LUCAS GARBINI CESPEDES

Controle da composição do copolímero P3HB-*co*-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

LUCAS GARBINI CESPEDES

Controle da composição do copolímero P3HB-*co*-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

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

São Paulo
2016

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

© reprodução não autorizada pelo autor

Cespedes, Lucas Garbini.
Controle da composição do copolímero P3HB-*co*-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas sp*. LFM461. / Lucas Garbini Cespedes. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção bacteriana de plásticos biodegradáveis.

Versão do título para o inglês: Composition control of P3HB-*co*-3HHx through gradative expression of *phaA* and *phaB* genes in *Pseudomonas sp.* LFM461.

1. Polihidroxialcanoatos 2. P3HB-*co*-3HHx 3. Polímeros biodegradáveis 4. *Pseudomonas* 5. Controle da composição I. Gomez, Prof. Dr. José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0111/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Lucas Garbini Cespedes.

Título da Dissertação: Controle da composição do copolímero P3HB-*co*-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes phaA e phaB em *Pseudomonas sp*. LFM461.

Orientador(a): Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez.

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

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

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **620/13** referente ao projeto intitulado: "*Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes phaA e phaB em Pseudomonas sp. LFM461*" sob a responsabilidade de **Lucas Garbini Cespedes,** foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 24 de setembro de 2013.

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

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

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez pelos ensinamentos transmitidos durante os anos juntos. Pelo exemplo de dedicação à sua profissão.

À Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva, Dra. Marilda Keiko Taciro e ao Aelson Luiz Santos pelo apoio quando necessário.

Ao Dr. Karel Olavarria Gamez pelas valiosas discussões e trabalho em conjundo em momentos importantes deste trabalho.

Aos amigos Bernardo, Thatiane, Rogério, Débora, Juliano, Cristiane, Nathalia e Amanda obrigado pelas discussões e conversas. Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Bioprodutos e do ICB-II pela ajuda.

Ao Dr. Jay Keasling, Dr. Blake Simmons, Dr. John Gladden e Dr. Steven Singer, e pela incrível oportunidade de ter experiência internacional em pesquisa, de conhecer e trabalhar no JBEI.

Ao Dr. Alberto Rodriguez pela amizade. Aos demais colegas no SynBio3 e do JBEI, Berkeley, CA, EUA.

À minha família pelos incentivos e suporte em minhas escolhas.

Aos Kancas e Meio-burros pelas risadas e anos de amizade.

À CAPES/CNPq pelo apoio financeiro.

À Fundação de Apoio Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES/CNPq pelo apoio financeiro e pela oportunidade de estágio no exterior.

“O que é a originalidade? É ver qualquer coisa que ainda não tem nome e que, por isso, não pode ainda ser mencionada, embora esteja mesmo à frente dos olhos de toda a gente. A maioria das pessoas não consegue ver aquilo que não tem um nome. As pessoas originais são as que já deram (ou têm capacidade para dar) nomes às coisas."

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

Cespedes LG. Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes *phaA* e *phaB* em *Pseudomonas* sp. LFM461. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são materiais poliésteres acumulados por bactérias e possuem propriedades termoplásticas, biodegradáveis, biocompatíveis e podem ser produzidos a partir de matérias-primas renováveis. Copolímeros de 3-hidroxibutirato e 3-hidroxihexanoato (P3HB-co-3HHx) têm atraído interesse, pois apresentam propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade para frações de 3HHx menores que 20 mol%; já em frações maiores de 3HHx o polímero tende a ser mais elástico assemelhando-se a PHA contendo monômeros de cadeia média. Recentemente, foi construída em nosso laboratório, uma linhagem de *Pseudomonas* sp. (LFM461) abrigando genes de biossíntese de PHA de *Aeromonas* sp., apresentando capacidade de produzir PHA contendo elevada fração de 3HHx (>20 mol%) a partir de glicose. Neste projeto, criou-se um sistema genético para regulação da composição do copolímero P3HB-co-3HHx pela indução de genes responsáveis pela biossíntese de precursores 3HB. Utilizando um plasmídeo contendo o gene de proteína fluorescente *mRFP1,* o promotor lac foi testado como funcional no hospedeiro LFM461. Assim, foram construídas cinco versões do plasmídeo de controle de copolímero (pCC), baseados no promotor lac. Em cada nova modificação do pCC, o plasmídeo resolveu problemas de estabilidade e expressão, tanto na linhagem teste *E. coli* MG1655 quanto na linhagem alvo *Pseudomonas* sp. LFM461. Entretanto, mesmo com a versão mais aprimorada, o pCC-5, não foi possível estabelecer um processo no qual houvesse o controle dos precursores 3HB em *Pseudomonas* sp. LFM461, e, portanto, controlar a composição do copolímero. Através de experimentos de atividade enzimática e RT-qPCR do mRNA, foi possível indicar que o problema está na impossibilidade do promotor *lac* de promover expressão dos genes de biossíntese de 3HB presentes nos pCC.

Palavras-chave: Polihidroxialcanoatos. P3HB-co-3HHx. Polímeros biodegradáveis. *Pseudomonas*. Controle da Composição.

ABSTRACT

Cespedes LG. Composition control of P3HB-co-3HHx through gradative expression of phaA and phaB genes in Pseudomonas sp. LFM461. [Masters thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polyesters material accumulated by bacteria which has thermoplastic, biodegradable and biocompatible properties and can be produced from renewable feedstocks. Copolymers of 3-hydroxybutirate and 3-hydroxyhexanoate (P3HB-*co*-3HHx) which contain less than 20mol% of 3HHx have being investigated for its properties, which are similar to low density polyethylene. If the 3HHx content is more than 20mol% the PHA material tends to be more elastic and similar to medium-chain-length PHA ($PHA_{MCL)}$. Recently, our laboratory has been investigating a *Pseudomonas* sp. strain, LFM461, which can produce high 3HHx content (>20mol%) from glucose when hosting PHA biosynthesis genes from *Aeromonas*. In this project, a genetic system was designed for control of P3HB-*co*-3HHX composition by induction of 3HB monomers biosynthesis. Using a fluorescent protein *mRFP1* gene under control of a Lac promoter, the promoter functionality was successful tested in our *Pseudomonas* sp. LFM461 host. Thus, five versions of a copolymer control plasmid (pCC) were built based on the Lac promoter. However, even though improvements were made on stability and expression profile of pCC it was not possible to establish an assay of successful PHA composition control in *Pseudomonas* sp. LFM461. By enzymatic activity and RT-qPCR of cDNA experiments we have indications of problems in the Lac promoter on driving the expression of 3HB genes in pCC.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates. P3HB-*co*-3HHx. Biodegradable polymers. *Pseudomonas*. Composition control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a) Monômero de PHA, onde R^1 é a cadeia que define HASCL ou HAMCL. b) Exemplos de monômeros de PHA: 3HB - 3-hidroxibutirato; 3HH - 3-hidroxihexanoato e 3HO - 3-hidroctanoato. 14
Figura 2 - Esquema representativo do metabolismo de acúmulo de PHB/PHA_{MCL} a partir de carboidratos e ácidos graxos (adaptado) (18). 20
Figura 3 - Porcentagens da demanda mundial por bioplásticos (43). 23
Figura 4 - Representação de vias de produção de ácidos 3-hidroxibutírico, em A e B, e 3-hidroxipropiônico, em C. 27
Figura 5 - Esquema de processo de pré-tratamento da lignina para obtenção do APL. 33
Figura 6 - Esquema representativo do pBBR1MCS-2::mRFP1+*lacI*^{q} utilizado para os ensaios de expressão gênica. 40
Figura 7 - Resposta da fluorescência relativa a DO em relação a diferentes níveis de indutor (IPTG) na linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pBBR1MCS-2::*mRFP1*+*lacI*^{q}. A linhagem contendo o pBBR1MCS-2::*mRFP1* foi utilizada como controle positivo e de expressão máxima e a linhagem contendo pBBR1MCS2 como controle negativo e de fluorescência basal. 41
Figura 8 - Representação do plasmídeo pCC-1. Em verde, genes relacionados à biossíntese de PHA; em azul, trechos reguladores da expressão; em amarelo, regiões homólogas; em cinza genes originais de pBBR1MCS-2, em preto promotor constitutivo do *operon phaPC*. 42
Figura 9 - Acúmulo de P3HB em *E. coli* MG1655 quando a expressão dos genes *phaAB* foi induzida com diferentes concentrações de IPTG. 43
Figura 10 – Eletroforese em gel (1%) do Plasmídeo pCC-1 extraído de *E. coli* DH5α (Coluna 1) e de *Pseudomonas sp.* LFM461 (Coluna 2), ambos digeridos com enzima de restrição *PstI*. 44
Figura 11 - Esquema representativo da remoção dos trechos de homologia presentes no pCC-1. 45
Figura 12 - Em A: Gel de eletroforese do plasmídeo pCC-3 extraído de *Pseudomonas* sp. LFM461. Na coluna 1 o plasmídeo sem digestão e na coluna 2 digerido com enzima *PstI*. Em B: Gel de eletroforese do plasmídeo pCC-3 extraído

de E. coli DH5α, sendo coluna 1 sem digestão e coluna 2 digerido com enzima *PstI* 46
Figura 13 - Variação da composição do copolímero P3HB-co-3HHx em *Pseudomonas* sp. LFM 461 pCC-3 quando submetida a diferentes níveis de indução por IPTG.....47
Figura 14 - Esquema representativo da modificação realizada para a construção do pCC-4. A alteração que foi realizada é a inversão da orientação do *operon phaPC*.48
Figura 15 - Perfil de composição de PHA acumulado por *Pseudomonas* sp. LFM 461 pCC-4 quando cultivada com diferentes concentrações de IPTG. 49
Figura 16 - Comparação entre diferentes versões do pCC quanto a perfil de crescimento e acúmulo de PHA em condições de repressão e indução na linhagem *E. coli* MG1655. Barras de erro com desvio padrão não foram inseridas pelo baixo desvio padrão encontrado (menor que 5% da média dos valores) 51
Figura 18 - Análise de cromatografia liquida do padrão de 3HP. No gráfico de cima está presente o resultado de HPLC com sinal RID (vermelho) e DAD (azul). No gráfico de baixo encontra-se o resultado de LC/MSD com ion extract de 89m/z. 59
Figura 19 - Análise de cromatografia liquida do padrão de 3HB. Em cima o resultado de HPLC com sinal RID (vermelho) e DAD (azul). Em baixo, resultado de LC/MSC utilizando ion extract 103 m/z. 60
Figura 20 - Representação da arquitetura gênica presente em pBBR1MCS-2::mRFP1. Em azul estão representados os promotores lac com suas respectivas distâncias em pares de base (pb) em relação ao sítio de ligação do ribossomo (RBS) e ao gene mRFP1. O P_{LAC} a esquerda é original do pBBR-1MCS-2 e o da direita é de origem do RFP coding device. 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das PHA sintases (36).....20
Tabela 2 - Propriedades de polímeros comparados entre suas propriedades. 22
Tabela 4 - Linhagens utilizadas no trabalho. 30
Tabela 5 - Plasmídeos utilizados neste trabalho. 31
Tabela 6 - Composição do meio LB. 32
Tabela 7 - Composição do meio MM.....32
Tabela 8 - Lista de oligonucleotideos utilizados. 34
Tabela 8 (continuação) - Lista de oligonucleotideos utilizados.....35
Tabela 9 - Acúmulo de PHA e crescimento celular em *E. coli* MG1655 expressando pCC-3 ou pCC-4 sob condições de indução ou não por IPTG. 48
Tabela 10 - Produção de PHA pelas linhagens obtidas no JBEI abrigando pCC-4: *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* MT2 e *Delftia acidovorans*. 54
Tabela 11 - Crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM461 em meio mineral contendo ácido cumárico como única fonte de carbono (MMAC). 55
Tabela 12 - Resultados do ensaio de produção de PHA pela linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-4 no meio MMAC e MMG como controle, ambos preparados com MM 10x.....56
Tabela 13 - Acúmulo de PHA utilizando diferentes concentrações de solução de lignina adicionado ao meio mineral. 56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 Polihidroxialcanoatos (PHA) 18
2.2 Genes e metabolismo de PHA 18
2.3 Enzimas PHA sintase 20
2.4 PHAs como termoplásticos, suas propriedades e copolímeros 21
2.5 PHAs como materiais de interesse comercial 23
2.6 Controle de composição de PHA 24
2.7 Ácido 3-hidroxipropiônico (3HP) e 3-hidroxibutírico (3HB) como precursores químicos de interesse comercial 26
2.8 Enzimas de biossíntese de ácidos 3HB e 3HP 27
2.9 Lignina como substrato para a produção de PHAs e 3HAs. 28
3 OBJETIVOS 29
3.1 Objetivos específicos 29
4 MATERIAIS E MÉTODOS 30
4.1 Microrganismos e plasmídeos 30
4.2 Meios de cultura 32
4.3 Oligonucleotideos 34
4.4 Condições de cultivo 36
4.5 Manipulação genética e sequenciamento 36
4.6 Expressão do gene repórter 37
4.7 Produção de PHA. 37
4.8 Massa seca celular 38
4.9 Teor e composição de PHA 38
5 RESULTADOS 39
5.1 Construção do plasmídeo repórter 39
5.2 Avaliação do controle da expressão gênica em *Pseudomonas* sp. LFM461. . 40
5.3 Construção do plasmídeo pCC-1 41
5.4 Ensaio de produção de PHB 42
5.5 Transformação de *Pseudomonas sp.* LFM461 com pCC-1 43
5.6 Remoção de regiões homólogas 44

5.7 Inserção de pCC-3 em LFM461 46
5.8 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-3 46
5.9 Construção do pCC-4. 47
5.10 Produção de PHA por *E. coli* MG1655 pCC-3 e pCC-4. 48
5.11 pCC-4 na produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 49
5.12 Construção do pCC-5 50
5.13 Produção de PHA por *E. coli* MG1655 pCC-5 50
5.14 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-5 51
5.15 Atividade enzimática de β-cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase 52
5.16 RT-qPCR de LFM461 em pCC-4 e pCC-5 53
5.17 Produção de PHA utilizando as linhagens oferecidas pelo JBEI 53
5.18 Avaliação de fontes de carbono aromáticas. 54
5.19 Crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM461 utilizando meio mineral com ácido cumárico (MMAC) e produção de PHA 55
5.20 Produção de PHA por *Pseudomonas sp.* LFM461 utilizando hidrolisado de lignina. 56
5.21 Construção dos plasmídeos para produção de 3HP e 3HB 57
5.22 RT-qPCR em tempo real para *tesB*, *ptb-buk* em *Pseudomonas* sp. LFM461. 57
5.23 Analise de 3HB e 3HP por HPLC e HPLC/MS 58
5.24 Produção de 3HP e 3HB por *Pseudomonas* sp. LFM461. 60

6 DISCUSSÃO 62
6.1 Construção dos pCCs 62
6.2 *Controle* da produção de PHB em *E. coli* 62
6.3 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando os pCCs 63
6.4 Produção de PHA por linhagens do JBEI abrigando pCC-4 65
6.5 Uso de lignina para produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM461 66
6.6 Produção de 3HP e 3HB por LFM461 67

7 CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS* 71

1 INTRODUÇÃO

Os polihidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados na forma de grânulos intracelulares por diversas bactérias em condições de limitação de um nutriente essencial e excesso de fonte de carbono (1). Os grânulos de PHA provêm reserva de fonte de carbono e energia para a célula bacteriana e chegam a corresponder a até 80% da massa total de células (2). Os PHA apresentam propriedades termoplásticas, são biodegradáveis e biocompatíveis, despertando interesse industrial como alternativa aos plásticos de origem petroquímica, cuja demanda tende a aumentar (3, 4).

A fórmula genérica do monômero de PHA é exibida na Figura 1, o radical (R^1) define se o monômero é classificado como de cadeia curta ($3HA_{SCL}$, do inglês *short-chain-length*) ou de cadeia média ($3HA_{MCL}$, do inglês *medium-chain-length*) (5). O poli-3-hidroxibutirato (PHB) é formado por monômeros de 3-hidroxibutirato (3HB) e apresenta propriedades de baixo alongamento à ruptura e, portanto, características de material duro e quebradiço (6). Em contraste, os polímeros PHA_{MCL} formados por monômeros como 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxioctanoato (3HO), 3-hidroxidecanoato (3HD) e 3-hidroxidodecanoato (3HDD) são conhecidos por apresentarem maior alongamento à ruptura que o PHB e assim formarem materiais com propriedades elastoméricas (7).

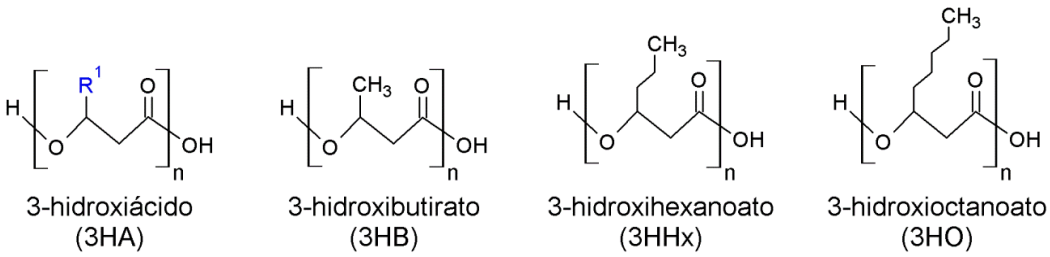

Figura 1 - a) Monômero de PHA, onde R^1 é a cadeia que define HASCL ou HAMCL. b) Exemplos de monômeros de PHA: 3HB - 3-hidroxibutirato; 3HH - 3-hidroxihexanoato e 3HO - 3-hidroctanoato.

A composição monomérica do polímero depende de três fatores: i) dos tipos de monômeros que são sintetizados pela linhagem hospedeira, ii) da quantidade de cada tipo de monômero disponível no citoplasma e iii) da especificidade da enzima PHA sintase por estes diferentes monômeros. A fim de modular a composição do polímero, vários trabalhos utilizaram a clonagem do gene que codifica a PHA sintase

(*phaC*) seguida de sua expressão em um hospedeiro que a suprisse com monômeros diferentes dos encontrados no organismo de origem (8-12).

Tendo em vista uma maior aplicabilidade destes materiais, alguns estudos têm por objetivo produzir polímeros com novas propriedades (13). Os copolímeros de $3HA_{MCL}$ e $3HA_{SCL}$ produzidos nesses estudos mostraram ser promissores quanto a novas aplicações destes materiais, com destaque ao P3HB-*co*-3HHx, naturalmente produzido por bactérias do gênero *Aeromonas* quando supridas com fonte de carbono contendo ácidos graxos (14). Os copolímeros P3HB-*co*-$3HA_{MCL}$ com teor de $3HA_{MCL}$ até 20 mol% demonstram ter propriedades semelhantes ao polietileno de baixa densidade (6).

Entretanto, para produzir copolímeros de 3HB e $3HA_{MCL}$ em bactérias como *Escherichia coli*, *Ralstonia eutropha* e *Burkholderia* sp., deve-se fornecer ácidos graxos como fonte de carbono, devido à incapacidade das vias metabólicas destas bactérias em fornecer monômeros $3HA_{MCL}$ a partir de carboidratos. Para superar essa limitação, em nosso laboratório (15), foi clonado o gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* e expresso em um hospedeiro *phaC*$^-$ (LFM461) derivado da linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046 (16). O trabalho teve sucesso em produzir P3HB-*co*-$3HA_{MCL}$ com cerca de 7 mol% de $3HA_{MCL}$ utilizando glicose como única fonte de carbono (16). Em seguida, outro trabalho teve sucesso em aumentar ainda mais o teor de $3HA_{MCL}$. Desta vez, a PHA sintase recombinante de *Aeromonas sp* TSM81 foi usada para produzir o copolímero P3HB-*co*-3HHx a partir de carboidratos. Utilizando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaPCJ*, os resultados mostraram a produção de um copolímero contendo 63% de 3HB e 37 mol% de 3HHx (Cespedes et al., dados não publicados) e confirmam dados da literatura que demonstram a capacidade da PHA sintase de *Aeromonas* ter especificidade tanto por monômeros 3HB como 3HHx (11). Além de monômeros 3HHx, foram também identificados outros monômeros de $3HA_{MCL}$ que podem ou não estar presentes no copolímero. Um teor de 3HHx maior que 20 mol% não é interessante do ponto de vista de propriedades desejáveis para o material pois a partir desta porcentagem o material passa a ser excessivamente maleável (6). Desta maneira, controlar o teor deste monômero no polímero é de interesse industrial e demonstra um desafio interessante na modificação de vias metabólicas.

Outra alternativa para modificar a composição do copolímero é controlar os monômeros supridos à PHA sintase. Os genes *phaA* (β-cetotiolase) e *phaB*

(cetoacetil-CoA redutase) podem ser superexpressos e seus produtos levam a um aumento da biossíntese de monômeros 3HB disponíveis à PHA sintase e, portanto, a um aumento do teor de 3HB na composição do copolímero. Ao aumentar a fração molar de 3HB no copolímero, é possível diminuir o teor de 3HHx no copolímero sem utilizar duas PHA sintases com especificidades diferentes. Utilizar duas PHA sintases com especificidades diferentes poderia levar à formação de duas cadeias poliméricas com composições diferentes e não um único copolímero com composição constante.

A simples superexpressão dos genes *phaA* e *phaB* provavelmente não seria a maneira mais eficiente de controlar a composição do polímero pois aumentaria desnecessariamente o fardo metabólico (17) e assim não seria possível modular o teor de 3HB. Uma estratégia mais interessante para o controle da composição do copolímero é utilizar uma regulação da expressão dos genes *phaAB*, assim, seria possível um controle mais preciso da composição, além de não aumentar o fardo metabólico. Um estudo da expressão do gene *prpE* – gene que catalisa a formação de propionil-CoA - sob o controle do promotor $P_{taclacUV5}$ (induzido por IPTG) em *Salmonella entérica* mostrou-se eficiente no controle do copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (18). Pela modulação da expressão gênica, alcançou-se variações de 2 a 25 mol% de 3-hidroxivalerato (3HV) na composição do copolímero (18). Em outro trabalho, utilizou-se o controle da expressão do gene *prpE* – uma propionil-CoA sintetase - para modular a biossíntese de 3HV, a fim de produzir um copolímero de P3HB-*co*-3HV em *Escherichia coli*, atingindo uma faixa entre 5 e 18% de 3HV na composição molar do PHA (19).

Juntamente com técnicas de modificação gênica e engenharia metabólica, é interessante que se use fontes de carbono alternativas com objetivo de diminuir os custos de produção do processo. Biomassa de material lignocelulósico é altamente disponível por ser rejeito do setor agrícola. Celulose e hemicelulose estão sendo cada vez mais utilizados em bioprocessos devido a recentes avanços no pré-tratamento destas matérias prima (20). A lignina é um polímero complexo de diferentes compostos aromáticos ligados entre si, sua estrutura pode variar dependendo do método de extração e do material lignocelulósico do qual é retirado (21). Assim, uma oportunidade de utilização da lignina está no uso como substrato ao processo de produção de PHA por microrganismos capazes de consumir os

compostos aromáticos presentes, candidatas a este processo são as bactérias do gênero *Pseudomonas* (22).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Polihidroxialcanoatos (PHA)

Descoberto entre 1923 e 1929 por Maurice Lemoigne no Instituto Pasteur, o polihidroxibutirato (PHB) foi o primeiro polímero a ser descrito da família dos polihidroxialcanoatos (PHA). Através de estudos de grânulos intracelulares de *Bacillus megaterium*, Lemoigne descreveu um polímero formado pelo ácido 3-hidroxibutírico (3HB) que era formado quando se hidrolisava um sólido obtido no processo de fermentação de *B. megaterium* em condições de limitação de oxigênio. O trabalho não teve impacto na época de sua publicação e, somente no final da década de 1950, o trabalho foi retomado por Wilkinson e colaboradores na Universidade de Edimburgo e por Stainer e Doudoroff na Universidade de Califórnia, Berkeley (23).

Como o PHB é o polímero mais comumente produzido por bactérias, outros monômeros de PHA não foram pesquisados até a década de 1970 e 80, quando foram descritos os ácidos 3-hidroxi-2-buteníoco, 3-hidroxivalerato (3HV), 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxiheptanoato (3HHp) e 3-hidroxioctanoato (3HO) entre outros (6, 24-27). Foi descrito também que bactérias do gênero *Pseudomonas* são produtoras de PHA com monômeros de cadeia média, sendo estes considerados de 6 a 12 carbonos (28, 29). Desta maneira, a nomenclatura formalizada para os PHAs se baseou nos organismos produtores de determinado PHA e nas vias metabólicas utilizadas para biossíntese destes monômeros. Assim, os PHA forma classificados como: PHA_{SCL} (do inglês, short-chain-length) cujos monômeros contêm de 3 a 4 átomos de carbono e são produzidos por diversos tipos de bactérias; e os PHA_{MCL} produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (5, 6).

2.2 Genes e metabolismo de PHA

Os PHAs têm função de reserva de energia, de carbono e de poder redutor às bactérias e, portanto, são geralmente acumulados quando existe excesso de fonte de carbono e restrição de um nutriente essencial ao crescimento e multiplicação celular, como por exemplo fósforo, nitrogênio, ferro e oxigênio (30, 31).

Os primeiros genes da via de biossíntese de PHB foram descritos na forma de *operon phaCAB* identificados em *Ralstonia eutropha*. O *operon phaCAB* codifica, respectivamente, uma PHA sintase, uma α-cetotiolase e uma acetoacetil-CoA redutase. O operon é descrito como sendo expresso constitutivamente e a regulação do acúmulo é feita em nível metabólico através de um aumento dos níveis intracelulares de acetil-CoA em situações de restrição nutricional (32). Para as bactérias acumuladoras de PHB, duas moléculas de acetil-CoA são transformadas em acetoacetil-CoA pela ação da enzima α-cetotiolase e posteriormente em 3HB-CoA pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase que utiliza NADPH como cosubstrato para tal reação. Finalmente, a enzima PHA sintase faz a catálise da reação de polimerização dos monômeros 3HB disponíveis, nesta reação é liberada uma molécula de água e outra de CoASH (Figura 2).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* tem particularidade no acúmulo de PHA_{MCL}, e para tal, o metabolismo de *Pseudomonas* deve suprir monômeros de cadeia média como o 3HHx, 3HO, 3HD e 3HDd (25, 29, 33). Quando são fornecidos carboidratos como substrato, os monômeros $3HA_{MCL}$ provém da via de síntese de ácidos graxos na qual os metabólitos são desviados pela enzima 3-hidroxiacil-ACP:CoA transferase, codificadas pelo gene *phaG*, que catalisa a reação de substituição da coenzima ACP pela coenzima A (34). Já quando são fornecidos ácidos graxos, os monômeros sofrem uma reação de hidratação pela enzima enoil-CoA hidratase, transcrita pelo gene *phaJ*. Da mesma forma que ocorre na formação de PHB, os monômeros de $3HA_{MCL}$ devem ser ligados a coenzima A para que sejam polimerizados pela enzima PHA sintase, cuja catalise elimina uma molécula de água e uma CoASH a cada incorporação de um monômero ao polímero (Figura 2).

Algumas bactérias são conhecidas por naturalmente acumularem copolímeros de P3HB-co-3HA, é o caso de bactérias do gênero *Aeromonas* quando são fornecidos ácidos graxos. Neste caso, o metabolismo bacteriano é capaz de produzir monômeros 3HB utilizando através da via de degradação de ácidos graxos utilizando o gene *phaJ* formando assim o copolímero P3HB-*co*-3HHx (12, 35).

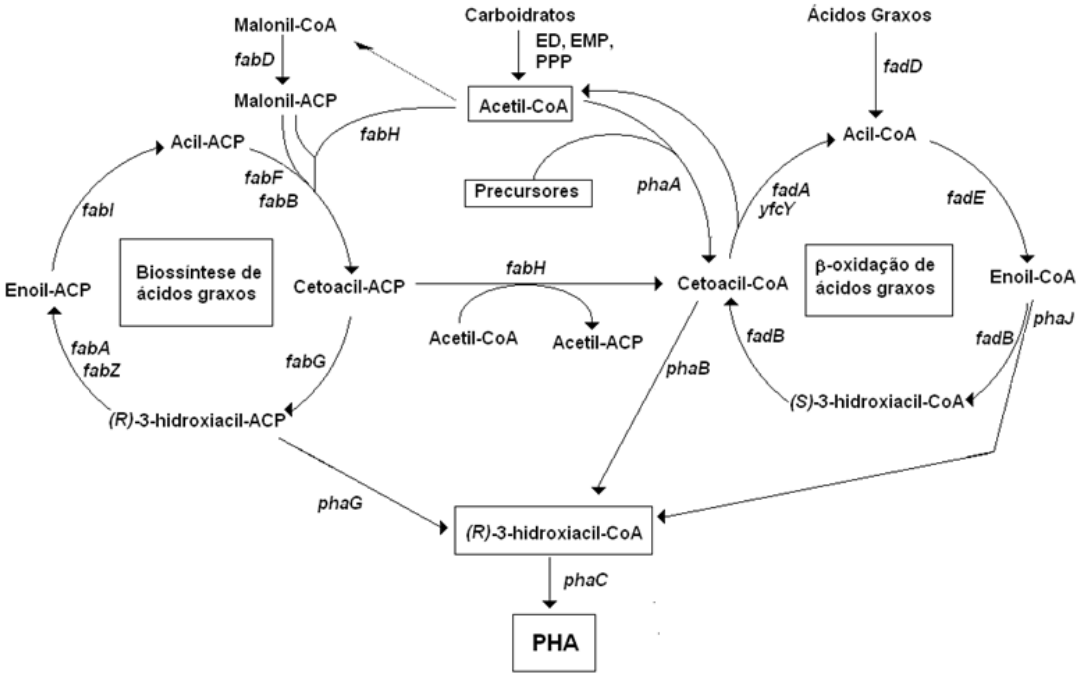

Figura 2 - Esquema representativo do metabolismo de acúmulo de PHB/PHA_{MCL} a partir de carboidratos e ácidos graxos (adaptado) (18).

2.3 Enzimas PHA sintase

As enzimas PHA sintase são chave no processo de acúmulo de PHA e sua especificidade pelos 3HA determinam a composição do polímero acumulado. Existem 4 classes de PHA sintase baseadas na sequência dos genes e especificidade de substratos (5, 36, 37) (Tabela1).

Tabela 1 - Classificação das PHA sintases (36).

Classe	Subunidades	Espécies	Substratos
I	PhaC	*Ralstonia eutropha*	$3HA_{SCL}$-CoA $4HA_{SCL}$-CoA $5HA_{SCL}$-CoA
II	PhaC	*Pseudomonas aeruginosa*	$3HA_{MCL}$-CoA
III	PhaC + PhaE	*Allochromatium vinosum*	$3HA_{SCL}$-CoA $3HA_{MCL}$-CoA (C6-C8) 4HA-CoA, 5HA-CoA
IV	PhaC + PhaR	*Bacillus megaterium*	$3HA_{SCL}$-CoA

Apesar de serem próximas à PHA sintases de classe I a PHA sintase de *Aeromonas* é uma exceção à classificação de Rehm (36). Essa PHA sintase tem capacidade de polimerizar monômeros de 3HHx em um polímero de PHASCL quando são fornecidos ácidos graxos como fonte de carbono (38).

2.4 PHAs como termoplásticos, suas propriedades e copolímeros

Como os PHAs são poliésteres de origem biológica eles apresentam propriedades termoplásticas aliadas à biodegradabilidade, biocompatibilidade e podem ser produzidos a partir de matérias primas renováveis (3, 39, 40). Em 1982, foi feita a primeira tentativa de comercialização de um PHA, o P3HB-*co*-3HV, um copolímero randômico de monômeros 3HB e 3HV. Neste processo de produção de PHA foi utilizada a bactéria *Ralstonia eutropha*, uma produtora natural do homopolímero PHB. Porém, quando esta é cultivada com ácido propiônico e glicose, as vias metabólicas de *Ralstonia eutropha* levam também à produção de monômeros 3HV que são incorporados ao polímero acumulado. Esse processo de produção de copolímero levou a uma melhora nas propriedades do material, facilitando o seu processamento pós bioprocesso e tornando o material mais atrativo ao mercado (1, 23, 41).

Desde então diversos copolímeros têm sido produzidos e caracterizados com objetivo de melhorar as propriedades dos PHAs como material termoplástico. As características químicas, físicas dos materiais como alongamento para ruptura, resistência a tração, temperatura de fusão, temperatura de transição vítrea, grau de cristalinidade e modulo de Young variam de acordo com sua massa molar e composição monomérica (1, 6, 41). A Tabela 2 esquematiza diversos polímeros produzidos até então.

Tabela 2 - Propriedades de polímeros comparados entre suas propriedades.

Polímero	Composição do copolímero	M.Y. (GPa)	R.T. (Mpa)	A.R (%)	Temp. de fusão (°C)	Tg (°C)
P(3HB)		3.5–4	40	3–8	173–180	5–9
P(4HB)		149	104	1000	53	-50
P3HB-co-3HV	(3 mol% 3HV)	2.9	38	n.a	170	n.a
	(9 mol% 3HV)	1.9	37	n.a	162	n.a
	(14 mol% 3HV)	1.5	35	n.a	150	n.a
	(20 mol% HV)	1.2	32	n.a	145	−1
	(25 mol% 3HV)	0.7	30	n.a	137	n.a
P3HB-co-4HB	(3 mol% 4HB)	n.a.	28	45	166	n.a.
	(10 mol% 4HB)	n.a.	24	242	159	n.a.
	(16 mol% 4HB)	n.a.	26	444	130	-7
	(64 mol% 4HB)	n.a.	17	591	50	-35
	(90 mol% 4HB)	n.a.	65	1080	50	-42
P3HHx-co-3HO		n.a	10	300	61	n.a
P3HB-co-3HA	(6 mol% 3HA)	0.2	17	680	133	-8
P3HB-co-HP	(67 mol% HP)	n.a	n.a	n.a	44	-19
P(3HB-co-3HHx		n.a	20	850	52	-4
PEAD		0.4–1.0	17.9–33.1	12–700	112–132	-80
PE-LD		0.05–0.1	15.2–78.6	150–600	88–130	-36
PS		3.0–3.1	50	3–4	80–110	21
Nylon-6.6		2.8	83	60	265	50
PET		2.2	56	7300	262	3400

M.Y.: Modulo de Young, R.T.: Resistência a tração, A.R.: alongamento para ruptura, 3HB: ácido 3-hidroxibutirato, 3HA: ácido 3-hidroxialcanoato, 3HV: ácido 3-hidroxivalerato, 3HHx: ácido 3-hidroxihexanoatto, 3HP: ácido 3-hidroxipropiônico, 3HO: ácido 3-hidroxioctanoato, 4HB: ácido 4-hidroxibutirato, PEAD: polietileno de alta densidade, PE-LD: polietileno de baixa densidade, PS: poliestireno, PET: polietileno tereftalato. Adaptado de Anjum (41).

2.5 PHAs como materiais de interesse comercial

Devido a suas propriedades termoplásticas agregadas a biodegradabilidade, biocompatibilidade e possibilidade de produção utilizando matérias primas renováveis, os PHAs despertam interesse comercial, sendo competidores diretos de plásticos de origem petroquímica. As resinas de PHA têm a vantagem de poderem ser utilizadas nos moldes convencionais de injeção de plásticos de origem petroquímica e, portanto, uma mudança de infraestrutura do processamento de resinas não é necessária (3, 42, 43).

Mesmo com todas as vantagens citadas, a principal barreira para a expansão da comercialização dos PHAs é o custo da resina. Dependendo do processo utilizado na produção, o custo da resina de PHA pode variar de $4-$16 dólares por quilograma enquanto que para ser comercialmente competitiva a resina deve ter custo entre $3-$5 dólares por quilograma (43, 44). Atualmente, os PHAs representam apenas 2% da demanda dos “bioplásticos”, competindo com o ácido polilático (40%), os polímeros blenda com amido (40%), poliésteres produzido a partir de etanol (9%) e outras blendas (9%) (Figura 2)(43).

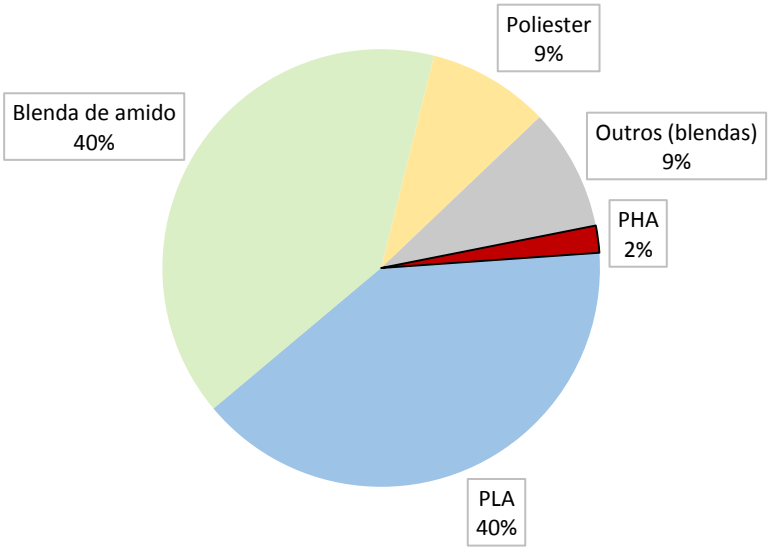

Figura 3 - Porcentagens da demanda mundial por bioplásticos (43).

Apesar das desvantagens competitivas, algumas tentativas de comercialização de PHA foram feitas tanto com o homopolímero PHB quanto com os copolímeros P3HB-*co*-3HV e P3HB-*co*-3HHx (Tabela 3). Uma das empresas que trabalham para viabilizar a comercialização de PHA é a PHB Industrial S/A uma

empresa proprietária da marca BIOCYCLE®, que possui uma planta piloto para a produção de P3HB-*co*-3HV. Entretanto, há cerca de 15 anos em operação, a empresa ainda não conseguiu evoluir para produção industrial (45).

Tabela 3 - Propriedades comparadas de polímeros PHA em comercialização.

	P(3HB) Biomer P240	P(3HB) Biomer P226	P(3HB-co-3HV) Biopol	P(3HB-co-3HHx) Nodax,Kaneka
Propriedades físicas				
Densidade (g/cm3)	1.17	1.25	1.23–1.26	1.07–1.25
Transparência (%)			0.7	Pó branco, filme translucido
Propriedades mecânicas				
Resistência à tração (MPa)	18–20	24–27		10–20
Elongação para ruptura (%)	10–17	6–9		10–25
Resistencia flexural (MPa)	1000–1200	1700–2000	40	Muitas ordens de magnitude

3HB: ácido 3-hidroxibutirato, 3HA: ácido 3-hidroxialcanoato, 3HV: ácido 3-hidroxivalerato, 3HHx: ácido 3-hidroxihexanoatto. Fonte: Anjum (41)

O substrato oferecido à bactéria pode influenciar de 30-50% no custo de produto final, assim, muitos estudos foram realizados no sentido de testar diversas fontes de carbono a fim de diminuir o custo de produção dos PHAs, entre elas: melaço de cana-de-açúcar, xilose, bagaço hidrolisado de cana, lignina, melaço de soja, glicerol, amido, sacarose, triglicérides, óleo de soja, gás de síntese, gás natural entre muitos outros (39, 41, 46-50).

2.6 Controle de composição de PHA

Existem basicamente três fatores importantes para a obtenção de diferentes composições de PHA: substratos oferecidos no processo, vias metabólicas bacterianas para biossíntese de monômeros e a PHA sintase do hospedeiro. Qualquer manipulação de um dos fatores com objetivo de alcançar uma composição especifica de PHA deve levar em conta custos de um eventual processo industrial, entretanto, a experimentação é fundamental no sentido de alcançar uma otimização global do processo.

A maioria dos estudos de modificação de composição são realizados pela alteração dos substratos oferecidos à bactéria, essa é a maneira mais simples, pois não envolve trabalhos de biologia molecular nem de obtenção de mutantes. Essa estratégia pode também diminuir os custos de produção dependendo do substrato oferecido (20, 31, 39). Estudos de obtenção de P3HB-*co*-3HV e P3HB-*co*-3HHx utilizaram respectivamente o ácido propiônico e ácido hexanóico como cosubstrato para *Ralstonia eutropha* entre outras bactérias, assim, dependendo da concentração de ácido propiônico, varia-se a concentração de 3HV no copolímero (51, 52). Entretanto, os ácidos orgânicos de cadeia curta são geralmente tóxicos, não podendo ser oferecidos em altas concentrações. Além disso, no caso de *R. eutropha* e outras bactérias, a PHA sintase selvagem não é capaz de incorporar grandes frações de 3HV no copolímero (53-55).

As alterações de vias metabólicas para biossíntese de determinados monômeros foi também uma estratégia bastante explorada para produção de PHAs. Utilizaram-se, estratégias de *knockout* tanto através de métodos clássicos de mutação aleatória como os mais modernos por biologia molecular (16, 56, 57). Para a produção de copolímeros de P3HB-*co*-$3HA_{MCL}$, alguns trabalhos utilizaram *Pseudomonas* como hospedeiro para abrigar genes de biossíntese de monômeros 3HB, uma vez que a PHA sintase de *Pseudomonas* já possui a capacidade de incorporar altas frações de monômeros $3HA_{SCL}$ (15, 58). Wang (59) e colaboradores por extensivo trabalho de deleções gênicas chegaram a produzir homopolímeros contendo monômeros de cadeia média (6 a 14 carbonos na cadeia principal).

Modificações da enzima PHA sintase são as que produzem alterações mais drásticas na composição do PHA, sendo através de mutações sitio-dirigidas (60) ou da clonagem em outro organismo. Para tornar possível a produção de PHA em *Escherichia coli,* deve ser expressa uma PHA sintase pois esta bactéria não é naturalmente produtora de PHA. Assim, pela clonagem de PHA sintase em *E. coli* podem ser produzidos polímeros contendo monômeros de cadeia curta (61-63), polímeros contendo monômeros de cadeia média (63-65) ou copolímeros PHA_{SCL}-*co*-HA_{MCL} (10, 66, 67).

Em bactérias do gênero *Pseudomonas,* as modificações de PHA sintase permitiram a produção de copolímeros de $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL}$ utilizando carboidratos como única fonte de carbono (15, 58). Em nosso grupo, uma linhagem mutante de *Pseudomonas* sp. (LFM461) em sua PHA sintase obtida por Gomez

(16), incapaz de acumular PHA a partir de carboidratos e de ácidos graxos é usada como modelo para modificações e expressão de PHA sintases heterólogas. Gomes (15) utilizou LFM461 e inseriu diversas construções contendo o gene *phaC* de *Ralstonia eutropha* e concluiu que LFM461 é capaz de acumular $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL}$ com 95 mol% de 3HB. Sendo assim, LFM461 é capaz de suprir 3HB a uma PHA sintase que tenha especificidade por esses monômeros.

Uma nova maneira de controle de composição foi explorada por Aldor e Keasling (18) e Wong e colaboradores (19), que utilizaram um sistema de controle do fluxo metabólico de precursores ao PHA baseado no uso de um promotor modulável por IPTG. Desta maneira, o sistema é flexível a mudanças durante o cultivo e sem alteração de substratos oferecidos à bactéria. O gene controlado nos dois trabalhos foi *prpE* de *Salmonella enterica* que catalisa a reação de síntese de propionil-CoA controlando a fração de 3HV no copolímero P3HB-*co*-3HV. Aldor e Keasling conseguiram uma faixa de controle da fração de 3HV entre 2 e 25 mol% utilizando *S. enterica* como hospedeiro, enquanto que Wong e colaboradores conseguiram uma faixa de 5 e 18 mol% utilizando *E. coli*.

2.7 Ácido 3-hidroxipropiônico (3HP) e 3-hidroxibutírico (3HB) como precursores químicos de interesse comercial

Outra aplicação recentemente estudada relacionada aos PHA é a utilização de seus 3HA como precursores para a indústria química, também chamados de *building blocks* (68). O 3HP é uma molécula de difícil síntese química devido à instabilidade térmica e por isso sua síntese por via biológica é uma boa alternativa, em 2004 foi classificado como uma das 12 moléculas mais valorizadas produzidas a partir de biomassa pelo Departamento de Energia dos EUA. Além disso, pode ser utilizada para a produção de diversas moléculas de interesse comercial como ácido malônico, 1,3-propanodiol, ácido acrílico, propionolactona, 3-hidroximetil-propionato e diversos polímeros (69). O monômero de 3HB por apresentar isomeria ótica, (R)-3HB e (S)-3HB, pode ser utilizado como percursor em moléculas que exigem uma configuração estereoquímica específica como na indústria farmacêutica, aumentando assim o seu valor agregado (70).

Os monômeros 3HB e 3HP quando ligados a coenzima A estão confinados ao espaço citoplasmático, porém algumas enzimas possuem atividade de remoção da

coenzima A e substituição por um grupo hidroxila. A transformação de 3-hidroxialcanoil-CoA em 3-hidroxialcanoatos permite que a molécula seja permeável a membrana celular e em seguida excretada da célula para o meio de cultura.

2.8 Enzimas de biossíntese de ácidos 3HB e 3HP

Diversos genes já foram clonados e expressos a fim de viabilizar o processo de produção de 3HP em microrganismos (71). Segundo Adkins (68) apenas duas vias demonstraram ser promissoras até o momento: i) desidratação do glicerol a 3-hidroxipropionaldeído e em seguida oxidação a 3HP; ii) redução em dois passos sequenciais de malonil-CoA a 3HP em reações catalisadas pela malonil-CoA redutase NADPH codificada pelo gene *mcr* de *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635 (Figura 4, item C). Na primeira estratégia, Rathnasingh (48) atingiu a produção de 38,7 g/L, contudo com desvantagem de toxicidade do intermediário 3-hidroxipropionaldeído e a necessidade de suplementação com coenzima B12 ao se utilizar *E. coli*;, A segunda estratégia permitiu atingir 0,19 g/L utilizando uma transidrogenase para suprir NADPH.

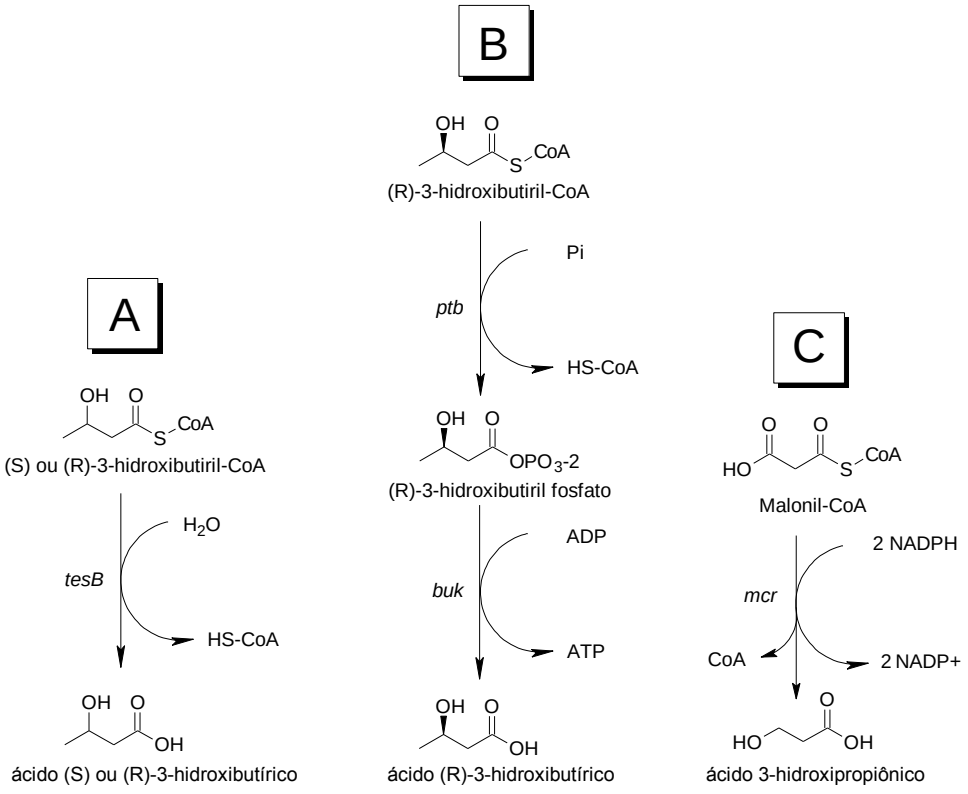

Figura 4 - Representação de vias de produção de ácidos 3-hidroxibutírico, em A e B, e 3-hidroxipropiônico, em C.

A produção estereoespecífica de (R)-3HB ou (S)-3HB depende também das enzimas utilizadas. Gao (72) publicou o primeiro trabalho de produção de (R)-3HB em *E. coli* utilizando os genes *phaAB* de *Ralstonia eutropha* e o *operon ptb-buk* de *Clostridium acetobutylicum* para catalisar a reação de 3HB-CoA para 3HB (Figura 4, item B). A linhagem de *E. coli* contendo estes genes conseguiu produzir 2 g/L em frascos agitados (72). Em outro estudo, foi utilizado o gene *tesB* de *E. coli* que codifica para uma tioesterase II e pode converter tanto precursores (R)-3HB-CoA quanto (S)-3HB-CoA, foram obtidos 2,92 e 2,08 g/L, respectivamente (70) (Figura 4, item A).

2.9 Lignina como substrato para a produção de PHAs e 3HAs.

Os substratos provenientes de matéria lignocelulósicos despertam grande interesse no Brasil por serem abundantes e de baixo custo, assim esses materiais tem oportunidade na produção de PHAs assim como de 3HA (39, 73, 74). Um dos componentes da lignocelulose é a lignina, que pode representar até 40% do material lignocelulósico. Atualmente, a celulose e hemicelulose estão sendo cada vez mais utilizados na produção de etanol de 1ª e 2ª geração, deixando a lignina cada vez mais interessante para ser utilizada como substrato em bioprocessos (20).

A lignina é um polímero formado por diferentes compostos aromáticos ligados entre si, a sua estrutura e composição são complexas e podem variar dependendo da planta e do processo utilizado na extração (21). Uma potencial utilização da lignina seria como fonte de carbono na produção de PHA por microrganismos capazes de catabolizar os compostos aromáticos presentes na lignina. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são conhecidas pela degradação de substratos aromáticos e são naturalmente produtoras de PHA_{MCL} (22).

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi construir uma linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM461 na qual se possa controlar a composição de monômeros 3HB e $3HA_{MCL}$ no copolímero produzido, visando futuramente um processo de produção de PHA que permita ao controlador do processo escolher precisamente as propriedades do material desejado.

Em estágio realizado no Joint Bioenergy Institute (JBEI, Berkeley, CA, EUA) foi buscado também o desenvolvimento de linhagens para a produção de 3HB e 3HP livres em solução utilizando linhagens de *Pseudomonas*. Foi também explorado o potencial de produção de PHA a partir de lignina como fonte de carbono.

3.1 Objetivos específicos

- Desenvolver um sistema gênico de expressão controlada em *Pseudomonas* sp. LFM461.
- Desenvolver um sistema de controle da biossíntese de monômeros de PHA para controle de composição do PHA produzido em *Pseudomonas* sp. LFM461.
- Verificar e analisar a capacidade de *Pseudomonas* sp. LFM461 consumir compostos derivados da hidrólise de lignina e analisar o perfil de acúmulo de PHA nesta condição.
- Avaliar a capacidade de *Pseudomonas* sp. LFM461 produzir 3HB e 3HP livres com a expressão de genes específicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e plasmídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados estão descritos na Tabela 4 e Tabela 5 respectivamente.

Tabela 4 - Linhagens utilizadas no trabalho.

Linhagens	Características	Referência
Pseudomonas sp. LFM 461	Mutante de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapaz de produzir PHA a partir de carboidratos e ácidos orgânicos	(Gomez, 2000)
E. coli DH5α	Mutante *endA*, *lacZ*ΔM15 e *recA1* utilizada para clonagem.	Invitrogen
E. coli S17-1	Contém os genes *recA* e *tra* do plasmídio RP4 integrados ao cromossomo	(75)
Pseudomonas putida KT2440	*P. putida* MT2 deriveda, rmo-; mod+	
Pseudomonas putida MT2	pWW0	
Delftia acidovorans ATCC15668		(76)

Tabela 5 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Características	Referênci
pBBR1MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5,144 Kb), Kmr.	(77)
pBBR1MCS-2::*mRFP1*	Plasmídeo pBBR1MCS-2 contendo o gene repórter mRFP1 sob controle do promotor P_{LAC}.	Este trabalho
pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacIq*	Plasmídeo pBBR1MCS-2::*mRFP1* contendo o gene repressor *lacI*^{q}.	Este trabalho
pCC-1	Plasmídeo com "backbone" de pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacIq*, contendo os genes phaAB e phaPC. Neste plasmídeo *mRFP1* foi substituído por *phaAB*.	Este trabalho
pCC-2	Plasmídeo pCC-1 editado, com trecho entre os genes *KanR* e *phaP* removida (região lac).	Este trabalho
pCC-3	Plasmídeo pCC-2 editado, com trecho entre os genes *phaC* e o promotor lac removida (região lac).	Este trabalho
pCC-4	Plasmídeo pCC-3 no qual o operon *phaPC* foi invertido	Este trabalho
pCC-5	Plasmídeo pCC-4 no qual foi removido a inserção de nucleotídeos entre o RBS e o códon de iniciação do gene *phaA*	Este trabalho
pBT-4	Plasmídeo para expressão bacteriana com gene que confere resistência a tetraciclina	Addgene® Cambridge, MA., EUA
pBT-4::*tesB*	pBT-4 contendo o gene *tesB* de *E. coli*	Este trabalho
pBT-4::*ptb-buk*	pBT-4 contendo o operon ptb-buk de Clostridium acetobutylicum	Este trabalho
pBT-4::*mcr*	pBT-4 contendo o gene mcr de Chloroflexus aurantiacus	Este trabalho

LFM - Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do ICB-USP; Km^{r} - possui o gene de resistência a canamicina.

4.2 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados ao longo deste trabalho estão apresentados nas nos itens em seguida e nas Tabelas 6 e 7.

- Meio Luria Bertani - LB

Tabela 6 - Composição do meio LB.

Componente	Concentração
Triptona	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
Cloreto de Sódio	10g/L

- Meio Mineral - MM

Tabela 7 - Composição do meio MM

Componente	Concentração
Na_2HPO4	3,5 g/L
KH_2PO_4	1,5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1,0 g/L
Solução de elementos traços*	1,0 mL/L
Citrato Férrico Amoniacal Sol. 6%	1,0 mL/L
$CaCl_2$. $2H_2O$ Sol. 1%	1,0 mL/L
$MgSO_4$. $7H_2O$ Sol. 20%	1,0 mL/L

*A solução de elementos traços continha: H_3BO_3 0,30 g/L; $CoCl_2$. $6H_2O$ 0,20 g/L; $ZnSO_4$. $7H_2O$ 0,10 g/L; $MnCl_2$. $4H_2O$ 0,03 g/L; $NaMoO_4$. $2H_2O$ 0,03 g/L; $NiCl_2$. $6H_2O$ 0,02 g/L; $CuSO_4$. $5H_2O$ 0,01 g/L.

- Meio mineral com compostos aromáticos:

O preparo dos ácidos ferúlico, cumárico e siríngico foi feito da seguinte maneira: o pó foi pesado e em seguida solubilizado em água e simultaneamente ajustado o pH para 7 com solução concentrada de hidróxido de sódio. Em seguida, a solução era adicionada a outra solução de MM 10 vezes concentrada (MM 10x) e diluída até ajustar o volume da solução final para 10 g/L de fonte de carbono.

- Meio mineral contendo lignina pelo processo DMR-EH

O pó de lignina obtido no processo de desacetilação/refinamento-mecânico e hidrólise enzimática (*deacetylation and mechnical-refining pretreatment and enzymatic hydrolysis*, DMR-EH) foi pesado para 10% (m/v) de sólidos. Em seguida, adicionado 2% (v/v) de hidróxido de sódio, a solução é esterilizada em reator com agitação a 121 ºC por 30 min. O pH da solução foi ajustado para 7 utilizando ácido clorídrico e em seguida centrifugado quatro vezes até que a fração não solúvel fosse removida, finalmente, a solução foi filtrada em membrana com poros de 0,45 μm. A solução final é denominada de *alcaline pretreated liquor* (APL) (Figura 4).

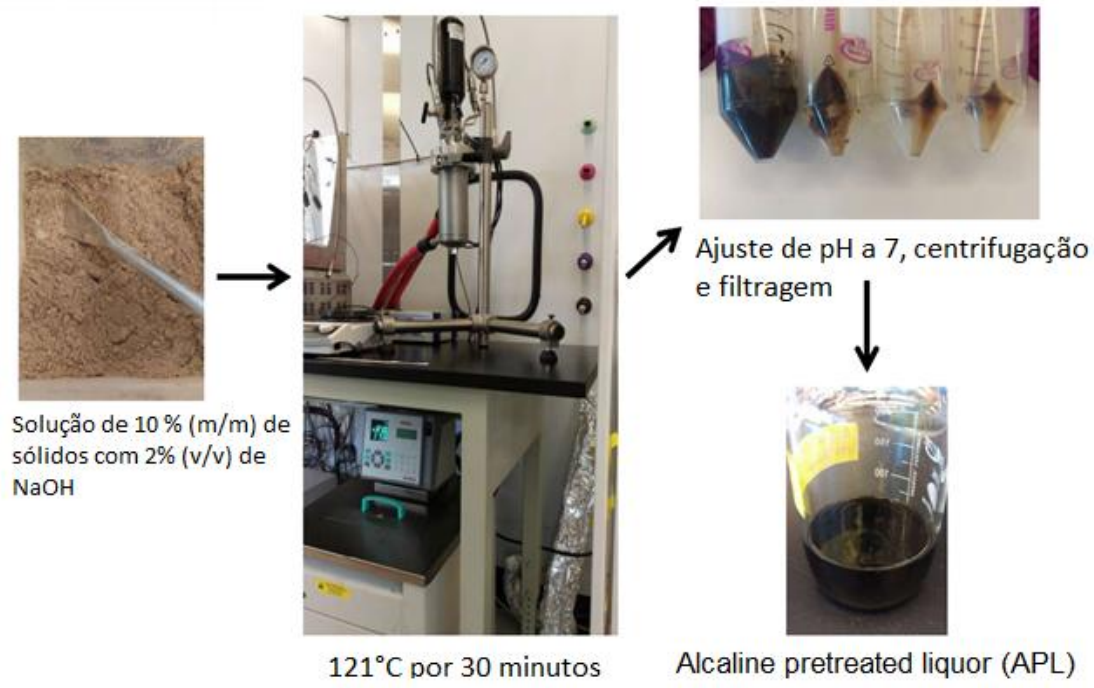

Figura 5 - Esquema de processo de pré-tratamento da lignina para obtenção do APL.

4.3 Oligonucleotideos

Na tabela 8 encontram-se todos os oligonucleotideos utilizados no trabalho de biologia molecular ao longo deste trabalho.

Tabela 8 - Lista de oligonucleotideos utilizados.

Primer	Sequência 5' – 3'	Sítio para enzima de restrição	Uso
M13 fw	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	-	Diversos
M13 rv	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	-	
LacISaccrt	ATTATAAGAGCTCTCACTGCCCGCTTTCCAGTC	SacI	Clonagem do gene *lacI*^{q}
P_LacI_Specrt	ATTACTACTAGTGGCATGCATTTACGTTGACAC	SpeI	
BamHIcrtbackbone	AATCTAGGATCCGCTCTCTACTAGAGTCACACTG	BamHI	Amplificação da estrutura do plasmídeo pBBR1MCS-2
ScaIcrtbackbone	TAGATTAGTACTTTTCTCCTCTTTCTCTAGTATG	ScaI	
BamHIcrphaAB	GGAATTGGATCCCGGCAGGTCAGCCCATATGCAG	BamHI	Amplificação do operon phaAB
ScaIcrtphaAB	AACCTTAGTACTATGACTGACGTTGTCATCGTATC	ScaI	
phaPC fw	ATCGAAGCTTGCGACCATAGAGCACAGAGGCT	HindIII	Amplificação do operon *phaPC e* remoção de regiões homólogas
phaPC rv	TACTCTAGAACCTCGAAGGGAGGCATGCTC	XbaI	

Tabela 8 (continuação) - Lista de oligonucleotideos utilizados.

Clear_HindIII_fw	GCTACTAAGCTTGAAGCCCAACCTTTCATA	HindIII	Remoção de regiões homológas
Clear_HindIII_rv	ATCGATAAGCTTGCGACCAT	HindIII	
Clear_XbaI_fw	AATTATCTCTAGAACCTCGAAGGG	XbaI	
Seq_HindIII	GCTGTGGCCCTTGGTGGCGTTG	-	Sequenciamento
Seq_XbaI	AGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTA	-	
qPCR-phaA-fw	CCATGACCATCAACAAGGTG	-	RT - qPCR
qPCR-phaA-rv	AACTGGAGTCGGTTCAGGTG	-	
pCC-3_to_4 fw	AGTGTCAAGCTTTCGAAGGGAGGCATGCTCAT	HindIII	Construção de pCC-4
pCC-3_to_4 rv	CATCTTTCTAGATCCACCTGATGGGACGCGGG	XbaI	
pCC-4_to_5 fw	AAGGTGGCTAGCTTTCTCCTCTTTCTCTAGTA	NheI	Construção de pCC-5
pCC-4_to_5 rv	CATAATGCTAGCATGACTGACGTTGTCATCGT	-	
qPCR-tesB-fw	GCTGAACCTGGAGAAGATCG	-	RT-qPCR
qPCR-tesB-rv	ATGATCGGCTTCTTGCTGTC	-	
qPCR-ptb-buk-fw	TGAAGGTCAAGAGCAAGGAAA	-	
qPCR-ptb-buk-rv	CACGATCTCGAAGTCGTTCA	-	
qPCR-glk-fw	ATTGTTGGTGAAGCGGAAAT	-	
qPCR-glk-rv	AACTGGAGTCGGTTCAGGTG	-	

4.4 Condições de cultivo

As culturas microbianas de *E. coli,* contendo os diferentes plasmídeos, assim como de *Pseudomonas* sp. LFM461, foram cultivadas em meio líquido ou sólido Luria Bertani (LB), contendo antibióticos quando necessário. As culturas microbianas de *Pseudomonas* sp LFM461, contendo os diferentes plasmídeos, também foram cultivadas em meio mineral (MM) líquido ou sólido, contendo os antibióticos, quando requeridos. As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37 ^{o}C, sob agitação de 150 rpm e as de *Pseudomonas* sp. LFM461 foram cultivadas a 30 ^{o}C, com agitação de 150 rpm.

4.5 Manipulação genética e sequenciamento

As extrações de DNA, construção de iniciadores e visualização do DNA foram feitas segundo instruções dos fabricantes. As construções plasmidiais foram realizadas na linhagem E. coli DH5α e em seguida transferidos para as linhagens *E. coli* MG1655 e *Pseudomonas* sp. LFM461 por eletrotransformação de acordo com os parâmetros definidos por Choi e Schweizer (78). Extração de RNA total e PCR quantitativo do cDNA (RT-qPCR) RNA foi realizada com tempos de 5, 9 e 24 horas após indução por IPTG utilizando o kit Direct-zol™ (Zymo Research®). Foram utilizados kit de reação de transcriptase reversa da iScript (Bio-Rad®), kit SsoAdvanced Universal SYBR (Bio-Rad®) para qPCR em tempo real no termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems®).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (Mastercycler Gradient, marca Eppendorf) com GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) para PCR de detecção e Phusion High Fidelity (Thermo Scientific) em reações para clonagem, ambos seguindo as instruções do fabricante. As reações de digestão foram executadas com enzimas de restrição do tipo FastDigest® (Fermentas Life Sciences) e as reações de ligação utilizaram a enzima T4 DNA Ligase, de acordo com o protocolo do fabricante (T4 DNA Ligase Blue/White cloning qualified, Promega, Madison, EUA).

Os sequenciamentos foram feitos no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP, com o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, USA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

4.6 Expressão do gene repórter

Avaliou-se o controle da expressão do gene *mRFP1* na linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q}. Como linhagens controles deste experimento, foram utilizadas *Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2 (controle negativo) e *Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2::P_{LAC}*mRFP1* (controle positivo, ou seja, sem o repressor *lacI*^{q}).

Os experimentos para avaliar a expressão gênica foram realizados em meio mineral contendo glicose (4 g/L) como fonte de carbono. A linhagem experimental (*Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2::P_{LAC}*mRFP1+lacI*^{q}) foi cultivada com diferentes concentrações de IPTG (0 – 200 μM) e as linhagens controle foram cultivadas sem adição de IPTG. Os cultivos (triplicata) foram realizados em tubos cônicos de 50 mL, sob agitação (150 rpm, 30 ^oC, 16 horas). Após incubação, as culturas foram transferidas para placas de 96 poços em quadruplicata (compondo triplicata biológica e quadruplicata analítica de cada condição experimental avaliada) e realizadas medidas em fluorímetro (Synergy HT Biotec®), utilizando filtro de excitação de 530/25 nm e de 590/35 para emissão. Os valores de fluorescência foram ponderados pela densidade ótica a 600nm de cada amostra, obtendo-se assim a fluorescência relativa.

4.7 Produção de PHA.

Colônias obtidas em meio sólido (LB – 24 horas) foram transferidas para um meio líquido complexo (LB), incubadas em agitador rotativo por 24h. Em seguida, esta cultura foi utilizada para inocular meio mineral (79) com glicose (MMG) como fonte de carbono (15 g/L), limitado na fonte de nitrogênio ($(NH_4)_2SO_4$ - 1,0 g/L) e adicionado de diferentes concentrações do indutor (IPTG). O cultivo em meio mineral estendeu-se por 72 horas. Foram determinados nestes experimentos: massa seca celular (gravimetria), teor e composição de PHA acumulado (cromatografia gasosa).

Em experimentos com adição de indutor isopropiltiogalactosídeo (IPTG) a adição era feita juntamente com a transferência da cultura para o MMG. De acordo com experimentos de Wong (2008), a adição de IPTG no inicio da fase log é o momento mais indicado para o controle de composição de copolímero.

4.8 Massa seca celular

A massa seca celular (MSC) foi determinada gravimetricamente após centrifugação de volume conhecido da cultura, lavagem e liofilização do material.

4.9 Teor e composição de PHA

A quantidade e composição de PHA foram determinadas por cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (95), em cromatógrafo gasoso 7890A (Agilent) equipado com uma coluna HP-1 (5% fenil-metil-siloxano, comprimento 30 m, diâmetro 0,32 mm, espessura do filme 0,25 μm) e com sistema de detecção por ionização de chama (FID).

Durante estágio no JBEI foi utilizado cromatografia a gás Focus GC (ThermoFisher) equipada com coluna DB-5 e detector FID. Método de corrida iniciou-se com 120 ºC por 3 minutos seguido de aumento de 7º/minutos até atingir 250 ºC e finalmente 250 °C por 5 minutos.

5 RESULTADOS

5.1 Construção do plasmídeo repórter

Para avaliar o funcionamento do par promotor/repressor do *operon* da lactose de *Escherichia coli* (P_{LAC}/*lacI*^{q}) em *Pseudomonas* sp. LFM461, foi utilizado o gene repórter *mRFP1* (monomeric Red Fluorescent Protein). A construção foi feita a partir de dois plasmídeos iniciais: pBBR1MCS-2, que possui resistência a canamicina e capacidade de se replicar em *Pseudomonas* sp. LFM461; e pSB1K3 contendo o *Biobrick RFP Coding Device* (código do biobrick: BBa_J04450), que consiste no promotor lac seguido de sítio de ligação ao ribossomo (RBS – *ribossome binding site*) e a sequência codificante da proteína vermelha fluorescente *mRFP1*. O procedimento de clonagem do gene *mRFP1* no pBBR1MCS-2 consistiu em dupla digestão com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Spe*I em ambos os plasmídeos seguido de um passo de ligação e inserção de DNA por transformação em *E coli* DH5α. As colônias transformantes que apresentaram coloração avermelhada foram selecionadas e submetidas a PCR utilizando iniciadores M13 para confirmar a clonagem. O plasmídeo resultante foi chamado de pBBR1MCS-2::*mRFP1*. Para a inserção do gene repressor *lacI*^{q}, foi realizada a amplificação do gene por PCR a partir do plasmídeo pTrc (Life Technologies do Brasil Ltda, São Paulo SP., Brasil) com iniciadores contendo enzimas de restrição *SpeI* e *SacI* nas extremidades. Em seguida, o produto de PCR foi digerido e ligado no plasmídeo pBBR1MCS-2::*mRFP1* previamente digerido com as mesmas enzimas. O produto da ligação foi então inserido por transformação para *E. coli* DH5α. Foram selecionadas colônias brancas para a confirmação da clonagem através de PCR de colônia utilizando os mesmos iniciadores utilizados na amplificação do gene *lacI*^{q}. O plasmídeo resultante foi denominado pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q} (Figura 5) que foi transferido para *Pseudomonas* sp. LFM461 juntamente com o pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-2::*mRFP1*, todos utilizando eletroporação. As regiões próximas aos sítios de restrições dos plasmídeos modificados foram sequenciados para confirmação dos insertos desejados (dados não apresentados).

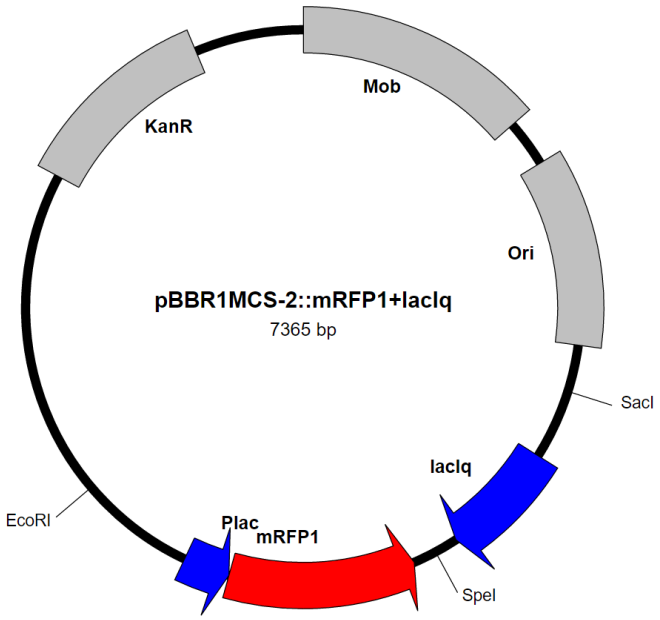

Figura 6 - Esquema representativo do pBBR1MCS-2::mRFP1+*lacI*^{q} utilizado para os ensaios de expressão gênica.

5.2 Avaliação do controle da expressão gênica em *Pseudomonas* sp. LFM461.

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q} apresentou, para concentrações crescentes do indutor (IPTG) de até 200 μM no meio de cultura, uma resposta crescente de fluorescência relativa (Figura 6). Foram testadas concentrações de até 500 μM, mas a partir de 200 μM, não foi percebido nenhum aumento do nível de fluorescência e, portanto, foi atingido o nível máximo de expressão que o sistema é capaz de promover. Para *Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q}, o valor de fluorescência encontrado com 200 μM de IPTG não atingiu o mesmo nível encontrado no controle positivo (*Pseudomonas* sp. LFM 461 pBBR1MCS-2::*mRFP1*), com cerca de 43% do valor máximo, provavelmente isso acontece devido a uma deficiência no transporte do IPTG para o interior da célula, uma vez que *Pseudomonas* não possuem transportadores de lactose (80). Foi também detectado um vazamento da expressão de cerca de 10% em relação ao valor máximo.

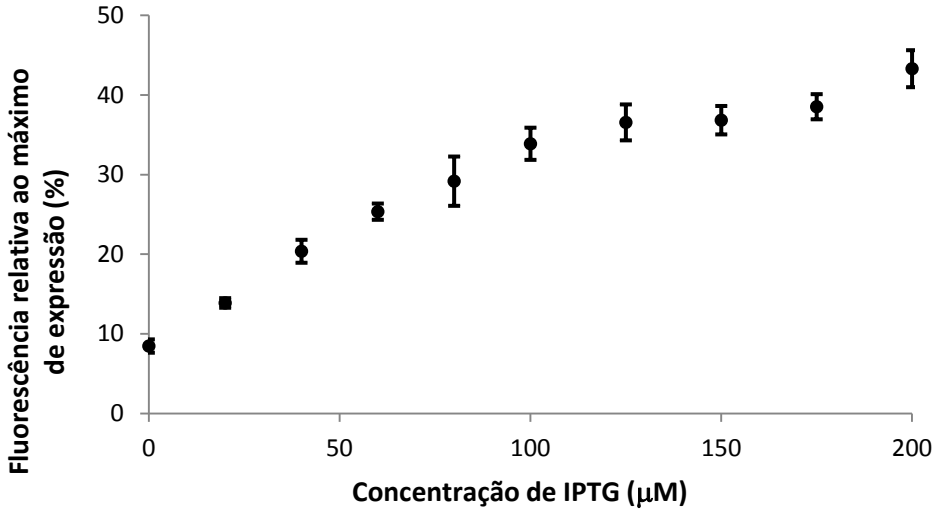

Figura 7 - Resposta da fluorescência relativa a DO em relação a diferentes níveis de indutor (IPTG) na linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q}. A linhagem contendo o pBBR1MCS-2::*mRFP1* foi utilizada como controle positivo e de expressão máxima e a linhagem contendo pBBR1MCS2 como controle negativo e de fluorescência basal.

5.3 Construção do plasmídeo pCC-1

Como o sistema P_{LAC}*lacI*^{q} foi considerado funcional em *Pseudomonas* sp. LFM461, este sistema de controle poderia ser utilizado para controle de vias de biossíntese de PHA. Assim, o plasmídeo pBBR1MCS-2::P_{LAC}*mRFP1+lacI*^{q} foi alterado com a inserção de dois *operons* de biossíntese de PHA: i) *operon phaAB* de *Ralstonia euthropha* sob controle do promotor P_{LAC} do *RFP coding device*, ii) *operon phaP* e *phaC* de *Aeromonas hydrophyla* sob controle do promotor nativo destes genes. Esse plasmídeo foi denominado plasmídeo de controle de copolímero (pCC-1) (Figura 7).

A construção do pCC-1 foi feita da seguinte forma: uma primeira reação de PCR foi desenhada para linearizar um trecho do plasmídeo pBBR1MCS-2::P_{LAC}*mRFP1+lacI*^{q} e remover a sequência codificante do gene *mRFP1.* Esse trecho foi chamado de *backbone*. O *backbone* continha em uma extremidade um sítio de restrição para a enzima *ScaI* adjacente a sequência *Shine-Dalgarno* do promotor P_{LAC}, Na outra extremidade do fragmento linear, o *backbone* possuía um sítio para a enzima *BamHI.* Assim, a primeira reação de ligação foi do *backbone* linear digerido com enzimas de restrição *ScaI* e *BamHI* juntamente com o produto de PCR do *operon phaAB* de *Ralstonia euthropha* digerido com estas mesmas enzimas. A ligação foi inserida por eletrotransformação em *E. coli* DH5α. O

plasmídeo resultante foi então sequenciado e em seguida usado para a inserção do *operon phaPC*. Para isso, foi amplificado o *operon phaPC* proveniente do plasmídeo *pBBR1MCS-2::phaPC*$_{A.h}$, adicionando sítios *XbaI* e *HindIII* ao produto de PCR. A reação de ligação do operon *phaPC* ao plasmídeo contendo o backbone do pBBR1MCS-2::P_{LAC}*mRFP1+lacI*^{q} e o *operon phaAB* foi feita após digestão com as enzimas *XbaI* e *HindIII* e ligação com T4 DNA ligase. Os clones foram então identificados e confirmados por sequenciamento.

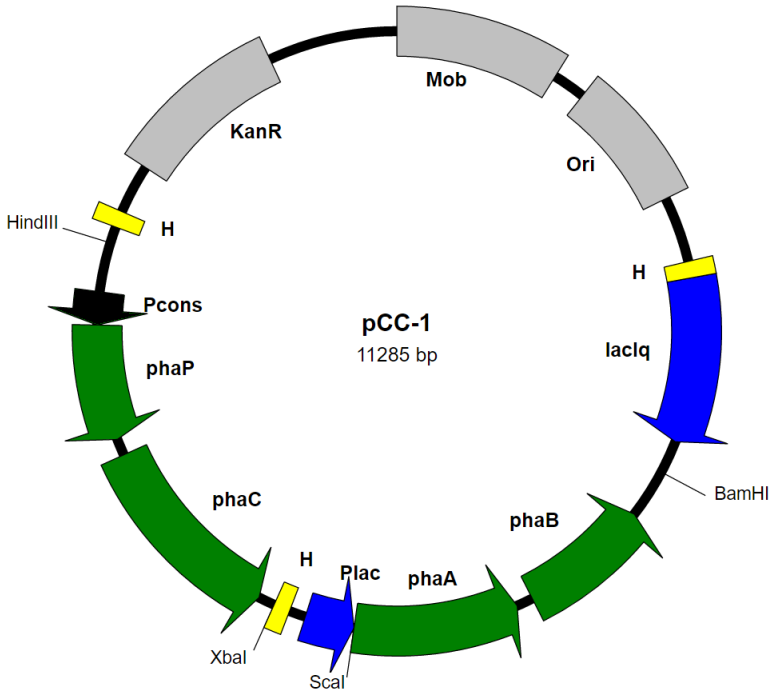

Figura 8 - Representação do plasmídeo pCC-1. Em verde, genes relacionados à biossíntese de PHA; em azul, trechos reguladores da expressão; em amarelo, regiões homólogas; em cinza genes originais de pBBR1MCS-2, em preto promotor constitutivo do *operon phaPC*.

5.4 Ensaio de produção de PHB

Como um teste preliminar, o pCC-1 foi então utilizado para avaliar seu potencial de promover o acúmulo de PHB em *E. coli* MG1655. A linhagem *E. coli* MG1655 não é capaz de suprir monômeros HA_{MCL} ou 3HB e, portanto, a resposta esperada com indução gradativa do *operon phaAB* é um aumento do teor de PHB acumulado. As concentrações testadas do indutor (IPTG) foram 100, 150, 200 e 250 μM. Observou-se um aumento no teor de PHB acumulado pela linhagem *E. coli* MG1655 expressando o plasmídeo pCC-1, em resposta ao aumento da

concentração do indutor (Figura 8), sugerindo que a indução de expressão crescente do operon *phaAB* foi obtida.

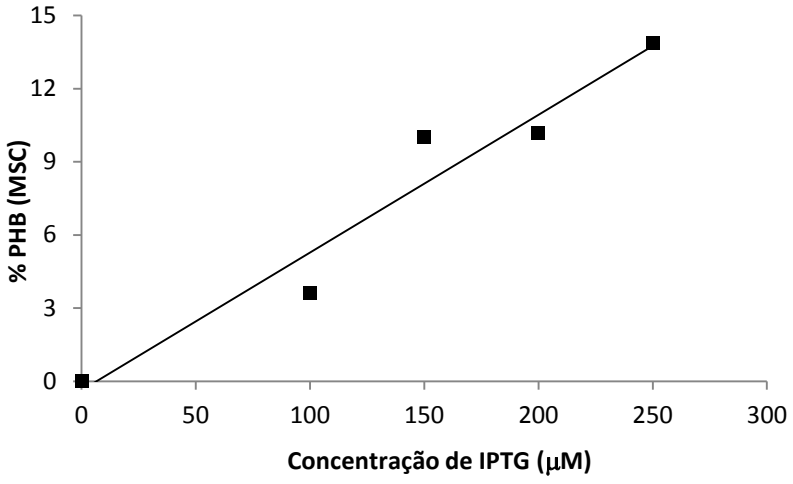

Figura 9 - Acúmulo de P3HB em *E. coli* MG1655 quando a expressão dos genes *phaAB* foi induzida com diferentes concentrações de IPTG.

5.5 Transformação de *Pseudomonas sp.* LFM461 com pCC-1

Em seguida, foi feita a tentativa de inserção do plasmídeo pCC-1 em *Pseudomonas* sp. LFM461 por eletrotransformação e por conjugação, utilizando a linhagem *E. coli* S17-1 como doadora desse plasmídeo. Após várias tentativas de inserção do pCC-1 em *Pseudomonas sp.* LFM 461, o plasmídeo não se mostrou capaz de promover acúmulo de PHA. Após análise do perfil de restrição do plasmídeo recuperado da linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461, verificou-se uma perda de grande parte do plasmídeo (Figura 9). O plasmídeo pCC-1 proveniente de *Pseudomonas* sp. LFM 461 foi inserido novamente em *E. coli* MG1655, porém, ao contrário do esperado, a linhagem não ganhou a capacidade de acumular PHB como anteriormente, quando o plasmídeo foi inserido diretamente a partir de *E coli.* DH5α.

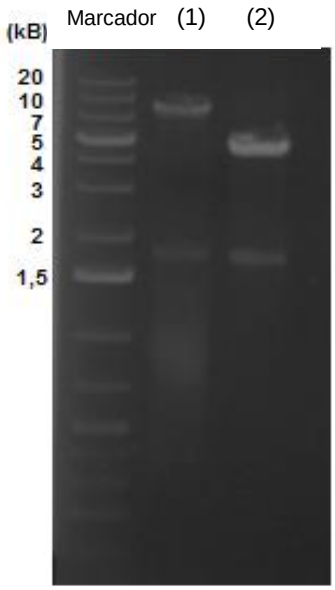

Figura 10 – Eletroforese em gel (1%) do Plasmídeo pCC-1 extraído de *E. coli* DH5α (Coluna 1) e de *Pseudomonas sp.* LFM461 (Coluna 2), ambos digeridos com enzima de restrição *PstI*.

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-1 apresentava resistência à canamicina, indicando que parte do plasmídeo original ainda deveria estar presente. A hipótese levantada para o fenômeno é que o plasmídeo pCC-1 poderia estar sofrendo recombinação homóloga intraplasmidial no hospedeiro *Pseudomonas* sp. LFM461. O plasmídeo pCC-1 apresenta três trechos de 90 nucleotídeos idênticos em sua sequência, conforme indicado na Figura 7. Em *E. coli* DH5α a recombinação intraplasmidial não estaria ocorrendo devido a inativação de recombinases nesta linhagem, porém, ao passar por *Pseudomonas* sp. LFM461, este plasmídeo estaria sendo modificado.

5.6 Remoção de regiões homólogas

A estratégia para solucionar o problema foi remover os trechos homólogos entre os genes *kanR* e *phaP,* formando o plasmídeo intermediário pCC-2, e, em seguida, o segundo trecho entre o promotor lac e o gene *phaC,* formando o plasmídeo pCC-3, como ilustra a Figura 10. Para isso, foram desenhados iniciadores nos quais o sítio de anelamento encontra-se nos flancos das regiões homólogas e com a ponta 5’ dos iniciadores de encontro entre si. Para a remoção da região homóloga entre os genes *kanR* e *phaP* foram desenhados iniciadores que removiam 508 pb do pCC-1. Já para o segundo trecho, o tamanho removido foi de 93 pb.

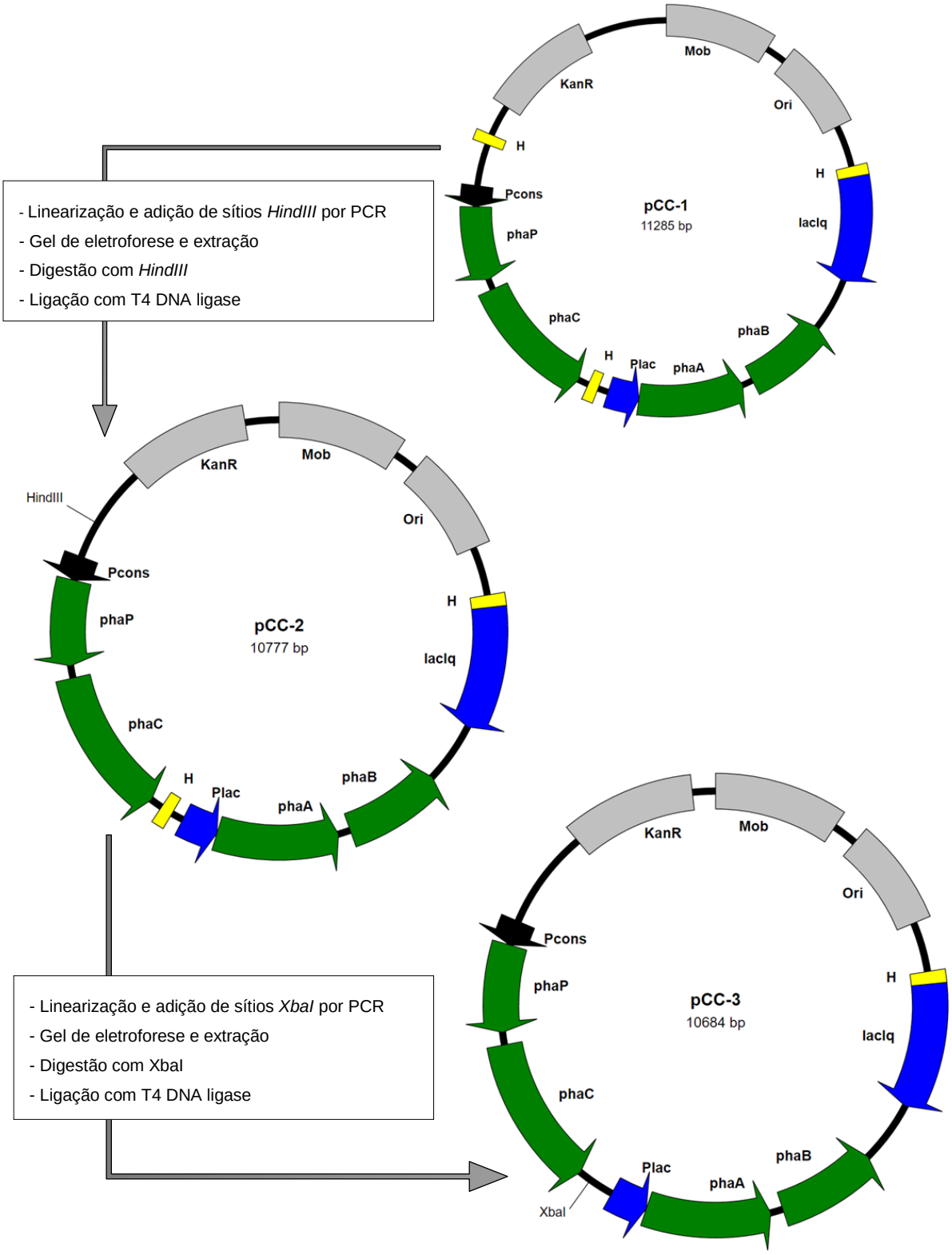

Figura 11 - Esquema representativo da remoção dos trechos de homologia presentes no pCC-1.

Para a confirmação da deleção, as regiões foram sequenciadas nos plasmídeos pCC-1 e pCC-3 e os resultados confirmaram a remoção das regiões homólogas (dados não apresentados).

5.7 Inserção de pCC-3 em LFM461

O plasmídeo pCC-3 foi inserido em *Pseudomonas* sp. LFM461 por eletrotransformação, recuperados dessa bactéria e analisado seu perfil de restrição. A Figura 11 mostra que o padrão de bandas de pCC-3 digerido com enzima *PstI* quando retirado do hospedeiro *Pseudomonas* sp. LFM461 foi igual ao obtido de *E. coli* DH5α, assim, indicando que o plasmídeo estava íntegro, permitindo a sua manutenção em *Pseudomonas* sp. LFM461. Essas alterações confirmaram a suspeita de recombinação intraplasmidial do pCC-1 em *Pseudomonas* sp. LFM461.

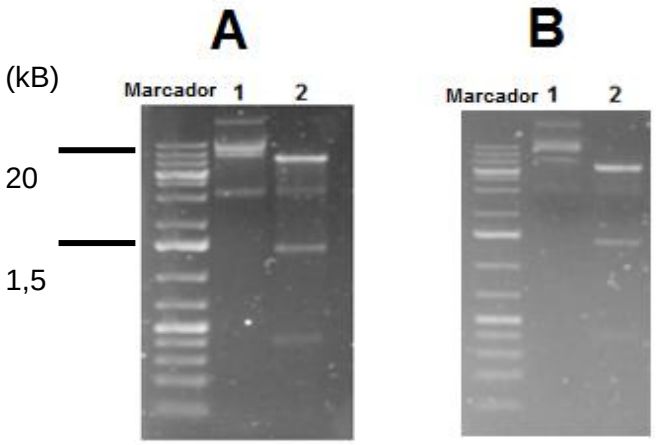

Figura 12 - Em A: Gel de eletroforese do plasmídeo pCC-3 extraído de *Pseudomonas* sp. LFM461. Na coluna 1 o plasmídeo sem digestão e na coluna 2 digerido com enzima *PstI*. Em B: Gel de eletroforese do plasmídeo pCC-3 extraído de E. coli DH5α, sendo coluna 1 sem digestão e coluna 2 digerido com enzima *PstI*

5.8 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-3

A linhagem de *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando o pCC-3 obteve sucesso no acúmulo de PHA com teor de cerca de 40% da MSC, sendo um valor maior do que o encontrado no controle positivo (*Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando o pBBR1MCS-2::*phaPC*) com 21% da MSC. Entretanto, a indução por IPTG do *operon phaAB* não promoveu uma mudança significativa na composição do polímero como era esperado, com menos de 2 mol% de 3HB de aumento quando induzido com 200 μM de IPTG (Figura 12).

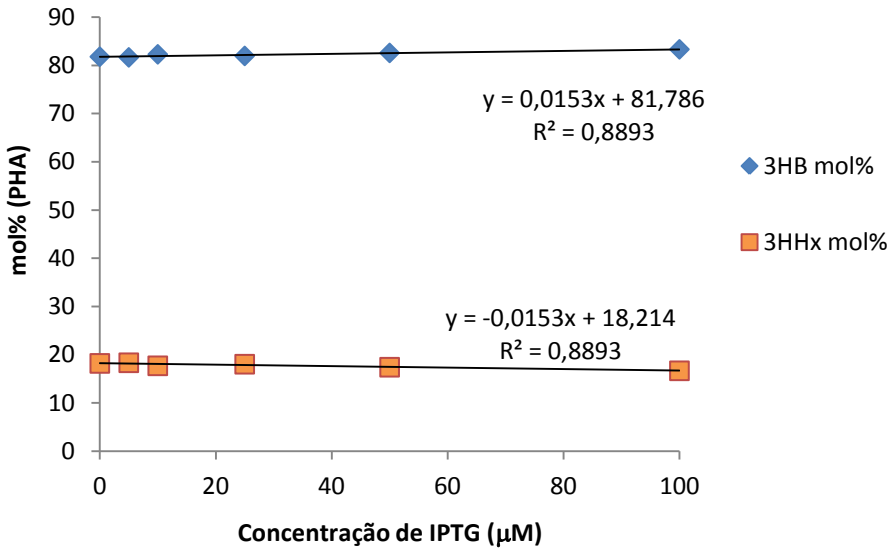

Figura 13 - Variação da composição do copolímero P3HB-co-3HHx em *Pseudomonas* sp. LFM 461 pCC-3 quando submetida a diferentes níveis de indução por IPTG.

5.9 Construção do pCC-4.

No pCC-3, os *operons phaPC* e *phaAB* estão orientados na mesma direção, e portanto, o promotor constitutivo do *operon phaPC* está a 5' (montante) e assim pode induzir a expressão do *operon phaAB,* que em condições sem indução deve ser reprimido. Caso isso ocorresse, o controle do P_{LAC} na expressão do *operon phaAB* estaria prejudicado, pois levaria a um vazamento na expressão dos genes *phaAB* independente da indução por IPTG. De fato, quando se analisa a produção de PHB na linhagem recombinante *E. coli* MG1655 pCC-1, se verifica uma produção deste polímero sem a indução com IPTG (Tabela 9). O pCC-3 então foi modificado com a inversão da orientação do *operon phaPC,* obtendo-se assim o pCC-4. Essa modificação foi realizada com a ligação de produtos de PCR do *operon phaPC* e do *backbone* do pCC-3, ambos previamente digeridos com as enzimas de restrição *Xba*I e *Hind*III (Figura 13).

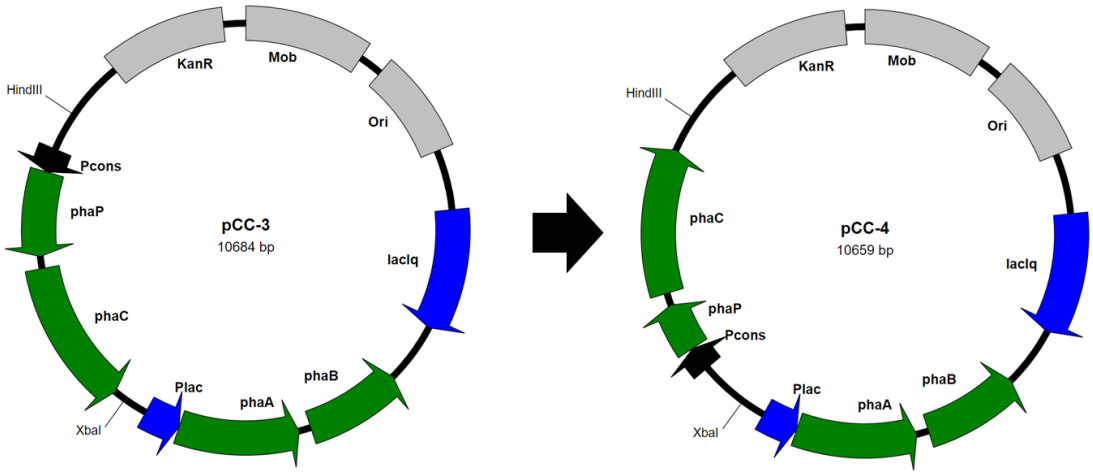

Figura 14 - Esquema representativo da modificação realizada para a construção do pCC-4. A alteração que foi realizada é a inversão da orientação do *operon phaPC*.

5.10 Produção de PHA por *E. coli* MG1655 pCC-3 e pCC-4.

Para testar a capacidade do pCC-4 de promover, em *E. coli*, a produção de PHB, o plasmídeo foi inserido na linhagem MG1655 a qual foi submetida a condições de acúmulo de PHB. Esse experimento foi feito em duplicata biológica como forma de teste de funcionamento do pCC-4 e os resultados estão demonstrados na Tabela 9.

Tabela 9 - Acúmulo de PHA e crescimento celular em *E. coli* MG1655 expressando pCC-3 ou pCC-4 sob condições de indução ou não por IPTG.

Plasmídeo	Adição de IPTG (200 μM)	MSC (g/L)	PHA (%MSC)
pCC-3	Não	1,30 ± 0,36	6,91 ± 2,62
	Sim	2,90 ± 0,16	50,43 ± 2,65
pCC-4	Não	1,14 ± 0,40	0,00
	Sim	2,17 ± 0,01	34,84 ± 3,09

Quando comparada com a linhagem abrigando o pCC-3, a linhagem *E. coli* MG1655 abrigando o pCC-4 obteve maior sucesso no controle de expressão. Em condição de não indução, as modificações realizadas mostraram-se capazes de reduzir a expressão gênica de forma a deixar indetectável o nível de PHB produzido pela célula. Da mesma forma que foi reduzida a expressão em condições de não indução (vazamento), também foi reduzida em condições de indução, sendo assim, o teor máximo detectado foi de 50,43% para 34,84%. Estes resultados, em conjunto,

corroboram a hipótese de que o promotor original do operon *phaPC* estaria dirigindo um vazamento da expressão dos genes *phaAB* no plasmídeo pCC-3.

5.11 pCC-4 na produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461

Um ensaio de produção de PHA foi realizado com cultivo de *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando o pCC-4 no qual foi avaliada a resposta da composição do PHA em diferentes concentrações de IPTG. Esse experimento foi realizado em triplicatas biológicas e a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 sem plasmídeo foi utilizada como controle negativo em relação à produção de PHA. Os resultados estão representados na Figura 14.

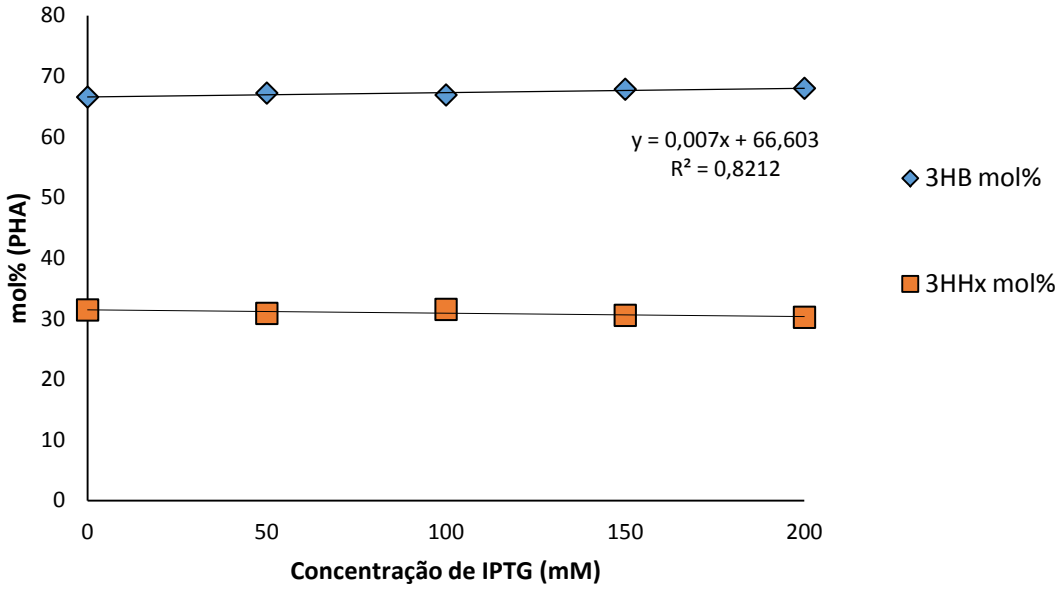

Figura 15 - Perfil de composição de PHA acumulado por *Pseudomonas* sp. LFM 461 pCC-4 quando cultivada com diferentes concentrações de IPTG.

A indução por IPTG não teve efeito em alterar a composição do PHA produzido, assim, esse resultado é similar ao encontrado com o pCC-3 quando expresso na mesma linhagem. Entretanto, uma diferença deve ser destacada. Enquanto, a expressão de pCC-4 levou ao acúmulo de PHA contendo cerca de 30 mol% de 3HHx, com a expressão de pCC-3 obteve-se um PHA contendo cerca de 20 mol% de 3HHx. Estes resultados são compatíveis com a expressão de *phaAB* serem regulados pelo vazamento do promotor de *phaPC* no plasmídeo pCC-3.

5.12 Construção do pCC-5

Depois de detalhada investigação utilizando sequenciamento, uma inserção de nove nucleotídeos foi identificada entre o sítio de ligação do ribossomo (RBS) e o códon de início do gene *phaA* no plasmídeo pCC-4. Ou seja, a distância original entre o RBS e o códon de inicio do gene *phaA* é de seis nucleotídeos, porém, foi identificado uma distância de quinze nucleotídeos. Essa inserção poderia estar afetando a tradução deste gene em sua proteína.

Para eliminar essa inserção foram desenhados dois iniciadores com sítios *NheI* para remoção por PCR. A remoção foi realizada por amplificação do pCC-4 com iniciadores com suas pontas 5' orientados entre si e desenhados para excluir por amplificação a inserção identificada, retornando assim a distância planejada de seis nucleotídeos. Em seguida, o produto de PCR foi digerido com enzima *NheI* e ligado a si mesmo. A confirmação da modificação realizada foi feita por sequenciamento e o plasmídeo resultante foi nomeado pCC-5.

5.13 Produção de PHA por *E. coli* MG1655 pCC-5

Foi feito um teste preliminar de produção de PHA utilizando a linhagem *E. coli* MG1655 pCC-5 em condição de indução do sistema de controle de expressão do *operon phaAB*. O ensaio de produção foi realizado como descrito anteriormente para os plasmídeos pCC-3 e pCC-4 quando inseridos em *E. coli* MG1655. O resultado deste experimento em comparação com os outros realizados anteriormente está presente na Figura 15.

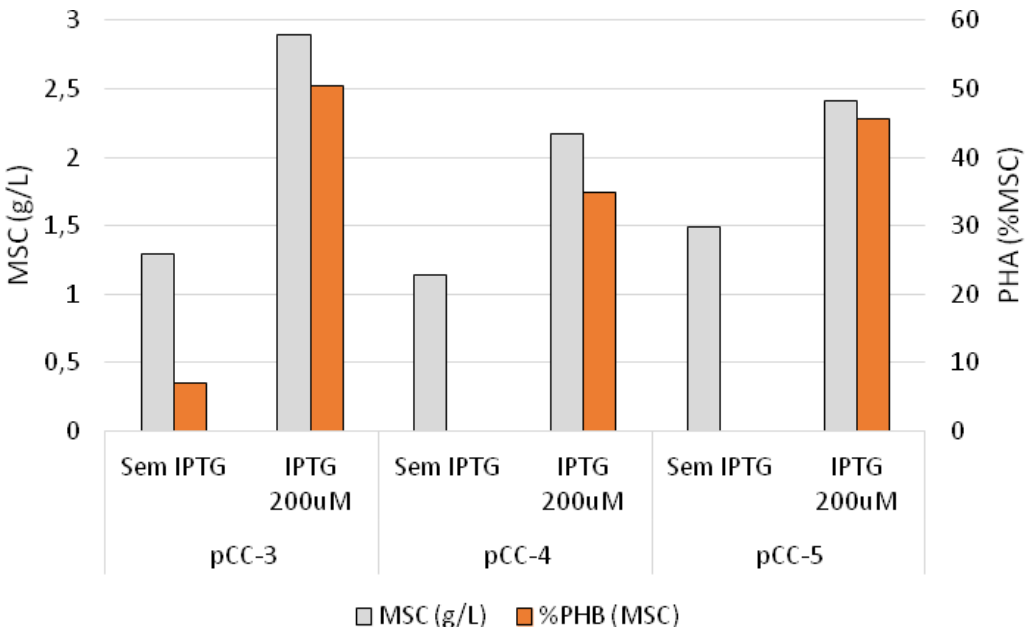

Figura 16 - Comparação entre diferentes versões do pCC quanto a perfil de crescimento e acúmulo de PHA em condições de repressão e indução na linhagem *E. coli* MG1655. Barras de erro com desvio padrão não foram inseridas pelo baixo desvio padrão encontrado (menor que 5% da média dos valores)

Como esperado, não foi detectado acúmulo de PHA por *E. coli* MG1655 pCC-5 quando esta não foi induzida por IPTG no seu meio de cultivo, e também foi detectado acúmulo em condições de indução com IPTG 200 μM. Porém, foi notável que esta linhagem teve desempenho superior àquelas abrigando os plasmídeos das outras duas versões, além de manter a característica de completa repressão do *operon phaAB* em condições de não indução, esta linhagem apresentou níveis melhores de acúmulo quando induzido. Assim, podemos concluir que as modificações realizadas para obter o pCC-5 foram bem-sucedidas.

5.14 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-5

O pCC-5 foi então inserido em *Pseudomonas* sp. LFM461 e a linhagem resultante foi submetida a ensaio de acúmulo para avaliar a capacidade do novo plasmídeo de controlar a composição do PHA (Figura 16).

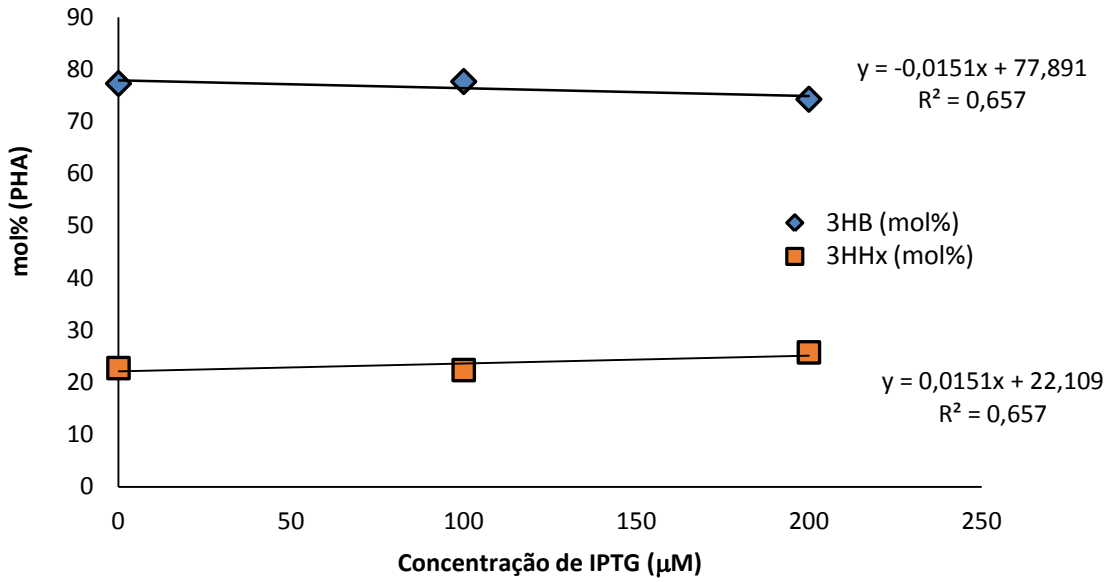

Figura 17 - Perfil de composição de PHA em resposta a indução por IPTG na linhagem LFM461 pCC-5.

Assim como encontrado nos experimentos anteriores expressando os plasmídeos pCC-3 e pCC-4 em *Pseudomonas* sp. LFM461, o plasmídeo pCC-5 não foi capaz de promover uma mudança significativa na composição do PHA quando induzido por IPTG. Além do experimento padronizado com retirada de amostra 72 horas após o inoculo em MMGK, foram realizados ensaios de produção com retirada de amostras com 24 e 48 horas após inoculo em MMGK. Esses experimentos foram realizados com a intenção de investigar uma possível mudança na composição do polímero em momentos intermediários da fase de acúmulo. Entretanto, nenhuma mudança de composição foi observada nestes experimentos também.

5.15 Atividade enzimática de β-cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase

A fim de identificar e corrigir um problema da indução da expressão gênica do sistema P_{LAC}/*phaAB,* foram medidas as atividades enzimáticas das enzimas β-cetotiolase, derivada do gene *phaA* e acetoacetil-CoA redutase, derivada do gene *phaB,* foram determinadas em condições de indução e não indução. As diferenças nos resultados obtidos não foram consideradas significativas após a repetição de diversas amostras biológicas. A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM 461 pCC3, mesmo com indução da expressão de *phaAB* com 200 μM de IPTG, apresentou atividades enzimáticas aproximadamente 100 vezes menores que o valor de atividade observada no controle positivo, ou seja, expressando o plasmídeo pBBR1MCS-

2::*phaCAB*$_{Re}$, no qual a expressão dos genes *phaAB* é controlada pelo promotor original do operon *phaCAB* de *Ralstonia eutropha*. Este resultado sugere que o promotor lac não estaria promovendo a expressão de *phaAB* em *Pseudomonas* sp. LFM461.

5.16 RT-qPCR de LFM461 em pCC-4 e pCC-5

Foi feita uma avaliação dos níveis de transcrição do *operon phaAB* por PCR quantitativo do cDNA correspondente ao mRNA do operon-alvo. Utilizou-se o gene constitutivo *glk* - gene que transcreve para a glicoquinase - como controle endógeno e tratamento de dados por método delta-delta Ct. O teste foi feito para os plasmídeos pCC-4 e pCC-5, sendo que em pCC-5 foram testados três pares de primers diferentes os quais foram desenhados para amplificar diferentes trechos do cDNA do operon *phaAB*: somente o gene *phaA,* região intergênica e somente *phaB*. Todos os resultados foram similares: em relação a amostras não induzidas, não houve aumento dos níveis de transcrição dos mRNA correspondentes ao *operon phaAB* quando as linhagens eram submetidas a condições de indução (200 μM de IPTG). Ao contrário do que se era esperado, a quantificação por PCR mostrou uma diminuição de 80-90% dos níveis de mRNA do *operon phaAB* da condição induzida em relação a não induzida.

5.17 Produção de PHA utilizando as linhagens oferecidas pelo JBEI

Três linhagens naturalmente produtoras de PHA contendo o pCC-4 foram testadas quando ao acúmulo de PHA: *Pseudomonas putida* KT2440, *P. putida* MT2 e *Delftia acidovorans* ATCC15668. Essas linhagens são estudadas pelo JBEI quanto ao consumo de lignina como fonte de carbono e tinham característica de sensibilidade à canamicina e tetraciclina. A produção de PHA em linhagens do JBEI foi feita em condições sem e com indução (200 μM de IPTG) e utilizou-se a linhagem selvagem como controle negativo. *Pseudomonas putida* KT2440 e *P. putida* MT2 foram crescidas em MMGK, mas para *D. acidovorans* a glicose do meio de cultura foi substituída por frutose, na mesma concentração. Os resultados deste ensaio estão presentes na Tabela 10.

Tabela 10 - Produção de PHA pelas linhagens obtidas no JBEI abrigando pCC-4: *Pseudomonas putida* KT2440, *Pseudomonas putida* MT2 e *Delftia acidovorans*.

Linhagem/Condição	MSC (g/L)*	PHA (%MSC)*
Pseudomonas putida KT2440	3,35 ± 0,13	13,39 ± 0,18
+ pCC-4	2,34 ± 1,06	16,17 ± 5,12
+ pCC-4/IPTG (200 μM)	2,32 ± 0,77	18,12 ± 2,17
Pseudomonas putida MT2	3,24 ± 0,53	23,8 ± 8,86
+ pCC-4	2,43 ± 0	32,66 ± 0,53
+ pCC-4/IPTG (200 μM)	2,62 ± 1,38	32,97 ± 3,78
Delftia acidovorans	1,21 ± 2,17	0,78 ± 0,10
+ pCC-4	1,38 ± 0,43	5,36 ± 0,48
+ pCC-4/IPTG (200 μM)	0,90 ± 0,64	4,54 ± 0,76

*Medidas de variação apresentadas em desvio padrão.

Todas as linhagens do JBEI abrigando o pCC-4 acumularam um teor maior de PHA em relação ao controle sem plasmídeo, entretanto, nenhuma diferença foi percebida quanto à composição em condições de indução em relação a condição sem indução. Em todas as condições, para *Pseudomonas* ssp. foi detectado apenas PHA_{MCL} enquanto que para *D. acidovorans*, apenas PHB.

5.18 Avaliação de fontes de carbono aromáticas.

A capacidade de crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM461 foi avaliada em três fontes de carbono aromáticas, as quais são componentes da lignina: ácido p-cumárico, ácido ferúlico e ácido siríngico. A baixa solubilidade destes ácidos em água e seu efeito de toxicidade para as bactérias é um desafio na realização destes ensaios quando fornecidos nas concentrações usualmente fornecidas nos ensaios de produção de PHA, por tal motivo é necessário que as soluções sejam preparadas com volumes grandes para serem adicionadas aos sais do meio mineral, bem como as soluções-mãe preparadas com no máximo 15 g/L de concentração destas fontes de carbono. Como consequência, foi impossível testar concentrações desta fonte de carbono maiores que 10 g/L no meio de cultura final.

Após 48 horas de cultivo, apenas o meio de cultura contendo ácido cumárico como fonte de carbono foi capaz de promover o crescimento bacteriano e, portanto, foram descartados outros experimentos com ácido ferúlico e ácido siríngico.

5.19 Crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM461 utilizando meio mineral com ácido cumárico (MMAC) e produção de PHA

Para avaliar o ácido cumárico como fonte de carbono para a produção de PHA, foi realizada uma curva de crescimento ao longo do tempo em meio MMAC, seguida de quantificação da fonte de carbono remanescente após 24 horas e determinação da MSC. Foram preparados meios com quatro concentrações de ácido cumárico: 10, 5, 2,5 e 1 g/L. Esse experimento foi feito em triplicatas biológicas em placa de cultivo de 24 poços, foi utilizado meio MMG contendo 15 g/L de glicose como controle de crescimento e meio MMG não inoculado como branco. Os resultados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 - Crescimento de *Pseudomonas* sp. LFM461 em meio mineral contendo ácido cumárico como única fonte de carbono (MMAC).

Fonte de carbono	Concentração (g/L)	μ máximo	Substrato disponível após 24 horas (g/L)	MSC (g/L)
Glicose	15	0,68	9,65	1,48
Ácido cumárico	10	0 (até 5h)	2,12	1,35
	5	0,56	0,18	1,37
	2,5	0,43	0,04	1,20
	1,5	0,51	0,03	0,71
	1	0,29	0,03	0,39

Apesar da concentração de 10 g/L de substrato não ter apresentado crescimento até 5 horas de cultivo, foi possível observar crescimento vigoroso após 24 horas. Nesta concentração foi possível encontrar 2,12 g/L de ácido cumárico após 24 horas de crescimento no meio de cultura, o que comparativamente, foi considerado a mínima concentração de fonte de carbono suficiente para a conversão em PHA.

Tabela 12 - Resultados do ensaio de produção de PHA pela linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-4 no meio MMAC e MMG como controle, ambos preparados com MM 10x.

	MSC (g/L)	%PHA (MSC)	mol%		Concentração de substrato (g/L)	
			3HB	3HHx	Inicial	Final
Glicose	1,5 ± 0,1	3,7 ± 1,1	86,2 ± 3,8	13,6 ± 3,8	8,24	0,37
Ácido cumárico	1,8 ± 0,1	10,3 ± 1,3	75,8 ± 7,5	24,1 ± 7,5	14,6	0,25

Apesar destas condições não serem ideais para linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-4, o ácido cumárico foi um bom substrato em relação ao crescimento e produção de PHA quando comparado à glicose nestas condições. Foi obtida uma produção de PHA aproximadamente três vezes maior utilizando ácido cumárico em comparação com glicose como fonte de carbono (Tabela 12). Quanto à composição do PHA, nos cultivos que foram oferecidos ácido cumárico foi detectado uma concentração de 10,5 mol% superior de monômeros 3HHx.

5.20 Produção de PHA por *Pseudomonas sp.* LFM461 utilizando hidrolisado de lignina.

Lignina obtida pelo processo de desacetilação/refinamento-mecânico e hidrólise enzimática (*deacetylation and mechnical-refining pretreatment and enzymatic hydrolysis*, DMR-EH), foi utilizada como fonte de carbono para a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 contendo o pCC-4. O método DMR-EH foi desenvolvido pelo National Renewable Energy Laboratory. Ao final do processo foi obtido o *alcaline pretreated liquor* (APL) o qual poderia ser adicionado ao meio de cultura.

O APL foi então oferecido em três diferentes concentrações diluídas em MM10x: 40%, 60% e 80% (v/v). Esse experimento foi realizado em triplicatas biológicas. Os resultados estão mostrados na tabela 13.

Tabela 13 - Acúmulo de PHA utilizando diferentes concentrações de solução de lignina adicionado ao meio mineral.

Concentração de APL	MSC (g/L)*	%PHA (MSC)*
40%	1,30 ± 0,13	0,18 ± 0,04
60%	0,45 ± 0,19	0,43 ± 0,05
80%	0,61 ± 0,19	0,35 ± 0,14

*Valores de variação estão apresentados como desvio padrão.

Nas condições testadas, a solução de lignina obtida não foi uma boa fonte de carbono para a produção de PHA. Com 60% e 80% (v/v), as concentrações foram

inibitórias ao crescimento bacteriano. A 40% (v/v), a solução de APL parece oferecer condições de crescimento, entretanto, assim como nas outras duas concentrações elas não oferecem condições para o acúmulo de PHA. Para este ensaio também foi testado meio mineral M9 modificado como descrito em Ragauskas (20), porém os resultados foram muito similares aos encontrados no meio MM com lignina, não sendo exibidos aqui.

A fim de aumentar a oferta de substratos disponíveis para a cultura bacteriana, foi tentada uma nova maneira de cultivar as células na fase de acúmulo (entre 24 e 72 horas) de PHA. Após 24 horas de cultivo em meio LB, as células foram centrifugadas e suspensas em meio mineral contendo 40% (v/v) de solução APL. Desta maneira, esperava-se que a lignina seria apenas direcionada para a produção de PHA, uma vez que, o meio LB consumido anteriormente seria apenas utilizado para o crescimento celular. Contudo, neste experimento, a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-4 acumulou PHA em níveis similares aos encontrados nos experimentos anteriores.

5.21 Construção dos plasmídeos para produção de 3HP e 3HB

As sequências codificantes (CDS) para os genes *tesB* de *E. coli, ptb-buk* de *Clostridium acetobutylicum* e *mcr* de *Chloroflexus aurantiacus* DSM 635 foram obtidas no banco de dados (GenBank) do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A montante das CDS foi desenhado um promotor constitutivo para *Pseudomonas* spp. *(81)* juntamente com o sítio de ligação do ribossomo (RBS) do gene *phaA* de *Ralstonia eutropha*. A otimização de códon dos CDS para *Pseudomonas*, síntese dos genes e clonagem no vetor pBT-4 (Addgene® Cambridge, MA., EUA) com enzimas de restrição *HindIII* e *SpeI* foram realizados pela companhia GenScript® (Piscataway, NJ., EUA). Os plasmídeos pBT-4::*tesB,* pBT-4::*ptb-buk* e pBT-4::*mcr* foram desenhados para possível clonagem e substituição do *operon phaPC* dos pCCs com os genes de biossíntese de 3HP e 3HB dos plasmídeos pBT-4.

5.22 RT-qPCR em tempo real para *tesB*, *ptb-buk* em *Pseudomonas* sp. LFM461.

Para garantir que a transcrição das construções sintéticas sejam funcionais, foi realizado teste de expressão gênica por RT-qPCR em tempo real. Foram

testados três períodos de cultivo de *Pseudomonas* sp. LFM461 para extração do RNA total: 5, 9 e 24 horas após o inoculo em MMGT (meio mineral contendo glicose e tetraciclina). Após a extração de RNA, foi feito um gel de agarose (1% m/v) acrescido de hipoclorito de sódio 0,5% (m/m) para desnaturar e assim determinar a qualidade do RNA extraído (82).

Como todas as construções foram desenhadas sob controle do mesmo promotor, foram escolhidos os genes *tesB* e *ptb-buk* para avaliação da transcrição do mRNA. Foi utilizado o gene *glk* como controle endógeno de expressão, controle de extração de RNA e de reação de transcriptase reversa. A maior qualidade e quantidade de mRNA para os dois genes estudados foi extraída 9 horas após o inoculo em MMGT. Todos os resultados do qPCR demonstraram uma maior expressão dos genes *tesB* e *ptb-buk* em comparação com o controle endógeno *glk*.

5.23 Analise de 3HB e 3HP por HPLC e HPLC/MS

Para detectar a produção de 3HB e 3HP nas culturas geneticamente modificadas, foram comprados padrões para cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) da empresa Santa Cruz Biotechnology® (Santa Cruz, CA., EUA). Foi utilizado HPLC Agilent® 1200 (Santa Clara, CA., EUA) para analisar os compostos com metodologia similar a Raj (47) com as seguintes modificações: 5 mM H_2SO_4 como fase móvel, fluxo de 0,6 ml/minuto e 60 °C de temperatura na coluna e 210 nm para o detector de luz ultra violeta (DAD) e índice de refração (RID). Os padrões comprados foram analisados nestas condições, porém apresentaram mais de um pico em ambos os detectores. Na intenção de solucionar o problema, os padrões foram analisados em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MSD SL Agilent® 1100 LC MSD Modelo G1946D Espectrômetro de massas) a fim de identificar corretamente os picos separados pela cromatografia líquida. As condições de análise do LC/MSD foram iguais as do HPLC exceto pela utilização de ácido fórmico 0,1% como fase móvel. Para a espectrometria de massas foi utilizado método similar a Raj (47) com as seguintes modificações: modo de ionização de elétrons por spray (ESI) foi utilizado em modo scan de 70 a 130 m/z; coluna HPX-87H e 70V para o fragmentador. Para o 3HP, foram achados dois picos correspondentes a 89 m/z que correspondem ao mesmo tendo de retenção encontrado em HPLC em 11,765 minutos e 13,148 minutos (Figura 17). Para 3HB

dois picos de 103 m/z foram achados em RID e DAD com tempos de retenção de 13,384 minutos e 14,276 minutos (Figura 18). Através destes experimentos foi possível concluir que esses padrões não poderiam ser utilizados apenas em diluição em água como em Raj (2008) por ser impossível construir uma curva padrão.

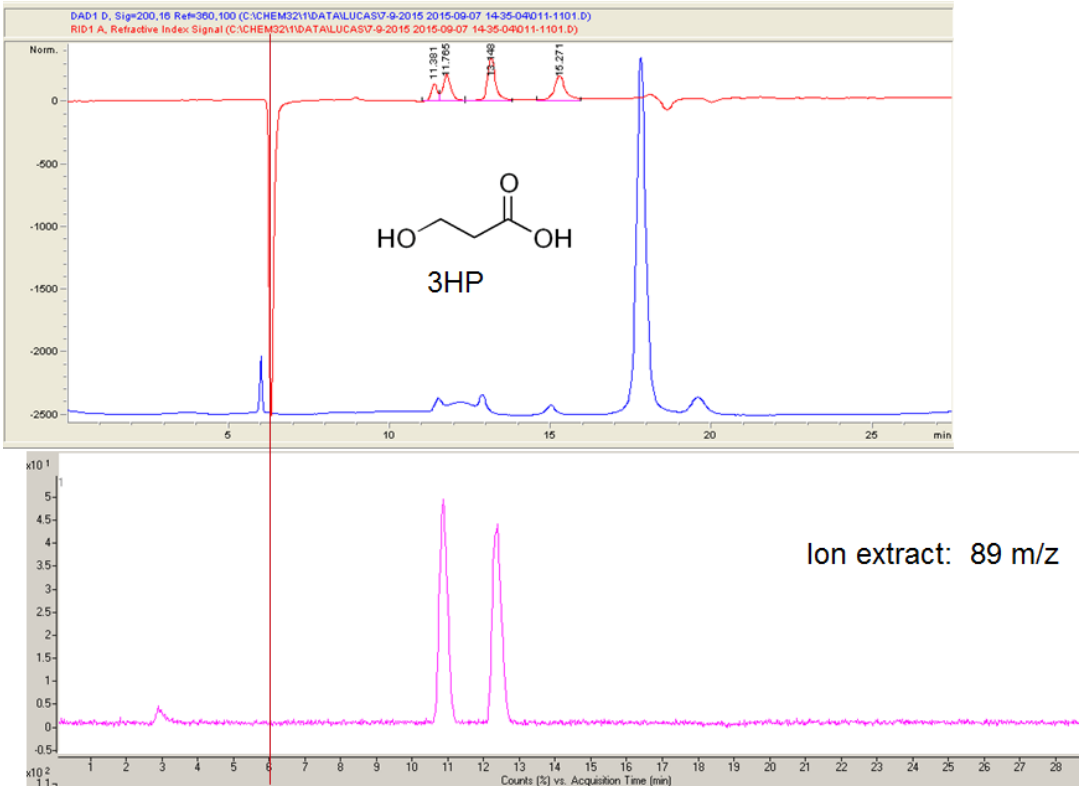

Figura 18 - Análise de cromatografia liquida do padrão de 3HP. No gráfico de cima está presente o resultado de HPLC com sinal RID (vermelho) e DAD (azul). No gráfico de baixo encontra-se o resultado de LC/MSD com ion extract de 89m/z.

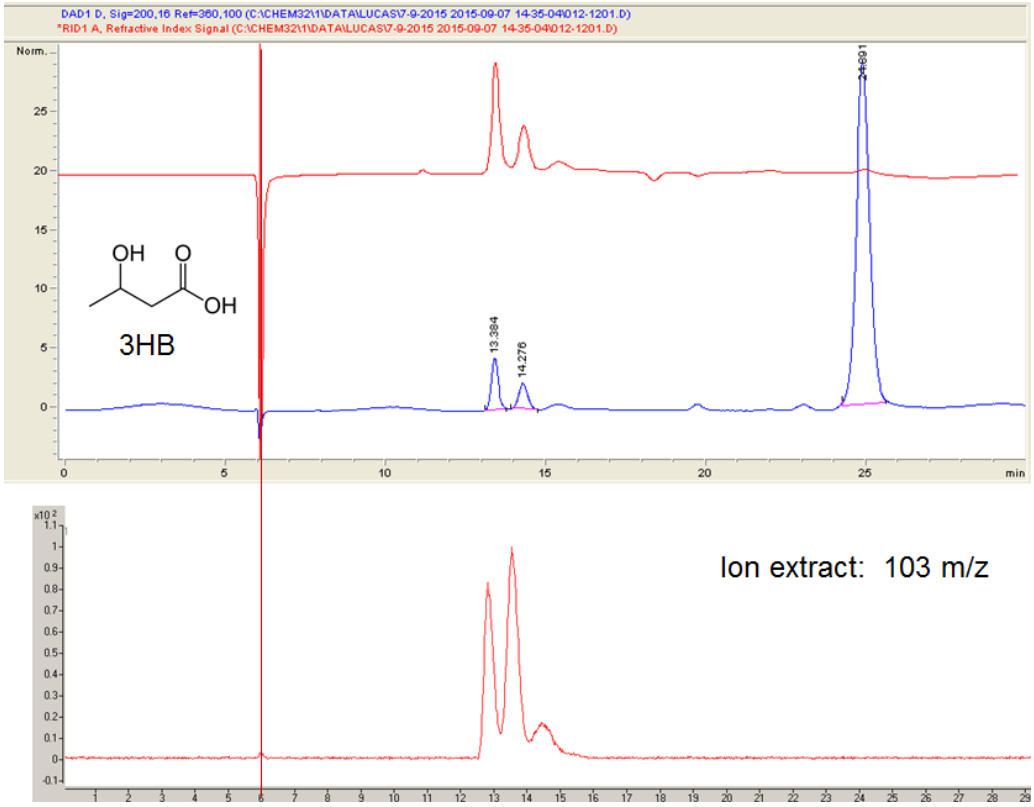

Figura 19 - Análise de cromatografia liquida do padrão de 3HB. Em cima o resultado de HPLC com sinal RID (vermelho) e DAD (azul). Em baixo, resultado de LC/MSC utilizando ion extract 103 m/z.

Os padrões de 3HP e 3HB foram então submetidos à derivatização por substituição do grupo hidroxila por um grupo popil-, o mesmo método utilizado para a análise de PHA, em seguida foi analisado em CG-FID (Focus GC©-Thermo Scientific©). Os parâmetros de análise por cromatografia gasosa foram optimizados para: 80 °C por 5 minutos seguido por subida até 170 °C a 10 °C/minuto e foi injetado 3 μL de amostra em modo Split 1:3.

Comparando os padrões de PHA e ácido benzoico (padrão interno) com os padrões dos ácidos 3HB e 3HP após o processo de derivatização, foi possível identificar apenas um pico para cada composto, e portanto, construir corretamente uma curva padrão.

5.24 Produção de 3HP e 3HB por *Pseudomonas* sp. LFM461.

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando os plasmídeos de biossíntese de 3HP e 3HB foi submetida aos mesmos tempos de cultivo de produção e meio de cultura utilizados nos ensaios de produção de PHA, apenas

substituindo canamicina 50 μg/mL por tetraciclina 20 μg/mL. Essa linhagem foi escolhida pois não possui atividade de enzima PHA sintase, o que diminui a competitividade de precursores bioquímicos das enzimas de síntese de 3HP e 3HB.

A primeira tentativa de detecção dos 3-hidroxiacidos foi filtrar os sobrenadantes em membranas 0,45 μm após 72 horas de cultivo em meio mineral glicose 15 g/L contendo tetraciclina (MMGT). Não foi detectado nenhum pico que correspondesse aos ácidos 3HP e 3HB no cultivo de *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando os plasmídeos pBT-4::*ptb-buk* e pBT-4::*mcr*. Entretanto, um pico foi detectado utilizando LC/MSD correspondendo a 103 m/z em modo negativo e 105 m/z em modo positivo no sobrenadante do cultivo de *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*tesB*, correspondendo ao primeiro pico encontrado no padrão comercial de 3HB. Contudo, não foi possível quantificar devido à falta de curva padrão no sistema de cromatografia líquida como descrito anteriormente.

Um segundo experimento foi feito para a produção de 3HP e 3HB. Através da análise dos sobrenadantes liofilizados em diferentes tempos de cultura. Amostras de 10 mL foram retiradas às 24, 48 e 72 horas após o inoculo em MMGT, centrifugadas (4000 g), e o sobrenadante foi transferido a tubos para liofilização. Toda a massa resultante da liofilização foi submetida à propanólise com a intenção de concentrar os possíveis ácidos produzidos e finalmente transferidos para frascos para análise em CG. Novamente, nenhum pico foi encontrado no tempo de retenção esperado de 3HP e 3HB, em nenhum tempo de cultivo para *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando pBT-4::*mcr* e pBT-4::*ptb-buk*. Contudo, foi detectado um pico de 3HB no sobrenadante de *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*tesB* após 24 horas de cultivo e sua concentração foi calculada como aproximadamente 311 mg/L.

6 DISCUSSÃO

6.1 Construção dos pCCs

Foi construído um plasmídeo de controle de copolímero (pCC-1) para promover alterações nas propriedades físicas e mecânicas do copolímero produzido por *Pseudomonas* sp. LFM 461. O promotor lac foi testado e indicou que permitiria controlar a expressão de genes no hospedeiro *Pseudomonas* sp. LFM 461 com base em ensaios de fluorescência da proteína mRFP1. Outros trabalhos relataram também o funcionamento do P_{LAC} em bactérias do gênero *Pseudomonas* (80, 83-86).

Um fenômeno de recombinação homóloga intraplasmidial estava ocorrendo no pCC-1 quando este era inserido em *Pseudomonas* sp. LFM461, o que causava perda de capacidade de acúmulo de PHA. Foram feitas duas alterações em pCC-1 para remoção de duas regiões homólogas, e, podemos afirmar que a hipótese proposta estava correta uma vez retiradas as regiões homólogas, o plasmídeo se manteve no tamanho e padrão de restrição esperados.

A literatura do fenômeno de recombinação intraplasmidial e interplasmidial não é extensa, entretanto foi possível encontrar dois estudos, um com *E. coli* K12 e outro com *Streptomyces lividans* 66 no qual os autores relatam a ocorrência deste fenômeno (87, 88). Apesar de neste caso específico essa propriedade de fácil recombinação do hospedeiro ter sido uma barreira, ela pode ser explorada em outras situações como facilitadora de edição genômica através de recombinação.

6.2 *Controle* da produção de PHB em *E. coli*

A bactéria *Escherichia coli* requer pelo menos três atividades enzimáticas para o acúmulo de PHB a partir de acetil-CoA: condensação de duas moléculas de acetil-CoA, por uma β-cetotiolase (codificada pelo gene *phaA*); seguida de uma redução de acetoacetil-CoA a 3-hidroxibutiril-CoA, por uma acetoacetoacil-CoA redutase (codificada pelo gene *phaB*) e polimerização dos monômeros 3HB-CoA por uma PHA sintase (codificada pelo gene *phaC*) (62, 64, 67). Sabendo que uma construção que promovesse o acúmulo de PHB nesta bactéria deveria ter pelo

menos estes três genes funcionais, ao longo deste trabalho, foram feitos vários testes dos plasmídeos pCC. Todas as construções pCC que foram testadas quanto à capacidade de reprimir ou promover o acúmulo de PHB em *Escherichia coli* MG1655 foram funcionais, indicando que tanto os três genes de biossíntese de PHB estavam funcionais (*phaAB e phaC*) quanto o sistema de regulação P_{LAC}/*lacI*. Um resultado similar com promotor tac no controle de produção de PHB em *Escherichia coli* foi obtido por Kidwell e colaboradores (62) que descreveram alta correlação entre desrepressão do promotor tac pelo indutor e a presença da enzima β-cetotiolase, contudo, menor influência foi detectada com relação à enzima acetoacetil-CoA redutase. No sentido de um possível processo de produção de PHB por *E. coli,* o sistema pCC poderia ser útil afim de reduzir o fardo metabólico da célula em fase exponencial (62, 89), induzindo a expressão dos genes de biossíntese de PHB apenas em uma fase do cultivo desejada, entretanto, para isso seria interessante a procura de uma alternativa ao IPTG como indutor a fim de reduzir custos de produção.

6.3 Produção de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 abrigando os pCCs

Foi possível observar que existe uma pequena diferença entre a composição do polímero produzido por *Pseudomonas* sp. LFM461 entre pCC-3 e pCC-4, sendo que a construção pCC-3 permitiu uma maior fração de 3HB do que pCC-4. Isso pode indicar que o promotor constitutivo do *operon phaPC* estaria influenciando a expressão do *operon phaAB* por estarem na mesma orientação no pCC-4. Assim, apesar do controle por IPTG não ter efeito sobre a expressão, eles apresentam uma diferença de composição devido a arquitetura do pCC. Esta é uma indicação que é possível controlar a composição do PHA com aumento da expressão dos genes *phaAB*.

Não é claro o motivo do não funcionamento dos pCC em *Pseudomonas* sp. LFM461, ou seja, apesar da manutenção do plasmídeo ser estável e de promover o acúmulo de PHA, não foi detectado mudanças na composição do PHA em relação à indução por IPTG como se era esperado. Apesar do experimento para validação do sistema de expressão P_{LAC}/*lacI*^{q} com proteína fluorescente *mRFP1* ter resultado positivo, todos os outros experimentos apontam para o não funcionamento do promotor lac em *Pseudomonas* sp. LFM461. As medições de atividade enzimática

em pCC-3 e os dados de expressão relativa do *operon phaAB* em pCC-4 e pCC-5, em conjunto com os dados de produção de PHA *in vivo* indicam fortemente que o sistema de regulação da expressão não estaria funcionando. Assim, embora a conclusão dos experimentos de fluorescência seja conflitante com os outros, a maioria das evidências sugerem o não funcionamento deste sistema de controle da expressão em *Pseudomonas* sp. LFM461.

O resultado dos experimentos com proteína repórter pode ter tido conclusões dúbias, uma vez que o pBBR1MCS-2::*mRFP1+lacI*^{q} possui dois promotores Lac. Os promotores Lac estão dispostos de modo adjacente e orientados na mesma direção, sendo o primeiro original do pBBR1MCS-2 e segundo de origem do RFP coding device (Figura 19). Essa duplicidade de promotores apresentada no plasmídeo em questão poderia alterar o comportamento de indução da expressão gênica do *mRFP1*. Apesar de serem idênticos em sua sequência nucleotídica, os dois promotores apresentaram distâncias diferentes relativas à sequência codificante do *mRFP1* e, portanto, possivelmente diferenças na regulação gênica. Desta maneira, uma resposta linear do nível de fluorescência pode não refletir fielmente a adição de indutor no meio de cultura. Outro fator a ser discutido é o impacto do aumento da expressão medida, que foi de cerca de 4 vezes de aumento em condição de indução comparado a sem indução. Em relação ao aumento de expressão pelo promotor lac é comum ser reportados aumentos em cerca de 80 vezes ou mais para *E. coli* (90, 91), desta maneira mesmo que o aumento fosse real ele poderia não ter o impacto desejado devido ao baixo desempenho demonstrado.

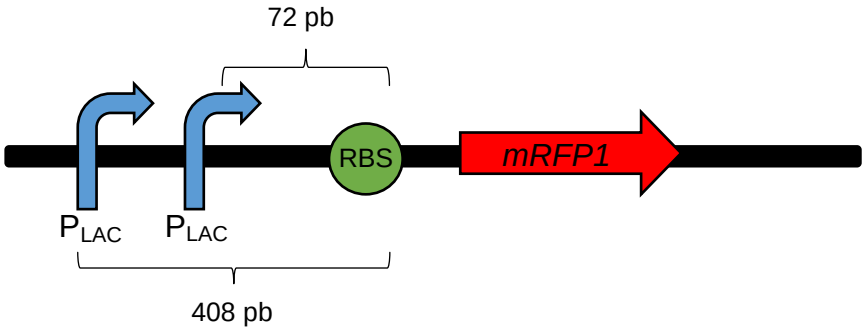

Figura 20 - Representação da arquitetura gênica presente em pBBR1MCS-2::mRFP1. Em azul estão representados os promotores lac com suas respectivas distâncias em pares de base (pb) em relação ao sítio de ligação do ribossomo (RBS) e ao gene mRFP1. O P_{LAC} a esquerda é original do pBBR-1MCS-2 e o da direita é de origem do RFP coding device.

A remoção do promotor lac original do pBBR1MCS-2 para a modificação de pCC-1 para pCC-3 o pode ter modificado o perfil de controle e assim, perdido a capacidade de promover efetivamente um aumento na expressão do gene de interesse. Essa característica seria apenas presente em *Pseudomonas* sp. LFM461, uma vez que em *E. coli* MG1655 os plasmídeos continuaram sendo funcionais em controlar a produção de PHB.

Futuramente, maiores investigações podem ser feitas em torno do funcionamento do pCC-5 em *Pseudomonas* sp. LFM461. Na edição do pCC-4 para pCC-5 foi inserido um sítio de restrição *NheI*, o qual possibilitaria a inserção de um gene repórter podendo ser expresso em fusão com a proteína β-cetotiolase. Desta forma seria possível outro método de detecção da expressão do sistema Lac em outro hospedeiro, e principalmente monitorar o perfil de expressão gênica do *operon phaAB* em conjunto com um gene repórter em várias fases do cultivo.

Muitos indícios levaram a acreditar que este sistema seria funcional em *Pseudomonas* sp. LFM461 os quais se destacam: (i) testes do sistema do promotor e repressor Lac com proteína fluorescente; (ii) funcionamento das diferentes versões do pCC em *E. coli* MG1655; (iii) melhorias no vazamento e na expressão máxima em *E. coli* MG1655; (iv) correção de problemas com a manutenção em *Pseudomonas* sp. LFM461; (v) diferenças na composição entre os copolímeros produzidos entre LFM461 pCC-3 e pCC-4. É importante destacar que os itens (ii), (iii) e (v) citados acima reforçam que o trabalho realizado para a construção e aprimoramento destes plasmídeos foram corretamente planejados e executados para avançar em relação aos objetivos propostos. Contudo, mesmo com estes indícios a favor, não foi possível obter uma condição de controle do copolímero produzido por *Pseudomonas* sp. LFM461.

6.4 Produção de PHA por linhagens do JBEI abrigando pCC-4

Os plasmídeos pCC foram desenhados com o objetivo de aumentar o fluxo de 3HB na biossíntese de P3HB-*co*-3HHx por *Pseudomonas* sp. LFM461, permitindo controlar a composição do PHA produzido. A estratégia é baseada no controle da expressão dos genes do *operon phaAB* pela desrepressão gradual do promotor lac com a adição de concentrações crescentes de IPTG à cultura. Logo, este plasmídeo pode ser utilizado em muitas linhagens bacterianas para a produção de PHB, ou

caso o hospedeiro possua vias metabólicas de biossíntese de $3HA_{MCL}$ essa linhagem poderia produzir copolímeros $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL}$ e a composição do PHA poderia ser controlada. Como os plasmídeos pCC foram construídos baseando-se no *backbone* do pBBR1MCS-2 (92), isto é, contendo o gene de resistência a canamicina, bem como sistema de replicação de amplo espectro de hospedeiros, eles podem ser inseridos em um grande número de espécies bacterianas Gram negativas. Desta maneira, a versão 4 do plasmídeo de controle de copolímero (pCC-4) foi inserida em linhagens fornecidas pelo JBEI e assim tentou-se controlar a composição do PHA produzido por estas linhagens. Estas linhagens são especialmente interessantes pois têm sido estudas para o consumo de componentes da lignina (22).

Apesar de ser filogeneticamente próxima ao gênero *Pseudomonas*, a bactéria *D. acidovorans* não foi capaz de produzir $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL}$ e apenas confirmou dados de outros trabalhos publicados que esta linhagem não é capaz de suprir monômeros $3HA_{MCL}$ e produz apenas PHB (76). Já as linhagens *P. putida* KT2440 e *P. putida* MT2, abrigando o plasmídeo PCC-4 produziram $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL,}$ embora sem controle da composição. Como as linhagens de *P. putida* testadas são naturalmente produtoras de PHA_{MCL}, elas possuem uma PHA sintase selvagem e, portanto, a atividade da PHA sintase selvagem pode interferir na atividade da PHA sintase do pCC-4, mascarando sua atividade. Assim, apesar de pCC-4 aumentar o teor de PHA produzido nestas linhagens de *Pseudomonas*, seria interessante a deleção da PHA sintase nativa destas bactérias, possibilitando assim confirmar a produção de um copolímero $P3HA_{SCL}$-*co*-$3HA_{MCL}$.

6.5 Uso de lignina para produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM461

Alguns estudos realizaram ensaios de produção de PHA a partir de materiais lignocelulósicos, embora a maioria deles seja focado no consumo de açúcares (pentoses e hexoses) provenientes da decomposição de celulose e hemicelulose (50, 93). A utilização de lignina é ainda pouco explorada para a produção de PHA, embora Linger (22) tenha realizado um trabalho completo de análise dos substratos provenientes da hidrólise de lignina, o APL, para produção de PHA_{MCL}, chegando a 32% PHA (MSC). A fração solúvel do APL consiste basicamente de lignina, extratores, compostos inorgânicos e acetato em 32%, 23%, 11% e 8% (m/m),

respectivamente (22). Quando hidrolisada em monômeros, a fração de lignina consiste em sua maioria de moléculas de 200 Da, 250 Da e 350 Da que correspondem a monômeros, dímeros e trímeros respectivamente. Os principais monômeros identificados são ácido p-cumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico e acetato além de outros (22).

Neste trabalho, utilizou-se um pré-tratamento para despolimerizar a lignina e assim tornar possível o consumo desta fonte de carbono como substrato para a produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM461. Esta linhagem bacteriana atingiu massa seca celular de apenas 1,30 g/L em comparação com experimento utilizando glicose como fonte de carbono que atingiu em média 3,4 g/L de biomassa seca total. Há duas hipóteses para explicar baixas taxas de crescimento e acúmulo de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM461 quando suprida com o hidrolisado de lignina como fonte de carbono. Deve ser destacado que, além de consumir efetivamente os monômeros liberados pelo pré-tratamento, a linhagem bacteriana deve resistir à toxicidade destes compostos (20). Uma explicação é que os monômeros liberados no processo de pré-tratamento da lignina não foram efetivamente consumidos por *Pseudomonas* sp. LFM461, isso resultaria em uma baixa oferta de fonte de carbono disponível para *Pseudomonas* sp. LFM461 crescer e acumular PHA. Outra explicação é de que o composto teria uma toxicidade muito alta e, portanto, inibitória ao crescimento, uma evidencia que fortalece essa hipótese é que quando se ofereceu concentrações maiores que 20% do hidrolisado de lignina (APL), o crescimento foi quase nulo, e, portanto, a concentração crítica para inibir completamente o crescimento deve estar entre 20% e 40% do hidrolisado de lignina.

6.6 Produção de 3HP e 3HB por LFM461

O experimento de expressão gênica feito com as linhagens abrigando os genes *tesB* e *ptb-buk* comprovou uma expressão destes genes como sendo maior do que o gene constitutivo *glk*. Como o mesmo promotor, RBS e processo de otimização foi utilizado para todos os genes inseridos no plasmídeo pBT-4, a não detecção de 3HP e 3HB pelas linhagens *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*mcr* e pBT-4::*ptb-buk* foi provavelmente um problema analítico ou do desenho do experimento, e não uma questão de construção gênica.

A alteração de metodologia de HPLC e LC/MSD para CG com derivatização de propil-éster possibilitou a estabilização da amostra e garantiu a detecção de um único pico em CG e, portanto, foi possível construir uma curva padrão. Para a detecção de 3HP e 3HB em LFM461 pBT-4::*mcr* e pBT-4::*ptb-buk* poderia ser utilizado o mesmo método de preparo de amostra com derivatização porém, a análise por CG acoplada a espectrometria de massas poderia ser utilizada uma vez que a sensibilidade é maior que a detecção por FID .

A produção de 311 mg/L para a linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*tesB* foi de concentração comparativamente boa em relação a trabalhos anteriores em que foram produzidos uma faixa de 75 a 2000 mg/L (72, 88). Utilizando-se uma linhagem de *E. coli*. Chung e colaboradores (94) utilizaram uma linhagem mutante de *Pseudomonas* na qual o *operon* de biossíntese de PHA e os genes de β-oxidação *fadA* e *fadB* passaram pelo processo de *knockout* e resultou em um aumento de 0,35 g/L para 2,55 g/L de ácidos 3HHx, 3HO, 3HD e 3HDd. Como *Pseudomonas* sp. LFM461 já possui *knockout* de sua PHA sintase, seria interessante explorar o potencial de produção de 3HA através da inativação dos genes *fadA* e *fadB* o que poderia diminuir o fluxo de formação de acetil-CoA aumentando assim o fluxo de intermediários metabólicos para a síntese de 3HB e 3HP pela via de biossíntese de ácidos graxos.

Como os pCCs tiveram sucesso em controlar a produção de PHB e, portanto, a biossíntese de 3HB-CoA em *E. coli* MG1655; ao substituir o gene *tesB* no lugar do gene *phaC*, seria possível controlar a produção de ácido 3HB livre pela adição de IPTG no meio de cultura. Desta maneira, o fardo metabólico seria reduzido na produção de ácido 3HB e permitiria ao controlador do processo iniciar a produção no momento por ele desejado.

7 CONCLUSÕES

Foram construídos cinco de plasmídeos capazes de controlar a produção de PHB em *E. coli* MG1655. Aprimoramentos foram observados nestes plasmídeos referente a manutenção no hospedeiro, vazamento da expressão e expressão total. A construção do pCC-1 demonstrou instabilidade no hospedeiro *Pseudomonas* sp. LFM461, assim, foi necessária edição do plasmídeo obtendo-se o pCC-3. A capacidade do hospedeiro em promover eventos de recombinação homóloga com facilidade pode ser explorada como característica útil para edição de seu genoma.

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 pCC-3 não demonstrou a capacidade de controlar a composição do copolímero, e em condições de indução não foi detectado mudança de valores de atividade enzimática das proteínas sob controle do sistema P_{LAC}/*lacI*^{q}. Assim, o pCC-3 foi aprimorado para pCC-4 e em seguida pCC-5. Apesar de melhoras terem sido percebidas em experimentos com *E. coli* MG1655 abrigando os pCC-4 e pCC-5, nenhuma das duas versões foram capazes de controlar a composição do copolímero P3HB-*co*-3HHx em *Pseudomonas* sp. LFM461. Em experimentos de RT-qPCR com pCC-4 e pCC-5 no hospedeiro final não se observou aumento dos níveis de transcrição dos *operon phaAB* em condições de indução.

Em um primeiro momento, através de experimentos de fluorescência anteriores a construção dos pCCs, o promotor lac foi validado para controle de expressão em *Pseudomonas* sp. LFM461, mas, ao avaliar o conjunto de evidências dos experimentos posteriores, conclui-se que o promotor lac não foi funcional no hospedeiro. Apesar do objetivo final não ter sido atingido, várias questões da biologia molecular e regulação gênica de *Pseudomonas* sp. LFM461 foram discutidas neste trabalho. Neste sentido, avanços foram realizados a fim de viabilizar futuros estudos sobre engenharia do metabolismo, produção de PHAs e outros bioprodutos na linhagem modelo *Pseudomonas* sp. LFM461 do Laboratório de Bioprodutos.

Em estágio no JBEI os experimentos realizados abriram oportunidades de estudo para os plasmídeos criados, bem como para a linhagem *Pseudomonas* sp LFM461:

- O plasmídeo pCC-4 foi avaliado em linhagens relacionadas a *Pseudomonas* sendo fornecidas pelo próprio instituto. O plasmídeo demonstrou ser funcional em aumentar o teor de PHA produzido por estas linhagens e potencial para ser aplicado a outras linhagens relacionadas futuramente.
- A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM461 demonstrou bom crescimento celular no consumo de ácido cumárico para a produção de PHA, com níveis de biomassa similares a glicose. Desta maneira, oportunidades foram criadas para estudos mais profundos com fontes de carbono relacionadas a lignina.
- Foram construídos três vetores para a produção de ácidos 3-hidroxibutírico e 3-hidroxipropiônico. Utilizando *Pseudomonas* sp. LFM461 pBT-4::*tesB* foi detectado a produção de 311 mg/L de 3HB, níveis comparativamente bons de produção considerando uma primeira tentativa (72, 88). Pode-se futuramente utilizar os pCCs para a produção controlada de 3HB em *E. coli* MG1655.

REFERÊNCIAS*

1. Brandl H, Gross RA, Lenz RW. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(b-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. Adv Biochem Eng/Biotechnol. 1990;41:77-93.

2. Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol rev. 1990;54(4):450-72.

3. Gomez JGC, Bueno-Netto CL. Produção de plásticos biodegradaveis por bactérias. Revista Brasileira de Engenharia Química. 17 (2), 24-29, 1997.

4. Crank M. PM, Marscheider-Weidemann F., Schleich J., Hüsing B., Angerer G., Wolf O. Techno-economic Feasibility of Large-scale Production of Bio-based Polymers in Europe. 2005.

5. Steinbuchel A, Valentin HE. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. Fems Microbiol Lett. 1995;128(3):219-28.

6. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 2000;25(10):1503-55.

7. De Koning GJM, van Bilsen HMM, Lemstra PJ, Hazenberg W, Witholt B, Preusting H, et al. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans.* Polymer. 1994;35:2090-7.

8. Fukui T, Abe H, Doi Y. Engineering of Ralstonia eutropha for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. Biomacromolecules. 2002;3(3):618-24.

9. Lu X, Zhang J, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid beta-oxidation pathway in E. coli. FEMS Microbiol Lett. 2003;221(1):97-101.

10. Lu XY, Wu Q, Zhang WJ, Zhang G, Chen GQ. Molecular cloning of polyhydroxyalkanoate synthesis operon from Aeromonas hydrophila and its expression in Escherichia coli. Biotechnol Prog. 2004;20(5):1332-6.

11. Lu XY, Wu Q, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in Aeromonas hydrophila CGMCC 0911. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64(1):41-5.

12. Jian J, Li ZJ, Ye HM, Yuan MQ, Chen GQ. Metabolic engineering for microbial production of polyhydroxyalkanoates consisting of high 3-hydroxyhexanoate content by recombinant Aeromonas hydrophila. Bioresour Technol. 2010;101(15):6096-102.

*De acordo com:
International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htmL

13. Liebergesell M, Mayer F, Steinbüchel A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. Appl Microbiol Biotechnol. 1993;40:292-300.

14. Lee SH, Oh DH, Ahn WS, Lee Y, Choi Ji, Lee SY. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of Aeromonas hydrophila. Biotechnol Bioeng. 2000;67(2):240-4.

15. Gomes RDS. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2010.

16. Gomez JGC. Produção por *Pseudomonas* sp. de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2000.

17. Keasling JD. Synthetic biology for synthetic chemistry. ACS Chem. Biol. 2008;3(1):64-76.

18. Aldor I, Keasling JD. Metabolic engineering of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant Salmonella enterica serovar typhimurium. Biotechnol Bioeng. 2001;76(2):108-14.

19. Wong MS, Causey TB, Mantzaris N, Bennett GN, San KY. Engineering poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in E. coli. Biotechnol Bioeng. 2008;99(4):919-28.

20. Ragauskas AJ, Beckham GT, Biddy MJ, Chandra R, Chen F, Davis MF, et al. Lignin valorization: improving lignin processing in the biorefinery. Science. 2014;344(6185):1246843.

21. Li C, Zhao X, Wang A, Huber GW, Zhang T. Catalytic Transformation of Lignin for the Production of Chemicals and Fuels. Chem Rev. 2015;115(21):11559-624.

22. Linger JG, Vardon DR, Guarnieri MT, Karp EM, Hunsinger GB, Franden MA, et al. Lignin valorization through integrated biological funneling and chemical catalysis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(33):12013-8.

23. Lenz RW, Marchessault RH. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. Biomacromolecules. 2005;6(1):1-8.

24. Wallen LL, Davis EN. Biopolymers of activated sludge. Environ Sci Technol. 1972;*6* (2):pp 161–4.

25. Gross RA, Brandl H, Ulmer HW, Posada MA, Fuller RC, Lenz RW. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). Polymer Prepr. 1989;30:492-3.

26. Donaruma LG. Microbial polyesters, by Yoshiharu Doi, VCH, New York, 1990, 156 pp. Journal of Polymer Science Part A: Polym. Chem. 1991;29(9):1365-.

27. Steinbüchel A, Schlegel HG. Physiology and molecular genetics of poly(beta-hydroxy-alkanoic acid) synthesis in Alcaligenes eutrophus. Mol. Microbiol. 1991;5(3):535-42.

28. De Smet MJ, Eggink G, Witholt B, Kingma J, Wynberg H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas* oleovorans during growth on octane. J. Bacteriol. 1983;154(2):870-878.

29. Lageveen RG, Huisman GW, Preusting H, Ketelaar P, Eggink G, Witholt B. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. Appl Environ Microbiol. 1988;54(12):2924-32.

30. Ulmer HW, Gross RA, Weisbach P, Fuller RC, Lenz RW. The bacterial synthesis of functional poly(b-hydroxyalkanoate). Polymer Prep. 1989;30:402-7.

31. Diniz SC, Taciro MK, Gomez JG, da Cruz Pradella JG. High-cell-density cultivation of Pseudomonas putida IPT 046 and medium-chain-length polyhydroxyalkanoate production from sugarcane carbohydrates. Appl Biochem Biotechnol. 2004;119(1):51-70.

32. Schubert P, Kruger N, Steinbuchel A. Molecular analysis of the alcaligenes-eutrophus poly(hydroxybutyrate) biosynthetic operon – Identification of the N-terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and identification of the promoter. J. Bacteriol. 1991;173(1):168-75.

33. Huisman GW, Wonink E, Meima R, Kazemier B, Terpstra P, Witholt B. Metabolism of poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) by *Pseudomonas oleovorans*. Identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J Biol Chem. 1991;266(4):2191-8.

34. Hoffmann N, Steinbuchel A, Rehm BH. The *Pseudomonas aeruginosa* phaG gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. FEMS Microbiol Lett. 2000;184(2):253-9.

35. Liu F, Jian J, Shen X, Chung A, Chen J, Chen GQ. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* 4AK4 for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate. Bioresour Technol. 2011;102(17):8123-9.

36. Rehm BH. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. Biochem J. 2003;376(Pt 1):15-33.

37. Rehm BHA. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat Rev Micro. 2010;8(8):578-92.

38. Matsuda, ST. Isolamento de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos de cadeia curta e média a partir de óleos vegetais. [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

39. Gomez JGC, Silva-Queiroz SR, Silva LMB, Costa M, Bretas AF, Silva LF, et al. PHA_{MCL} production from renewable substrates. International Symposium on Biological Polyesters; Westfälische Wilhelms-Universität Münter, Germany2002.

40. Silva LF, Gomez JGC, Rocha RCS, Taciro MK, Pradella JGC. Produção biotecnológica de poli-hidroxialcanoatos para a geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. Química Nova. 2007;30:1732-43.

41. Anjum A, Zuber M, Zia KM, Noreen A, Anjum MN, Tabasum S. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. Int J Biol Macromol. 2016;89:161-74.

42. Rehm BH. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. Nat Rev Microbiol. 2010;8(8):578-92.

43. Rolnad-Holst D, Triolo R, Helft-Neal S, Bayrami B. Bioplastics in California - Economic assessment of market conditions for PHA/PHB production from waste methane. 2013.

44. Reddy CS, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresour Technol. 2003;87(2):137-46.

45. Toledo K. Plástico biodegradável de açúcar está pronto para escala industrial. 2012. (Acessado em 10 de junho 2016.
Disponível em: http://agencia.fapesp.br/plastico_biodegradavel_de_acucar_esta_esta_pronto_para_escala_industrial/15994/

46. Brämer CO, Vandamme P, da Silva LF, Gomez JGC, Steinbüchel A. *Burkholderia sacchari* sp nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(5):1709-13.

47. Raj SM, Rathnasingh C, Jo J-E, Park S. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. Process Biochem. 2008;43(12):1440-6.

48. Rathnasingh C, Raj SM, Jo JE, Park S. Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol. Biotechnol Bioeng. 2009;104(4):729-39.

49. Wang Q, Nomura CT. Monitoring differences in gene expression levels and polyhydroxyalkanoate (PHA) production in *Pseudomonas putida* KT2440 grown on different carbon sources. J Biosci Bioeng. 2010;110(6):653-9.

50. Cesário MT, Raposo RS, de Almeida MC, van Keulen F, Ferreira BS, da Fonseca MM. Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates. N Biotechnol. 2014;31(1):104-13.

51. Silva LF, Gomez JG, Oliveira MS, Torres BB. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. J Biotechnol. 2000;76(2-3):165-74.

52. Doi Y, Kitamura S, Abe H. Microbial Synthesis and Characterization of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Macromolecules. 1995;28(14):4822-8.

53. Mendonça TT. Avaliação do potencial de *Burkholderia sacchari* produzir o copolímero biodegradável poli(hidroxibutirato-*co*-hidroxihexanoato) [P(3HB-*co*-3HHx)] [Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2009.

54. Rocha RC, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JG. Production of poly(3-hydroxybutyrate-*co* -3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. World J Microb Biot. 2008;24(3):427-31.

55. Budde CF, Riedel SL, Willis LB, Rha C, Sinskey AJ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. Appl Environ Microbiol. 2011;77(9):2847-54.

56. Qiu YZ, Han J, Chen GQ. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). Appl Microbiol Biotechnol. 2006;69(5):537-42.

57. Lopes MSG, Gomez JGC, Silva LF. Cloning and overexpression of the xylose isomerase gene from *Burkholderia sacchari* and production of polyhydroxybutyrate from xylose. Can J Microbiol. 2009;55(8):1012-5.

58. Qiu YZ, Han J, Guo JJ, Chen GQ. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and Pseudomonas putida. Biotechnol Lett. 2005;27(18):1381-6.

59. Wang HH, Zhou XR, Liu Q, Chen GQ. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;89(5):1497-507.

60. Tsuge T, Hisano T, Taguchi S, Doi Y. Alteration of chain length substrate specificity of *Aeromonas caviae* R-enantiomer-specific enoyl-coenzyme A hydratase through site-directed mutagenesis. Appl Environ Microbiol. 2003;69(8):4830-6.

61. Schubert P, Steinbuchel A, Schlegel HG. Cloning of the *Alcaligenes-eutrophus* genes for synthesis of poly-beta-hydroxybutyric acid (phb) and synthesis of phb in *Escherichia-coli*. J. Bacteriol. 1988;170(12):5837-47.

62. Kidwell J, Valentin HE, Dennis D. Regulated expression of the *Alcaligenes-eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia-coli*. Appl Environ Microbiol. 1995;61(4):1391-8.

63. Fukui T, Yokomizo S, Kobayashi G, Doi Y. Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (R)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 1999;170(1):69-75.

64. Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. FEMS Microbiol Lett. 1999;176(1):183-90.

65. Taguchi K, Aoyagi Y, Matsusaki H, Fukui T, Doi Y. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. Biotechnol Lett. 1999;21(7):579-84.

66. Park SJ, Lee SY. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate- co-3-hydroxyalkanoates) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. Appl Biochem Biotechnol. 2004;113-116:335-46.

67. Wang Q, Zhu C, Yancone TJ, Nomura CT. The Effect of Co-Substrate Feeding on Polyhydroxyalkanoate (PHA) Homopolymer and Copolymer Production in Recombinant *Escherichia col*i LS5218. J. Bioproc Eng Bioref. 2012;1(1):86-92.

68. Adkins J, Pugh S, McKenna R, Nielsen DR. Engineering microbial chemical factories to produce renewable "biomonomers". Front Microbiol. 2012;3:313.

69. Chu HS, Kim YS, Lee CM, Lee JH, Jung WS, Ahn JH, et al. Metabolic engineering of 3-hydroxypropionic acid biosynthesis in *Escherichia coli*. Biotechnol Bioeng. 2015;112(2):356-64.

70. Tseng HC, Martin CH, Nielsen DR, Prather KL. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for enhanced production of (R)- and (S)-3-hydroxybutyrate. Appl Environ Microbiol. 2009;75(10):3137-45.

71. Jiang X, Meng X, Xian M. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;82(6):995-1003.

72. Gao HJ, Wu Q, Chen GQ. Enhanced production of D-(-)-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2002;213(1):59-65.

73. Pradella JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório Técnico nº84396-205; Centro de Tecnologia de Processos e Produtos Laboratório de Biotecnologia Industrial., São Paulo: LBI/CTPP; 2006.

74. Sánchez RJ, Schripsema J, da Silva LF, Taciro MK, Pradella JGC, Gomez JGC. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. Eur. Polym. J. 2003;39(7):1385-94.

75. Simon R, Priefer U, Puhler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. Nat Biotech. 1983;1(9):784-91.

76. Wen A, Fegan M, Hayward C, Chakraborty S, Sly LI. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 1999;49 Pt 2:567-76.

77. Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM, 2nd, et al. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene. 1995;166(1):175-6.

78. Choi KH, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Protoc. 2006;1(1):153-61.

79. Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dube B, Bataille P, Ramsay JA. Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids. Appl Environ Microbiol. 1990;56(7):2093-8.

80. Hansen LH, Knudsen S, Sorensen SJ. The effect of the *lacY* gene on the induction of IPTG inducible promoters, studied in Escherichia coli and *Pseudomonas fluorescens*. Curr Microbiol. 1998;36(6):341-7.

81. Xu Y, Tao F, Ma C, Xu P. New constitutive vectors: useful genetic engineering tools for biocatalysis. Appl Environ Microbiol. 2013;79(8):2836-40.

82. Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis. 2012;33(2):366-9.

83. Cebolla A, Vázquez ME, Palomares AJ. Expression vectors for the use of eukaryotic luciferases as bacterial markers with different colors of luminescence. Appl Environ Microbiol. 1995;61(2):660-8.

84. Jensen LB, Ramos JL, Kaneva Z, Molin S. A substrate-dependent biological containment system for *Pseudomonas putida* based on the Escherichia coli gef gene. Appl Environ Microbiol. 1993;59(11):3713-7.

85. Warren JW, Walker JR, Roth JR, Altman E. Construction and characterization of a highly regulable expression vector, pLAC11, and its multipurpose derivatives, pLAC22 and pLAC33. Plasmid. 2000;44(2):138-51.

86. Nikel PI, Romero-Campero FJ, Zeidman JA, Goñi-Moreno Á, de Lorenzo V. The glycerol-dependent metabolic persistence of *Pseudomonas putida* KT2440 reflects the regulatory logic of the GlpR repressor. MBio. 2015;6(2).

87. Laban A, Cohen A. Interplasmidic and intraplasmidic recombination in *Escherichia coli* K-12. Mol Gen Genet. 1981;184(2):200-7.

88. Chen CW, Tsai JF, Chuang SE. Intraplasmid recombination in *Streptomyces lividans* 66. Mol Gen Genet. 1987;209(1):154-8.

89. Aldor IS, Keasling JD. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. Curr Opin Biotechnol. 2003;14(5):475-83.

90. Marbach A, Bettenbrock K. lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. J Biotechnol. 2012;157(1):82-8.

91. Yildirim N, Mackey MC. Feedback regulation in the lactose operon: A mathematical modeling study and comparison with experimental data. Biophys. J. 2003;84(5):2841-51.

92. Kovach ME, Phillips RW, Elzer PH, Roop RM, Peterson KM. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. Biotechniques. 1994;16(5):800-2.

93. Yu J, Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. Bioresour Technol. 2008;99(17):8042-8.

94. Chung A, Liu Q, Ouyang SP, Wu Q, Chen GQ. Microbial production of 3-hydroxydodecanoic acid by pha operon and *fadBA* knockout mutant of *Pseudomonas putida* KT2442 harboring tesB gene. Appl Microbiol Biotechnol. 2009;83(3):513-9.

95. Riis V, Mai W. Gas chromatographic determination of poly-β-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis. J. Chromatogr. A. 1988; 445: 285-9