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

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, polihidroxialcanoato.

Burkholderia sacchari é uma espécie de bactéria descrita em 2001, isolada nos anos 90, de solo de canavial em São Paulo, capaz de acumular polihidroxialcanoatos (PHA). A partir do substrato sacarose, acumula o homopolímero poli-3-hidroxiбутirato (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-hidroxiбутirato-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.

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 polihidroxialcanoatos (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 polihidroxialcanoatos (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. Ensaios 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 Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (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 a 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_{sc}), com 3 a 5 átomos de carbono da cadeia carbônica, e os PHA *medium-chain-length* compostos por monômeros de cadeia média (PHA_{mc}), 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, conterá 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-hidroxisvalerato (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-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (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. Todas 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, as vias metabólicas centrais, como o ciclo do ácido tricarboxílico (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 $Y_{3HV/Prop}$, (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 transicional ou repressão (CELIS, 1999; KEULEN et al., 2003; VAN PICOSSE 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 sequência 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.

5 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 desidrigenase.

- 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.

6 REFERÊNCIAS

ALEXANDRINO, P.M.R., MENDONÇA, T.T., BAUTISTA L.P.G., CHERIX, J., LOZANO-SAKALAIUSKAS, 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., PÓSFAL 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., SHIM 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.

KESHAVERZ, 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 of 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-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) [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-hidroxibutirato- co-3-hidroxihexanoato) [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_versi> 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-hidroxialcanoatos 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.