MIREIA RECIO MITTER

**Modificação da morfologia de células de
Pseudomonas sp. LFM046 e avaliação do impacto no
acúmulo de polihidroxialcanoato**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

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

2019

Resumo

MITTER M. R. Modificação da morfologia de células de *Pseudomonas* sp. LFM046 e avaliação do impacto no acúmulo de polihidroxialcanoato. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A morfologia celular tem sido apontada como um novo alvo na engenharia genética de bactérias na produção de compostos químicos de interesse industrial. Recentemente, uma série de trabalhos têm mostrado que a alteração da morfologia celular de bactérias pode levar a um maior acúmulo de polihidroxialcanoatos contendo monómeros de cadeia curta, um tipo de poliéster bacteriano. Neste trabalho, o efeito da alteração da morfologia celular é estudado em *Pseudomonas* sp. LFM046, uma cepa isolada de solo canavial que produz naturalmente polihidroxialcanoato contendo monómeros de cadeia média. A proteína SulA, inibidora da divisão celular, foi expressa de forma controlada na bactéria alvo para a obtenção de células filamentosas. O efeito da mudança morfológica no acúmulo do polímero foi determinado através de microscopia de fluorescência e análises químicas de amostras obtidas em cultivos em frascos agitados e em cultivos de batelada alimentada em biorreator. Além do estudo empírico, este trabalho propõe um modelo matemático para analisar a capacidade de acúmulo de polihidroxialcanoatos baseado na geometria da célula. Comprimentos celulares aumentados de *Pseudomonas* sp. LFM046 foram obtidos de forma controlada e a mudança morfológica resultou em um aumento de 10% no acúmulo de polihidroxialcanoato. Em cultivos de batelada alimentada a cepa modificada com indução apresentou um comprimento 10 vezes aumentado e acumulou 84% de polímero na massa seca celular, enquanto a cepa modificada sem indução ficou com o comprimento original e acumulou 76%.

Palavras-chave: polihidroxialcanoatos, *Pseudomonas*, morfologia celular, divisão celular, sulA

Abstract

MITTER, M. R . Modification of the morfology of *Pseudomonas* sp. LFM046 cells and analysis of the effect on polyhydroxyalkanoate accumulation. 68 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, ano.

Cell morphology has been pointed out as a new target for genetic engineering of bacteria for bioproduction. Modifying the cell shape of bacteria has been reported to lead to increases in the accumulation of the short-chain-length type of the natural polyester polyhydroxyalkanoate. In this work, the impact of increasing cell length on the production of medium-chain-length polihidroxialcanoate by the natural producer *Pseudomonas* sp. LFM046 is studied. Therefore, the endogenous gene codifying the cell division inhibitor SulA was expressed in this cell strain and both the cell morphology and the polyhydroxyalkanoate accumulation were analyzed in shaken-flask and fed-batch bioreactor cultivations. Further, a mathematical model for predicting accumulation capacity based on cell morphology is proposed. The cell length was successfully increased in a controlled manner in the Brazilian sugarcane soil isolate and the polyhydroxyalkanoate accumulation resulted to be increased by 10% when cell length was increased 10 times. In bed-batch cultivations the modified strain acumulated 84% of polymer in cell dry weight when induced, and 76% without induction.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas*, cell morphology, cell division, sulA

1 Introdução

1.1 Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHA) são cadeias de ácidos hidroxicanóicos (HA) unidos por ligações éster. Estes polímeros hidrofóbicos são encontrados nos citoplasmas de diversas bactérias e também em algumas arqueias na forma de grânulos com proteínas associadas (BRESAN et al., 2016). Existe uma grande variedade de HAs, mais de 150 HAs diferentes haviam sido reportados até o final do século XX como constituintes de PHA (STEINBÜCHEL; LÜTKE-EVERSLOH, 2003; CHEN; HAJNAL, 2015). Todos os monômeros possuem um grupo carboxila e uma hidroxila, e são polimerizados por meio de uma reação de esterificação, que une uma hidroxila de um monômero com o grupo carboxila do próximo monômero, liberando uma molécula de água. Há HAs com a hidroxila na posição 3, 4, 5 e 6, sendo a posição 3 a mais frequente. Quando ocorre esta ligação, os carbonos de posições posteriores à hidroxila formam ramificações ou resíduos (R) da cadeia resultante (Figura 1).

Dependendo do número de carbonos, os HAs são classificados em HAs de cadeia curta (scl) ou cadeia média (mcl) (do inglês *short-* ou *medium-chain-length*). Os primeiros têm de 3 a 5 carbonos, os segundos de 6 a 14 (MADISON; HUISMAN, 1999; LÓPEZ et al., 2015). Existem PHAs compostos por monômeros que contêm insaturações, moléculas de enxofre ou até anéis benzóicos. Quando é analisada a composição monomérica dos polímeros produzidos por bactérias selvagens, se encontram polímeros compostos por um só tipo de HA ou diferentes tipos na mesma cadeia, os segundos são denominados copolímeros. Os copolímeros podem apresentar diferentes monômeros distribuídos de forma aleatória pelo polímero ou podem apresentar trechos de apenas um monômero dentro do polímero. No primeiro caso são chamados de *random copolymers* (copolímeros randômicos) e no segundo de *block copolymers* (copolímeros em blocos). A composição monomérica dos PHAs determina as propriedades físico-químicas do material como densidade, cristalinidade, elasticidade e temperatura de fusão (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Os PHAs têm um papel importante nas comunidades microbianas. Enquanto muitos microrganismos são produtores, um número ainda maior de microrganismos é consumidor destes poliésteres (OBRUCA et al., 2016; PRIETO et al., 2015). Quando conveniente para as células, os polímeros são degradados pela bactéria e utilizados como fonte de carbono e energia (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Por isso, eles são considerados um material de reserva. A degradação é catalisada por PHA depolimerases, localizadas nos grânulos dos produtores (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; PRIETO et al., 2015) e secretadas pelos microrganismos não produtores, muitos deles fungos (JENDROSSEK; SCHIRMER;

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química dos polihidroxicanoatos. Baseado em (MADISON; HUISMAN, 1999; LÓPEZ et al., 2015)

SCHLEGEL, 1996; MATAVULJ; SAD; MOLITORIS, 2000). Por serem universalmente degradados em ácidos hidroxicanoicos, os quais podem ser metabolizados por muitos organismos, os PHAs são biodegradáveis. Tem sido demonstrada a degradabilidade de PHA_{scl} em ambientes terrestres e aquáticos e até nas profundidades marinhas (MATAVULJ; SAD; MOLITORIS, 2000). Também os PHA_{mcl} são biodegradáveis (KIM et al., 2007). Alguns PHAs, como o amplamente estudado poli(3-hidroxiibutirato) (P3HB ou PHB), podem ser degradados até no corpo humano, liberando monômeros que se encontram naturalmente no sangue (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013). De fato, existem moléculas de PHB encontradas em conformações diferentes à das inclusões proteolípídicas descritas, tanto em células procariotas como eucariotas, que exercem diferentes funções (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001; REUSCH, 2013). Os PHA_{mcl} também apresentam biocompatibilidade (CHEN; WU, 2005).

As características termoplásticas dos PHAs fazem com que eles possam se tornar uma alternativa de fonte renovável aos plásticos tradicionais, que ainda apresenta biodegradabilidade e biocompatibilidade. A principal barreira na indústria dos PHAs é o alto

custo de produção (CHEN, 2009). Isso tem provocado que a principal aplicação migrasse de fabricação de produtos descartáveis como embalagens para produtos com alto valor agregado, na área médica (SUN et al., 2007; SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013).

Embora um grande número de bactérias seja produtor de PHAs, o gênero *Pseudomonas* se destaca pela síntese de PHA_{mcl} sem necessidade de utilizar uma fonte de carbono relacionada quimicamente com o monômero da cadeia, como por exemplo a partir de glicose. Para fazer isso, contam com genes específicos, apresentados a seguir.

1.1.1 Biosíntese dos PHAs

A síntese de polihidroxicanoatos é catalizada por um conjunto de enzimas que geram ou preparam os monômeros que serão polimerizados pela ação da PHA sintase. Como mencionado acima, na natureza são encontrados PHAs com composições muito diversas. A capacidade de sintetizar os polímeros diferentes depende da PHA sintase presente no organismo e da presença de alguns genes adicionais. Existem diferentes tipos de PHA sintases que apresentam diferente especificidade para substratos de cadeia curta ou média (REHM, 2003). O primeiro polímero a ser estudado foi o PHB, a síntese do qual é a mais simples. Para gerar o monômero de quatro carbonos, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas, formando acetoacetil-CoA, que depois é transformado em (R)-3-hidroxiacetil-CoA, pronto para ser polimerizado. Assim, somente três enzimas são necessárias para sintetizar PHB a partir de Acetil-CoA: a acetil-CoA acetiltransferase ou β -cetotiolase, a acetoacetil-CoA reductase e a PHA sintase (Figura 2). Os genes que codificam essas três enzimas geralmente se encontram organizados no operon *phaCAB* e as enzimas são chamadas também PhaA, PhaB e PhaC, respectivamente (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

A incorporação de monômeros de mais de quatro carbonos é reforçada nas bactérias que possuem a enzima enoil-CoA hidratase ou PhaJ, pois ela permite usar compostos intermediários da β -oxidação (Figura 2). Por exemplo, bactérias do gênero *Aeromonas* (DOI; KITAMURA; ABE, 1995) acumulam poli(3-hidroxiacetilato-co-3-hexanoato) quando é fornecido um ácido alcanóico ou um óleo vegetal, graças ao operon *phaPCJ* que codifica além da enzima mencionada, uma PHA sintase e uma phasina, que é um tipo de proteína específica dos grânulos de PHA, introduzido abaixo (FUKUI et al., 2001).

Por fim, o gênero *Pseudomonas*, apresenta outro tipo de síntese de PHAs (SUDESH; ABE; DOI, 2000). As espécies deste gênero geralmente produzem PHAs com monômeros de cadeia média sem necessidade de utilizar uma fonte de carbono relacionada quimicamente, como por exemplo a partir de glicose. Além de contar com a enzima PhaJ, que permite usar intermediários da β -oxidação, também possuem a enzima (R)-3-hidroxicanoil-ACP-CoA transacilase ou PhaG, que fornece monômeros (R)-3-hidroxiacil-CoA a partir da síntese de ácidos graxos *de novo* (Figura 2) (PRIETO et al., 2015). Geralmente não produzem

PHA_{scl}, porém existem exceções, como a *Pseudomonas extremaustralis*, uma espécie de *Pseudomonas sensu stricto* isolada da antártica, que produz majoritariamente PHB, mas provavelmente ela adquiriu o operon de síntese de PHB por transferência horizontal (AYUB et al., 2007).

Figura 2 – Representação esquemática da biossíntese dos diferentes tipos de polihidroxialcanoato. PhaA: acetil-CoA acetiltransferase ou β -cetotiolase, PhaB: acetoacetyl-CoA reductase, PhaC: PHA sintase. Baseado em (SUDESH; ABE; DOI, 2000; PRIETO et al., 2015).

1.1.2 Grânulos e regulação da síntese dos PHAs

Cada vez são encontradas mais evidências de que os grânulos de PHA não são simples acumulações de poliéster, mas sim complexos macromoleculares, para os quais foi proposto o nome carbonossomo (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). Embora eles apresentem uma camada superficial de natureza diferente ao interior do grânulo, como é observado em imagens de microscopia eletrônica, eles não contêm fosfolipídeos (BRESAN et al., 2016), mas várias proteínas têm sido co-localizadas com os grânulos, as quais exercem as mais diversas funções (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014).

As proteínas associadas ao grânulo de PHA são chamadas de *granule associated protein* (GAP). Em diversos organismos foram identificadas como GAP (i) PHA sintases (PhaC), (ii) PHA depolimerases (PhaZ), (iii) reguladores de transcrição e (iv) proteínas estruturais (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). As proteínas estruturais são chamadas de phasinas, elas apresentam uma parte hidrofóbica, ligada ao grânulo e uma parte hidrofílica, exposta ao citoplasma (STEINBÜCHEL et al., 1995). Desde que a ausência de fosfolipídeos na superfície dos grânulos foi demonstrada, elas são as únicas moléculas conhecidas que impedem a coalescência dos grânulos hidrofóbicos (BRESAN et al., 2016).

Além da função estrutural, algumas phasinas (PhaP1 e PhaM em *Cupriavidus necator*, também conhecida como *Ralstonia eutropha* (REINECKE; STEINBÜCHEL, 2009), e PhaF em *Pseudomonas putida*) controlam o número e o tamanho dos grânulos (GALÁN et al., 2011; WIECZOREK et al., 1995; WAHL et al., 2012). Recentemente ainda foi provado que algumas phasinas (PhaM em *C. necator* e PhaF em *P. putida*) ligam os grânulos ao cromossomo bacteriano, determinando a localização deles na célula, e sendo essenciais para a segregação dos carbonossomos na divisão celular (GALÁN et al., 2011; WAHL et al., 2012). PhaM, em *C. necator*, também demonstrou ativar a PHA sintase PhaC1 (WAHL et al., 2012; BRESAN; JENDROSSEK, 2017).

A proteína PhaF, além das funções de phasina e de localização e segregação dos grânulos em *P. putida*, também afeta a transcrição dos genes do agrupamento *pha* embora a ligação desta ao DNA seja independente da sequência (GALÁN et al., 2011; PRIETO et al., 1999). Em contraste, o regulador transcricional PhaD atua em dois promotores do agrupamento *pha* (De Eugenio et al., 2010). O gene *phaD* se encontra logo depois da segunda PHA polimerase, ou seja nessa ordem: *phaC1*, *phaZ*, *phaC2* e *phaD*. Ele é um regulador positivo que atua no P_{C1} , promotor responsável pela transcrição de *phaC1ZC2D*, e no P_I , promotor responsável pela transcrição de *phaIF*. O agrupamento *pha* de *Pseudomonas* possui vários promotores (P_{C1} , P_Z , P_{C2} , P_F e P_I foram identificados), mas os promotores que mostraram ter uma força maior foram P_I e P_{C1} , os quais são regulados positivamente pelo PhaD, sendo que o P_I somente é ativado na presença de PhaD, enquanto P_{C1} também se encontra ativo, embora com uma taxa de transcrição menor, na ausência de PhaD.

Em *C. necator* a proteína repressora PhaR, que também é uma GAP, se liga tanto ao DNA, quanto ao PHA. Ela inibe a transcrição da phasina PhaP1 e também a transcrição do próprio gene *phaR* (YORK; STUBBE; SINSKEY, 2002; PÖTTER et al., 2002; JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). Acredita-se que ela se liga ao polímero quando o grânulo está se iniciando, permitindo a expressão de PhaP, que também se liga ao polímero. Quando a superfície do grânulo não permite mais a ligação de proteínas, PhaR inibe a expressão dessas duas GAPs (PÖTTER et al., 2002; BRIGHAM; SINSKEY, 2012).

Além da atividade dos reguladores transcricionais descritos acima, resultados

reportados em *C. necator* e *P. putida*, indicam que existem outros mecanismos de regulação envolvidos na síntese ou degradação dos PHAs, tais como os fatores de transcrição sigma (σ_{38} , σ_{54} e σ_{70}) (HOFFMANN; REHM, 2004; TIMM; STEINBÜCHEL, 1992; RAIGER-IUSTMAN; RUIZ, 2008), resposta severa (*stringent response*) (JUENGERT et al., 2017; RUIZ et al., 2001), o sistema Crc, o qual está relacionado com o uso de fontes de carbono (La Rosa et al., 2014), e o sistema GacS/GacA que afeta várias rotas metabólicas bacterianas (RYAN et al., 2013).

Embora a regulação do metabolismo do PHA e a dinâmica dos carbonossomos ainda não estejam completamente elucidadas, o metabolismo do PHA é entendido como um ciclo, em que o polímero é sintetizado e degradado suprimindo demandas transientes por metabolitos e equivalentes de redução (PRIETO et al., 2015). Geralmente ele é produzido em grandes quantidades quando há uma fonte de carbono em excesso e uma limitação em um nutriente essencial para o crescimento como o nitrogênio, embora possa ser sintetizado em condições favoráveis ao crescimento. No caso de *P. putida*, acumula PHA na fase exponencial de crescimento usando octanoato como fonte de carbono, enquanto usando uma fonte de carbono não-relacionada como glicose ela somente acumula quantidades significativas na fase estacionária do crescimento, após limitação de um nutriente essencial para o crescimento (PRIETO et al., 2015).

1.2 *Pseudomonas* sp. LFM046

A cepa *Pseudomonas* sp. LFM046 é uma cepa isolada de solo de canavial que demonstrou ser uma das melhores produtoras de PHA_{mcl} (GOMEZ, 1994; GOMEZ, 2000; DINIZ et al., 2004). O PHA_{mcl} produzido por esta cepa a partir de carboidratos é composto principalmente por ácido 3-hidroxidecanóico (3HD) e ácido 3-hidroxioctanóico (3HO). O material resultante foi caracterizado como semi-cristalino com alta estabilidade térmica e propriedades termo-mecânicas apropriadas para aplicação como filmes (SÁNCHEZ et al., 2003). Ela acumula até 60% de polímero na massa seca celular (MSC) usando glicose como única fonte de carbono (SÁNCHEZ et al., 2003; SILVA-QUEIROZ et al., 2009). Quando alimentada com diferentes óleos vegetais, a composição monomérica do PHA varia, o que permite produzir PHAs com propriedades diferentes, abrindo assim possibilidades de síntese de polímeros "feitos sob medida" (SILVA-QUEIROZ et al., 2009).

O genoma deste isolado do Laboratório de Bioprodutos foi sequenciado (CARDINALI-REZENDE et al., 2015) e se encontra já na versão completa na plataforma RAST, que oferece um sistema de anotação semi-automático baseado em subsistemas de genes (AZIZ et al., 2008) e onde o genoma pode ser consultado através da ferramenta SEED viewer, a qual oferece serviços de busca e apresenta as anotações com uma interface amigável para o usuário (OVERBEEK et al., 2005).

1.3 Efeito da morfologia celular no acúmulo de polihidroxialcanoatos

Na literatura, pouca atenção é dada à morfologia celular das bactérias produtoras de PHA. Existe somente um estudo, em que as dimensões das células são analisadas ao longo de um cultivo de *C. necator* em meio mínimo com frutose como fonte de carbono. Interessantemente, as células apresentaram um aumento no comprimento ao longo do cultivo. O comprimento celular médio aumentou de 4 μm no começo do cultivo a 12 μm às 48h de cultivo, enquanto o diâmetro celular manteve-se em 0,7 μm durante o cultivo todo (MRAVEC et al., 2016). Uma cepa mutante deficiente na produção de PHA apresentou o mesmo comportamento, indicando que o aumento no comprimento não é provocado pela presença de grânulos de PHA. Embora esse aumento no comprimento não seja provocado pela síntese de PHA, ele poderia ter um efeito no acúmulo de PHA.

O aumento do comprimento não é observado quando a cepa *Pseudomonas* sp. LFM046 é cultivada em meio mínimo, embora não houvesse nenhuma análise detalhada da morfologia dessa bactéria até este trabalho. As dimensões estimadas em $1 \times 1 \mu\text{m}$ durante todo o cultivo de acúmulo são menores do que as dimensões apresentadas por *C. necator*.

O teor de PHA acumulado, ou seja, a porcentagem de polímero na massa seca celular, ao final do cultivo é um parâmetro muito importante quando é analisado o custo de produção (KONING; WITHOLT, 1997; WANG et al., 2014).

Pensando nestas observações e na importância do teor de polímero na viabilidade econômica do processo, surgiu a idéia de dar atenção à morfologia da bactéria produtora. Diminuir a biomassa residual, que é a diferença da biomassa total e a massa de PHA, para aumentar a proporção de produto no fim do processo é essencial para diminuir o custo de produção. Por que não fazer com que a célula adquira dimensões maiores, com mais volume disponível? Um modo de fazer isso é inibir a divisão da célula em um momento do cultivo, fazendo com que o comprimento das células aumente, e isso poderia resultar em um maior acúmulo de polímero (Figura 3).

Figura 3 – Representação esquemática do alongamento de um bacilo produtor de PHA.

Resultados preliminares do Laboratório de Bioprodutos indicaram que essa idéia era promissora. Foi usado o antibiótico ácido nalidíxico, que age na DNA girase (FÀBREGA et al., 2009) e causa a inibição da divisão celular, formando filamentos quando aplicado em bactérias do gênero *Pseudomonas* (Al Bahry; SIVAKUMAR; AL-KHAMBASHI, 2012). O tratamento com concentrações sub-MIC resulta em células alongadas pela não formação do septo, já que elas não param de crescer. Quando este ácido é adicionado um pouco antes da fase estacionária de crescimento, ele bloqueia as últimas replicações que as células teriam antes de entrar nesse estado fisiológico. Assim, elas entram nesta fase, que é onde ocorre o maior acúmulo de polímero, com um comprimento maior, o que disponibiliza mais espaço no interior das células para o acúmulo do polímero. Quando foi aplicado ácido nalidíxico na concentração $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 8h do inóculo a mudança morfológica esperada foi obtida. O teor de PHA após 27 horas foi 20% maior que o do controle. Este resultado foi obtido usando *B. sacchari* LFM101 e impulsionou o planejamento deste projeto de mestrado, que devia criar um sistema de controle da divisão celular independente do uso de antibiótico.

A estratégia de mudar a morfologia celular para aumentar o teor de PHA acumulado também foi usada por outro grupo de pesquisa. O grupo do Dr. George Chen vem publicando uma série de trabalhos no período de desenvolvimento deste projeto de mestrado relacionados à estratégia introduzida (JIANG; CHEN, 2016). Esses trabalhos, serão apresentados após uma breve introdução à divisão celular bacteriana.

1.3.1 Divisoma bacteriano

Precisamos entender como funciona a divisão celular no organismo estudado para encontrar formas de controlá-la. O processo de divisão celular bacteriana envolve numerosas proteínas, algumas delas, bem conservadas na maior parte das bactérias e arqueias. O conjunto delas recebe o nome “divisoma”. Para ocorrer a formação de duas células idênticas a partir de uma progenitora no caso de um bacilo é preciso atingir um certo comprimento, duplicar o material genético, distribuir o conteúdo celular entre elas e finalmente separar os dois espaços. Para que tudo isso aconteça, existem mecanismos de regulação, alguns dos quais estão bem caracterizados para certos organismos modelo como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Caulobacter crescentus*. Outros organismos modelo, como a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que é o mais próximo do organismo aqui estudado *Pseudomonas* sp. LFM046, foram protagonistas de bem menos evidências experimentais para entender o funcionamento do divisoma. Entretanto, a comparação genética e protéica *in silico* dos componentes do divisoma permite dizer que os mecanismos elucidados, expostos a seguir para *E. coli*, muito provavelmente ocorram também no gênero *Pseudomonas*.

1.3.1.1 Formação do septo

A proteína central do estrangulamento citoplasmático é a FtsZ. Trata-se de uma GTPase que polimeriza formando filamentos e é comparada com a tubulina, proteína do citoesqueleto eucarioto (ERICKSON, 1997; MINGORANCE et al., 2010). As cadeias de FtsZ são chamadas de protofilamentos. Estes se unem entre si e a outras proteínas para formar o anel-Z, que é ancorado à membrana citoplasmática e é a estrutura responsável pelo estrangulamento do citoplasma. A proteína FtsZ é capaz de polimerizar e formar anéis sem necessidade de outras proteínas *in vitro* (MINGORANCE et al., 2010). Na localização certa e na hora certa, o anel é bem estabilizado para poder exercer a sua função. Existe uma série de proteínas associadas ao anel. Elas se unem ao sítio de divisão em dois tempos diferentes. No primeiro passo, as seguintes proteínas se encontram associadas ao anel: FtsA, ZipA, ZapA, ZapB, ZapC, ZapD. Estas proteínas ligam o anel-Z à membrana citoplasmática e estabilizam-no. Na segunda etapa, incorporam-se FtsK, FtsQ, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN, PBP3. A segunda leva participa no transporte de DNA (FtsK), na união do anel ao peptidoglicano (FtsN) e na síntese do peptidoglicano (PBP3) (ADAMS; ERRINGTON, 2009; EGAN; VOLLMER, 2013). Apesar de *ftsZ* ser um gene essencial para a divisão celular, existem exceções, pois há bactérias capazes de se dividir sem ele (ADAMS; ERRINGTON, 2009).

1.3.2 Regulação de posição do anel-Z

Como as bactérias fazem para posicionar o septo na metade do seu comprimento? Essa é uma pergunta que tem intrigado a comunidade científica por muito tempo e ainda não está completamente respondida. Existem dois mecanismos bem descritos que regulam a posição do anel-Z, mas tem sido demonstrado que há outros mecanismos envolvidos, até agora desconhecidos (MÄNNIK et al., 2012; BAILEY et al., 2014). Os mecanismos conhecidos são o sistema Min e a oclusão de nucleóide (Noc).

1.3.2.1 Sistema Min

Na célula são formados anéis-Z continuamente em diferentes posições, mas eles são despolimerizados em todo lugar inadequado para a fissão (WU et al., 2015). Um mecanismo de controle de posição do anel-Z muito bem caracterizado é o sistema Min. O sistema é composto por três proteínas: MinC, MinD e MinE. MinD é uma ATPase associada à membrana em forma de dímero quando ligada a ATP. Quando o ATP é desfosforilado a proteína se solta da membrana. MinD também se liga a MinC. MinE é outra proteína associada à membrana citoplasmática que estimula a atividade ATPase de MinD, forçando-a a se soltar da membrana. Por fusão da proteína MinD com a proteína fluorescente GFP, observa-se a oscilação do complexo MinCD de um polo da célula bacteriana ao outro, inibindo a formação do anel-Z (WU et al., 2015). Este sistema era entendido como um

gradiente de concentração, no qual como resultado da oscilação nos polos haveria uma maior presença do complexo inibidor de FtsZ. Isso faria com que a formação do anel fosse possível somente na região central da célula (BLAAUWEN, 2013; EGAN; VOLLMER, 2013). Entretanto Ghosal e colaboradores mostraram que MinC e MinD formam cadeias associadas à membrana citoplasmática alternando as duas proteínas ao longo da membrana. Como MinE é encontrada predominantemente no centro da célula formando uma estrutura que lembra um anel e provoca a dissociação de MinCD da membrana, impediria a inibição de FtsZ pelas cadeias MinCD (GHOSAL et al., 2014).

Cepas de *E. coli* mutantes deficientes no sistema Min apresentam divisões nos polos da célula, resultando em células pequenas sem DNA, chamadas *minicells*. Em uma cepa com deleção de *minC* foi observado que 73% das células dividem no centro da célula, e das células restantes, a metade divide em uma posição de 1:3 e a outra metade nos polos (MÄNNIK et al., 2012). Com esse padrão de divisão, a população ganha células com comprimento aumentado. Para cepas deficientes no sistema Min foi reportado um comprimento celular médio maior quando comparado com as cepas selvagens, sem levar em consideração as *minicells* (TEATHER; COLLINS; DONACHIE, 1974).

1.3.2.2 Oclusão de nucleóide

Outro mecanismo de regulação de localização do anel de estrangulamento citoplasmático bastante estudado é a oclusão de nucleóide ou Noc. Este também é um sistema de regulação negativa, que impede o corte do nucleóide na hora da fissão binária, assegurando que as duas células filhas terão uma cópia inteira do material genético. Em *E. coli*, a proteína SlmA se liga a sequências palindrômicas específicas do DNA. Este tipo de sequências reconhecidas pela proteína SlmA estão distribuídas pelo cromossomo com exceção de regiões terminais. Assim, quando os dois cromossomos estão se separando e no centro da célula se encontram somente regiões terminadoras, o anel-Z pode começar a se formar (EGAN; VOLLMER, 2013; NATALE; PAZOS; VICENTE, 2013; MONAHAN et al., 2014). Não obstante, os resultados de Männik e colaboradores indicam que SlmA não é o único fator envolvido (MÄNNIK et al., 2012).

1.3.3 Regulação da divisão celular pela resposta SOS

Em situação de estresse, a célula pode regular a divisão celular por meio da resposta SOS. Depois de danos ao material genético, é induzida a síntese da proteína Sula como parte da resposta SOS. Esta proteína se liga a FtsZ impedindo a polimerização da mesma. A resposta SOS inibe desta forma a divisão da célula até que o dano no DNA seja reparado (CHEN; MILAM; ERICKSON, 2012).

1.4 Evidências de Chen e colaboradores

O grupo do Prof. George Chen vem publicando uma série de trabalhos no período de desenvolvimento deste projeto de mestrado em que, com o objetivo de aumentar o teor de PHA, foi alterada a morfologia celular de bactérias. O grupo tem demonstrado usando *E. coli* e *Halomonas* spp., que o aumento do volume celular através do controle da divisão binária resulta em aumento no teor de PHA acumulado nas condições testadas. *E. coli* não é produtora natural de PHA, mas pode acumular o polímero por meio de expressão heteróloga dos genes de síntese. Em seus trabalhos, provocaram alterações na morfologia e avaliaram o seu impacto no processo de produção de PHA.

Primeiro exploraram o uso da proteína inibidora da divisão celular SulA. A proteína SulA impede a polimerização da proteína FtsZ, que é essencial para a formação do anel-Z, e consequentemente o estrangulamento citoplasmático não ocorre. Isso provoca o alongamento das células. Induzindo a expressão do inibidor às 8h do cultivo foi atingido um teor de PHA final de 27%, enquanto o controle chegou em 12% da MSC. Este resultado foi obtido com *E. coli* BL21DE3 com *pet28asulA* para obtenção de células alongadas e *p15apCAB* para a síntese de polihidroxibutirato (WANG et al., 2014).

Também foi testada a deleção e a expressão fraca do gene *mreB*, que codifica pela proteína MreB, a qual forma uma espiral ancorada à membrana citoplasmática, responsável pela morfologia de bacilo. A deleção desse gene provoca a mudança da morfologia de bacilo para esférica (MADIGAN et al., 2015). Nessa nova linhagem, *E. coli* JM109 Δ *mreB*, que efetivamente apresenta morfologia de coco, ainda foi induzida a expressão do inibidor da divisão celular *sulA*, visando obter células esféricas maiores (Figura 4). As bactérias assim construídas resultaram ser frágeis e lisar após indução da expressão de *sulA*. Para compensar a fragilidade causada pela falta de proteína MreB, foi introduzido um outro plasmídeo, com o gene *mreB* para ajudar a manter a integridade da célula pela a expressão fraca do gene. Os melhores resultados foram obtidos com essa combinação. A linhagem de *E. coli* recombinante conseguiu acumular PHA correspondendo a 80% da MSC, o controle acumulou 53% da MSC (JIANG et al., 2015).

Os genes *minC* e *minD* foram escolhidos pelo grupo para determinar o efeito da deleção deles na produção de PHB por *E. coli*. Como descrito acima (item 1.3.2), esses genes são responsáveis por evitar a formação do septo perto dos polos da célula e a deleção deles provoca uma mudança no padrão de divisão celular, permitindo a formação de septos em diversos locais da célula e resultando em um comprimento celular médio maior que a cepa selvagem quando as *minicells* não são consideradas. Wu e colaboradores reportaram, além do comprimento celular maior de *E. coli* JM109 Δ *minCD* quando comparado com a cepa selvagem, células dividindo em diversos sítios ao mesmo tempo, resultando em várias células a partir de uma célula. Com isso, os autores afirmaram ter mudado o padrão de fissão binária para fissão múltipla, que resultou em um crescimento maior da população,

Figura 4 – Representação esquemática da mudança de morfologia de bacilo para coco combinada com a inibição da divisão em uma bactéria produtora de PHA.

com base nas medidas de MSC efetuadas pelo grupo. A deleção de *minCD* levou a um acúmulo maior pela linhagem modificada em relação ao controle com 60% e 50% de PHA na MSC, respectivamente. Os genes *ftsQ*, *ftsL*, *ftsW* e *ftsN*, envolvidos na divisão celular, foram expressos todos juntos em *E. coli* JM109 e provocaram um aumento no comprimento das bactérias. Quando esses genes foram expressos na cepa *E. coli* JM109 $\Delta minCD$ houve um aumento no teor de PHA acumulado ainda maior. O teor de PHA da cepa recombinante foi 70% da MSC, enquanto no controle foi 50% da MSC (WU et al., 2016).

Os genes *env* e *nlp* estão envolvidos na hidrólise de peptidoglicano para separar a parede celular de duas células resultantes de uma fissão binária. A deleção deles provoca o crescimento filamentosos. A combinação de deleções de *minCD* e *envCnlpD* com indução de expressão de *sulA*, nos trabalhos do grupo chinês, permitiram acúmulos de PHB ao redor de 70% da MSC na cepa de *E. coli* JM109 enquanto o controle ficou em 50% da MSC (WU; CHEN; CHEN, 2016).

Uma outra estratégia foi usada pelo grupo do professor Chen, com os genes *ftsZ* e *mreB* como alvo. Por meio de CRISPRi, com Cas9 sem atividade catalítica, foi abordada a regulação da transcrição destes genes. Desenharam 5 sgRNAs para cada gene, com sequências alvo distribuídas pela região reguladora do gene e no próprio gene. O maior efeito de repressão transcricional para cada gene foi obtido quando foram usadas combinações de sgRNAs. Estas duas combinações também foram combinadas entre si para ter o efeito inibidor da divisão somado à inibição da espiral MreB. A cepa resultante acumulou polímero correspondendo a 80% da MSC, enquanto o controle atingiu 44%. Quando foi inibido somente o gene *ftsZ* com esta técnica, foi reportado um teor de PHA de 61% da MSC (ELHADI et al., 2016).

Mais recentemente, usando a técnica de CRISPRi também, foi avaliado o efeito que teria a espessura e a rigidez da parede celular no acúmulo de PHA. Para isso foram criadas duas linhagens a partir de *E. coli* Top10, uma com uma parede celular mais grossa e mais rígida que o normal e outra com a parede celular mais fina e frágil. A primeira linhagem foi construída inserindo o promotor constitutivo P_{glta} em vários locais do genoma para controlar a expressão dos genes de síntese de parede celular *murDEFG*, *mraY* e *ftsW*. A segunda cepa foi construída usando CRISPRi. Vários sgRNAs foram desenhados para guiar a dCas9 para se ligar em genes de síntese de parede e inibir a expressão deles. A linhagem com parede celular mais rígida acumulou 25% de PHA enquanto a linhagem com parede celular mais fina (com sgRNAs para *murE* e *murD*) acumulou 93% de PHA (ZHANG et al., 2017).

Na maioria dos trabalhos introduzidos acima foi usada a cepa *E. coli* JM109. O grupo também realizou dois trabalhos com bactérias do gênero *Halomonas*, produtor de PHA natural e interessante por poder ser cultivado usando água marinha. Em *Halomonas* sp. TD08 os genes *minCD* foram superexpressos. A superexpressão levou a uma morfologia celular mais alongada e a um aumento no acúmulo de PHA, de 69% no controle para 82% na linhagem modificada (TAN et al., 2014). Usando *Halomonas campaniensis* LS21, produtora natural reforçada expressando um plasmídeo contendo genes de síntese de PHB, foi estudado também o efeito da morfologia celular no acúmulo. Para controlar a morfologia foi criado um sistema baseado na mudança da temperatura para indução da alteração. Os genes *mreB* e *ftsZ* foram deletados, e o plasmídeo pTKmf contendo os dois genes foi inserido. Este plasmídeo é capaz de se replicar a 30°C enquanto a 37°C ele é desestabilizado. Na temperatura elevada então, as células não se dividem e nem produzem a proteína que mantém a estrutura de bacilo. Estas células aumentadas de tamanho acumularam um teor de PHA de 70%. Este teor não foi significativamente maior do que o do controle que continha também o plasmídeo contendo genes envolvidos na síntese de PHB (JIANG; CHEN, 2017).

1.5 Biologia molecular usando *Pseudomonas* sp. LFM046

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046, como mencionado anteriormente (1.2), foi isolada pelo laboratório (GOMEZ, 1994) e provavelmente é uma espécie nova que somente tem sido estudada pelo grupo. O uso de ferramentas de biologia molecular tem sido relativamente pouco explorado.

1.5.1 Mutantes por exposição a radiação UV

As primeiras modificações genéticas de *Pseudomonas* sp. LFM046 foram realizadas através da geração de mutações aleatórias por exposição à radiação UV, seguida da seleção

do fenotipo desejado. Com esta técnica foram obtidas linhagens como a *Pseudomonas* sp. LFM461, deficiente na produção de PHA (GOMEZ, 2000).

1.5.2 Mutantes por transposon

Mutantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados foram obtidos por Sonia R. S. Queiroz, utilizando-se o sistema de transposon mini-Tn5, alguns dos quais apresentaram maior eficiência na incorporação de monômeros insaturados ao PHA. Através da clonagem e o seqüenciamento de fragmentos de DNA interrompidos pelo transposon, alguns genes afetados nos mutantes foram identificados (QUEIROZ, 2007). Usando a mesma técnica, também foram obtidos mutantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de sintetizar PHA a partir de glicose (GOMES, 2009).

1.5.3 Expressão de genes exógenos em plasmídeo

No trabalho de doutorado de Rogério Gomes foram expressados genes envolvidos na síntese de PHB de *C. necator* em *Pseudomonas* sp. LFM046 usando o plasmídeo pBBR1MCS-2. Nas construções, genes do operon *phaCAB* se encontram precedidos do promotor nativo de *C. necator* (sequência reconhecida pelo fator sigma 70) e também do promotor *lac*. A produção de PHB foi detectada em todas as construções contendo a PHA sintase *phaC* de *C. necator*. Não foi adicionado indutor IPTG nos cultivos, mas ainda assim não ficou claro se os genes foram expressos pelo vazamento do promotor *lac* ou pelo reconhecimento do promotor exógeno original do operon.

No trabalho de J. Camilo R. Sarmiento, genes de consumo de xilose foram expressados de forma heteróloga em *Pseudomonas* sp. LFM046 usando o plasmídeo pSEVA241 (RONCALLO, 2017). O promotor usado nesse trabalho foi o promotor constitutivo *tac*. A transcrição do operon exógeno (*C. crescentus*) em *Pseudomonas* sp. LFM046 foi confirmada por PCR de cDNA. Mesmo assim, o consumo de xilose não foi muito expressivo, mas o sistema de expressão mostrou-se funcional.

Lucas G. Céspedes desenvolveu vários plasmídeos chamados pCC usando promotor *lac* com a finalidade de expressar genes envolvidos na síntese de PHB em *Pseudomonas* sp. LFM461, a cepa mutante deficiente na produção de PHA, de forma controlada. Em primeiro lugar foi observado que o plasmídeo pCC1 era modificado pela bactéria após a transformação por um evento de recombinação homóloga, enquanto em *E. coli* MG1655 isso não acontecia (CESPEDES, 2016). Versões melhoradas do plasmídeo foram criadas sucessivamente até o pCC5. Esses plasmídeos mostaram-se funcionais em *E. coli* MG1655, mas no organismo alvo a expressão dos genes era do mesmo nível que sem adição do indutor. Isso levou a concluir que o sistema de regulação *lac* não é o adequado para

Pseudomonas sp. LFM046 (CESPEDES, 2016).

1.5.4 Integração de genes exógenos no genoma

O sistema de transposons mini-Tn7 foi usado por Edmar R. O. Filho para integrar sequências de PHA sintases exógenas no genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046. A integração no genoma foi bem sucedida, embora a atividade dessas proteínas exógenas tenha sido baixa (OLIVEIRA, 2016). Os genes de PHA sintases das linhagens resultantes estão precedidos apenas pelo promotor exógeno original, de *C. necator*, *Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas* sp. TSM 81.

Até este trabalho, não tem sido caracterizado um sistema de expressão controlada de genes em *Pseudomonas* sp. LFM046. Para isso, aqui foi usado o plasmídeo pJN105, que será descrito a seguir.

1.6 Sistema de expressão controlada pJN105

O plasmídeo pJN105 é um plasmídeo *broad host range* criado para expressão controlada de genes em bactérias Gram-negativas não entéricas. Ele é derivado de pBBR1MCS-5, o qual tem a origem de replicação de *Bordatella bronchiseptica*, que é reconhecido por uma vasta gama de espécies. O sistema de expressão controlada é constituído pelo cassete *araC*-P_{BAD}, ou seja, a sequência codificadora pelo repressor AraC e a do promotor de L-arabinose de *E. coli*. Na ausência de L-arabinose o repressor se encontra ligado à região promotora, impedindo a transcrição dos genes subsequentes. Na presença de L-arabinose, o repressor libera a região promotora, permitindo uma regulação fina da produção das proteínas de interesse (NEWMAN; FUQUA, 1999).

1.7 Técnica de clonagem SLIC

A técnica de clonagem usada neste trabalho, SLIC (*sequence and ligase independent cloning*), é uma técnica de clonagem, como diz o nome, independente de sequência e de ligase. Se baseia na adição de sequências complementares nos extremos dos fragmentos a serem ligados e utiliza a própria maquinaria de recombinação da bactéria receptora para unir eles, depois de serem parcialmente degradados por incubação com a exonuclease T4 DNA polimerase. Em primeiro lugar os fragmentos a serem unidos são preparados. No caso da inserção de um fragmento em um plasmídeo, são adicionados às extremidades do fragmento sequências complementares à sequência da posição desejada do plasmídeo de 20 nucleotídeos. O plasmídeo precisa ser linearizado por PCR ou digestão simples, na posição exata onde o fragmento será inserido. Uma vez prontos os fragmentos, eles são tratados com T4 DNA polimerase, que na ausência de dNTPs e a temperatura ambiente, tem

ação exonuclease, hidrolisando nucleotídeos dos extremos dos fragmentos e tornando-os fita simples (*sticky ends*), que irão estabelecer pontes de hidrogênio com as sequências complementares. Quando introduzidos por choque térmico na bactéria alvo, a maquinaria da célula adiciona os nucleotídeos complementares onde ficaram espaços vazios (Figura 5) (LI; ELLEDGE, 2012).

Figura 5 – Representação esquemática da técnica de clonagem SLIC Baseado em (LI; ELLEDGE, 2012).

2 Discussão

A alteração da morfologia celular tem sido proposta como possível abordagem para melhorar a produção bacteriana de PHA e de compostos acumulados intracelularmente no geral (JIANG; CHEN, 2016). Esta estratégia tem sido testada para a produção de PHB por *E. coli* e bactérias do gênero *Halomonas* (WU; CHEN; CHEN, 2016; TAN et al., 2014). Este trabalho explorou o aumento do comprimento celular em *Pseudomonas* sp. LFM046. Diferentemente dos trabalhos anteriores, o tipo de PHA produzido é PHA_{mcl}, enquanto nos trabalhos anteriores testaram a produção de PHA_{scl}.

Modificando a morfologia celular pretende-se criar mais espaço disponível dentro da célula para o acúmulo de polímero. Quanto espaço ficará disponível é o que pretende ser estimado com ajuda do modelo matemático proposto neste trabalho. Ele descreve o efeito do aumento no comprimento celular na capacidade de acúmulo de PHA. Segundo o modelo, a variação na capacidade de acúmulo depende da variação nos componentes citoplasmáticos que não são PHA, os componentes internos (CI), com a variação de comprimento. Se os CI aumentam proporcionalmente ao aumento do volume citoplasmático, a capacidade de produção de PHA aumenta muito pouco (Hipótese A). Se os CI não aumentam com o aumento do comprimento, o aumento na capacidade de acúmulo de PHA é considerável (Hipótese B). Espera-se que o comportamento da célula, quando o comprimento é alterado, se encontre em um ponto intermediário entre os dois extremos. Contudo, este modelo apresenta limitações. Ele simplifica a célula bacteriana como sendo um cilindro rígido, quando na realidade ela tem um formato de um bastão arredondado, e não é rígida. Nos ensaios realizados neste trabalho observamos a mudança de diâmetro das células ao longo do cultivo e confirmamos que elas são mais largas no fim do cultivo quando comparado com células no final da fase exponencial, indicando que o citoesqueleto (espiral MreB) e envelope celular cedem à pressão exercida pelos grânulos acumulados no citoplasma. Interessantemente, as células filamentosas, independentemente do comprimento, ficaram com o mesmo diâmetro. A plasticidade da estrutura celular também foi observada experimentalmente nas células filamentosas, que curvaram-se e enrolaram-se, como mostram as microfotografias (Figura ??).

Além das simplificações espaciais, o modelo tem limitações conceituais. O modelo descreve apenas o espaço disponível na célula e a quantidade de PHA que poderia caber nesse espaço. Não prevê as interações que podem acontecer entre os componentes celulares. Quanto menos CI, mais PHA, sem levar em consideração que os CI são necessários para a produção de PHA. Existem várias formas de inibir a divisão celular e consequentemente aumentar o comprimento celular, uma delas é a inibição da síntese de DNA, a qual contribui para manter uma menor quantidade de CI. Com uma só cópia do cromossomo em uma

célula filamentosa, não só terá menos DNA ocupando espaço, mas a síntese de RNAs e proteínas será reduzida quando comparada com uma célula filamentosa com múltiplos cromossomos. Enquanto no modelo isso levaria a uma maior capacidade de acúmulo, uma menor quantidade e pior distribuição de enzimas ao longo da célula filamentosa poderia afetar a produção de PHA. Além de que um único cromossomo em uma célula filamentosa poderia não favorecer a produção de PHA pela disponibilidade de enzimas limitada e localizada, há a questão da distribuição espacial dos grânulos no citoplasma, já que os grânulos de PHA são associados ao DNA por meio de phasinas, como foi reportado em *P. putida* e *R. eutropha* (WAHL et al., 2012; GALÁN et al., 2011). Pensando nisso, seria interessante que o DNA se encontre espalhado por toda a célula para uma melhor distribuição deles.

A mudança de morfologia de *Pseudomonas* sp. LFM046 através da superexpressão de *sulA* permitiu controlar o comprimento celular. Embora nos ensaios em frascos agitados o teor de PHA não foi alterado pela alteração do comprimento celular, quando a fonte de carbono foi mantida em excesso através de adições de glicose no ensaio em biorreator, foi determinado um teor de PHA aumentado com expressão de *sulA*. No estudo anterior, em que foi superexpresso o gene *sulA* em *E. coli* (WANG et al., 2014), o teor de polímero reportado foi 27% e 12% da MSC com expressão de *sulA* e no controle, respectivamente. Este resultado foi obtido com *E. coli* BL21DE3 com *pet28asulA* e *p15apCAB*, para a síntese de polihidroxibutirato (WANG et al., 2014). Em este trabalho, no ensaio de batelada alimentada, para *Pseudomonas* sp. LFM046 *sulA* foram determinados teores de 84% e 70% com e sem indução da expressão de *sulA*, respectivamente. Estes resultados são compatíveis com as previsões do modelo, pois ele prevê uma capacidade de acúmulo que aumenta com o aumento do comprimento. No modelo, a capacidade de acúmulo se aproxima em um valor máximo, o qual depende da hipótese considerada, e também é afetado pela densidade do polímero, sendo maior a densidade de PHB do que a densidade PHA_{mcl}. Contudo, o valor máximo não é afetado pelo teor de PHA nas dimensões originais, que corresponde ao controle dos experimentos. Então, com um teor de PHA menor no controle, o aumento do teor com o aumento do comprimento pode ser maior, quando comparado com uma cepa que já acumula um teor mais elevado nas dimensões originais. Para *Pseudomonas* sp. LFM046, o modelo prevê um acúmulo máximo de perto de 84% considerando a Hipótese B. Comparando as previsões do modelo com os resultados experimentais, podemos concluir que o conteúdo citoplasmático diferente de PHA, aqui chamado CI, não aumentou proporcionalmente ao aumento do comprimento. Como discutido acima, o tipo de modificação que levou ao aumento no comprimento pode influenciar a relação de volume de CI e de PHA. Quando o comprimento é aumentado por inibição da divisão celular via *sulA*, os resultados indicam que no fim do cultivo o PHA ocupa uma porção de espaço maior no citoplasma do que nas dimensões originais.

A regulação da síntese e consumo de PHA não está completamente elucidada, mas

já foram reportados vários mecanismos em produtoras de PHB e PHA_{mcl}, que incluem reguladores transcricionais codificados por genes do agrupamento *pha* assim como sistemas de regulação de transcrição global da célula, como fatores σ , e também sistemas de regulação pós-transcricional (LÓPEZ et al., 2015; RYAN et al., 2013). Contudo, sabemos que o número, tamanho e distribuição espacial dos granulos de PHA é controlado por phasinas tanto em *P. putida* quanto em *C. necator* (GALÁN et al., 2011; WAHL et al., 2012; WIECZOREK et al., 1995). Em *C. necator* foi reportado que, em cultivo em meio definido, o número de granulos não aumentou depois de 24h de cultivo, embora o teor de PHA ainda aumentasse 20% até 80h de cultivo. Esse resultado também apoia a visão de que a iniciação de granulos novos e o tamanho final dos granulos são eventos controlados, cuja regulação também não é elucidada, mas sabemos que as phasinas estão envolvidas. Em contraste, *E. coli* não possui regulação específica de produção de PHA, já que não é uma produtora natural, e nem possui phasinas. Interessantemente, há estudos anteriores onde a morfologia de *E. coli* é modificada ao contrário, diminuindo o comprimento celular e aumentos no teor de PHA acumulado também foram reportados. Nesse caso, tratava-se de *E. coli* XL1Blue, na qual havia sido observado um aumento espontâneo no comprimento quando genes heterologos eram expressos. Quando essa filamentação foi suprimida superexpressando *ftsZ*, foi reportado um aumento no teor de PHB em determinadas condições (LEE, 1994; CHOI; LEE, 1999).

Para testar o efeito de mudança morfológica em *Pseudomonas* sp. LFM046, foi usado o plasmídio pJN105, desenhado para a expressão de genes sob controle do promotor P_{BAD} em bactérias não entéricas (NEWMAN; FUQUA, 1999). Este plasmídio permitiu controlar a expressão de genes de forma precisa, sem vazamento, em *Pseudomonas* sp. LFM046, como demonstrado com a expressão de *gfp* e *sulA*. Anteriormente, a construção de um sistema de expressão de genes controlado havia sido estudada em *Pseudomonas* sp. LFM461, a cepa mutante deficiente na produção de PHA. Uma série de plasmídios chamados pCC foram desenvolvidos e testados sucessivamente nessa cepa. Os problemas encontrados foram em primeiro lugar, que o plasmídeo pCC1 era modificado por um evento de recombinação homóloga em *Pseudomonas* sp. LFM461, enquanto em *E. coli* MG1655 isso não acontecia. Em segundo lugar, a expressão dos genes alvo com e sem adição do indutor IPTG era a mesma. Isso levou à conclusão de que o sistema de regulação *lac* não é o adequado para *Pseudomonas* sp. LFM046 e cepas derivadas (CESPEDES, 2016). O estabelecimento do plasmídio pJN105 como ferramenta de expressão controlada de genes em uma das cepas modelo do grupo possibilita a realização de outros trabalhos que contribuam à caracterização dela e ao estudo da produção de PHAs.

Em conclusão, este trabalho estabeleceu um sistema de expressão controlada de genes para *Pseudomonas* sp. LFM046, comprovou que o comprimento celular desta cepa pode ser aumentado através da superexpressão do gene endógeno *sulA* e que o aumento no comprimento celular permite um acúmulo de PHA maior. Porfim, este aumento na

capacidade de acúmulo de PHA pode ser explicado pelo modelo matemático apresentado, considerando a Hipótese B, ou seja, que o PHA ocupa uma porcentagem do volume citoplasmático maior com o comprimento celular aumentado, quando comparado com o a porcentagem do volume ocupada nas dimensões originais da célula.

Referências

- ADAMS, D. W.; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 9, p. 642–53, sep 2009. ISSN 1740-1534. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680248>>. Citado na página 11.
- Al Bahry, S.; SIVAKUMAR, N.; AL-KHAMBASHI, M. Effect of nalidixic acid on the morphology and protein expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Hainan Medical College, v. 5, n. 4, p. 265–269, 2012. ISSN 19957645. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60037-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60037-6)>. Citado na página 10.
- AYUB, N. D. et al. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, v. 58, n. 3, p. 240–248, 2007. ISSN 0147619X. Citado na página 6.
- AZIZ, R. K. et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC genomics*, v. 15, p. 1–15, 2008. Citado na página 8.
- BAILEY, M. W. et al. Evidence for Divisome Localization Mechanisms Independent of the Min System and SlmA in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2014. ISSN 15537404. Citado na página 11.
- BLAAUWEN, T. D. Prokaryotic cell division : flexible and diverse. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier Ltd, v. 16, n. 6, p. 738–744, 2013. ISSN 1369-5274. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.09.002>>. Citado na página 12.
- BRESAN, S.; JENDROSSEK, D. New Insights into PhaM-PhaC-Mediated Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/AEM>>. Citado na página 7.
- BRESAN, S. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, v. 6, n. May, p. 26612, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep26612>>. Citado 3 vezes nas páginas 3, 6 e 7.
- BRIGHAM; SINSKEY. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, p. 53–60, 2012. ISSN 1617253855. Citado na página 7.
- CARDINALI-REZENDE, J. et al. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp . Strain LFM046 , a Producer of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate. *Genome Announcements*, v. 3, n. 4, p. 45–46, 2015. Citado na página 8.
- CESPEDES, L. G. *Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes phaA e phaB em Pseudomonas sp. LFM461*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 16, 17 e 21.

- CHEN, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society reviews*, v. 38, n. 8, p. 2434–2446, 2009. ISSN 0306-0012. Citado na página 5.
- CHEN, G.-Q.; HAJNAL, I. The ‘PHAome’. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 10, p. 559–564, 2015. ISSN 01677799. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001584>>. Citado na página 3.
- CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, 2005. ISSN 01429612. Citado na página 4.
- CHEN, Y.; MILAM, S. L.; ERICKSON, H. P. SulA inhibits assembly of FtsZ by simple sequestration mechanism. *Biochemistry*, v. 51, n. 14, p. 3100–3109, 2012. Citado na página 12.
- CHOI, J.-i.; LEE, S. Y. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] with High P(3HB) Content by Recombinant *Escherichia coli* Harboring the *Alcaligenes latus* P(3HB) Biosynthesis Genes and the *E. coli*ftsZ Gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, n. 6, p. 722–725, 1999. ISSN 10177825. Citado na página 21.
- De Eugenio, L. I. et al. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 1591–1603, 2010. ISSN 14622912. Citado na página 7.
- DINIZ, S. C. et al. High-Cell-Density Cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Production From Sugarcane Carbohydrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 119, p. 51–69, 2004. Citado na página 8.
- DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, v. 28, n. 14, p. 4822–4828, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/ma00118a007>>. Citado na página 5.
- EGAN, A. J. F.; VOLLMER, W. The physiology of bacterial cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1277, p. 8–28, jan 2013. ISSN 1749-6632. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23215820>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 12.
- ELHADI, D. et al. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification. *Metabolic Engineering*, 2016. ISSN 10967184. Citado na página 14.
- ERICKSON, H. P. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *trends in CELL BIOLOGY*, v. 7, p. 362–367, 1997. Citado na página 11.
- FÀBREGA, A. et al. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 40–61, 2009. ISSN 17517907. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-7915.2008.00063.x>>. Citado na página 10.
- FUKUI, T. et al. Characterization of 13 kDa granule-associated protein in *Aeromonas caviae* and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. *Biomacromolecules*, v. 2, n. 1, p. 148–153, 2001. ISSN 15257797. Citado na página 5.

- GALÁN, B. et al. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, v. 79, n. 2, p. 402–418, 2011. ISSN 0950382X. Citado 3 vezes nas páginas 7, 20 e 21.
- GHOSAL, D. et al. MinCD cell division proteins form alternating copolymeric cytomotive filaments. *Nature Communications*, v. 5, n. 5341, p. 1–11, 2014. Citado na página 12.
- GOMES, R. d. S. *Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica*. 100 p. Tese (Doutorado), 2009. Citado na página 16.
- GOMEZ, J. G. C. *Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 1994. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 15.
- GOMEZ, J. G. C. *Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 16.
- HOFFMANN, N.; REHM, B. H. A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 1, p. 1–7, 2004. ISSN 03781097. Citado na página 8.
- JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Reviews on Microbiology*, v. 5, n. 6, p. 403–432, 2002. ISSN 10769757. Citado na página 3.
- JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 8, p. 2357–2373, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 3, 6 e 7.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, a.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5-6, p. 451–463, dec 1996. ISSN 0175-7598. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s002530050844>>. Citado na página 4.
- JIANG, X. et al. Engineering the bacterial Shapes for enhanced inclusion Bodies accumulation. *Metabolic Engineering*, Elsevier, v. 29, p. 227–237, apr 2015. ISSN 10967176. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717615000439>>. Citado na página 13.
- JIANG, X. R.; CHEN, G. Q. *Morphology engineering of bacteria for bio-production*. 2016. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 19.
- JIANG, X.-r.; CHEN, G.-q. Controlling cell volume for efficient PHB production by Halomonas. *Metabolic Engineering*, Elsevier Inc., v. 44, n. September, p. 30–37, 2017. ISSN 1096-7176. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.09.004>>. Citado na página 15.
- JUENGERT, J. R. et al. Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. v. 83, n. 13, p. 1–16, 2017. Citado na página 8.

- KIM, D. Y. et al. Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology*, v. 45, n. MAY, p. 87–97, 2007. Citado na página 4.
- KONING, G. J. M. de; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 1, p. 7, 1997. ISSN 0178515X. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s004490050345>>. Citado na página 9.
- La Rosa, R. et al. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 278–290, 2014. ISSN 14622912. Citado na página 8.
- LEE, S. Y. Supression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 12, p. 1247–1252, 1994. Citado na página 21.
- LI, M. Z.; ELLEDGE, S. J. SLIC: A Method for Sequence- and Ligation- Independent Cloning. *Methods in molecular biology*, v. 852, p. 51–59, 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-564-0>>. Citado na página 18.
- LÓPEZ, N. I. et al. Polyhydroxyalkanoates: Much more than biodegradable plastics. *Advances in Applied Microbiology*, v. 93, p. 73–106, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216415000313>>. Citado 3 vezes nas páginas 3, 4 e 21.
- MADIGAN, M. T. et al. *Brock Biology of Microorganisms*. [S.l.]: 14th Edition. Pearson, 2015. Citado na página 13.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 4.
- MÄNNIK, J. et al. Robustness and accuracy of cell division in *Escherichia coli* in diverse cell shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Academy of Sciences, v. 109, n. 18, p. 6957–6962, 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/109/18/6957>>. Citado 2 vezes nas páginas 11 e 12.
- MATAVULJ, M.; SAD, N.; MOLITORIS, H. P. Biodegradation of polyhydroxyalkanoate-based plastic (BIOPOL) under different environmental conditions. *Regensburgische Botanische Gesellschaft*, v. 61, p. 735–749, 2000. Citado na página 4.
- MINGORANCE, J. et al. Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends in microbiology*, v. 18, n. 8, p. 348–56, aug 2010. ISSN 1878-4380. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598544>>. Citado na página 11.
- MONAHAN, L. G. et al. Division site positioning in bacteria : one size does not fit all. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. February, p. 1–7, 2014. Citado na página 12.
- MRAVEC, F. et al. Accumulation of PHA granules in *Cupriavidus necator* as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, n. April, 2016. Citado na página 9.
- NATALE, P.; PAZOS, M.; VICENTE, M. Minireview The *Escherichia coli* divisome : born to divide. v. 15, p. 3169–3182, 2013. Citado na página 12.

- NEWMAN, J. R.; FUQUA, C. Broad-host-range expression vectors that carry the -arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*, v. 227, p. 197–203, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 21.
- OBRUCA, S. et al. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2016. ISSN 19326203. Citado na página 3.
- OLIVEIRA, E. R. *Construção de mutantes de Pseudomonas abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma , para produção de 3HB- co -3HA MCL*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2016. Citado na página 17.
- OVERBEEK, R. et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. v. 33, n. 17, p. 5691–5702, 2005. Citado na página 8.
- PÖTTER, M. et al. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, v. 148, n. 8, p. 2413–2426, 2002. ISSN 13500872. Citado na página 7.
- PRIETO, A. et al. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, p. n/a–n/a, 2015. ISSN 14622912. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12760>>. Citado 4 vezes nas páginas 3, 5, 6 e 8.
- PRIETO, M. A. et al. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes. *Journal of Bacteriology*, 1999. ISSN 00219193. Citado na página 7.
- QUEIROZ, S. R. D. S. *Estudo do Metabolismo de Ácidos Graxos em Pseudomonas putida Visando à Modulação da Composição Monomérica de Elastômero Biodegradável*. 98 p. Tese (Doutorado), 2007. Citado na página 16.
- RAIGER-IUSTMAN, L. J.; RUIZ, J. A. The alternative sigma factor, RpoS, affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 284, n. 2, p. 218–224, 2008. ISSN 03781097. Citado na página 8.
- REHM, B. H. A. Polyester synthases : natural catalysts for plastics. *Biochemistry Journal*, v. 376, p. 15–33, 2003. Citado na página 5.
- REINECKE, F.; STEINBÜCHEL, A. *ralstonia eutropha* strain h16 as model organism for pha metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 1-2, p. 91–108, 2009. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000142897>>. Citado na página 7.
- REUSCH, R. N. The role of short-chain conjugated poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) in protein folding. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 6, p. 10727–10748, 2013. ISSN 14220067. Citado na página 4.
- RONCALLO, J. C. S. *Avaliação da expressão de genes da via de Weimberg sobre o catabolismo de xilose na linhagem produtora de PHA_{MCL} Pseudomonas sp. LFM046*. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2017. Citado na página 16.

- RUIZ, J. A. et al. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 225–230, 2001. Citado na página 8.
- RYAN, W. J. et al. Gacs-dependent regulation of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Pseudomonas putida* ca-3. *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology Journals, v. 79, n. 6, p. 1795–1802, 2013. ISSN 0099-2240. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/79/6/1795>>. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 21.
- SÁNCHEZ, R. J. et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *European Polymer Journal*, v. 39, n. 7, p. 1385–1394, jul 2003. ISSN 00143057. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305703000193>>. Citado na página 8.
- SHRIVASTAV, A.; KIM, H.-Y.; KIM, Y.-R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*, v. 2013, n. 12, p. 1–12, 2013. ISSN 2314-6133. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/581684><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/581684><http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/>>. Citado 2 vezes nas páginas 4 e 5.
- SILVA-QUEIROZ, S. R. et al. PHA(MCL) biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of biotechnology*, v. 143, n. 2, p. 111–8, aug 2009. ISSN 1873-4863. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540884>>. Citado na página 8.
- STEINBÜCHEL, A. et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. v. 41, n. 13, p. 94–105, 1995. Disponível em: <www.nrcresearchpress.com>. Citado na página 7.
- STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, n. 2, p. 81–96, nov 2003. ISSN 1369703X. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>>. Citado na página 3.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, dec 2000. ISSN 00796700. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670000000356>>. Citado 3 vezes nas páginas 3, 5 e 6.
- SUN, Z. et al. *Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hydroxyalkanoates*. 2007. Citado na página 5.
- TAN, D. et al. Engineering Halomonas TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*, 2014. ISSN 10967184. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 19.
- TEATHER, R. M.; COLLINS, J. F.; DONACHIE, W. D. Quantal behavior of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in *Escherichia coli*.

Journal of Bacteriology, American Society for Microbiology Journals, v. 118, n. 2, p. 407–413, 1974. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://jb.asm.org/content/118/2/407>>. Citado na página 12.

TIMM, a.; STEINBÜCHEL, a. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 209, p. 15–30, 1992. ISSN 0014-2956. Citado na página 8.

WAHL, A. et al. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC microbiology*, v. 12, n. 1, p. 262, 2012. ISSN 1471-2180. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143&tool=pmcentrez&rendertype=ab>>. Citado 3 vezes nas páginas 7, 20 e 21.

WANG, Y. et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 25, p. 183–93, sep 2014. ISSN 1096-7184. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088357>>. Citado 3 vezes nas páginas 9, 13 e 20.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology Journals, v. 177, n. 9, p. 2425–2435, 1995. ISSN 0021-9193. Disponível em: <<https://jb.asm.org/content/177/9/2425>>. Citado 2 vezes nas páginas 7 e 21.

WU, F. et al. Multi-color imaging of the bacterial nucleoid and division proteins with. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1–15, 2015. Citado na página 11.

WU, H.; CHEN, J.; CHEN, G. Q. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Applied Microbiology and Biotechnology, p. 1–10, 2016. ISSN 14320614. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7715-1>>. Citado 2 vezes nas páginas 14 e 19.

WU, H. et al. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. *Microb Cell Fact*, v. 15, 2016. Citado na página 14.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. The *Ralstonia eutropha* PhaR Protein Couples Synthesis of the PhaP Phasin to the Presence of Polyhydroxybutyrate in Cells and Promotes Polyhydroxybutyrate Production. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 1, p. 59–66, 2002. Citado na página 7.

ZHANG, X.-C. et al. Engineering Cell Wall Synthesis Mechanism for Enhanced PHB Accumulation in *E. coli*. *Metabolic Engineering*, 2017. ISSN 10967176. Citado na página 15.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 1, p. 5–21, 2001. ISSN 0169409X. Citado na página 4.