	27
Figura 4 - Esquema de regulação transcricional do <i>LysR</i> (MADDOCK, 2008).....	29
Figura 5 - Correlação entre sequência de DNA estudada por Cintra, 2008 e via da α -oxidação do propionato.	30
Figura 6 Esquema geral do cultivo para acúmulo em meio mineral com glicose e co-substrato (Mendonça, 2014).....	37
Figura 7 - Recombinação homóloga com plasmídeo suicida contendo duas regiões de similaridade no genoma (região A e B) com dois eventos de recombinação (Sung et al, 2009).....	39
Figura 8 - Recombinação homóloga com plasmídeo suicida contendo uma região de similaridade no genoma, com um evento de recombinação (ALEXEYEV, 1999).....	40
Figura 9 - Regiões amplificadas para construção de cassete de deleção do pNPTS138 e pEX18Ap.....	41
Figura 10 Região amplificada para construção do cassete de deleção do pKNOCK.....	42
Figura 11 Plasmídeos suicidas construídos para deleção <i>sitio dirigida</i>	45
Figura 12 - Esquema do experimento de conjugação para a obtenção de um mutante <i>sitio dirigido</i> de <i>B. sacchari</i>	46
Figura 13 - Esquema de conjugação na placa de LB.	47
Figura 14 Braços de homologia construídos logo após as regiões de corte (PAM) para o sistema de deleção CRISPR-Cas.....	49
Figura 15 Sequências de gDNA e scaffold sintetizadas.....	50
Figura 16 - Esquema do experimento para obtenção de mutantes CRISPR-Cas no qual a sequência alvo de gDNA inserida no plasmídeo pCRISPR e os DNA molde para recombinação são inseridos na bactéria que já contém o gene <i>Cas9</i>	52
Figura 17 - Sequência do regulador transcricional <i>lysR</i> utilizada para pesquisa no genoma de <i>B. sacchari</i>	53
Figura 18 – Operon identificado no genoma de <i>B. sacchari</i>	54
Figura 19 - Reações possivelmente catalisadas pela CoA transferase/L-carnitina desidratase.....	55
Figura 20 - Anotação do operon α -oxidação do propionato no genoma de <i>B. sacchari</i>	55
Figura 21 - Metabolismo do propionato em <i>B. sacchari</i> com destaque para genes já anotados em seu genoma (RAST).	56
Figura 22 - Pesquisa de fragmento codificador de acil- CoA desidrogenase em <i>Ralstonia eutropha</i> H16. Houve alinhamento desta região e os genes adjacentes estão na orientação e sinalizados da mesma maneira que na via da α -oxidação em <i>B. sacchari</i> . As sequências anotadas como H16_RS19155 corresponde ao gene <i>lysR</i> , H16_RS19160 a codificador de acil CoA desidrogenase, H16_RS19165 ao de CoA-transferase e H16_RS19170 ao do transportador.....	58
Figura 23 –Gel A: as figuras representam as bandas de fragmentos de DNA com o tamanho aproximado. Gel A: Produto de PCR 1: marcador de peso molecular 1kb, 2: <i>LysR</i> (1074pb); 3: <i>LysR+acil CoA desid.</i> (2861); Gel B: 1: marcador de peso molecular 1kb; 2: <i>LysR+acil CoA desid.+CoA transferase./L-Carnitina desidratase</i> (4200pb); 3: <i>LysR+acil CoA+ CoA transferase./L-Carnitina desidratase+ transportador MFS</i>	64

Figura 24 –Gel de eletroforese mostrando a migração de plasmídeos portando os insertos linearizados após digestão com a enzima HindIII. 1: Marcador 1kb, 2: pBBR1 MCS2 (5144pb), 3: pBBR1 MCS2::ACL1 (6218kb), 4: pBBR1 MCS2::ACL2 (8005pb), 5: pBBR1 MCS2:: ACL3 (9344pb), 6: pBBR1 MCS2:: ACL4 (10690pb).....	65
Figura 25 –Regiões genômicas de <i>B. sacchari</i> , propostas como envolvidas no catabolismo de propionato, foram inseridas em mutantes <i>prp</i> e a capacidade de restituir o fenótipo <i>prp+</i> (crescimento em propionato) em meio mineral (MM) a estes mutantes está aqui apresentada. Wt - LFM 101 pBBR1 MCS-2, 1 - LFM 177 pBBR1 MCS-2, 2 - LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL1, 3 - LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL2, 4 -LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL3, 5 -LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL4, 6 -LFM 186 pBBR1 MCS-2, 7 -LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL1, 8 - LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL2, 9 - LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL3, 10 - LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL4, 11 - LFM 198 pBBR1 MCS-2, 12 - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL1, 13 - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL2, 14 - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL3, 15 - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL4. MM (meio mineral) contendo sacarose ou propionato como única fonte de carbono foi utilizado. As regiões e suas respectivas codificações são: ACL1: regulador transcricional <i>lysR</i> .; ACL2 regulador transcricional <i>LysR</i> , juntamente com a acil CoA desidrogenase; ACL3: regulador transcricional <i>lysR</i> , acil CoA desidrogenase e CoA-transferase/L-carnitina desidratase.e ACL4: operon por completo.....	67
Figura 26 – Organização do operon envolvidos na via da α -oxidação.....	72
Figura 27 - Posição dos fragmentos <i>lysR del</i> e acil CoA <i>del</i> clonados para construção do cassete de deleção e possíveis regiões de interação com outras moléculas (domínio de ligação de substrato e promotores) e sítios ativos (domínio C terminal) que devem ser retirados após recombinação.	73
Figura 28 - Recombinação do plasmídeo suicida pNTPS138:: α -oxdel	74
Figura 29 - Gel de eletroforese do PCR de colônia que buscava mutantes sitio dirigidos após o segundo evento de recombinação. Controle positivo foi a amplificação do cassete de deleção presente no plasmídeo.....	76
Figura 30 – Gel de eletroforese PCR de colônia de clones carbenicilina resistentes do primeiro evento de recombinação. A- Amplificação de fragmento do gene <i>lysR</i> contendo fragmento similar para recombinar com uma parte do cassete de deleção (aproximadamente 900 pb); B- Amplificação do gene acil CoA desidrogenase (aproximadamente 1770 pb), que contém um uma zona similar para recombinar com uma parte do cassete de deleção; C+ (controle positivo); C- controle negativo.....	77
Figura 31 - Sequência do gene <i>sacB</i> presente em <i>B. mallei</i> ATCC 23344 utilizado para pesquisa no genoma de <i>B. sacchari</i>	78
Figura 32 - Esquema de recombinação do plasmídeo pKNOCK.....	81
Figura 33 - Gel de eletroforese do produto de PCR de 879pb do inserto clonado no pKNOCK.	82
Figura 34 – Esquema de transformação com CRISPR. Ilustrando as regiões utilizadas para construção dos braços homólogos, delimitados pelos iniciadores em destaque e DNA guias nomeados na figura como guide 1 e guide 2.	84
Figura 35 - Gel de eletroforese demonstrando a amplificação dos braços de similaridade (aproximadamente 1600 pb) (DNA molde).	84
Figura 36 - Gel de eletroforese com colônias obtidas no experimento de obtenção de mutantes sitio dirigido CRISPR-Cas. C+ (DNA de linhagem selvagem) banda de aproximadamente 2900pb C- (ausência de DNA).	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos fenotípicos de mutantes de *B. sacchari* obtidos, considerando a utilização de intermediários da α -oxidação de propionato (Silva, 1998).

Tabela 2 - Antibióticos utilizados.

Tabela 3 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no presente trabalho

Tabela 4 - Iniciadores para amplificação dos genes da α -oxidação

Tabela 5 - Iniciadores desenhados para construção do cassete de deleção

Tabela 6 - Iniciadores desenhados para construção do cassete de deleção do pKNOCK

Tabela 7 - Iniciadores que amplificam os braços de DNA homólogos aos DNA genômico

Tabela 8 - Sequências dos gDNA

Tabela 9 - Iniciadores utilizados para amplificação dos gDNA com scaffolds.

Tabela 10 - Comparação de genes de *B. sacchari* pesquisados em no genoma de *R. eutropha* H16

Tabela 11 - Crescimento de mutantes prp de *B. sacchari* em intermediários da α -oxidação e propionato.

Tabela 12 - Resultados de avaliação fenotípica realizada após a inserção de fragmentos contendo potenciais genes da α -oxidação em linhagens selvagem e mutantes UV prp- de *B. sacchari* em meios contendo glicose, sacarose ou intermediários da α -oxidação (propionato, lactato, piruvato e acetato), como única fonte de carbono.

Tabela 13 - Parâmetros obtidos no ensaio para avaliação da produção de PHA do mutante UV complementado LFM 177 pBBR2::ACL4 . São mostradas as médias obtidas de triplicata biológica e duplicata analítica dos seguintes dados: pH final do cultivo, massa seca celular (MSC em g/L), quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%.

Tabela 14 - Parâmetros obtidos no ensaio 2 para avaliação da produção de PHA do mutante UV complementado LFM 177 pBBR2::ACL4 . São mostradas as médias obtidas de triplicata biológica: pH inicial e final do cultivo, quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3HB – 3-hidroxiacetato

3HV – 3-hidroxiacetato

Amp^r – resistência à ampicilina

Amp^S- sensível ao antibiótico ampicilina

ATCC – *American Type Cell Culture*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

Cm^R – resistente a cloranfenicol

CRISPR - *clustered regularly interspaced short palindromic repeat*

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

g – gramas (unidade de massa)

HA – hidroxiacil-CoA

HA_{MCL} – 3-hidroxiacil-CoA de cadeia média (6-14 carbonos) (do inglês *medium chain length*)

HA_{SCL} – 3-hidroxiacil-CoA de cadeia curta (3-5 carbonos) (do inglês *short chain length*)

IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Kan^R- resistência a canamicina

Kan^S- sensível ao antibiótico canamicina

lac⁻ - incapaz de consumir lactato

lacZ – gene codificante para β-galactosidase

LB – Luria Bertani

LFM – Laboratório de Fisiologia de Microrganismos

LTTR – do inglês LysR-type transcriptional regulator

mL – mililitros (unidade de volume)

MFS – transportador de membrana da Superfamília dos Facilitadores Maioritários (do inglês *major facilitator superfamily*)

MM – Meio Mineral

MSC – Massa seca celular

NCBI - Centro nacional de informação de biotecnologia, do inglês National Center for Biotechnology Information

ORFs – fase aberta de leitura (do inglês *open reading frames*)

oriT⁺ - presença de origem de transferência

P(3HB) – poli-3-hidroxibutirato

P(3HB-co-3HV) – poli(3-hidroxibutirato-co-3hidroxivalerato)

pb – pares de base

PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*

PHA – polihidroxialcanoatos

PHA⁺- produção de polihidroxialcanoato

PHB - polihidroxibutirato

pir⁻ - incapaz de consumir piruvato

prp⁻ - incapaz de consumir de propionato

prp⁺ - capacidade de consumir propionato

RNA – Ácido ribonucleico

Sac⁺ - capacidade de consumir sacarose

sacB – gene codificante para levansucrase

Spec^R – resistente a espectinomicina

TAE – tampão Tris-base, Ácido acético e EDTA

Tc^S – sensível ao antibiótico tetraciclina

UV – ultravioleta

Y_{3HV/Prp} – eficiência na conversão de propionato a unidades 3HV

Sumário

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Impacto do plástico de origem petroquímica e a busca por polímeros biodegradáveis	20
2.2	Polihidroxicanoatos	21
2.3	Catabolismo do propionato	21
2.4	Catabolismo do propionato em <i>Burkholderia sacchari</i>	27
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	Objetivo principal.....	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	Meios de Cultura	32
4.2	Micro-organismos e plasmídeos.....	32
4.3	Pesquisa <i>in silico</i> dos genes envolvidos na via da α -oxidação e de outras vias envolvidas no catabolismo propionato em <i>B. sacchari</i>	34
4.4	Pesquisa <i>in silico</i> dos genes envolvidos α -oxidação do propionato em <i>Ralstonia eutropha H16</i>	34
4.5	Testes fenotípicos dos mutantes UV.....	34
4.6	Clonagem de genes da via da α -oxidação para complementação dos mutantes UV.	34
4.7	Testes fenotípicos dos mutantes UV e mutantes UV transformados.....	36
4.8	Ensaio em frascos agitados de acúmulo de PHA com mutantes UV complementados em agitador rotativo	36
4.9	Metodologias analíticas	37
4.9.1	Determinação de biomassa.....	37
4.9.2	Teor de P3HB e 3HV.....	38
4.10	Sistema de deleção com plasmídeos suicidas.	38
4.10.1	Construção de estruturas para deleção utilizando pNPTS138 e pEX18AP.....	40
4.10.2	Construção de estruturas para deleção utilizando pKNOCK	44
4.10.3	Experimentos para testar a obtenção de mutantes por inserção de pNPTS138:: α -oxdel por eletrotransformação.	45
4.10.4	Inserção do plasmídeo suicida pNPTS138:: α -oxdel por conjugação.	45
4.10.5	Inserção do plasmídeo suicida pEX18Ap:: α -oxdel por eletrotransformação.	46
4.10.6	Inserção do plasmídeo suicida pEX18Ap:: α -oxdel por conjugação.	46
4.10.7	Inserção do plasmídeo suicida pKNOCK:: $\Delta\alpha$ -ox por conjugação.	47
4.11	Testes do sistema de deleção CRISPR.....	48
4.11.1	Testes para obtenção de mutantes empregando o sistema CRISPR-Cas9.	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

5.1	Pesquisa <i>in silico</i> da presença dos possíveis genes da via da α -oxidação e outras vias do catabolismo de propionato em <i>B. sacchari</i>	53
5.2	Pesquisa <i>in silico</i> dos genes envolvidos α -oxidação do propionato em <i>Ralstonia eutropha</i> H16.	57
5.3	Verificação da capacidade dos potenciais genes da α -oxidação detectados restituírem o fenótipo selvagem a mutantes <i>prp</i> ⁻	63
5.4	Confirmação dos fenótipos dos mutantes UV <i>prp</i> ⁻	65
5.5	Inserção de fragmentos de DNA codificando prováveis genes da α -oxidação em mutantes <i>prp</i> ⁻ e testes fenotípicos com os clones obtidos.....	66
5.6	Avaliação quantitativa do copolímero produzido pelo mutante complementado.....	69
5.7	Testes de diferentes estratégias para mutação dirigida	72
5.7.1	Sistema de deleção sítio dirigida com plasmídeos suicidas.....	72
5.7.2	Sistema CRISPR-Cas	83
6	CONCLUSÃO	86
7	REFERÊNCIAS.....	88
	ANEXOS	99
A.	Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene <i>lysR</i>	99
B.	Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene isovaleril CoA desidrogenase.....	100
C.	Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene CoA transferase/L-carnitina desidratase.	101
D.	Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene do Transportador.	102
E.	Sequenciamento do cassete de deleção	103
F.	Pesquisa genoma de <i>Ralstonia eutropha</i> (BLASTX) da sequência do regulador transcricional <i>lysR</i>	105
G.	Pesquisa genoma de <i>Ralstonia eutropha</i> (BLASTX) da sequência do gene acil CoA desidrogenase.....	106
H.	Pesquisa genoma de <i>Ralstonia eutropha</i> (BLASTX) da sequência do gene CoA transferase/L-carnitina desidratase.	107
I.	Pesquisa genoma de <i>Ralstonia eutropha</i> (BLASTX) da sequência transportador.....	108
J.	Construções com genes do operon da α -oxidação.....	109
K.	Mapa do plasmídeo pNPTS138.....	110
L.	Mapa do plasmídeo pEX18ap	110
M.	Mapa do plasmídeo pKNOCK	111
N.	Mapa do plasmídeo pCas9.....	112
O.	Mapa do plasmídeo pTargetF	112
P.	Dados não tratados de ensaio de acúmulo em frascos agitados	113

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O plástico é um material amplamente utilizado no mundo moderno, a grande maioria provém do petróleo, uma fonte finita e não renovável em curto período de tempo relativos a vida humana. Este material possui uma gama de aplicações, devido as suas combinações monoméricas que geram propriedades físico-químicas diferentes para cada tipo de plástico, garantido uma ampla flexibilidade em suas aplicações. O grande consumo de materiais plásticos é um problema mundial, pois estes materiais demoram muito para se decompor, acumulando-se no ambiente, principalmente o ambiente marinho, gerando graves problemas ambientais e de saúde pública.

Diante deste cenário, aumentou-se a busca por materiais que possam substituir o plástico de origem petroquímica, que devem possuir uma origem mais ambientalmente correta e que sejam biodegradáveis. Os polihidroxicanoatos (PHA) se encaixam neste perfil de material. Os PHA são poliésteres acumulados intracelularmente por microrganismos, de modo mais expressivo na ausência de um nutriente essencial e excesso de fonte de carbono. São polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, com potencial para substituição dos plásticos de origem petroquímica, devido às suas características físicas. Eles possuem uma ampla gama de aplicação, podendo ser utilizados desde produção de embalagens até matrizes de liberação controlada de fármacos.

Estudos foram realizados para isolamento de bactérias promissoras para produção de PHA, dentre essas bactérias está a *Burkholderia sacchari*, bactéria gram-negativa, não-fermentadora, isolada de solo de canavial, capaz de acumular até 80% de sua massa seca em PHA. Esta bactéria produz polihidroxibutirato (P3HB) a partir de fontes de carbono como sacarose. Ao se fornecer um co-substrato como propionato ela é capaz de acumular poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV), um copolímero com ponto de fusão menor e propriedades mais maleáveis que o P3HB.

Apesar de um cenário bem promissor para produção deste copolímero, o catabolismo de propionato de *B. sacchari* precisa ser mais estudado, pois estudos prévios já mostraram que nem todo propionato fornecido é direcionado para produção de PHA, ele pode ser utilizado como fonte de energia pela bactéria, gerando

preferencialmente em biomassa, CO₂ e água. Desta maneira, para que *B. sacchari* seja usada para produção industrial de P3HB-co-3HV suas vias metabólicas ainda devem ser elucidadas para o melhor aproveitamento deste substrato para produção deste copolímero, visto que propionato é uma matéria prima com o custo elevado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impacto do plástico de origem petroquímica e a busca por polímeros biodegradáveis

Plásticos são polímeros formados por uma rede de monômeros ligados covalentemente um a outro. Existem diferentes tipos de monômeros que, em combinação, podem formar diferentes tipos de plásticos. Estes possuem vantagens em relação a outros tipos de materiais como vidro e metal, devido ao seu baixo peso, custo, flexibilidade e uso em aplicações médicas. Segundo a Plastic European Association a produção mundial de materiais plásticos chegou à 322 milhões de toneladas em 2015, deste número, 39,9% foi utilizado na produção de embalagens. Na Europa em 2014, 25 milhões de toneladas do plástico produzido foram para o lixo, 69,2% foi reaproveitado através de reciclagem ou produção de energia e 30,8% continuou em aterros sanitários.

Este crescimento na produção tem sido acompanhado por um aumento correspondente na concentração de plásticos no ambiente marinho, destino final da maioria dos plásticos descartados no ambiente, prejudicando todo o ecossistema. Os plásticos podem ficar retidos por séculos no ambiente se não forem submetidos a radiação ultravioleta, nem expostos a microrganismos. Fragmentos destes materiais podem ser encontrados em todos os oceanos, com concentração observada de 580 mil fragmentos por quilômetro quadrado (WILCOX et al., 2015). Há relatos na literatura de microplásticos encontrados no ambiente marinho deste 1970 (COSTA; BARLETTA, 2015). Nem só no ambiente tem sido notada a presença destes materiais. Estudos atuais mostram que foram encontradas micropartículas de diversos tipos de plásticos de origem petroquímica em amostras de sal de cozinha comercializadas na China (YANG et al., 2015), mostrando ser também um problema de saúde pública.

Os plásticos derivados do petróleo demoram muito para se decomporem no ambiente, tempo estimado na ordem de séculos. Além disso, sua incineração libera produtos tóxicos como dioxinas. O constante contato com plásticos derivados de petróleo também pode ser prejudicial à saúde humana, uma vez que, estudos indicam que o bisfenol A (BPA) e Bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP), presentes nestes materiais podem causar danos à saúde e à reprodução humana, como maturação sexual precoce e diminuição da fertilidade masculina (NORTH; HALDEN, 2003). Diante deste

cenário a produção de plásticos biodegradáveis e biocompatíveis é cada vez mais estudada.

Os polihidroxicanoatos (PHA) se encaixam nesta categoria de materiais, porém, para se tornarem competitivos com os de origem petroquímica muitos estudos ainda devem ser feitos. O custo de produção do PHB foi estudado e verificou-se que é fortemente dependente de preços do açúcar, que representa quase 29% do custo final, não considerando valores de tributação de impostos. Como um todo, o custo da produção de PHB foi estimado a US \$ 2,65 / kg PHB para uma planta de 100 mil toneladas por ano, com o uso de sacarose e combustíveis fósseis como substrato (LEE E CHOI, 1998). Segundo Nonato e colaboradores em 2001, a avaliação preliminar para 10 mil toneladas por ano por planta observa que o custo de produção está fortemente relacionado ao preço de mercado do açúcar. Ensaio piloto realizados previram que o custo (sem impostos) poderia muito aproximar da estimativa mais baixa proposta por Lee e Choi em 1998, de acordo com os preços de matéria prima, produção e separação. Estudos mais recentes estimam que eles são 15 vezes mais caros que os derivados de petróleo, como polipropileno e polietileno (MOZEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016).

Desta maneira, muitos estudos ainda devem ser feitos para melhorar a produção de biomassa e a sua composição, que garante as propriedades desejadas, e assim diminuir o custo de produção e tornando viável sua produção em larga escala. Cerca de 50% do custo da produção provem do custo da matéria prima, desta maneira otimizar a sua conversão em PHA é um desafio (MOZEJKO-CIESIELSKA; KIEWISZ, 2016).

2.2 Polihidroxicanoatos

Polihidroxicanoatos (PHA) são poliésteres acumulados intracelularmente por algumas bactérias, na forma de grânulos intracelulares, que apresentam importância biotecnológica por serem empregados na produção de plásticos e elastômeros biodegradáveis e biocompatíveis (GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; SILVA et al., 2014; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Estes poliésteres são produzidos por diversas bactérias, principalmente em condições desbalanceadas de cultivo, com ausência de nutrientes essenciais, como fósforo ou nitrogênio, e abundância de fonte de carbono (ANDERSON; DAWES, 1990).

Os PHA foram descritos pela primeira vez em 1920, pelo pesquisador francês, Maurice Lemoigne, que descobriu que grânulos de polihidroxibutirato (PHB) eram acumulados intracelularmente em *Bacillus megaterium*. Mas nesta época e por um longo período, a presença de grânulos de PHA foi utilizado como um dado de importância taxonômica (KESHAVARZ; ROY 2010). Com a crise do petróleo da década de 1970, houve uma busca por novos materiais para substituir os plásticos originados de petróleo. E assim, cinquenta anos após a sua descoberta, a produção de PHB foi levada a cabo em escala comercial (CHEN, 2009; NONATO et al., 2001; URTUVIA et al., 2014). Diversas empresas têm sido estabelecidas nos EUA, Alemanha, China, Brasil etc. para produzir tais materiais (CHEN, 2009). As principais empresas do ramo de produção de PHA são Metabolix Inc. (U.S.), Meredian Inc. (U.S.), Biomer (Germany), Tianjin GreenBio Materials Co. Ltd (China), Shenzhen Ecomann Technology Co. Ltd (China), que estão em um cenário crescente no mercado de plásticos biodegradáveis. O crescimento mundial deverá ter um ritmo acelerado entre 2015 e 2020, sendo impulsionado pela maior conscientização ambiental e implementação de normas ambientais mais rigorosas (MARKETS AND MARKETS, 2015).

De acordo com da estrutura da cadeia de carbonos, PHA são divididos em dois grupos: PHA *short-chain-length*, que engloba aqueles PHA compostos de monômeros de cadeia curta (PHA_{scl}), com 3 a 5 átomos de carbono da cadeia carbônica, e os PHA *medium-chain-length* compostos por monômeros de cadeia média (PHA_{mcl}), com mais de 6 carbonos (DOI; STEINBÜCHEL, 2002). Mais de 150 tipos de monômeros diferentes foram encontrados como componentes da cadeia polimérica dos PHA (STEINBÜCHEL; LÜTKE-EVERSLOH, 2003).

Os PHA podem ser utilizados para fabricação de filmes, sacos, embalagens, revestimentos de papel, produtos plásticos convencionais, incluindo os itens descartáveis (HOLMES, 1985). Também possuem grande aplicabilidade na indústria farmacêutica, como matrizes biodegradáveis para liberação controlada de fármacos (NIGMATULLIN, 2015). Por serem biocompatíveis, PHA também estão presentes na indústria médica, sendo utilizados como materiais osteossintéticos na estimulação do crescimento ósseo, em placas de osso, substituições de suturas cirúrgicas e dos vasos sanguíneos, devido às suas propriedades piezoelétricas, que confere a capacidade de produzir energia a partir da pressão mecânica no material (BRIGHAM; MASAELI et al., 2013, REDDY et al., 2003, SINSKEY, 2012).

Trabalhos realizados com o objetivo de obter bactérias para produção industrial de PHA isolaram, entre outras, a espécie *Burkholderia sacchari*, bactéria Gram negativa isolada a partir de solos de canaviais brasileiros, capaz de acumular até 80% de sua massa seca em PHA a partir de sacarose e diversos outros substratos (GOMEZ, 1994; GOMEZ et al., 1996; MENDONÇA et al., 2014; MENDONÇA et al., 2017; SILVA et al., 2000; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2014). Esta bactéria foi descrita como uma nova espécie em 2001 por Brämer e colaboradores. Estudos filogenéticos realizados em 2014 por Sawana e colaboradores, com base nos resultados das análises filogenéticas de sequências conservadas indel e do perfil de patogenicidade das espécies de *Burkholderia* spp, propuseram uma divisão do gênero *Burkholderia* em dois gêneros. Nesta nova proposta, o gênero *Burkholderia*, correspondente ao clado I, conterà apenas as espécies *Burkholderia* clinicamente relevantes e fitopatogênicas. Todas as outras espécies de *Burkholderia* spp., que são primariamente ambientais, serão transferidas para um novo gênero *Paraburkholderia* gen. Nov.. Porém, neste trabalho de mestrado optamos por manter a nomenclatura como *Burkholderia sacchari*.

Esta espécie ao ser cultivada em sacarose, sob limitação de um nutriente essencial ao crescimento, como nitrogênio, fósforo, oxigênio, dentre outros, acumula o homopolímero poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e, ao se oferecer como co-substrato o propionato, a bactéria acumula um copolímero de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicaprolato (P3HB-co-3HV) um copolímero com propriedades mais maleáveis que o P3HB, que é mais rígido e quebradiço. O aumento do teor monômero de 3HV no copolímero diminui seu ponto de fusão e aumenta a porcentagem de alongamento até a ruptura, permitindo melhor processamento térmico (LUZIER, 1992; SILVA, 1998; SILVA et al., 2007). A Figura 1 esquematiza algumas das reações envolvidas na biossíntese deste copolímero em bactérias. P3HB e P3HB-co-3HV estão entre os PHA mais estudados e, por serem potenciais substitutos dos plásticos convencionais, tiveram sua produção industrial viabilizada (CHEN, 2009; KONING et al., 1996; NONATO et al., 2001).

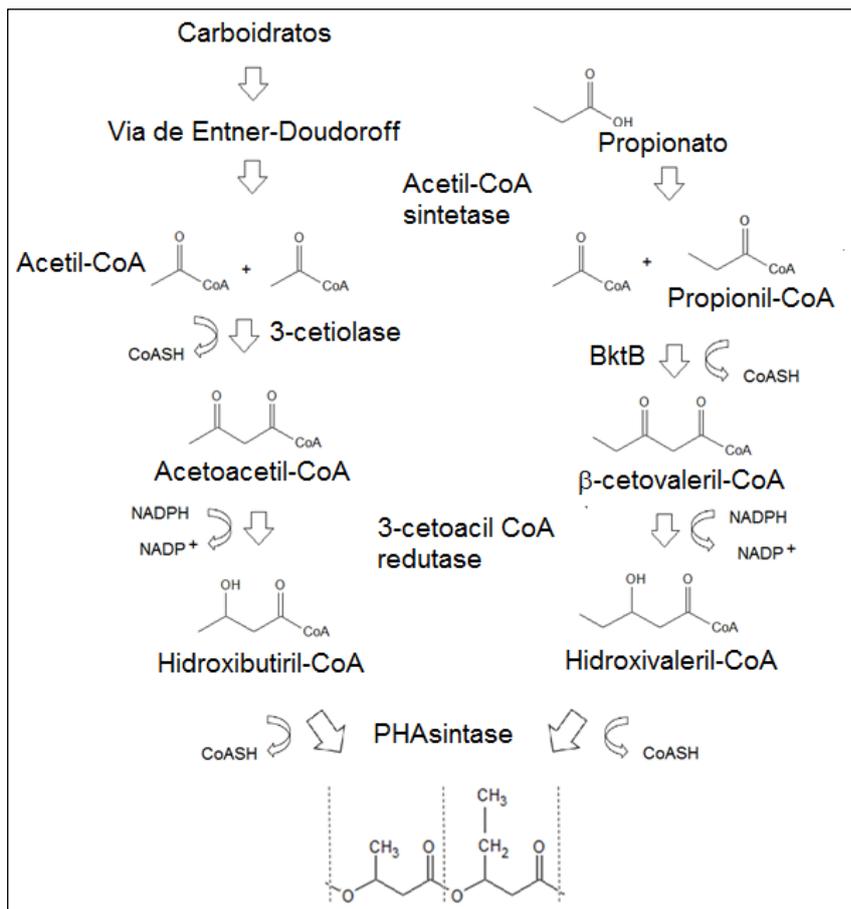


Figura 1- Vias de formação do copolímero de poli-3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato (P3HB-co-3HV) (STEINBUCHER & PIEPER 1992).

A incorporação de unidades 3HV, obtida pelo fornecimento de propionato como co-substrato, gera um copolímero mais flexível e com maior variedade de aplicações (HOLMES, 1985). O ácido propiônico, até pouco tempo, era totalmente produzido a partir de petróleo, porém estudos biotecnológicos buscam sua produção a partir de fontes renováveis, como o glicerol, subproduto da produção do biodiesel, sendo estudado como substrato para produção de ácido propiônico (ZHANG ;YANG, 2009). A indústria indiana PRATHISTA INDUSTRIES LIMITED, já produz propionato a partir de fontes renováveis. Dado o custo deste co-substrato, nos primeiros desenvolvimentos do copolímero, e ao baixo aproveitamento do mesmo por bactérias, na sua conversão em 3HV, inclusive por *B. sacchari*, foram obtidos mutantes, a partir de radiação ultravioleta (UV) desta bactéria, mais eficientes na conversão de propionato em monômeros de 3HV e deficientes no consumo de propionato para crescimento bacteriano (mutantes *prp*⁻). Esta eficiência pode ser mensurada calculando-se o fator de conversão de propionato a unidades 3HV ($Y_{3HV/Prop}$) em g/g, ou seja, quantos gramas (g) de produto são formados por grama de substrato

consumido (Gomez et al., 1996). Foram obtidos dois grandes grupos de mutantes demonstrando um aumento nos valores de $Y_{3HV/Prop}$: em mutantes afetados no consumo de intermediários da α -oxidação do propionato, $Y_{3HV/Prop}$ elevou-se de 0,10 até 0,35 g/g. Já aqueles não afetados no consumo de intermediários da α -oxidação do propionato $Y_{3HV/Prop}$ elevou-se de 0,10 para 0,80 g/g (SILVA et al., 1996, SILVA, 1998, SILVA; GOMEZ, 1998; SILVA et al., 2000). Considerando-se que o valor máximo teórico de $Y_{3HV/Prp}$ é 1,35 g/g, esses resultados já indicam alto potencial desses mutantes para uso industrial em processo desenvolvido pelo IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) e licenciado para produção industrial para a empresa PHB Industrial S.A. que produz o polímero denominado Biocycle (BUENO NETTO et al., 1993; NONATO et al., 2001; 1995; SILVA; GOMEZ, 2013).

Estudos realizados com um dos mutantes não afetados no consumo de intermediários da via da α -oxidação, alcançaram valores muito próximos ao máximo teórico calculado, com valores que variaram de 1.1 a 1.34 g/g, otimizando-se o processo de cultivo desta linhagem em biorreator. (ROCHA et al, 2008). Porém o estudo da outra via de catabolismo de propionato atuante em *B. sacchari* é importante para compreensão de seu metabolismo e uma possível melhora no processo de obtenção do copolímero.

2.3 Catabolismo do propionato

A formação e a degradação de todos os ácidos graxos envolvem uma via oxidativa. Já para o propionato, existem várias vias propostas. Todos as vias descritas começam com propionil-CoA, a qual pode sofrer uma α -oxidação, uma β -oxidação, uma carboxilação, carboxilação redutora ou condensações de Claisen (Figura 2) (TEXTOR, 1997).

O propionato pode servir como única fonte de carbono para muitas bactérias. Seu metabolismo está ligado ao metabolismo do malonato através do ciclo do 2-metilcitrato e, a partir desta via, a vias metabólicas centrais, como o ciclo do ácido tricarbóxicos (TCA). As enzimas do ciclo do 2-metilcitrato são codificadas pelos genes *prpBCDE*, *acnB*, e genes *acnD* (2-metilcitrato desidratase). *AcnB* (aconitato hidratase) é uma enzima bifuncional que também pertence ao TCA e o ciclo do glioxilato. Propionato também participa do ciclo citramalato compreendendo os produtos dos genes *mutB*, *meaB*, *pccBA*, e MCE. *PrpR* trata-se de um ativador

transcricional do tipo sigma TF-54 dependente de fator transcricional que pertence à família de Fis, que é conhecido por ser um ativador transcricional dos genes *prp* em *Escherichia coli* e *Ralstonia eutropha* (SUVOVA, 2012).

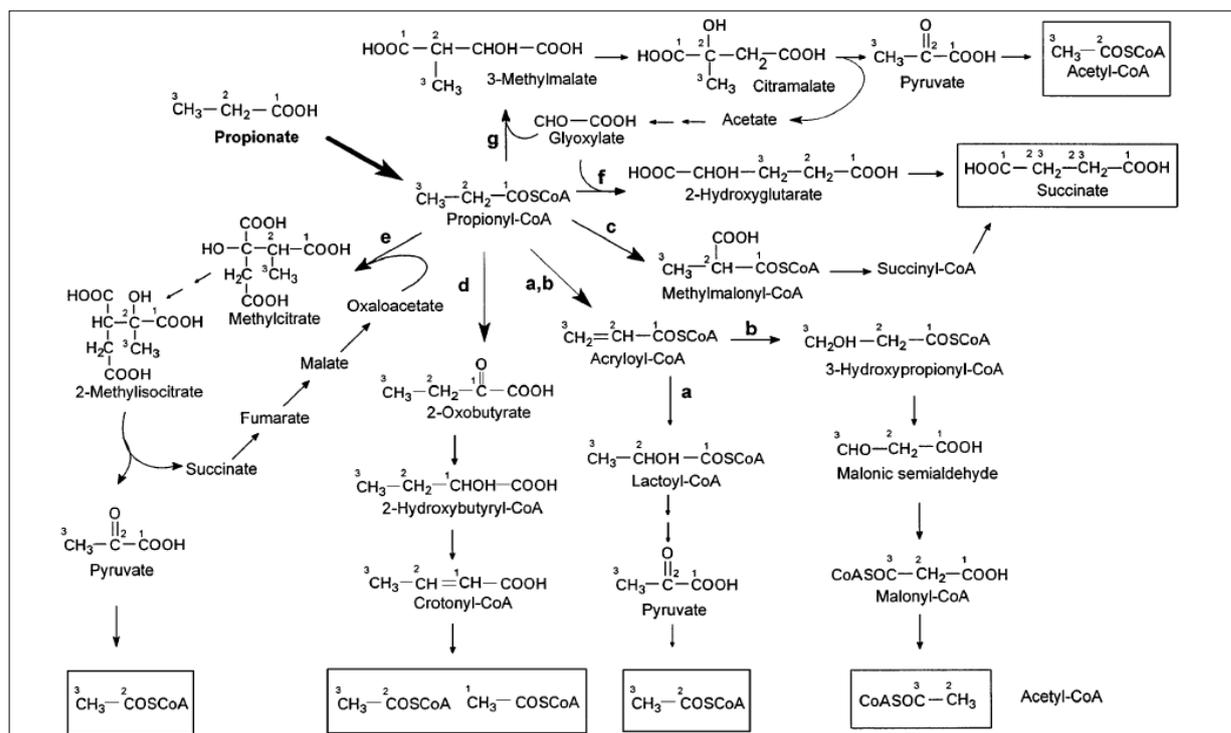


Figura 2- Possíveis vias para oxidação do propionato: a α-oxidação, b β-oxidação, c α-carboxilação, d carboxilação redutiva, e e – g condensação de Claisen (TEXTOR, 1997)

Bok e colaboradores (2001), propuseram uma nova via para o consumo de propionato além das listadas por Textor (1997). Esta via foi descrita em *Smithella propionica* em experimentos em que esta foi co-alimentada com propionato e acetato marcados com ^{13}C . Duas moléculas de propionato se condensam e isomerizam formando uma molécula de cadeia linear, sem cadeias secundárias, a partir deste composto, 3 moléculas de acetil-CoA podem ser geradas. Estas reações são reversíveis, desta maneira o acetato marcado entra na via, randomizando os carbonos (Figura 3).

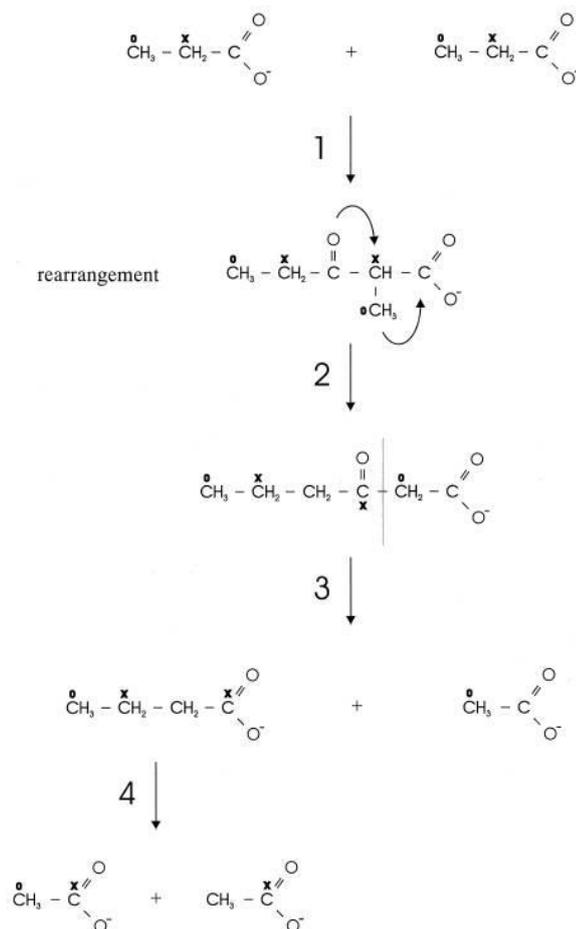


Figura 3- Via proposta para catabolismo de propionato para *S. propionica* (BOK ET AL., 2001).

2.4 Catabolismo do propionato em *Burkholderia sacchari*

Estudos identificaram a presença dos genes da via do ciclo do 2-metilcitrato em *B. sacchari* (BRÄMER et al., 2002; SILVA et al., 1998). Nesta via, quatro genes apresentaram identidade àqueles do *locus prp* de outras bactérias Gram-negativas, *prpR*, *prpB*, *prpC*, *acnM* e uma *ORF* (*ORF5*), respectivamente, um gene regulador, genes codificadores das enzimas 2-metil-isocitrato liase, 2-metilcitrato sintase e os dois últimos genes codificam produtos envolvidos na conversão de 2-metilcitrato a 2-metilisocitrato. Esta é a principal via catabólica deste substrato nesta bactéria e opera em baixas concentrações de propionato (0,1 g/L) (PEREIRA, 2007). Além de mutantes UV, foram construídos mutantes interrompidos em *acnM* e deletado *acnM* e *prpC* (PEREIRA et al., 2009). A eficiência de conversão nestes mutantes de propionato a unidades de 3HV ($Y_{3HV/Prop}$) aumentou de 0,09 g/g para 0,81-0,96 g/g, indicando que os produtos dos genes *acnM* e *prpC* são ambos essenciais para o

crescimento em propionato nesta via que compete com a via de síntese de 3HV pelo propionato. Porém, nenhuma das mutações resultou no fator de conversão máximo teórico 1,35 g/g (PEREIRA et al., 2009). Estes resultados reforçaram a hipótese de outra possível via para o catabolismo de propionato: a via da α -oxidação.

A comprovação da presença do 2MCC e a proposição da presença da α -oxidação teve origem a partir de estudos para obtenção de mutantes, por UV, mais eficientes no uso de propionato na conversão de 3HV. Esta via foi proposta após se caracterizar fenotipicamente os mutantes, identificados por deficiência de crescimento de em intermediários do propionato na α -oxidação (mutantes dos grupos I-III, tabela 1) (SILVA et al., 2000).

Tabela 1. Grupos fenotípicos de mutantes de *B. sacchari* obtidos, considerando a utilização de intermediários da α -oxidação de propionato (SILVA, 1998).

<i>Linhagem/Grupo</i>		<i>Fenótipo</i>				
	Selvagem	sac+	acet+	prp+	lac+	pir+
Grupo	I	sac+	acet-	prp-	lac-	pir-
Grupo	II	sac+	acet-	prp-	lac?	pir-
Grupo	III	sac+	acet-	prp-	lac+	pir-
Grupo	IV	sac+	acet+	prp-	lac+	pir+

Sac+ (crescimento em sacarose), acet+ (crescimento em acetato), prp + (crescimento em propionato), lac+ (crescimento em lactato), pir + (crescimento em piruvato), Sac- (ausência de crescimento em sacarose), acet - (ausência de crescimento em acetato), prp - (ausência de crescimento em propionato), lac- (ausência de crescimento em lactato), pir - (ausência de crescimento em piruvato), lac? (crescimento indeterminado em lactato).

Neste estudo, além das diferenças das características fenotípicas estudadas, sabe-se que muitos desses mutantes não foram complementados por fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) genômico de *B. sacchari* portadores de regiões de genes que participam do 2MCC, nem por outras regiões capazes de complementar outros mutantes prp⁻ do grupo IV, não afetados no consumo de intermediários α -oxidação (CINTRA, 2008). Outro dado a ser considerado é que mutantes afetados no consumo de intermediários da α -oxidação tiveram valores de $Y_{3HV/Prop}$ aumentados de 0,09 g/g na selvagem para cerca de 0,30 g/g, enquanto aqueles não afetados (grupo IV, Tabela 1) alcançaram valores em torno de 0,8-0,9 g/g (PEREIRA et al., 2009; SILVA et al., 2000). Os resultados de eficiência de conversão de propionato a unidades 3HV dos mutantes afetados no 2MCC e na α -oxidação indicam que a deleção de ambas

as vias poderia resultar na geração de mutantes apresentando valores próximos ao máximo teórico de $Y_{3HV/Prp}$, (SILVA et al., 1996, SILVA et al., 2000).

Cintra em 2008, estudou esses mutantes incapazes de crescer em intermediários da via da α -oxidação, buscando a complementação com fragmentos de DNA de biblioteca genômica de *B. sacchari*. Desta maneira, conseguiu identificar um fragmento capaz de restituir o fenótipo prp^+ nos mutantes UV alterados na via da α -oxidação. Este fragmento foi sequenciado e foi possível demonstrar sua semelhança com sequências de genes codificadores de ativadores transcricionais do tipo *lysR*, presente em várias espécies de *Burkholderia* spp.

Após alinhamento de sua sequência de aminoácidos correspondentes aos nucleotídeos (BLASTX) no banco de dados GenBank um banco de dados de Nucleotídeos do NCBI (National Center for Biotechnology Information), no genoma de outras *Burkholderia* spp (*Burkholderia* sp., *B. cenocepacia*, *B. ambifaria*, *B. multivorans*), chegou-se à conclusão de que o fragmento correspondia ao regulador transcricional do tipo *lysR*.

Lys R é um regulador transcricional que possui um sitio de ligação ao DNA (domínio *helix turn helix*- HTH) N-terminal e um domínio de ligação de cofator C-terminal. É uma proteína homodimérica com dois sítios de ligação, um regulatório e outro ativador (Figura 4). A interação entre os dois dímeros desta proteína aumenta a afinidade da RNA polimerase pela sequência do promotor (MADDOCK, 2008). Co-indutores são reconhecidos como sendo importantes para a função de LTTRs (do inglês *LysR-type transcriptional regulator*) e muitas vezes parecem contribuir para um circuito fechado de realimentação, em que um produto intermediário ou de uma dada via metabólica / via de síntese atua como co-indutor necessário para ativação transcricional ou repressão (CELIS, 1999; KEULEN et al., 2003; VAN PICOSI et al., 2007).

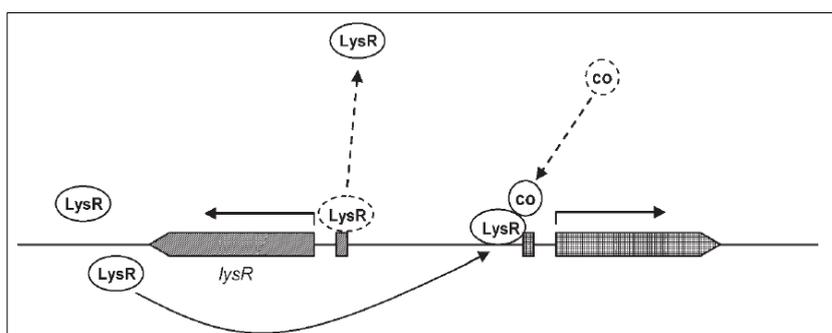


Figura 4 - Esquema de regulação transcricional do LysR (MADDOCK, 2008).

Uma pesquisa foi realizada nestes genomas de outras *Burkholderia* spp., com o intuito de se identificar os genes adjacentes a este regulador transcricional. Em 2008, Cintra encontrou uma organização de genes que codificam para as seguintes enzimas: acil-CoA desidrogenase, acil-CoA transferase/*L*-carnitina desidratase e uma permease da superfamília dos facilitadores MFS-1 (do inglês major *facilitator superfamily*). Todos estes genes podem estar envolvidos no catabolismo do propionato, como observado na Figura 5, na qual se compara esta organização com enzimas que caracterizam a α -oxidação do propionato.

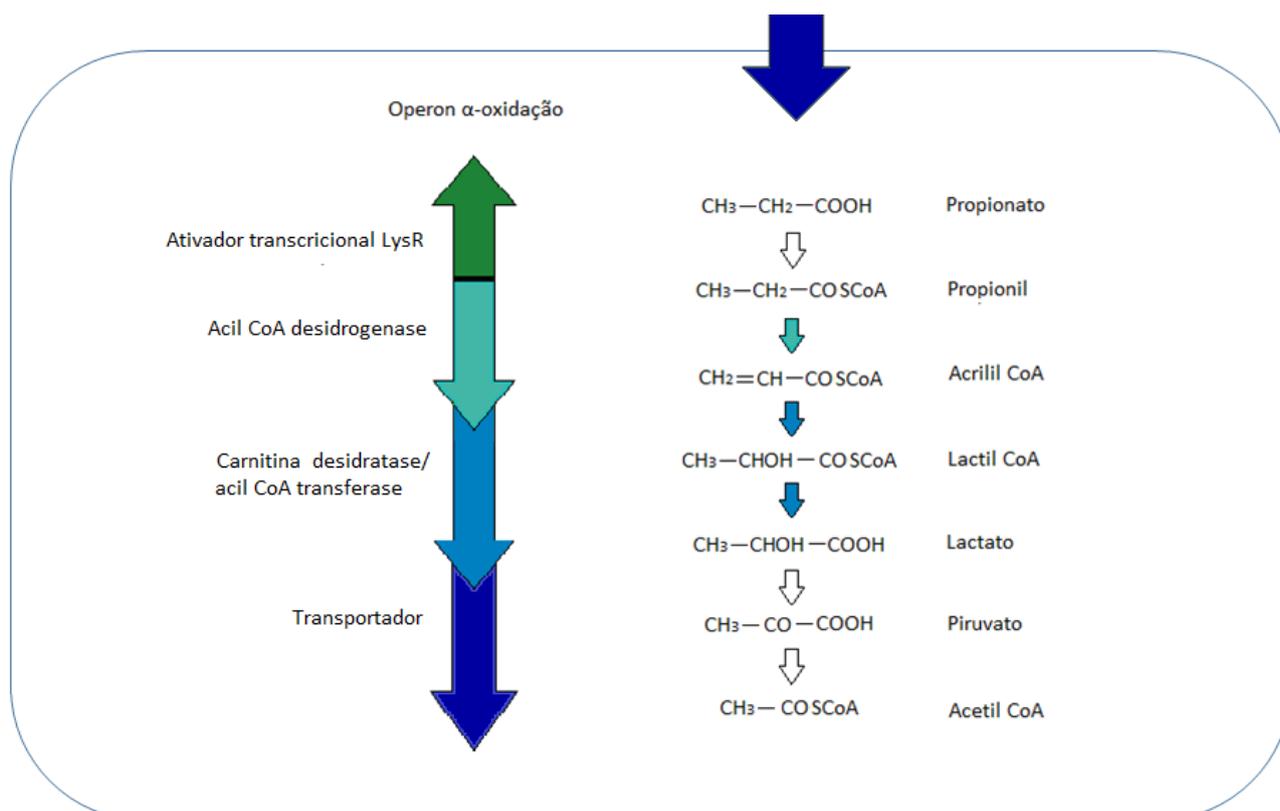


Figura 5 - Correlação entre seqüência de DNA estudada por Cintra, 2008 e via da α -oxidação do propionato.

Recentemente foi publicado o *draft* do genoma de *B. sacchari* (ALEXANDRINO et al, 2015). A partir dos dados acima, o presente trabalho buscou a via da α -oxidação, no aspecto molecular, procurando localizar e identificar a presença do regulador transcricional tipo LysR e os possíveis genes envolvidos na via da α -oxidação que podem estar sob sua regulação. Uma vez identificados os genes, foi proposto o melhoramento genético dessa bactéria para aumento da produção do copolímero P3HB-co-3HV, buscando alcançar a eficiência máxima teórica de conversão de propionato a 3HV.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Comprovar em bases moleculares a presença dos genes da via da α -oxidação do propionato em *B. sacchari* e avaliar sua funcionalidade.

3.2 Objetivos específicos

Identificar no genoma de *B. sacchari*, regiões possivelmente codificadoras de um operon envolvido na α -oxidação, amplificar as regiões suspeitas e verificar sua capacidade e complementar os mutantes prp- afetados na α -oxidação de propionato, restituindo sua capacidade de crescer em propionato como única fonte de carbono.

Realizar experimentos em frascos agitados nos mutantes complementados para verificar se, além da capacidade de crescer em propionato, o valor de $Y_{3HV/Prop}$ da linhagem selvagem é restabelecido.

Identificar possíveis regiões-alvo essenciais para a expressão da via e desenvolver estratégias para construir cassetes para interromper esta via através da deleção de um ou mais genes, gerando assim, um mutante prp- inativado em pontos específicos de α -oxidação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Meios de Cultura

Todos os meios utilizados neste trabalho foram esterilizados em autoclave a 121 °C, 1 atm por 20 minutos.

O meio Luria-Bertani (LB) é constituído por 10 g de triptona, 5 g de peptona e 5 g de cloreto de sódio para 1L de água destilada (q.s.p.) (SAMBROOK et al., 1989).

Meio mineral (MM) é constituído por 3,5 g de Na₂HPO₄, 1,5 g KH₂PO₄, 1,0 g (NH₄)₂SO₄, 1,0 mL de citrato férrico 6%, 1,0 mL de solução de (CaCl)₂.2H₂O 1%, 1,0 mL de solução de elementos traços (0,3 g H₃BO₃, 0,2 g de CaCl₂.6H₂O, 0,1 g de ZnSO₄.7H₂O, 30,0 mg MnCl₂.4H₂O, 30,0 mg (NaMoO₄)₂.2H₂O, 20,0 mg NiCl₂.6H₂O, 10,0 mg CuSO₄.5H₂O em q.s.p. 1L de água (ROCHA et al., 2008). A fonte de carbono foi posteriormente adicionada a este meio em concentração final de 1-10 g/L, conforme necessidade.

Os antibióticos utilizados foram adicionados aos meios de cultura após esterilização de acordo com as concentrações indicadas na tabela 2:

Tabela 2 - Antibióticos utilizados nos meios de cultura.

<i>Antibiótico</i>	<i>Concentração da solução-mãe</i>	<i>Concentração final</i>
Carbenicilina (Carb)	200 mg/mL (em H ₂ O)	200 µg/mL
Canamicina (Kan)	50 mg/mL (em H ₂ O)	50 µg/mL
Cloranfenicol (Cm)	25 mg/mL (em etanol)	25 µg/mL
Espectinomicina (Spec)	50 mg/mL (em H ₂ O)	50 µg/mL

4.2 Micro-organismos e plasmídeos

Os micro-organismos e plasmídeos utilizados no presente trabalho estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Linhagem	Características	Origem
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 101	Sac+, PHA+, prp+, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	GOMEZ et al, 1996
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 177	Sac+, PHA+, prp-, lac-, pir-, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	SILVA et al., 2000
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 183	Sac+, PHA+, prp-, lac-, pir-, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	SILVA et al., 2000
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 186	Sac+, PHA+, prp-, lac-, pir-, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	SILVA et al, 2000
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 191	Sac+, PHA+, prp-, lac-, pir-, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	SILVA et al, 2000
<i>Burkholderia sacchari</i> LFM 198	Sac+, PHA+, prp-, lac-, pir-, Kan ^S , Amp ^S , Tc ^S	SILVA et al., 2000
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λ pir	PHA-, Tc ^S , gene recA, genes tra do plasmídeo RP4 integrado ao DNA genômico	SIMON et al., 1983
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Linhagem usada para propagação plasmidial	DURFEE et al., 2008
<i>Rashtonia eutropha</i> H16	Linhagem selvagem produtora de PHA _{SCL}	(DAVIS, 1969) YABUUCHI et al. 1996
pBBR1 MCS-2	Plasmídeo 5228 pb, Kan ^R , LacZ α , MCS, Mob	KOVACH et al., 1995
pBBR1 MCS-2::ACL1	Plasmídeo 6302 pb, Kan ^R , LacZ α , MCS, Mob abrigando o gene <i>lysR</i>	Este trabalho
pBBR1 MCS-2::ACL2	Plasmídeo 8089 pb, Kan ^R , LacZ α , MCS, Mob abrigando os genes de <i>lysR</i> e acil CoA desidrogenase	Este trabalho
pBBR1 MCS-2::ACL3	Plasmídeo 9428pb Kb, Kan ^R , LacZ α , MCS, Mob abrigando os genes de <i>lysR</i> , acil CoA desidrogenase e CoA transferase	Este trabalho
pBBR1 MCS-2::ACL4	Plasmídeo 10774 pb, Kan ^R , LacZ α , MCS, Mob abrigando os genes de <i>lysR</i> , acil CoA desidrogenase, CoA transferase e transportador	Este trabalho
pNPTS138	Plasmídeo 5361 pb, Kan ^R , oriT+ sacB+	DICKON ALLEY, M.R.K., trabalho não publicado.
pNPTS138:: α -oxdel	Plasmídeo 6144 pb, Kan ^R , oriT+ sacB+	Este trabalho
pEX18Ap	Plasmídeo 5842 pb, Amp ^R ; oriT+ sacB+	HOANG et al., 1998
pEX18Ap:: α -oxdel	Plasmídeo 6625 pb, Amp ^R ; oriT+ sacB+	Este trabalho
pCas9	Plasmídeo 9326pb, Cam ^R , ori p15A	JIANG et al, 2013
pTargetF	Plasmídeo 2118 pb, Spec ^R , ori pMB1	JIANG et al, 2015
pTargetF::gDNA	Plasmídeo 2356 pb, Spec ^R , ori pMB1	Este trabalho
pKNOCK	Plasmídeo 2098 pb, Kan ^R , oriT_RP4	ALEXEYEV, M.F., 1999

4.3 Pesquisa *in silico* dos genes envolvidos na via da α -oxidação e de outras vias envolvidas no catabolismo propionato em *B. sacchari*.

O *draft* do genoma de *B. sacchari* foi recentemente publicado (ALEXANDRINO et al., 2015). As pesquisas e anotações feitas neste genoma nesta dissertação empregaram o software de análise e anotações de sequências de DNA denominado RAST (AZIZ, 2008). Possíveis *open reading frames* (ORFs) foram analisadas no software *on-line* SoftBerry (SOFTBERRY, 2015). E análises para desenho de iniciadores foram realizados no SnapGene software (GSL Biotech; disponível em snapgene.com).

4.4 Pesquisa *in silico* dos genes envolvidos α -oxidação do propionato em *Ralstonia eutropha* H16.

Ralstonia eutropha é um organismo modelo na produção de PHA, ela também é capaz de produzir P3HB-co-3HV a partir de glicose e propionato (GUOCHENG, 2001). E assim como em *B. sacchari* já teve a via do 2MCC descrita (BRÄMER; STEINBÜCHEL, 2001), o que pode ser um indicio de que essas bactérias possuem metabolismo semelhante no consumo de propionato.

As possíveis sequências identificadas como genes atuantes na via da α -oxidação em *B. sacchari* foram utilizadas para pesquisa no genoma de *R. eutropha* H16 (POHLMANN, et al. 2006), que comparou sequências de nucleotídeos (BlastX) no banco de dados GenBank.

4.5 Testes fenotípicos dos mutantes UV.

Os mutantes UV (SILVA,1996) foram reativados e inoculados em MM acrescidos com fontes de carbono intermediários da α -oxidação (lactato, piruvato e acetato), propionato e sacarose, com concentração final de 1 g/L, com o objetivo de confirmar o fenótipo.

As placas inoculadas foram incubadas a 30°C por até 7 dias.

4.6 Clonagem de genes da via da α -oxidação para complementação dos mutantes UV.

Os iniciadores que flanqueiam os genes presentes do operon identificado foram desenhados no programa SnapGene Viewer e suas sequências estão descritas na tabela 4. Eles têm como objetivo de amplificar o operon, assim como partes deste separadamente com o intuito de testar as possíveis complementação nos mutantes UV, restituindo o fenótipo selvagem.

Tabela 4 - Iniciadores para amplificação dos genes da α -oxidação

Nome dos iniciadores	Sequência	Enzima de restrição
FW_lysR	ATTACT GGTACC ACGATCAGGTGAGCGCGTGA	KpnI
RV_lysR	ATCACT ACTAGTT GTCTCCAGGGTTTGTTCGG	SpeI
FW_prop. CoA	ATCTTC GGTACC TTTCGGTGTCTCCGTGTGCC	KpnI
RV_prop. CoA	GATAACT CTAGATT GCTCGAGTCTCACTGTGC	XbaI
FW_transp/carnitina	TGTTCA GGTACCC GCACAGTGAGACTCGAGCA	KpnI
RV_transp/carnitina	TATAC CCCCGGG CGTGGTGATGCTCGTCATGT	SmaI
FW_transportador	CATATC GGTACCC GAAGCATCAATACGCATAA	KpnI
RV_transportador	GATAT CTCTAGATT CGCACTCACACTGAGCGA	XbaI

O DNA foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior clonagem com a enzima PrimeSTAR HS DNA Polymerase (TAKARA Bio Inc, Japan). Para verificar os fragmentos de DNA de interesse foi realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE, com uma alíquota deste produto de PCR.

Após confirmação da amplificação dos fragmentos, o produto de PCR foi purificado. Utilizou-se para isso, o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Após purificação, estes fragmentos digeridos juntamente com o plasmídeo de clonagem pBBR1 MCS-2 (KOVACH et al., 1995), foram extraídos da *E. coli* DH10B (Durfee et al., 2008) com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). As enzimas utilizadas nesta digestão foram *EcoRI*, *ApalI* e *SalI* FastDigest™ (Thermo Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA), a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37 °C por 3 horas. Após a digestão, o plasmídeo e fragmentos de DNA foram novamente purificados, e em seguida foi montada uma

reação de ligação com a T4DNA ligase (New England BioLabs ®Inc, Ipswich, Massachusetts, EUA) seguindo a instrução do fabricante.

Os plasmídeos construídos foram transferidos, para estocagem, para *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008) eletricamente competentes por sucessivas lavagens com água e glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, USA). As células transformantes foram recuperadas em meio LB e mantidas em agitador rotativo a 37 °C, por 1 hora. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada.

Após o crescimento bacteriano dos transformantes de *E. coli* DH10B, o plasmídeo foi extraído da bactéria com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Os plasmídeos construídos foram inseridos, por transformação, aos LFM 177, LFM 186 e LFM 198 eletricamente competentes. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantidas em agitador rotativo a 30 °C, por 2 horas. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada.

4.7 Testes fenotípicos dos mutantes UV e mutantes UV transformados.

Os mutantes transformados foram inoculados em MM acrescidos com fontes de carbono intermediários da α -oxidação (lactato, piruvato e acetato), propionato e sacarose, com concentração final de 1 g/L e com a concentração adequada de canamicina, para verificação do fenótipo pós-transformação.

As placas inoculadas foram incubadas a 30°C por até 7 dias.

4.8 Ensaio em frascos agitados de acúmulo de PHA com mutantes UV complementados em agitador rotativo

As linhagens LFM 101 e LFM 177 abrigando o plasmídeo pBBR1 MCS-2, utilizadas como controles e a linhagem LFM 177 abrigando o plasmídeo pBBR1 MCS-2::ACL4 foram cultivadas em LB sólido acrescido de canamicina a 30 °C, 3 colônias deste cultivo foram inoculadas em LB líquido com o intuito de se obter um pré-inóculo

do ensaio, que foi incubado a 30 °C sob 150 rpm de agitação durante o período de uma noite. O pré-inóculo foi acrescentado ao MM líquido (ROCHA et al., 2008), a uma razão de 10% do volume final, com excesso de fonte de carbono, glicose 10 g/L e limitação de nitrogênio, 1 g/L. Este cultivo foi incubado a 30 °C, sob 150 rpm de agitação durante 24 horas. Após este período, foi adicionado o propionato como co-substrato, com a concentração final no cultivo de 1 g/L. Após adição do co-substrato, o cultivo foi incubado novamente a 30 °C sob 150 rpm de agitação por mais 48 horas. Foram tomadas amostras, em duplicata analítica, nos tempos de 0, 24 e 72 horas para determinação de massa seca celular (MCS), concentração de glicose e propionato, pH do meio de cultura e quantidade e composição dos PHA produzidos. Este ensaio foi realizado com base no protocolo descrito por Mendonça (2014) (Figura 6).

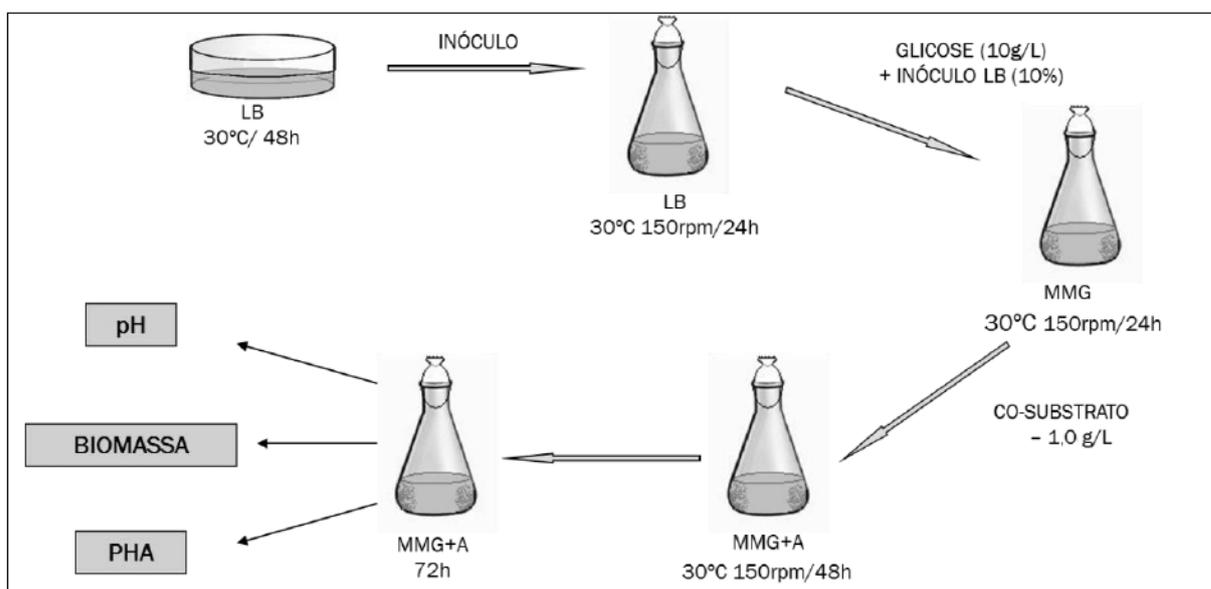


Figura 6 - Esquema geral do cultivo para acumulo em meio mineral com glicose e co-substrato (Mendonça, 2014).

Um segundo ensaio foi realizado, alterando-se somente as concentrações de glicose de 10 g/L para 15 g/L e de propionato de 1 g/L para 2 g/L. As outras condições de agitação e temperatura foram todas iguais.

4.9 Metodologias analíticas

4.9.1 Determinação de biomassa

A massa seca celular (MSC) foi obtida a partir de uma amostra de 5 mL do cultivo que foi centrifugada a 5000 rpm, por 20 minutos a 4 °C. As células foram

lavadas com solução salina 0,85% (m/v) e, posteriormente, liofilizadas para retirada de água. A massa obtida foi mensurada gravimetricamente.

4.9.2 *Teor de P3HB e 3HV*

A MSC obtida foi submetida à propanólise (RIIS; MAI, 1988). Entre 10 a 20 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos de vidro aos quais foram adicionados 2 mL de solução de ácido clorídrico e propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram hermeticamente fechados, agitados e colocados em banho quente a 100 °C por 3 horas, com agitações. Passado este tempo, os tubos foram resfriados e adicionaram-se 4 mL de água destilada, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases, a fase aquosa foi descartada, posteriormente adicionando-se sulfato de sódio anidro para retirada do restante da fase aquosa. E quando houve a separação completa das fases, a fase orgânica foi utilizada para análise.

Os propil-ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa em cromatógrafo HP7890A Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos da América), equipado com coluna HP-1 (100 % dimethylolysiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 320 µm e espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste - Nitrogênio (0,6 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 3 minutos, elevação da temperatura até 180 °C mantida por 5 minutos e, elevação da temperatura até 240 °C (6 °C/min), mantida por 1 minuto.

O ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich Chem. CO) foram utilizados como padrões para geração de curvas de padrão.

4.10 Sistema de deleção com plasmídeos suicidas.

O sistema de deleção utilizando plasmídeos suicidas consiste no uso de plasmídeos que não possuem origem de replicação para a bactéria que possui as regiões gênicas a serem inativadas. Desta maneira, estes precisam se integrar no

genoma para se manterem dentro da célula (SCHWEIZER, 2008). Para se promover a inativação, eles devem carregar cassetes de deleção, contendo fragmentos de DNA cujas sequências sejam similares às sequências de DNA presentes na região-alvo do genoma, favorecendo a ocorrência de uma recombinação homóloga entre o DNA genômico e o cassete no plasmídeo, resultando na substituição da região original pelo cassete de deleção. Esses cassetes podem conter sequências que flanqueiam a região que se tem interesse em deletar ou regiões que estão no meio do gene que se deseja interromper, para que possam fazer uma recombinação homóloga com o DNA genômico. Quando existem duas regiões de homologia (braços homólogos) no plasmídeo ocorrem 2 eventos de recombinação para obtenção o mutante (Figura 7) e, quando se possui uma região de homologia, apenas um evento de recombinação ocorre (Figura 8) (SUNG et al, 2009).

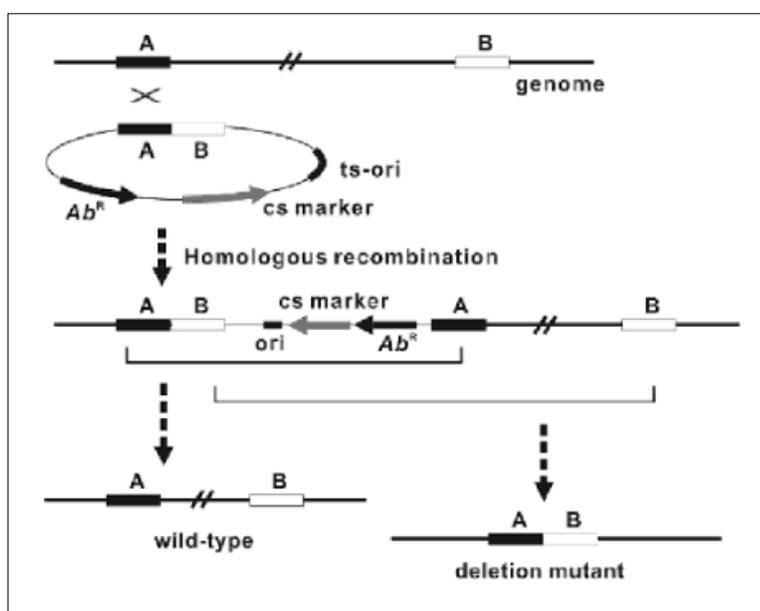


Figura 7 - Recombinação homóloga com plasmídeo suicida contendo duas regiões de similaridade no genoma (região A e B) com dois eventos de recombinação (Sung et al, 2009).

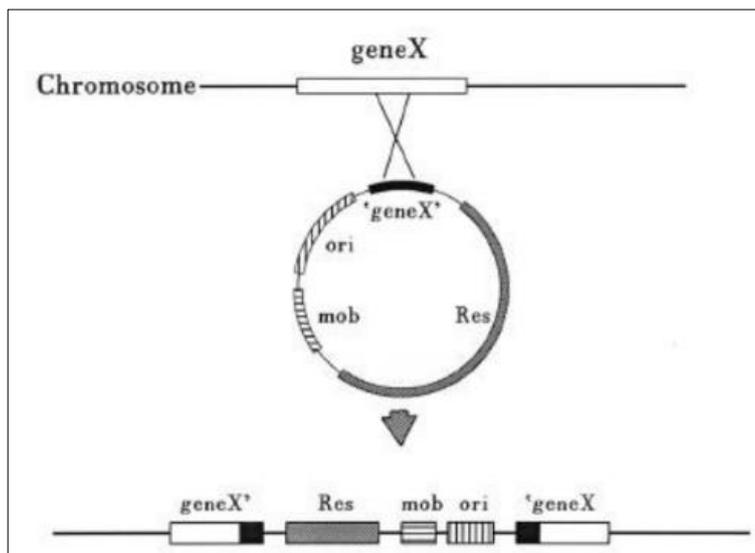


Figura 8 - Recombinação homóloga com plasmídeo suicida contendo uma região de similaridade no genoma, com um evento de recombinação (ALEXEYEV, 1999).

Três plasmídeos suicidas foram testados para deleção de genes por recombinação homóloga, com o intuito de se construir uma cepa mais promissora na produção de P3HB-*co*-3HV. Os plasmídeos utilizados foram: pNPTS138, pEX18Ap e pKNOCK (tabela 3).

4.10.1 Construção de estruturas para deleção utilizando pNPTS138 e pEX18AP

O cassete de deleção construído para o pNPTS138 foi o mesmo que foi inserido no pEX18Ap. Este cassete se caracterizou por conter duas regiões de homologia com o DNA genômico, desta maneira eram esperados dois eventos de recombinação. A detecção da segunda recombinação é possível de ser realizada porque estes plasmídeos contêm um gene *sacB*, utilizado para uma contra seleção, este gene resulta na produção de levansucrase, uma enzima que na presença de sacarose ira formar polímeros ramificados de derivados de frutose, o acúmulo deste polímero no espaço periplasmático de *E. coli*, resulta em toxicidade mortal para célula (YANO et al., 2005). Estudos mostram que esta ação tóxica também ocorre em diversas bactérias, tanto em Gram negativas quanto em Gram positivas (DENIS-LAROSE et al, 1998; JAGER et al, 1995). Assim, o uso deste gene para contra seleção irá selecionar clones que perderam espontaneamente o plasmídeo integrado

no genoma após o segundo evento de recombinação, sobrevivendo, assim, ao cultivo em meio contendo este substrato.

O cassete aqui utilizado foi construído a partir da amplificação das regiões chamadas de lysR del e acilCoA del, ilustrados na Figura 9. A escolha dessas regiões foi feita, porque elas flanqueiam as regiões nas quais estão os promotores e início dos genes acil CoA desidrogenase e regulador transcricional lysR. Regiões estas que devem sair do genoma após a recombinação homóloga, impedindo a transcrição do possível operon. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 5.

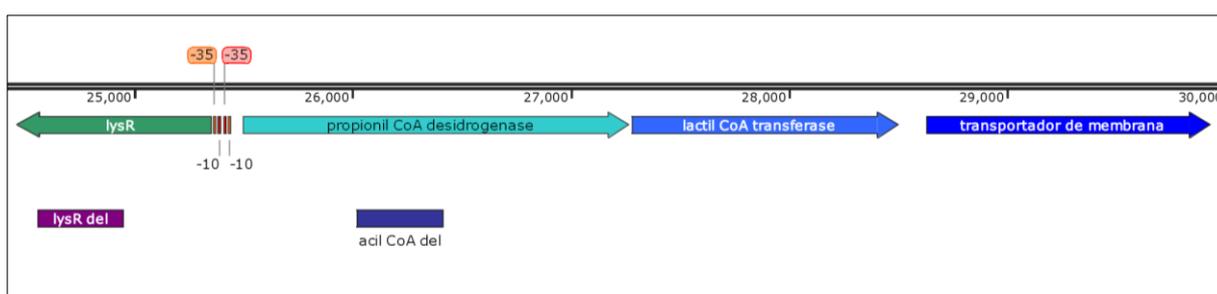


Figura 9 - Regiões amplificadas para construção de cassete de deleção do pNPTS138 e pEX18Ap.

Tabela 5 - Iniciadores desenhados para construção do cassete de deleção.

Nome do iniciador	Sequência	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento
FW_lysR del	TAATAG GAATTCT AAGGATTGCTTGCCAACGGCCG	EcoRI	387 Kb
RV_lysR del	TAGTAAG GGCCCT GAGCTGCAGCGTTTGCATATCG	Apal	
FW_acil CoA del	GCATCT GGGCCCT TAGACTTCGACACGCTCTACCAG	Apal	396 Kb
RV_acil CoA del	CGTTG AGTCGACT AGCGGCCATCTGATGAAAACCG	Sall	

Para o plasmídeo suicida pKNOCK foi utilizada apenas uma região de homologia (Figura 10) localizada no meio do gene acil CoA desidrogenase, primeiro gene a ser transcrito no possível operon. Assim esperava-se que deveria ocorrer apenas um evento de recombinação para interromper o gene em questão, que é o primeiro gene a ser transcrito no operon, a interrupção deste gene impediria a transcrição de todos os outros genes seguintes presentes no operon. Os iniciadores utilizados para amplificação deste fragmento estão na tabela 6.

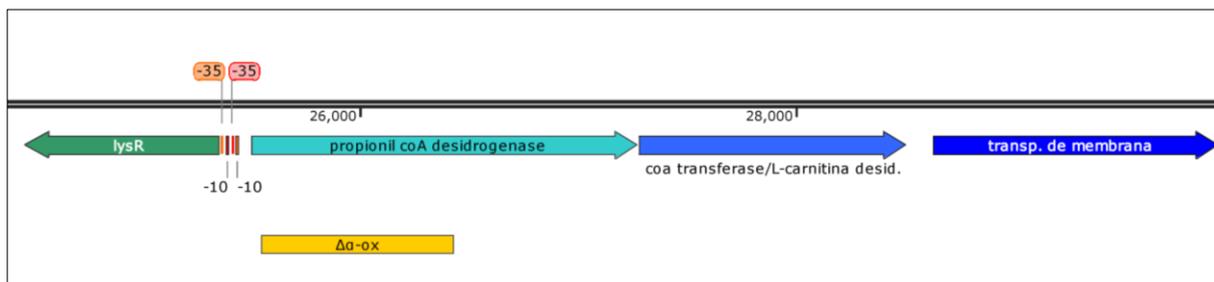


Figura 10 - Região amplificada para construção do cassete de deleção do pKNOCK

Tabela 6 - Iniciadores desenhados para construção do cassete de deleção do pKNOCK

Nome do iniciador	Sequência	Enzima de restrição	Tamanho do fragmento
P3	TTCCCGACTAGTGCGGCATCAACTTCTTCACG	BcuI	879 Kb
RV_Acil CoA. Del	CGTTGAGTCGACTAGCGGCCATCTGATGAAAACCG	Sall	

Para construção do cassete de deleção com os braços de homologia utilizados nos plasmídeos pNPST138 e pEX18Ap, os fragmentos de similaridade ao gene foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior clonagem com a mistura GoTaq® Green Master Mix ((M712) Promega, Madison, Wisconsin, USA), que contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs e MgCl₂ e tampão. Para verificar o sucesso na obtenção dos fragmentos de DNA de interesse, foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE (Tris(hydroxymethyl)aminomethane 0,04M, ácido acético 1M, EDTA dissódico (ácido etilenodiamino tetracético) 50mM pH-8), com uma alíquota deste produto de PCR.

Após confirmação da amplificação dos fragmentos desejados, o produto de PCR foi purificado com kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. O plasmídeo de clonagem foi extraído de *E. coli* DH10B com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Plasmídeo e fragmentos amplificados foram digeridos, separadamente, com as mesmas enzimas de restrição gerando extremidades coesivas.

As enzimas utilizadas nesta digestão foram *EcoRI*, *Apal* e *Sall* FastDigest™, a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a digestão, o plasmídeo e fragmentos de DNA foram novamente

purificados, e em seguida foi montada uma reação de ligação com a T4 DNA ligase seguindo a instrução do fabricante. O plasmídeo portando o cassete de deleção foi chamado de pNPTS138:: α -oxdel.

O plasmídeo pNPTS138:: α -oxdel foi inserido, por transformação, em *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008) e em *E. coli* S17-1 (SIMON et al, 1983) eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantido em agitador rotativo a 37°C, por 1 hora. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada. A construção foi inserida em *E. coli* DH10B para estocagem. A inserção em *E. coli* S17-1 visou a posterior transferência do plasmídeo, por conjugação para as células-alvo da deleção.

Para construção do plasmídeo suicida pEX18Ap portando o cassete de deleção, as células transformadas com o plasmídeo pNPTS138:: α -oxdel foram crescidas em meio LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada a 37°C “overnight”. Após o crescimento bacteriano, foi feita uma extração de plasmidial utilizando o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. O plasmídeo extraído foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Sall* FastDigest™, a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37°C por 30 minutos. O plasmídeo pEX18Ap também foi digerido com as mesmas enzimas. O cassete de deleção foi separado do plasmídeo pNPTS138 por eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE. Após a separação, o fragmento de DNA de interesse foi extraído do gel e purificado com o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, o pEX18Ap digerido também foi purificado. Em seguida, foi montada uma reação de ligação com a T4 DNA ligase seguindo a instrução do fabricante. O novo plasmídeo portando o cassete de deleção foi chamado de pEX18Ap:: α -oxdel. Foram feitos PCR com as colônias dos clones obtidos para confirmação da ligação. A mesma reação de PCR descrita para confecção do cassete, foi realizada neste procedimento.

O plasmídeo pEX18Ap:: α -oxdel, foi inserido, para estocagem, em *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008) e em *E. coli* S17-1 (SIMON et al, 1983) eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantido em agitador rotativo a 37 °C, por 1 hora. Após

esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada.

4.10.2 Construção de estruturas para deleção utilizando pKNOCK

Para construção do cassete de deleção do pKNOCK, o fragmento de similaridade ao gene foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior clonagem com a mistura GoTaq® Green Master Mix, que contém Taq DNA polimerase, dNTPs e MgCl₂ e tampão. Para verificar o fragmento de DNA de interesse foi realizada corrida de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE (Tris(hidroximetil)aminometano 0,04M, ácido acético 1M, EDTA dissódico (ácido etilenodiamino tetracético) 50mM pH-8), com uma alíquota deste produto de PCR.

Após a confirmação do tamanho do produto de PCR, o cassete de deleção, juntamente com o plasmídeo previamente extraído de *E. coli* S17-1 (SIMON et al, 1983) com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Para a digestão foram utilizadas as enzimas BcuI e Sall FastDigest™, a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37 °C por 30 minutos. O cassete de deleção e o plasmídeo passaram por outra eletroforese em gel de agarose 1% a 90 V por 50 minutos em tampão TAE. Após a separação, o fragmento de DNA de interesse foi extraído do gel e purificado com o kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Em seguida foi montada uma reação de ligação com a T4 DNA ligase seguindo a instrução do fabricante. O novo plasmídeo portando o cassete de deleção foi chamado de pKNOCK::Δα-ox.

O plasmídeo pKNOCK::Δα-ox foi inserido, para estocagem, em *E. coli* S17-1 (SIMON et al, 1983) eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantido em agitador rotativo a 37 °C, por 1 hora. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico canamicina na concentração adequada

A Figura 11 ilustra o esquema dos 3 plasmídeos suicidas construídos portando seus respectivos cassetes de deleção.

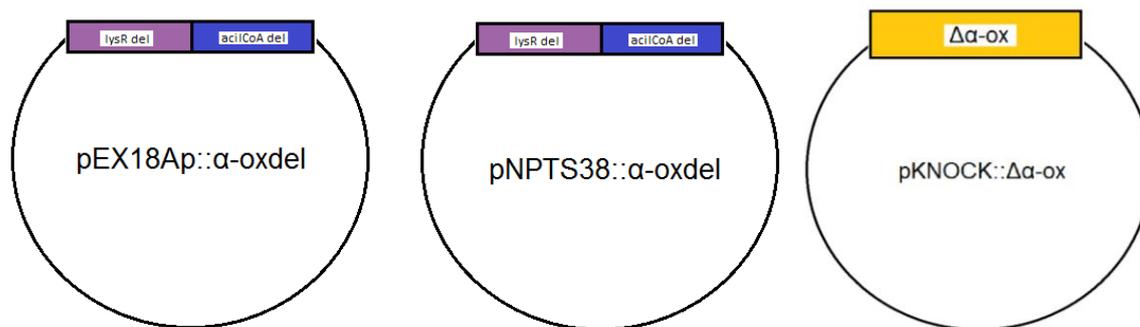


Figura 11 - Plasmídeos suicidas construídos para deleção sitio dirigida.

4.10.3 Experimentos para testar a obtenção de mutantes por inserção de pNTPS138::α-oxdel por de eletrotransformação.

Uma alíquota do plasmídeo, extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008), foi transferida para células de *B. sacchari*, por choque elétrico utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. Estas células foram rapidamente recuperadas em 1mL de LB líquido em foram mantidas em agitador rotativo a 30°C por 2 horas. Após esse período, o cultivo foi semeado em LB sólido com o antibiótico canamicina na concentração adequada.

4.10.4 Inserção do plasmídeo suicida pNTPS138::α-oxdel por conjugação.

Células de *B. sacchari* e *E. coli* S17-1 pNTPS138::α-oxdel foram crescidas por 18 horas com meio LB, quando necessário acrescido de antibiótico adequado para o experimento de conjugação ilustrado na Figura 12.

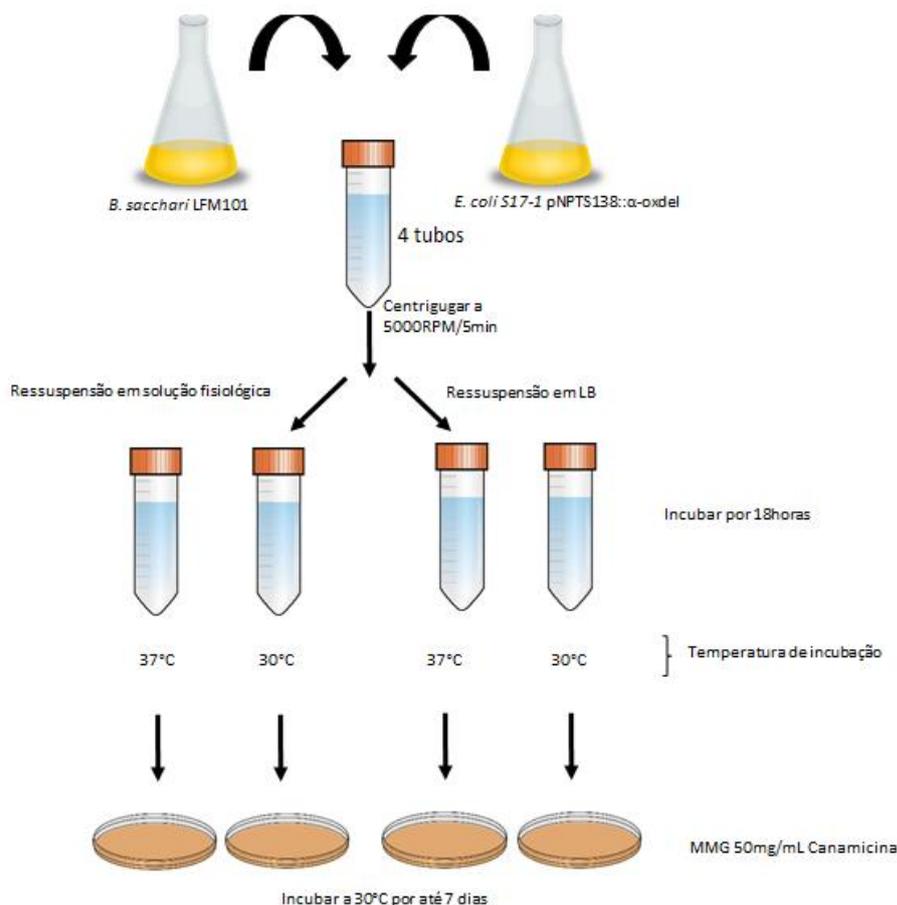


Figura 12 - Esquema do experimento de conjugação para a obtenção de um mutante sitio dirigido de *B. sacchari*.

4.10.5 Inserção do plasmídeo suicida pEX18Ap::α-oxdel por eletrotransformação.

Uma alíquota de 1 μL de plasmídeo pEX18Ap::α-oxdel, extraído com o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System da *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008), foi transferida para células de *B. sacchari*, por choque elétrico. Estas células foram rapidamente recuperadas em 1mL de LB líquido em foram mantidas em agitador rotativo a 30 °C, por 2 hora. Após esse período, o cultivo foi semeado em meio LB sólido com o antibiótico carbenicilina na concentração adequada.

4.10.6 Inserção do plasmídeo suicida pEX18Ap::α-oxdel por conjugação.

As linhagens de *B. sacchari* (selvagem) e *E. coli* S17-1 pEX18Ap::α-oxdel foram reativadas no dia anterior em meio LB líquido, quando necessário, com o antibiótico carbenicilina em concentração adequada. Uma alíquota de 30 μL do crescimento de *E. coli* S17-1 pEX18Ap::α-oxdel foi gotejada no meio sólido LB.

Enquanto a placa de LB ficou incubada para absorver o líquido, a cultura de *B. sacchari* foi incubada a 42 °C por 2 horas. Após este período, uma alíquota de 30 µL foi gotejada sobre o inóculo de *E. coli* S17-1 pEX18Ap::α-oxdel. Alíquotas de controle também foram inoculadas na mesma placa. O esquema da placa está ilustrado na Figura 13. Esta placa foi incubada a 30 °C por uma noite.

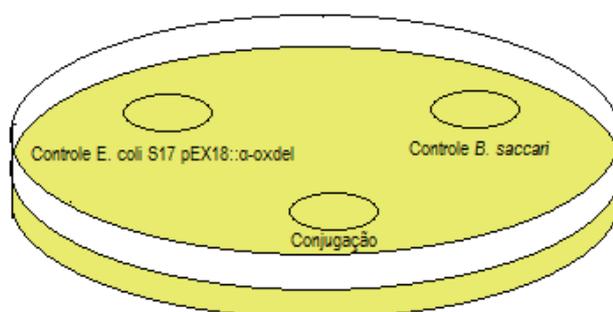


Figura 13 - Esquema de conjugação na placa de LB.

Com uma alça microbiológica, uma alíquota crescimento da conjugação foi coletada e suspensa em 400µL de LB líquido e agitada por 5 segundos em agitador de tubos. Esta suspensão ficou incubada por 2 horas em agitador rotativo a 30 °C. Posteriormente, esta suspensão foi inoculada em MM acrescido de glicose 1 g/L com o antibiótico carbenicilina, em concentração adequada. Neste meio, apenas células de *B. sacchari* que sofreram a recombinação com o plasmídeo devem crescer. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias.

As colônias crescidas neste meio foram novamente transferidas para meio MM acrescido de glicose 1 g/L, para a eliminação da *E. coli* S17-1 pEX18Ap::α-oxdel. Após o crescimento neste meio, as colônias foram inoculadas em LB no período de 18 horas, para o segundo evento de recombinação. Após este período foi inoculado uma alíquota deste crescimento em placas de LB contendo 20% de sacarose para contra seleção das bactérias que passaram pelo segundo evento de recombinação.

4.10.7 Inserção do plasmídeo suicida pKNOCK::Δα-ox por conjugação.

As linhagens de *B. sacchari* (selvagem) e *E. coli* S17-1 pKNOCK::Δα-ox foram reativadas no dia anterior em meio LB líquido, quando necessário, com o antibiótico canamicina em concentração adequada. Uma alíquota de 30 µL do crescimento de *E. coli* S17-1 pKNOCK::Δα-ox foi gotejada no meio sólido LB. Enquanto a placa de LB

ficou incubada para absorver o líquido, a cultura de *B. sacchari* foi incubada a 42 °C por 2 horas. Após este período, uma alíquota de 30 µL foi gotejada sobre o inóculo de *E. coli* S17-1 pKNOCK::Δα-ox. Alíquotas de controle também foram inoculadas na mesma placa. O esquema da placa está ilustrado na Figura 13. Esta placa foi incubada a 30 °C por uma noite.

Com uma alça microbiológica, uma alíquota crescimento da conjugação foi coletada e suspensa em 400µL de LB líquido e agitada por 5 segundos em agitador de tubos. Esta suspensão ficou incubada por 2 horas em agitador rotativo a 30 °C. Posteriormente, foi inoculada em MM acrescido de glicose 1 g/L com o antibiótico carbenicilina, em concentração adequada. Neste meio, apenas células de *B. sacchari* que sofreram a recombinação com o plasmídeo devem crescer. As placas foram incubadas a 30 °C por 2 dias.

4.11 Testes do sistema de deleção CRISPR.

O CRISPR consiste em um sistema imune que integra pequenos fragmentos de DNA exógeno em repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente intercaladas, do inglês, *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR). Estes *loci* são transcritos em pequenos RNAs (RNA guia) que reconhecem sequências cognatas em DNA exógeno (plasmídeos e vírus) quando estes estão em meio intracelular. Quando este evento de reconhecimento acontece, o ácido nucleico sinalizado pelo RNA guia é clivado por endonucleases denominadas Cas (do inglês, CRISPR associated protein) (HAURWITZ et al, 2010; JINEK et al, 2012).

O sistema de deleção CRISPR-Cas consiste na utilização dessas nucleases do sistema imune de procaríotos para reconhecer sequências específicas, de aproximadamente 20 nucleotídeos, adjacentes a uma região PAM, do inglês *protospacer adjacent motif* (PAM), no DNA genômico da bactéria marcadas por RNA guias (JIANG et al, 2013). A endonuclease Cas9 (do inglês, CRISPR associated protein 9) utilizada neste sistema vem do *Streptococcus pyogenes*, que reconhece nucleotídeos sinalizados por RNA guias estão adjacentes a 5'-NGG, a sequência PAM. Quando a Cas9 reconhece a região NGG ela cliva o DNA e, se não houver reparo após o corte esta célula deve morrer. Neste momento, se houver disponível um DNA molde, com a região NGG mutada ou ausente, as chances de ocorrer uma recombinação homóloga são muito altas. Uma vez que esta recombinação ocorra

entre o DNA genômico e o DNA molde não ocorre mais o reconhecido pelo RNA guia pela região do DNA genômico, desta maneira a Cas9 não tem sinalização para clivar o DNA.

Assim, braços de homologia que flanqueiam a região em que se deseja fazer a deleção, devem ser construídos para que sirvam de molde para o DNA clivado utilizar para o seu reparo. Estes braços devem ser construídos próximos às zonas de corte, porém não devem conter a região NGG (JIANG et al, 2013).

Para construção destes braços foram desenhados iniciadores (tabela 7) que amplificassem fragmentos de DNA genômico que flanqueiam as sequências de 20 nucleotídeos ao lado de uma NGG (gDNA) que servirá de molde para o RNA guia RNA guia escolhidas como alvo para enzima Cas9.

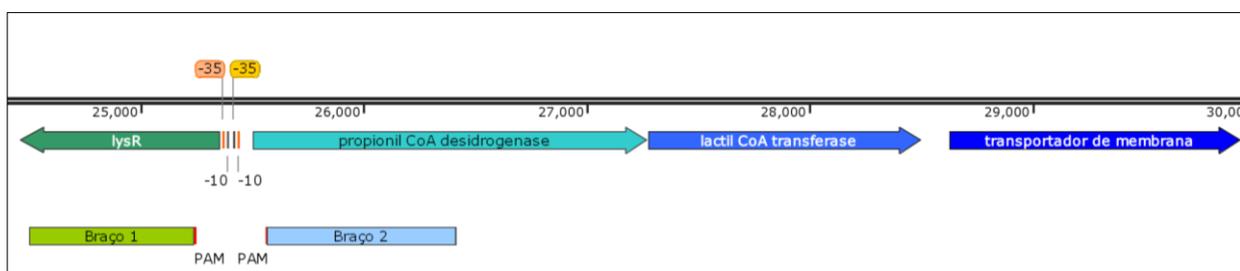


Figura 14 - Braços de homologia construídos logo após as regiões de corte (PAM) para o sistema de deleção CRISPR-Cas.

Os fragmentos de similaridade ao genoma foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior clonagem com a mistura GoTaq® Green Master Mix, que contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs e $MgCl_2$ e tampão. Para verificar o fragmento de DNA de interesse foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE (tris-base 0,04M, ácido acético 1M, EDTA 50mM pH-8), com uma alíquota deste produto de PCR. Os fragmentos foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Após a purificação ambos fragmentos foram digeridos com a enzima Bcul FastDigest™, a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a digestão, o fragmento de DNA de interesse foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e em seguida foi montada uma reação de ligação com a T4 DNA ligase seguindo a instrução do fabricante.

Após a ligação, os braços de homologia foram amplificados com os primers P1 e Acil CoA del RV (indicados na Tabela 7) através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para posterior clonagem com a mistura GoTaq® Green Master Mix, que contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs e MgCl₂ e tampão. Para verificar os fragmentos de DNA de interesse foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 1%.

Tabela 7 - Iniciadores que amplificam os braços de DNA homólogos aos DNA genômico

Nome do iniciador	Sequência	Enzima de Restrição	Tamanho do fragmento
P1 XbaI	GCGGT CTCT AGATGCGAAGCCTTGCACGATG	<i>XbaI</i>	760 Kb
P2 BclI	ACATCC ACTAGT TTCGAAGAGCAACTGGGCGTG	<i>BclI</i>	
P3 BclI	TTCCCG ACTAGT GCGGCATCAACTTCTTCACG	<i>BclI</i>	879 Kb
RV_ Acil CoA del	CGTTGAG TCGACT AGCGGCCATCTGATGAAAACCG	<i>SalI</i>	

Os DNA guias (gDNA), que foram utilizados para transcrição do RNA guia neste experimento foram sintetizados juntamente com os RNA *scaffold* (que contém a região do gDNA para o annealing e o scaffold para reconhecimento da Cas9) (Figura 15), pela empresa GENONE. As sequências de gDNA estão descritas na tabela na tabela 8.

Tabela 8 - Sequências dos gDNA

gDNA	Sequência
Guia 1	CCAGTTGCTCTTCGAACTTG
Guia 2	GCCAATATTCCCGATAGCCG

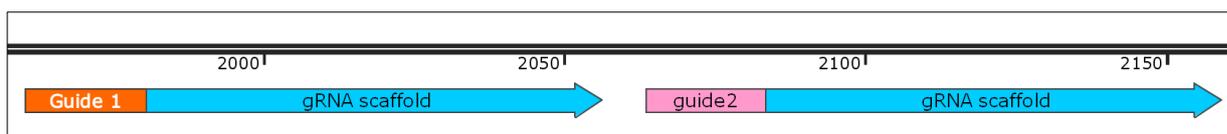


Figura 15 - Sequências de gDNA e scaffold sintetizadas.

Após a síntese eles foram inseridos no plasmídeo pTargetF amplificando-se o fragmento contendo os gDNA e scaffolds através da reação em cadeia da polimerase (PCR), os iniciadores utilizados nesta amplificação estão descritos na tabela 9.

Tabela 9 - Iniciadores utilizados para amplificação dos gDNA com scaffolds.

gDNA	Sequência	Enzimas de Restrição	Tamanho do fragmento
Guia 1 – FW	AAAGGG ACTAGT CCAGTTGCTCTTCGAACTTG	<i>BcuI</i>	212 pb
Guia 2 - RV	CGGCGG GAATTC AAAAAAGCA	<i>EcoRI</i>	

A clonagem foi realizada, com a mistura GoTaq® Green Master Mix, que contém *Taq* DNA polimerase, dNTPs e MgCl₂ e tampão. Para verificar os fragmentos de DNA de interesse foram realizadas corridas de eletroforese em gel de agarose 1% a 90V por 50 minutos em tampão TAE (tris-base 0,04M, ácido acético 1M, EDTA 50mM pH-8), com uma alíquota deste produto de PCR. Os fragmentos foram purificados com kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Após a purificação o produto de PCR e pTargetF foram digeridos com as enzimas *EcoRI* e *BcuI* FastDigest™, a reação foi montada seguindo instruções do fabricante e incubada a 37 °C por 30 minutos. Após a digestão, o fragmento de DNA de interesse foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System e em seguida foi montada uma reação de ligação com a T4 ligase seguindo a instrução do fabricante.

O plasmídeo resultante foi chamado de pTargetF::gDNA, este foi inserido, para estocagem, em *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008), eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantido em agitador rotativo a 37°C, por 1 hora. Após esse período, o cultivo foi inoculado em placas de LB com o antibiótico espectinomicina na concentração adequada.

4.11.1 Testes para obtenção de mutantes empregando o sistema CRISPR-Cas9.

O plasmídeo pCas9, contendo gene codificador da enzima Cas9, foi inserido em *B. sacchari* eletricamente competentes por lavagens com glicerol. O choque elétrico foi realizado utilizando o equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. As células foram recuperadas em meio LB e mantido em agitador rotativo a

30°C, por 2 horas. Após esse período, o cultivo foi semeado em placas de LB com o antibiótico cloranfenicol na concentração adequada e incubada a 30°C por 48 horas.

Após a transformação essas células contendo os plasmídeos foram cultivadas a 37°C e quando atingiram a densidade ótica de 0,5, foram lavadas com glicerol. Estas células receberam os braços de similaridade (DNA doador) e o segundo plasmídeo pTargetF::gDNA (Figura 8) via choque elétrico, com o auxílio do equipamento Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems. Experimento semelhante está ilustrado na Figura 16.

Após o choque elétrico estas células foram rapidamente recuperadas em 1mL de LB líquido em foram mantidas em agitador rotativo a 37 °C, por 3 horas. Neste momento, espera-se o gDNA sintetizado juntamente com o RNA *scaffold*, seja transcrito e o RNA resultante sinalize o local de clivagem no DNA para a Cas9. Após esse período de recuperação, o cultivo foi semeado em meio LB sólido com o antibiótico cloranfenicol e espectinomicina nas concentrações adequadas e posteriormente incubadas até 7 dias.

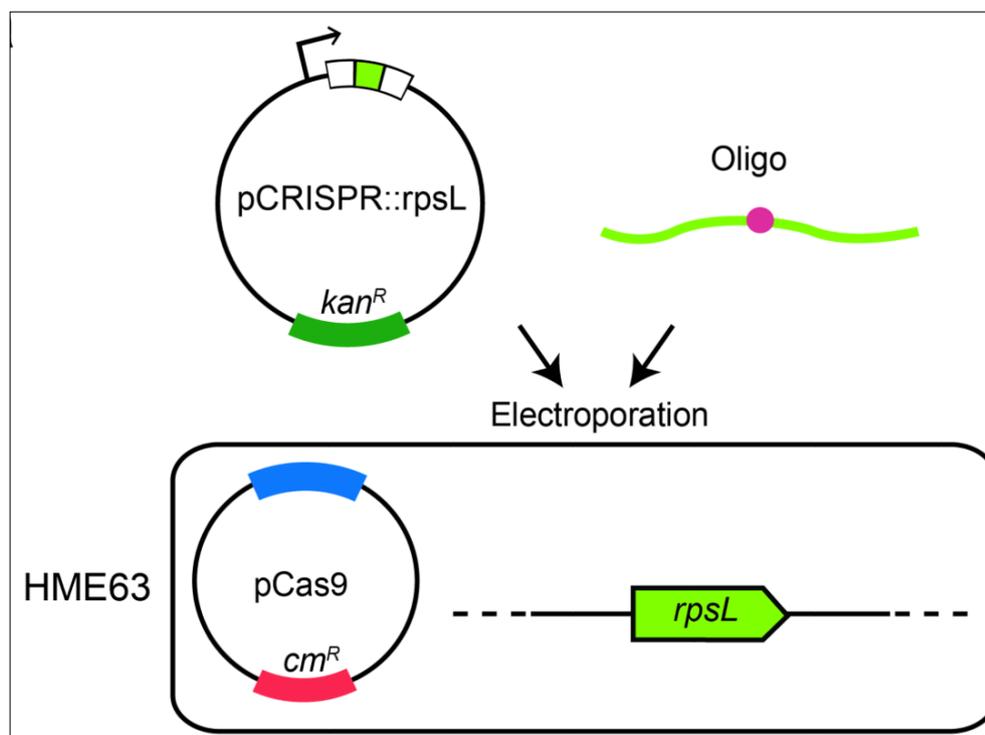


Figura 16 - Esquema do experimento para obtenção de mutantes CRISPR-Cas no qual a sequência alvo de gDNA inserida no plasmídeo pCRISPR e os DNA molde para recombinação são inseridos na bactéria que já contém o gene Cas9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pesquisa *in silico* da presença dos possíveis genes da via da α -oxidação e outras vias do catabolismo de propionato em *B. sacchari*

Essa pesquisa foi realizada utilizando os dados do draft do genoma de *B. sacchari*, recém-publicado que foi representado em por 121 contigs com um comprimento total de 7.265.069 pb (profundidade de cobertura, 49 \times) e um teor de G + C de 64,03%. O tamanho médio dos contigs é 60.042 pb, e o N50 é 208.943 pb. O software RAST (*Rapid Annotations using Subsystems Technology*) identificou 6 741 *ORF*, entre as quais havia genes relacionados com o catabolismo dos carboidratos, catabolismo de ácidos graxos, metabolismo de PHA. Nenhum gene relacionado à patogênese foi encontrado em *B. sacchari*. Somente um gene associado com resistência a antibióticos foi encontrado e associado com resistência à bacitracina (ALEXANDRINO et al, 2015).

A busca realizada no genoma com auxílio do software RAST identificou no contig 19 uma região com similaridade à sequência do regulador transcricional *lysR*. A sequência de nucleotídeos utilizadas para esta busca está representada na Figura 17. De acordo com as anotações e posição das *ORF* encontradas a montante do regulador transcricional *lysR*, verificou-se que se tratava dos três genes sugeridos por Cintra (2008), anotados como codificadores de acil CoA desidrogenase, CoA desidrogenase/L-carnitina desidratase e transportador de membrana MFS.

```
tagctgctgccccggccctgcaccgccagataccctgcgaagcctgacacgatggcgctcggttcgcccgtgctgtgagcc
tgagcacctgcgattcataaggattgctgccaacggccggaacaccgcgctcgccgccatggtgccgagcgccgcg
ggcagcgagcgatgcccattgccgaactccaccatgctcaccacggctgctccataagcgcgccctgtagcggatctgtg
actgaagcctgcatccacgcatgctgcatgatctgatcgataatgctggcgacaccgagcgcggaacaaaatgaac
ggctcgcgcgagcgcgggcgagctcgatgctgctgcccgcggaagcgggtggcccggcaggcagcacagaaa
tggctcggaaaatagcggctccgattgcacctcggcaggaaagcgccccagtgcggaagcccagatcgatatgaaa
cgctgacgcatggacctgctcgatgggttcatctcgcgagcagcagacctccaccgcgggatgatcttctgaagcgcc
ggaccgctcgggagcccgcgatacagcatcgagttgacgaagccgatgctgagcggcccgcgagcccattgctgccc
gagcgtgcccgcgatgctgcccactctgctggcctgttccagcagccgcccgcgcttctcgagcagcagctagcccgcgttcg
tgagcgcgacagcctgtgtgtgctcagcaattgacgcccagttgcttctgaacttgccgatgtcgaagctcagcgcg
ggctgagatgaagagccgcccgtgcccgcgcccgaagtgcagttcctcggccacggcaacgaaatagcgcaattgct
tgagttccat
```

Figura 17 - Sequência do regulador transcricional *lysR* utilizada para pesquisa no genoma de *B. sacchari*.

Considerando as posições das *ORF* encontradas e a posição do *lysR* pode-se identificar os genes adjacentes ao gene codificador do regulador transcricional. Estes tiveram suas sequências de nucleotídeos comparadas (BLASTX) com suas respectivas sequências de aminoácidos no banco de dados GenBank (Anexos A, B, C e D). As *ORF* identificadas sugerem a presença do operon com os genes identificados da seguinte maneira:

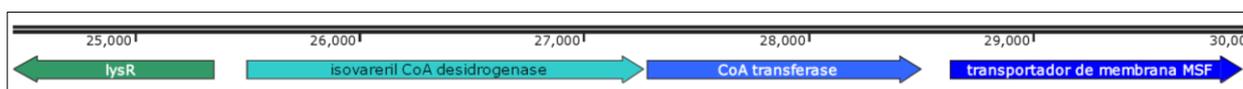


Figura 18 – Operon identificado no genoma de *B. sacchari*.

A análise atual se mostrou um pouco diferente da realizada por Cintra (2008). A atual análise sugere que o último gene do operon pode estar anotado de maneira equivocada no banco de dados. Anotado anteriormente como um transportador, atualmente está anotado como outro regulador transcricional do tipo *lysR*. Uma segunda análise foi realizada com esta sequência para verificar a incompatibilidade de informação da anotação proposta. A última possível sequência do operon foi analisada no pFam, (<http://pfam.xfam.org/> acesso em 15.06.15), software que prediz domínios enzimáticos, estrutura e função apenas com a sequência de DNA fornecida (Anexo D). Esta análise indicou que a sequência correspondia a um transportador de membrana do tipo “*major facility superfamily transporter*”, esta informação corrobora a análise de Cintra (2008), que foi realizada por comparação de um fragmento de biblioteca genômica capaz de complementar mutantes *prp*⁻ com sequências de genomas de outras *Burkholderia* spp, visto que, ainda não se havia sequenciado o genoma da *B. sacchari*. Este dado sugere que a anotação deste gene no GenBank está equivocada.

Além do gene do transportador, outro apresentou conflito de anotações entre a pesquisa atual e a realizada por Cintra (2008). O gene identificado como codificador de CoA transferase/*L*-carnitina desidratase, que se acredita ser responsável pela transcrição de uma proteína com dupla função, uma atuando na etapa de oxidação de acrilil-CoA a lactil-CoA (Figura 19) e outra na transferência da coenzima A da lactil-CoA para outra molécula, atualmente está anotado somente como uma CoA-transferase (Anexo 3 e 4). Neste caso, duas hipóteses podem ser consideradas. A primeira sugere que o gene pode transcrever uma enzima de função dupla, pois ainda

existem anotações que se referem aos genes da forma como foi encontrado por Cintra (2008), *L*-carnitina desidratase ou CoA transferase, e ambas as reações podem fazer parte da via. A outra hipótese sugere que seja a enzima transcrita tenha apenas uma função, a de CoA transferase, enquanto a outra reação de hidratação, que ocorre na transição de acrilil-CoA para lactil-CoA, seja atribuída a outra enzima transcrita por outro gene que participa de outras vias, como exemplo a enzima acetil CoA sintetase (Acs), enzima que converte o acetato a acetil CoA, que também é capaz de converter o propionato em propionil CoA (HORSWILL; ESCALANTE- SEMERENA, 1999)

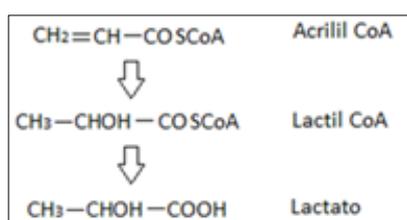


Figura 19 - Reações possivelmente catalisadas pela CoA transferase/*L*-carnitina desidratase.

Após esta análise, foi possível confirmar a hipótese de Cintra (2008) de que no genoma de *B. sacchari* há uma região que pode representar um operon codificando genes de α -oxidação. Apenas não conseguimos afirmar se o gene CoA-transferase/*L*-carnitina desidratase participa ou não de duas etapas da via. O operon pesquisado está descrito na Figura 20 com as nomenclaturas de genes encontradas no GenBank.

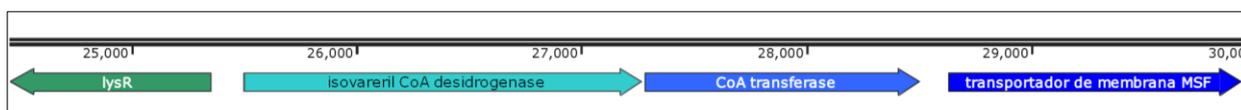


Figura 20 - Anotação do operon α -oxidação do propionato no genoma de *B. sacchari*.

Os mesmos contigs disponíveis, representando o draft do genoma que foram utilizados para a busca de genes envolvidos na α -oxidação, foram utilizados para uma pesquisa, por genes que possam estar envolvidos em outras vias de catabolismo do propionato. O RAST, assim como outros programas de anotação rápida, identifica *ORF* comparando com banco de dados de proteínas e, uma vez identificadas as *ORF*, elas são alinhadas ou com uma anotação de genoma de referência ou a totalidade de UniProt (Universal Protein Resource), um catálogo de informações de proteínas, usando ferramentas de alinhamento rápido de sequência, como BLAST por exemplo.

5.2 Pesquisa *in silico* dos genes envolvidos α -oxidação do propionato em *Ralstonia eutropha* H16.

Foi realizada a pesquisa da presença de genes que poderiam estar associados a uma via da α -oxidação de propionato em *R. eutropha* H16, devido a sua importância no estudo de PHA. Esta bactéria é conhecida há mais de 50 anos e atualmente é o organismo mais bem estudado se tratando de produção de PHA (REINECKE; STEINBÜCHEL, 2009), produzindo eficientemente diversos PHA, inclusive P3HB-co-3HV utilizando propionato, sendo assim, uma bactéria de interesse para se avaliar a presença desta via. O genoma de *R. eutropha* H16 foi sequenciado em 2006 por Pohlman e colaboradores, o qual relatou a sequência completa do genoma dos dois cromossomos: o cromossomo 1 (4,052,032 pares de bases (pb)) e o cromossomo 2 (2 912 490 pb), que codificam 6 116 genes putativos.

A busca foi realizada no GenBank, no qual, as sequências dos possíveis genes da via da α -oxidação de propionato, identificados no genoma de *B. sacchari*, tiveram suas sequências de nucleotídeos comparadas a sequências de aminoácidos individualmente (BLASTX). O resultado da pesquisa está representado na tabela 10.

Tabela 10 - Comparação de genes de *B. sacchari* pesquisados no genoma de *R. eutropha* H16

Gene	Max Score	Total score	Query cover	e- value	Identidade
Regulador transcricional lysR	250	250	97%	2e-82	48%
acil CoA desidrogenase	593	593	91%	0.0	62%
L-carnitina-desidratase/ CoA-transferase	401	401	87%	6e-139	64%
Transportador	508	508	93%	1e-179	69%

MAX SCORE: maior pontuação de alinhamento; TOTAL SCORE: soma das pontuações de alinhamento de todos os segmentos da mesma sequência de banco de dados; QUERY COVER: porcentagem da sequência submetida coberta pelo alinhamento; E-VALUE: número de falsos positivos; IDENTIDADE: número de resíduos similares identificados no alinhamento.

O alinhamento mostrou parâmetros estatísticos bons para comparação, com o E-value muito próximo de zero. Desta maneira podemos confiar no grau de identidade encontrados para cada gene. Se o alinhamento entre duas sequências for no mínimo de 20% (valor limite para detectar similaridade) podemos verificar que houve alinhamento significativo (Baxevanis & Ouellette (2001), visto que os valores de

identidade obtidos para cada gene foram bem superior a este, observa-se que houve alinhamento significativo entre as sequências que estão presentes no cromossomo 2 do genoma, mostrando que existe a possibilidade desta via estar presente e atuante em *R. eutropha* H16. A pesquisa mostrou também que estes genes se encontram agrupados como um operon, de maneira semelhante a que está organizado em *B. sacchari* (Figura 22).

Após este resultado, foram feitas análises nas sequências dos aminoácidos transcritos por estes possíveis genes identificados em *B. sacchari*, utilizando o software *on line* Pfam, o qual prediz regiões ativas das proteínas através da comparação com seu banco de dados.

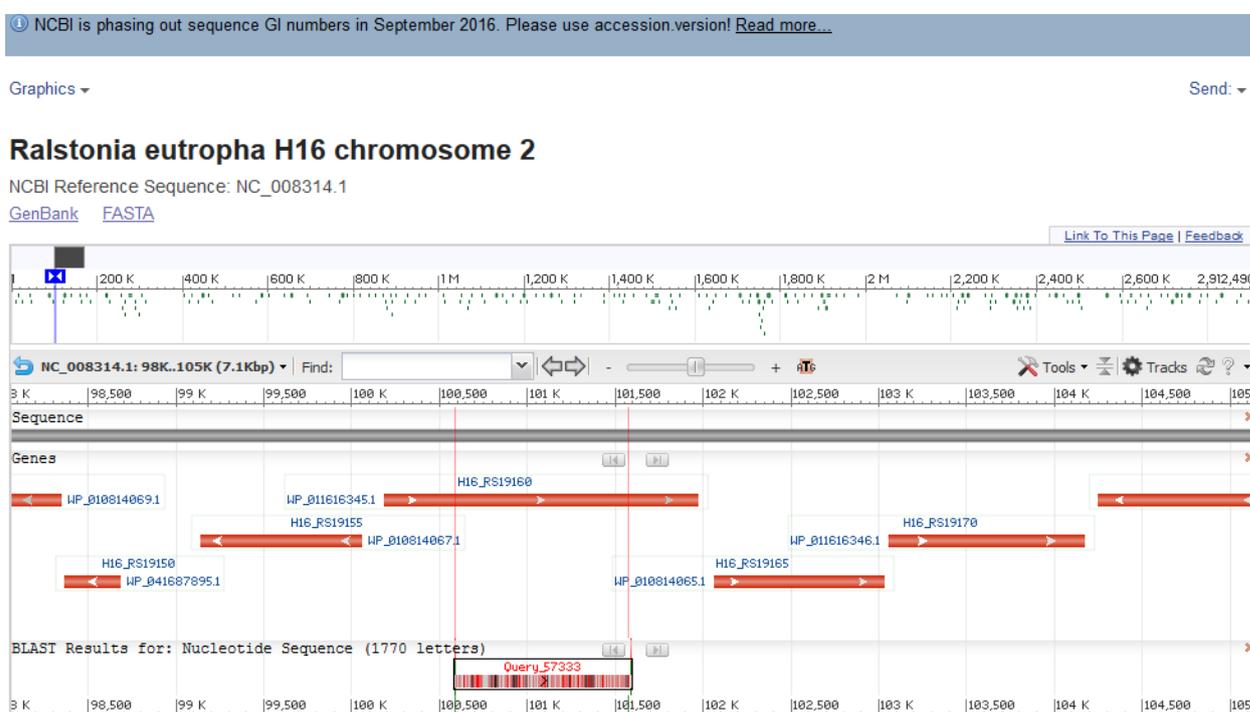


Figura 22 - Pesquisa de fragmento codificador de *acil*-CoA desidrogenase em *Ralstonia eutropha* H16. Houve alinhamento desta região e os genes adjacentes estão na orientação e sinalizados da mesma maneira que na via da α -oxidação em *B. sacchari*. As sequências anotadas como H16_RS19155 corresponde ao gene *lysR*, H16_RS19160 a codificador de *acil* CoA desidrogenase, H16_RS19165 ao de CoA-transferase e H16_RS19170 ao do transportador.

A sequência de aminoácidos foi alinhada utilizando o CLUSTAL, programa de alinhamento de múltiplas sequências, com outras sequências de *Ralstonia* spp: *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia* sp. MD27, *Ralstonia insidiosa*, *Ralstonia* sp. UNC404CL21Col, *Cupriavidus necator* N-1 e *Ralstonia eutropha* H16.


```

Ralstonia_eutropha_H16      IYEGTTAIQANDLVGRKTVRDGGAVARAICAQIVETEAAALGQHGGAAFTAVQAQLARGRA
*:** : * . * : * : . . : : . :
Paraburkholderia_sacchari  ALDSVAECGRDES-----VRQAASALYHATTAAFMACEAAQVSR-----GAQDY-
Ralstonia_pickettii        AIAKVAEDGSDEL-----VRQAGSALYHITTAIFMAVEGVRL-----APDH-
[Ralstonia_sp.             TIAKVAEEGSDEL-----VRQAGSALYHITTAIFMAVEGVRL-----APDH-
Ralstonia_insidiosa        TIAKVAEEGSDEL-----VRQAGSALYHITTAIFMALEGVCL-----APDH-
Ralstonia_sp.              AIAKVAEDGSDEL-----VRQAGSALYHITTAISMAVEGMRL-----APDH-
Cupriavidus_necator_N-1    MLHENPELLEAN-----ARRFAQGLVLTQAALMLAH-----ADTEN-
Ralstonia_eutropha_H16     ALEAVVEFVVANAKADPNAVFAGSVPYLKLKCGIVF--SGWQLARAMLAADAKSAEDPNFY
: * : . . . : : :
Paraburkholderia_sacchari  -RRLALAHLIVRHKLLPRDPLALDER--DASAAPLRALVDEHPLPLADAMQLLPAQ---
Ralstonia_pickettii        -RRLALAHLVLRHNLFPVDPLALPAN--DDAL-LLDALVKQREVSVFALAMQALPTGGAQ
[Ralstonia_sp.             -RRLALAHLVLRHKLFPVDPLALPES--DDAL-LFDALVKQREVSLALAVQALPAGGKQ
Ralstonia_insidiosa        -RRLALAHLVLRHKLFPVDPLALPES--DDAP-LFEALVKQREVSLALATQALPAGDAQ
Ralstonia_sp.              -RRLAFAHLVLRHKLFPMDPLDLPTN--DDAS-LFDALVKQREVPLALAMQALPTGAAQ
Cupriavidus_necator_N-1    -AEL-----FVASRLGRQHGVFVFTL--DADADVLKRVFSR-----GF-----EG----
Ralstonia_eutropha_H16     AAKIATALFFAEHVLQSSSAMCAAAATAGDVEVTYFRV-----
.: . * * * :

```

CoA transferase/L-carnitina desidratase

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

```

Paraburkholderia_sacchari  MNIHQRSETSAPGKVNGLHGLRVIDLSRVLGGPYCTQALADHGAQVIKLEPPVGDDETRG
Ralstonia_pickettii        -----MNAINGALHGLKVIDLSRVLGGPYCTQALADHGAQVIKLEPPVGDDETRT
Ralstonia_sp._MD27         -----MSAVNGALHGLKVIDLSRVLGGPYCTQALADHGAQVIKLEPPVGDDETRT
Ralstonia_insidiosa        -----MSAVNGALHGLKVIDLSRVLGGPYCTQALADHGAQVIKLEPPVGDDETRT
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col -----MSGPNGALHGLKVIDLSRVLGGPYCTQALADHGAQVIKLEPPVGDDETRT
Cupriavidus_necator_N-1    -----MTQTSFGALAGIRVVDLRILGGPYCGQILGDHGAQVLEPPVGDDETRT
Ralstonia_eutropha_H16     -----MMQSSPGALAGLRVIDLTQMLAGPFCTQILADHGAQVIKLEPPVGDDETRT
                               *** *::*:**::*:**::*:**::*:**::*:**::*:**::*:**::*:**::*
Paraburkholderia_sacchari  WGPFFLD-D---TSWYYMGVNRNKGIAVDLSRDEGRAILWQLLEGADVLVENFKPGTLA
Ralstonia_pickettii        WGPFFDES D---TAWYFNGVNRNKLGISVDLSNEEGRAVLWQLLEDADVLVENFKPGTLA
Ralstonia_sp._MD27         WGPFFDES D---TAWYFNGVNRNKLGISVDLSCDEGRAVLWQLLEEADVLVENFKPGTLA
Ralstonia_insidiosa        WGPFFDES D---TAWYFNGVNRNKLGISVDLSRDEGRAVLWQLLEDADVLVENFKPGTLA
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col WGPFFDES D---TAWYFNGVNRNKLGISVDLTCDEGRAVLWQLLEDADVLVENFKPGTLA
Cupriavidus_necator_N-1    WGPFFKDG V---A-SYYFGLNRNKRVMRLDLTADADREVLLVLLAEADVLVENFKGTME
Ralstonia_eutropha_H16     TAPFCEDDTLREYGGYFQSVNRNKRKRSIAVDLKTVEGLALARKLIDGADIVVENFRAGVME
.* : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Paraburkholderia_sacchari  RWGMDYERDLKPRFRLIHCAISGFGPD---GPLGGLPGYDAVIQAMAGLMSVNGESDG
Ralstonia_pickettii        RWGMDFERDLQPRFRLIHCAVSGFGPD---GPLGGLPGYDAAIQAMAGLMSVNGERDG
Ralstonia_sp._MD27         RWGMDFERDLQPRFRLIHCAVSGFGPD---GPLGGLPGYDAAIQAMAGLMSVNGERDG
Ralstonia_insidiosa        RWGMDFERDLQPRFRLIHCAVSGFGPD---GPLGGLPGYDAAIQAMAGLMSVNGERDG
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col RWGMDFERHLQPRFRLIHCAVSGFGPD---GPLGGLPGYDAAIQAMAGLMSVNGERDG
Cupriavidus_necator_N-1    KWGLGYD-TLSARFRLVHCRVSGFGAD---GPLGGLPGYDAAIQAMSGIMSINGEADG
Ralstonia_eutropha_H16     RLGGLGWE-RLRERNRPLVYGTVRGFGDPRSGASPYADWPAYDVVAQAMGMTGITGPDHQ
: * : : : * * **:: : : ** . * . * . * . * . * . * . * . * . * .
Paraburkholderia_sacchari  PALRIGLPIVDMVTGLNALAGILLALAEREKSGRQGSIDIALYDCGVSLLHPLHPNFYFG
Ralstonia_pickettii        GPMRVGLPIVDMVTGLNALAGILLALAEREKSGRQGSIDIALYDCGVSLLHPLHPNFYFG
Ralstonia_sp._MD27         GPMRVGLPIVDMVTGLNALAGILLALAEREKSGRQGSIDIALYDCGVSLLHPLHPNFYFG
Ralstonia_insidiosa        GPMRVGLPIVDMVTGLNALAGILLALAEREKSGRQGSIDIALYDCGVSLLHPLHPNFYFG
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col GPMRVGLPIVDMVTGLNALAGILLALAEREKSGRQGSIDIALYDCGVSLLHPLHPNFYFG
Cupriavidus_necator_N-1    DPLRVGLPVVDMVTGLNAVIGVLLALQERARSGRQGFVEAALYDSGLSLHPLHPANWFMS
Ralstonia_eutropha_H16     TPMKIGPGVGDITPALMLCIGILSAVHRVKETGKQGFVDMVAMTDAVLAMCERIVYQTSYT
: : * : * : * * ** * : . . : : * * : : * * : : . :
Paraburkholderia_sacchari  GRTPQRSNAHPNIAPYDSYATSTAPIFLAVGNDRQFAKLCAHLDPDLADDPFRANRS
Ralstonia_pickettii        GKVPQRSNAHPNIAPYDSYQTGTAPIFLAVGNDRQFAKLCAHIGATELQADARFAGNRS
Ralstonia_sp._MD27         GKVPQRSNAHPNITPYDSYQTGTPIFLAVGNDRQFAKLCTHIGVPELVEDACFADNRS
Ralstonia_insidiosa        GKVPQRSNAHPNITPYDSYQTGTPIFLAVGNDRQFAKLCAHIGVPELVEDARFADNRS
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col GKVPQRSNAHPNIAPYDSYQTGTAPIFLAVGNDRQFAKLCTHIGAAELTQDTRFADNRS
Cupriavidus_necator_N-1    GKTPQRTGNAHPNIAPYDVTATADPIFLAVGNDRQFRILCEHLRPLPALDDERYGTAGA
Ralstonia_eutropha_H16     GVVPGEGRNHRPLPCFGLFRARDGYVSIANDPLWEKLAAGHPELGTDPAFSTNAA
* . * * * * : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

```

Paraburkholderia_sacchari      RCAHRPELKAALAEARLTQHACEPLARDLISAGVPCGPVQTVDAVAAHPHQHRRLVEM-
Ralstonia_pickettii            RCAHRAALKHALEAHLARDFCETLAQDLIHGGVPCGPVLSVDVVARHPHTLHRQMVVEL-
Ralstonia_sp._MD27             RCAHRPELQKALEAQLARDFCETLAQDLIQGGVPCGPVLSVDVVARHPHTLHRQMVVEL-
Ralstonia_insidirosa           RCAHRAELKHALEAQLARDFCETLAQDLIHGGVPCGPVLSVDVVARHPHTLHRQMVVEL-
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    RSVNRVALKAELEARLREFDQKVLADELVAAGVPCAPVLSVADALQHPHTQHREMVVEME
Cupriavidus_necator_N-1       RVANMQQVIDLLEDFTSGR-TKEQIAAVLGGKVPFPGVCTSAEIFADPHYAVRQMLVDVE
Ralstonia_eutropha_H16        * .. : ** : : : . ** .** : .** *.*:***

```

```

Paraburkholderia_sacchari      DG-----YRGTGAPVKLSRTPATYRTPPPVVLGGDTRAVLDTLGDAAATQONLFDAGVVKG
Ralstonia_pickettii            GD-----YRGTGSPIKLSRTPATYRNAPPALGADTDAVLASLGIDADTRQRLFQAGVVK-
Ralstonia_sp._MD27             GE-----YRGTGSPIKLSRTPATYRNAPPALGADTDAVLASLGIDTETRQRLFQAGVVK-
Ralstonia_insidirosa           GD-----YRGTGSPIKLSRTPATYRNAPPALGADTDAVLASLGIDTETRQRLFQAGVVK-
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    GT-----YRGTGSPIKLSRTPATYRNAPPALGADTDAVLASLGIDADTRQRLFQAGVVK-
Cupriavidus_necator_N-1       GG-----YQGLGAPVKLSRTPATYRYAPLTEGDEFD-----
Ralstonia_eutropha_H16        QPGSAQRVKIAGVPIKLSDTPGAVRRRAPMLGEHTDEVLRAGYSGDDIDDLRAVGAIR-
                               : * *.*:*** :*: * * .

```

Transportador

CLUSTAL O(1.2.2) multiple sequence alignment

```

Paraburkholderia_sacchari      ----MTSITTRQPARASLAAEYVGTIEWYDFYIYATAAALIFGKLFPPSNEPFYSTLASE
Ralstonia_pickettii            --MQPSQPGGRQPARAATAAFVGTMIIEWYDFYIYATAAALVFGPLFFPGGDPFLSTLASF
Ralstonia_sp._MD27             --MQPSHSGGRQPVRAATAAFVGTMIIEWYDFYIYATAAALVFGPLFFPGGDPFLSTLASF
Ralstonia_insidirosa           --MQSSQPGGRQPARAATAAFVGTMIIEWYDFYIYATAAALVFGPLFFPGGDPFLSTLASF
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    MSTLQPSSTATHQPVRAATAAFIGTAVEFYDYTYATAAALVIGEVFFPSSNHFLSTMASF
Cupriavidus_necator_N-1       --MQVSPSGTRQPVRAATAAFVGTMIIEWYDFYIYATAAALVFGPLFFPGGDPFLSTLASF
Ralstonia_eutropha_H16        -----KVILASSFGALMEWYDFYIYAAL-AVYFGALFFPKGNETAFLASL
                               :. * :.*: :*:***:* ** : * :* :*** : : :***:

```

```

Paraburkholderia_sacchari      GTFVAGFFARPLGGIVFGHWGDRIGRKKALVATLSIMGLGVGIGFLPTYASAGALAPAL
Ralstonia_pickettii            GTFVAGFFARPLGGIVFGHWGDRIGRKKALMITLTMGLATIGIGLLPTYATAGALAPVL
Ralstonia_sp._MD27             GTFVAGFFARPLGGIVFGHWGDRIGRKKALMITLTMGLATIGIGLLPTYATAGALAPVL
Ralstonia_insidirosa           GTFVAGFFARPLGGIVFGHWGDRIGRKKALMITLTMGLATIGIGLLPTYATAGALAPVL
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    ATFFVGFARPLSGAVFVGHGDRIGRKKMLLVTFMGLIATGIGLLPGYATIGIWIAPIL
Cupriavidus_necator_N-1       GTFVAGFFARPLGGIVFGHWGDRIGRKKALMTTMMMGVATIGIGLLPTYATAGAIAPVL
Ralstonia_eutropha_H16        ATFGAGFLIRPVGALLFGRGLDGRKYTFLVTLILMGVATVGVGLPTYEQIGITATVL
                               **. **.*: ***:.. :***: ** ** ** : : * :***:.. * * . * * *

```

```

Paraburkholderia_sacchari      LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-SVAH
Ralstonia_pickettii            LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-LVTS
Ralstonia_sp._MD27             LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-LVTS
Ralstonia_insidirosa           LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-LVTS
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-LVSS
Cupriavidus_necator_N-1       LVLRVQGIAGVGGEGGAVLMAGEHAPKGRRTFFASFAQLGSPAGLILSLLAFR-AVTS
Ralstonia_eutropha_H16        LVLRLLQGLALGVEVGGAVTYVAEHSVHKKRGLYTSLSLQTTATLGLDLSLLVYLKTF
                               ** **.*: ***:*** ** ** ** ..**:* :* : * * : ** : ** : ** :

```

```

Paraburkholderia_sacchari      LDKAALFSWGWRPLPFASAVLLVGLLIRSGVGSPEFEALKTQRRTAALPILDVLRD--
Ralstonia_pickettii            MEKDAFMDWGRPLPFASAVLLVGVVIRLGVNESPEFAQVQAQRKTAKLPIAEVWRT--
Ralstonia_sp._MD27             MEKDVFMWGRPLPFASAVLLVGVAAIRSGVNESPEFAQVQAQRKTAKLPIAEVWRT--
Ralstonia_insidirosa           MEKDVFMWGRPLPFASAVLLVGVAAIRSGVNESPEFAQVQAQRKTAKLPIAEVWRT--
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    LDHESFITWGRPLPFASAVLLVGVVIRMGVKESPEFERMKQNNVLEKPNVGEVLR--
Cupriavidus_necator_N-1       MEHDVFMWGRPLPFASAVLLVGVVIRLGVNESPEFAQVQAQRKTAKLPIAEVWRT--
Ralstonia_eutropha_H16        LTEAEFRWGRPLPFIVSLVLMVLSVYIRGKLHESPVFARMKAANTTSRAPIRESFTNWK
                               : . : * **.*:***:.. ** : * ** * : : . . * : :

```

```

Paraburkholderia_sacchari      -SWRTVLLCL---GANVIGVAGAFVNTFMLNYTTQTGLGLDRALILDCLFVVAFIQFFTG
Ralstonia_pickettii            -ARVPVLLCI---GANTIGIAGVYFTNTFMIAIYATQYLSLSRTLLDCLFVVAFIQFLAQ
Ralstonia_sp._MD27             -ARVPVLLCI---GANTIGIAGVYFTNTFMIAIYATQYLSLSKTLILDCLFAVAFIQFLAQ
Ralstonia_insidirosa           -ARVPVLLCI---GANTIGIAGVYFTNTFMIAIYATQYLSLSKTLILDCLFAVAFIQFLAQ
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    -AWRPVILAA---MATTIGSAGFFFTNTFMISYVTYTLGMSKALILDCLFVVTIQLLSQ
Cupriavidus_necator_N-1       -ARVPVLLCI---GANTIGIAGVYFTNTFMIAIYATQYLSLSRTLLDCLFAVAFIQFLAQ
Ralstonia_eutropha_H16        NLRVLLLVVVAAGLGAIFGTGHFYSMFFLNKTLHVPLETVHML-IGIALV---VATPCY
                               ::* * . * * : : * : * : * : : . :

```

```

Paraburkholderia_sacchari      LASGWFAQRVAGRFLKLAAGLAMLSPYPMFVVLVSTGKPAAIIVVGIATIAVCMSSSYAVM
Ralstonia_pickettii            PLAAWLAELKGGARFLKLMALLMAMASPYPMFLLVQTRQAPLMVLGIALAVVCMASFYSVI
Ralstonia_sp._MD27             PLAAWLAELKGGARFLKLMALLMAMASPYPMFLLVQTRQAPLMILGIAIIVVCMASFYSVI
Ralstonia_insidirosa           PLAAWLAELKGGARFLKLMALLMAMASPYPMFLLVQTRQAPLMILGIAIIVVCMASFYSVI
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col    PVSALLAQRYGDRFLTWAAFISMLTPYPMFLLVSTQNPVAMVAGITLAVVTLTSAVYAVI
Cupriavidus_necator_N-1       PLAAWLAELKGGARFLKLAALLMAMASPYPMFLLVQTRQAPAIIVLGIALAVVCMASFYSVI

```

```

Ralstonia_eutropha_H16      LLFGWLSDRIGRKYIMMAACLLAAVCIQPVF-----
.  :::: *   ::   .  ::   *:*

Paraburkholderia_sacchari  AGFMTNAFPVRVRYSAISVSYQCCAALAGGLTELVGTTLLAHDFPGQWWPLALFYSALAAV
Ralstonia_pickettiii       AGFVSGVFETRVRYS AISLSYQVCGAVAGGLTPLIGTTLAQRFHGQWWPLAVFYTLLAGI
Ralstonia_sp._MD27         AGFVSGVFETRVRYS AISLSYQVCGAVAGGLTPLVGTTLAQRFHGEWWPLAVFYTLLAGV
Ralstonia_insidiiosa      AGFVSGVFETRVRYS AISLSYQVCGAVAGGLTPLVGTTLAQRFHGEWWPLAVFYTLLAGV
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col AGFMTPAFPTRVRYSGIS IAYQVCTMIAGGTTPLIGTMLAERYKGEWLPLALFFFTVLSAI
Cupriavidus_necator_N-1   AGFVSGVFETRVRYS AISLSYQVCGAVAGGLTPLVGTTLAQRFGQWWPLAVFYTLLAGV
Ralstonia_eutropha_H16    -----

Paraburkholderia_sacchari  SLGCIAVLQRRQPAQAAGAAIALTE-
Ralstonia_pickettiii       SLLSIAAIDARQRDSATAANAVGA---
Ralstonia_sp._MD27         SLLCIIAIDARQRGRAPAGDAVNA---
Ralstonia_insidiiosa      SLVCITAIIDARQRGRAPAGDAVNA---
Ralstonia_sp._UNC404CL21Col SLIGIIGLGRYRDG-KQPEESTALATN
Cupriavidus_necator_N-1   SLLCIASIDARQRQPQPAQAQA--
Ralstonia_eutropha_H16    -----

```

Os símbolos asterisco (*), ponto (.) e dois pontos (:), observados na linha inferior em cada série de alinhamento, indicam máxima identidade entre todas as sequências analisadas, alteração de um resíduo de aminoácido ou alteração de dois aminoácidos, respectivamente. Em destaque, regiões em realce com cores, estão as possíveis regiões ativas da proteína identificadas pelo software Pfam. Quando estas regiões ativas são visualmente comparadas a sequências de outras espécies analisadas, podemos perceber que houve um certo grau de conservação nestas regiões, havendo poucas deleções ou trocas de aminoácidos nas regiões dos sítios ativos, uma análise mais detalhada deve ser realizada para confirmar se essa enzima não tem alteração em sua função devido a essas pequenas diferenças entre o alinhamento com as sequências de *B. sacchari*, porém, corroboram a hipótese de existência de possíveis genes envolvidos na via da α -oxidação no consumo de propionato, também em espécies de *Ralstonia spp.*

5.3 Verificação da capacidade dos potenciais genes da α -oxidação detectados restituírem o fenótipo selvagem a mutantes *prp⁻*.

A detecção de um possível operon no genoma de *B. sacchari* e sua anotação permitiram propor sua amplificação e clonagem com a finalidade de testar sua capacidade de restituir o fenótipo selvagem em mutantes UV *prp⁻*, deficientes no consumo de propionato e intermediários da α -oxidação, anteriormente obtidos (Silva, 1998, Silva et al., 2000). Para isso, foram desenhados os iniciadores indicados em material e métodos (item 4.6) para amplificar os genes detectados para sua clonagem em plasmídeos.

Regiões do operon foram amplificadas de maneira que foram realizados quatro tipos de construções, a primeira com apenas o regulador transcricional *lysR* (fragmento ACL1), a segunda com o regulador transcricional *LysR*, juntamente com a acil CoA desidrogenase (fragmento ACL2), o terceiro com o regulador transcricional *lysR*, acil CoA desidrogenase e CoA-transferase/L-carnitina desidratase (fragmento ACL3) e o quarto com o possível operon por completo (fragmento ACL4). Estas construções foram feitas para clonar no plasmídeo com o intuito de verificar se apenas alguns genes seriam capazes de restituir o fenótipo selvagem ou seria necessário o operon inteiro para fazê-lo. O procedimento para essas clonagens foi descrito no item 4.6. As fotos dos géis de eletroforese para confirmação da amplificação dos genes estão inseridas abaixo (Figura 23). Para as amplificações que apresentaram bandas de fragmentos de DNA oriundos de *annealing* inespecífico dos iniciadores, a banda de interesse foi excisada do gel para posterior purificação, digestão e ligação. Quando não havia banda inespecífica o produto de PCR foi purificado diretamente. Os produtos de PCR foram inseridos individualmente no plasmídeo pBBR1MCS2 e analisados por tamanho esperado, totalizando quatro construções (Anexo J)

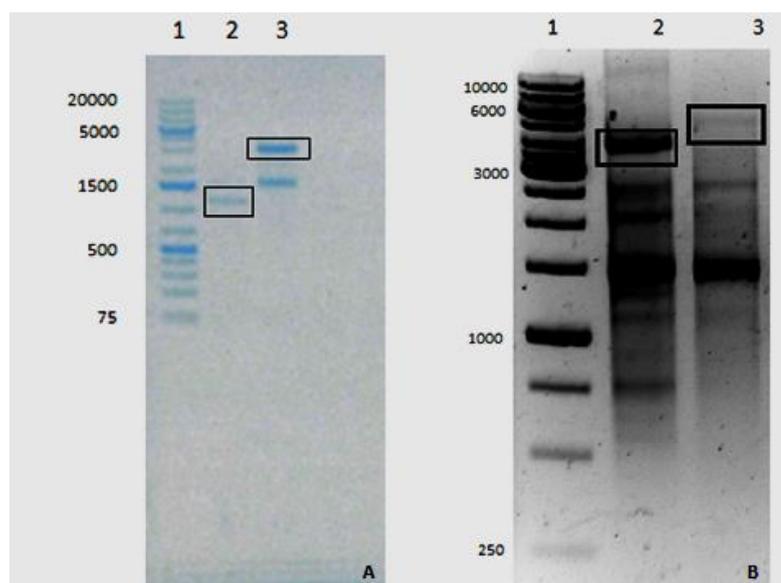


Figura 23 –Gel A: as figuras representam as bandas de fragmentos de DNA com o tamanho aproximado. Gel A: Produto de PCR 1: marcador de peso molecular 1kb, 2: *LysR* (1074pb); 3: *LysR*+acil CoA desid. (2861); Gel B: 1: marcador de peso molecular 1kb; 2: *LysR*+acil CoA desid.+CoA transferase./L-Carnitina desidratase (4200pb); 3: *LysR*+acil CoA+ CoA transferase./L-Carnitina desidratase+ transportador MFS

As construções foram inseridas em *E. coli* DH10B (DURFEE et al., 2008) por eletrotransformação. Após o crescimento, as colônias brancas, ou seja, aquelas em

que os plasmídeos se ligaram ao fragmento de DNA de interesse interrompendo o gene *lacZ*, foram selecionadas e tiveram seus plasmídeos extraídos para que uma digestão simples fosse feita com o intuito de confirmar a ligação entre plasmídeo e fragmento de DNA de acordo com seu tamanho. Para isso, os plasmídeos passaram por uma digestão simples e posterior eletroforese (Figura 23). Em seguida, foram inseridos por eletrotransformação para *B. sacchari* e seus mutantes *prp*⁻.

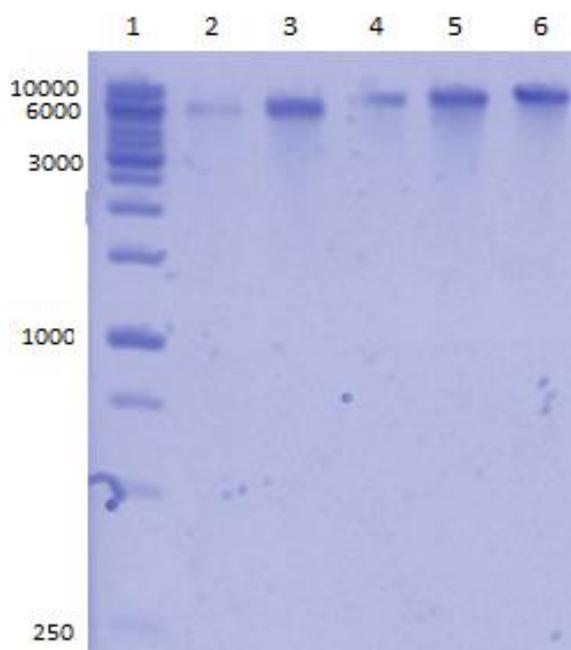


Figura 24 –Gel de eletroforese mostrando a migração de plasmídeos portando os insertos linearizados após digestão com a enzima *HindIII*. 1: Marcador 1kb, 2: pBBR1 MCS2 (5144pb), 3: pBBR1 MCS2::ACL1 (6218kb), 4: pBBR1 MCS2::ACL2 (8005pb), 5: pBBR1 MCS2::ACL3 (9344pb), 6: pBBR1 MCS2::ACL4 (10690pb).

5.4 Confirmação dos fenótipos dos mutantes UV *prp*⁻.

Antes da transformação, os mutantes foram submetidos a testes fenotípicos para verificar a manutenção do fenótipo dos mutantes UV *prp*⁻, após o armazenamento da cepa. O teste identificava o crescimento em meio mineral acrescido de fonte de carbono (sacarose, acetato, piruvato, lactato e propionato).

Tabela 11 - Crescimento de mutantes *prp* de *B. sacchari* em intermediários da α -oxidação e propionato.

<i>Linhagens</i> <i>Meios</i>	<i>MMS</i>	<i>MMP</i>	<i>MMLac</i>	<i>MMPir</i>	<i>MMAc</i>
LFM 101	+++	+++	+++	+++	+++
LFM 177	+++	---	---	---	+++
LFM 182	+++	---	---	---	---
LFM 184	+++	---	---	---	+++
LFM 186	+++	---	+	+	+++
LFM187	+++	---	---	---	+++
LFM 191	+++	+++	+++	+++	+++
LFM 198	+++	---	---	---	---

+++ : Crescimento altamente visível. ++ : crescimento visível. + : crescimento dificilmente visível. --- : ausência de crescimento. MMS: meio mineral com sacarose, MMP: meio mineral com propionato, MMLac: meio mineral com lactato, MMPir: meio mineral com piruvato, MMAc: meio mineral com acetato.

O resultado original se confirmou para todas as fontes de carbono, exceto acetato, apresentando-se diferente, portanto, dos resultados obtidos por Cintra em 2008 e Silva 1998, porém todos ainda se apresentaram com fenótipo negativo para crescimento em propionato e afetados no consumo deste substrato pela α -oxidação (tabela 11).

5.5 Inserção de fragmentos de DNA codificando prováveis genes da α -oxidação em mutantes *prp*⁻ e testes fenotípicos com os clones obtidos.

Após o teste fenotípico, os mutantes UV LFM 177, 186 e 198 foram selecionados para serem testados. Estas cepas foram as escolhidas por serem cepas complementadas com os fragmentos de DNA da biblioteca genômica (Cintra, 2008) e ainda possuírem alteração no consumo de propionato e intermediários da α -oxidação.

Culturas apropriadamente preparadas destas cepas foram lavadas com glicerol deixando-as competentes para eletrotransformação (item 4.6) com os plasmídeos portando as quatro construções com os genes amplificados e o plasmídeo sem inserto algum, como controle (pBBR1 MCS-2::ACL1, pBBR1 MCS-2:: ACL2, pBBR1 MCS-2:: ACL3, pBBR1 MCS-2:: ACL4 e pBBR1 MCS-2, respectivamente).

Após a obtenção de clones dos mutantes *prp*⁻ com as construções anteriormente descritas, foi realizado novamente o teste fenotípico dos mutantes *prp*⁻ (item 4.7) e os resultados estão na tabela 12. O crescimento em MM contendo

propionato como única fonte de carbono foi observado para cada linhagem (Figura 25).

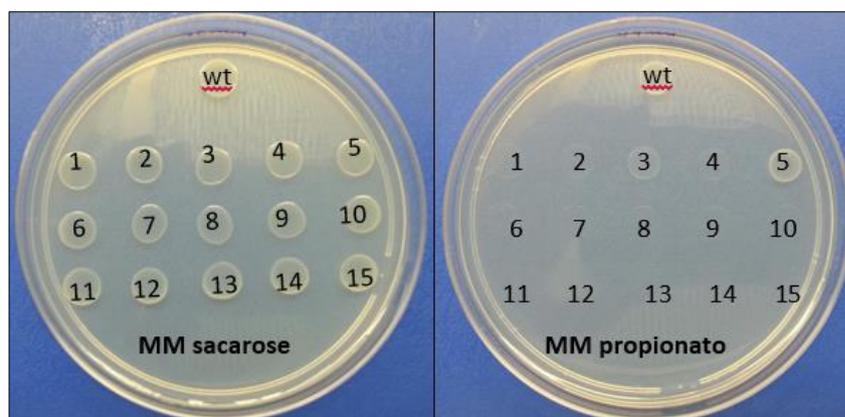


Figura 25 –Regiões genômicas de *B. sacchari*, propostas como envolvidas no catabolismo de propionato, foram inseridas em mutantes *prp* e a capacidade de restituir o fenótipo *prp*⁺ (crescimento em propionato) em meio mineral (MM) a estes mutantes está aqui apresentada. **Wt** - LFM 101 pBBR1 MCS-2, **1**- LFM 177 pBBR1 MCS-2, **2**- LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL1, **3**- LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL2, **4**-LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL3, **5**-LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL4, **6**-LFM 186 pBBR1 MCS-2, **7**- LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL1, **8**-LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL2, **9**- LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL3, **10** - LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL4, **11** - LFM 198 pBBR1 MCS-2, **12** - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL1, **13** - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL2, **14** - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL3, **15** - LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL4. MM (meio mineral) contendo sacarose ou propionato como única fonte de carbono foi utilizado. As regiões e suas respectivas codificações são: ACL1: regulador transcricional *lysR*.; ACL2 regulador transcricional *LysR*, juntamente com a acil CoA desidrogenase; ACL3: regulador transcricional *lysR*, acil CoA desidrogenase e CoA-transferase/L-carnitina desidratase.e ACL4: operon por completo.

De acordo com a tabela 12, podemos observar que os mutantes controle carregando o plasmídeo sem fragmentos de DNA clonado, não cresceram em propionato, como esperado, porém pode ter havido um crescimento dificilmente visível nos outros substratos.

De todas as linhagens mutantes que receberam os plasmídeos contendo os genes identificados no genoma apenas a linhagem LFM 177 apresentou algum tipo de crescimento em propionato. O mutante LFM177 pBBR1 MSC2::ACL1, contendo apenas o ativador transcricional, não apresentou crescimento em propionato, já as outras linhagens LFM 177 contendo os outros plasmídeos (pBBR1 MSC2::ACL2, pBBR1 MSC2::ACL3 e pBBR1 MSC2::ACL4) tiveram sua capacidade de crescimento em propionato reestabelecida, tendo o crescimento mais evidente na linhagem LFM 177 pBBR1 MSC2::ACL4, que continha o possível operon completo, tendo seu crescimento reestabelecido também em outros substratos da via da α -oxidação, podendo-se observar um crescimento comparável ao da linhagem selvagem utilizada como controle positivo.

Os mutantes LFM 186 e LFM 198 que portavam qualquer um dos plasmídeos construídos permaneceram com o fenótipo igual aos dos controles dos mutantes portando apenas os plasmídeos sem fragmentos de DNA clonados, não apresentando crescimento em meio contendo propionato como única fonte de carbono.

Tabela 12 - Resultados de avaliação fenotípica realizada após a inserção de fragmentos contendo potenciais genes da α -oxidação em linhagens selvagem e mutantes UV prp- de *B. sacchari* em meios contendo glicose, sacarose ou intermediários da α -oxidação (propionato, lactato, piruvato e acetato), como única fonte de carbono.

<i>Linhagens Meios</i>	<i>MMS</i>	<i>MMP</i>	<i>MMLac</i>	<i>MMPir</i>	<i>MMAc</i>
LFM 101 pBBR1 MCS-2	+++	+++	+++	+++	+++
LFM 177 pBBR1 MCS-2	+++	---	+	+	+++
LFM 186 pBBR1 MCS-2	+++	---	+	+	+++
LFM 198 pBBR1 MCS-2	+++	---	+	+	+++
LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL1	+++	---	+	+	+++
LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL1	+++	---	+	+	+++
LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL1	+++	---	+	+	+++
LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL2	+++	+++	+	+	+++
LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL2	+++	---	+	+	+++
LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL2	+++	---	+	+	+++
LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL3	+++	+	+	+	+++
LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL3	+++	---	+	+	+++
LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL3	+++	---	+	+	+++
LFM 177 pBBR1 MCS-2::ACL4	+++	+++	+++	+++	+++
LFM 186 pBBR1 MCS-2::ACL4	+++	---	+	+	+++
LFM 198 pBBR1 MCS-2::ACL4	+++	---	+	+	+++

+++ : Crescimento altamente visível. ++ : crescimento visível. + : crescimento dificilmente visível. --- : ausência de crescimento. MMS: meio mineral com sacarose, MMP: meio mineral com propionato, MMLac: meio mineral com lactato, MMPir: meio mineral com piruvato, MMAc: meio mineral com acetato.

Estes resultados sugerem que os genes pesquisados atuam no catabolismo do propionato realizando uma α -oxidação e que o gene propionil CoA desidrogenase provavelmente é o gene mutado no mutante UV LFM177, pois todos os fragmentos que continham este gene foram capazes de restituir a capacidade de crescer em propionato, mesmo que não muito eficientemente, como podemos observar no fragmento ACL3. A linhagem mais eficiente na complementação foi a linhagem que portava o possível operon completo (fragmento ACL4). Os demais mutantes UV, que não foram complementados por este plasmídeo, podem conter mutações em seu

genoma diferentes das encontradas na linhagem LFM 177, o que pode explicar a não complementação com o operon.

Até o momento, apenas a presença da via do 2MCC foi comprovada molecularmente em *B. sacchari* (BRÄMER et al., 2002; SILVA, 1998). A via da α -oxidação de propionato até agora foi pouco estudada, encontrando-se apenas alguns artigos que descrevem suas reações, medindo atividades enzimáticas ou produtos resultantes da alimentação da bactéria com substratos marcados com ^{13}C (TEXTOR et al., 1996, SILVA et al., 2000). Este resultado corrobora a proposta de que esta região genômica existe e aparentemente está organizada como um operon e possui um papel no catabolismo de propionato em *B. sacchari*, porém para afirmarmos com certeza que se trata de um operon, uma análise de transcriptoma deve ser realizada.

A partir destes resultados, o mutante LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL4, abrigando o fragmento que continha o possível operon completo, foi submetido a testes quantitativos para avaliar sua eficiência em converter propionato a unidades 3HV.

5.6 Avaliação quantitativa do copolímero produzido pelo mutante complementado.

Foram realizados ensaios em frascos agitados para promover o acúmulo de copolímero (P3HB-co-3HV) a partir de glicose e propionato como fontes de carbono, visto que esta última fonte de carbono direciona intermediários de seu catabolismo para produção de monômeros de 3HV (SILVA, 1998; SILVA et al., 2007). O objetivo do experimento foi avaliar se, uma vez recebendo o fragmento capaz de complementar o mutante, restituindo a capacidade de crescer em propionato como única fonte de carbono, como observado na análise qualitativa, o mutante também teria restaurada a sua capacidade de converter propionato a monômeros de 3HV, ou seja, sua eficiência nesta conversão atingiria os valores da linhagem selvagem, o que seria um dado a mais para corroborar a hipótese de que nenhuma outra via faria parte da rede catabólica desse substrato. O ensaio descrito no item 4.8 foi realizado com base em metodologias previamente definidas (MENDONÇA, 2010; MENDONÇA et al, 2014).

Foram então realizados dois ensaios de crescimento e acúmulo do copolímero pelo mutante complementado, linhagem LFM 177 pBBR2::ACL4, tendo como linhagens controle, LFM 101 pBBR2 e LFM 177 pBBR2 . No ensaio 1, foi fornecido,

nas primeiras 24 horas, apenas glicose, na concentração de 10 g/L, como fonte de carbono, para que houvesse crescimento, para o ensaio 2 foi fornecido 15 g/L. No período inicial de 24 horas deve ocorrer crescimento celular utilizando a fonte de carbono e nitrogênio, este último é adicionado ao meio numa concentração tal que, começa a se tornar escasso no final deste período, quando finalmente, as células deixam de usar a fonte de carbono para crescer e começam a utilizá-la para acúmulo de PHA. Desta maneira, o propionato deve ser inserido neste momento, na fase de acúmulo (MENDONÇA, 2014). Foi fornecido propionato na concentração final de 1g/L para o ensaio 1 e 2 g/L no ensaio 2. Os resultados dos dois ensaios estão apresentados na tabela 13 e 14. As tabelas contendo os dados sem tratamento estão no anexo P e Q.

Tabela 13 – Parâmetros obtidos no ensaio 1 para avaliação da produção de PHA do mutante UV complementado LFM 177 pBBR2::ACL4 . São mostradas as médias obtidas de triplicata biológica: pH inicial e final do cultivo, quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%.

Linhagens	pH inicial	pH final	PHA (%)	HB (%)	HV (%)	Glicose inicial (g/L)	Glicose final (g/L)	Propionato inicial (g/L)	Propionato final (g/L)	Y _{HV/prp} (g/g)
177 pBBR1 MCS2::ACL4	7.056	7.030	54.732	53.998	1.547	11.150	0.000	0.930	0.000	0.039 ± 0.004
177 pBBR1 MCS2	7.056	7.020	57.234	53.522	5.617	11.690	0.000	0.940	0.000	0.202 ± 0.028
101 pBBR1 MCS2	7.053	7.040	50.158	49.812	1.855	11.560	0.000	0.680	0.000	0.070 -

*Não foi possível calcular a média e desvio padrão desta amostra.

De acordo com os dados obtidos no ensaio 1 pode-se observar que houve acúmulo de PHA em torno de 50 a 57% da massa seca celular após 72 horas de experimento. O pH não teve alterações significativas ao longo do experimento, mostrando que houve um ambiente propício para o crescimento bacteriano. Houve um consumo de todo propionato fornecido para as linhagens. Os mutantes UV se mostraram eficientes no acúmulo assim como a linhagem selvagem. As porcentagens de monômeros de 3HB e 3HV se mostraram diferentes nas três linhagens empregadas. A menor concentração de 3HV, que foi de 1,547 %, está presente na linhagem complementada, sendo até menor quando comparada com o valor da linhagem selvagem que foi 1,855 %. A linhagem mutante UV controle teve um teor maior de 3HV, como esperado. Os resultados das linhagens controle são comparáveis aos resultados previamente descritos em literatura, nos quais mutantes deficientes no consumo de intermediários da α -oxidação, alcançou valores de rendimento (Y_{HV/prp})

maiores que a linhagem selvagem (Cintra, 2008; SILVA et al., 1996, SILVA et al., 2000).

Estes resultados sugerem que pode ter havido um consumo maior de propionato para produção de energia, ao invés do seu uso para produção de copolímero, no mutante complementado LFM 177 pBBR2::ACL4 do que no mutante UV e LFM 177 pBBR2, e até mesmo que a linhagem selvagem LFM 101 pBBR2. As linhagens selvagens e complementadas tiveram um consumo maior de propionato que a mutante UV como esperado, mas diferença de consumo entre a linhagem complementada e a selvagem pode ser explicada pela quantidade de cópias dos genes presentes na bactéria. Pois os genes estão no plasmídeo, o qual se apresenta em um número maior de cópias. Desta maneira as linhagens complementadas possuem mais cópias dos genes que a linhagem selvagem que possui apenas uma cópia em seu genoma, aumentando assim, sua disponibilidade para expressão (BOWERSA et al., 2004).

Tabela 14: Parâmetros obtidos no ensaio 2 para avaliação da produção de PHA do mutante UV complementado LFM 177 pBBR2::ACL4 . São mostradas as médias obtidas de triplicata biológica: pH inicial e final do cultivo, quantidade de PHA total (%MSC), assim como das composições monoméricas dos polímeros produzidos por cada linhagem, em mol%.

Linhasgens	pH inicial	pH final	PHA (%)	HB (%)	HV (%)	Glicose inicial (g/L)	Glicose final (g/L)	Propionato inicial (g/L)	Propionato final (g/L)	Y _{HV/prp} (g/g)
177 pBBR1 MCS2::ACL4	6.953	7.451	53.495	50.706	2.789	16.781	0.000	1.750	0.030	0.085 ± 0.007
177 pBBR1 MCS2	6.986	7.481	58.317	51.645	6.672	16.475	0.000	1.760	0.020	0.215 ± 0.013
101 pBBR1 MCS2	7.063	7.526	47.773	44.901	2.872	16.717	0.000	1.740	0.050	0.093 ± 0.022

Os resultados no ensaio 2 mostraram que houve um acúmulo maior de monômeros de 3HV do polímero. Neste ensaio o rendimento máximo teórico da linhagem selvagem e da linhagem complementada ficaram bem próximos na com o valor de 0,093 g/g para a primeira e 0,085 para a segunda, mas a linhagem complementada ainda se mostrou mais eficiente em consumir propionato para produção de energia do que para produção de monômeros de 3HV.

Comparando-se os valores de 3HV do polímero nos dois ensaios, podemos perceber que o acúmulo não foi proporcional ao aumento da concentração de propionato, porém as linhagens ainda apresentaram um mesmo perfil de acúmulo.

Os resultados aqui obtidos corroboram a hipótese de trabalhos anteriores que sugeriam a presença da via da α -oxidação no catabolismo do propionato em *B. sacchari* (Cintra, 2008; SILVA et al., 1996, SILVA et al., 2000). Neste trabalho, foi possível identificar e localizar regiões genômicas em *B. sacchari* envolvidas neste processo. Foram indicados genes que estão organizados de maneira que sugere a composição de um operon organizado conforme a Figura 18, contendo uma região que codifica um regulador transcricional que está orientado na posição oposta à dos demais genes. Em seguida, a jusante, está localizado o gene codificador de uma acil-CoA desidrogenase, responsável pela reação de redução do propionil CoA para acrilil CoA.

O gene seguinte à jusante ainda pode ser considerado uma incógnita. Nos bancos de dados do GenBank está anotado de forma mais abrangente como codificador de uma CoA transferase, mas também, em alguns casos, como codificador de uma *L*-carnitina desidratase. Ambas reações ocorrem na via, porém não se sabe se trata-se de uma enzima de dupla função ou se ela possui apenas uma das duas funções e outra enzima envolvida em outras vias atua em alguma das duas etapas catalíticas em que ela pode estar envolvida: na hidratação da molécula de acrilil-CoA ou na transferência da coenzima A para outra molécula, liberando uma molécula de lactato. O último gene da via anotado como transportador tipo MFS que pode atuar na entrada do propionato na célula. Duas regiões promotoras foram identificadas entre o regulador transicional e o gene acil CoA desidrogenase, indicando que os outros genes são transcritos juntamente a este último, como esperado para de um operon. O operon descrito está representado na Figura 27.

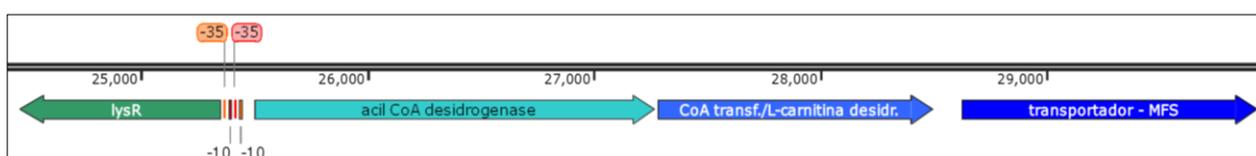


Figura 26 – Organização do operon envolvidos na via da α -oxidação.

5.7 Testes de diferentes estratégias para mutação dirigida

5.7.1 Sistema de deleção sítio dirigida com plasmídeos suicidas.

Após os resultados das análises *in silico* do genoma, e após a forte evidência da presença dos genes com potencial para estarem envolvidos na via α -oxidação do propionato, foram testadas estratégias para se obter uma cepa mais eficiente na conversão de propionato em monômeros de 3HV inativada especificamente nas vias envolvidas no seu desvio para a geração de acetil-CoA, levando a formar 3HB ou células em detrimento da geração de 3HV.

Uma vez que o genoma foi sequenciado e os genes de interesse identificados, foi possível clonar as zonas de homologia para construção dos cassetes de deleção que posteriormente foram inseridos em plasmídeos suicidas, os procedimentos utilizados para as clonagens estão detalhados no item 4.10. Esses plasmídeos são classificados como suicidas porque não possuem origem de replicação para a bactéria na qual se deseja fazer a deleção. Desta maneira, estes precisam se integrar no genoma, deixando de ser uma molécula extra cromossômica, para se manterem dentro da célula (SCHWEIZER, 2008). A escolha da região a ser clonada foi feita de maneira que as regiões importantes para a transcrição do possível operon fossem interrompidas, tais como sítios ativos e locais de interação com outras moléculas, como ativadores transcricionais e regiões de promotores. A Figura 27 mostra a posição das regiões utilizadas como molde para construção dos cassetes de deleção e os possíveis sítios ativos que devem ser deletados após recombinação.

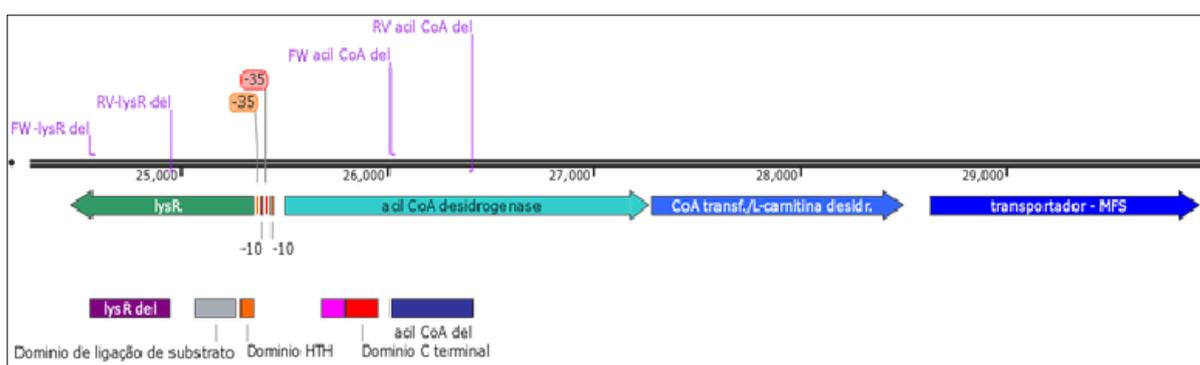


Figura 27 - Posição dos fragmentos *lysR del* e *acil CoA del* clonados para construção do cassete de deleção e possíveis regiões de interação com outras moléculas (domínio de ligação de substrato e promotores) e sítios ativos (domínio C terminal) que devem ser retirados após recombinação.

Inicialmente foi testado o plasmídeo suicida pNPTS138 para construção de mutantes (DICKON ALLEY, M.R.K., trabalho não publicado). Para isso, foi inserido neste plasmídeo um fragmento de DNA de aproximadamente 783 pb que possui duas regiões de homologia ao DNA de *B. sacchari*, o fragmento *lys del* e *acilCoA del*, cada uma com aproximadamente 390 pb, o alinhamento do sequenciamento dos

fragmentos estão em anexo (Anexo 5). O plasmídeo contendo esta construção foi nomeado pNPTS138:: α -oxdel.

Este cassete de deleção pode se recombinar com o genoma em alguma das regiões correspondentes de homologia, carregando consigo o plasmídeo, interrompendo o operon com esta inserção. Após este primeiro evento de recombinação, deve-se inocular a bactéria em meio contendo altas concentrações de sacarose, assim o segundo evento de recombinação pode ocorrer. O segundo evento de recombinação resultará em dois possíveis genótipos, podendo retomar o genótipo inicial retirando a sequência do plasmídeo retomando o genótipo selvagem, ou ainda, se recombinar retirando o plasmídeo e a região entre as regiões de similaridade ao cassete, retirando uma parte importante para funcionamento do operon (Figura 28). Esta segunda recombinação pode ser detectada com a incubação do clone em meio contendo alta concentração de sacarose, pois estes plasmídeos contêm ainda o gene de contra-seleção *sacB* que permite a seleção de clones que sofreram os dois eventos de recombinação (HOANG et al., 1998). O sistema de sensibilidade à sacarose, com o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* codifica a levansucrase, que é letal na maioria das bactérias gram-negativas na presença de sacarose (Gay et al., 1983). A excisão do plasmídeo nas células pode, portanto, ser selecionada por crescimento num meio contendo sacarose. Este sistema é amplamente utilizado na maioria dos plasmídeos suicidas comuns.

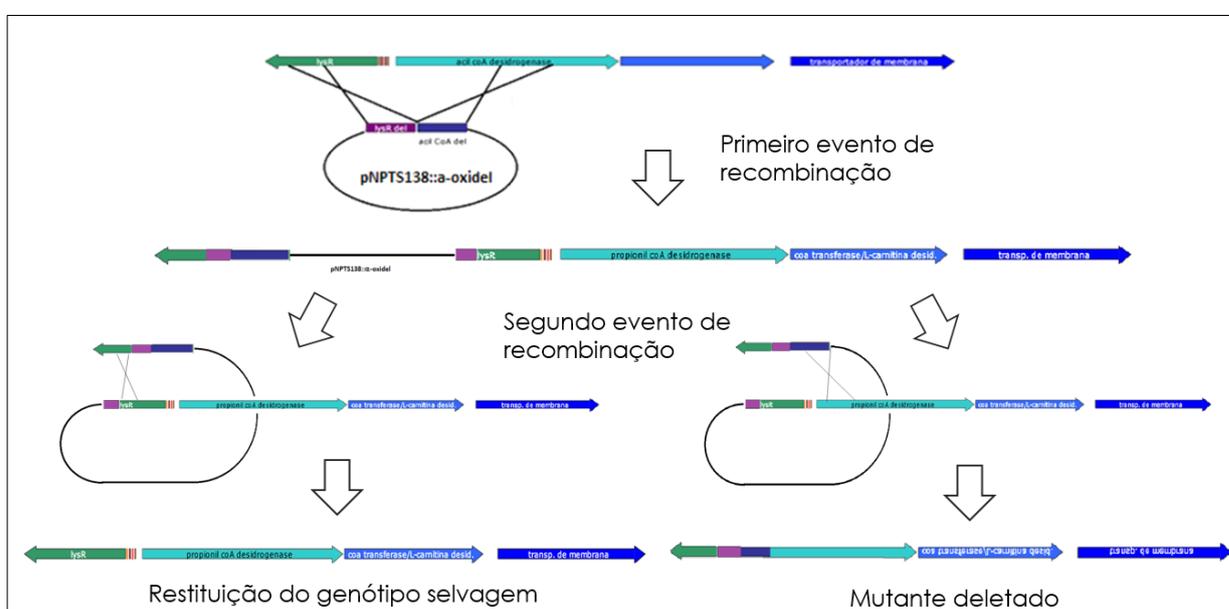


Figura 28 - Recombinação do plasmídeo suicida pNPTS138:: α -oxdel

Para obtenção destes clones deletados, a técnica de eletrotransformação foi utilizada para inserção do plasmídeo na bactéria, porém, nenhum clone foi obtido em nenhum dos experimentos com este plasmídeo nem com primeiro evento de recombinação. Para a recombinação acontecer devem existir regiões de similaridade de pelo menos 300pb para recombinar e uma série de enzimas específicas (recombinases). Durante o processo, algumas enzimas envolvidas atuam em DNA fita simples, além disso a extremidade 3' desta fita deve invadir o DNA de fita dupla para iniciar o processo de pareamento (MARQUES, 2012). Durante a eletrotransformação o plasmídeo está na forma de DNA circular e fita dupla, talvez por isso esta estratégia não tenha sido eficiente para realização da mutação sitio dirigida.

A conjugação foi a segunda estratégia abordada para a mutação sitio dirigida com plasmídeo pNPTS138:: α -oxdel, pois desta maneira, durante a transferência do plasmídeo, com os fragmentos de similaridade, o DNA é transferido como fita simples e linear, aumentando as chances de invasão do DNA de fita dupla, iniciando o pareamento para posterior recombinação (MARQUES, 2012).

Para os experimentos de conjugação com o plasmídeo pNPTS138:: α -oxdel, nenhum clone canamicina resistente foi obtido, apesar de inúmeras tentativas, alterando a concentração de antibiótico, modificando temperatura de incubação e quantidades de inóculo. Nenhum clone foi obtido, nem para o primeiro evento de recombinação. Desta maneira este plasmídeo, não foi eficiente para obtenção de clones com mutação sitio-dirigida.

Como uma segunda opção de plasmídeo foi utilizado o pEX18Ap (HOANG et al., 1998), plasmídeo gentilmente cedido pelo professor Rodrigo Galhardo, que também é um plasmídeo suicida e com mecanismo muito semelhante com pNPTS138. Foi inserido neste plasmídeo o mesmo cassete de deleção construído para o pNPTS138:: α -oxdel, procedimento descrito no item 4.10.

Com este novo plasmídeo pEX18Ap:: α -oxdel, nenhum clone foi obtido com a técnica de eletroporação. Corroborando a hipótese, de que a recombinação homóloga é mais eficiente quando o DNA que deve recombinar é transferido como fita simples e linear, aumentando as chances de invasão do DNA de fita dupla, iniciando o pareamento para posterior recombinação.

Após a tentativa de obtenção de clones por eletroporação não ser bem-sucedida, a conjugação foi a técnica de escolha para uma nova tentativa com este plasmídeo (item 4.10.4). Desta vez, muitos clones carbenicilina resistentes foram

obtidos com esta técnica, ao contrário do que aconteceu com o plasmídeo pNTPS138:: α -oxdel. Estes clones foram crescidos em LB por 18 horas e posteriormente inoculados LB sem cloreto de sódio acrescido de sacarose 20% para seleção de clones que sofreram o segundo evento de recombinação. Os clones capazes de crescer em sacarose foram inoculados em MMP, para teste fenotípico e posteriormente foi realizada uma reação de PCR de colônia para confirmar o resultado molecularmente.

Foram feitos vários experimentos de conjugação para transferência do pEX18:: α -oxdel, porém, em nenhum dos experimentos foi possível isolar mutantes deletados, ao final de cada 2 recombinação, todas as colônias testadas apresentavam características que indicavam a restituição do genótipo selvagem ao invés de um mutante nocauteado. Pois cresciam em MMP e a amplificação da região de deleção obtida pela reação de PCR realizada em cada colônia apresentava perfil de genótipo selvagem. Mais de 100 clones foram testados molecularmente alguns deles estão representados na Figura 29.

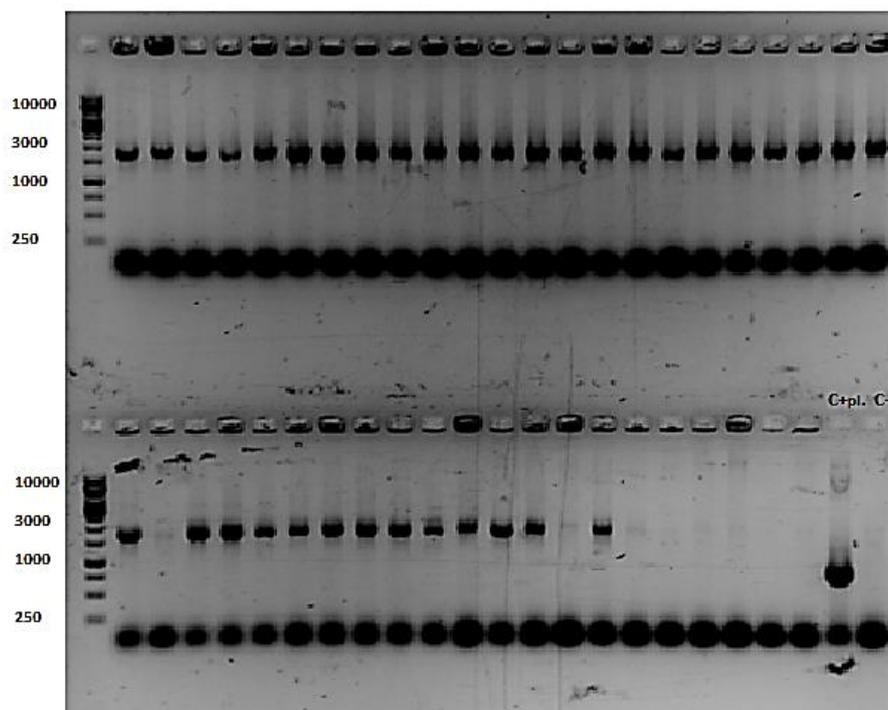


Figura 29 - Gel de eletroforese do PCR de colônia que buscava mutantes sitio dirigidos após o segundo evento de recombinação. Controle positivo foi a amplificação do cassete de deleção presente no plasmídeo.

Diante deste impasse, uma pesquisa foi realizada, com clones no primeiro evento de recombinação, com o intuito de analisar em que local do genoma de *B. sacchari* os fragmentos do cassete de deleção estavam se inserindo, na região do

regulador transcricional do tipo *lysR* ou na região do gene acil CoA desidrogenase, visto que o cassete de deleção apresentava fragmentos de homologia presentes internamente nessas duas regiões. Dois tipos reações de PCR foram feitos com as mesmas linhagens recombinantes, uma das reações utilizou iniciadores que amplificavam o regulador transcricional *lysR* e a outra iniciadores que amplificavam o gene acil CoA desidrogenase, que também continha uma zona de similaridade com a outra parte do cassete de deleção. Com esta combinação de reações era esperado que o gene que não sofreu a recombinação fosse amplificado e o outro gene que recombinou não fosse amplificado devido seu tamanho aumentado (maior que 5842pb, tamanho do plasmídeo).

Esta análise foi realizada para verificar se alguma das duas possíveis recombinações se sobressai a outra para formação de nocautes ou restituição de genótipo selvagem.

Ao final da reação de PCR, foi feita uma eletroforese para analisar os genes amplificados, porém foi verificado que as duas regiões pesquisadas foram amplificadas (Figura 30), apesar de todos os clones apresentarem resistência a carbenicilina, sugerindo a presença do plasmídeo, apesar de não estar em nenhum dos locais planejados para recombinação.

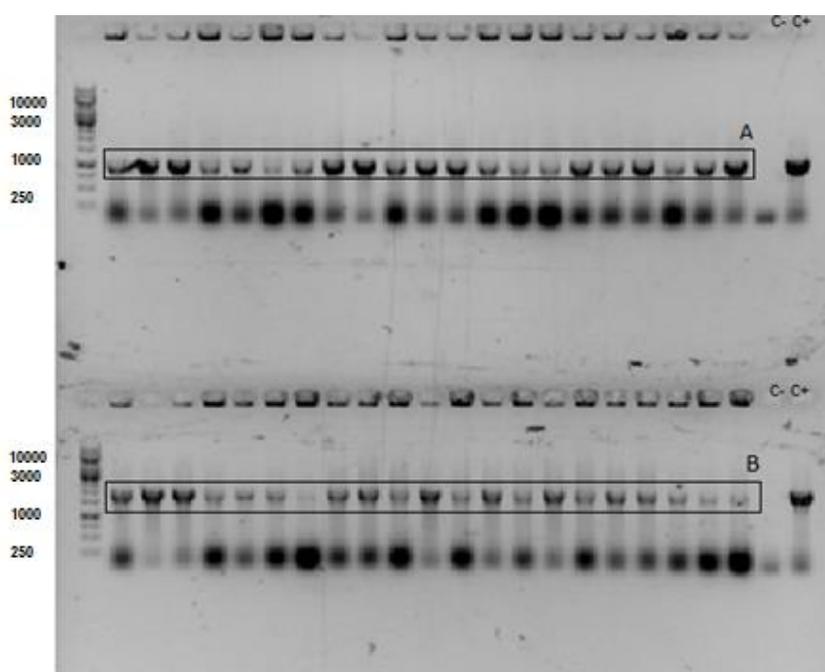


Figura 30 – Gel de eletroforese PCR de colônia de clones carbenicilina resistentes do primeiro evento de recombinação. A- Amplificação de fragmento do gene *lysR* contendo fragmento similar para recombinar com uma parte do cassete de deleção (aproximadamente 900 pb); B- Amplificação do gene acil CoA desidrogenase (aproximadamente 1770 pb), que contém uma zona similar para recombinar com uma parte do cassete de deleção; C+ (controle positivo); C- controle negativo.

Este resultado sugere que a inserção do plasmídeo ocorreu em outra parte do genoma. A recombinação deve ocorrer entre fragmentos de DNA similares. Desta maneira, foi pesquisado outros genes presentes no plasmídeo que também poderiam estar presentes no genoma de *B. sacchari*. Como a bactéria não possui resistência a antibióticos betalactâmicos, o gene de resistência do plasmídeo não foi pesquisado, desta maneira, o gene escolhido para a pesquisa foi o *sacB*.

Em uma pesquisa feita no NCBI, foi verificado a presença deste gene em outras bactérias do mesmo gênero, como exemplo *B. mallei* ATCC 23344 (Schell et al, 2008). A sequência do gene *sacB* presente nesta bactéria (Figura 31) foi utilizada para pesquisa no genoma de *B. sacchari*. Esta pesquisa demonstrou o alinhamento com uma sequência de alta identidade (Identities = 1084/1332 (81%), Gaps = 3/1332 (0%), E. value= 0.0) com o a sequência do gene *sacB*, mostrando que foi identificado um gene anotada como *sacB* em *B. sacchari*.

NC_006349.2

```

ATGACATATTCCAACAAGCCGTTTCCCGTCGACACAAACGTTTGGCCCTGAGCGCGGCCGCGCTCACCG
CAGCCGCTTGCATGTCGGCGCACGCGCAGAGCGACGGCGCCGGCCCCGCGCCGACCCGCACACGCGAGCA
GGCCTACGATCCCCGAAAGCCATTTACGATGCGCTGGACGCGCGGGACATGCGTCAGATCGTCAAGCAA
TCGCACACGGCGGGCGCCGACAAGAAGTTCGCTGCCGCCCGCGCTGACGATGCCGGACATCGCGCAGAAGT
TTCCGCTCGTCGATTGAAACGTGTGGGTATGGGATACCTGGCCGCTCGCCGACATGCGCGCGAACCAGTT
GAGCTACAAGGGCTGGGAAGTGATCTTCTCGCTGAGCGCCGATCCGCGCGGGGTACACGTTTCGACGAT
CGCCACGTGCATGCGCGCATCGGCTTCTTCTATCGCCGCGCGGGCATTCCGGCTTCGCAGCGTCCGGCCA
ACGGCGGCTGGACCTGGGGCGGCCATCTGTTTCCGGACGGCGCGAGCGGAAGGTGTTTCGGCACCGCGCC
GATGACGAACAACGCCGAGTGGTCCGGCTCCGCGCGCCTCACGCACGGCGAGAAGTTCAGCCTCTACTAC
ACCGCGCTGTGCTTCAATCGCTCGGGCGCCCGGGCGCCGACATCACGCCCGCGATCGCGATCATCACGC
GCGCGGACGGTCACATCCACGCGGACGACAAGCATGTGTGGTTCTCGGGATTCGACGATCACAAAGGCGCT
GCTGCAGCCTGAAGGCAAGATGTACCAGACGGGCCAGCAGAACAACCTTACTACTCGTTCCGCGATCCGTTT
GTGTTACCGATCCCAGCGCATCCGGGCAACACGTACATGGTGTTCGAGGGCAACACGGGGCGCCCCGCGCG
GCGCGCGCACCTGCACCGAAGCCGATCTCGGCTACGCGCCGAACGATCCGTATCGCGAGGATCTGAACGC
GGTGTGAACTGGGCGCAGTGTATCAGAAGGCCAATGTCCGGCTTCGCGATCGCGACGAACCCGCAACTG
ACCGAGTGGAAAGTTTCTGCCGCCGCTGCTGTCCGGCAACTGTGTGACGATCAGACCGAGCGTCCGCAGA
TCTATCTGAAGGACGGCAAGTACTACCTGTTACGATCAGCCACCGGACGACGATGGCCGCCGGCATCGA
CGCCCCGGACGGCGTGTATGGCTTCGTCGGCAACGGCATCCGCGAGCGATTTCCTGCCGCTGAACGGCGGG
AGCGGCCTCGTGCTCGGCAACCCGACCGACTTCTCCGCGCCCCGCCGGCGCGCCGTACGCACAGGACCCGA
ACCAGAACCCGCGCGGTTCCAGTCTGACTCGCACTACGTGATGCCGGGGCGGGCGCGTTCGAGTTCGTTT
CGACGCGATCGGCGCGCGGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ACGACGGTTCGACCGCGCGTACGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCGTGGGCGCAGGCCACCGACTGA

```

Figura 31 - Sequência do gene *sacB* presente em *B. mallei* ATCC 23344 utilizado para pesquisa no genoma de *B. sacchari*.

Este resultado, porém, ainda não comprova que a recombinação possa ter ocorrido neste ponto. Estudos sugerem que existe a necessidade de um alto grau de homologia, sequencias para o sucesso da recombinação homóloga, em linhagens selvagem de *E. coli*, a redução da similaridade de 100% para 90% diminui a

frequência de recombinação em 40 vezes (Shen;Huang,1986), Desta maneira uma alinhamento entre a sequência do *sacB* o plasmídeo pEX18Ap e *da B. sacchari* foram alinhados no CLUSTAL, visto que no BLAST este alinhamento não se demonstrou possível.

Apesar de algumas deleções e trocas de base, podemos notar visualmente que existe uma similaridade entre elas, porem nada que comprove similaridade suficiente para que ocorra a recombinação homóloga.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Bsacchari      --ATGCGCAAACGTTTGAC--GGCTGGGCTCGCA--GCGGT-TTGGGCAGCC---G----
Cloning        TTATTTGTAACTGTTAATTGTCCTTGTTC AAGGATGCTGTCTTTGACACAGATGTTTT
                ** *  *** ** *  * *  * * *  * *  * *  * *  * *  *  *
Bsacchari      -GCGCCTTGCCGGTTCATGCCCAGACTTCGCCCCAGGGATCAGG-TTTCCCCGCTCCGAC
Cloning        CTTGCCTTTGATGTT CAGCAGGAAGCTAGGCGCAAACGTTGATTGTTTGTCTGCGTAGAA
                *****  *****  *  **  * *  * *  * *  * *  * *  * *
Bsacchari      TG--CGCATACACAGCAGGCCTACGATCCCGAGGCC-----GACTTC
Cloning        TCCTCTGTTTGTTCATATAGCTTGTAAATCACGACATTGTTTCCTTTCGCTTGAGGTACAGC
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      ACGATGCGCTGGACACGAGCGGACATCCGGCAGATCCTCGCGCAGTCCCATACTGCGACG
Cloning        GAAGTGTGAGTAAGTAAAGGTTACATCGTTAGGATCAAGATCCATTTTTAA--CACAAAGG
                ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      GCAGTGGACAAGAACTCGCTGCCCCAGGCACTGAC--GATGCCTGATATCCGCGAGGACT
Cloning        CCAGTTTTGTT CAGCGGCTTGTATGGGCCAGTTAAAGAATTAGAAACATAACCAAG----
                ****  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      TTCCGTTGATCAACCCGAACGTGTGGGTGTGGGATACGTGGCCGCTCGCGGATGTTTCGG
Cloning        -----CATGTAAATATCGTTAGACGTAATGCCGTC AATCGTCATTTTTGATC
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      CGCACCAGTTGAGTTACAAGGGCTGGGAAGTCATCTTTTCGCTTACGGCGGACCCCATG
Cloning        CGCGGGAGTCAGTGAACA---GATACCATTTGCCGTT CATTTTAAAGACGTTGCGCGGTT
                ***  ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      CTGGTTACAGTTCGATGACCGACATGTACATGCGCGCATTGGCTTCTTTTATCGTCGCG
Cloning        CAATTCATCTGTTACTGTGTTAGATGCA-ATCAGCGGTTTCATCACTTTTTCAGTGTG
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      CAGGCATACCCGCGTCGCAAAGGCCGGCTAATGGCGGTT-GGATCTGGGGCGGCCATTTG
Cloning        TAATCATCGTTTAGCTCAATCATACCGAGAGCGCCGTTTGCTAACTCAGCCGTGCGTTTT
                *  ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      TTCCCGACGGCGGAGCGTCAAAGTATTCGGCACGGCGCCTATGACCAACAATGCTGAA
Cloning        TTATCGCTTTGCAGAAGTTTTTGACTTT-----CTTGACGGAAGAA
                **  **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      TGGTCGGGTTCTGCGCGCTC-----ACTGGGGGCGACAACGTAGACGTC
Cloning        TGATGTGCTTTTGCCATAGTATGCTTTGTTAAATAAAGATTCTTCGCTTGGTAGCCATC
                **  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      TACTATACGGCGTTGTCAATCAACCGCTCGGCACCCGGTGGATCGGACATTACCCGCGG
Cloning        TTCAGTTCAGTGTGTTGCTTCAAATACTAAGTATTTGTGGCT-----TTATCTTCTAC
                *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *
Bsacchari      ATTGCGATCATACCCGGGCGGATGGCCATATTCACGCAGACGACAAGCACGTCTGGTTC

```


tentativa de obtenção de um mutante sítio-dirigido ou outro cassete de deleção deve ser construído com zonas de homologia maiores, visto que a frequência de recombinação aumenta com o tamanho do fragmento homólogo. Diante disso, um último plasmídeo suicida foi testado para construção do mutante sítio-dirigido, o plasmídeo pKNOCK, gentilmente cedido pelo prof. Benny Spira, foi escolhido por não possuir nenhum gene de contra seleção o que possibilita apenas um evento de recombinação, que deve interromper o gene de interesse impedindo sua transcrição. Assim, foi dada a preferência para utilização deste plasmídeo, ao invés da construção de outro cassete de deleção para continuar a utilização do pEX18Ap.

O plasmídeo suicida pKNOCK, foi utilizado possui origem de replicação dependente da proteína λ pir (ALEXEYEV, 1999), desta maneira ele deve se replicar apenas se o hospedeiro for capaz de produzi-la ou se o plasmídeo se integrar no genoma (Figura 32).

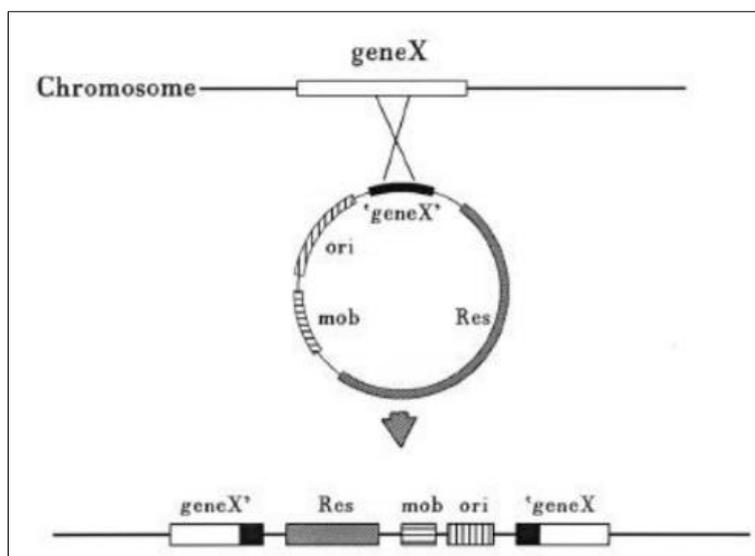


Figura 32 - Esquema de recombinação do plasmídeo pKNOCK

Para que ele se integre no genoma um cassete de deleção com apenas uma zona de homologia ao DNA genômico deve ser inserido nele. Um inserto de aproximadamente 879 pb, presente em uma região intermediária do gene acil-CoA desidrogenase, foi clonado e inserido no pKNOCK. Os procedimentos utilizados na clonagem estão descritos no item 4.10, o gel de eletroforese contendo o produto de PCR utilizado para confecção do cassete de deleção está ilustrado na Figura 33. Com este tipo de fragmento contendo apenas uma zona de homologia, a inserção do

plasmídeo no genoma ocorreria no meio do gene, interrompendo a transcrição do mesmo.

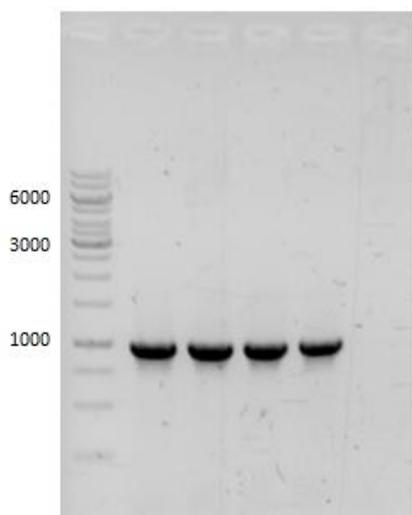


Figura 33 - Gel de eletroforese do produto de PCR de 879pb do inserto clonado no pKNOCK.

Assim como os outros dois plasmídeos, para o pKNOCK:: $\Delta\alpha$ -ox foram feitos experimentos de transformação via choque elétrico e conjugação, como esperado não houve a presença de clones canamicina resistentes para a eletrotransformação, por motivos já discutidos acima. Desta maneira, foi realizado um experimento de conjugação para transferência deste plasmídeo para *B. sacchari*, o procedimento utilizado foi detalhadamente descrito no item 4.10.6.

Para o experimento de conjugação, nenhum clone canamicina resistente foi obtido. O que sugere que não houve evento de recombinação.

Considerando que não houve sucesso na utilização de nenhum dos três plasmídeos suicidas, deve considerar que o evento de recombinação é bem difícil de se obter em *B. sacchari*, devendo ser mais amplamente estudado. Apesar de apresentar clones resistentes carbenicilina para o plasmídeo pEX18AP, a recombinação não ocorreu no local desejado, supondo-se que se tratava de uma recombinação no gene *sacB*, que possui tamanho de aproximadamente 1500 pb. Talvez o tamanho do gene que supostamente recombinau seja um fator determinante para a melhora no evento de recombinação, pois este possui aproximadamente 1500 pb, enquanto que as outras zonas de homologia variaram de 390 – 900 pb.

O pNPTS deve ser um plasmídeo de escolha cautelosa, pois em trabalhos realizados por Mendonça (trabalho não publicado), também não foram bem sucedidos na obtenção de mutantes.

Embora a utilização deste método com plasmídeo suicida seja aparentemente fácil com muitas bactérias, permanece muito difícil ou impraticável com outras. O método clássico de utilização de um plasmídeo suicida que é incapaz de replicar na cepa estudada para inativado o gene no cromossomo é muitas vezes não eficiente porque a frequência de eventos de dupla passagem pode ser baixa ou porque pode ocorrer recombinação ilegítima (REYRAT, et al 1998).

5.7.2 Sistema CRISPR-Cas

Após inúmeras tentativas, sem sucesso, de deleção sitio-dirigida com plasmídeos suicidas, outra estratégia de deleção foi adotada. Para isso, foi escolhido o sistema de deleção CRISPR-Cas.

Neste sistema deve-se inserir na bactéria que se deseja realizar a mutação um plasmídeo pCas9 que transcreve a enzima Cas9, que reconhece e clivar sequências de DNA específicas pareadas com RNA guia. Esta sequência de RNA guia deve ser transcrita por um segundo plasmídeo o pTargetF que deve conter uma sequência de DNA guia (gDNA) de 20 nucleotídeos para que ocorra o *annealing* e consequentemente o reconhecimento da região pela enzima Cas9 para corte. Esta região deve estar inserida logo após a uma região NGG (JIANG, 2013; JIANG, 2015).

DNA é clivado neste ponto sinalizado, desta maneira, o sistema de reparo da célula começa a atuar para reparar o dano. Neste momento, deve-se estar disponível na célula um DNA doador que possui zonas de similaridade as regiões que flanqueiam o corte para facilitar a recombinação. O DNA genômico que sofreu o corte deve sofrer ação de enzimas para expor uma fita simples 5' para que esta possa invadir o DNA doador para iniciar uma nova síntese com o intuito de religar o DNA. Como o DNA doador, não possui as regiões de *annealing* dos RNAs guia, não ocorrerá um novo corte, ou seja, a célula recombinante perderá a região entre os 2 RNAs guia (JIANG, 2013; JIANG 2015).

Desta maneira, os gDNAs foram sintetizados juntamente com o RNA *scaffolds*, para que fossem juntamente transcritos em RNA guia para sinalização do local do corte. Este DNA foi inserido no plasmídeo pTargetF, que foi renomeado para pTargetF::gDNA (item 4.11.1). Na figura 34 está identificado os locais escolhidos para desenhar os gDNAs e os braços de similaridade para montagem do DNA molde para recombinação.

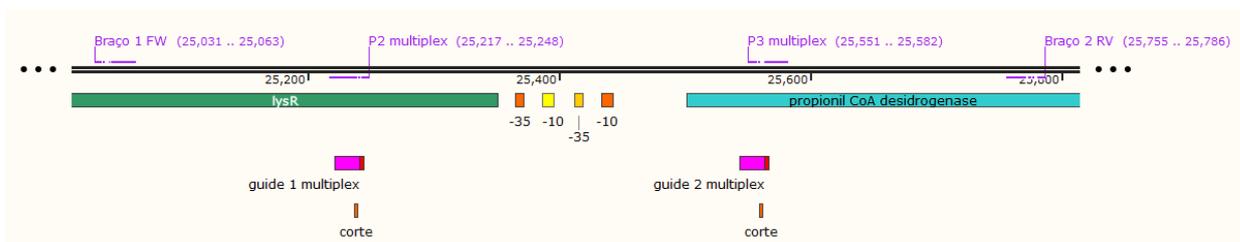


Figura 34 – Esquema de transformação com CRISPR. Ilustrando as regiões utilizadas para construção dos braços homólogos, delimitados pelos iniciadores em destaque e DNA guias nomeados na figura como guide 1 e guide 2.

Os braços de similaridade ao DNA gnômico foram construídos de acordo o item 4.11.1 os braços possuem aproximadamente 1600 pb de tamanho (Figura 35).

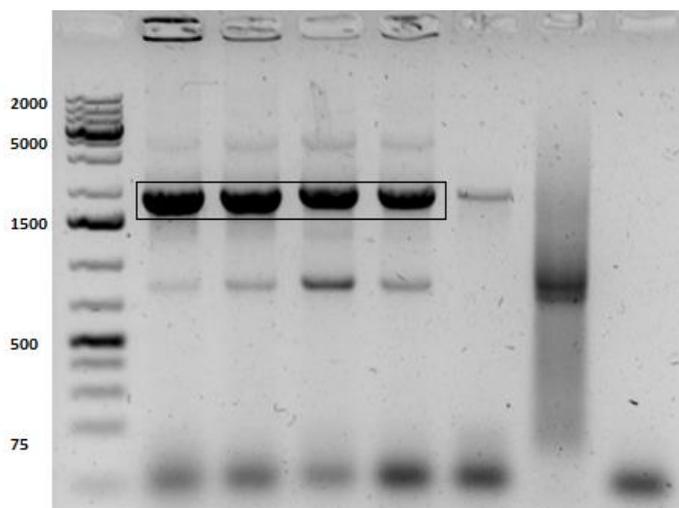


Figura 35 - Gel de eletroforese demonstrando a amplificação dos braços de similaridade (aproximadamente 1600 pb) (DNA molde).

Após a construção de todas as ferramentas necessárias para o experimento de deleção com CRISPR-Cas, plasmídeos pCas9 e pTargetF::gDNA e braços de homologia. O experimento de deleção em si foi iniciado, realizando-se transformação com os plasmídeos e DNAs molde (braços de similaridade). O procedimento está descrito no item 4.11.1. Ao final do experimento as células que receberam os plasmídeos e DNA molde foram inoculadas em meio LB contendo espectinomicina como agente seletivo, pois teoricamente só devem sobreviver células que contenham o plasmídeo pTargetF::gDNA (resistentes a espectinomicina) e que conseguiram escapar da clivagem da Cas9, recombinando com o DNA doador.

Foram obtidos alguns clones neste experimento. Estes clones passaram por uma triagem, foram feitos PCR de colônia com o intuito de se encontrar os clones que

perderam um fragmento de 300pb do seu genoma, para isso utilizou-se iniciadores externos a zonas de similaridade (Figura 37). Todos os clones apresentaram bandas iguais ao controle selvagem, demonstrando que não houve a recombinação com o DNA molde. Os clones resistentes a espectinomicina que não perderam o fragmento de DNA, podem ter sofrido uma mutação pontual na região de corte da Cas9, que proporcionou a sobrevivência da célula. Estes clones ainda, foram inoculados em MMP para teste fenotípico, para confirmar se esta possível mutação poderia ter interferido no fenótipo, pois poderia alterar quadros de leitura, porém todos cresceram, comprovando que a bactéria ainda está transcrevendo os genes da via.

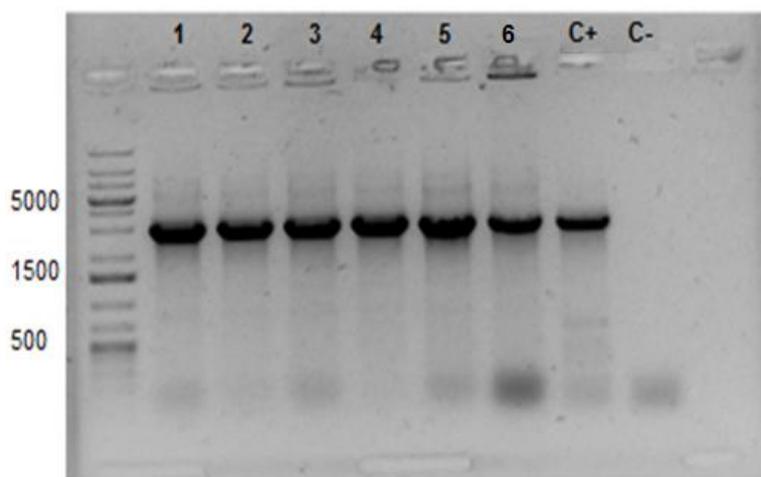


Figura 36 - Gel de eletroforese com colônias obtidas no experimento de obtenção de mutantes sitio dirigido CRISPR-Cas. C+ (DNA de linhagem selvagem) banda de aproximadamente 2900pb C- (ausência de DNA).

6 CONCLUSÃO

A seguir se encontram os objetivos propostos neste trabalho delineados, a hipótese a ser corroborada com o cumprimento dos objetivos e as conclusões do trabalho:

- As análises *in silico* permitiram concluir que os genes pesquisados e que possivelmente atuam na via da α -oxidação de propionato, estão presentes no genoma de *B. sacchari*. Estes parecem estar organizados em um operon, pois foi observado a presença de apenas promotor apenas jusante ao gene acil CoA desidrogenase, primeiro gene da organização do operon, seguidos por CoA desidrogenase/L-carnitina desidratase e transportador MFS. A jusante deste operon está o regulador transcricional tipo *lysR* que é transcrito pela outra fita de DNA. Esta análise computacional possibilitou análises *in vivo* que comprovaram a que a clonagem desses genes em mutantes UV prp- proporcionaram a sua complementação, pois estes tiveram seus fenótipos selvagem prp+ restituídos

- A complementação com os fragmentos clonados permitiram concluir que os genes pesquisados atuam na via da α -oxidação do catabolismo de propionato em *B. sacchari* e que o gene mutado na linhagem LFM177 provavelmente se trata da propionil CoA desidrogenase.

- Ensaios em frascos agitados permitiram avaliar a eficiência de conversão de propionato a 3HV em comparação a linhagens controle prp- (LFM 177) e selvagem (*B. sacchari* LFM 101), demonstrando que a complementação foi eficiente em restituir o fenótipo, deixando a linhagem complementada até mais eficiente em consumir o propionato para produção de energia, ao invés do seu uso para produção de 3HV, muito possivelmente devido ao número de cópias dos genes disponíveis para transcrição.

- Após estabelecida a presença dos genes pesquisados no genoma, a busca por um mutante sitio dirigido foi muito importante para obtenção de outra prova molecular da existência do operon, dessa vez por deleção dos genes e perda do fenótipo. A produção de uma linhagem deletada também é desejável para obtenção de uma cepa industrial com teores maior com monômero de 3HV no copolímero. Porém as ferramentas disponíveis que foram testadas ainda não se mostraram eficientes para deleção de genes nesta bactéria, mostrando que estudos ainda devem ser feitos com o intuito de encontrar a melhor técnica de deleção em *B. sacchari*.

Neste estudo, podemos verificar que o plasmídeo pNPTS deve ser uma escolha cautelosa para próximos experimentos, visto que inúmeras tentativas não proporcionaram nenhum evento de recombinação. Já os outros plasmídeos, devem ser mais estudados para uma possível padronização da técnica, como exemplo, aumentar o tamanho dos cassetes de deleção para aumentar a possibilidade do evento de recombinação. A ferramenta CRISPR-Cas, ainda pode ser uma técnica promissora, porém neste trabalho não foi amplamente testada, pois não houve tempo hábil para sua padronização. Sendo uma alternativa que ainda deve ser amplamente estudada para edição do genoma.

7 REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, P.M.R., MENDONÇA, T.T., BAUTISTA L.P.G., CHERIX, J., LOZANO-SAKALOUSKAS, G.C., FUJITA, A., OLIVEIRA FILHO E.R., LONG, P., PADILLA, G.M., TACIRO, M.K., GOMEZ, J.G.C., SILVA, L.F. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil **Genome Announc.** V.3, p.313-315, 2015.

ALEXEYEV, M.F. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. **Biotechniques**, V.26, p. 824-828, 1999.

BOK, F.A., Stams A.J., Dijkema C., Boone D.R., Pathway of propionate oxidation by a syntrophic culture of *Smithella propionica* and *Methanospirillum hungatei*. **Applied and environment Microbiology**, V. 64, p. 1800-1804.

BOWERSA, L.M., LAPOINTA, K., ANTHONYB, L., PLUCIENNIK, A., FILUTOWICZ, M. Bacterial expression system with tightly regulated gene expression and plasmid copy number. **Gene**. V.340, p. 11-18, 2004.

BRÄMER, C. O, SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C., PRIEFERT, H., STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101 and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content . **Applied and Environmental Microbiology**, V. 68, p. 271-279, 2002.

BRÄMER, C. O., STEINBÜCHEL, A. The methylcitric acid pathway in *Ralstonia eutropha*: new genes identified involved in propionate metabolism. **Microbiology**, V. 147 p. 2203-2214, 2001.

BRÄMER, C. O, VANDAMME, P., SILVA, L.F., GOMEZ, J.G.C., STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium

isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **International Journal of Microbiol Ecology**, V. 51,p.1709-1713, 2001.

BUENO NETTO, C.L., CRAVEIRO, A.M., PRADELLA, J.G.C., OLIVEIRA, M.S., MAIORANO, A.E., PINTO, A.G., SAITO, R.M. **Processo para produzir polihidroxicanoatos a partir de açúcares extraídos da cana-de-açúcar**. Patente brasileira PI 9103116-8, 1993.

CARRONDO, MT, CRESPO, JPS, MOURA, MJ. Production of propionic acid using a xylose utilizing Propionibacterium. **Applied biochemistry and biotechnology**, V.12, p.295-312, 1988.

CINTRA, A.C.S.D., **α -oxidação de propionato está envolvida na redução da produção de plástico biodegradável em *Burkholderia sacchari*?** 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

CHOI, J., LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. . **Appl. Microbiol. Biotechnology**, V. 51, p. 13-21, 1998.

COSTA, M. F., BARLETTA M., Microplastics in coastal and marine environments of the western tropical and sub-tropical Atlantic Ocean. **Environmental Science: Processes & Impacts**, V.17, p. 1868 -1879, 2015.

DENIS-LAROSE, C., BERGERON, H., LABBÉ, D., GREER, C. W., HAWARI, J., GROSSMAN, M. J., LAU, P. C. K. . Characterization of the Basic Replicon of Rhodococcus Plasmid pSOX and Development of a Rhodococcus-Escherichia coli Shuttle Vector. **Applied and Environmental Microbiology**. V. 64, p.4363–4367, 1998.

DURFEE, T., NELSON R., BALDWIN S., PLUNKETT G. 3RD, BURLAND V., MAU B., PETROSINO J. F. , QIN X., MUZNY D. M., AYELE M., GIBBS R. A., CSÖRGO B., PÓSFAI G., WEINSTOCK G. M., BLATTNER F.R. The complete genome

sequence of *E. coli* DH10B: insights into the biology of the laboratory workhorse. **Journal of Bacteriology**, V.190, p. 2597-2606, 2008.

GOMEZ, J.G.C. & BUENO NETTO, C.L. **Produção de poliésteres bacterianos**. In: Biotecnologia Industrial, vol. III Processos Fermentativos e enzimáticos (eds), Editora Edgard Blücher, São Paulo. V.3 p.219-248, 2001.

GOMEZ, J.G.C. **Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxicanoatos**. 1994. 92 p. Dissertação (Programa de Mestrado em Biotecnologia - IPT-USP- I. Butantã) Universidade de São Paulo, 1994.

GOMEZ, J.G.C; FONTOLAN, V.; ALLI, R.C.P.; RODRIGUES, M.F.A, BUENO NETTO, C. L.; SILVA. L.F.; SIMÕES, D.A. Production of P3HB-co-3HV by soil isolated bacteria able to use sucrose. **Revista de Microbiologia**. 28: 43-48. (1997)

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES, M.F. A; ALLI, R.C.P.; TORRES, B.B.; BUENO NETTO, C.L.; OLIVEIRA; SILVA, L.F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology Biotechnology**, V. 45, p.785-791, 1996.

GUOCHENG C. DU, JIAN C., JIAN Y., SHIYI L. Feeding strategy of propionic acid for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with *Ralstonia eutropha*. **Biochemical Engineering Journal**, v.8, p.103-110, 2001.

HAURWITZ, R. E., JINEK, M., WIEDENHEFT, B., ZHOU K., DOUDNA, J. A. Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease. **Science**, V. 329 p. 1355 – 1358. 2010.

HOLMES, P.A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics in Technology**, V.16, p.32-36, 1985.

JAGER, W., SCHAFFER, A. P., Isolation of insertion elements from gram-positive *Brevibacterium*, *Corynebacterium* and *Rhodococcus* strains using the *Bacillus subtilis*

sacB gene as a positive selection marker. **Federation of European Microbiological Societies Microbiol Letters**, V. 126, p. 1-6, 1995.

JIANG, W., BIKARD, D., COX, D., ZHANG, F., MARRAFFINI, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. **Nature Biotechnology**. V.31, 233-239, 2013.

JIANG, Y., CHEN, B., DUAN, C., SUN, B., YANG, J., YANG, S., Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System. **Applied and Environmental Microbiology**. V.81, p. 2506 – 2514, 2015.

JINEK, M., CHYLINSKI, K., FONFARA, I., HAUER, M., DOUDNA, J.A., E. CHARPENTIER A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. **Science**. V. 337, p. 816-821, 2012.

KEGG (**Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes**), Software. Versão: Release 79.0, July 1, 2016. Disponível em <http://www.genome.jp/kegg/> acesso em 12 de jul. 2016.

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

LONDON, R.E., ALLEN, D.L., GABEL, S.A. DEROSE, E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of metabolism of propionate by *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, V.181, p. 3562-3570, 1999.

LUZIER W. D., Materials derived from biomass/biodegradable materials. **Proceedings of the National Academy Sciences fo United States of America**. V-89, p. 839–842, 1992.

MARKETS AND MARKETS (2015). Biodegradable Plastics Market by Type (PLA, PHA, PBS, Starch-Based Plastics, Regenerated Cellulose, PCL), by Application (Packaging, Fibers, Agriculture, Injection Molding, and Others) - **Global Trends & Forecasts to 2020. Report** Code: CH 2736. Disponível em:

<<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biodegradable-plastics-93.html>>. Acesso em: 11 de nov. 2015.

MARQUES, M.V. (2012) *Biologia molecular e genética bacteriana*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (2012).

MENDONÇA, T.T.; **Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato) [P(3HB-co-3HHx)]** 2009. 130f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

MENDONÇA, T.T., GOMEZ, J.G.C., TORTAJADA, M., VIDAL, D.R., ROJAS, A., BUSTAMANTE, D., SILVA, L.F., Effects of the supply of different glucose/hexanoic acid ratios in the composition of the copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) P(3HB-co-3HHx) produced by *Burkholderia sacchari*. In: M.A. Reis, B.S. Ménde (Eds.) **Bioplásticos**. PRIBOP–CYTED. V.1, p. 9–21, 2014.

MENDONÇA, THATIANE T.; TAVARES, RAFAELA R. ; CESPEDES, LUCAS G. ; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, RUBEN J. ; SCHRIPSEMA, JAN ; TACIRO, MARILDA K. ; GOMEZ, JOSÉ G.C. ; SILVA, LUIZIANA F. . Combining molecular and bioprocess techniques to produce poly(3-hydroxybutyrate- co -3-hydroxyhexanoate) with controlled monomer composition by *Burkholderia sacchari*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 654-663, 2017.

MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT BY CLUSTALW, software. Versão: (version 1.83). Disponível em <http://www.genome.jp/tools/clustalw/> acesso em 20 de jul. 2016.

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

NIGMATULLIN, R., THOMAS, P., LUKASIEWICZ, B., PUTHUSSERY, H., & ROY, I. Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. V.90, p. 1209–1221, 2015.

NONATO, R.V., MANTELATTO, P.E., ROSSELL, C.E.V Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, V.57, p.1-5, 2001.

NORTH, E.J., HALDEN, R.U. Plastics and Environmental Health: The Road Ahead. **Rev Environ Health**. V.8, p.1–8, 2013.

pFam. **European Molecular Biology Laboratory** .Software. Disponível em: <http://pfam.xfam.org/> . Acesso em 15 de junho de 2015.

PHB Industrial S/A. (1995). Disponível em: <http://www.biocycle.com.br/site.htm>, acesso em: 15 de nov. 2015.

PLASTICS EUROPE. **Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data.** Disponível em: < https://issuu.com/plasticseuropeebook/docs/plastics_the_facts_2016_final_ver1> Acesso em 24 de março de 2017.

PEREIRA, E.M., **Avaliação da influência de genes do catabolismo de propionato sobre a síntese de copolímero biodegradável em *Burkholderia sacchari* e outras bactérias.** (2007) 69 p. Dissertação (Programa de Pós-graduação Interunidades Biotecnologia USP-IPT-I.Butantã) Universidade de São Paulo, 2007.

PEREIRA, E.M., SILVA- QUEIROZ, S. R., GOMEZ, J.G.C., SILVA, L.F., Disruption of the 2-methylcitric acid cycle and evaluation of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate biosynthesis suggest alternate catabolic pathways of propionate

in *Burkholderia sacchari*. **Canadian Journal of Microbiology**. V.90, p.1209–1221, 2009.

POHLMANN, A., WOLFGANG, F.F., REINECKE F., KUSIAN, B., LIESEGANG, H., CRAMM, R., EITINGER, T., EWERING, C., PÖTTER, M., SCHWARTZ,E., STRITTMATTER, A., VOß, I., GOTTSCHALK, G., STEINBÜCHEL, A., FRIEDRICH, B., BOWIEN, B., Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16, **Nature Biotechnology** v.24, p.1257 – 1262. 2006.

Prathisa Industriéis Limited. (2012) Disponível em: <http://www.prathista.com/proponic_acid.html> Acesso em: 15 de nov. 2015.

REDDY, C.S.K.,GHAI, R., RASHMI, KALIA, V.C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology** 87 137–146.

REINECKE F, STEINBÜCHEL A, *Ralstonia eutropha* Strain H16 as Model Organism for PHA Metabolism and for Biotechnological Production of Technically Interesting Biopolymers. **Journal Molecular Microbiology and Biotechnology**; V.16, p.91-108, 2009.

REYRAT, J.M., PELICIC, V., GICQUE,L B., RAPPUOLI, R. Counterselectable Markers: Untapped Tools for Bacterial Genetics and Pathogenesis. **Infection and Immunity**. V. 66 p. 4011-4017. 1998

RICHARDSON, E. J., WATSON, M. The automatic annotation of bacterial genomes. **Briefings in Bioinformatics**, V.14, p. 1–12, 2013.

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

HORSWILL, A. R., ESCALANTE-SEMERENA , J. C., Salmonella typhimurium LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. **Journal Bacteriology**. V. 181, p. 5615-5623, 1999.

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

SCHELL, M. A., LIPSCOMB L., DESHAZER, D., Comparative Genomics and an Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia Mallei*. **Journal of Bacteriology**. V.190. p. 2306–2313, 2008.

SCHWEIZER, H.P. Bacterial genetics: past achievements, present state of the field, and future challenges. *Biotechniques* , v.44, p.633-641, 2008.

SHEN, P., HUANG, H. V., Homologous recombination in *Escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. **GENETICS**, v. 112, p. 3 441-457,1986.

SILVA, L.F. **Estudo do catabolismo de propionato em *Burkholderia sp* visando o aumento da eficiência na produção de poli-3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato (P3HB-co-3HV) – um plástico biodegradável.** (1998) 62 p. Tese de doutorado (departamento de Microbiologia- IC- USP), Universidade de São Paulo, 1998.

SILVA, L.F. Development of technology at IPT to produce biopolymers from sugar cane - **2o. Congresso Internacional de Microbiologia Industrial**, 10-12/05/2000 Bogotá, Colômbia, 2000.

SILVA, L.F. & GOMEZ, J.G.C. (2013). **Cepa mutante de *Burkholderia sp* e método de obtenção da cepa**, Patente brasileira PI 9806557-2. Submetida em 1998 e concedida em 2013

SILVA, L.F. GOMEZ, J.G.C., OLIVEIRA, M.S., TORRES, B.B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia sp*. **Journal Biotechnology**. V.76, p.165-174, 2000.

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. **Química Nova**, V. 30, p.1732-1743, 2007.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, R.C.; RODRIGUES, M.F.A.; BUENO NETTO, C.L.; STEINBÜCHEL, A.; TORRES, B.B. Reduction costs of P3HB-co-3HV production using mutants showing higher $Y_{3HV/Prop}$. **International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates '96: program and book of abstracts**, Davos, Switzerland: ISBP, p. 8. 1996.

SILVA, L.F., TACIRO, M.K., RAICHER, G., PICCOLI, R.A.M., MENDONÇA, T.T., LOPES, M.S.G., GOMEZ, J.G.C., Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. **International Journal of Biological Macromolecules**, V.71, p. 2-7, 2014

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, V.1, p.784-91, 1993.

SNAPGENE VIEWER VERSION 2.7.1, **GSL Biotech LLC 2015**. Software. Disponível em: <http://www.snapgene.com/products/snapgene_viewer/> acesso em 17 de abr.2015.

SOFTBERRY, Copyright © 2015 www.softberry.com. Software. Disponível em: <<http://www.softberry.com/>> acesso em 19 de abr. 2015

STEINBÜCHEL, A., PIEPER, U., Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, V37, p.1-6, 1992.

STEINBÜCHEL, A., VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Lett.**, 128:219-228, 1995.

STEINBÜCHEL, A., LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**. V6, p.81–96, 2003.

SUNG, B. H., Lee, J. H., Kim, S. C., in *Escherichia coli* Genome engineering and minimization for the construction of a Bioengine. In *Systems Biology and Biotechnology of E. coli.*, South Korea: Ed. Springer (2009).

SUVOROVA, I. A., RAVCHEEV, D. A., GELFAND, M. S., Regulation and Evolution of Malonate and Propionate Catabolism in Proteobacteria. **Journal Bacteriology**. V. 194, p. 3234-3240, 2012.

TEXTOR, S., WENDISCH, V.F., GRAAF A. A., MÜLLER, U., LINDER, M.L., LINNDER, D., BUCKEL W., Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. **Archives of Microbiology**. V.168, p.428–436, 1997.

*The RAST Server: **Rapid Annotations using Subsystems Technology***. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. *BMC Genomics*, 2008.

URTUVIA V., VILLEGAS P., GONZÁLEZ M., SEEGER M. (2014). Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. **International Journal of Biological Macromolecules**, 70 (208-213).

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

YANO, T., SANDERS, C., CATALANO, J., & DALDAL, F. *sacB*-5-Fluoroorotic Acid-pyrE-Based Bidirectional Selection for Integration of Unmarked Alleles into the

Chromosome of *Rhodobacter capsulatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 71, p. 3014–3024, 2005

YUNG-HUN YANG, Y.H., BRIGHAM, C.J., BUDDE, C.F., BOCCAZZI P., WILLIS, L.B., HASSAN, M.A., YUSOF Z.A.M., RHA C., SINSKEY A.J. Optimization of growth media components for polyhydroxyalkanoate (PHA) production from organic acids by *Ralstonia eutropha*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. V.87, p.2037-2045, 2010.

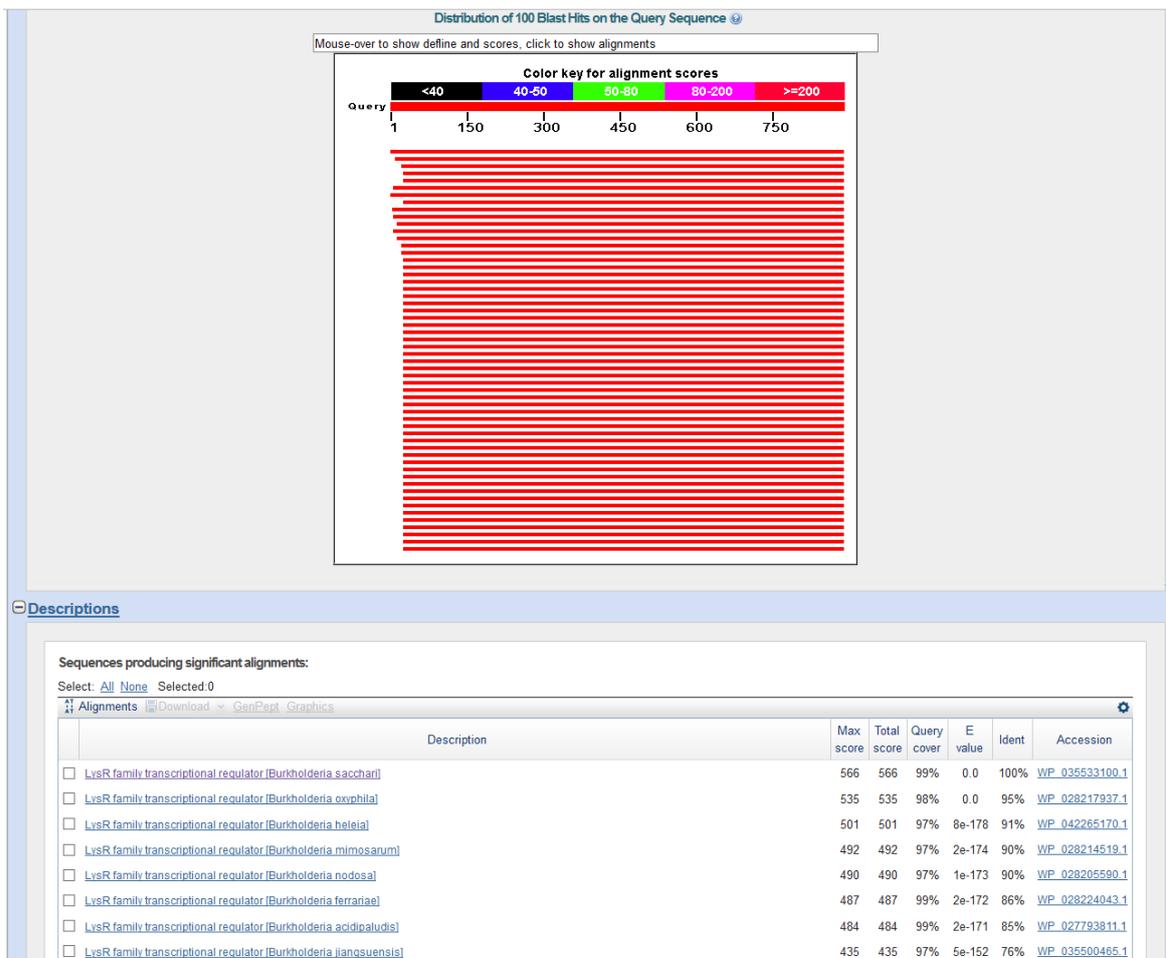
YABUUCHI, E., KOSAKO, Y., YANO, I., HOTTA, H., NISHIUCHI, Y. Transfer of Two *Burkholderia* and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. **Microbiology and Immunology**, v. 39: 8, p. 97–904, 1995.

WILCOX C., VAN SEBILLE E., HARDESTY B.D., *Threat of plastic pollution to seabirds is global, pervasive, and increasing*. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. V. 22; p.112 -138, 2015.

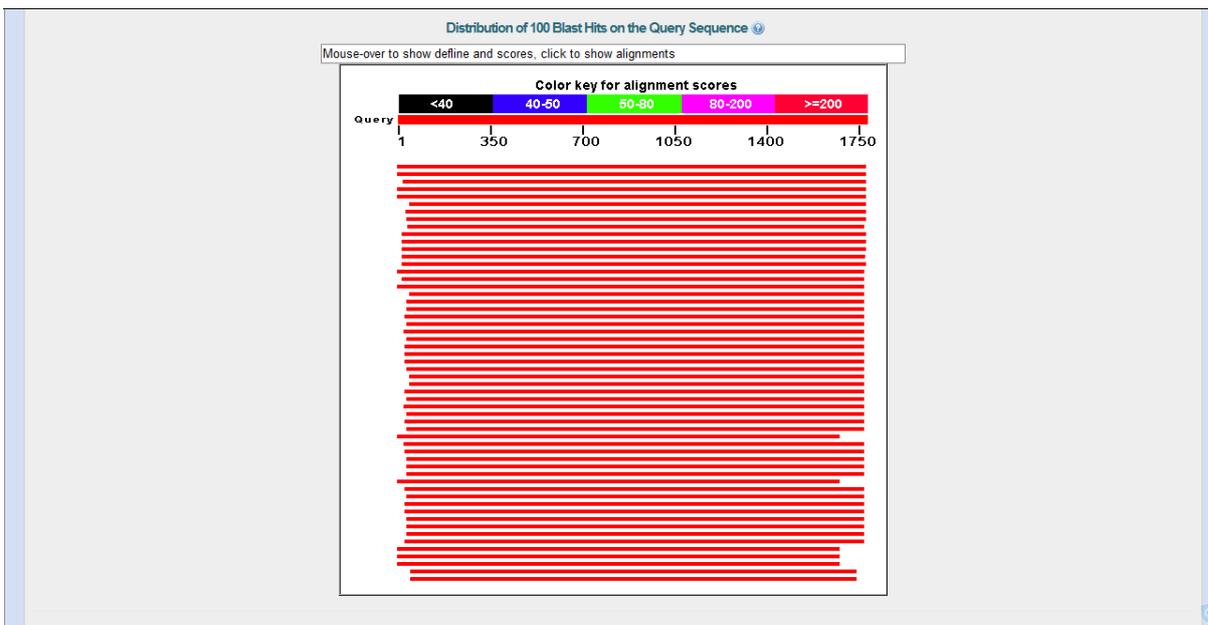
ZHANG, A., YANG S.-T. Propionic Acid production from Glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium* acid propionic. **Process Biochemistry**. V.44, p.1346-1351, 2009.

ANEXOS

A. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene *lysR*.



B. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene isovaleri CoA desidrogenase.



Descriptions

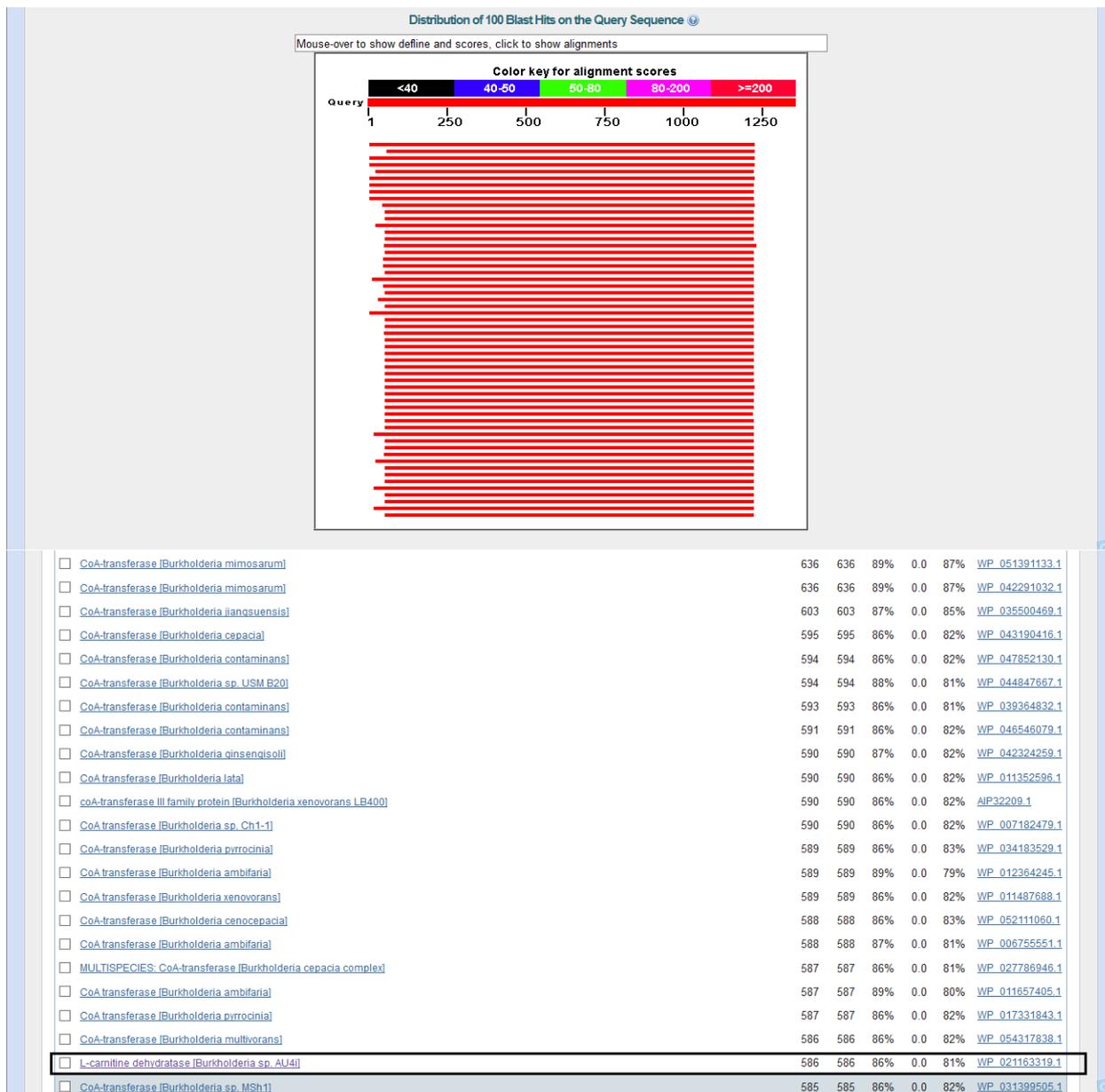
Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenPept](#) [Graphics](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia sacchari]	1143	1143	99%	0.0	100%	WP_035533099.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia oxiphila]	1082	1082	99%	0.0	95%	WP_028217936.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia mimosarum]	992	992	98%	0.0	88%	WP_051391132.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia nodosa]	991	991	99%	0.0	87%	WP_028205591.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia mimosarum]	991	991	99%	0.0	87%	WP_042291030.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia heleaia]	983	983	97%	0.0	89%	WP_042265167.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia acidipaludis]	978	978	97%	0.0	86%	WP_027793810.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia ferrariae]	966	966	97%	0.0	85%	WP_028224042.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia liangsuensis]	890	890	97%	0.0	79%	WP_035500467.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia fungorum]	857	857	98%	0.0	75%	WP_046566025.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia phytotriamans]	854	854	98%	0.0	77%	WP_012432466.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia fungorum]	851	851	98%	0.0	75%	WP_028199806.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia qinsengisoli]	850	850	98%	0.0	75%	WP_042324262.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia sp. K24]	848	848	98%	0.0	75%	WP_030103403.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia xenovorans]	836	836	99%	0.0	75%	WP_011487687.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia sp. Ch1-1]	833	833	98%	0.0	76%	WP_007182480.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia sp. 9120]	828	828	99%	0.0	73%	WP_035551453.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia sp. USM B20]	808	808	96%	0.0	75%	WP_044847686.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia pyrrocinia]	808	808	97%	0.0	74%	WP_047898520.1
<input type="checkbox"/>	isovaleryl-CoA dehydrogenase [Burkholderia cepacia]	807	807	97%	0.0	74%	WP_027784897.1

C. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene CoA transferase/L-carnitina desidratase.



D. Alinhamento da sequência de nucleotídeos do gene do Transportador.

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

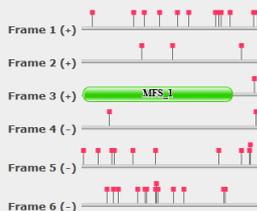
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia sacchari]	760	760	94%	0.0	100%	WP_035533097.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia oxphila]	716	716	94%	0.0	97%	WP_028217934.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia heteia]	709	709	94%	0.0	92%	WP_042265164.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia nodosa]	709	709	94%	0.0	92%	WP_028205593.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia acidipaludis]	705	705	94%	0.0	91%	WP_027793808.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia ferrariae]	694	694	94%	0.0	93%	WP_042336965.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia qinsengisoli]	651	651	93%	0.0	84%	WP_042324256.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia fungorum]	649	649	94%	0.0	83%	WP_046566020.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia phytofirmans]	648	648	94%	0.0	83%	WP_012432468.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia fungorum]	648	648	94%	0.0	83%	WP_028199804.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia sp. K24]	647	647	94%	0.0	83%	WP_030103405.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia sp. 9120]	647	647	94%	0.0	83%	WP_035551451.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia xenovorans]	647	647	94%	0.0	83%	WP_011487689.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia sp. Ch1-1]	646	646	94%	0.0	83%	WP_007182478.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia oklahomensis]	637	637	94%	0.0	84%	WP_025898909.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia oklahomensis]	635	635	94%	0.0	84%	WP_010111091.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia thailandensis]	632	632	94%	0.0	82%	WP_025369268.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia thailandensis]	632	632	94%	0.0	82%	WP_009890127.1
<input type="checkbox"/> LysR family transcriptional regulator [Burkholderia thailandensis]	628	628	94%	0.0	82%	WP_009904618.1
<input type="checkbox"/> MULTISPECIES: LysR family transcriptional regulator [Burkholderia]	625	625	94%	0.0	82%	WP_009913005.1
<input type="checkbox"/> sugar (and other) transporter family protein [Burkholderia thailandensis]	624	624	94%	0.0	82%	WP_015601454.1

DNA sequence search results

This page shows the results of searching your DNA sequence for Pfam-A matches. To do this we perform a six-frame translation to generate a set of protein sequences, which we then search using the normal Pfam-A HMMs and GA cut-offs.

Show the detailed description of this results page.

We have found 1 significant hit and 0 insignificant hits in 1 frame.



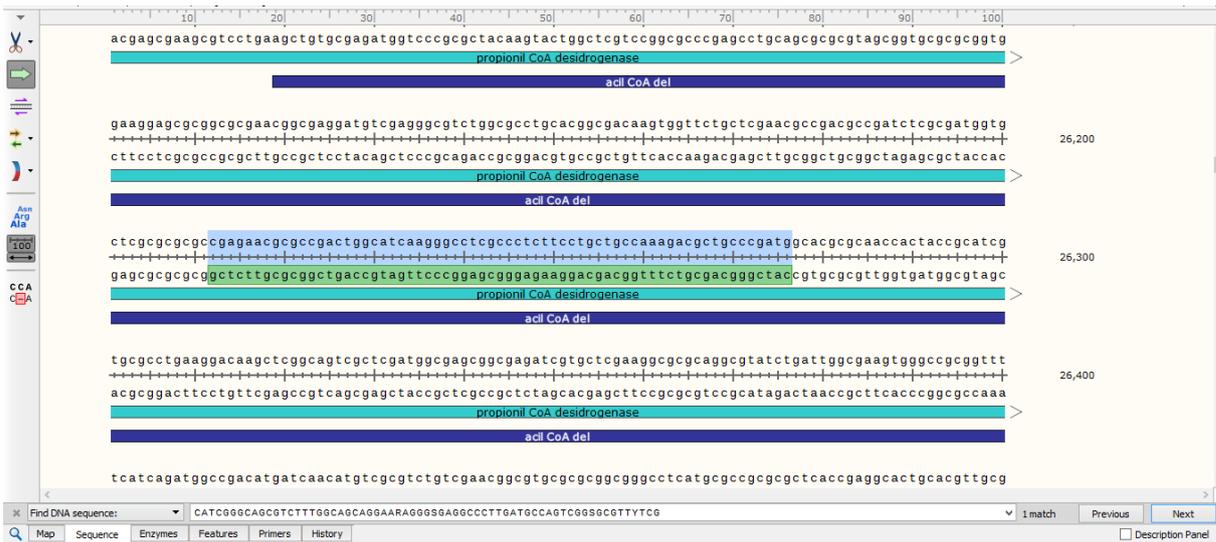
Show the DNA and protein sequences, and the URL for bookmarking these results.

Return to the search form to look for Pfam domains on a new sequence.

Significant Pfam-A Matches

Show or hide all alignments. Toggle between amino-acid and DNA sequence coordinates.

Frame (sense)	Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
					Start	End	Start	End	From	To					
3 (+)	MFS_1	Major Facilitator Superfamily	Family	CL0015	5	373	8	373	2	352	352	88.0	5.1e-25	n/a	Show



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
284 bits(314)	2e-74	233/289(81%)	9/289(3%)	Plus/Minus

Features: [Acyl-CoA dehydrogenase](#)

Query	344	ACTTCGACACGCTCTACCAGGGCGCGATGTTTCATGACCGAGCAGGCGCGGGCTCGGACG	403
Sbjct	2351499	ACTTCGACACGCTGTACCAGGGCGCGATGTTTCATGACCGAGCAGGCGCGGGCTCCGACG	2351440
Query	404	TykykykywTCGCCACGCGCCACGAAGGAGCGGGCGGAACGGCGAGGATGTCGAGG	463
Sbjct	2351439	TCGGCCGGATCGCGACGCGCGAC-----CTGGAAACCGACGTGCACGGCGAGA	2351389
Query	464	GCGTCTGGCGCTGCACGGCGACAAGTGGTTCGCTCGAACCGGACGCCGATYTCGGGA	523
Sbjct	2351388	CCGTCCTGGCGCTGACCGCGACAAGTGGTTCGCTCGAACCGGACGCCGATCTCGCA	2351329
Query	524	TGGTCCCGCAGCGCCGAGAAGCGCGACTGGCATCAAGGGCTCGCCCTCTTCCTGC	583
Sbjct	2351328	TGGTCTCGCGCGCCGACGGCGCGCGGACCGCATCAAGGGCTCGCGCTGTCCTGC	2351269
Query	584	TGCCAAGACGCTGCCGATGGCACGGCAACCACTACCGCATCGTGCG	632
Sbjct	2351268	TGCCAAGACGCTGCCGACGGCACGGCAACCGCTACCGCATCGTGCG	2351220

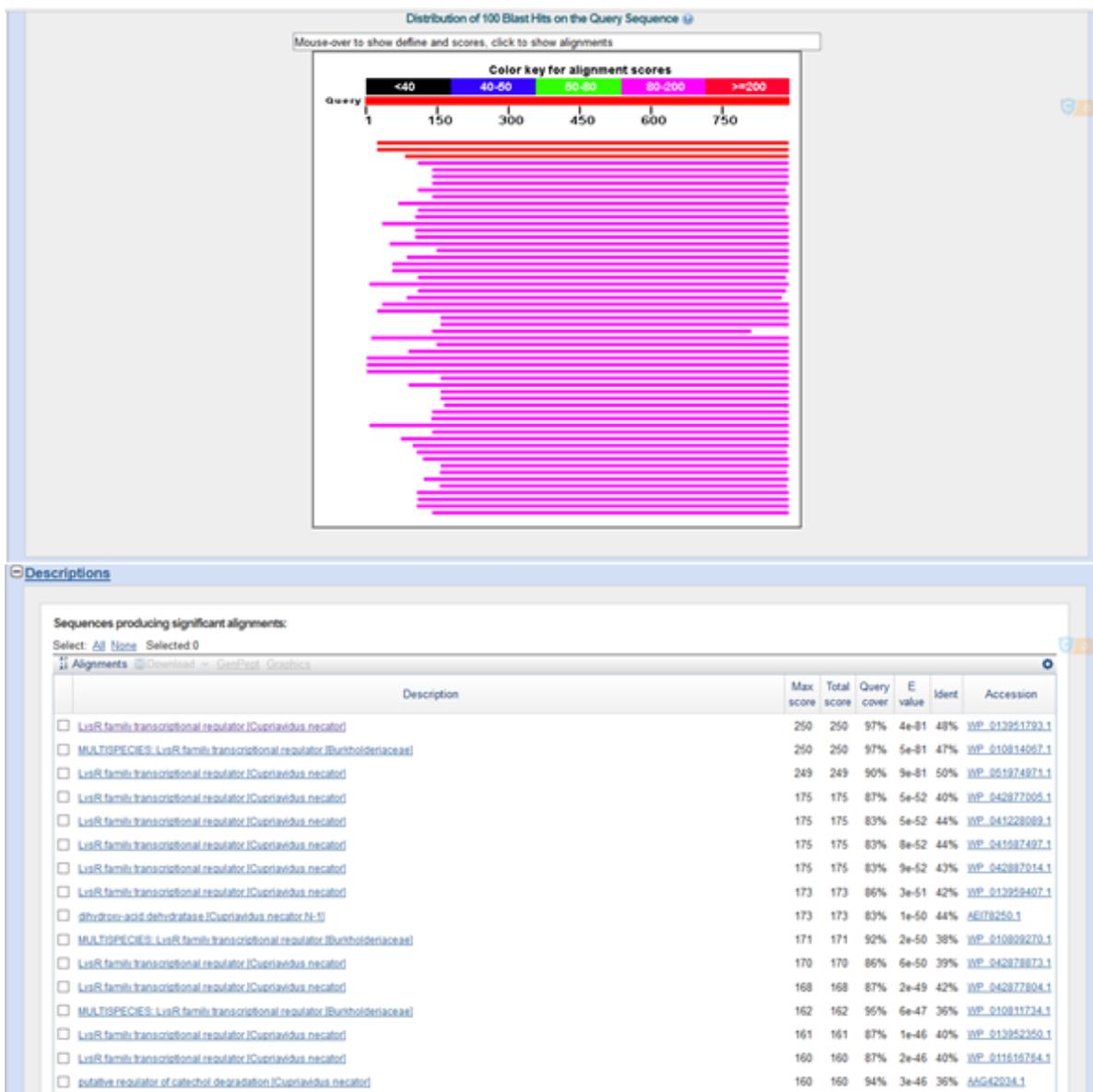
Range 2: 2352601 to 2352913 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#) [First Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
194 bits(214)	3e-47	229/314(73%)	3/314(0%)	Plus/Minus

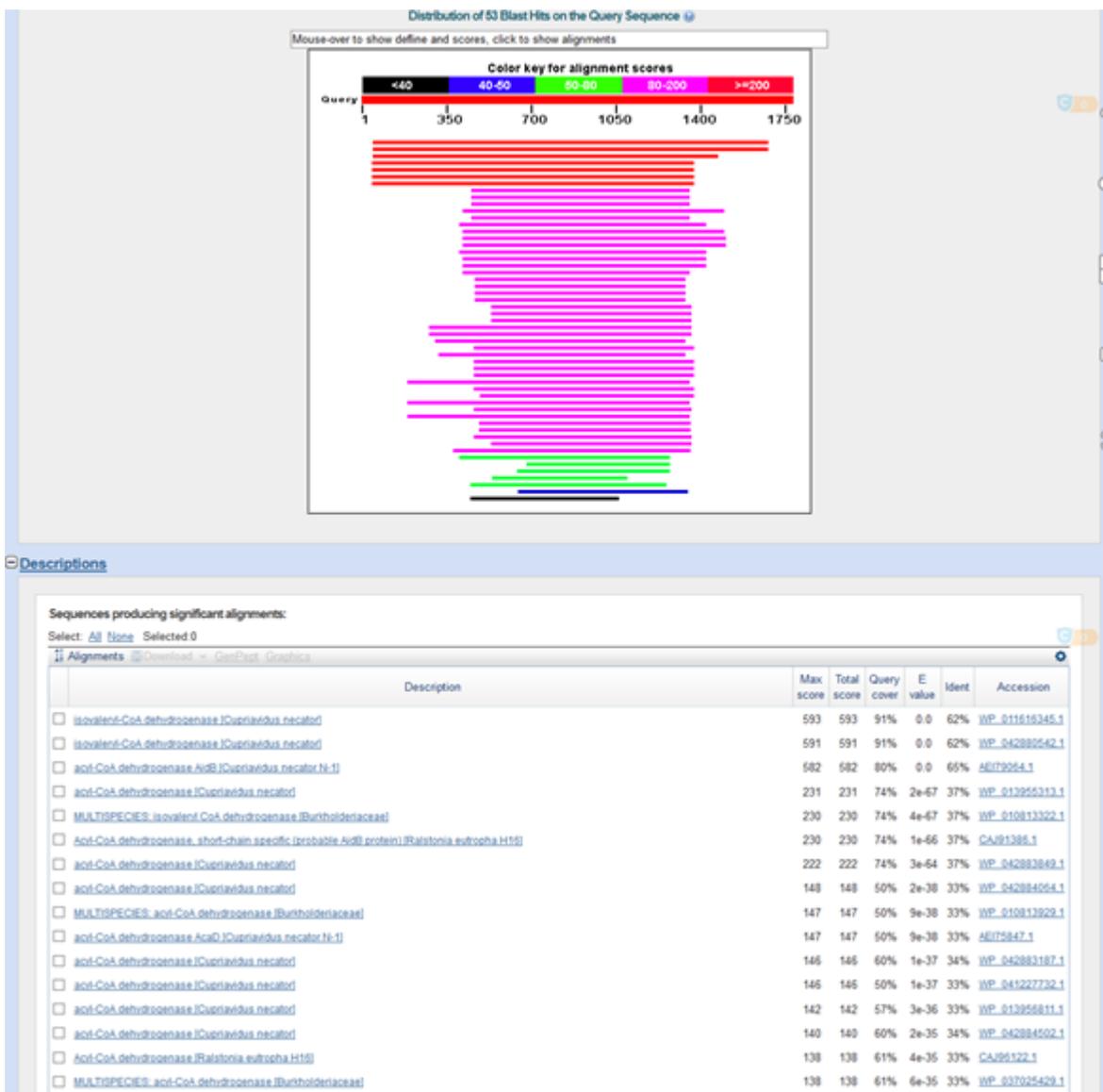
Features: [transcriptional regulators, LysR family](#)

Query	6	CGCG-GGCACGAGCGGATGCCCATGSGCAACTTCWMAACGKACCAACGGTCTGCCATA	64
Sbjct	2352913	CGCGCGCACCCAGCGGATGCCCATCCGGAATTCGATCATCGACAGGATCGTCTGCCACA	2352854
Query	65	AGCGCGCTCGKACGGATTGKGGACTGAAGCCCGCATCCACGCAITGCGGATGATCT	124
Sbjct	2352853	GCCGCGCTCGTGGCGGATCAGCGGACTGAATCCCGCTTCACGCACTGCGGATGATCA	2352794
Query	125	GATCGTGATAATGSGGCGACMCCGAGCGCGAAACAAAATGAACGGCTCGCGCGGAGSG	184
Sbjct	2352793	GGTCTGTAGTGCGGTCCGCGCTCGCGGAAACAGGATGAACGGTTCGGTTCGCGAGCG	2352734
Query	185	CGCGAGCTCGATGCGCTTGSGCCGCGGAAGCGKGGCCCG-CGGCAGGCAGCACARA	243
Sbjct	2352733	TGGCGAGCGGACTGCCTGCGCCGCGCA-GTGGATGCGCGCGCGGACGGCAGGCACACG	2352675
Query	244	AATGGCTCGGAAAATGSGGCTCCRAITGCACTCGCAGGAAAGCCCGCCAGKGGSGCG	303
Sbjct	2352674	AACGGCTCGCATAGACGGGACCGATTCCACCTCGGGCGGGARGTGGCCCGATGCGCA	2352615

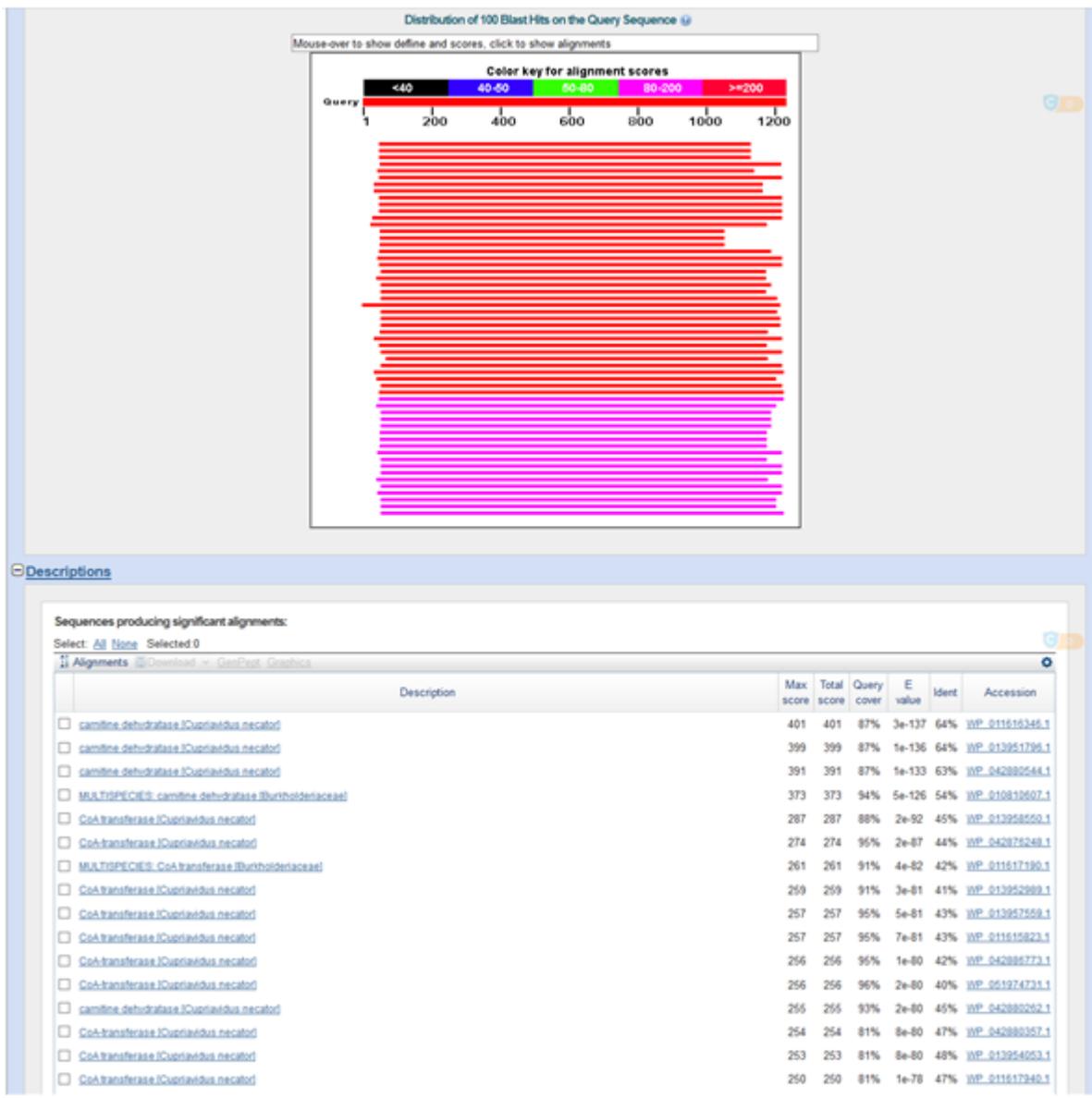
F. Pesquisa genoma de *Ralstonia eutropha* (BLASTX) da sequência do regulador transcricional *lysR*.



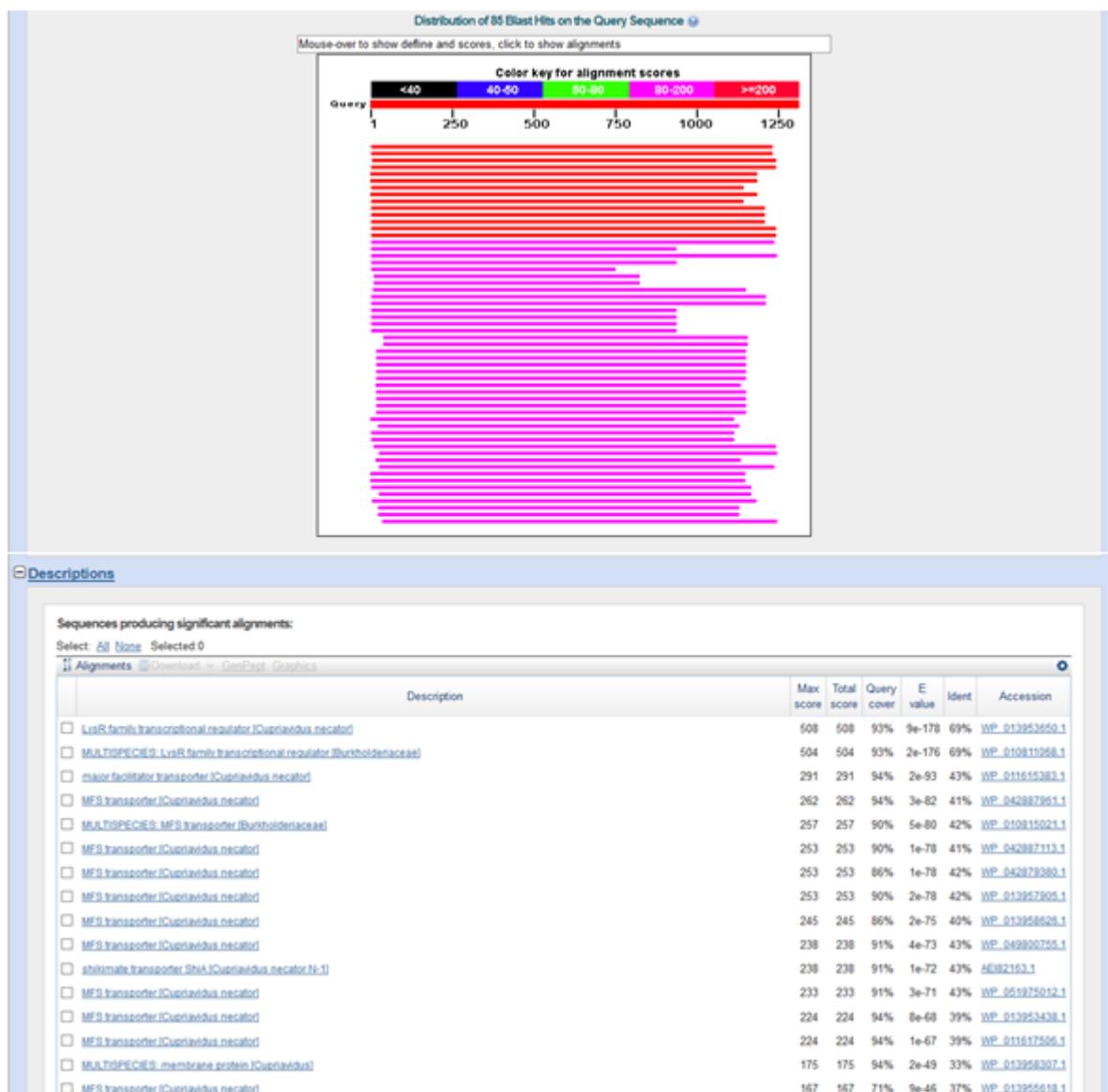
G. Pesquisa genoma de *Ralstonia eutropha* (BLASTX) da sequência do gene acil CoA desidrogenase.



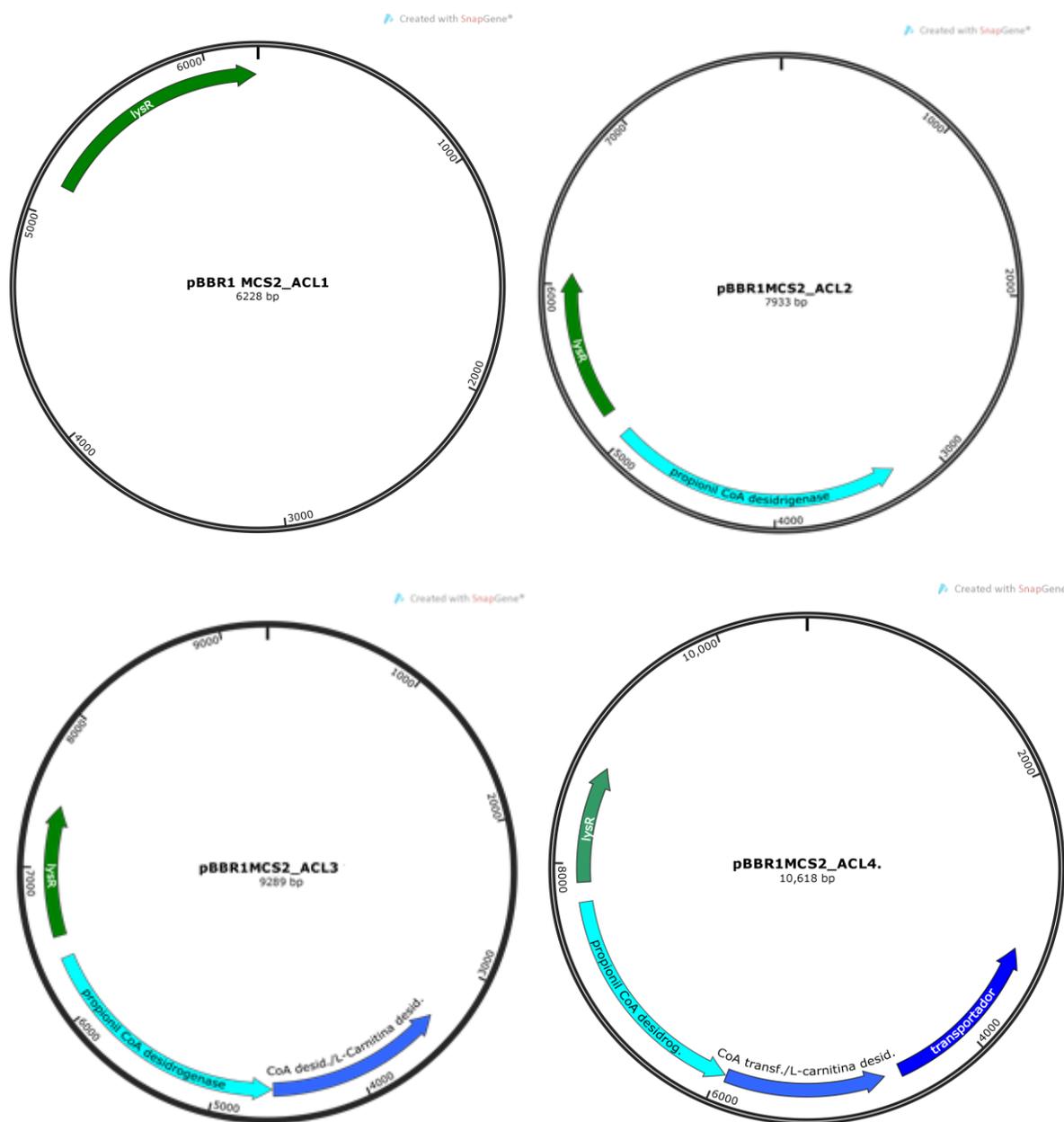
H. Pesquisa genoma de *Ralstonia eutropha* (BLASTX) da sequência do gene CoA transferase/L-carnitina desidratase.



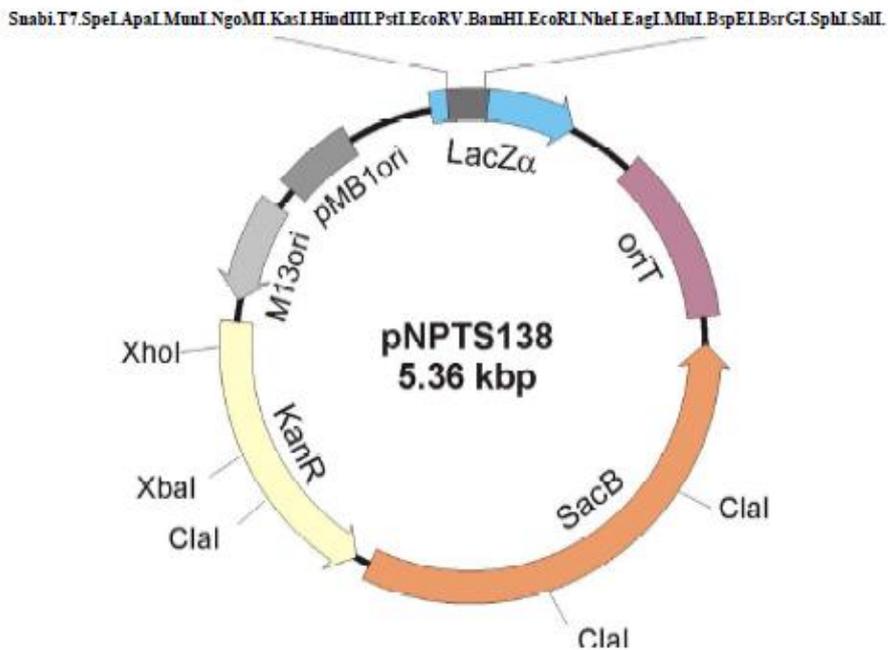
I. Pesquisa genoma de *Ralstonia eutropha* (BLASTX) da sequência transportador.



J. Construções com genes do operon da α -oxidação.

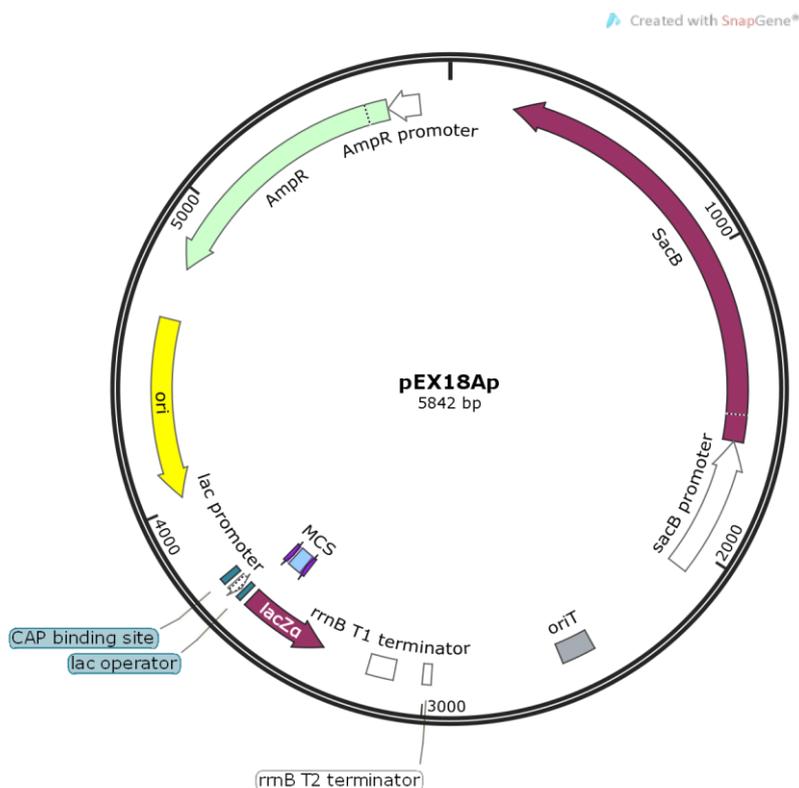


K. Mapa do plasmídeo pNPTS138

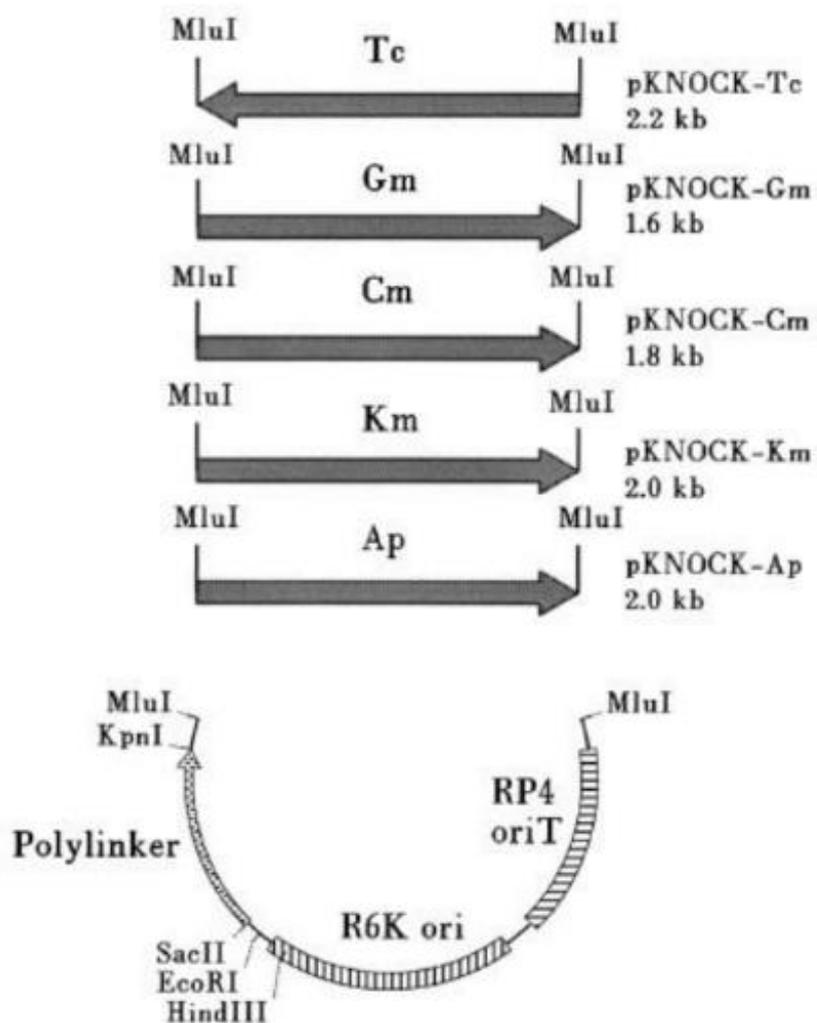


Fonte: M.R.K. Dickon Alley, trabalho não publicado.

L. Mapa do plasmídeo pEX18ap

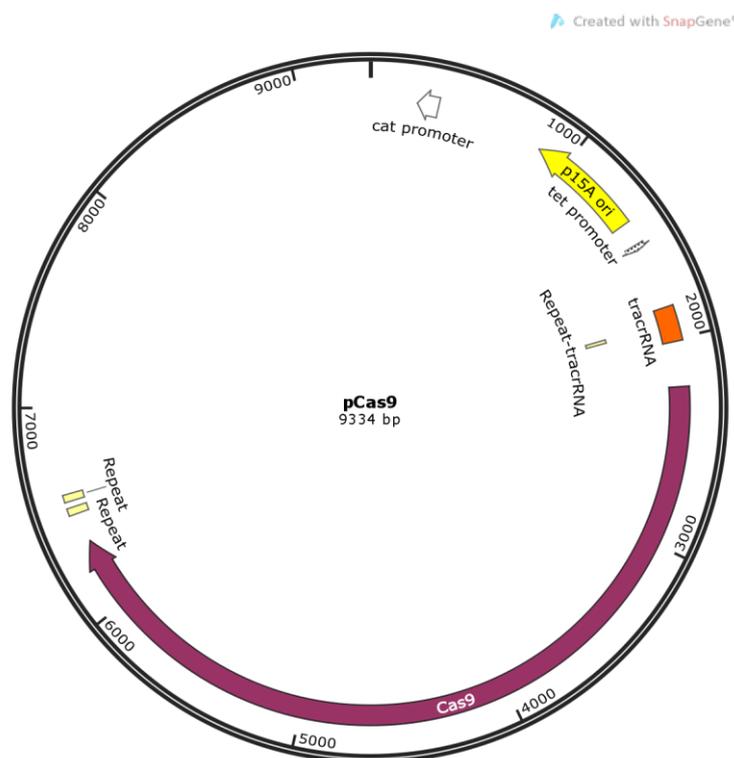


M. Mapa do plasmídeo pKNOCK

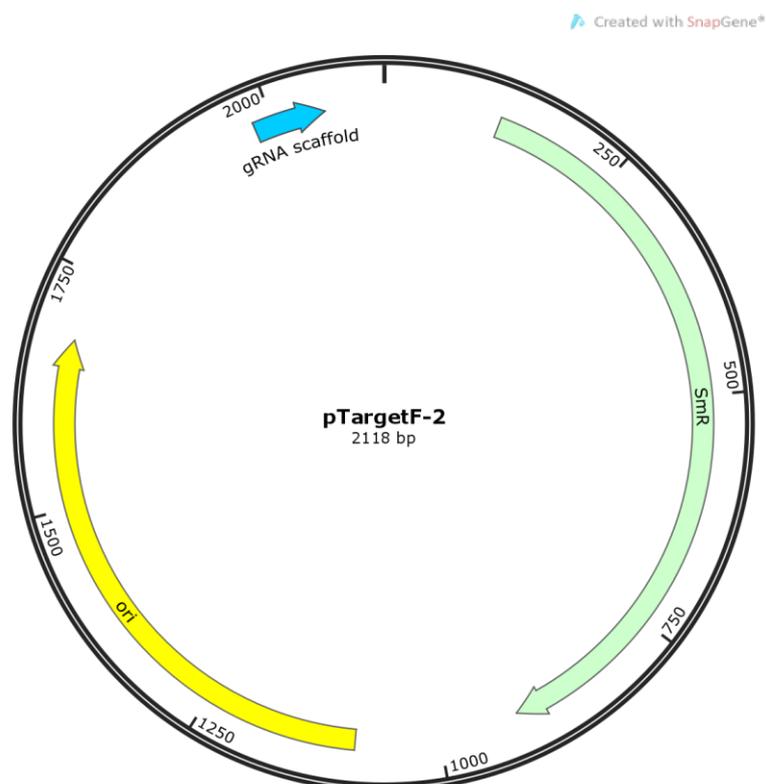


Fonte: Alexey, 1999.

N. Mapa do plasmídeo pCas9



O. Mapa do plasmídeo pTargetF



P. Dados não tratados de ensaio de acúmulo em frascos agitados

Ensaio 1

Tempo (h)	Amostra	Tubo (mg)	total (mg)	Xt (g/L)	pH	Prop. (mg)	HB (M)	HV (M)	PHA (%)	HB (%)	HV(%)	HB (mol%)	HV (mol%)	Glicose (g/L)	Propionato (g/L)	Y hv/prp (g/g)
0	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (1)	1.055	1.056	0.020	7.060	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.350	0.000	-
0	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (2)	1.059	1.059	0.040	7.040	1.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	10.980	0.000	-
0	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (3)	1.048	1.048	0.050	7.070	0.900	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.130	0.000	-
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 (1)	1.051	1.053	0.170	7.050	0.700	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.780	0.000	-
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 (2)	1.054	1.055	0.080	7.060	0.800	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.750	0.000	-
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 (3)	1.038	1.039	0.080	7.060	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.550	0.000	-
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 (1)	1.048	1.049	0.080	7.060	0.700	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.530	0.000	-
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 (2)	1.045	1.046	0.100	7.050	0.700	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.820	0.000	-
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 (3)	1.045	1.046	0.090	7.050	0.900	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	11.350	0.000	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (1)	1.049	1.094	4.420	6.080	14.000	7.956	0.000	56.829	56.829	0.000	100.000	0.000	2.570	0.934	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (2)	1.056	1.101	4.520	6.060	13.000	7.274	0.000	55.956	55.956	0.000	100.000	0.000	2.910	0.853	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (3)	1.050	1.096	4.560	6.100	11.000	6.326	0.000	57.508	57.508	0.000	100.000	0.000	2.530	1.020	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 (1)	1.055	1.103	4.770	6.200	12.000	8.341	0.000	69.506	69.506	0.000	100.000	0.000	1.730	0.938	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 (2)	1.045	1.092	4.640	6.210	12.300	10.435	0.000	84.834	84.834	0.000	100.000	0.000	1.970	0.950	-
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 (3)	1.038	1.084	4.610	6.200	13.600	8.765	0.000	64.449	64.449	0.000	100.000	0.000	2.470	0.936	-
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 (1)	1.044	1.089	4.540	6.140	11.000	8.269	0.000	75.173	75.173	0.000	100.000	0.000	2.060	0.688	-
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 (2)	1.038	1.081	4.280	6.130	10.500	6.999	0.000	66.025	66.025	0.000	100.000	0.000	3.360	0.350	-
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 (3)	1.057	1.107	5.010	6.100	12.900	11.034	0.000	85.534	85.534	0.000	100.000	0.000	0.000	1.095	-
72	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (1)	1.082	1.132	4.950	7.020	14.900	7.735	0.098	52.572	51.914	0.657	98.923	1.077	0.000	0.000	0.035
72	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (2)	1.075	1.124	4.910	7.030	14.500	6.905	0.098	48.295	47.621	0.674	98.797	1.203	0.000	0.000	0.039
72	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL (3)	1.081	1.132	5.080	7.040	12.700	7.933	0.111	63.331	62.461	0.871	98.815	1.185	0.000	0.000	0.043
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 (1)	1.073	1.125	5.220	7.030	11.600	6.090	0.390	55.862	52.503	3.359	94.784	5.216	0.000	0.000	0.187
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 (2)	1.078	1.129	5.030	7.010	13.300	7.088	0.466	56.801	53.295	3.506	94.645	5.355	0.000	0.000	0.186
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 (3)	1.075	1.127	5.150	7.040	12.800	7.011	0.546	59.040	54.770	4.269	93.718	6.282	0.000	0.000	0.235
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 (1)	1.074	1.125	5.090	7.030	14.500	6.821	0.150	48.080	47.043	1.037	98.140	1.860	0.000	0.000	0.077
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 (2)	1.073	1.125	5.130	7.060	14.000	7.726	0.003	55.186	55.186	0.023	99.964	0.036	0.000	0.000	0.003
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 (3)	1.067	1.119	5.140	7.050	12.800	6.043	0.003	47.209	47.209	0.027	99.951	0.049	0.000	0.000	0.001

Ensaio 2

Tempo (h)	Amostra	MS tubo (mg)	MS total (mg)	Xt (g/L)	pH	Prop. (mg)	HB (M)	HV (M)	PHA (%)	HB (%)	HV(%)	HB (mol%)	HV (mol%)	Glicose (g/L)	Ácido (g/L)	Y hv/prp (g/g)
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 1	1079.700	1080.500	0.160	7.060	0	0	0	0	0	0	0	0	15.973	0.000	
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 2	1159.800	1160.700	0.180	7.100	0	0	0	0	0	0	0	0	17.271	0.000	
0	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 3	1160.000	1160.900	0.180	7.030	0	0	0	0	0	0	0	0	16.907	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 1	1065.400	1066.200	0.160	7.010	0	0	0	0	0	0	0	0	17.522	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 2	1154.000	1155.000	0.200	6.980	0	0	0	0	0	0	0	0	16.145	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 3	1078.100	1079.300	0.240	6.970	0	0	0	0	0	0	0	0	15.758	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 1	1065.300	1066.200	0.180	6.950	0	0	0	0	0	0	0	0	17.271	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 2	1079.100	1080.000	0.180	6.960	0	0	0	0	0	0	0	0	17.107	0.000	
0	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 3	1148.800	1149.900	0.220	6.950	0	0	0	0	0	0	0	0	15.964	0.000	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 1	1165.000	1188.700	4.740	5.800	13.300	5.918	0.000	44.499	44.50	0.00	44.499	0.000	6.320	3.654	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 1'	1166.700	1189.700	4.600	5.810	13.500	7.206	0.000	53.378	53.38	0.00	53.378	0.000	6.396	1.841	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 2	1161.100	1182.700	4.320	5.930	15.900	7.185	0.000	45.188	45.19	0.00	45.188	0.000	7.093	1.741	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 2'	1121.900	1143.900	4.400	5.910	13.100	5.671	0.000	43.287	43.29	0.00	43.287	0.000	7.050	1.724	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 3	1154.400	1176.200	4.360	5.870	11.700	7.513	0.000	64.217	64.22	0.00	64.217	0.000	7.164	1.523	
24	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 3'	1164.900	1187.000	4.420	5.860	13.300	6.365	0.000	47.858	47.86	0.00	47.858	0.000	7.182	1.860	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 1	1149.600	1174.300	4.940	6.280	14.000	8.018	0.000	57.271	57.27	0.00	57.271	0.000	6.545	1.706	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 1'	1158.600	1183.900	5.060	6.170	14.600	7.179	0.000	49.172	49.17	0.00	49.172	0.000	6.449	1.778	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 2	1155.900	1179.300	4.680	6.210	14.000	7.785	0.000	55.609	55.61	0.00	55.609	0.000	7.228	1.741	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 2'	1064.500	1088.800	4.860	6.160	12.700	6.827	0.000	53.752	53.75	0.00	53.752	0.000	7.198	1.742	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 3	1167.100	1190.700	4.720	6.090	12.400	6.741	0.000	54.360	54.36	0.00	54.360	0.000	7.499	1.772	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 3'	1079.300	1102.600	4.660	6.080	14.600	7.776	0.000	53.258	53.26	0.00	53.258	0.000	7.749	1.811	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 1	1112.000	1137.500	5.100	5.850	11.900	6.790	0.000	57.061	57.06	0.00	57.061	0.000	5.634	1.777	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 1'	1157.400	1183.600	5.240	5.820	17.700	9.658	0.000	54.565	54.56	0.00	54.565	0.000	5.492	1.728	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 2	1076.600	1099.400	4.560	5.830	11.700	6.231	0.000	53.258	53.26	0.00	53.258	0.000	6.128	1.769	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 2'	1087.200	1111.200	4.800	5.820	14.300	7.373	0.000	51.557	51.56	0.00	51.557	0.000	6.116	1.757	
24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 3	1164.700	1187.400	4.540	5.800	12.600	6.565	0.000	52.102	52.10	0.00	52.102	0.000	6.520	1.711	

24	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 3'	1165.600	1188.700	4.620	5.810	14.000	7.944	0.000	56.746	56.75	0.00	56.746	0.000	6.538	1.739	
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 1	1067.900	1094.300	5.280	7.610	17.500	7.700	0.498	46.847	44.00	2.85	44.001	2.846	0.000	0.056	0.042
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 1'	1158.400	1184.500	5.220	7.580	11.800	5.066	0.335	45.771	42.93	2.84	42.934	2.837	0.000	0.050	0.083
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 2	1166.100	1193.800	5.540	7.550	15.400	7.544	0.465	52.003	48.99	3.02	48.986	3.017	0.000	0.074	0.100
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 2'	1158.700	1186.200	5.500	7.510	14.700	6.638	0.414	47.976	45.16	2.82	45.157	2.819	0.000	0.022	0.091
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 3	1145.000	1172.200	5.440	7.500	14.000	6.016	0.390	45.756	42.97	2.79	42.970	2.787	0.000	0.070	0.104
72	LFM 101 pBBR1 MCS2 - 3'	1150.300	1177.700	5.480	7.490	13.000	5.780	0.377	47.360	44.46	2.90	44.460	2.901	0.000	0.022	0.086
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 1	1156.200	1183.500	5.460	7.510	16.700	8.356	1.069	56.436	50.04	6.40	50.036	6.400	0.000	0.022	0.207
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 1'	1153.600	1181.800	5.640	7.490	11.900	6.200	0.781	58.666	52.10	6.57	52.100	6.566	0.000	0.022	0.211
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 2	1124.000	1151.900	5.580	7.470	16.900	8.993	1.189	60.251	53.22	7.04	53.215	7.036	0.000	0.022	0.228
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 2'	1162.200	1190.400	5.640	7.470	15.300	8.111	1.076	60.044	53.01	7.03	53.013	7.031	0.000	0.022	0.231
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 3	1080.900	1109.000	5.620	7.480	14.900	7.785	1.002	58.970	52.25	6.72	52.245	6.725	0.000	0.022	0.216
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 - 3'	1167.200	1195.400	5.640	7.470	18.100	8.916	1.135	55.535	49.26	6.27	49.261	6.273	0.000	0.022	0.198
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 1	1152.400	1178.400	5.200	7.430	17.600	8.625	0.484	51.756	49.01	2.75	49.005	2.751	0.000	0.022	0.081
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 1'	1143.700	1169.900	5.240	7.430	18.000	9.305	0.520	54.585	51.70	2.89	51.697	2.888	0.000	0.022	0.089
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 2	1153.100	1179.000	5.180	7.470	12.200	5.935	0.309	51.176	48.65	2.53	48.647	2.529	0.000	0.022	0.075
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 2'	1085.900	1112.300	5.280	7.470	11.700	6.031	0.315	54.231	51.54	2.69	51.543	2.689	0.000	0.022	0.082
72	LFM 177 pBBR1 MCS2::ACL4 - 3	1160.200	1186.700	5.300	7.450	12.800	6.445	0.363	53.187	50.35	2.84	50.349	2.838	0.000	0.022	0.089
72	LFM 177 pBBR1 MCS2 ::ACL4 - 3'	1154.300	1180.100	5.160	7.460	14.800	7.844	0.450	56.037	53.00	3.04	52.997	3.040	0.000	0.071	0.094

Dados em vermelho não foram utilizados em ambos ensaios.