SONIA REGINA DA SILVA QUEIROZ

ESTUDO DO METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS EM *Pseudomonas putida* VISANDO À MODULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DE ELASTÔMERO BIODEGRADÁVEL

**Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.**

**São Paulo
2007**

SONIA REGINA DA SILVA QUEIROZ

ESTUDO DO METABOLISMO DE ÁCIDOS GRAXOS EM *Pseudomonas putida* VISANDO À MODULAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA DE ELASTÔMERO BIODEGRADÁVEL

**Tese (Doutorado) apresentada ao
Programa de Pós-Graduação Interunidades
em Biotecnologia USP/Instituto Butantan /
IPT, para obtenção do Título de Doutor em
Biotecnologia.**

**Área de concentração:
Biotecnologia**

Orientador: Prof^a Dra. Luiziana Ferreira da Silva

**São Paulo
2007**

**Ao meu amado filho, Vinicius, que me
ensinou o valor do tempo.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva pela confiança e apoio.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pelo conhecimento transmitido durante todos estes anos. Por ter sido de fundamental importância para o desenvolvimento deste trabalho. Por ser um exemplo de pesquisador e de ser humano.

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pelas sugestões e discussões ao longo deste trabalho.
À Vânia Santos Braz por tão gentilmente ter colaborado para que parte desta tese fosse desenvolvida.

À Marilda pela valorosa orientação quanto à escolha do caminho a seguir.

À Denise, Marjorie, Márcia e Ivan pela colaboração em parte deste trabalho.

Aos meus valiosos amigos que tanto me ajudaram durante este longo caminho: Roger, Rose, Rafael e Aelson. E ao final do trabalho ainda reforçaram a revisão deste.

Aos meus queridos companheiros de laboratório: Ana Carolina, Daniela, Érica, Marco, Nuri, Renata, Sayuri e Thatiane, por serem tão prestativos e terem me ajudado muito.

Ao meu esposo por ter sido tão companheiro e amigo.

Ao meu filho por ter me emprestado tanto tempo do nosso convívio.

Aos meus pais pelos esforços realizados para minha formação, principalmente ao meu pai que tanto sonhou e se empenhou para que esse momento se realizasse.

A nova família que me deu suporte em momentos difíceis, principalmente: à D. Maria, Lucineide e Marta.

A Deus por ter sempre iluminado meu caminho com pessoas maravilhosas e ter me dado de presente uma família de cinco anjos: Cris, Dani, Lucas, Carol e Guilherme.

Ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo. Aos pesquisadores, técnicos e auxiliares que colaboraram na realização deste trabalho.

À Fundação de Apoio Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa.

**Tudo neste mundo tem seu tempo;
cada coisa tem sua ocasião.**

**Há um tempo de nascer e tempo de morrer;
tempo de plantar e tempo de arrancar;
tempo de matar e tempo de curar;
tempo de derrubar e tempo de construir.**

**Há tempo de ficar triste e tempo de se
alegrar;
tempo de chorar e tempo de dançar;
tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntá-
las;
tempo de abraçar e tempo de afastar.**

**Há tempo de procurar e tempo de perder;
tempo de economizar e tempo de desperdiçar;
tempo de rasgar e tempo de remendar;
tempo de ficar calado e tempo de falar.**

**Há tempo de amar e tempo de odiar;
tempo de guerra e tempo de paz.**

(Eclesiastes 3, 1-8)

RESUMO

SONIA, R.S.Q. **Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável.** 2007. 98p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

Neste trabalho, foram desenvolvidas estratégias para modular a composição de elastômeros biodegradáveis da família dos polihidroxialcanoatos (PHA), produzidos por *Pseudomonas*, a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais, para diversificar suas aplicações, sobretudo pela inserção de monômeros insaturados. A composição do PHA produzido variou com o tipo de ácido graxo fornecido e com sua proporção em misturas. Em genomas seqüenciados, detectaram-se dois genes *fadH* (codificador de 2,4-dienoilCoA hidratase) em *P. aeruginosa* e apenas um em outras *Pseudomonas*. Observou-se uma correlação entre o número de cópias de *fadH* no genoma e maior eficiência na oxidação de ácidos graxos insaturados. Mutantes afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados foram obtidos utilizando-se transposon, alguns destes mutantes apresentaram maior eficiência na incorporação de monômeros insaturados ao PHA. A clonagem e seqüenciamento de fragmentos de DNA interrompidos pelo transposon permitiram a identificação dos genes afetados nesses mutantes.

Palavras-chave: elastômero biodegradável, polihidroxialcanoatos, *Pseudomonas*, óleos vegetais, ácido linoleico, transposon.

ABSTRACT

SONIA, R.S.Q. **Estudo do metabolismo de ácidos graxos em *Pseudomonas putida* visando à modulação da composição monomérica de elastômero biodegradável.** 2007. 98p. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

Different strategies were applied to modulate the composition of biodegradable elastomeric polyhydroxyalkanoates (PHA) accumulated by *Pseudomonas* from fatty acids and plant oils, in order to improve the applications of this material, mainly by unsaturated monomer insertion. PHA composition varied both with fatty acid type and fatty acids ratio in mixtures supplied. Analysis of genome sequences revealed two *fadH* (encoding 2,4-dienoyl-CoA hydratase) copies in *Pseudomonas aeruginosa* and only one in other *Pseudomonas* species. The number of *fadH* copies in the genome was related to the higher oxidation of unsaturated fatty acids. Transposon-induced mutants affected on unsaturated fatty acids metabolism were obtained, some of them showing higher efficiency to incorporate unsaturated monomers do the PHA. Cloning and sequencing of transposon-disrupted DNA regions allowed to identify the genes affected in those mutants.

Keyword: biodegradable elastomer, polyhydroxyalkanoates, *Pseudomonas*, plant oils, linoleic acid, transposon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fotomicrografia de cortes ultrafinos de <i>Ralstonia eutropha</i>	18
Figura 2:	Fórmula estrutural geral dos polihidroxialcanoatos.....	19
Figura 3:	Esquema geral da síntese de PHA.....	20
Figura 4:	Vias metabólicas envolvidas na síntese de PHA _{MCL} em <i>Pseudomonas</i>	22
Figura 5:	Reação de hidrólise de triacilglicerol.....	23
Figura 6:	Esquema da oxidação de ácidos graxos.....	26
Figura 7:	Esquema ilustrativo das reações envolvidas na oxidação do ácido oleico.....	28
Figura 8:	Esquema ilustrativo das reações envolvidas na oxidação de ácido linoleico.....	30
Figura 9:	Metabolismo de ácidos graxos em <i>Escherichia coli</i> e sua regulação pela proteína FadR.....	32
Figura 10:	Correlação entre o teor de 3HDd e 3HDd ⁶ e os teores de ácidos oleico (A) e linoleico (B), respectivamente fornecidos ao cultivo de <i>P.putida</i>	52
Figura 11:	Cromatogramas dos polímeros sintetizados a partir de diferentes proporções de ácido oleico e linoleico.....	53
Figura 12:	Variação do teor de 3HHx, 3HO e 3HD no polímero produzido, em função da concentração de ácido oleico fornecida.....	54
Figura 13:	Modelo metabólico para síntese de PHA _{MCL} a partir de óleo vegetal.....	55
Figura 14:	Fluxo metabólico (μmol/L.48 h) proposto a partir dos dados de cultivo de <i>P. putida</i> IPT 046 somente em ácido linoleico.....	58
Figura 15:	Fluxo metabólico (μmol/L.48 h) propostos a partir dos dados de cultivo de <i>P. putida</i> IPT 046 em ácido oleico e ácido linoleico	58

	(1:4).....	
Figura 16:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) obtido de cultivo de <i>Pseudomonas</i> a partir de ácido oleico e ácido linoleico (2,5:2,5).....	59
Figura 17:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) obtido de cultivo de <i>Pseudomonas</i> a partir de ácido oleico e linoleico (4:1).....	59
Figura 18:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) obtido de cultivo de <i>Pseudomonas</i> a partir de ácido oleico somente (5:0).....	60
Figura 19:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) observado para os componentes provenientes da via de β -oxidação em diferentes concentrações de ácido oleico.....	61
Figura 20:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) observado para os componentes provenientes da via de síntese <i>de novo</i> em diferentes concentrações de ácido oleico.....	61
Figura 21:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) observado para via de síntese <i>de novo</i> e β -oxidação em diferentes concentrações de ácido oléico.....	62
Figura 22:	Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L}$.48 h) observado para via de síntese <i>de novo</i> e β -oxidação em diferentes concentrações de ácido oleico.....	68
Figura 23:	Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprido e a fração molar de 3HDd Δ^6 detectado no PHA produzido por <i>P. putida</i> IPT046.....	71
Figura 24:	Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros insaturados e a fração molar destes no PHA produzido por <i>P. putida</i> IPT046.....	72
Figura 25:	Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros saturados e a fração molar destes no PHA produzido por <i>P. putida</i> IPT046.....	72
Figura 26:	Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprido e a fração molar de 3HDd Δ^6 detectado no PHA produzido por <i>P. aeruginosa</i> IPT171.....	73
Figura 27:	Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros insaturados e a fração molar destes no PHA por <i>P. aeruginosa</i> IPT171.....	73
Figura 28:	Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros saturados e a fração molar destes no PHA por <i>P.</i>	74

	<i>aeruginosa</i> IPT171.....	
Figura 29:	Esquema de inserção do transposon mini-Tn5.....	78
Figura 30:	Expressão do gene <i>lacZ</i> em mutantes por transposon de <i>P. putida</i> IPT046 cultivados em (A) MM4P; (B) MMV e (C) MMGK.....	79
Figura 31:	Análise eletroforética de gel de agarose de DNA plasmidial do clone contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de <i>Pseudomonas putida</i> , digerido com <i>Pst</i> I.....	85
Figura 32:	Análise eletroforética de gel de agarose de DNA plasmidial de subclones contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de <i>Pseudomonas putida</i> , digerido com <i>Pst</i> I.....	86
Figura 33:	Dendograma resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos de 2,4 dienoil-CoA redutase em <i>Pseudomonas</i>	87
Figura 34:	Alinhamento da Região anterior do gene <i>fadH1</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440, <i>Pseudomonas putida</i> F1 e <i>P.Entomophila</i> L48.....	88
Figura 35:	Alinhamento da Região Posterior do gene <i>fadH1</i> de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440 E F1.....	89
Figura 36:	Análise eletroforética de gel de agarose apresentando 1.2. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com HindIII). 3;4;5 e 6. Fragmento de DNA contendo o gene <i>fadH</i> obtido pela amplificação em <i>P. putida</i> KT2440. 7 e 8. <i>P.putida</i> IPT046.....	89
Figura 37:	Gel de agarose de plasmídeos provavelmente contendo o gene <i>fadH1</i>	90
Figura 38:	Gel de agarose de plasmídeos contendo o <i>fadH</i> digeridos com <i>Apa</i>	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Ácidos graxos componentes de diferentes óleos vegetais.....	24
Tabela 2:	Publicações referentes à produção de PHA _{MCL} a partir de óleos vegetais e ácidos graxos.....	34
Tabela 3:	Antibióticos e concentrações utilizados.....	39
Tabela 4:	Plasmídeos utilizados e características relevantes.....	39
Tabela 5:	Seqüência de oligonucleotídeos utilizados.....	40
Tabela 6:	Produção de PHA _{MCL} a partir de ácidos graxos e óleo de soja por <i>P.putida</i> IPT 046.....	50
Tabela 7:	Monômeros que podem ser gerados a partir da degradação degradação dos diferentes ácidos graxos e glicerol.....	52
Tabela 8:	Composição de óleos vegetais obtida por análise de cromatografia gasosa.....	64
Tabela 9:	Produção de PHA por <i>P. putida</i> IPT046 a partir de diferentes óleos vegetais ou combinações destes.....	65
Tabela 10:	Produção de PHA por <i>P. aeruginosa</i> IPT 171 a partir de diferentes óleos vegetais ou combinações destes.....	66
Tabela 11:	Perfil de crescimento dos mutantes de <i>P. putida</i> IPT046 em ácido valérico e ácido 4- pentenóico.....	77
Tabela 12:	Composição monomérica de PHA acumulados por <i>P. putida</i> e seus mutantes quando cultivados em presença de ácido oleico e linoleico comerciais, ou uma mistura destes.....	12

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 Polihidroxicanoatos.....	18
2.2 Síntese e incorporação de monômeros a PHA.....	20
2.3 Polihidroxicanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}).....	20
2.4 Síntese de PHA_{MCL}.....	21
2.5 Degradação de ácidos graxos saturados e insaturados.....	23
2.5.1 <i>Oxidação de ácidos graxos: β-oxidação.....</i>	<i>24</i>
2.5.2 <i>Oxidação dos ácidos graxos insaturados.....</i>	<i>27</i>
2.5.3 <i>Fad R – proteína regulatória do metabolismo de ácidos graxos.....</i>	<i>31</i>
2.6 PHA_{MCL} a partir de óleos vegetais e seus ácidos graxos.....	33
2.7 Aplicações para polihidroxicanoatos.....	36
3 OBJETIVO.....	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Linhagens utilizadas.....	39
4.2 Condições de cultivo.....	39
4.3 Plasmídeos.....	39
4.4 Sequências de oligonucleotídeos utilizados.....	40
4.5 Meios de cultura.....	40
4.6 Manipulação de DNA.....	41
4.6.1 <i>Extração de DNA genômico e plasmidial.....</i>	<i>41</i>
4.6.2 <i>Digestão de DNA com enzimas de restrição.....</i>	<i>42</i>
4.6.3 <i>Ligação.....</i>	<i>42</i>
4.6.4 <i>Inserção de DNA em bactérias por transformação.....</i>	<i>42</i>
4.6.5 <i>Análise de DNA em gel de agarose.....</i>	<i>43</i>
4.6.6 <i>Reação de amplificação do gene fadH.....</i>	<i>43</i>
4.6.6.1 <i>Ligação do produto da amplificação ao vetor.....</i>	<i>43</i>
4.6.7 <i>Sequenciamento de fragmentos de DNA de interesse.....</i>	<i>44</i>
4.7 Banco de mutantes de <i>Pseudomonas putida</i> IPT046 por transposon.....	44
4.7.1 <i>Seleção de mutantes afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados...</i>	<i>45</i>
4.7.2 <i>Mutantes com padrão de expressão alterado na presença de ácido graxo insaturado.....</i>	<i>45</i>
4.7.3 <i>Identificação do gene interrompido pelo mini-Tn5 nas linhagens mutantes isoladas da biblioteca.....</i>	<i>45</i>
4.8 Experimentos de acúmulo de polímero.....	46
4.8.1 <i>Produção de polímeros por <i>P. putida</i> IPT046 a partir de diferentes ácidos graxos e óleo de soja.....</i>	<i>46</i>
4.8.2 <i>Produção de polímeros por <i>P. putida</i> IPT046 e <i>P. aeruginosa</i> a partir de diferentes ácidos e óleos vegetais</i>	<i>46</i>
4.8.2.1 <i>Extração e purificação de PHA.....</i>	<i>47</i>
4.8.3 <i>Ensaio de produção de polímero utilizando ácidos graxos comerciais.....</i>	<i>47</i>
4.9 Determinações analíticas.....	47
4.9.1 <i>Massa seca celular.....</i>	<i>47</i>
4.9.2 <i>pH.....</i>	<i>48</i>
4.9.3 <i>Quantidade e composição de PHA.....</i>	<i>48</i>
4.9.4 <i>Composição de ácidos graxos presente nos óleos vegetais.....</i>	<i>48</i>
4.10 Preservação das linhagens utilizadas.....	49

4.11 Esterilização.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 Produção de polímero a partir de diferentes ácidos graxos.....	50
<i>5.1.1 Análise de fluxos metabólicos.....</i>	<i>54</i>
5.2 Produção de PHA a partir de diferentes óleos vegetais.....	63
5.3 Produção de PHA a partir de óleos vegetais e caracterização de monômeros por espectrometria de massa.....	74
5.4 Obtenção de mutantes afetados no metabolismo de ácidos graxos.....	75
<i>5.4.1 Construção da biblioteca de mutantes.....</i>	<i>75</i>
<i>5.4.2 Seleção de mutantes deficientes no crescimento a partir de ácido graxo insaturado.....</i>	<i>76</i>
<i>5.4.3 Detecção de mutantes com maior expressão do gene lacZ.....</i>	<i>77</i>
<i>5.4.4 Avaliação da produção de PHA por mutantes deficientes na utilização de ác. graxos insaturados.....</i>	<i>79</i>
<i>5.4.5 Identificação de genes afetados nos mutantes.....</i>	<i>85</i>
5.5 fadH.....	87
<i>5.5.1 fadH em Pseudomonas.....</i>	<i>87</i>
<i>5.5.2 Amplificação e clonagem do gene fadH.....</i>	<i>88</i>
6 CONCLUSÕES.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXO 1.....	102
ANEXO 2.....	108

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Polihidroxicanoatos (PHA) são polímeros sintetizados por muitos organismos como reserva de carbono e energia (STEINBÜCHEL, 1991). Estes polímeros têm atraído a atenção de pesquisadores e indústrias por possuírem propriedades tais como: apresentarem propriedade termoplásticas e/ou elastoméricas, serem fabricados a partir de matéria-prima renovável, serem biodegradáveis e biocompatíveis.

A composição de PHA pode ser altamente variável e sua síntese depende da natureza do substrato fornecido, das vias metabólicas que levam à formação dos monômeros (EGGINK *et al.*, 1995) e da especificidade do sistema de polimerização da bactéria.

Estes polímeros são classificados basicamente em dois grandes grupos: PHA_{SCL} (do inglês “short chain length”) que são polímeros constituídos por monômeros de 3 a 5 átomos de carbonos; e PHA_{MCL} (do inglês “medium chain length”) cujos monômeros possuem mais de 6 átomos de carbonos.

Poli-3-hidroxibutirato (P3HB), pertencente à família dos PHA_{SCL}, é certamente o mais conhecido dos PHA e já houve iniciativas para a sua produção industrial em diversos países. No Brasil, este polímero vem sendo produzido pela empresa PHB Industrial S.A. utilizando tecnologia desenvolvida em conjunto pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), pelo Centro de Tecnologia da Copersucar (CTC) e pela Universidade de São Paulo (USP) (GOMEZ *et al.*, 2001; ERENO, 2007).

PHA contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}) apresentam propriedades elastoméricas. Estes polímeros são produzidos por *Pseudomonas* e apresentam características bem distintas do P3HB e seus copolímeros, que são altamente cristalinos. Assim, PHA_{MCL} deverão ser utilizados em aplicações não atendidas pelo P3HB e seus copolímeros. Uma grande variedade de substratos já foi utilizada para a produção de PHA_{MCL}: alcanos (LAGEVEEN *et al.*, 1988), álcoois (HAYWOOD *et al.*, 1989; HUISMAN *et al.*, 1989) ácidos graxos (BARBUZZI *et al.*, 2004; DE WAARD *et al.*, 1993; BRANDL *et al.*, 1988; HAZER *et al.*, 1998;), óleos vegetais (EGGINK *et al.*, 1995; SOLAIMAN *et al.*, 2006; WENNAN *et al.*, 1998) e carboidratos (GOMEZ, 2000; DINIZ *et al.*, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2003). Quando substratos alifáticos – com cadeias carbônicas abertas – são utilizados, grupos funcionais, como insaturações, podem ser incorporados ao polímero, possibilitando a

produção de diferentes poliésteres. As insaturações também podem ser alvos para posterior modificação química do polímero.

Os ácidos graxos derivados dos óleos vegetais são excelente opção de substrato para a produção de PHA_{MCL} usando fonte de carbono renovável. Primeiro, são relativamente baratos. Segundo, muitos dos ácidos graxos constituintes dos óleos vegetais são insaturados e funcionam como precursores de monômeros insaturados que são incorporados ao polímero, possibilitando que o polímero possa ser modificado quimicamente e assim atinja propriedades mecânicas satisfatórias, aumentando sua aplicabilidade (ASHBY *et al.*, 1998; DE KONING, 1994; DEUSFRENE *et al.*, 2001; EROGLU *et al.*, 2005; HAZER *et al.*, 2001; HAZER; STEINBUHEL, 2007;).

Neste panorama, este trabalho teve como proposta desenvolver estudos visando modular a composição monomérica de PHA_{MCL} produzidos por *P. putida* IPT046, dando ênfase à incorporação dos monômeros insaturados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polihidroxialcanoatos

Polihidroxialcanoatos (PHA) são polímeros acumulados por diversas bactérias na forma de grânulos intracelulares (Figura 1), que atingem até 80% da massa seca bacteriana, sob condições desbalanceadas de crescimento, ou seja, com excesso de fonte de carbono disponível e limitação de pelo menos um nutriente essencial para a multiplicação celular (ANDERSON; DAWES, 1990). Poli-3-hidroxiбутирато (P3HB) e seu copolímero poli-3-hidroxiбутирато-*co*-3-hidroxiуалерато (P3HB-*co*-3HV) foram os primeiros a serem estudados, impulsionando o interesse mundial por estes materiais termoplásticos biodegradáveis, uma vez que podem ser gerados a partir de matérias-primas renováveis e podem substituir os polímeros de origem petroquímica em algumas aplicações, como por exemplo, o polietileno, na fabricação de embalagens (BYROM, 1987).

Figura 1 - Fotomicrografia de cortes ultrafinos de *Ralstonia eutropha* (Cedida por Rita de Cassia Paro Alli, Agrupamento de Biotecnologia – IPT).

A fórmula estrutural geral de PHA está apresentada na Figura 2, o radical R pode ser um átomo de hidrogênio, ou uma cadeia com até treze átomos de carbono, que pode conter insaturações, cadeias cíclicas, grupos aromáticos e inclusive outros átomos como, bromo, flúor ou cloro (REHM; STEINBÜCHEL, 1999). A composição monomérica de PHA depende da linhagem microbiana e da fonte de carbono fornecida durante o acúmulo (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

Figura 2. Fórmula estrutural geral dos polihidroxicanoatos n =pode variar de 1 a 4; R = pode ser um átomo de hidrogênio ou uma cadeia com até treze átomos de carbono.

Até o momento, cerca de 150 monômeros diferentes já foram identificados como constituintes de PHA produzidos por bactérias (REHM, 2003; REHM & STEINBÜCHEL, 1999). A incorporação destes monômeros depende fundamentalmente do microrganismo utilizado e do substrato fornecido (ANDERSON; DAWES, 1990). Apenas para um número restrito destes monômeros, foi descrita a produção a partir de simples carboidratos (RODRIGUES *et al.*, 1995), ou seja, para a síntese e incorporação da maioria dos monômeros é necessário fornecer substrato cuja estrutura química seja relacionada à do monômero que se deseja inserir ao polímero.

Como comentado na introdução, de acordo com o comprimento da cadeia carbônica principal do monômero, PHA são classificados, mais detalhadamente, em PHA_{SCL}, PHA_{MCL} e PHA_{LCL} (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Os PHA_{SCL} (“short chain length”) são os PHA contendo monômeros de cadeia curta, ou seja, monômeros com 3 a 5 átomos de carbono e são encontrados em *Ralstonia eutropha*, *Rhodococcus ruber*, entre bactérias de diversos grupos taxonômicos (STEINBÜCHEL, 1991). Os PHA_{MCL} (“medium chain length”) contêm monômeros de cadeia média, ou seja, com 6 a 16 átomos de carbono e são encontrados em *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans* e outras *Pseudomonas* fluorescentes. Embora tenha sido proposta a classe dos PHA_{LCL} (“long chain length”), que são os polímeros de cadeia longa, contendo monômeros com mais de 16 átomos de carbono, estes ainda não foram identificados em nenhum microrganismo (JENDROSSEK *et al.*, 1996; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

2.2 Síntese e incorporação de monômeros a PHA

A síntese e incorporação destes diferentes monômeros dependem de um substrato adequado que possa ser convertido no hidroxiaçil-CoA desejado através das reações metabólicas existentes nas células bacterianas. Além disso, é necessário que a célula bacteriana possua uma enzima denominada PHA sintase, que seja capaz de incorporar o hidroxiaçil-CoA sintetizado a uma cadeia polimérica (Figura 3).

Figura 3. Esquema geral da síntese de PHA. Os três fatores chave que determinam a composição monomérica do PHA estão destacados dentro de retângulos.

2.3 Polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL})

Embora P3HB seja conhecido desde 1926 (LEMOIGNE, 1926), a capacidade de sintetizar PHA contendo ácido 3-hidroxiocetanóico (3HO) como principal constituinte por *Pseudomonas oleovorans* só foi descoberta em 1983 (De SMET *et al.*, 1983). Posteriormente, verificou-se que diversas *Pseudomonas* pertencentes ao grupo I de homologia do RNA ribossomal eram capazes de sintetizar PHA contendo monômeros de cadeia média de carbonos (6 a 16 átomos de carbono) quando supridas com alcanos, álcoois ou ácidos carboxílicos, de tal forma que a composição do poliéster refletia o comprimento da fonte de carbono suprida. Assim, por exemplo, quando a principal fonte de carbono era ácido nonanóico, *P. oleovorans* sintetizava PHA cujo principal constituinte era 3-hidroxinonanoato (BRANDL *et al.*, 1988; LAGEVEEN *et al.*, 1988). No início de 1990, foi descoberto que *Pseudomonas* fluorescentes são capazes de sintetizar polímeros deste tipo a partir de carboidratos (TIMM ; STEINBÜCHEL, 1990; HAYWOOD *et al.*, 1990).

Sabe-se hoje que *Pseudomonas* fluorescentes sintetizam PHA_{MCL}, que apresentam características claramente distintas daquelas observadas em poli-3-hidroxibutirato e seus copolímeros, PHA_{SCL}. PHA_{MCL} apresentam propriedades elastoméricas, assemelhando-se à borracha, enquanto PHA_{SCL} assemelham-se a plásticos como o polietileno. Deste modo, as aplicações serão distintas e, como já mencionado, dependerão da composição monomérica presente.

PHA_{MCL} podem ser sintetizados a partir de ambos os substratos, carboidratos e alifáticos. A utilização de substratos alifáticos pode representar vantagens: maiores rendimentos são esperados e os grupos funcionais podem ser incorporados ao polímero, possibilitando a produção de diferentes poliésteres, bem como a sua modificação química após a biossíntese utilizando os grupos funcionais como alvos para a modificação.

PHA_{MCL} sintetizado a partir de ácidos graxos possuem monômeros com cadeia de carbono de tamanho igual à do substrato ou menores por uma ou mais unidades de dois carbonos (C₂), indicando que os intermediários da β -oxidação são utilizados como precursores para a sua biossíntese (BRANDL *et al.*, 1988; DOI, 1990; LAGEVEEN *et al.*, 1988).

A incorporação dos intermediários da degradação dos ácidos graxos nestes PHA é uma oportunidade para o estudo do metabolismo destes substratos e o estabelecimento de um melhor controle sobre a composição do polímero.

2.4 Síntese de PHA_{MCL}

Um dos principais fatores para a síntese de PHA_{MCL} é a enzima PHA sintase presente em *Pseudomonas*, claramente distinta das PHA sintases presentes em bactérias com capacidade de acúmulo semelhante à *Ralstonia eutropha*, envolvida na síntese do biopolímero polihidroxibutirato (P3HB) (REHM, 2003).

Estudos fisiológicos indicam que PHA sintases presentes em *Pseudomonas* fluorescentes possuem a capacidade de incorporar apenas 3-hidroxicanoatos contendo de 6 a 16 átomos de carbono na cadeia principal, com preferência para monômeros com oito, nove ou dez átomos de carbono (C₈, C₉ ou C₁₀, respectivamente) dependendo da fonte de carbono utilizada (HUISMANN *et al.*, 1989).

Três vias metabólicas principais estão envolvidas na geração de monômeros de PHA_{MCL}, e são dependentes basicamente do substrato fornecido ao microrganismo

(HUIJBERTS *et al.*, 1994) (Figura 4). Estas vias são descritas a seguir:

Figura 4. Vias metabólicas envolvidas na síntese de PHA_{MCL} em *Pseudomonas*.

- quando carboidratos são fornecidos, os 3-hidroxiacil são gerados pela síntese *de novo* de ácidos graxos, ou seja, a partir da condensação de diversas moléculas de acetil-CoA (via malonil-CoA) é gerado o 3-hidroxiácido que será incorporado ao polímero. Antes da incorporação ao polímero, o 3-hidroxiacil é transferido do ACP (Acyl Carrier Protein), que é o carreador dos grupos acil na síntese *de novo* de ácidos graxos, para a coenzima A (CoA), carreadora dos grupos acil na reação de polimerização catalisada pela PHA sintase (Figura 4, esquema à esquerda) (REHM *et al.*, 1999);
- quando alcanos, álcoois, ou ácidos carboxílicos são supridos, a β-oxidação apresenta papel fundamental na geração dos monômeros, entretanto, de modo geral ainda não foi esclarecido se uma epimerase, uma 3-cetoacil redutase ou uma enoil-CoA hidratase realiza a drenagem de intermediários da β-oxidação para a síntese de PHA_{MCL} (Figura 4, esquema à direita). Foram já clonados genes codificadores da enzima 3-(R)-enoil-CoA hidratase pertencentes a *Aeromonas punctata*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Rhodospirillum rubrum* e relacionados com a síntese

de PHA a partir de ácidos graxos em *Escherichia coli* (FUKUI *et al.*, 1998, REISER *et al.*, 2000; TSUGE *et al.*, 2003);

- c) outra hipótese para geração de intermediários é a explicação para a presença de monômeros contendo dois carbonos a mais que o substrato fornecido, ou seja, a condensação de acetil-CoA com outros acil-CoA intermediários da β -oxidação também deve ocorrer (Figura 4: entrada de acetil-CoA na cadeia de elongação). Essa reação seria catalisada por uma β -cetotiolase. Assim, por exemplo, quando ácido hexanóico é suprido como única fonte de carbono observa-se a presença de monômeros contendo oito átomos de carbono.

2.5 Degradação de ácidos graxos saturados e insaturados

Os triacilgliceróis são lipídios formados pela ligação de três moléculas de ácidos graxos com o glicerol através de ligações tipo éster. Os ácidos graxos que participam da estrutura de um triacilglicerol são geralmente diferentes entre si. O óleo é composto por triacilgliceróis que, por ação de lipases, é hidrolisado a ácidos graxos e glicerol (Figura 5).

Figura 5. Reação de hidrólise de triacilglicerol.

Fonte: <http://www2.ufp.pt/~pedros/bq/fatty.htm>

A Tabela 1 apresenta a composição de ácidos graxos de diferentes óleos vegetais.

Tabela 1 – Ácidos graxos componentes de diferentes óleos vegetais

Óleos	Ácidos graxos				
	Palmítico	esteárico	oleico	linoleico	linolênico
Arroz	18,2	1,9	47,9	34,6	1,2
Canola	5,1	1,7	60,1	21,5	9,9
Girassol	6,4	4,5	22,1	65,6	0,5
Milho	12,3	1,0	27,7	56,1	-
Soja	10,8	3,9	23,9	52,1	7,8

Fonte: DUBOIS *et al.*, 2007.

Como visto na Tabela 1, mais que 70% dos ácidos graxos presentes nestes óleos de origem vegetal, produzidos e comercializados em grandes quantidades, correspondem aos ácidos oleico e linoleico. Ambos são ácidos graxos insaturados, o ácido oleico com apenas uma insaturação (Δ^9) e o ácido linoleico com duas ($\Delta^{9,12}$). Além disso, o ácido linolênico, que possui três insaturações ($\Delta^{9,12,15}$), é encontrado em quantidades consideráveis nos óleos de canola e soja. Assim, os óleos vegetais são substratos com grande potencial para a produção de polímeros contendo monômeros com insaturações.

2.5.1 Oxidação de ácidos graxos: β -oxidação

Muitas bactérias podem crescer em ácido graxos de cadeia longa, que são oxidados a acetil-CoA por uma via denominada β -oxidação (WHITE, 2000). Esta via consiste de uma série cíclica de quatro reações, ao final das quais a acil-CoA é encurtada de dois carbonos, liberados sob a forma de acetil-CoA.

A Figura 6 apresenta a via de degradação dos ácidos graxos em *Escherichia coli* (DIRUSSO *et al.*, 1999). Os ácidos graxos de cadeia longa entram na célula por um sistema de transporte auxiliado por proteínas, produtos dos genes *fadL* e *fadD*. A proteína codificada pelo gene *fadL* localiza-se na membrana externa, onde atua como um receptor dos ácidos graxos de cadeia longa e auxilia sua passagem através da membrana externa. O gene *fadD* codifica a acil-CoA sintetase, que é responsável pela ativação do ácido graxo e sua passagem pela membrana interna. A molécula de ácido graxo ativada (acil-CoA) é oxidada por enzimas acil-CoA desidrogenases, sintetizadas a partir dos genes *fadF* e *fadG*. O produto do gene *fadF* possui especificidade para acil-CoA com cadeia de comprimento médio ou longo, enquanto o produto de *fadG* apresenta especificidade para acil-CoA com cadeia curta. O produto formado é uma enoil-CoA (acil-CoA insaturada na posição 2). O gene *fadE* codifica

uma flavoproteína responsável pela transferência de elétrons requeridos pelas acil-CoA desidrogenases (FadG e FadF) (DIRUSSO *et al.*, 1999).

As enzimas subsequentes requeridas para a β -oxidação estão associadas a um complexo multienzimático (FadBA) formado por dois polipeptídeos codificados pelos genes *fadA* e *fadB*. O complexo é constituído de duas subunidades com estrutura $\alpha_2\beta_2$, com a massa molecular de 260000 Da. A subunidade β , codificada pelo gene *fadA*, possui 42000 Da, e a subunidade α , codificada pelo gene *fadB*, possui 78000 Da. Este complexo foi isolado e purificado por PRAMANIK em 1979 (PRAMANIK *et al.*, 1979). Alguns autores (KUNAU *et al.*, 1995) associaram a este complexo as seguintes atividades: (i) enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17) (catalisa a reação de hidratação da dupla ligação da 2-enoil-CoA, formando um 3-hidroxiacil-CoA de configuração S), (ii) 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (EC 1.1.1.35) (catalisa a oxidação da 3-hidroxiacil-CoA, resultando uma β -cetoacil-CoA), (iii) 3- β -cetoacil-tiolase (EC 2.3.1.16) (participa da etapa final da β -oxidação, quando ocorre reação da β -cetoacil-CoA com uma molécula de CoA formando acetil-CoA e uma acil-CoA com dois carbonos a menos que a inicial.), (iv) Δ^3 -cis- Δ^2 -trans-enoil-CoA isomerase (EC 5.3.3.3) (específica para oxidação de ácidos graxos com insaturações estendendo-se do carbono ímpar para o par) e (v) 3-hidroxiacil-CoA epimerase (EC 5.1.2.3.) (catalisa a conversão de R-3-hidroxiacil-CoA em S-3-hidroxiacil-CoA). Conforme referido acima, a acil-CoA sintetase (EC 6.2.1.3) e acil-CoA desidrogenases (EC 1.3.99.2 e EC 1.3.99.3) não estão associadas a este complexo enzimático. A única função associada ao produto do gene *fadA* é a de 3-cetoacil tiolase, enquanto as quatro funções restantes estão associadas ao produto do gene *fadB*.

O complexo enzimático FadBA também foi identificado e caracterizado em *Pseudomonas fragi* (ISHIKAWA *et al.*, 1997; SATO *et al.*, 1992), *Pseudomonas oleovorans* (FIEDLER *et al.*, 2002) e *Pseudomonas putida* (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Figura 6. Esquema da oxidação de ácidos graxos (DIRUSSO *et al.*, 1999). Entre parênteses estão indicados os genes codificadores das enzimas envolvidas em cada reação apresentada.

Todas as enzimas do complexo possuem atividade para um amplo espectro de substratos, com exceção da enoil-CoA hidratase (EC 4.2.1.17) que é ativa para substratos de

cadeia curta. A hidratase específica para ácido graxo de cadeia média é uma proteína distinta que não está associada ao complexo enzimático multifuncional. O gene estrutural para esta hidratase ainda não foi identificado em *E. coli* (DIRUSSO *et al.*, 1999).

2.5.2 Oxidação dos ácidos graxos insaturados

A oxidação de ácidos graxos insaturados requer enzimas adicionais àquelas requeridas para a oxidação dos ácidos graxos saturados (STOFFEL; CAESAR, 1965). A seguir são descritas etapas e enzimas envolvidas na oxidação destes ácidos:

a) Enoil-CoA isomerase:

No caso dos ácidos graxos que contêm insaturações estendendo-se de carbono ímpar para par, durante o ciclo de beta oxidação é gerado o composto 3-enoil-CoA. Neste caso, a enoil-CoA isomerase é responsável pela conversão dos compostos 3-enoil-CoA para *trans*-2-enoil-CoA (STOFFEL; CAESAR, 1965) (Figura 7). Por exemplo, no caso do ácido oleico, que possui uma dupla ligação no carbono 9, este seria oxidado pelo ciclo de β -oxidação e, após remoção de algumas unidades de dois carbonos, seria obtido 3-*cis*-dodecenoil-CoA. A enoil-CoA hidratase envolvida no ciclo β -oxidação não reconhece este composto e então uma enoil-CoA isomerase converte-o em 2-*trans*-dodecenoil-CoA, que pode retornar ao ciclo e ser totalmente oxidado.

Figura 7. Esquema ilustrativo das reações envolvidas na oxidação do ácido oleico

Fonte: <http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-3.htm>

Uma via alternativa para a degradação destes ácidos graxos (insaturações estendendo-se de carbono ímpar para par) é proposta na literatura. Esta via seria dependente de três enzimas auxiliares, enoil-CoA isomerase, 2,4-dienoil-CoA redutase e $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase (HE *et al.*, 1995; LUTHRIA *et al.*, 1995; TSERNG; JIN, 1991). Embora a presença desta via tenha sido comprovada em mitocôndrias e peroxissomos de fígados de camundongos, bem como mitocôndrias do coração de camundongos (REN; SCHULZ, 2003), a enzima $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase não foi detectada em *E. coli* (REN *et al.*, 2004).

b) 2,4 dienoil-CoA redutase

A dupla ligação estendendo-se a partir de carbono par requer, em ambos os sistemas (procariótico e eucariótico), o envolvimento de 2,4-dienoil-CoA redutase NADPH dependente (produto do gene *fadH*) (SCHULZ; KUNAU, 1987). Assim, o ácido linoleico, que possui duas insaturações, uma estendendo-se a partir de carbono ímpar (Δ^9) e outra de carbono par

(Δ^{12}), é igualmente oxidado como o ácido oleico até sua primeira dupla ligação. Após a ação da enoil-CoA isomerase, o composto obtido é o 2-*trans*-6-*cis*-dodecadienoil-CoA que retorna ao ciclo de β -oxidação até a formação de 2-*trans*-4-*cis*-dodecadienoil-CoA, quando é necessária uma 2,4-dienoil-CoA redutase para a redução deste composto a 3-*trans*-dodecenoil-CoA em organismos eucarióticos, que é convertido a 2-*trans*-dodecenoil-CoA, pela ação da enoil-CoA isomerase, e então completamente oxidado pela β -oxidação, levando à formação de 5 moléculas de acetil-CoA. Em *E. coli*, a 2-*trans*-4-*cis*-dodecadienoil-CoA já é diretamente convertida a 2-*trans*-dodecenoil-CoA pela 2,4-dienoil-CoA redutase (Figura 8).

Em estudos realizados de produção de PHA em *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida* e *P. resinovorans*, avaliando-se os produtos formados a partir dos substratos fornecidos, chegou-se à conclusão que a 2,4-dienoil-CoA redutase também é operante nesta espécie (ASHBY; FOGLIA, 1998; IAMAMURA *et al.*, 1990, DE WAARD *et al.*, 1993;).

Figura 8. Esquema ilustrativo das reações envolvidas na oxidação de ácido linoleico.
 Fonte: <http://courses.cm.utexas.edu/jrobertus/ch339k/overheads-3.htm>

2.5.3 *Fad R* – proteína regulatória do metabolismo de ácidos graxos

A regulação do metabolismo de ácidos graxos foi muito bem estudada em *E. coli* (DIRUSSO *et al.*, 1999). Neste sistema, FadR é uma proteína muito importante para o metabolismo de ácidos graxos. Embora possua muitas funções, é basicamente responsável pela indução da oxidação de ácidos graxos e repressão da biossíntese destes na presença de ácidos graxos exógenos (DIRUSSO *et al.*, 1999). Em resumo, na ausência de ácidos graxos exógenos, a síntese de lipídeos é dependente da síntese de ácidos graxos. O FadR está ativo, ligado ao DNA, e os genes *fad* (genes codificantes de enzimas responsáveis pela degradação de ácidos graxos – fatty acid degradation, incluindo *fadD* e *fadL*) são expressos em baixos níveis, enquanto genes *fab* (fatty acid biosynthesis) são expressos em níveis altos. Quando ácidos graxos são supridos no meio de cultura, são transportados e ativados, e o acil-CoA formado de cadeia longa se liga ao FadR e muda sua conformação, de tal forma que esta não pode se ligar ao DNA. Isto resulta na liberação dos genes *fad* e expressão reduzida dos genes *fab*.

Fujita *et al.* (2007), em uma revisão sobre a regulação do metabolismo de ácidos graxos em bactérias apresentou um modelo da inter-relação do transporte de ácido graxo e a regulação da transcrição de enzimas responsáveis pela oxidação e síntese ácidos graxos do envelope celular (Figura 9). Após o transporte através da membrana e ativação do ácido graxo (mediados por FadL e FadD), dá-se o primeiro passo da β -oxidação (por ação de FadE) que gera uma enoil-CoA. Esta é convertida a 3-cetoacil-CoA (em duas reações catalisadas por FadB). No último passo, catalisado por FadA, o produto anterior é clivado a acetil-CoA e uma acil-CoA encurtada por dois carbonos. Para a degradação de ácidos graxos insaturados, FadH transforma 2,4 dienoil-CoA derivado dos ácidos graxos insaturados em enoil-CoA (Figura 9, vide esquema à esquerda e nome completo de cada enzima no rodapé). Na oxidação de ácidos graxos insaturados também participa uma Δ^3 , Δ^2 enoil-CoA isomerase presente em FadB, que não está representada na Figura 9.

Já na síntese de ácidos graxos, AccABCD atua na formação de malonil-CoA a partir de acetil-CoA. FabD transfere então malonil para ACP (Fig. 9, esquema à direita). A reação de condensação inicial de acetil-CoA com malonil-ACP é catalisada por FabH, gerando acetoacetyl-ACP. No ciclo de alongação que se segue, atua FabG e o 3-hidroxiacil-ACP resultante é desidratado pela ação da enzima FabZ, gerando um enoil-ACP. O último passo do ciclo é catalisado por FabI e o acil-ACP resultante pode ser então alongado por ação de FabB e/ou FabF.

Para sintetizar ácidos graxos insaturados, FabA também catalisa a desidratação de 3-hidroxiacil-CoA e isomeriza a dupla ligação existente no trans-2-enil-CoA gerando o isômero *cis*-3. A enzima FabB condensa *cis*-3-decenil-CoA com malonil-CoA para produzir *cis*-5-ene-3-cetododecenil-CoA, que pode agora passar pelas reações subsequentes catalisadas por FabG, FabZ e FabI.

Figura 9. Metabolismo de ácidos graxos em *Escherichia coli* e sua regulação pela proteína FadR.

FadL – proteína de membrana FadD – acil-CoA sintetase, FadE – acil-CoA desidrogenase, FadB – enoil-CoA hidratase/3-hidroxiacil-CoA, FadA – β-cetotiolase(acetil-CoA C-aciltransferase), FadH – 2,4 dienil-CoA redutase, AccABCD – acetil-CoA carboxilase, FabD – malonil-CoA:ACP transacilase, FabH – 3-cetoacil-ACP sintase III, FabG – 3-cetoacil-ACP redutase NADPH dependente, FabZ – 3-hidroxiacil-ACP desidratase, FabI – enoil-ACP redutase, FabB – 3-cetoacil-ACP sintetase I, FabF – 3-cetoacil-ACP sintetase II, FadR – proteína reguladora da degradação de ácidos graxos, FabR repressor

Fonte: modificado de FUJITA *et al.*, 2007.

A proteína FadR reprime a expressão dos genes *fadL*, *fadD*, *fadE*, *fadB*, *fadA* e *fadH*, bem como os genes *uspA*, *yfcX* e *yfcY*. Os produtos destes genes estão realçados pela caixa verde (exceto *uspA*). O gene *uspA* codifica uma proteína de estresse universal, enquanto *yfcX* e *yfcY* estão envolvidos na degradação de ácidos graxos em anaerobiose. FadR desencadeia a expressão dos genes *fabA* e *fadB* bem como do gene *iclR*. Os produtos destes genes estão realçados pelas caixas vermelhas (exceto o produto do gene *iclR*). FadR é antagonizado por acil-CoA de cadeia longa (acima de 14 átomos de carbono). O gene *iclR* codifica um regulador

negativo para ciclo do glioxilato. Além disso, FabR somente reprime os genes *fabA* e *fabB* (caixa azul). Os sinais que modulam a atividade de ligação de FabR (X) são desconhecidos. No mais, os acil-ACPs regulam a biossíntese de ácidos graxos por retro inibição (feedback inhibition) de *accABCD*, *fabH* e *fabI* (em azul claro) (Figura 9).

Baseados em artigos indicativos de que, em *E. coli*, a ativação transcricional dos genes não interligados *fabA* e *fabB* se dá por FadR, um regulador do grupo de reguladores transcricionais com a assinatura da família GntR, Choi e Schweizer (2005) obtiveram mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inativados em 25 dos 27 genes do genoma que apresentam assinatura GntR, entretanto, nenhum deles codificava um possível ativador de *fabAB*. Não foram obtidos mutantes inativados em dois genes (*PA1285* e *PA2299*) que podem então ter uma função essencial. Estes autores também afirmam, embora não apresentem seus resultados, que a expressão do operon *fabAB* é reprimida por ácidos graxos exógenos adicionados, mais efetivamente ácido oleico. Resultados preliminares mencionados pelos autores indicam que esta repressão pode ser devida a um relaxamento da ativação por um regulador transcricional que se liga a uma região de 30 nucleotídeos localizada na região promotora de *fabAB* (Choi e Schweizer, resultados não publicados, citados em CHOI e SCHWEIZER, 2005).

2.6 PHA_{MCL} a partir de óleos vegetais e seus ácidos graxos.

Na Tabela 2 estão apresentados os principais trabalhos referentes à produção de PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos, óleos vegetais ou gordura animal. Primeiro estão relacionados PHA_{MCL} formados a partir de ácidos graxos bem distintos daqueles presentes nos óleos vegetais (Tabela 2-A). Pode-se verificar a formação de monômeros insaturados, bem como monômeros diferenciados (3HU Δ_{10} , 3HN Δ_8 , 3HHp Δ_6 .) Estes trabalhos demonstram a possibilidade de incorporação de monômeros específicos ao PHA_{MCL} fornecendo-se substrato relacionado. No entanto, a produção de biopolímero em grande escala seria inviável pelo alto custo destes substratos.

Em B (Tabela 2-B), estão relacionados os trabalhos de produção de PHA_{MCL} a partir de diferentes ácidos graxos. Estes trabalhos preocupam-se em demonstrar a relação entre a variação dos substratos fornecidos e monômeros específicos incorporados. Em C (Tabela 2-C), os substratos fornecidos são óleos vegetais ou gorduras animais hidrolisados. Na maioria dos trabalhos apresentados, as gorduras ou óleos são previamente hidrolisados porque as

linhagens utilizadas não são produtoras de lipases. Neste caso, a produção do polímero possui ainda o custo inerente da hidrólise dos ácidos graxos. Já em D (Tabela 2-D), são apresentados os polímeros sintetizados a partir de óleos vegetais e gordura animal, neste caso, são utilizadas linhagens já produtoras de lipases ou recombinantes possuindo o gene codificadores das mesmas. O PHA_{MCL} sintetizado é constituído principalmente por 3HD e 3HO, sendo que foi obtido polímero constituído por até 49% de monômeros insaturados. A situação em que óleos e gorduras são utilizados para produzir PHA é a que deve apresentar maior chance de sucesso, uma vez que a fonte de carbono representa um importante item nos custos de produção.

Tabela 2 – Publicações referentes à produção de PHA_{MCL} a partir de óleos vegetais e ácidos graxos.

A. PHA_{MCL} produzidos a partir ácidos graxos diferenciados				
Linhagens	Substratos	Principais monômeros sintetizados	Monômeros insaturados (mol %)	Autores
<i>P. putida</i> GPo1 (ATCC 29347)	Misturas de ácido octanóico e ácido 10-undecenóico	3HO (18,8 a 83 mol%) 3HHx (1,6 a 8,7mol%)	8,3 mol a 79,6mol% com a mistura com 75% de ácido 10-undecenóico	HARTMANN <i>et al.</i> , 2005
<i>P. oleovorans</i>	Ácido 10-undecenóico	3HUΔ ₁₀ , 3HNΔ ₈ , 3HHpΔ ₆	99%	EROGLU <i>et al.</i> , 2005
B. PHA_{MCL} produzidos a partir de ácidos graxos fornecidos em misturas diversas				
Linhagens	Substratos	Principais monômeros sintetizados	Monômeros insaturados (mol %)	Autores
<i>P. aeruginosa</i> 42A2	Composições variadas de ácido oleico grau técnico em cultivos com variações de K _{LA} e temperatura	3HD (30,8 a 48,7%); 3HO (2,2 a 24,3%)	64,4 %	FERNANDEZ <i>et al.</i> , 2005
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ácidos graxos com números ímpares de carbono (C9 a C15)	3HN (45 a 55mol%); 3HHp(20-40mol%)	dados não apresentados	BARBUZZI <i>et al.</i> , 2004
<i>P. corrugata</i> 388	Mistura de glicose e ácido oleico	3HO (33 a 48mol%); 3HD (24 a 33 mol%)	(12 a 26 mol%)	SOLAIMAN <i>et al.</i> , 2002
<i>P. stutzeri</i> 1317	Ácidos graxos variando de C2 a C14 e mistura destes	3HHp; 3HO, 3HN e 3HD	dados não apresentados	GUO-QIANG <i>et al.</i> , 2001
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Ácidos graxos saturados com números pares de carbono (C8 a C20) e ácido oleico	3HO (38 a 86mol%); 3HD(4 a 38 mol%)	6mol% com ácido oleico	BALLISTRERI <i>et al.</i> , 2001

Tabela 2 - Continuação. Publicações referentes à produção de PHA_{MCL} a partir de óleos vegetais e ácidos graxos.

C. PHA_{MCL} produzidos a partir de hidrolisados ou ácidos graxos puros de óleos vegetais ou gordura animal				
Linhagens	Substratos	Principais monômeros sintetizados	Monômeros insaturados (mol%)	Autores
<i>P. oleovorans</i>	Hidrolisado de óleo de soja	3HO (59 mol%); 3HD(18 mol%)	10 mol%	HAZER <i>et al.</i> , 2001
<i>P. putida</i>	Ácidos graxos de óleo de linhaça	3HD (13,3%); 3HO (11,6)	65,9mol%	VAN der WALLE <i>et al.</i> , 1993
	Ácidos graxos de sebo	3HD (26,6); 3HO (22,9)	39,8mol%	
<i>P. oleovorans</i>	Hidrolisados de Óleos de oliva Óleo de avelã Óleo de gergelim Óleo de Anchova	3HO (14 a 35%); 3HD (11 a 27%)	(12% com óleo de oliva a 43% com óleo de avelã)	HAZER <i>et al.</i> , 1998
<i>P. putida</i> PGA1	Óleo de dendê saponificado	3HO (82,9 1%); 3HHx (8,7 %) w/w	1,3 %	TAN <i>et al.</i> , 1997
D. PHA_{MCL} produzidos a partir de óleos vegetais ou gordura animal				
Linhagens	Substratos	Principais monômeros sintetizados	Monômeros insaturados (mol%)	Autores
<i>Comamonas testosteroni</i>	Óleo de mamona Óleo de coco Óleo de algodão Óleo de mostarda Óleo de amendoim Óleo de oliva Óleo de gergelim	3HO (33,9 a 48,5 mol%); 3HD (32,1 a 55,0 mol%)	dados não apresentados	THAKOR <i>et al.</i> , 2005
<i>P. corrugata</i> 388 recombinante com plasmídeo possuindo os genes da lipase.	Sebo e banha de porco	3HO (42 a 48mol%); 3HD (23 a 35 mol%)	dados não apresentados	SOLAIMAN <i>et al.</i> , 2002
<i>P. putida</i> e <i>P. resinovorans</i> recombinante com plasmídeo possuindo os genes da lipase.	Banha de porco Óleo de coco Ácido oleico	3HO (31-51mol%); 3HD(28-34mol%)	(12 a 25mol% com banha de porco)	SOLAIMAN <i>et al.</i> , 2001
<i>P. resinovorans</i> NRRLB-2649 recombinante com plasmídeo possuindo os genes da lipase.	Óleo de coco Óleo de soja e misturas destes com glicose	3HO (20 a 27mol%); 3HD(37 a 55mol%)	(5 a 25mol%)	ASHBY <i>et al.</i> , 2001
<i>Não descrita</i>	Óleo de linhaça	3HO (25%); 3HD(14%)	49%	ASHBY <i>et al.</i> , 2000
<i>P. saccharophila</i> NRRL B-628	Óleo de coco	3HD (40 mol%); 3HO (30 mol%)	4,0 mol%	SOLAIMAN <i>et al.</i> , 1999
<i>P. resinovorans</i>	Sebo Banha de porco Manteiga] Óleo de oliva Óleo de girassol Óleo de coco Óleo de soja	3HD (30-41%); 3HO (26-37%)	(5% com óleo de manteiga a 21%-com óleo de soja)	ASHBY; FOGLIA, 1998
<i>P. oleovorans</i> <i>P. resinovorans</i> <i>P. putida</i> <i>P. citronellis</i>	Sebo e Ácidos graxos de sebo	3HO (36 a 48%);3HD (22 a 33%)	(5 a 8%)	CROMWICK <i>et al.</i> , 1996
<i>P. aeruginosa</i> 44T1	Óleo de Eufórbia Óleo de Mamona	3HO (14 a 35%); 3HD (11 a 27%)	(óleo de oliva a 12% e óleo de avelã a 43%)	EGGINK <i>et al.</i> , 1995

2.7 Aplicações para polihidroxialcanoatos

Um dos aspectos mais importantes sobre PHA do ponto de vista biotecnológico é a grande diversidade de monômeros que podem ser a eles incorporados. Além disso, alguns monômeros podem ser modificados quimicamente, como por exemplo, aqueles contendo insaturações. Esta característica tem levado muitos autores a afirmar que PHA poderão se constituir em polímeros feitos sob medida para diferentes aplicações (KIM *et al.*, 2007). Esta afirmação está baseada no fato que as propriedades físicas e mecânicas de polímeros, em grande medida, dependem de sua composição monomérica. Desta maneira, sua aplicação é definida pela sua composição monomérica.

Esta variabilidade explica a existência, na classe dos PHA, de materiais rígidos, como o P3HB, bem como de materiais flexíveis, como PHA_{MCL}, os quais podem até se apresentar como materiais viscosos e aderentes, quando são compostos por uma grande fração de monômeros insaturados (GOMEZ, 2000).

Para se ter uma idéia de como as propriedades variam com a natureza constitutiva do PHA, PHA_{MCL} apresentam um alongamento para ruptura maior que 1000%, sendo classificados como elastômeros, enquanto o P3HB é um termoplástico rígido que apresenta um alongamento para ruptura menor que 5%. A incorporação de unidades 3HV ao P3HB permite aumentar a maleabilidade e resistência, atingindo-se valores de alongamento para ruptura de cerca de 50% (SUDESH *et al.*, 2000). A incorporação de monômeros HA_{MCL} a um PHA contendo 3HB como principal constituinte se revelou como uma estratégia interessante para obtenção de materiais com propriedades intermediárias entre o P3HB e PHA_{MCL}. A incorporação de apenas 6 mol% de 3HA_{MCL} permite obter um material com alongamento para ruptura superior a 600% (SUDESH *et al.*, 2000). Copolímeros de 3HB e 3HA_{MCL} têm sido objeto de diferentes patentes apresentadas pela empresa Procter & Gamble (HASSAN *et al.*, 2006; NODA *et al.*, 2005; NODA; BOND, 2002; NODA; SATKOWSKI, 2003;).

Historicamente, o primeiro produto comercial a partir de PHA foi lançado em 1990, que era uma garrafa biodegradável para xampu de uma companhia alemã de cosméticos composta de um copolímero de 3HB e 3-hidroxicaproato - P3HB-co-3HV (PREUSTING, 1992). Desde então, diversas outras aplicações em pequena escala têm sido desenvolvidas para P3HB ou P3HB-co-3HV (SILVA *et al.*, 2007).

Embora ainda não disponíveis comercialmente, uma série de aplicações potenciais têm sido vislumbradas para PHA_{MCL}, principalmente na área médica e farmacêutica em resposta às necessidades emergentes da área de engenharia de tecidos. Atualmente, PHA passaram a

ser uma das principais classes de biomateriais pesquisada para o desenvolvimento de produtos na área de engenharia de tecidos. Isto porque PHA podem oferecer um conjunto de propriedades não disponíveis em outros polímeros, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade e flexibilidade. Exemplos de aplicações para estes materiais que estão sendo pesquisadas são: suporte para tecidos (MOHANNA; TERENCEHI, 2005; WILLIAMS *et al.*, 1999; WILLIAMS; MARTIN, 2002), válvulas cardíacas, suturas, entre outras (WILLIAMS; MARTIN, 2006). Mais aplicações na área médica estão disponíveis na página eletrônica da Tephra Inc. (www.tepha.com) que é uma empresa norte-americana que vem se dedicando a este tema.

Outras aplicações também relatadas na literatura são citadas a seguir: (a) filmes de recobrimento para papel, papelão (De KONING *et al.*, 1997); (b) componentes de tintas a base de água (BUISMAN *et al.*, 2000; van der WALLE *et al.*, 1999) e (c) componentes em formulações de adesivos (BABU *et al.*, 1996).

3 OBJETIVO

Este trabalho teve como proposta desenvolver ferramentas e estratégias para modular a composição monomérica de PHA_{MCL} produzidos por *Pseudomonas. putida* IPT046, a partir de ácidos graxos e óleos vegetais dando ênfase à incorporação dos monômeros insaturados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens utilizadas

Neste trabalho, foram utilizadas as seguintes linhagens: *Pseudomonas putida* IPT046 (GOMEZ, 1996) e mutantes dela obtidos, *P. putida* KT2440, *P. aeruginosa* IPT171, *E. coli* S17-1, portando o plasmídeo pUTKm2 (LORENZO *et al.*, 1990), bem como *E. coli* XL1-Blue. Todas as linhagens foram preservadas em glicerol a 10%, a -80°C.

4.2 Condições de cultivo

P.aeruginosa IPT171, *P. putida* KT2440 (IPT036) e *P. putida* IPT 046 foram cultivadas a 30°C, 150 rpm e as linhagens de *E.coli* XL1-Blue e S17-1 a 37 °C, 150 rpm.

Antibióticos foram preparados de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989) e adicionados aos meios de cultura nas concentrações indicadas a seguir (Tabela 3):

Tabela 3. Antibióticos e concentrações utilizados

Antibiótico	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL)
Ampicilina (A) sal sódico	100 (em H ₂ O)	100
Canamicina (K)	50 (em H ₂ O)	50

4.3 Plasmídeos

As características dos plasmídeos utilizados neste trabalho estão listadas na Tabela 4:

Tabela 4. Plasmídeos utilizados e características relevantes.

Plasmídeos	Características	Referência ou fonte
pGEM- T easy	pGEM- T Easy Vector system I. Vetor de clonagem de produtos de PCR.	(Promega Corp., Madison USA)
pUT-KM2	Plasmídeo suicida carregando o transposon mini-Tn5 contendo o gene repórter <i>lacZ</i> sem promotor	De LORENZO <i>et al.</i> , 1990
pUCBM20	Vetor de clonagem, Replicon ColE1, Amp ^r	Böehringer Mannheim GmbH

4.4 Sequências de oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 5:

Tabela 5 Sequência de oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência (5'→3')	Finalidade
M13 "Forward"	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento de DNA.
M13 "Reverse"	CAGGAAACAGCTATGAC	
Ext 12	CGCTGACTTGACGGGACGGGACGGC	
FadHF	AAA GCT TTG TCC CAT CCT TTT GTC AGC ATG A	Amplificação do <i>fadH</i>
FadHR	AAA GCT TCA TGG ATC GCA GTT TAC AGG GTA A	Amplificação do <i>fadH</i>

4.5 Meios de cultura

As células foram cultivadas em meios de cultura descritos a seguir. Os reagentes foram sempre de grau PA, dissolvidos em água destilada.

Caldo nutriente (CN) ou agar nutriente (AN): denominado caldo nutriente quando líquido e agar nutriente quando sólido, com a seguinte composição:

- Peptona 5 g/L
- Extrato de carne 3 g/L
- Agar (para meio sólido) 15 – 20 g/L

Luria Bertani (LB):

- Triptona 10,0 g/L
- Extrato de levedura 5,0 g/L
- NaCl 5,0 g/L

As seguintes denominações foram dadas para os meios LB contendo diferentes composições:

- LBA – Meio LB contendo ampicilina (100 mg/L)
- LBK - Meio LB contendo canamicina (50 mg/L)

Meio mineral (MM) – O meio mineral foi formulado com a base de sais descrita a seguir (RAMSAY et al., 1990), sendo denominado meio mineral sólido quando complementado com agar (15-20 g/L).

– $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,00 g/L
– Na_2HPO_4	3,50 g/L
– KH_2PO_4	1,50 g/L
– $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g/L
– $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/L
– Citrato férrico amoniacal	0,06 g/L
– Solução de elementos traços	1,00 mL/L

Cada litro de solução de elementos traços apresentou a seguinte composição:

– H_3BO_3	0,30 g
– $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
– $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
– $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
– $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
– $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
– $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g

As seguintes denominações foram dadas para meios minerais sólidos contendo diferentes fontes de carbono:

MMGK– Meio mineral contendo glicose (1g/L) e canamicina (50mg/L)

MM4P- Meio mineral contendo ácido 4-pentenóico (1 g/L)

MMV – Meio mineral contendo ácido pentanóico (valérico) (1g/L)

4.6 Manipulação de DNA

4.6.1 Extração de DNA genômico e plasmidial

Foram utilizados os seguintes kits para extração e purificação do DNA bacteriano conforme instruções do fabricante:

- DNA genômico: Wizard Genomic Purification Kit (Promega Corp.) e Purelink™ Genomic DNA Purification (Invitrogen Corp.);
- DNA plasmidial: Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen Corp.) e Qiaprep® Spin Miniprep (Qiagen).

4.6.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição

Para a digestão de DNA foi utilizada endonucleases de *restrição* segundo instruções do fabricante (Invitrogen Corp.). A quantidade de enzima adicionada representou no máximo 10 % do volume de reação.. Após a digestão, foi realizada inativação da enzima em condições adequadas descritas pelo fabricante.

4.6.3 Ligação

As reações de ligação foram realizadas utilizando-se a enzima T4 DNA ligase (GIBCO ou NewEngland Biolabs Inc.), de acordo com protocolo do fabricante.

4.6.4 Inserção de DNA em bactérias por transformação

A linhagem de *E. coli* XLI Blue ou *E. coli* S17-1 foi inoculada em 25 mL de meio LB adicionado de MgCl_2 10 mM e MgSO_4 10 mM. Foram incubadas em agitador rotativo a 37°C até um valor de densidade óptica a 650 nm $\text{DO}_{650} = 0,3-0,5$. Em tubos esterilizados, foram centrifugados 8 mL da cultura por 15 min, a 4000 rpm, 4 °C e o “pellet” foi ressuspensão com 4 mL de tampão de transformação (composição descrita a seguir), as células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, o “pellet” foi ressuspensão em 0,8 mL do tampão de transformação, dividido em alíquotas de 200 μL , mantidas em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente.

Para cada 200 μL de células competentes, adicionaram-se 5 μL de DNA, (cerca de 500 ng) incubou-se em banho de gelo por 30 min e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 90s e imediatamente resfriada em gelo. Adicionaram-se 600 μL de meio LB e incubou-se por 1 hora a 37 °C. Clones transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico apropriado, IPTG (isopropil-tio- β -D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) também foram adicionados para diferenciar clones recombinantes contendo o inserto de DNA.

Tampão de transformação

Tris/HCl	(Hidrocloreto de hidroximetil aminometano)	10 mM
CaCl_2		50 mM
MgCl_2		10 mM
MgSO_4		10 mM
Água destilada qsp		1000 mL
pH 8,0		

4.6.5 Análise de DNA em gel de agarose

Para a análise do DNA, utilizou-se gel de agarose nas concentrações 0,8(%) (m/v). Utilizou-se TBE como tampão de corrida (SAMBROOK *et al.*, 1989). As amostras de DNA foram aplicadas nos géis com 1/10 do volume de corante de corrida. As corridas eletroforéticas em mini-géis foram realizadas a 90V, 80mA, 80W por 1 hora.

Os fragmentos foram observados após coloração do gel com brometo de etídeo (0,1 mg/100mL de TBE) por 20 min, lavado no mesmo tampão e visualizado sob luz UV (254 nm) em transluminador (Ultralum 100).

4.6.6 Reação de amplificação do gene *fadH*

O gene *fadH* foi amplificado a partir de oligonucleotídeos (“primers”) desenhados utilizando as seqüências adjacentes ao gene *fadH1* de linhagens de *P.putida* com genoma sequenciado. Para amplificação, foi empregada a mistura de reação abaixo:

1. Para um volume de 50 µL de reação:

PCR Master Mix *	25,0 µL
primer direto 10 µM	5,0 µL
primer reverso 10 µM	5,0 µL
DNA molde (cerca de 250ng)	5,0 µL
Água livre de DNase	10,0 µL

As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 94 °C por 15 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos, este ciclo foi repetido 35 vezes. Estas amplificações foram realizadas no Termo Ciclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG).

4.6.6.1 Ligação do produto da amplificação ao vetor

O produto amplificado por PCR foi purificado a partir de gel de agarose utilizando o Kit Perfect Prep Gel Cleanup (Eppendorf AG) e ligado ao vetor pGEM T-Easy de acordo com a indicação do fabricante (Promega Corp). O produto de ligação foi transferido para *E. coli* XL1 Blue utilizando a transformação por choque térmico na presença de íons divalentes (item

4.6.4), sendo selecionadas colônias resistentes a ampicilina e apresentando coloração branca na presença de IPTG e XGal. O DNA plasmidial de clones positivos foi extraído digerido com *EcoRI* e analisado em gel de agarose. A clonagem correta foi confirmada por sequenciamento.

4.6.7 Sequenciamento de fragmentos de DNA de interesse

Fragmentos de DNA de interesse ligados aos vetores empregados foram submetidos ao sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano -USP- Setor de Sequenciamento, utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase). As seqüências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

4.7 Banco de mutantes de *Pseudomonas putida* IPT046 por transposon

Linhagens de *Pseudomonas putida* IPT046 e *E. coli* contendo o plasmídeo pUTKm2, congeladas em glicerol a -80°C , foram incubadas em AN e LBK, respectivamente, por 72h a 30°C . Colônias isoladas destas culturas foram inoculadas em CN e LBK líquido (25 mL cada). Após 24 h, 10 mL de cada cultivo foram filtrados juntos em membrana $0,45\ \mu\text{m}$. A membrana foi transferida para AN e incubada por 24h a 30°C . Após este período, a membrana foi lavada para separação das células (em solução salina 0,85%). A solução obtida foi diluída e diluições apropriadas foram semeadas na superfície de MMGK sólido. Como as células de *E. coli* não são capazes de crescer em MM e células de *P. putida* IPT046 não são resistentes a canamicina, as células que se desenvolveram em MMGK foram consideradas linhagens de *P. putida* IPT046 que haviam recebido o plasmídeo que abriga o transposon e que este já teria se integrado ao genoma bacteriano, carregando consigo gene codificador da resistência ao antibiótico. Estes clones foram transferidos para MMGK para confirmar este fenótipo e em seguida utilizados para o rastreamento daqueles afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados ou com padrão de expressão alterado na presença de ácido graxo insaturado.

4.7.1 Seleção de mutantes afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados

Os clones obtidos na biblioteca de mutantes, após serem transferidos para MMGK, foram transferidos para MM4P e MMV. Foram selecionados aqueles capazes de crescer em MMV e MMGK e com crescimento afetado em MM4P.

4.7.2 Mutantes com padrão de expressão alterado na presença de ácido graxo insaturado

Após três dias de cultivo em MMGK, MMV e MM4P sólidos, foi adicionado agar (0,3%) semi-sólido, contendo 0,3 mg/mL de X-Gal, à superfície dos meios de cultura contendo as colônias crescidas. As placas foram incubadas por 1 hora, com o objetivo de identificar mutantes nos quais o gene *lacZ* do transposon se inseriu à frente de um promotor exposto preferencialmente na presença do ácido 4-pentenóico.

4.7.3. Identificação do gene interrompido pelo mini-Tn5 nas linhagens mutantes isoladas da biblioteca

Para identificar o gene interrompido e determinar o sítio de inserção do mini-*Tn5lacZ* foi realizada clonagem direta no vetor pUCBM20. Para isso, o DNA genômico do mutante foi digerido com enzima de restrição *Pst*I e ligado ao vetor pUCBM20 também digerido com *Pst*I. O vetor foi transferido para *E. coli* XL1-Blue por transformação. Os clones contendo fragmentos de interesse foram selecionados em meio LB contendo canamicina. Para identificação do gene interrompido foi realizado o sequenciamento do fragmento utilizando os iniciadores Ext 12, M13 Forward e M13 Reverse. As seqüências obtidas foram comparadas ao genoma de *P. putida* KT2440 utilizando o programa TBLASTX.

4.8 Experimentos de acúmulo de polímero

4.8.1. *Produção de polímeros por P. putida IPT046 a partir de diferentes ácidos graxos e óleo de soja.*

Células das diferentes linhagens foram semeadas em AN e cultivadas por 72 h a 30°C. Colônias isoladas desta cultura foram utilizadas para inocular 50 mL de CN e incubadas por 24 h; 20 mL do cultivo em CN foram centrifugados (10000 rpm, 10 min, 10°C) e utilizados para inocular 100 mL de MM contendo glicose (1 g/L). Após 24h, as células foram lavadas e ressuspensas em solução salina. Esta suspensão foi utilizada para inocular 100 mL de MM livre de nitrogênio contendo diferentes concentrações dos ácidos oleico e linoleico. Foi testada também a produção a partir do ácido linolênico. O cultivo em óleo de soja foi utilizado como controle. Após 24 e 48 horas de cultivo foram analisados: massa seca celular, pH, teor e composição de PHA.

4.8.2. *Produção de polímeros por P. putida IPT046 e P. aeruginosa a partir de diferentes ácidos e óleos vegetais –*

As linhagens bacterianas foram semeadas em AN e cultivadas por 72 h a 30 °C. Colônias isoladas desta cultura foram utilizadas para inocular 100 mL de CN e incubadas por 24 h; 20 mL do cultivo em CN foram utilizados para inocular 200 mL de MM contendo os diferentes óleos vegetais ou misturas destes como única fonte de carbono (1% v/v ou aproximadamente 9 g/L) e quantidade limitada da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄ – 1 g/L) de forma a propiciar condições para algum crescimento celular e acúmulo de PHA utilizando a fonte de carbono fornecida em excesso. Após 72h, as células foram centrifugadas e lavadas em solução de Tween 80 a 0,1% para determinar a massa seca celular e o teor e composição do PHA produzido. O pH da cultura foi analisado no sobrenadante da cultura. Os óleos vegetais testados foram adquiridos da Campestre Ind. e Com. de Óleos Vegetais.

4.8.2.1 Extração e purificação de PHA

Para a caracterização de monômeros constituintes de PHA foram realizados novos cultivos utilizando os óleos de soja, milho, girassol e arroz. As células foram centrifugadas (10600 $\times g$, 10 minutos, 4 °C) e liofilizadas. O polímero foi extraído das células liofilizadas utilizando clorofórmio. O material foi filtrado em papel de filtro para separação dos restos celulares e o polímero foi precipitado a partir da solução em clorofórmio utilizando 10 volumes de etanol. O polímero foi adicionalmente seco ao ar. O PHA foi submetido a propanólise (RIIS, MAI, 1988) e tratado ou não com trimetilsilil (LEE, CHOI, 1995).

4.8.3 Ensaio de produção de polímero utilizando ácidos graxos comerciais

Células de *P. putida* IPT046 ou seus mutantes obtidos por inserção do transposon miniTn5 foram semeadas em AN e cultivadas por 72 h a 30 °C. Colônias isoladas desta cultura foram utilizadas para inocular 25 mL de CN e incubadas por 24 h; 1,5 mL do cultivo em CN foram utilizados para inocular 25 mL de MM contendo ácido oleico (Synthesis), linoleico (Aldrich 60%) ou mistura destes (aproximadamente 5 g/L) e quantidade limitada da fonte de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄ – 1 g/L) de forma a propiciar condições para algum crescimento celular e acúmulo de PHA utilizando a fonte de carbono fornecida em excesso.. Após 72h, as células foram centrifugadas e lavadas em solução de Tween 80 a 0,1% para determinação da massa seca celular e o teor e composição do PHA. O pH foi determinado . As células assim obtidas foram liofilizadas e analisadas por cromatografia de fase gasosa.

4.9. Determinações analíticas

4.9.1 Massa seca celular

Dez mililitros da suspensão celular foram centrifugados (10 600 $\times g$, 10 min, 10 °C), suspensos em água e filtrados com o uso de membranas de poro 0,45 μm (Millipore Corp.). Nos cultivos em que foram empregados óleos vegetais ou ácido graxo, as células foram ressuspensas em solução de Tween 80 a 0,1% (m/v) e novamente centrifugadas (10 600 $\times g$, 10 min, 10 °C) antes da filtração. A membrana contendo as células foi seca por 4 horas a 100 °C.

Após ser retirado da estufa, este conjunto permaneceu 20 min em dessecador à temperatura ambiente e, após este período, foi determinada a massa seca celular (MS) através da seguinte equação:

$$MS = ((MMC - MM + UM)/VOL) \times 1000$$

Onde:

MMC= massa da membrana e células após a secagem (g)

MM= massa da membrana (g)

UM= umidade média do lote de membranas (g)

VOL= volume de suspensão centrifugada (L)

4.9.2 pH

O pH foi medido no sobrenadante após centrifugação, em potenciômetro (Mettler modelo Delta 350), utilizando padrões de pH 4,0; 7,0 e 9,0 (Ingold – Mettler Toledo Int. Inc.).

4.9.3 Quantidade e composição de PHA

Foram determinadas em propil-ésteres obtidos a partir de células liofilizadas ou polímero extraído segundo método descrito por RIIS e MAI (1988). Os propil-ésteres foram analisados em cromatógrafo gasoso (HP 6890 series II) equipado com coluna HP-5. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *Pseudomonas oleovorans* foram utilizados como padrões externos. Para confirmar a estrutura química dos monômeros detectados, principalmente os insaturados, os propil-ésteres obtidos foram analisados por espectrometria de massas na Central Analítica do Instituto de Química da USP.

4.9.4 Composição de ácidos graxos presente nos óleos vegetais

Foi determinada em metil-ésteres após transesterificação, conforme descrito por WILLIAMS (1984). Os metil-ésteres foram analisados em cromatógrafo gasoso (HP 6890 series II) equipado com coluna capilar HP-20M.

4.10 Preservação das linhagens utilizadas

Linhagem selvagem: As culturas da linhagem selvagem *Pseudomonas putida* IPT046 foram cultivadas em CN por 24 horas, diluídas 1:1 (v/v) com glicerol a 10%, distribuídas em tubos de microcentrífuga esterilizados, resfriadas por 2 horas em congelador de refrigerador doméstico e finalmente congeladas e estocadas em “freezer” a -80°C.

Mutantes: Todos os clones mutantes obtidos foram preservados em placas multipoços contendo LBK e solução de glicerol a 10% (1/1), nas condições descritas acima.

4.11 Esterilização

Soluções e meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 20 minutos. Foram esterilizados em forno de Pasteur, a 180 °C, os óleos, ácidos graxos comerciais (1 hora) e vidrarias em geral (4 horas). Os ácidos 4-pentenóico e valérico (solução a 10%), bem como os antibióticos foram esterilizados por filtração em membranas de poro 0,22 µm (Millipore).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de polímero a partir de diferentes ácidos graxos

Com o objetivo de entender melhor o metabolismo de ácidos graxos e padronizar metodologias que deverão ser utilizadas na avaliação dos mutantes afetados em passos deste metabolismo, foram realizados experimentos de produção de PHA a partir de diferentes combinações de ácidos graxos utilizando a linhagem selvagem *P. putida* IPT046. Os cultivos foram realizados na presença de diferentes proporções dos ácidos oleico e linoleico, bem como com ácido linolênico e óleo de soja. Estes resultados estão apresentados na Tabela 6. Uma vez que, padrões para a análise de 3-hidroxi-5-dodecenoato (3HDd Δ^5) e 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDd Δ^6) não estão disponíveis comercialmente ou em nosso laboratório, os cálculos das quantidades destes monômeros foram realizados considerando um mesmo fator de resposta para estes componentes que aquele detectado para a análise por cromatografia gasosa do componente 3-hidroxidodecanoato (3HDd), para o qual padrões estão disponíveis em nosso laboratório.

Tabela 6. Produção de PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos e óleo de soja por *P.putida* IPT 046.

Substratos*	Tempo (h)	pH	Xt (g/L)	3HHx (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol%)	3HDd (mol%)	3HDd Δ^5 (mol%)	3HDd Δ^6 (mol%)	PHA (%MSC)
Ac. Oleico (0) +	24	6,94	1,48	14,54	21,81	46,44	0,00	0,00	17,21	9,79
Ac. Linoleico (5)	48	ND	1,14	17,87	23,62	44,52	0,00	0,00	13,99	18,62
Ac. Oleico (1) +	24	7,04	0,76	8,66	19,91	50,12	0,00	0,00	21,30	29,18
Ac. Linoleico (4)	48	6,08	1,15	16,54	24,96	39,88	6,99	0,00	11,62	23,54
Ac. Oleico (2,5) +	24	7,13	0,74	5,29	17,52	50,91	9,44	0,00	16,84	28,08
Ac. Linoleico (2,5)	48	7,03	0,90	10,75	20,47	43,65	11,02	0,00	14,11	30,82
Ac. Oleico (4) +	24	7,13	0,27	3,89	16,10	54,10	17,43	0,00	8,49	25,02
Ac. Linoleico (1)	48	7,12	0,94	5,08	17,15	51,05	18,67	0,00	8,06	43,98
Ac. Oleico (5) +	24	7,14	0,55	0,00	15,84	57,83	26,34	0,00	0,00	36,87
Ac. Linoleico (0)	48	7,17	0,50	3,04	14,91	55,32	24,53	2,20	0,00	48,18
Ac. Linolênico (5)	24	6,79	0,66	16,16	71,53	12,30	0,00	0,00	0,00	36,87
	48	6,65	0,59	10,90	46,37	42,73	0,00	0,00	0,00	48,18
Óleo de Soja	24	7,26	0,61	3,27	14,44	52,37	14,85	0,00	15,08	16,93
	48	7,29	0,67	3,67	16,31	50,01	13,98	0,00	16,03	25,77

*Entre parênteses estão as proporções (v/v) de cada fonte de carbono empregada

No cultivo utilizando óleo de soja como fonte de carbono observou-se um acúmulo de PHA correspondendo a cerca de 25% da massa seca celular, valor este bastante semelhante

àquele obtido anteriormente (SILVA-QUEIROZ, 2003). A composição do polímero também não foi muito diferente daquele obtido anteriormente, com o 3-hidroxidecanoato (3HD) sendo o principal constituinte detectado. A análise revelou ainda a presença de um constituinte insaturado representando cerca de 15% dos monômeros detectados.

Quando o ácido linolênico foi fornecido, o teor de PHA atingiu quase 50% da massa seca celular e quantidades semelhantes de 3-hidroxi octanoato (3HO) e 3-hidroxidecanoato (3HD) foram detectadas. A partir deste ácido graxo esperava-se a incorporação de um monômero insaturado com doze carbonos (3HDd $\Delta^{6,9}$), entretanto, no cromatograma gerado pela análise por cromatografia gasosa, na região dos picos com 12 átomos de carbono (C12), observaram-se apenas dois pequenos picos (não integrados) que apresentavam tempo de retenção semelhante ao 3HDd e 3HDd Δ^5 , ou seja, provavelmente provenientes da biossíntese de ácidos graxos gerados a partir de acetil-CoA. Componentes insaturados com 8 e 10 carbonos também poderiam ser gerados a partir deste substrato, mas também não foram detectados.

Com o objetivo de analisar melhor como cada ácido graxo contribui para a formação de monômeros no PHA, *P. putida* IPT046 foi cultivada ainda na presença de diferentes proporções de ácido oleico (C18 Δ^9) e linoleico (C18 $\Delta^{9,12}$). Considerando a via de β -oxidação desses ácidos graxos, o ácido oleico seria precursor do 3-hidroxidodecanoato (3HDd) e o ácido linoleico precursor de 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDd Δ^6) (Tabela 7). A Figura 10-A demonstra que há uma correlação linear entre a concentração de ácido oleico fornecido e a fração molar de 3HDd no PHA sintetizado. Já para o ácido linoleico (Figura 10-B) observa-se um aumento linear inicial, mas uma saturação posterior, ou seja, a partir de uma dada concentração de ácido linoleico não se observa um aumento na quantidade de 3HDd Δ^6 no PHA sendo sintetizado. Observou-se um aumento no teor de PHA acumulado à medida que o ácido oleico representava uma parcela mais importante da fonte de carbono fornecida, indicando uma maior facilidade de metabolização desse substrato pela β -oxidação de ácidos graxos. Quando ácido oleico representava uma importante parcela do substrato fornecido, também foi detectada a presença do constituinte 3HDd Δ^5 , sempre presente em PHA produzido a partir de carboidratos (TIMM; STEINBÜCHEL, 1990; SANCHEZ *et al.*, 2003) (Figura 11). Este resultado sugere que, no cultivo em ácido oleico, a via de biossíntese de ácidos graxos pode assumir alguma importância na geração de monômeros para o PHA.

Anteriormente (SILVA-QUEIROZ, 2003), foi observado que o PHA produzido a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais por *P. putida* IPT046 difere daquele produzido a

Tabela 7 – Monômeros que podem ser gerados a partir da degradação dos diferentes ácidos graxos e glicerol

Constituintes formados que podem ser incorporados	
Glicerol	$3HHx \rightarrow 3HO \rightarrow 3HD \rightarrow 3HDd \rightarrow 3HTd \rightarrow 3HDd\Delta^5 \rightarrow 3HTd\Delta^7$
Ácidos graxos	
Octanóico (C8)	$3HO \rightarrow 3HHx$
Decanóico (C10)	$3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Dodecanóico (C12)	$3HDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Mirístico (C14)	$3HTd \rightarrow 3HDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Palmítico (C16)	$3HTd \rightarrow 3HDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Estearico (C18)	$3HTd \rightarrow 3HDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Oleico (C18Δ^9)	$3HTd\Delta^5 \rightarrow 3HDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Linoleico (C18$\Delta^{9,12}$)	$3HTd\Delta^{5,8} \rightarrow 3HDd\Delta^6 \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Linolênico (C18$\Delta^{9,12,15}$)	$3HTd\Delta^{5,8,11} \rightarrow 3HDd\Delta^{6,9} \rightarrow 3HDA\Delta^7 \rightarrow 3HO\Delta^5 \rightarrow 3HHx$
α-eleosteárico (C18$\Delta^{9,11,13}$)	$3HTd\Delta^{5,7,11} \rightarrow 3HDd\Delta^{5,7} \rightarrow 3HDA\Delta^5 \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$
Ricinoleico (C18;12 hidroxí -Δ^9)	$3,8dHTDA\Delta^5 \rightarrow 3,6dHDd \rightarrow 3HD \rightarrow 3HO \rightarrow 3HHx$

São apresentados monômeros que podem ser gerados a partir de diferentes ácidos graxos presentes em óleos vegetais (via de β -oxidação), bem como, monômeros que são gerados a partir da degradação do glicerol (via de síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA gerado). Em destaque estão os ácidos oleico e linoleico, bem como, o monômero 3HDd Δ^5 .

Figura 10 –Correlação entre o teor de 3HDd e 3HDd Δ^6 e os teores de ácidos oleico (A) e linoleico (B), respectivamente fornecidos ao cultivo de *P.putida*.

Figura 11. Cromatogramas dos polímeros sintetizados a partir de diferentes proporções de ácido oleico e linoleico.

partir de carboidratos no seguinte aspecto: enquanto 3HD é o principal constituinte gerado a partir de carboidratos (provavelmente decorrente da retirada deste constituinte nesse ponto da biossíntese de ácidos graxos e seu direcionamento para a síntese de PHA), os componentes 3HHx e 3HO ganham importância quando a via geradora dos 3HA é a β -oxidação. À medida que maior quantidade de ácido oleico foi fornecida em relação ao ácido linoleico observa-se uma tendência que confirma o que havia sido apresentado anteriormente, ou seja, que o ácido oleico é metabolizado mais facilmente e que a biossíntese de ácidos graxos ganha importância à medida que esse substrato é fornecido (Figura 12).

Figura12 – Variação do teor de 3HHx, 3HO e 3HD no polímero produzido, em função da concentração de ácido oleico fornecida.

5.1.1 Análise de fluxos metabólicos

Com o objetivo de avaliar melhor o que estaria ocorrendo nos diferentes cultivos em termos de fluxos metabólicos, foi proposto o modelo descrito na Figura 13, que apresenta o modelo metabólico para a síntese de PHA_{MCL} a partir de óleos vegetais.

Figura 13 - Modelo metabólico para síntese de PHA_{MCL} a partir de óleo vegetal

Observa-se que a partir de óleo vegetal, a avaliação de fluxos metabólicos seria interessante em 9 pontos diferentes. A seguir são comentadas as formas pelas quais o fluxo metabólico seria estimado em cada um dos pontos.

Fluxo 1. Pode ser estimado por determinação da composição de ácidos graxos do óleo vegetal, considerando-se a quantidade de óleo que foi alimentada e descontando-se a quantidade não consumida presente no meio de cultura. O fluxo 1 pode ser dividido em vários sub-fluxos correspondentes a cada um dos ácidos graxos, uma vez que os óleos vegetais possuem diversos ácidos graxos na sua composição.

Fluxo 2. O fluxo 2 é estimado com base na incorporação de componentes específicos ao PHA. Por exemplo, ácido linoleico levaria à formação de 3HDd Δ^6 e ácido linolênico levaria à formação de 3HDd $\Delta^{6,9}$. Alguns dos intermediários C12 podem ser sintetizados através de outros fluxos, por exemplo, 3HDd pode também ser sintetizado pela biossíntese de ácidos graxos (fluxo 6).

Fluxo 3. Pode ser estimado considerando-se o total de ácido graxo consumido e subtraindo-se a quantidade dirigida ao fluxo 2. Uma dificuldade aqui é ter uma boa estimativa do fluxo 2,

pois alguns dos monômeros também podem ser gerados em outras etapas metabólicas (por exemplo, fluxo 6).

Fluxos 4. A determinação do fluxo metabólico na direção da síntese destes monômeros (3HD, 3HO, 3HHx) não pode ser facilmente realizada, pois estes também podem ser gerados no fluxo 6.

Fluxo 5. Corresponde à acetil-CoA que foi gerada pela oxidação completa de ácidos graxos. Seria estimado considerando-se o consumo de ácidos graxos e descontando-se aqueles que foram incorporados ao PHA a partir de intermediários da β -oxidação através dos fluxos 2 e 4. Uma dificuldade aqui é ter uma boa estimativa dos fluxos 2 e 4.

Fluxo 6. Corresponde à síntese de monômeros incorporados ao PHA a partir da biossíntese de ácidos graxos, como ocorre na síntese de PHA a partir de carboidratos. Um monômero detectado no PHA é sintetizado exclusivamente através desta via e não pela β -oxidação (3HDd Δ^5). Assim, é possível fazer uma avaliação se este fluxo ocorre de maneira expressiva em diferentes situações, analisando-se a quantidade de 3HDd Δ^5 presente. Uma chave para resolver os problemas de estimativa de monômeros comuns deste fluxo e dos fluxos 2 e 4 talvez possa ser realizada considerando-se esse componente. Poderia se admitir que os outros componentes comuns guardam a mesma proporção daquela encontrada no PHA sintetizado a partir de carboidratos e com isso seria possível estimar os componentes comuns provenientes do fluxo 6 daqueles provenientes dos fluxos 2 ou 4. É claro que esta hipótese pode não corresponder plenamente à realidade, pois a retirada de intermediários da biossíntese de ácidos graxos e sua incorporação como componentes do PHA pode não acontecer da mesma forma que ocorre na síntese de PHA a partir exclusivamente de carboidratos, pois agora o ambiente intracelular também apresenta os outros componentes originados a partir dos intermediários da β -oxidação. Apesar desta situação, aceitar esta hipótese pode significar uma boa representação da situação real. Além disso, o uso de óleos vegetais com diferentes proporções de ácidos graxos ou ácidos graxos puros em diferentes proporções deverá revelar o quanto esta hipótese se distancia da realidade e permitirá o estabelecimento de uma partição de fluxos mais precisa.

Fluxo 7. Corresponde à acetil-CoA que foi oxidada no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Este fluxo pode ser avaliado em um sistema fazendo o balanço gasoso, ou seja estimando-se o CO₂ formado (Fluxo 8). Atualmente, estas determinações só podem ser realizadas em experimentos em biorreator.

Fluxo 8. Este fluxo é estimado pela análise do CO₂ formado, como já mencionado. Atualmente, este fluxo só pode ser analisado em experimentos em biorreator.

Fluxo 9. Este fluxo corresponde à conversão do glicerol em acetil-CoA e pode ser calculado considerando-se o total de óleo vegetal alimentado e quantidade de glicerol detectado no meio de cultura. Esta estimativa está baseada na idéia que os triglicérides fornecidos são rapidamente convertidos em ácidos graxos e glicerol.

Todas as proposições acima estão baseadas na hipótese que não há formação de outros subprodutos além de PHA e CO₂. Entretanto, esta hipótese poderá ser confirmada em experimento que se determinem todas as entradas (óleo vegetal, ácidos graxos, glicerol) e todas as saídas (todos os componentes do PHA e CO₂). Assim, foi realizada a análise de fluxos metabólicos nos diferentes cultivos utilizando os ácidos oleico e linoleico. Nessa análise, foram feitas as seguintes considerações:

1. Admitiu-se que todo o ácido graxo fornecido foi consumido, uma vez que ainda estão sendo implantadas metodologias para a análise de ácidos graxos.
2. Os valores de CO₂ formado não foram confirmados uma vez que os experimentos foram realizados em agitador rotativo.
3. A análise do fluxo foi simplificada uma vez que foram fornecidos apenas os ácidos graxos em diferentes proporções. Assim, não temos a liberação e utilização do glicerol.
4. O cálculo do fluxo metabólico na síntese *de novo* de ácidos graxos foi baseado na quantidade de 3HDd Δ^5 detectado.

Apesar de todas estas limitações que podem tornar os valores em si artificiais, consideramos que esta análise ainda tem um importante valor do ponto de vista comparativo. Ou seja, todos os cultivos foram analisados da mesma forma. A seguir são apresentados os fluxos obtidos (Figuras 14 a 18)

Figura 14. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) proposto a partir dos dados de cultivo de *P. putida* IPT 046 somente em ácido linoleico.

Figura 15. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) propostos a partir dos dados de cultivo de *P. putida* IPT 046 em ácido oleico e ácido linoleico (1:4)

Figura 16 Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) obtido de cultivo de *Pseudomonas* a partir de ácido oleico e ácido linoleico (2,5:2,5).

Figura 17. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) obtido de cultivo de *Pseudomonas* a partir de ácido oleico e linoleico (4:1).

Figura 18. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) obtido de cultivo de *Pseudomonas* a partir de ácido oleico somente (5:0).

As Figuras 19 e 20, que sintetizam os dados obtidos na análise de fluxos metabólicos das Figuras 14 a 18, apontam que a composição dos polímeros depende dos substratos fornecidos e que as vias metabólicas supridoras de monômeros podem contribuir de maneiras diferentes para a síntese do PHA como um todo. O fluxo total de 3HD foi sempre superior a qualquer dos outros monômeros. Entretanto, o fluxo desse monômero a partir da β -oxidação de ácidos graxos (Figura 19) é menor que o fluxo de 3HDd quando ácido oléico foi fornecido como única fonte de carbono. A incorporação mais eficiente do intermediário de 12 (3HDd) carbonos é bastante surpreendente, pois dados da literatura sugerem que a especificidade da PHA sintase é maior para monômeros contendo entre 8 e 10 carbonos (HUISMANN *et al.*, 1989). Este é um exemplo de como a compreensão do fluxo de intermediários no metabolismo celular pode contribuir de maneira decisiva para alterar a composição do PHA. Assim, caso seja conhecido como a composição do polímero interfere em suas propriedades, é possível a partir destes dados identificar a combinação de substrato para conseguir a síntese do polímero desejado (tailor made polymer).

É possível observar que o fluxo total de monômeros sendo incorporados ao PHA sintetizado pode ser decorrente da proporção dos diferentes substratos fornecidos (Figura 21). O fluxo máximo de síntese de PHA é obtido quando misturas de ácido oleico ou linoleico são fornecidas. Tanto quando apenas ácido oleico ou apenas ácido linoleico foram fornecidos o fluxo metabólico total de incorporação de monômeros ao PHA é diminuído. Assim, também

seria possível modular o fluxo total de PHA sendo sintetizado a partir da combinação de substratos fornecidos.

Figura 19. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) observado para os componentes provenientes da via de β -oxidação em diferentes concentrações de ácido oleico.

Figura 20. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) observado para os componentes provenientes da via de síntese *de novo* em diferentes concentrações de ácido oleico.

Figura 21. Fluxo metabólico ($\mu\text{mol/L.48 h}$) observado para via de síntese *de novo* e β -oxidação em diferentes concentrações de ácido oléico.

Os resultados obtidos nestes ensaios avançam referentes aos da literatura (item 2.6). Uma vez que, os trabalhos publicados até o momento, preocupam-se em demonstrar superficialmente a relação entre a variação de substratos fornecidos e monômeros específicos incorporados. A maioria dos autores não analisa a relação entre a quantidade de fonte de carbono fornecida e polímero acumulado. Os que fizeram esta análise utilizaram ácidos graxos caros. No entanto, a principal necessidade nesta área é produzir polímeros sob medida com baixo custo, e assim, a análise da incorporação de um determinado monômero variando-se a quantidade de um determinado substrato precursor torna-se fundamental, uma vez que, amplia as possibilidades de diferenciação deste polímero. Como dito anteriormente, os óleos vegetais apresentam até 70% dos ácidos oleico e linoleico em sua composição. Assim, estudo mais minucioso da incorporação de monômeros insaturados provenientes destes ácidos avança no sentido de corresponder as expectativas de se obter ferramentas para produzir polímero sob medida com baixo custo.

5.2 Produção de PHA a partir de diferentes óleos vegetais.

Foram realizados ensaios de produção de polímero a partir de óleos extraídos de 11 vegetais diferentes ou suas combinações utilizando as linhagens *P. putida* IPT046 e *Pseudomonas aeruginosa* IPT171.

Inicialmente, foi realizada análise dos óleos vegetais para obter dados sobre sua composição. Para análise por cromatografia gasosa, os ácidos graxos foram derivatizados (metilados) por duas metodologias diferentes. A primeira utilizava o composto HTMA (hidróxido de tetra metil amônio), que não se mostrou adequada, pois apesar de permitir análise de ácidos graxos livres, quando aplicada a óleos vegetais não permitia uma boa reprodutibilidade dos resultados. Estes resultados são provavelmente decorrentes do fato do processo de metilação ocorrer durante a injeção da amostra. A segunda metodologia utilizada consistia na transesterificação em presença de metanol e do reagente BF_3 . Nesse procedimento, a metilação é realizada previamente em banho-maria.

As composições de ácidos graxos obtidas para os óleos de algodão, arroz, coco, girassol, milho, soja e palma, embora não sejam exatamente iguais aos dados da literatura (DUBOIS *et al.*, 2007), apresentaram grande semelhança (Tabela 8).

Para o óleo de canola, observou-se uma grande diferença entre os dados da literatura e os resultados da análise. Esperava-se encontrar um alto teor de ácido oleico (aproximadamente 50%) e um teor de ácido linoleico que corresponderia à metade deste (aproximadamente 25%) (DUBOIS *et al.*, 2007). Entretanto, a composição de ácidos graxos foi muito semelhante àquela encontrada no óleo de soja ou milho, ou seja, cerca de 50% de ácido linoleico e 25% de ácido oleico.

Para o óleo de linhaça, também se observou uma diferença significativa na composição. Esperava-se cerca de 50-60% de ácido linolênico, entretanto, a análise por cromatografia gasosa revelou apenas cerca de 7%. Já o ácido linoleico, que deveria corresponder a cerca de 15%, foi detectado em concentrações elevadas (cerca de 60%).

Para os óleos de mamona e tungue, esperava-se encontrar dois componentes em quantidades elevadas que não estariam presentes nos demais óleos. No caso do óleo de mamona, o pico mais expressivo da análise cromatográfica apresentou o mesmo tempo de retenção do ácido linoleico. Assim, foi interpretado que este pico corresponderia a ácido ricinoleico, o que impediu a determinação da quantidade de ácido linoleico presente nesta

amostra. Além disso, a quantidade de ácido ricinoleico detectada foi bastante menor que aquela esperada com base na literatura, tendo ainda sido detectado o ácido oleico em quantidade muito maior que a esperada.

No caso do óleo de tungue, o pico mais expressivo da análise cromatográfica apresentou o mesmo tempo de retenção do ácido linolênico. Assim, foi interpretado que este pico corresponderia ao ácido α -eleosteárico, o que impediu de determinar a quantidade de ácido linolênico presente nesta amostra. Além disso, a quantidade de ácido α -eleosteárico detectada foi bastante menor que aquela esperada com base na literatura, tendo ainda sido detectados os ácidos oleico e linoleico em quantidades muito maiores que as esperadas.

Tabela 8. Composição de óleos vegetais obtida por análise de cromatografia gasosa.

Óleos Vegetais	Composição de ácidos graxos (% m/m)										
	C8	C10	C12	C14	C16	C18	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1*	C18:3*
Algodão	0,00	0,00	0,00	0,27	14,64	3,78	21,77	55,08	4,46	0,00	0,00
Arroz	0,00	0,00	0,00	0,00	16,79	3,96	36,99	39,77	2,49	0,00	0,00
Canola	0,22	0,26	4,05	1,55	11,60	3,97	20,65	51,32	6,38	0,00	0,00
Coco	2,21	2,63	43,15	16,32	9,68	3,71	18,94	3,33	0,04	0,00	0,00
Girassol	0,00	0,00	0,00	0,08	8,95	4,16	20,70	62,42	3,70	0,00	0,00
Linhaça	0,00	0,00	0,00	0,00	11,29	3,26	21,29	57,30	6,86	0,00	0,00
Mamona	0,00	0,00	0,00	0,00	10,66	6,55	27,74	?	5,35	49,71	0,00
Milho	0,13	0,15	2,37	0,91	11,38	3,93	24,83	50,84	5,45	0,00	0,00
Palma	0,02	0,02	0,25	0,82	41,42	4,99	42,35	9,89	0,24	0,00	0,00
Soja	0,00	0,00	0,00	0,00	11,16	3,73	24,46	54,87	5,78	0,00	0,00
Tungue	0,00	0,00	0,00	0,00	8,63	6,52	22,75	19,41	?	0,00	42,69

C8 – ácido octanóico, C10 – ácido decanóico, C12 – ácido láurico, C14 – ácido mirístico, C16 – ácido palmítico, C18 – ácido esteárico, C18:1 – ácido oleico, C18:2 – ácido linoleico, C18:3 – ácido linolênico, C18:1* – ácido ricinolêico, C18:3* – ácido α -eleosteárico. ? – valores não determinados.

Os resultados obtidos de produção de PHA a partir de óleos vegetais ou suas combinações estão apresentados nas Tabelas 9 e 10, respectivamente, para *P. putida* IPT046 e *P. aeruginosa* IPT171.

Foi observado um acúmulo muito mais expressivo de PHA pela linhagem IPT046 do que pela linhagem IPT171. Enquanto *P. putida* IPT046 atingiu até 62% da massa seca celular como PHA, os valores obtidos com *P. aeruginosa* IPT171 foram inferiores a 20%.

Para avaliar a interferência do metabolismo de cada uma das bactérias na composição do PHA produzido, foram construídos gráficos correlacionando a fração molar de um determinado monômero detectado no PHA produzido por uma bactéria em relação à fração molar do mesmo monômero no PHA produzido pela outra quando o mesmo óleo ou mistura foi fornecido (Figura 22).

Tabela 9. Produção de PHA por *P. putida* IPT046 a partir de diferentes óleos vegetais ou combinações destes.

Óleos	MSC (g/L)	Composição PHA (mol%)								PHA (%MSC)	Xr (g/L)
		3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	3HDdΔ ^{5,7}	3HDdΔ ⁵	3HDdΔ ⁶		
Algodão	2,90	0,9	5,0	22,6	45,3	9,1	0,0	3,1	14,0	48,63	1,49
Arroz 50%/Milho 50%	5,40	0,8	5,6	23,7	48,8	8,1	0,0	3,6	9,4	43,20	3,07
Arroz	3,97	0,9	5,1	23,7	49,1	10,7	0,0	2,8	7,8	40,40	2,37
Canola	4,00	0,4	4,8	24,8	44,8	15,6	0,0	2,8	6,8	19,81	3,21
Côco	4,98	0,6	5,6	26,8	49,1	16,0	0,0	1,5	0,4	56,70	2,16
Girassol 80%/Soja 20%	5,25	1,3	6,5	25,8	47,4	6,2	0,0	2,8	9,9	36,20	3,35
Girassol	3,95	1,0	5,6	24,0	47,3	6,9	0,0	3,4	11,7	26,06	2,92
Linhaça 25%/Algodão 75%	4,39	1,1	6,8	27,5	45,7	6,4	0,0	3,2	9,3	44,08	2,46
Linhaça 40%/Algodão 60%	5,78	1,0	6,4	25,8	47,0	6,8	0,0	3,3	9,6	42,67	3,32
Linhaça 50%/Algodão 50%	4,96	0,9	6,4	25,8	46,1	7,2	0,0	3,5	10,1	45,84	2,69
Linhaça 70%/Algodão 30%	5,18	0,9	6,1	24,9	46,4	7,1	0,0	3,9	10,7	46,89	2,75
Linhaça 80%/Algodão 20%	5,05	1,0	6,5	26,4	46,9	6,2	0,0	3,3	9,7	45,32	2,76
Linhaça	5,06	0,9	6,3	25,9	46,8	6,2	0,0	3,5	10,5	41,59	2,96
Mamona	3,06	1,3	6,9	31,4	53,9	3,0	0,0	1,6	1,9	41,54	1,79
Milho	4,51	1,3	6,2	25,0	45,7	8,3	0,0	3,4	10,1	41,91	2,62
Palma 15%/Canola 85%	5,28	0,6	4,9	24,2	49,8	9,3	0,0	3,5	7,7	62,19	2,00
Palma 50%/Soja 50%	5,00	1,3	8,6	28,9	46,2	7,9	0,0	2,5	4,6	25,45	3,73
Palma 80%/Mamona 20%	5,12	0,7	5,8	26,2	50,2	12,6	0,0	2,1	2,4	49,12	2,61
Palma	5,29	0,7	5,8	25,7	51,0	13,1	0,0	1,8	1,9	52,34	2,52
Soja	3,02	1,0	6,2	25,0	46,0	7,2	0,0	3,5	11,0	42,88	1,73
Tungue	3,27	0,2	4,2	22,5	48,1	8,1	5,5	8,4	2,9	17,57	2,70

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxi octanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato;

3HDd – 3-hidroxidodecanoato; 3HDdΔ^{5,7} – 3-hidroxi-5,7-dodecenoato; 3HDdΔ⁵ – 3-hidroxi-5-dodecenoato; 3HDdΔ⁶ – 3-hidroxi-6-dodecenoato.

PHA – polihidroxialcanoato; Xr – biomassa residual.

Tabela 10. Produção de PHA por *P. aeruginosa* IPT 171 a partir de diferentes óleos vegetais ou combinações destes.

Óleos	MSC (g/L)	Composição PHA (mol%)								PHA (%MSC)	Xr (g/L)
		3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	3HDdΔ ^{5,7}	3HDdΔ ⁵	3HDdΔ ⁶		
Algodão	2,58	0,88	3,60	33,27	45,64	9,86	0,00	2,33	4,42	11,51	2,29
Arroz 50%/Milho 50%	2,69	0,83	3,28	30,51	48,96	9,46	0,00	3,16	3,80	14,15	2,31
Arroz	2,49	0,76	3,49	28,14	50,65	11,32	0,00	2,69	2,96	16,62	2,08
Canola	4,61	0,00	4,24	34,36	44,57	9,68	0,00	2,47	4,69	6,80	4,30
Côco	2,40	1,05	4,87	44,07	35,02	14,99	0,00	0,00	0,00	18,45	1,96
Girassol 80%/Soja 20%	2,61	0,88	3,75	30,69	46,73	9,06	0,00	3,28	5,59	13,79	2,25
Girassol	2,69	0,94	3,72	35,11	43,57	9,95	0,00	1,47	5,25	11,78	2,38
Linhaça 25%/Algodão 75%	2,66	1,01	4,46	40,47	35,84	9,83	0,00	1,91	6,49	13,94	2,29
Linhaça 40%/Algodão 60%	2,43	1,11	4,90	38,65	35,72	9,72	0,00	3,18	6,71	13,03	2,12
Linhaça 50%/Algodão 50%	2,58	2,28	4,31	38,55	37,51	10,30	0,00	1,55	5,51	11,05	2,30
Linhaça 70%/Algodão 30%	2,72	0,00	4,87	34,95	41,67	9,22	0,00	3,31	5,98	10,95	2,43
Linhaça 80%/Algodão 20%	2,72	0,00	5,06	35,35	42,93	10,55	0,00	1,35	4,76	8,38	2,50
Linhaça	2,67	1,12	4,38	38,92	37,53	9,19	0,00	2,87	5,99	12,53	2,34
Mamona	2,19	0,00	4,87	29,07	38,32	18,56	0,00	3,59	5,60	6,22	2,06
Milho	2,03	0,00	3,88	33,39	49,17	9,39	0,00	2,82	1,35	10,76	1,81
Palma 15%/Canola 85%	2,30	0,76	3,63	35,12	41,24	11,90	0,00	3,11	4,23	11,04	2,05
Palma 50%/Soja 50%	3,28	0,77	3,73	33,64	46,67	10,99	0,00	2,10	2,08	15,25	2,78
Palma 80%/Mamona 20%	4,07	0,64	3,24	31,30	50,01	12,62	0,00	1,62	0,56	15,93	3,42
Palma	2,73	0,00	4,12	37,14	41,89	13,88	0,00	1,42	1,56	17,29	2,26
Soja	4,97	0,00	3,70	30,12	50,85	9,23	0,00	2,52	3,58	6,05	4,67
Tungue	2,96	1,09	5,30	29,38	42,43	6,05	0,00	9,80	5,95	6,47	2,77

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato; 3HHx – 3-hidroxihexanoato; 3HO – 3-hidroxiocetanoato; 3HD – 3-hidroxidecanoato;
 3HDd – 3-hidroxidodecanoato; 3HDdΔ^{5,7} – 3-hidroxi-5,7-dodecenoato; 3HDdΔ⁵ – 3-hidroxi-5-dodecenoato; 3HDdΔ⁶ – 3-hidroxi-6-dodecenoato.
 PHA – polihidroxialcanoato; Xr – biomassa residual.

Foram observadas diferenças na composição do PHA produzido pelas duas bactérias quando cultivadas no mesmo óleo vegetal (Figura 22). Observou-se uma tendência de incorporação mais eficiente de 3HO e 3HDd na linhagem IPT171 em comparação a IPT046 (Figuras 22-B e 22-D). Por outro lado, o sistema de biossíntese de PHA da linhagem IPT046 foi mais eficiente na incorporação de 3-hidroxihexanoato (3HHx) e 3-hidroxi-6-dodecenoato (3HDd Δ^6) (Figuras 22-A e 22-F). Para 3HD e 3HD Δ^5 , não se observou diferença na eficiência de incorporação destes monômeros pelo sistema de biossíntese das duas linhagens avaliadas (Figuras 22-C e 22-E). Na Figura 22-G observa-se uma maior eficiência na incorporação de monômeros insaturados pelo sistema de biossíntese de PHA de *P. putida* IPT046 quando comparada a *P. aeruginosa* IPT171. Uma vez que, nenhuma diferença entre a especificidade de *PHA sintase* foi detectada até o momento (REF), estes resultados provavelmente refletem diferenças nos sistemas biológicos de biossíntese de PHA nessas espécies de *Pseudomonas*. Rehm *et al.* (1998) demonstrou que ao se deletar o gene *phaG*, a biossíntese de PHA em *P. putida* era completamente abolida, enquanto que *P. aeruginosa* ainda era capaz de produzir PHA (Rehm *et al.*, 1998; Hoffmann *et al.*, 2000). Estes dados sugerem a existência de outra(s) enzima(s) que pode(m) contribuir na transferência de intermediários da síntese de ácidos graxos para a biossíntese de PHA em *Pseudomonas aeruginosa*. A observação de que mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* afetados nos genes *phaG* ou *rhlG* produziram PHA com diferentes composições a partir de ácido glucônico (Rehm *et al.*, 2001) corrobora essa hipótese. *E. coli* recombinante portando o gene *rhlG*, apresentaram um aumento da produção de PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos, de modo que o produto do gene *rhlG* deve também contribuir para a canalização de intermediários da β -oxidação para biossíntese de PHA (Park *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2005). Desde que, genes homólogos a *rhlG* não foram detectados no genoma de *P. putida* (www.ncbi.nlm.nih.gov), a presença desse gene no genoma de *Pseudomonas aeruginosa* poderia explicar pelo menos parte das divergências sobre a composição do PHA produzido por estas duas espécies de *Pseudomonas*.

Figura 22. Comparação entre a composição de monômeros nos PHA sintetizados por *P. putida* IPT046 e *P. aeruginosa* IPT171. Cada ponto representa a fração molar de cada monômero no PHA acumulado por uma bactéria em relação à outra quando um mesmo óleo ou mistura foi oferecido.

No PHA produzido a partir do óleo de tungue por *P. putida* IPT046, foi observado um pico na análise cromatográfica com tempo de retenção próximo da região na qual são detectados monômeros com 12 carbonos não detectado nos PHA produzidos a partir de qualquer dos outros óleos. Uma vez que o óleo de tungue apresentaria em sua composição o ácido α -eleostearico, este pico foi considerado como correspondendo ao propil éster de 3-hidroxi-5,7-dodecenoato (3HDd $\Delta^{5,7}$), que seria gerado pela β -oxidação daquele ácido graxo. Este componente não foi detectado no PHA produzido por *P. aeruginosa* IPT171.

O monômero 3-hidroxi-5-dodecenoato (3HDd Δ^5) é produzido pela síntese de ácidos graxos (HUIJBERTS *et al.*, 1992), sendo normalmente detectado nos PHA produzidos a partir de carboidratos (SANCHEZ *et al.*, 2003), bem como outras fontes de carbono que são metabolizadas a acetil-CoA. Para todas as amostras de óleo foi observada a presença deste monômero, provavelmente decorrente da síntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA derivados da β -oxidação de ácidos graxos ou da oxidação do glicerol proveniente dos triglicérides. No PHA produzido a partir de carboidratos por *P. putida* IPT046, foram detectados cerca de 4-5 mol% desse monômero (SANCHEZ *et al.*, 2003). Utilizando óleo de tungue, observou-se um teor significativamente maior de 3HDd Δ^5 , tanto para linhagem IPT046 quanto para IPT171 quando comparado aos demais óleos. O valor observado é mesmo maior que aquele obtido no PHA produzido a partir de carboidratos. Estes resultados são surpreendentes e sugerem a presença de um ácido graxo no óleo de tungue que seria precursor deste monômero, uma vez que a fração molar observada não poderia ser explicada considerando sua síntese apenas a partir de acetil-CoA. TSUZUKI e colaboradores (2003) verificaram a presença de ácido 9,11-octadecenoico no fígado e lipídios plasmáticos de ratos alimentados com ácido α -eleostearico. Se essa conversão também ocorrer em bactérias, a metabolização subsequente do ácido 9,11-octadecenoico pelo ciclo de β -oxidação levaria à formação do monômero 3HDd Δ^5 .

Com o objetivo de verificar a possibilidade de modular a composição do PHA produzido a partir de diferentes óleos ou misturas, foi correlacionada a quantidade de ácidos graxos suprida e a composição do PHA obtido (Figuras 23 a 28).

Foi obtida uma correlação linear entre a concentração de ácido linoleico suprida e a fração molar de 3HDd Δ^6 , tanto para a linhagem *P. putida* IPT046 como para *P. aeruginosa* IPT171 (Figuras 23 e 26). Em média, a linhagem *P. putida* IPT046 mostrou-se mais eficiente (o dobro da eficiência) na incorporação de 3HDd Δ^6 a partir das mesmas quantidades de ácido linoleico supridas, com base nos coeficientes angulares de ajuste das retas.

Nos resultados de acúmulo de PHA por *P. putida* IPT 046 a partir dos ácidos oleico e linoleico, verificou-se que a fração molar de 3HDdΔ⁶ no PHA acumulado variou com a quantidade de ácido linoleico suprida até o patamar de 15 mol%, atingido com o fornecimento de 2,5 g/L de ácido linoleico. Fornecendo-se maiores quantidades de ácido linoleico (até 5 g/L), não se obteve PHA contendo uma fração molar de 3HDdΔ⁶ maior. No entanto, neste experimento, o acúmulo se deu a partir de a partir de diferentes óleos vegetais ou combinações destes. Considerando a composição dos ácidos graxos dos óleos vegetais, foram realizados experimentos nos quais se forneceu até 5 g/L de ácido linoleico, entretanto, observou-se uma variação na fração molar de 3HDdΔ⁶ com a quantidade de ácido linoleico suprido aproximadamente linear, atingindo-se até 14 mol% de 3HDdΔ⁶ (Figuras 23 e 26). Uma vez que o ácido linoleico deve ser inicialmente liberado do triglicéride para então ser utilizado pela célula, temos um sistema dinâmico de liberação dos ácidos graxos e consumo destes pela célula que são fatores que determinam a concentração deste ácido graxo disponível no meio de cultura. Assim, embora tenha se fornecido a quantidade de 5 g/L de ácido graxo na constituição do óleo vegetal, a concentração de ácido linoleico disponível para a célula ao longo do cultivo pode ser muito inferior a esse valor.

Também foi obtida uma correlação linear quando analisada a presença dos monômeros insaturados e os ácidos graxos precursores destes monômeros supridos nos óleos vegetais (Figuras 24 e 27). Portanto, a quantidade de monômeros insaturados pode ser modulada em função do óleo vegetal fornecido, tendo sido obtidos PHA contendo de 0 a 17 mol% destes monômeros. Deve-se destacar que foram analisados apenas monômeros insaturados contendo 12 átomos de carbono. No entanto, é possível que monômeros com 14 átomos de carbono também tenham sido incorporados ao PHA formado. Desta maneira, a fração molar de monômeros insaturados pode ser ainda maior.

Foi analisada ainda a correlação entre a quantidade de ácidos graxos precursores de monômeros saturados supridos e a fração molar de monômeros saturados observados (Figuras 25 e 28). Inicialmente, observa-se um aumento praticamente linear na quantidade de monômeros saturados à medida que se fornece mais ácidos graxos precursores destes. Entretanto, há uma tendência para a estabilização no valor de 97-98 mol%. Este resultado era esperado uma vez que a formação de 3HDdΔ⁵ pela biossíntese de ácidos graxos estará sempre contribuindo para a composição do PHA sintetizado,

independentemente do fornecimento de um ácido graxo precursor de monômeros insaturados.

Todos os dados apresentados reforçam a possibilidade de modular o PHA sintetizado a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos. Como relatado anteriormente, a possibilidade de modular estes polímeros amplia as perspectivas de aplicação, uma vez que as propriedades físicas são diferenciadas pela sua composição.

Figura 23. Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprido e a fração molar de 3HDΔ⁶ detectado no PHA produzido por *P. putida* IPT046.

Figura 24. Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros insaturados e a fração molar destes no PHA produzido por *P. putida* IPT046.

Figura 25. Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros saturados e a fração molar destes no PHA produzido por *P. putida* IPT046.

Figura 26. Correlação entre a concentração de ácido linoleico suprido e a fração molar de 3HDDΔ⁶ detectado no PHA produzido por *P. aeruginosa* IPT171.

Figura 27. Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros insaturados e a fração molar destes no PHA por *P. aeruginosa* IPT171.

Figura 28. Correlação entre a concentração de ácidos graxos precursores de monômeros saturados e a fração molar destes no PHA por *P. aeruginosa* IPT171.

5.3. Produção de PHA a partir de óleos vegetais e caracterização de monômeros por espectrometria de massa.

A linhagem *Pseudomonas putida* IPT 046 foi cultivada nos óleos de milho, arroz, girassol e soja com o objetivo de produzir maiores quantidades de PHA. O polímero foi extraído com clorofórmio e precipitado com etanol. O PHA purificado foi submetido a propanólise e analisado por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa. O objetivo desta análise era confirmar a estrutura química dos monômeros detectados, sobretudo daqueles contendo insaturações, para os quais não existem padrões disponíveis. Entre estes havia um interesse especial na confirmação do monômero 3HDdΔ⁶, pois nos experimentos de produção de PHA, seja a partir de ácidos graxos, seja a partir de óleos vegetais, se observou uma boa correlação entre a quantidade de ácido linoleico oferecido a bactéria e a fração molar desse monômero detectada no PHA produzido.

Nestes experimentos foi utilizado o PHA produzido por *P. putida* IPT 046 a partir de carboidratos como referência. Espectrogramas de massa típicos de cada um dos monômeros (3HHx, 3HO, 3HD, 3HDd, 3HDdΔ⁵ e 3HDdΔ⁶) podem ser vistos no Anexo 1.

A confirmação que os picos observados por cromatografia gasosa realmente correspondiam a propil-ésteres de 3-hidroxiácidos foi facilmente obtida, uma vez que foram identificados picos correspondendo à clivagem α ao grupo funcional hidroxil (relação massa-carga dos íons, m/e 131). Evidências adicionais de que se tratavam de 3-hidroxiácidos na análise foram a detecção dos subfragmentos com m/e 89 e m/e 43, resultantes da clivagem do fragmento com m/e 131, que libera propil e ácido 3-hidroxipropiônico.

As melhores evidências compatíveis com a característica de cada um dos monômeros foram os picos com m/e correspondendo M-87, equivalentes a m/e 115 (3HHx), 143 (3HO), 171 (3HD), 197 (3HDd Δ^5), 197 (3HDd Δ^6) e 199 (3HDd). A análise dos picos M-87 não permite diferenciar os monômeros 3HDd Δ^5 e 3HDd Δ^6 . Entretanto, estes componentes são claramente separados pela cromatografia gasosa, pois apresentam tempos de retenção distintos.

Na literatura foi descrito um método para análise de PHA contendo monômeros saturados e insaturados no qual foi aplicada, após metanólise do PHA, uma segunda derivatização com trimetilsilil (LEE; CHOI, 1995). Os autores concluíram que essa seria uma estratégia eficiente para a determinação da estrutura do PHA. Os propil-ésteres submetidos a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS) foram também derivatizados utilizando a metodologia descrita por Lee e Choi (1995). Não se observou diferenças nos espectrograma de massa obtidos com ou sem derivatização com trimetilsilil, além disso, foi possível identificar fragmentos com massa característica de cada um dos monômeros. Desta forma, o uso da propanólise, independentemente da segunda derivatização, também se mostrou adequado para caracterização dos monômeros presentes no PHA produzido.

5.4. Obtenção de mutantes afetados no metabolismo de ácidos graxos.

5.4.1 Construção da biblioteca de mutantes

O transposon mini-Tn5lacZ (contendo o gene codificador de resistência a canamicina) foi inserido em *P. putida* IPT 046 após conjugação com *E. coli* S17-1 λ -pir portando o plasmídeo pUTKm2 (de Lorenzo *et al.*, 1990). Clones contendo o transposon foram selecionados em meio mineral com glicose e canamicina (MMGK). O tamanho

do genoma de *P. putida* corresponde a 6.181.863 Kb contendo 5420 ORFs (Nelson *et al.*, 2002). Com a finalidade de obtermos uma biblioteca representativa, foram isolados aproximadamente 7000 mutantes.

O banco de mutantes por transposon pUTKm2 foi utilizado para selecionar mutantes que apresentaram deficiência no crescimento ou mostraram uma maior expressão do gene *lacZ* quando cultivados em meio mínimo contendo ácido graxo insaturado (ácido 4-pentenóico).

5.4.2 Seleção de mutantes deficientes no crescimento a partir de ácido graxo insaturado

As linhagens mutantes do banco foram transferidas em placas de Petri contendo meio mineral com ácido 4-pentenóico (MM4P), ácido valérico (MMV), bem como glicose e canamicina (MMGK) Ambos ácidos graxos contêm 5 átomos de carbono, sendo o primeiro insaturado e o segundo seu correspondente saturado. Seriam selecionados mutantes deficientes no crescimento a partir de MM4P e que crescessem normalmente em MMV. Esperava-se obter mutantes deficientes na produção de 2,4-dienoil-CoA redutase, já que esta é a enzima requerida na oxidação de ácidos graxos contendo insaturações estendendo-se de um carbono par para ímpar (ácido 4-pentenóico – C5 Δ^4).

Nessa seleção, foi possível identificar 17 clones afetados no metabolismo de ácidos graxos. A Tabela 11 apresenta o perfil de crescimento dos mutantes nos meios testados. Houve variação na intensidade de crescimento em MM4P entre os mutantes (de – até ++). Esses resultados podem indicar que genes diferentes estejam afetados nestes mutantes, e nesse caso, outros genes teriam papel relevante para o crescimento utilizando ácidos graxos com insaturações estendendo-se de carbono par para ímpar, além da 2,4 dienoil-CoA redutase. Outra possibilidade é que genes envolvidos na regulação da expressão tenham sido alterados pela inserção do transposon ou ainda que o gene que codifica para 2,4-dienoil-CoA redutase foi apenas parcialmente afetado.

O mutante AM1 (Tabela 11) não foi capaz de crescer em meio mineral contendo ácido 4-pentenóico como única fonte de carbono, entretanto, também não foi capaz de crescer com ácido valérico. Estes resultados sugerem que AM1 pode estar afetado no metabolismo de ácidos graxos em geral.

Tabela 11– Perfil de crescimento dos mutantes de *P. putida* IPT046 em ácido valérico e ácido 4- pentenóico.

Linhagens	MMGK	MM4P	MMV
<i>P. putida</i> IPT046	-	++++	++++
AG46	++++	++	+++
AK1	++++	++	+++
AM1	++++	-	-
BG45	+++	+	+++
BJ5	+++	+	++++
CF12	+++	+	+++
CM29	+++	-	++++
CM51	+++	-	+++
CN25	++++	++	++++
CR4	++++	-	++++
DG45	+++	+	+++
DM26	+++	+	+++
DR52	+++	+	+++
DU54	++++	-	++++
DW4	++++	+	+++
DX38	++++	+	+++
EB50	++++	-	+++

MMGK-meio mineral com glicose e canamicina; MMV – meio mineral com ácido valérico; MM4P – meio mineral com ácido 4-pentenóico; -sem crescimento +, ++, +++, ++++ intensidades de crescimento

5.4.3 Detecção de mutantes com maior expressão do gene *lacZ*

Com a biblioteca de mutantes por transposon de *P. putida* IPT046 completa, uma segunda abordagem dos mutantes pôde ser realizada. Na primeira abordagem, descrita acima, foram analisados os mutantes deficientes na oxidação de ácidos graxos insaturados seja porque foram afetados em genes codificando para enzimas desse metabolismo ou genes envolvidos na regulação da expressão desses. Diferentemente desta abordagem, a partir da análise por expressão do gene *lacZ* existe a possibilidade de se avaliar os genes que apresentam uma expressão aumentada na presença de ácido 4 pentenóico quando comparada à expressão na presença do ácido valérico, ou seja, é possível analisar os genes que são induzidos nessa condição. Isto porque o gene *lacZ* que está presente no transposon mini*Tn5* (Figura 29) não possui promotor próprio, assim a expressão do gene da β -galactosidase é dependente do promotor presente na região do genoma onde o mini*Tn5* se inseriu (de LORENZO *et al.*, 1990).

Figura 29 - Esquema de inserção do transposon mini-Tn5

Fonte: Braz (2006)

A varredura da biblioteca neste caso foi realizada adicionando-se sobre as colônias crescidas em MMV, MM4P e MMGK agar semi-sólido (0,3% agar) contendo 0,3 mg/mL de X-Gal. Após 1 hora de incubação, foram escolhidas as linhagens que apresentaram aumento da expressão do gene *lacZ* em MM4P e que apresentavam menor ou nenhuma expressão em MMV e MMGK (Figura 30). Desta forma, seriam selecionados genes que são ativados especificamente quando o ácido 4-pentenóico é fornecido.

Nesta varredura da biblioteca, foram selecionados 14 mutantes. Treze mutantes apresentaram colônias azuis quando cultivados em meio mineral contendo ácido graxo insaturado (ácido 4-pentenóico) e colônias brancas quando cultivados em ácido graxo saturado (ácido valérico) ou MMGK. Um mutante apresentou colônias azuis quando cultivado em ácido valérico e MMGK, no entanto, com uma intensidade na coloração muito menor que no cultivo contendo ácido insaturado (MM4P). Este mutante também foi selecionado uma vez que o transposon deve ter se inserido na frente de um promotor reprimido especificamente na presença de ácido 4-pentenóico.

Estes são resultados de grande valor para o estudo de genes que são ativados ou reprimidos na presença de ácido graxo insaturado. Estudos futuros utilizando estes mutantes permitirão identificar genes que apresentam sua expressão regulada na presença do ácido 4-pentenóico e, desta forma, sofisticar o modelo metabólico de oxidação de ácidos graxos insaturados em *P. putida* IPT 046. Espera-se com essa compreensão poder estabelecer novas estratégias que permitam um controle ainda maior sobre a geração de monômeros insaturados e sua incorporação ao PHA.

Figura 30 – Expressão do gene *lacZ* em mutantes por transposon de *P. putida* IPT046 cultivados em (A) MM4P; (B) MMV e (C) MMGK.

5.4.4. Avaliação da produção de PHA por mutantes deficientes na utilização de ácidos graxos insaturados

A linhagem selvagem IPT046 bem como os mutantes afetados no metabolismo de ácido 4-pentenóico foram cultivados com ácido oleico e linoleico comerciais, ou uma mistura destes (Tabela 12). Deve-se destacar que esses ácidos graxos são comerciais e, portanto, apresentam outros ácidos graxos em sua composição. Por exemplo, o ácido linoleico utilizado apresenta apenas 60% de ácido linoleico e o restante de sua composição corresponde a outros ácidos graxos, dentre os quais, o ácido oleico. Da mesma forma, o ácido oleico comercial apresenta em sua composição ácido linoleico, mesmo que em menor quantidade.

A linhagem selvagem (IPT 046) acumulou cerca de 10, 20 e 50% da biomassa na forma de PHA, respectivamente, nos cultivos utilizando ácido oleico, ácido linoleico e a mistura destes. O acúmulo de menores quantidades de PHA quando quantidades maiores de ácido linoleico foi suprida é compatível com os efeitos inibitórios observados anteriormente neste trabalho. A pequena quantidade de PHA acumulada a partir de ácido oleico pode ter sido decorrente da redução mais drástica no pH. A composição monomérica é coerente com experimentos anteriores. Por exemplo, o ácido oleico é precursor do monômero 3HDd e observa-se uma clara correlação entre a quantidade de ácido oleico suprida e fração molar deste monômero no polímero. O

ácido linoleico é precursor do monômero 3HDd Δ^6 , e observa-se também uma correlação entre a quantidade de ácido linoleico suprida e a fração molar de 3HDd Δ^6 no PHA. Nos PHA produzidos pela linhagem selvagem também foi detectada a presença do monômero 3HDd Δ^5 , gerado a partir da biossíntese de ácidos graxos. Observa-se também que quanto maior a quantidade de ácido oleico suprida, maior a fração molar deste constituinte no polímero. Anteriormente, foi observado que na presença de quantidades mais elevadas de ácido oleico, a biossíntese de ácidos graxos apresentava uma maior participação na geração de monômeros para biossíntese de PHA (item 5.1). Assim, o ácido oleico deve ser mais rapidamente metabolizado no ciclo de β -oxidação gerando acetil-CoA que é direcionado para a biossíntese de ácidos graxos. Esses resultados são compatíveis com a operação simultânea das vias de degradação e biossíntese de ácidos graxos, sugerindo que se houver uma regulação semelhante aquela desempenhada por FadR em *E. coli* (DIRUSSO *et al.*, 1999; FUJITA *et al.*, 2007) em *Pseudomonas* esta regulação não é tão rigorosa, permitindo que a biossíntese de ácidos graxos ainda ocorra. A ausência de uma regulação desse tipo em *Pseudomonas* torna o sistema mais flexível permitindo alterar a composição do PHA não apenas pelo suprimento de diferentes ácidos graxos, mas também pela combinação com substratos que são facilmente metabolizados a acetil-CoA, como carboidratos ou glicerol, dentre outras fontes de carbono. Entretanto, estudos adicionais serão necessários para se estabelecer se nenhuma regulação ocorre ou se esta é apenas parcial.

O acúmulo de PHA pelos mutantes ocorreu de maneira bastante variável, o teor de PHA detectado atingiu até cerca de 35% da biomassa. O mutante AM1, embora não tenha sido capaz de crescer em ácido valérico ou ácido 4-pentenóico, ainda foi capaz de acumular PHA a partir de ácidos graxos. Este mutante pode estar afetado apenas no consumo de ácidos graxos de cadeia curta.

Alguns dos mutantes eram incapazes de crescer em ácido 4-pentenóico, embora ainda permanecessem capazes de crescer em ácido valérico (CM29, CM51, CR04, DU54 e EB50). Estes mutantes demonstraram boa capacidade de acumular PHA a partir de ácidos graxos, atingindo até 35% da massa seca celular. O mutante CR4 apresentou frações de 3HDd Δ^6 no PHA superiores aos valores observados para linhagem selvagem, indicando uma maior eficiência de conversão do ácido linoleico em monômeros 3HDd Δ^6 , sugerindo que este mutante pode estar afetado na utilização de intermediários

da β -oxidação de ácidos graxos contendo insaturações que se estendem de carbono par para ímpar.

Outros mutantes foram capazes de crescer em ácido 4-pentenóico, entretanto, em menor intensidade que a linhagem selvagem. Para esses mutantes não foram observadas diferenças expressivas na fração molar de 3HDd Δ^6 detectada no PHA quando comparados à linhagem selvagem. Esses resultados em conjunto demonstram que é possível obter mutantes incapazes de crescer em ácido 4-pentenóico que não apresentam modificação no metabolismo do ácido linoleico. Esses mutantes podem estar afetados especificamente em genes para a metabolização de ácidos graxos insaturados de cadeia curta.

Tabela 12 – Composição monomérica de PHA acumulados por *P. putida* e seus mutantes quando cultivados em presença de ácido oleico e linoleico comerciais, ou uma mistura destes

Amostra	Biomassa (g/L)	pH	3Hx (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol)%	3HDd (mol%)	3HDdΔ⁶ (mol%)	3HDdΔ⁵ (mol%)	%PHA
IPT046 oleico	2,56	5,43	5,64	30,12	34,03	23,17	2,31	4,74	9,54
IPT046 linoleico	3,22	6,43	7,50	32,90	40,35	8,80	7,75	2,69	20,46
IPT046 O:L	ND	6,42	6,89	30,53	38,74	14,58	5,46	3,80	51,50
AM1 oleico	1,79	6,45	4,50	16,74	28,51	50,25	0,00	0,00	3,56
AM1 linoleico	2,49	6,32	4,85	26,88	35,33	24,69	8,24	0,00	3,88
AM1 O:L	3,04	6,36	5,90	24,10	26,40	31,78	9,71	2,11	10,11
CM29 oleico	3,37	6,57	5,92	27,79	40,09	13,44	2,72	10,04	29,18
CM29 linoleico	2,70	6,40	6,58	29,15	33,44	12,52	8,10	10,22	14,74
CM29 O:L	2,91	6,49	6,47	24,96	28,74	14,40	5,41	20,03	11,15
CM51 oleico	3,61	6,48	5,36	24,48	44,95	17,93	3,30	3,98	34,04
CM51 linoleico	2,99	6,42	6,79	29,00	40,85	12,89	7,07	3,39	23,42
CM51 O:L	2,60	6,34	7,14	28,81	36,64	16,31	7,77	3,33	29,23
CR4 oleico	2,52	6,89	2,16	8,93	11,17	67,67	10,07	0,00	18,06
CR4 linoleico	2,72	6,43	6,44	27,88	34,27	16,15	12,49	2,77	9,22
CR4 O:L	2,87	6,43	3,16	14,35	16,08	29,53	14,52	22,36	14,67
DU54 oleico	2,74	6,52	5,99	26,81	37,55	22,21	3,31	4,12	17,20
DU54 linoleico	2,34	6,56	5,15	13,53	38,35	35,99	6,97	0,00	3,30
DU54 O:L	2,89	6,49	3,73	17,72	24,68	34,53	19,34	0,00	24,33
EB50 oleico	3,10	6,46	6,52	30,72	43,58	16,32	2,86	0,00	20,42
EB50 linoleico	2,01	6,53	5,03	20,81	33,76	31,75	6,71	1,95	27,90
EB50 O:L	3,46	6,25	5,47	25,13	36,53	12,59	5,28	15,00	19,93

O:L – mistura dos ácidos oléico e linoleico

Tabela 12 – *Continuação*. Composição monomérica de PHA acumulados por *P. putida* e seus mutantes quando cultivados em presença de ácido oleico e linoleico comerciais, ou uma mistura destes

Amostra	Biomassa (g/L)	pH	3Hx (mol%)	3HO (mol%)	3HD (mol)%	3HDd (mol%)	3HDd⁶ (mol%)	3HDd⁵ (mol%)	%PHA
AG46 oleico	2,56	6,44	3,46	8,66	25,59	28,81	0,00	33,48	3,97
AG46 linoleico	2,97	6,26	6,60	28,53	33,96	21,62	9,29	0,00	4,75
AG46 O:L	ND	6,29	3,41	14,87	33,41	36,96	9,17	2,18	10,30
AG46 O:L 26/10	2,94	6,48	7,01	30,58	35,97	17,37	6,65	2,43	24,38
AK1 oleico	3,38	6,44	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
AK1 linoleico	2,76	6,41	0,00	0,00	23,73	38,82	0,00	37,45	5,64
AK1 linoleico	2,76	6,41	0,00	0,00	16,87	71,16	11,98	0,00	13,45
AK1 O:L	ND	5,43	0,00	10,38	32,08	47,85	9,69	0,00	8,79
AK1 O:L	ND	6,43	0,00	0,00	27,67	45,64	26,69	0,00	4,81
AK1 O:L 26/10	2,92	6,45	7,36	31,39	38,11	14,39	5,50	3,24	29,75
BG45 oleico	3,06	6,29	4,20	19,56	44,84	25,14	2,91	3,35	13,45
BG45 linoleico	2,05	6,20	6,18	27,86	31,63	23,70	8,35	2,28	13,79
BG45 O:L 26/10	2,71	6,48	8,18	33,18	34,88	13,60	6,95	3,20	24,48
BJ5 oleico	2,33	5,61	5,63	24,22	26,25	36,14	5,35	2,41	10,12
BJ5 linoleico	2,78	6,16	0,00	0,00	22,89	77,11	0,00	0,00	4,95
BJ5 O:L	3,18	6,12	0,00	4,63	23,73	60,17	11,47	0,00	4,52
CF12 oleico	2,79	6,03	0,00	10,71	26,74	25,91	36,64	0,00	4,98
CF12 linoleico	2,69	6,19	0,00	0,00	25,42	74,58	0,00	0,00	4,34
CF12 O:L	2,97	5,99	2,75	10,36	40,75	46,13	0,00	0,00	2,62
CN25 oleico	3,43	5,76	7,42	17,38	40,37	34,83	0,00	0,00	2,94
CN25 linoleico	2,9	6,06	0,00	3,38	43,74	52,88	0,00	0,00	1,80
CN25 O:L	3,18	5,85	3,68	4,20	17,80	57,90	16,42	0,00	6,23
DM26 oleico	2,23	6,60	0,00	12,55	39,26	48,19	0,00	0,00	2,20
DM26 linoleico	2,34	6,36	0,00	17,52	34,26	32,00	5,31	10,90	5,29
DM26 O:L	ND	6,44	0,00	7,80	20,22	57,97	14,01	0,00	5,50
DM26 O:L 26/10	2,51	6,50	6,85	28,28	32,35	24,98	5,41	2,14	13,02

Tabela 12 – *Continuação*. Composição monomérica de PHA acumulados por *P. putida* e seus mutantes quando cultivados em presença de ácido oleico e linoleico comerciais, ou uma mistura destes

DR52 oleico	2,26	6,50	5,28	24,28	30,51	34,11	3,23	2,59	13,44
DR52 linoleico	2,67	6,16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
DR52 O:L	3,02	6,13	0,00	5,84	23,91	70,26	0,00	0,00	5,41
DW4 oleico	2,51	6,29	2,31	10,59	24,48	55,98	6,64	0,00	7,27
DW4 linoleico	ND	6,21	5,60	27,14	31,68	9,62	8,53	17,44	14,34
DW4 linoleico 26/10	2,61	6,45	7,85	32,58	36,27	7,03	7,95	8,34	25,61
DW4 O:L	ND	6,28	6,21	19,89	35,64	32,95	5,30	0,00	3,31
DW4 O:L 26/10	2,69	6,44	7,45	31,68	35,79	16,32	6,21	2,55	27,13
DX38 oleico	2,67	6,40	5,54	23,99	37,74	32,73	0,00	0,00	3,77
DX38 linoleico	3,45	6,26	0,00	15,26	20,34	56,94	7,47	0,00	7,19
DX38 O:L	ND	6,49	0,00	6,79	8,89	70,72	13,61	0,00	4,69
DX38 O:L 26/10	2,52	6,50	5,64	24,40	30,87	31,63	5,48	1,98	10,74

5.4.5. Identificação de genes afetados nos mutantes.

O DNA genômico dos mutantes afetados na utilização de ácido 4-pentenóico como única fonte de carbono foi extraído, digerido com a enzima de restrição *Pst*I, ligado ao vetor pUCBM20 (2,7 Kb) e transferido por transformação por choque térmico na presença de CaCl_2 conjugação para *E. coli* XL1 Blue. Foi obtido um clone resistente a canamicina apenas para o mutante CM29. Uma vez que esse clone apresentava vários fragmentos de DNA além do vetor (Figura 31), foi realizada nova digestão e religação ao acaso do plasmídeo e fragmentos provenientes desse clone, obtendo-se vários subclones resistentes a canamicina.

Figura 31. Análise eletroforética de gel de agarose de DNA plasmidial do clone contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de *Pseudomonas putida*, digerido com *Pst*I. 1. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind*III). 2. DNA plasmidial contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de *Pseudomonas putida*, digerido com *Pst*I.

A análise eletroforética em gel de agarose indicou alguns clones contendo apenas um inserto além do vetor (Figura 32).

Figura 32 - Análise eletroforética de gel de agarose de DNA plasmidial de subclones contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de *Pseudomonas putida*, digerido com *Pst*I. 1. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com *Hind*III). 1-8. DNA plasmidial de subclones contendo fragmento de DNA do mutante CM29 de *Pseudomonas putida*, digerido com *Pst*I.

Dois desses clones foram utilizados para seqüenciar a região do genoma onde ocorreu a inserção do transposon utilizando o primer Ext12 (Braz, 2006). A seqüência obtida foi utilizada para busca de genes semelhantes no genoma de *Pseudomonas putida* KT2440, utilizando o programa TBLASTX. Embora os resultados do seqüenciamento mostrassem diversas indefinições de nucleotídeos, a comparação com seqüência do genoma de *P. putida* KT2440 permitiu identificar alguns trechos com semelhança a um transportador de ácidos graxos de cadeia curta. Uma vez que, nos cultivos em ácido oleico e linoleico não se observou um perfil de incorporação 3HDd Δ^6 no mutante CM29 diferente da linhagem selvagem, este mutante deve estar afetado apenas no transporte de ácido graxos de cadeia curta. É interessante notar que este transportador deve apresentar especificidade para ácidos graxos de cadeia curta insaturados, uma vez que, o mutante apresenta crescimento normal em ácido valérico e não cresce em ácido 4-pentenóico.

5.5 *fadH*

5.5.1. *fadH* em *Pseudomonas*

Utilizando a sequência do gene *fadH* de *E. coli*, foi realizada busca em genomas de *Pseudomonas* seqüenciados por genes apresentando similaridade a este. Em todas as *Pseudomonas* foi identificado pelo menos um gene *fadH*. Entretanto, em *P. aeruginosa* foram identificados dois destes genes, denominados *fadH1* e *fadH2*. No anexo 2 é apresentado o alinhamento da sequência de aminoácidos de diferentes 2,4 dienoil-CoA redutase putativas codificadas por genes *fadH*.

Na figura 33 é apresentado dendograma com base nas seqüências de aminoácidos de diferentes 2,4 dienoil-CoA redutases presentes em espécies de *Pseudomonas*. O dendograma revela que os produtos de tradução podem ser divididos em dois grupos: um reunindo FadH1, presentes em todas as linhagens de *Pseudomonas*, e outro reunindo os produtos de tradução do gene *fadH2* presentes apenas em linhagens de *P. aeruginosa*.

Estes resultados são compatíveis com a duplicação de *fadH* especificamente no genoma de *P. aeruginosa* em um estágio inicial do estabelecimento desta espécie bacteriana, embora a aquisição do segundo gene *fadH* por transferência horizontal não pode ser excluída.

Figura 33 – Dendograma resultante do alinhamento das seqüências de aminoácidos de 2,4 dienoil-CoA redutase em *Pseudomonas*.

Análise de fluxo da produção de PHA a partir de diferentes óleos vegetais e utilizando de *P. putida* ou *P. aeruginosa* revelou uma relação linear entre a quantidade linear entre a quantidade de ácido linoleico no óleo vegetal e a fração molar de 3HDd Δ^6 detectada no PHA produzido. Entretanto, *P. putida* incorporou este monômero com uma eficiência duas vezes maior. Uma vez que 3HDd Δ^6 é um intermediário da β -oxidação do ácido linoleico, gerado imediatamente antes do passo metabólico requerendo a atividade de uma 2,4 dienoil-CoA redutase, a menor eficiência na incorporação de monômeros 3HDd Δ^6 por *P. aeruginosa* é compatível com hipótese que o gene *fadH* adicional leva a uma oxidação mais eficiente do ácido linoleico nesta espécie bacteriana.

5.5.2. Amplificação e clonagem do gene *fadH*

Com o objetivo de amplificar o gene *fadH*, foram alinhadas as seqüências de nucleotídeos flanqueando estes genes em *Pseudomonas*. Não se verificou seqüências conservadas em todas as *Pseudomonas* nestas regiões. Assim, foi realizado alinhamento das seqüências de nucleotídeos apenas das linhagens de *P. putida* (Figuras 34 e 35). Com base neste alinhamento, foram desenhados iniciadores para a amplificação do gene *fadH*. Foram utilizados como molde para esta amplificação os DNAs genômicos de *P. putida* KT2240 e IPT046. Os resultados destas amplificações estão apresentados na Figura 36. Foram obtidos amplicons de aproximadamente 2,6 Kb apenas quando o DNA de *P. putida* KT2440 foi utilizado como molde, indicando que o DNA genômico de IPT 046 apresenta diferença significativa em relação a essa região quando comparado às linhagens com genomas seqüenciados.

<i>P. putida</i> KT2440	GATCATTAACTTGTTCAGTTTTCGATCATTGAGGCAAT
<i>P. putida</i> F1	GATCAATAACTTGTTCAGTTTTCGATCATTGAGCCCTT
<i>P. putida</i> KT2440	TCAAACGGCTGTTTAATGTCTG...CAGGCAGACAAACGACGGGGCCCGCCA
<i>P. putida</i> F1	TCAAACGGCTGTTTAATGTCTG...CTGACAGACAAACGACGGGGCCCGCCA
<i>P. putida</i> KT2440	CCCAGT...GAGGTGCCCGCATTCCGTGATCAGCCATCAGGGGACCTTTC
<i>P. putida</i> F1	CCCAGT...GAGGTGCCCGCAATCCGTGATCAGCCATCAGGGGACCTTTC

Figura 34. Alinhamento da Região anterior do gene *fadh1* de *Pseudomonas putida* Kt2440, *Pseudomonas putida* F1 E *P.Entomophila* L48. Apresentado os iniciadores propostos.

<i>P. putida</i> KT2440	ggttgtcGGGGCTGCGTGAGCCCGACACCTGCACGCGTGGGAGCGGGCAT
<i>P. putida</i> F1	GGGGCTGCGTGAACCCGTCACCTGCACGCTGGGAGCGGGCAT
<i>P. putida</i> KT2440	GCCCGCGAAACAGGTGACGCGGTGGATGGCACCGGCATTGCCGGTGTTCG
<i>P. putida</i> F1	GCCCGCGAAACAGGTGACGCGGTGGATGGCACCGGCATTGCCGGTGTTCG
<i>P. putida</i> KT2440	CGGGTGAACCCGCTCCTACGACGGCTGTGCCGGGGCATCGATGCCTGTG
<i>P. putida</i> F1	CGGGTGAACCCGCTCCTACGACGGCTGTGCCGGGGTATCGATGCCTGTG
<i>P. putida</i> KT2440	TCGAGCCACCCTGGCACTGTGATGCCTCGGCGGGGGCGGG
<i>P. putida</i> F1	TCGAGCCACCCTGGCACTGTGATGCCTCGGCGGGGGCGAC
<i>P. putida</i> KT2440	TCATCGATTACAAGCGCTTGCGGGATTACCCTGTAACTGCGATCCATG
<i>P. putida</i> F1	TCATCGATTACAAGCGCTTGCGGGATTACCCTGTACACTGCGATCCATG
	TTACCCTGTAACTGCGATCCATG

Figura 35. Alinhamento da Região Posterior do gene *fadh1* de *Pseudomonas putida* Kt2440 E F1. Apresentado o iniciador proposto.

Figura 36. Análise eletroforética de gel de agarose apresentando 1.2. padrão de peso molecular (DNA do fago λ digerido com HindIII). 3;4;5 e 6. Fragmento de DNA contendo o gene *fadH* obtido pela amplificação em *P. putida* KT2440. 7 e 8. *P.putida* IPT046.

O produto de amplificação de 2,6 Kbp obtido foi ligado ao vetor pGEM T-Easy®. O produto de ligação foi então transferido para *E. coli* XL1-Blue por transformação. Os clones transformantes foram selecionados em LB contendo ampicilina (LBA), bem como IPTG e X-Gal. Foram obtidas oito colônias brancas das quais foram extraídos o DNA plasmidial, digeridos com a enzima de restrição *EcoR*I e analisados em gel de agarose. Três clones (Figura 37- colunas 6, 7 e 8) apresentaram plasmídeos com o perfil esperado para conter o gene *fadh1*. Uma vez que, o gene *fadh1* de *P. putida* KT2440 apresenta um sítio de restrição *EcoR*I, o fragmento de 2,6

Kpb foi dividido em dois subfragmentos, um de aproximadamente 1,0 Kpb e outro de 1,6 Kpb. Foi observada uma pequena diferença de tamanho entre o subfragmento menor de um dos plasmídeos com perfil esperado e os outros dois.

Figura 37 Gel de agarose de plasmídeos provavelmente contendo o gene *fadH1*. Colunas 1 e 10. DNA ladder de 1 Kb. Colunas 2-9 Plasmídeos provavelmente contendo o gene *fadH1*.

O passo seguinte consistiria na transferência do gene *fadH1* clonado no vetor pGEM T-Easy para o vetor de amplo espectro de hospedeiros pBBR1MCS-2 (KOVACH *et al.*, 1995). Desta forma, seria possível expressar o gene *fadH1* em *P. putida* IPT046 ou outras *Pseudomonas* e avaliar o seu efeito na metabolização de ácidos graxos insaturados. Uma vez que *fadH1* codifica para uma 2,4 dienoil-CoA redutase, espera-se que sua expressão em um plasmídeo aumente a taxa de oxidação do ácido linoleico, reduzindo a incorporação de 3HDd Δ^6 . Além disso, o plasmídeo pBBR1MCS-2::*fadH1* poderia ser utilizado para avaliar sua capacidade de complementar os mutantes deficientes na metabolização de ácido 4-pentenóico obtidos.

Uma análise dos sítios de restrição presentes no sítio de múltipla clonagem do plasmídeo pGEM T Easy e no gene *fadH* de *P. putida* KT2440 demonstrou que todos os sítios de restrição presentes no vetor também estavam presentes no gene *fadH*. O único sítio de restrição que poderia ser utilizado para retirada do gene *fadH* completo era o sítio da enzima *ApaI* que está presente em uma das extremidades do amplicon de 2,6 Kb em uma região não codificante. A questão era se o sítio *ApaI* estaria na extremidade do amplicon próxima ao sítio *ApaI* presente no vetor ou na extremidade distal. Com a

digestão do plasmídeo dos clones contendo o vetor pGEM T-Easy portando o gene *fadH* com a enzima de restrição *ApaI* foi possível verificar que o clone F apresentou bandas de tamanhos correspondentes ao vetor pGEM T-Easy e ao gene *fadH* (Figura 38). O plasmídeo F – (coluna 7- Figura 37 e coluna 3 da Figura 38) foi submetido a seqüenciamento que confirmou a identidade deste fragmento de DNA com o gene *fadH*.

Figura 38. Gel de agarose de plasmídeos contendo o *fadH* digeridos com *ApaI*. Coluna 1. (DNA do fago λ digerido com *HindIII*). Colunas. 2, 3 e 4 .vetor pGEM T-Easy portando o gene *fadH* digeridos com enzima de restrição *ApaI* (E, F e G).

Assim, no futuro será possível clonar o gene *fadH* no vetor pBBR1MCS-2 e avaliar seu efeito sobre a metabolização de ácidos graxos insaturados.

6 CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho foram:

- É possível modular a composição de monômeros insaturados no PHA sintetizado por *P. putida* e *P. aeruginosa* com base no fornecimento de ácidos graxos insaturados precursores;
- A utilização de óleos vegetais contendo diferentes ácidos graxos em sua composição também permite modular a composição monomérica do PHA sintetizado.
- Foi observada diferença na composição monomérica do PHA sintetizado por *P. putida* e *P. aeruginosa*, sugerindo que enzimas envolvidas na transferência de intermediários do metabolismo de ácidos graxos para a biossíntese de PHA também interferem em sua composição.
- A análise dos polímeros por GC-MS permitiu confirmar a identidade de monômeros saturados e insaturados constituintes do PHA acumulado. Demonstrou-se que é possível fazer essa identificação diretamente com os propil-ésteres sem a necessidade de uma segunda derivatização.
- Com base em pesquisas realizadas em banco de genomas, foi possível verificar que *P. aeruginosa* possui dois genes codificadores da enzima 2,4 dienoil-CoA redutase, enquanto, *P. putida* possui apenas um. Estes dados estão de acordo com os obtidos em ensaios de acúmulo de PHA a partir de óleos vegetais por estas linhagens, visto que, *P. putida* foi muito mais eficiente na incorporação de monômeros insaturados que *P. aeruginosa*.
- Mutante obtido por inserção do transposon incapaz de crescer a partir de ácido 4-pentenóico, também se tornou mais eficiente na incorporação do monômero 3HDd Δ^6 a partir de ácido linoleico, sugerindo que pode estar afetado na metabolização de ácidos graxos com insaturações estendendo-se de carbono par para ímpar. No entanto, ainda não foi possível identificar o gene que foi afetado neste mutante.
- Foi possível clonar o *fadH* de *P. putida* KT2440. A clonagem deste gene foi confirmada por sequenciamento. Estudos futuros permitirão avaliar a relevância da 2,4-dienoil-CoA redutase no metabolismo de ácidos graxos insaturados, bem como seu papel na modulação da composição monomérica de PHA.

REFERÊNCIAS*

- ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 431-437, 1998.
- ASHBY, R.D. *et al.* Viscoelastic properties of linseed oil-based medium-chain length polyhydroxyalkanoates films: epoxidation and curing. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 27, p. 355-361, 2000.
- ASHBY R.D. *et al.* Glucose/lipid mixed substrates as a means of controlling the properties of medium chain length poly(hydroxyalkanoates). **Biomacromolecules**, v. 2, n.1, p. 211-6, 2001.
- ASHBY, R.D.; SOLAIMAN, D.K.Y.; FOGLIA, T.A. Bacterial poly(hydroxyalkanoate) polymer production from the biodiesel co-product stream. **J. Polym. Environ.**, v. 12, n.3, p. 105-112, 2004.
- BABU, G.N. *et al.* Poly-3-hydroxyalkanoates as pressure sensitive adhesives. In: International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, 1996, Dawos, Switzerland. **Proceedings of the 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoate**. Ottawa: National Research Council of Canada, 1997. p. 48.
- BALLISTRERI, A. *et al.* Biosynthesis and structural characterization of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) produced by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids. **Int. J. Biol. Macromol.** v. 29, n.2, p. 107-14, 2001.
- BARBUZZI, T. *et al.* Microbial synthesis of poly (3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas aeruginosa* from fatty acids: identification of higher monomer units and structural characterization. **Biomacromolecules.**, v. 5, n.6, p. 2469-78, 2004.
- BRANDL, H. *et al.* *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 1977-1982, 1988.
- BRAZ, V.S. **Caracterização de genes envolvidos na resposta a metais em *Caulobacter crescentus***. 145f. Tese (doutorado em Ciências – Microbiologia – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2006.

* De acordo com:

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

BUISMAN, G.J.H. *et al.* **Poly (3-hydroxyalkanoate) paint and method for the preparation thereof.** US PI 6,024,784, 2000.

BYROM, D. Polymer synthesis by micro-organisms: technology and economics. **Trends Biotechnol.**, v. 5, p. 246-250, 1987.

CHOI, K.H.; SCHWEIZER, H.P. An improved method for rapid generation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* deletion mutants. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 30, 2005.

CROMWICK, A.M.; FOGLIA, T.; LENZ, R.W. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. **Appl. Microbiol. Biotech.**, v. 46, p. 464-469, 1996.

DE KONING, G.J.M. *et al.* A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. **Polymer**, v.35, p. 2090-2097, 1994.

DE KONING, G.J.M.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas*. 1. Solubilization. **Bioprocess Eng.**, v. 17, p. 7-13, 1997.

DE LORENZO, V. *et al.* Mini *Tn5* transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in Gram negative eubacteria, **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 6568-6572, 1990.

DE SMET, M.J. *et al.* Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, v. 154, p. 870-878, 1983.

DE WAARD, P. *et al.* Heteronuclear NMR analysis of unsaturated fatty acids in poly(3-hydroxyalkanoates). **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 315-319, 1993.

DEUSFRENE, A. *et al.* Gamma-ray crosslinking of poly(3-hydroxyoctanoate-co-undecenoate). **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 29, p. 73-82, 2001.

DINIZ S.C. *et al.* High-cell-density cultivation of *Pseudomonas putida* IPT046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 119, n.1, p. 51-70, 2004.

DIRUSSO, C.C.; BLACK, P.N.; WEIMAR, J.D. Molecular inroads into the regulation and metabolism of fatty acids, lessons from bacteria. **Prog. Lipid Res.**, v. 38, p. 129-197, 1999.

DOI, Y. **Microbial polyester**. New York: VCH publishers, 1990.

DUBOIS, V. *et al.* Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 109, p. 710–732, 2007.

EGGINK, G.; DE WAARD, P.; HUIJBERTS, G.N.M. Formation of a novel poly(hydroxyalkanoates) from long-chain fatty acids. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 14-21, 1995.

ERENO, D. Plástico renovável. **Rev. Fapesp.**, v. 142, p. 67-71, 2007.

EROGLU, M.S. *et al.* Hydroxylation of pendant vinyl groups of poly(3-hydroxy undec-10-enoate) in high yield. **J. Appl. Pol. Sci.**, v. 97, p. 2132-2139, 2005.

FERNÁNDEZ, D. *et al.* Agro-industrial oil wastes as substrates for PHA production by the new strain *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 40045: Effect of culture conditions. **Biochem. Eng. J.**, v. 26, p. 159-167, 2005.

FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B.H.A. The role of the fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas oleovorans* in polyhydroxyalkanoate biosynthesis: molecular characterization of the *fadBA* operon from *P. oleovorans* and of the enoyl-CoA hydratase genes *phaJ* from *P. oleovorans* and *P. putida*. **Arch. Microbiol.**, v. 178, p. 149-160, 2002.

FUJITA, Y. *et al.* Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 4, p. 829-839, 2007.

FUKUI, T.; SHIOMI, N.; DOI, Y. Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 18, p. 667-673, 1998.

GOMEZ, J.G.C.; RODRIGUES M.F.A.; ALI, R.C.P. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia media a partir de carboidratos**: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 220 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GOMEZ, J.G.C. *et al.* Production of biodegradable polymer from sugar cane in Brazil. In: WORLD CLEAN AIR & ENVIRONNEMENTE CONGRESS AND EXHIBITION., 12., 2001, Seoul, Korea, 2001.

GUO-QIANG, C., *et al.* Synthesis of copolyesters consisting of medium-chain-length β -hydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317. **React. Funct. Pol.**, v. 48, p. 107–112, 2001.

HARTMANN, R. *et al.* Tailor-made olefinic medium-chain-length poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] by *Pseudomonas putida* GPo1: Batch versus Chemostar Production. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 93, p. 737-746, 2005.

HASSAN, M. K. *et al.* Biodegradable copolymers of 3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate (NodaxTM), including recent improvements in their mechanical properties. **Mol. Cryst. Liq. Cryst.**, v. 447, p. 341-362, 2006.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria. **Biotechnol. Lett.**, v. 11, p. 471-476, 1989.

HAYWOOD, G.W. *et al.* Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxy-decanoate from simple carbohydrate substrate by *Pseudomonas* sp strain NCIMB 40135. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3354-3359, 1990.

HAZER, B.; TORUL, O.; BORCAKLI, M. Bacterial production of polyesters from free fatty acids obtained from natural oils by *Pseudomonas oleovorans*. **J. Environ. Polym. Degr.**, v. 6, p. 109-113, 1998.

HAZER, B. *et al.* Free radical crosslinking of unsaturated bacterial polyesters obtained from soybean oily acids. **Polym. Bull.**, v. 46, p. 389-394, 2001.

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

HE, X.-Y. *et al.* Peroxisomes contain $\Delta^{3,5}, \Delta^{2,4}$ -dienoyl-CoA isomerase and thus possess all enzymes required for the β -oxidation of unsaturated fatty acids by a novel reductase-dependent pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 215, 15-22, 1995.

HUIJBERTS, G.N.M. *et al.* *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturate and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58: p. 536-544, 1992.

HUIJBERTS, G.N.M. *et al.* NMR studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly-(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1661-1666, 1994.

HUISMAN, G.W. *et al.* Synthesis of polyhydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1949-1954, 1989.

IAMAMURA, S. *et al.* A. Purification of the multi-enzyme complex for fatty acid β -oxidation from *Pseudomonas fragi* and reconstitution of the fatty acid oxidation system. **J. Biochem.**, v. 107, p. 184-189, 1990.

ISHIKAWA, M. *et al.* Reconstitution, morphology and crystalization of a fatty acid β -oxidation multienzyme complex from *Pseudomonas fragi*. **J. Biochem.**, v. 328, p. 815-820, 1997.

JENDROSSEK, F.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H.G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 451-463, 1996.

KIM, D. Y. *et al.* Biosynthesis, Modification, and biodegradation of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. **J. Microbiol.**, v. 45, p. 87-97, 2007.

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

KUNAU, W.H.; DOMMES, V.; SCHULZ, H. β -oxidation of fatty acid in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. **Prog. Lipid Res.**, v. 34, p. 267-342, 1995.

LAGEVEEN, R.G. *et al.* Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-hydroxyalkenoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 2924-2932, 1988.

LEE, E.Y; CHOI, C.Y. Gas chromatography-mass spectrometric analysis and its application to a screening procedure for novel bacterial polyhydroxyalkanoic acids containing long chain saturated and unsaturated monomers. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 80: p. 408-414, 1995.

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

LUTHRIA, D. L.; BAYKOUSHEVA, S. P.; SPRECHER, H. Double Bond Removal from Odd-numbered Carbons during Peroxisomal β -Oxidation of Arachidonic Acid Requires both 2,4-Dienoyl-CoA Reductase and Delta 3,5, Delta 2,4 -Dienoyl-CoA Isomerase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 13771-13776, 1995.

MOHANNA, P.N.; TERENCEHI, G. **Polyhydroxyalkanoate nerve regeneration devices**. AU P. 2004268560, 2005.

NELSON, K.E. *et al.* Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. **Environ. Microbiol.**, v. 4, n.12, p. 799-808, 2002.

NODA, I.; BOND, E.C. **Polyhydroxyalkanoate copolymer and polylactic acid polymer composition for laminate films.** US PI 2002143136, 2002.

NODA, I.; SATKOWSKI, M.M. **Agricultural items and agricultural methods comprising biodegradable copolymers.** US PI 2003143261, 2003.

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

OLIVEIRA, E.R. *et al.* Two different pathways are involved in the β -oxidation of *n*-alkanoic and *n*-phenylalkanoic acids in *Pseudomonas putida* U: genetic studies and biotechnological applications. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 863-874, 2001.

PARK, S.J.; PARK, J.P.; LEE, S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 214, p. 217-222, 2002.

PARK, S.J.; CHOI, J.I.; LEE, S.Y. Engineering of *Escherichia coli* fatty acid metabolism for the production of polyhydroxyalkanoates. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 36, p. 579-588, 2005.

PREUSTING, H.R. ***Pseudomonas oleovorans* as a source of bioplastics: Production and characterization of poly(3-hydroxyalkanoates).** PhD Thesis - University of Groningen, The Netherlands, 1992.

RAMSAY, B.A. *et al.* Production of poly- β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REHM, B.H.A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid de novo synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 24044-24051, 1998.

REHM, B.H.A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA syntheses and other proteins required for PHA synthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 3-19, 1999.

REHM, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 376, p. 15-33, 2003.

REISER, S.E.; MITSKY, T.A.; GRUYS, K. J. Characterization and cloning of an (*R*)-specific trans-2,3-enoylacyl-CoA hydratase from *Rhodospirillum rubrum* and use of this enzyme for PHA production in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 209-218, 2000.

REN, Y.; SCHULZ, H. Metabolic functions of the two pathways of oleate β -oxidation double bond metabolism during the β -oxidation of oleic acid in rat heart mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 1, p. 111-116, 2003.

REN, Y. *et al.* An alternative pathway of oleate beta-oxidation in *Escherichia coli* involving the hydrolysis of a dead end intermediate by a thioesterase. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 12, p. 11042-11050, 2004.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyrate acid in microbial acid in microbial biomass - ester hydrochloric acid propanolisi. **J. Chromatogr.**, v. 273, p. 285-289, 1988.

RODRIGUES, M.F.A. *et al.* Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, n. 43. p. 880-886, 1995.

SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ, R.J. *et al.* Medium-chain-length polyhydroxy-alkanoic acids (PHA_{MCL}) produced by *Pseudomonas putida* IPT046 from renewable sources. **Eur. Polym. J.**, v. 39, p. 1385-1394, 2003.

SATO S. *et al.* Primary structures of the genes, *faoa* And *faob*, from *Pseudomonas fragi* B-0771 which encode the 2 subunits of the hdt multienzyme complex involved in fatty-acid β -oxidation. **J. Biochem.**, v. 111, p. 8-15, 1992.

SCHULZ, H.; KUNAU, W.H. β -oxidation of unsaturated fatty acids: a revised pathway. **Trends Biochem. Sci.**, v. 12, p. 403-406, 1987.

SILVA, L.F. *et al.* Produção biotecnológica de poli-hidroxiálcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Quím. Nova.** v. 30, p. 1732-1743, 2007.

SILVA-QUEIROZ, S.R. **Biossíntese de polihidroxiálcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) por bactérias a partir de óleos vegetais.** 99f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. Medium-chain-length poly(β -hydroxyalkanoate) synthesis from triacylglycerols by *Pseudomonas saccharophila*. **Curr. Microbiol.**, v. 38, p. 151-154, 1999.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. Production of polyhydroxyalkanoates from intact triacylglycerols by genetically engineered *Pseudomonas* **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 56, p. 664-669, 2001.

SOLAIMAN, D.K.Y. *et al.* Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Appl. Microbiol. Biot.**, v.71 (6), p. 783-789, 2006.

SOLAIMAN, D.K.Y.; ASHBY, R.D.; FOGLIA, T.A. Physiological characterization and genetic engineering of *Pseudomonas corrugate* for medium-chain-length

polyhydroxyalkanoates synthesis from triacylglycerols. **Curr. Microbiol.**, v. 44, p. 189-195, 2002.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (Ed.) **Biomaterials. Novel materials from biological sources**. Basingstoke: Macmillan Publishers, 1991. p. 123-213,

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

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

STOFFEL, W.; CAESAR, H. Metabolism of unsaturated fatty acids. On the β -oxidation of mono- and polyene-fatty acids. Mechanism of enzymatic reactions of delta-2-*cis*-enoyl-CoA compounds. Hoppe-Seyler's S. **Physiol. Chem.**, 341: 76-83, 1965.

SUDESH K.; ABE H.; DOI Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Prog. Polym. Sci.**, v. 25, p. 1503-1555. 2000.

TAN, I.K.P.; SUDESH, K.K.; THEANMALAR, M. Saponified palm kernel oil and its major free fatty acids as carbon substrates for the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* PGA1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 207-211, 1997.

THAKOR, N.; TRIVEDI, U.; PATEL, K.C. Biosynthesis of medium chain length poly(3-hydroxyalkanoates) (mcl-PHAs) by *Comamonas testosteroni* during cultivation on vegetable oils. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 1843-1850, 2005.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *pseudomonads*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3360-3367, 1990.

TSERNG, K.Y.; JIN, S.J. NADPH-dependent reductive metabolism of *cis*-5 unsaturated fatty acids. A revised pathway for the β -oxidation of oleic acid. **Biol. Chem.**, v. 266, n.18, p. 11614-11620, 1991.

TSUGE, T. *et al.* Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, p. 195-205, 2003.

TSUZUKI, T. *et al.* The metabolic conversion of 9,11,13-elostearic acid (18:3) to 9,11-conjugated linoleic acid (18:2) in the rat. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 49, p. 195-200, 2003.

VAN DER WALLE, G.A.M. *et al.* Development of environmentally friendly coatings and paints using medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) as the polymer binder. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 123-128, 1999.

WENNAN, H. *et al.* Production of novel polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* 1317 from glucose and soybean oil. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 169, p. 45-49, 1998.

WHITE, D. The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2nd ed. Oxford: University Press, 2000. 565 p.

WILLIAMS, S. (Ed.) AOAC-IUPAC method. Fatty acids in oils and fats preparation of methyl esters. Final action, Boron trifluoride method. 14th ed. Arlington: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 1984. p. 513.

WILLIAMS, S.F. *et al.* PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 111-121, 1999.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D. Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy. In: STEINBUCHER, A.; DOI, Y. **Biopolymers**. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. p. 91-128.

WILLIAMS, S.F.; MARTIN, D.P. **Polyhydroxyalkanoate compositions for soft tissue repair, augmentation, and viscosupplementation**. US PI 7.025.980, 2006.

Anexo 1

Espectogramas de massa dos monômeros constituintes de PHA_{MCL} produzidos por *P. putida* IPT046 a partir de óleo vegetal e carboidrato.

A - Espectograma de massa do monômero 3Hx (cultivo em óleo de girassol)

B- Espectograma de massa do monômero 3HO (cultivo em óleo de girassol)

C - Espectograma de massa do monômero 3HD (cultivo em óleo de girassol)

E- Espectograma de massa do monômero 3HDd $\square^5$ (cultivo em carboidrato)

F- Espectograma de massa do monômero 3HDdΔ⁶ (cultivo em óleo de girassol)

Anexo 2

Alinhamento de aminoácidos do produto do gene *fadH1* de diferentes *Pseudomonas* com genoma sequenciado (não foram apresentadas as seqüências de duas *Pseudomonas* pois não estavam disponíveis no momento).

<i>P.putida</i> KT2440	MAAD.RYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEERP
<i>P.putida</i> F1	MAAD.RYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEERP
<i>P.entomophila</i> L48	MANA.RYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEERP
<i>P.fluorescens</i> Pf5	MAGA.PYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	MTAT.QYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.aeruginosa</i> PA7	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.aeruginosa</i> 2192	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.aeruginosa</i> C3719	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.syringae</i> 1448A	MTAA.HYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEER
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP -PA14	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.aeruginosa</i> PA01	MTAAVPYPHLLAPLDLGFTTLNRNRTLMGSMHTGLEEK
<i>P.putida</i> KT2440	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.putida</i> F1	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAEKLSTEEADKHRI
<i>P.entomophila</i> L48	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.fluorescens</i> Pf5	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> PA7	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> 2192	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> C3719	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.syringae</i> 1448A	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.aeruginosa</i> PA01	RARGGVGLMVTGGIAPNDEGGVYSGAAKLSTEEADKHRI
<i>P.putida</i> KT2440	KICLQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEAGIE
<i>P.putida</i> F1	KICLQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKALDEEGIE
<i>P.entomophila</i> L48	KICLQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.fluorescens</i> Pf5	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> PA7	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> 2192	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> C3719	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.syringae</i> 1448A	KICLQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFTPRELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.aeruginosa</i> PA01	KICMQILHAGRYAYSQVAPSAIQAPINPFKPKELDEEGIE
<i>P.putida</i> KT2440	CAVLAQRAGYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.putida</i> F1	CAVLAQRAGYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.entomophila</i> L48	CASLAQRAGYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.fluorescens</i> Pf5	CSTLAQKAEDYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	CSVLAQTAEDYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> PA7	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> 2192	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> C3719	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.syringae</i> 1448A	CSTLARSAGYDGVEMGSEGYFINQFLAAHTNHRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP -PA14	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.aeruginosa</i> PA01	CASLAQVAGYDGVEMGSEGYFINQFLVQHTNQRTDRWGS
<i>P.putida</i> KT2440	EIVSRVRGAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSTWDEIELLAKAIE
<i>P.putida</i> F1	EIVSRVRGAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSTWDEIELLAKAIE
<i>P.entomophila</i> L48	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSTWDEIVVLAKAIE
<i>P.fluorescens</i> Pf5	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSTWEEIVQLAQIAIE
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSTWEEIVTLAKAIE
<i>P.aeruginosa</i> PA7	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAIE
<i>P.aeruginosa</i> 2192	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAVEKAGATLI
<i>P.aeruginosa</i> C3719	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAVEKAGATLI
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAVEKAGATLI
<i>P.syringae</i> 1448A	EIVTRVREAVGADFIIIFRLSMLDLVEGGSTWEEIVQLAKAVEQAGATLI
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAVEKAGATLI
<i>P.aeruginosa</i> PA01	EIVRRVREAVGNFIIIFRLSMLDLVEGGSSWDEIVLLAKAVEKAGATLI

<i>P.putida</i> KT2440	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGVVSIPLITTNRINTPEVA
<i>P.putida</i> F1	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGVVSIPLITTNRINTPEVA
<i>P.entomophila</i> L48	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGAVKIPLITTNRINTPEVA
<i>P.fluorescens</i> Pf5	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGSVSIPLITTNRINTPEVA
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGSVNIPLITTNRINTPEIA
<i>P.aeruginosa</i> PA7	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEIGIPLITTNRINTPEVA
<i>P.aeruginosa</i> 2192	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEVGIPLITTNRINTPEVA
<i>P.aeruginosa</i> C3719	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEVGIPLITTNRINTPEVA
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEVGIPLITTNRINTPEVA
<i>P.syringae</i> 1448A	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	SKVTAKLRGSVKVPLITTNRINTPEVA
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEVGIPLITTNRINTPEVA
<i>P.aeruginosa</i> PA01	NTGIGWHEARIPTIATKVPRAAF	TKVTAKLRGEVGIPLITTNRINTPEVA
<i>.putida</i> KT2440	EAVLAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGRADEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.putida</i> F1	EAVLAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGRADEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.entomophila</i> L48	EAVLAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGRADEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.fluorescens</i> Pf5	EQILAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGRADEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	EQILAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGRADEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> PA7	ERVLAEGDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGQAEINTCIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> 2192	EKVLAEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINTCIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> C3719	EKVLAEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINTCIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	EKVLAEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINTCIGCNQACLDHT
<i>P.syringae</i> 1448A	ERILSEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINICIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	EKVLAEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINTCIGCNQACLDHT
<i>P.aeruginosa</i> PA01	EKVLAEGLDADMVSMARPF	LADPDFVNKAAAGHAERINTCIGCNQACLDHT
<i>P.putida</i> KT2440	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLPV	RTVKRIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.putida</i> F1	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLPV	RTVKRIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.entomophila</i> L48	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLPV	RAVKRIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.fluorescens</i> Pf5	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLPV	KQIKKIAVVGAGPAGLSAATVAAER
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLPV	KQIKKIAVVGAGPAGLSAATVAAER
<i>P.aeruginosa</i> PA7	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	ARAKKIAVVGAGPAGLAAASVAAER
<i>P.aeruginosa</i> 2192	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	TRPKKIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.aeruginosa</i> C3719	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	TRPKKIAVVGSGPAGLAAATVAAER
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	TRPKKIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.syringae</i> 1448A	FGGKLTSLVNPRACHETELNYLP	TROVKKIAVVGAGPAGLAAATVAAQR
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	ARPKKIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.aeruginosa</i> PA01	FGGKLTSLVNPRACHETELNYIPT	TRPKKIAVVGAGPAGLAAATVAAER
<i>P.putida</i> KT2440	GHAVTLFDAASEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.putida</i> F1	GHAVTLFDAASEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.entomophila</i> L48	GHEVTLFDAGSEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.fluorescens</i> Pf5	GHQVTLFDSASEIGGQFNIA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	GHQVTLFDSASEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> PA7	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> 2192	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> C3719	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.syringae</i> 1448A	GHEVTLFDSASEIGGQFNIA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.aeruginosa</i> PA01	GHRVSLFDAAGEIGGQFNVA	KRVPGKEEFFETLRYFRNKVKSTGVDLRLN
<i>P.putida</i> KT2440	TRVDVQALVGGGFDEIILAT	GIAPRTPDIAGVEHAKVLSYLDVLLERKPV
<i>P.putida</i> F1	TRVDVQALVGGGFDEIILAT	GIAPRTPAIAGVEHAKVLSYLDVLLERKPV
<i>P.entomophila</i> L48	TRVDVAALVAGEYDEIILAT	GIAPRTPAIPGIDNAKVLSYLDVLLERKPV
<i>P.fluorescens</i> Pf5	TRVDVQQLVAGGFDEIILAT	GIAPRTPAIPGVEHAKVLSYLDVLLERKPV
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	TRVDVAKLVAGGFDEIILAT	GIAPRTPAIPGVENAKVLSYLDVLLERKLV
<i>P.aeruginosa</i> PA7	TRVGVDLAVAGGYDEIILAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV
<i>P.aeruginosa</i> 2192	RRVDVDDLAVAGGYDEIVLAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV
<i>P.aeruginosa</i> C3719	RRVDVDDLAVAGGYDEIVLAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	RRVGVDLAVAGGYDEIVLAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV
<i>P.syringae</i> 1448A	TRIKAEDLLGAGFDEIILAT	GIAPRTPAIPGIDNQKLSYLDVILORQKPV
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	RRVGVDLAVAGGYDEIVLAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV
<i>P.aeruginosa</i> PA01	RRVGVDLAVAGGYDEIVLAT	GIVPRTPAIPGIEHPKVISYLDAILERKPV

<i>P.putida</i> KT2440	GKSVAVIGAGGIGFDVSEYLVHQGVATSQDRAAFWKEWGIDTHLQARGGV
<i>P.putida</i> F1	GKSVAVIGAGGIGFDVSEYLVHEGVATSQDRAAFWKEWGIDTHLQARGGV
<i>P.entomophila</i> L48	GERVAVIGAGGIGFDVSEYLVHKGVATSQDREAFWKEWGIDTQLEARGGV
<i>P.fluorescens</i> Pf5	GKSVAVIGAGGIGFDVSEFLVHQGVATSQDRQAFWKEWGIDTQLQARGGV
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	GKRVAVIGAGGIGFDVSEFLVHEGVATSQDRAAFWKEWGIDTNLEARGGV
<i>P.aeruginosa</i> PA7	GNRVAVIGAGGIGFDVSEFVTHAGPSTSLDREAFWKEWGIDARLEARGGI
<i>P.aeruginosa</i> 2192	GGKVAVIGAGGIGFDVSEFIITHAGPSTSLEREAFWKEWGIDTRLEARGGI
<i>P.aeruginosa</i> C3719	GGKVAVIGAGGIGFDVSEFIITHAGPSTSLEREAFWKEWGIDTRLEARGGI
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	GGKVAVIGAGGIGFDVSEFIITHAGPSTSLEREAFWKEWGIDTRLEARGGI
<i>P.syringae</i> 1448A	GRSVAVIGAGGIGFDVSEFLVHQGVATSLDREAFWKEWGIDTTLLEARGGV
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	GGKVAVIGAGGIGFDVSEFIITHAGPSTSLEREAFWKQWGIDTRLEARGGI
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	GGKVAVIGAGGIGFDVSEFIITHAGPSTSLEREAFWKEWGIDTRLEARGGI
<i>P.putida</i> KT2440	AGIKAEPHAPARQVYLLQRKSSKVGDLGKTTGWIHRTGLKNKGVMQMLNS
<i>P.putida</i> F1	AGIKAEPHAPARQVYLLQRKSSKVGDLGKTTGWIHRTGLKNKGVMQMLNS
<i>P.entomophila</i> L48	AGIKPEPHAPARQVYLLQRKSSKVGDLGKTTGWIHRTGLKNKHVMQMLNS
<i>P.fluorescens</i> Pf5	AGIKPEPHAPARQVFLLRKKTQVGDLGKTTGWIHRTGLKNKGVMQMLNS
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	AGIKAAPHAPARDVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRTGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> PA7	AGVKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> 2192	AGVKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> C3719	AGVKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	AGIKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.syringae</i> 1448A	AGIKPDVHAPARQVYLLQRKSSKVGDLGKTTGWIHRTGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	AGVKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	AGIKAIEVHPAARQVFLLRKSSKVGDLGKTTGWIHRAAGLKNKGVMQMLNS
<i>P.putida</i> KT2440	VEYLGIDDAGLHIRVDG.GEPQVLAVDNVVICAGQDPLRELQEGVLAAGQ
<i>P.putida</i> F1	VEYLAIDDAGLHIRVDG.GEPQVLAVDNVVICAGQDPLRELQEGVLAAGQ
<i>P.entomophila</i> L48	VEYLSVDDAGLHVRINE.GEPQLLAVDNIVVCAGQEPRELQEGVLAAGQ
<i>P.fluorescens</i> Pf5	VEYLKIDDAGLHIRIGEAGEPQVLPVDNIVICAGQDPLRELQDGLVLAAGQ
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	VEYLKIDDEGLHIRIGETGEPQVLPVDNIVICAGQDPLRELHDGLVEAGQ
<i>P.aeruginosa</i> PA7	VEYLGIDDAGLHIRIAD.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQEGVLAAGQ
<i>P.aeruginosa</i> 2192	VEYLGIDDAGLHIRVAE.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQDGLLAAGQ
<i>P.aeruginosa</i> C3719	VEYLGIDDAGLHIRVAE.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQDGLLAAGQ
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	VEYLGIDDAGLHIRVAE.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQDGLLAAGQ
<i>P.syringae</i> 1448A	VQYLLKIDDAGLHIRIGEDGEEKLLAVDNIVICAGQDPLRELYDDLVSAGQ
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	VEYLGIDDAGLHIRVAE.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQDGLLAAGR
<i>P.aeruginosa</i> PAO1	VEYLRIDDAGLHIRVAE.GEPQVLPVDTVIVCAGQDPLRELQDGLLAAGQ
<i>P.putida</i> KT2440	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.putida</i> F1	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.entomophila</i> L48	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.fluorescens</i> Pf5	NVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.fluorescens</i> Pfo1	NVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> PA7	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> 2192	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> C3719	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> PACS2	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.syringae</i> 1448A	SVHLIGGADVAAELDAKRAIDQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> UCBPP-PA14	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLAAEL
<i>P.aeruginosa</i> PAO	SVHLIGGADVAAELDAKRAINQGSRLA