GABRIELA CAZONATO LOZANO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES ENVOLVIDOS NA MOBILIZAÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EM LINHAGENS RECOMBINANTES DE

Escherichia coli

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

São Paulo 2013

GABRIELA CAZONATO LOZANO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DE GENES ENVOLVIDOS NA MOBILIZAÇÃO DE POLI-3-HIDROXIBUTIRATO EM LINHAGENS RECOMBINANTES DE *Escherichia coli*

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

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

São Paulo 2013

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

© reprodução total

Lozano, Gabriela Cazonato. Avaliação do papel de genes envolvidos na mobilização de poli-3hidroxibutirato em linhagens recombinantes de *Escherichia coli /* Gabriela Cazonato Lozano. -- São Paulo, 2013.

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: Obtenção de bioprodutos de interesse biotecnológicos: poli-3-hidroxibutirato.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the role of genes involved in mobilization of poly-3-hydroxybutyrate in recombinant strains of *Escherichia coli*.

1. Poli-3-hidroxibutirato 2. Mobilização 3. P3HB despolimerases intracelulares 4. *Escherichia coli* recombinante 5. *Ralstonia eutropha* 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/SBIB0176/2013

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

| Candidato(a): | Gabriela Cazonato Lozano |
|-------------------------|--|
| Título da Tese: | Avaliação do papel de genes envolvidos na mobilização de poli-3- hidroxibutirato em linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i> . |
| Orientador(a): | José Gregório Cabrera Gomez |
| À Comissão Julga púl | adora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão olica 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: (56) (11) 3091-7833 - telefax : (55) (11) 3091-8405 e-mail: <u>cep@icb.usp.br</u>

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 486/11 referente ao projeto intitulado: "Avaliação do papel de genes associados à mobilização de Poli-3-hidroxibutirato em linhagens recombinantes de Escherichia coli" sob a responsabilidade de Gabriela Cazonato Lozano, 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 n°196 de 1996.

São Paulo, 19 de outubro de 2011.

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

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

Ao Caio, meu amor e apoio de todos os momentos.

Aos meus pais, por permitirem que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, exemplo de pesquisador, pelo conhecimento transmitido durante essa etapa. Por sua paciência e tempo desprendido para contribuir verdadeiramente em minha formação.

À Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva e Dra. Marilda Keiko Taciro pelo apoio, incentivo e pela oportunidade de compartilhar experiências.

Aos meus colegas de laboratório pela ajuda e estímulo de todos os momentos.

Às amigas Thatiane e Liege, que se transformaram em mais do que companheiras de trabalho.

Aos meus pais Márcia e Wagner, pelo amor, pela confiança sempre depositada e por se esforçarem para fazer de mim uma mulher e profissional de caráter. Por estarem sempre na primeira fila me aplaudindo ou me ajudando a levantar.

Ao meu irmão Neto, pelo carinho e cumplicidade, me fazendo querer ser sempre melhor.

Ao meu amor Caio, por não me deixar desistir ou desestimular, por compreender todo o tempo que foi preciso dedicar nesse trabalho, por acreditar no meu potencial e me incentivar a continuar nesse caminho, e principalmente por ser minha fortaleza, minha motivação e fazer dos meus dias mais felizes.

À Deus por iluminar meus caminhos e permitir que eu viva para concretizar meus sonhos. Obrigada Senhor.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

LOZANO, G. C. Avaliação do papel de genes envolvidos na mobilização de poli-3hidroxibutirato em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polihidroxialcanoatos (PHA) constituem uma família de poliésteres armazenados intracelularmente em diversas bactérias, na forma de grânulos, atuando no armazenamento de carbono e energia para esses micro-organismos. O PHA mais conhecido é o poli-3hidroxibutirato (P3HB), e pode ser sintetizado por diversas linhagens, como Ralstonia eutropha e Burkholderia sacchari. A mobilização de PHA consiste na degradação dos grânulos previamente acumulados, em condições de escassez de carbono e/ou energia. Sabese que para degradar o P3HB previamente acumulado nos grânulos, as bactérias contam com as P3HB despolimerases intracelulares e oligômero hidrolases. Diversos genes têm sido anotados como codificadores de P3HB despolimerases intracelulares, tendo destaque para o gene phaZa1, apontado como codificador desta enzima em diversos trabalhos. Um estudo com mutantes de B. sacchari por transposon mini Tn-5 demonstrou que a inativação dos genes phaZal e lonA levou a uma significante redução nas taxas de mobilização de P3HB. Diferente dos genes phaZ, o gene lonA codifica uma protease ATP dependente não mencionada nos trabalhados de mobilização de P3HB anteriores, assim sua ação no processo ainda não está esclarecida. Acredita-se que LonA possa atuar ou como uma peptidase envolvida na ativação de P3HB despolimerases intracelulares, ou ainda como uma nova P3HB despolimerase intracelular, não descrita anteriormente. O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito da expressão dos genes phaZal e lonA no processo de mobilização de P3HB. Para tal, o trabalho se dividiu em duas etapas. Na primeira etapa foi realizada a complementação heteróloga dos mutantes de B. sacchari afetados nos genes phaZal e lonA, a partir genes ortólogos de R. eutropha. A expressão do gene lonA restabeleceu a capacidade de mobilização no mutante $\Delta lonA$, o que confirma o envolvimento de LonA na mobilização de P3HB. O gene lonA, entretanto, não complementou o mutante $\Delta phaZa1$. A expressão do gene phaZal restaurou o fenótipo selvagem em ambos os mutantes, indicando que a superexpressão de phaZal possa suprimir o efeito da interrupção do gene lonA. Em um segundo momento foram construídas linhagens recombinantes de Escherichia coli abrigando tanto os genes de acúmulo de P3HB como de mobilização de R. eutropha. Foram construídas linhagens abrigando o gene phaZa1 e lonA isoladamente e outra ainda abrigando esses dois genes simultaneamente. Surpreendentemente, a presença do gene lonA isoladamente ocasionou um aumento expressivo na capacidade acúmulo de P3HB nas linhagens recombinantes de E. coli. Quando expressos separadamente, tanto phaZa1 quanto lonA, não apresentaram papel significante na mobilização de P3HB. Quando os dois genes (phaZa1 e lonA) foram expressos simultaneamente, as taxas de mobilização do P3HB previamente acumulado atingem mais de 50%. Os resultados indicam que deva

0 ocorrer uma interação entre PhaZa1 e LonA para que o processo de mobilização seja efetivo, contudo o mecanismo de interação entre essas proteínas ainda não é conhecido.

Palavras-chave: Poli-3-hidroxibutirato. Mobilização. P3HB despolimerases intracelulares. *Ralstonia eutropha. Escherichia coli* recombinantes.

ABSTRACT

LOZANO, G. C. Evaluation of the role of genes involved in mobilization of poly-3hydroxybutyrate in recombinant strains of *Escherichia coli*. 2013. 99 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are a family of intracellular polyesters stored in granules in several bacteria representing carbon and energy reserves in these microorganisms. The most studied PHA is the poly-3-hydroxybutyrate (P3HB), and it can be synthesized by several strains, like Ralstonia eutropha and Burkholderia sacchari. The mobilization of PHA is the degradation of granules previously accumulated, during carbon and/or energy starvation. To degrade the P3HB previously accumulated, the bacteria must have intracellular P3HB depolymerases and oligomers hydrolases. Several genes have been annotated as encoding intracellular P3HB depolymerases, mainly the phaZa1 gene, which is described in many reports. A study with mutants of B. sacchari by mini Tn-5 transposon showed that the interruption of phaZa1 and lonA genes led to a significant reduction in rates of P3HB mobilization. Different of phaZa1 gene, the lonA gene encodes an ATP-dependent protease that has not been before related to P3HB mobilization, so its role in this process is not yet clarified. It was hypothesized that LonA can act like as a peptidase involved in the activation of intracellular P3HB depolymerase, or as a novel intracellular P3HB depolymerase, not described before. The present study aimed to evaluate the effect of expression of phaZa1 and lonA genes in the mobilization process of P3HB. Therefore, this work was divided into two steps. In the first step, the heterologous complementation of mutants of B. sacchari affected in phaZal and lonA genes by orthologous genes from R. eutropha was evaluated. The expression of *lonA* gene reestablished the capacity of mobilization in $\Delta lonA$ mutant, confirming the involvement of LonA in mobilization of P3HB. The lonA gene did not complemented $\Delta phaZa1$ mutant. The expression of *phaZa1* gene restored the wild phenotype in both mutants, indicating that a super expression of phaZa1 can suppress the effect of interruption in lonA gene. In a second step, recombinant Escherichia coli strains were constructed harboring both accumulation and mobilization genes of R. eutropha. It was obtained strains harboring the phaZa1 and lonA genes singly and another one harboring both genes simultaneously. Surprisingly, the presence of the lonA gene increased significantly the accumulation capacity in recombinant E. coli strain. When express singly, both phaZa1 and lonA, the genes did not show a significant role in mobilization of P3HB. When both genes (phaZa1 and lonA) were express simultaneously, the mobilization of P3HB rates reached more than 50%. The results indicate that an interaction must occur between PhaZa1 and LonA for an effective P3HB mobilization, however the interaction mechanism between these proteins should be revealed yet.

Keywords: Poly-3-hydroxybutyrate. Mobilization. Intracellular P3HB despolimerases. *Ralstonia eutropha*. Recombinant *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

| Figura 2.1- | Fórmula geral dos polihidroxialcanoatos | 17 |
|--------------|--|----|
| Figura 2.2- | Classificação das diferentes PHA sintase, considerando sua estrutura proteica e afinidade pelo substrato | 18 |
| Figura 2.3- | Via metabólica simplificada de síntese de P3HB em R. eutropha | 19 |
| Figura 2.4- | Via metabólica de síntese e degradação de P3HB em R. eutropha | 24 |
| Figura 2.5- | Esquema de membros típicos das subfamílias LonA e LonB, representado por Lon proteases de <i>Escherichia coli</i> e <i>Archaroglobus fulgidus</i> , respectivamente. | 27 |
| Figura 4.1- | Estratégia de avaliação da mobilização em meio mineral sólido | 43 |
| Figura 5.1- | Avaliação da capacidade de mobilização de P3HB detectada por opacidade das colônias de <i>B. sacchari</i> | 47 |
| Figura 5.2- | Cinética de mobilização de P3HB por <i>B. sacchari</i> em meio mineral | 48 |
| Figura 5.3- | Organização estrutura do gene lonA em Burkholderia sacchari | 51 |
| Figura 5.4- | Perfil de migração em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação por PCR do gene <i>lonA</i> a partir do DNA molde de <i>R. eutropha</i> | |
| Figura 5.5- | Perfil de migração em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pBBR1MSC- 5 abrigando o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | 52 |
| Figura 5.6- | Plasmídeo pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> digerido com <i>Kpn</i> I. (A) Perfil de migração em gel de agarose 0,8% após digestão; (B) Representação do plasmídeo indicando os sítios de restrição de <i>Kpn</i> I | 53 |
| Figura 5.7- | Cinética de mobilização de P3HB por mutante LFM588 ($\Delta lonA$) de <i>B. sacchari</i> complementado com o pBBR1MCS-5: <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular | 55 |
| Figura 5.8- | Cinética de mobilização de P3HB por mutante LFM587 (Δ <i>phaZa1</i>) de <i>B. sacchari</i> abrigando o pBBR1MCS-5: <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular | 56 |
| Figura 5.9- | Cinética de mobilização de P3HB por mutantes LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$) de <i>B. sacchari</i> abrigando o pBBR1MCS-5: <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular | 58 |
| Figura 5.10- | Teor de P3HB presente intracelularmente em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> (LFM280) em meio mineral sob condições de mobilização de P3HB | 59 |

| Figura 5.11- | Teor de P3HB presente intracelularmente em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral sob condições de mobilização de P3HB | 61 |
|--------------|---|----|
| Figura 5.12- | Teor de monômeros de 3HB excretado no meio extracelular por <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral | 62 |
| Figura 5.13- | Avaliação da mobilização de P3HB em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral. (A) Teor de P3HB intracelular; (B) Teor de 3HB no sobrenadante | 63 |
| Figura 5.14- | Biomassa residual de <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral | 64 |
| Figura 5.15- | Micrografia de <i>E. coli</i> recombinantes. (A) LFM1133 (B) CABpBBR5 | 65 |
| Figura 5.16- | Mobilização de P3HB em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando simultaneamente os genes <i>phaZa1</i> e <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral após 72 horas de cultivo | 66 |
| Figura 5.17- | Cinética de mobilização de P3HB em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando simultaneamente os genes de <i>phaZa1</i> e <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral | 67 |
| Figura 5.18- | Perfil de migração em gel de agarose 0,8% após digestão. (A), pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i> digerido com <i>Xba</i> I e <i>Sac</i> I; (B) pBBR1MCS- 5:: <i>lonA+phaZa1</i> linear (digerido com <i>Hind</i> III); (C) Fragmentos de <i>lonA</i> e <i>phaZa1</i> amplificado a partir de pBBR1MCS-5:: <i>lonA+phaZa1</i> | 68 |
| Figura 5.19- | Cinética de mobilização de P3HB em <i>E. coli</i> pSK:: <i>phaCAB</i> abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-5:: <i>lonA+phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> em meio mineral | 69 |

LISTA DE TABELAS

| Tabela 4.1- | Linhagens de bactérias utilizadas | |
|-------------|---|----|
| Tabela 4.2- | Plasmídeos utilizados | 34 |
| Tabela 4.3- | Sequência de oligonucleotídeos utilizados | 34 |
| Tabela 4.4- | Modificações do meio mineral | 36 |
| Tabela 4.5- | Condições de amplificação dos fragmentos de DNA | 40 |
| Tabela 4.6- | Linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> construídas, a partir de LFM280 | 42 |
| Tabela 4.7- | Linhagens controle de <i>E. coli</i> construídas, a partir de LFM280 | 42 |
| Tabela 5.1- | Linhagens recombinantes de B. sacchari construídas | 54 |
| Tabela 5.2- | Concentração de P3HB acumulado intracelularmente durante 48 horas de cultivos em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> | 60 |
| Tabela 5.3- | Concentração de P3HB acumulado intracelularmente durante 48 horas de cultivos em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> abrigando o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | 65 |

| CTI | A TA | DI | \mathbf{n} |
|-------------|------|----|--------------|
| 5 U1 | VLA | К | |
| ~ ~ ~ | | | ~~ |

| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 14 |
|--|----|
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 16 |
| 2.1 Polihidroxialcanoatos | 16 |
| 2.2 Síntese de PHA | 17 |
| 2.3 Estrutura e características dos grânulos de PHA | 20 |
| 2.4 Degradação de P3HB | 20 |
| 2.4.1 Degradação Extracelular | 21 |
| 2.4.2 Degradação Intracelular | 22 |
| 2.5 LonA protease ATP dependente | 26 |
| 2.6 Linhagens de <i>Escherichia coli</i> recombinantes para síntese e mobilização de P3HB. | 30 |
| 3 OBJETIVOS GERAIS | 32 |
| 3.1 Objetivos Específicos | 32 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 Linhagens e Plasmídeos | 33 |
| 4.2 Oligonucleotídeos | 34 |
| 4.3 Condições de crescimento e meios de cultura | 34 |
| 4.4 Composição dos meios de cultura | 35 |
| 4.4.1 Caldo Nutriente (CN) ou Ágar Nutriente (AN) | 35 |
| 4.4.2 Luria-Bertani (LB) | 35 |
| 4.4.3 Meio Mineral (MM) | 35 |
| 4.5 Manipulação de DNA | 36 |
| 4.5.1 Extração de DNA genômico e plasmidial | 36 |
| 4.5.2 Digestão de DNA genômico e plasmidial | 36 |
| 4.5.3 Ligação do DNA | 37 |

| 4.5.4 Eletroforese em gel de agarose | 37 |
|---|----|
| 4.5.5 Inserção de DNA em bactérias por transformação | 37 |
| 4.5.5.1 Choque térmico | 37 |
| 4.5.5.2 Choque elétrico | 38 |
| 4.6 Amplificação do fragmento de DNA por PCR | 39 |
| 4.6.1 Gene lonA | 39 |
| 4.6.2 Gene phaZa1 | 40 |
| 4.7 Clonagem do fragmento <i>lonA</i> em vetor de clonagem | 40 |
| 4.8 Clonagem do fragmento <i>lonA</i> e <i>phaZa1</i> em vetor de clonagem | 41 |
| 4.9 Obtenção de linhagens recombinantes | 41 |
| 4.9.1 B. sacchari | 41 |
| 4.9.2 E. coli | 42 |
| 4.10 Avaliação qualitativa da mobilização de P3HB em meio mineral sólido | 42 |
| 4.11 Avaliação quantitativa de mobilização de P3HB | 43 |
| 4.12 Métodos analíticos | 44 |
| 4.12.1 Determinação de biomassa | 44 |
| 4.12.2 Teor de P3HB e 3HB | 44 |
| 4.12.3 Viabilidade Celular | 45 |
| 4.13 Preservação de linhagens bacterianas | 45 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 46 |
| 5.1 Avaliação de mutantes LFM587 (ΔphaZa1) e LFM588 (ΔlonA) de | |
| B. sacchari | 46 |
| 5.2 Busca de genes ortólogos a <i>lonA</i> em <i>R. eutropha</i> e <i>Burkholderia</i> spp | 50 |
| 5.3 Amplificação e clonagem do fragmento <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | 51 |
| 5.4 Teste de complementação heteróloga dos mutantes de <i>B. sacchari</i> LFM587 (Δ <i>phaZa1</i>) e LFM588 (Δ <i>lonA</i>) | 53 |
| 5.4.1 Teste de complementação com pBBR1MCS-5::lonA | 54 |

| 5.4.2 Teste de complementação com pBBR1MCS-5::phaZa1 | 57 |
|--|----|
| 5.5 Avaliação das linhagens de <i>E. coli</i> recombinantes | 59 |
| 5.5.1 Padronização das condições de acúmulo e mobilização | 59 |
| 5.5.2 Avaliação dos recombinantes portando o gene phaZa1 de R. eutropha | 60 |
| 5.5.3 Avaliação dos recombinantes portando o gene lonA de R. eutropha | 63 |
| 5.5.4 Avaliação dos recombinantes portando, simultaneamente, os genes phaZa1 e lonA de R. eutropha | 66 |
| 6 CONCLUSÕES | 71 |
| REFERÊNCIAS | 72 |
| ANEXOS | 84 |
| ANEXO A – Organização estrutural do gene <i>lonA</i> em espécies de Burkholderiaceae | 85 |
| ANEXO B – Vetor clonagem e plasmídeos utilizados | 88 |
| ANEXO C – Sequências dos genes utilizados | 90 |
| ANEXO D – Dados completos dos experimentos de mobilização de P3HB em linhagens de <i>B. sacchari</i> e <i>E. coli</i> recombinante | 94 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Embalagens descartáveis estão presentes na maioria dos produtos consumidos pela sociedade atual. Dentre estes materiais, os plásticos são um dos mais visados por serem facilmente descartados e manuseados para as mais diversas aplicações. Entretanto, esses plásticos costumeiramente são obtidos a partir de polímeros sintéticos derivados de petróleo que, além de serem obtidos a partir de uma fonte de difícil renovação, apresentam lenta degradação na natureza, acarretando diversos problemas ambientais. Para solucionar tais problemas, a substituição de plásticos de origem petroquímica por polímeros termoplásticos biodegradáveis, tem se mostrado uma boa alternativa.

Dentre esses polímeros, os polihidroxialcanoatos (PHA) se destacam por serem totalmente biodegradáveis, termoplásticos e biocompatíveis. Os PHA se acumulam intracelularmente na forma de grânulos em determinadas bactérias, principalmente em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de pelo menos uma fonte de nutriente essencial à multiplicação celular. O PHA mais conhecido é o poli-3-hidroxibutirato (P3HB). As linhagens da bactéria *Ralstonia eutropha*, são modelos para estudos de P3HB, entretanto a bactéria *Burkholderia sacchari* também se mostra um excelente produtor do polímero, sendo capaz de acumular altos teores do mesmo. Em condições de escassez de carbono e/ou energia, essas bactérias são capazes de mobilizar o polímero, processo este que consiste em degradar os grânulos previamente acumulados intracelularmente. Acredita-se que os processos de síntese e mobilização do P3HB se dão de forma cíclica, podendo ocorrer simultaneamente na bactéria, contudo as taxas de polimerização costumam ser cerca de 10 vezes mais elevadas que as taxas de despolimerização intracelular sob condições de acúmulo de polímero.

A síntese do polímero vem sendo amplamente explorada nas últimas décadas, contudo quando o foco é a mobilização do mesmo, o conhecimento ainda é muito fragmentado devido limitações técnicas. Considerando a biossíntese do polímero para produção de plásticos biodegradáveis, a compreensão do processo de mobilização poderá permitir um maior controle sobre a eficiência de produção, bem como sobre sua massa molecular. Outro aspecto relevante é a possibilidade de se desenvolver processos, nos quais os monômeros são excretados devido à superexpressão de PHA despolimerases, permitindo gerar compostos quirálicos para biossíntese de substâncias bioativas.

Sabe-se que para degradar o P3HB previamente acumulado nos grânulos, as bactérias contam com as P3HB despolimerases intracelulares, além de oligômero hidrolases. Diversos genes têm sido anotados como codificadores de P3HB despolimerases intracelulares,

destacando-se o gene *phaZa1*, o qual foi apontado como codificador desta enzima em diversos trabalhos. Um estudo com *R. eutropha* e *B. sacchari* apontou ainda um possível envolvimento do produto dos genes *phaZa2*, *phaZa3* e *lonA* na mobilização de P3HB. Diferente dos genes *phaZ*, o gene *lonA* está anotado como codificador de uma protease ATP dependente não mencionada em trabalhados anteriores de mobilização de P3HB, assim sua ação no processo ainda não está esclarecida.

Duas hipóteses foram formuladas para explicar a atividade de *lonA*. A primeira sugere que *lonA* codifique uma peptidase envolvida na ativação de P3HB despolimerases intracelulares. Já a segunda hipótese, considera que o produto de *lonA* corresponda a uma nova P3HB despolimerase intracelular, não descrita anteriormente, já que LonA possui uma sequência *lipase box*, semelhante a diversas PHA despolimerases.

Dentro deste contexto, o presente trabalho visa ao estudo do papel do produto dos genes *phaZa1* e *lonA* no processo de mobilização de P3HB, através da construção de linhagens recombinantes de *Escherichia coli*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) constituem uma família de poliésteres sintetizados e armazenados intracelularmente em diversas bactérias, na forma de grânulos, que atuam como reserva de carbono e energia para esses micro-organismos (ANDERSON; DAWES, 1990; GOMEZ; BUENO NETTO, 2001; STEINBÜCHEL; VALENTIM, 1995). Alguns pesquisadores apontam ainda como função fisiológica dos PHA o auxílio na tolerância às condições de estresses ambientais, como pressão osmótica, radiação ultravioleta e dessecação (WANG et al., 2009).

A síntese desses polímeros é influenciada pelas condições ambientais, e passa a ser mais expressiva quando há excesso de fonte de carbono e simultânea limitação de algum nutriente essencial ao crescimento microbiano, como nitrogênio, fósforo ou enxofre (ANDERSON; DAWES, 1990; BRANDL; GROSS; LENZ, 1990; ULMER et al., 1994). Além de mecanismos de síntese, os micro-organismos capazes de acumular essas inclusões são dotados de uma maquinaria de despolimerização, que permite a mobilização do polímero. O processo de mobilização consiste na degradação do polímero previamente acumulado em situações de deficiência ou ausência de fonte exógena de carbono e/ou energia (MERRICK; STEGER; DOMBROSKI, 1999).

Os PHA têm despertado o interesse industrial uma vez que possuem propriedades biodegradáveis, são termoplásticos e biocompatíveis (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; SUDESH; ABE; DOI, 2000). Outro aspecto relevante das características destes polímeros, é que são produzidos a partir de matérias-primas de fácil e rápida renovação e podem substituir polímeros de origem petroquímica em diversas aplicações (BYROM, 1990).

A estrutura química geral dos PHA (Figura 2.1) apresenta um radical R, o qual pode variar desde um átomo de hidrogênio até uma cadeia com 13 carbonos, podendo esta ser dotada de insaturações, ramificações ou átomos como bromo, flúor e cloro, além de cadeias cíclicas e grupos aromáticos (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

Podemos classificar PHA pelo comprimento da cadeia carbônica lateral de seus monômeros em PHA_{SCL} e PHA_{MCL}. Os PHA_{SCL} (*short chain length*) contêm monômeros de cadeia curta, com 3 a 5 átomos de carbono, enquanto que os PHA_{MCL} (*medium chain length*) apresentam monômeros de cadeia média, com 6 a 16 átomos de carbono (FÜCHTENBUSCH; FABRITIUS; STEINBÜCHEL, 1996; FÜCHTENBUSCH et al., 1998; JENDROSSEK;



Figura 2.1 - Fórmula geral dos polihidroxialcanoatos.

Pelo menos 150 diferentes monômeros já foram identificados como constituintes de PHA em diversas bactérias (LUENGO et al., 2003; REHM, 2003; REHM; STEINBÜCHEL, 1999). A composição química dos monômeros presentes na cadeia polimérica varia conforme a linhagem bacteriana em questão, bem como pela fonte de carbono utilizada durante o acúmulo. De acordo com a estrutura química dos monômeros, é possível obter PHA com diferentes propriedades físicas e químicas (RODRIGUES, et al., 1995), o que influencia na qualidade do plástico biodegradável produzido e nas possíveis aplicações para estes materiais. Em muitos casos, o bioplástico é composto por mais de um tipo de monômeros, e são chamados copolímeros.

Dentre os muitos polímeros possíveis, o P3HB (poli-3-hidroxibutirato) é o PHA mais amplamente estudado, apresentando monômeros de quatro carbonos.

A bactéria *Ralstonia eutropha*, também denominada *Cupriavidus necator*, têm sido utilizada como organismo modelo para estudos relacionados à produção de P3HB (REINECKE; STEINBÜRCHEL, 2009), entretanto outros micro-organismos, como a bactéria *Burkholderia sacchari*, têm se mostrado um excelente produtor deste polímero, uma vez que é capaz de acumular intracelularmente até 80% de sua massa seca celular de P3HB, a partir de sacarose (GOMEZ et al., 1996; GOMEZ et al., 1997; SANT'ANA, em elaboração*).

2.2 Síntese de PHA

A síntese de PHA é influenciada principalmente pelas vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, no substrato fornecido na fase de acúmulo e pelo tipo de enzima PHA sintase presente (responsável por catalisar a incorporação dos monômeros na cadeia polimérica). O substrato fornecido é metabolizado até gerar moléculas de hidroxiacil-CoA, que são, por sua vez, adicionados à cadeia de PHA. Importantes rotas metabólicas podem estar envolvidas neste processo, como a degradação oxidativa de ácidos graxos (β -oxidação) e a biossíntese de ácidos graxos (ALDOR; KEASLING, 2003).

Todas as bactérias produtoras de PHA são dotadas da enzima PHA sintase. Esta é considerada a enzima chave para a síntese de PHA, pois é responsável por catalisar a polimerização dos monômeros à cadeia que está sendo formada. As PHA sintases são classificadas de acordo com sua estrutura proteica, número de subunidades e especificidade ao substrato (Figura 2.2). Assim, são divididas em quatro grupos: i) Classe I – compostas por apenas um tipo de unidade proteica (PhaC) e com especificidade por HA_{SCL}; ii) Classe II – constituídas por um tipo de unidade polipeptídica (PhaC1 ou PhaC2), e apresentam especificidade por HA_{MCL}; iii) Classe III – formada por duas subunidades proteicas diferentes (PhaC e PhaE), e tem afinidade por HA_{SCL} e, pelo menos em alguns casos, também por HA_{MCL}; iv) Classe IV – possuem duas subunidades polipeptídicas diferentes (PhaC e PhaR), e tem afinidade por HA_{SCL} (REHM, 2003).



Figura 2.2 – Classificação das diferentes PHA sintases, considerando sua estrutura proteica e afinidade pelo substrato (Adaptado de REHM, 2003).

Dentre os diferentes metabolismos de síntese de PHA, a rota de biossíntese de P3HB é a melhor caracterizada, e tem como modelo a bactéria a *R. eutropha*, que é capaz de utilizar diversos compostos como fonte de carbono, entre eles glicose, frutose, formiato, acetato, lactato e gluconato. Além deste organismo, outras espécies também são capazes de acumular este polímero (STEINBÜCHEL, 1991; 1996).

A biossíntese de P3HB em *R. eutropha*, ocorre a partir de acetil-CoA, um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e a via dos ácidos tricarboxílicos, e abrange três etapas (Figura 2.3). Inicialmente, ocorre a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, pela ação da β -cetotiolase (PhaA), gerando um acetoacetil-CoA; posteriormente o acetoacetil-CoA é reduzido a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA, pela atividade da 3-acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB); por fim os monômeros de (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA são incorporados a uma cadeia polimérica pela ação da P3HB sintase (PhaC) (ANDERSON; DAWES, 1990; STEINBÜCHEL, 1991).



Figura 2.3 - Via metabólica simplificada de síntese de P3HB em R. eutropha (PIEMOLINI, 2004).

Os genes que codificam as enzimas envolvidas na síntese de P3HB (phaA, phaB e phaC) em R. eutropha, assim como em diversas outras bactérias, como Alcaligenes latus e Burkholderia cepacia, encontram-se organizados no operon *phaCAB* (REHM; STEINBÜCHEL, SCHUBERT: KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1991). Outras 1999; organizações gênicas também são conhecidas em bactérias produtoras de PHA, como ocorre em Pseudomonas oleovorans e Pseudomonas aeruginosa, em que os genes que codificam as duas subunidades da PHA sintases (*phaC1* e *phaC2*) estão separados por um gene codificador de uma PHA despolimerase intracelular (*phaZ*) (JENDROSSEK; HANDRICK,2002).

2.3 Estrutura e características dos grânulos de P3HB

Os grânulos de PHA se formam como inclusões discretas, que se localizam no citoplasma bacteriano e variam em tamanho e número nas diferentes espécies produtoras. O desenvolvimento destes grânulos não ocorre de modo aleatório no interior da célula. Acreditase que o modelo que melhor descreve esse processo é do brotamento, no qual os estágios iniciais de síntese ocorrem próximo aos polos da célula e à membrana citoplasmática. Já nos estágios mais tardios da formação dos grânulos, os mesmos podem ser distribuídos de forma mais aleatória na célula (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

Foi demonstrado que a estrutura física do P3HB adota diferentes formas dentro ou fora da célula. *In vivo*, a molécula se encontra na forma nativa (nP3HB), ou seja, em estado amorfo, com cadeias carbônicas móveis e desordenadas e revestida por uma camada superficial de proteínas (MAYER, 1992; PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005; STEINBÜCHEL et al., 1995). Entretanto, quando o P3HB está fora da célula, após extração ou morte e lise celular, a camada superficial do grânulo é danificada e as cadeias poliméricas tendem a assumir uma forma helicoidal, adquirindo um estado cristalino. Nesse estado, o P3HB é denominado desnaturado (dP3HB) (STEINBÜCHEL et al., 1995).

Uma terceira forma de se encontrar o P3HB é como grânulos artificiais (aP3HB). Estes são preparados a partir de uma solução de P3HB cristalino em solvente orgânico que é emulsificado como um detergente, e são costumeiramente utilizados em ensaios de atividade enzimática de despolimerases intracelulares. Suas propriedades, como massa molecular, densidade e tamanho, são semelhantes às encontradas na forma amorfa (HOROWITZ; SANDERS, 1994).

2.4 Degradação de P3HB

Os PHA podem ser catabolizados por diversos micro-organismos através de processos intracelulares ou extracelulares, dependendo da localização do polímero e da presença de enzimas ditas PHA despolimerases.

Os organismos capazes de sintetizar grânulos de polihidroxialcanoatos são também dotados de uma maquinaria de degradação intracelular destes polímeros. A degradação

intracelular consiste na despolimerização ativa dos grânulos endógenos acumulados previamente. Este processo é conhecido como mobilização de PHA. Para tal, as bactérias contam com as enzimas PHA despolimerases intracelulares (i-PHA despolimerase), que tem afinidade com os grânulos amorfos (nPHA), forma que o polímero se encontram *in vivo*. Já a degradação extracelular é a utilização de um polímero exógeno, proveniente da morte e lise de outros organismos produtores de PHA ou ainda de materiais constituídos pelo mesmo que se encontrem no solo. Neste caso é necessária a existência de PHA despolimerases extracelulares (e-PHA despolimerase), que, por sua vez, tem especificidade com os dPHA (estado desnaturado). A degradação extracelular pode ser realizada por fungos e bactérias, que não necessariamente são capazes de produzir o biopolímero (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

Além do estado físico do polímero, nativo ou desnaturado, as PHA despolimerases apresentam especificidade também com o tipo de monômeros que compõe o substrato. Assim, estas enzimas podem ser classificadas ainda, em aquelas que degradam grânulos formados por monômeros de cadeia curta, i-PHA_{SCL} e e-PHA_{SCL}, e enzimas que agem sobre polímeros com monômeros de cadeia média, i-PHA_{MCL} e e-PHA_{MCL}. (HANDRICK et al., 2001; KNOLL et al., 2009).

A maioria das despolimerases apresenta um trio catalítico que constitui seu sítio ativo (serina – histidina – ácido aspártico), sendo a serina catalítica parte de uma sequência denominada *lipase box* (GxSxG). A exceção a esta conformação pode ser observada na P3HB despolimerase intracelular (PhaZa1) de *R. eutropha*, que não apresenta a referida *lipase box* (SAEGUSA et al., 2001).

2.4.1 Degradação Extracelular

Os poliésteres do tipo PHA têm grande destaque por serem facilmente degradados em ambientes naturais. A principal contribuição para esse processo provém da atividade enzimática de micro-organismos (ANDERSON; DAWES, 1990). Outro fator que interfere fortemente na biodegradabilidade dos PHA, são suas propriedades físico-químicas, como taticidade da cadeia, cristalinidade, composição monomérica e acessibilidade à superfície do grânulo (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

A habilidade de degradar PHA extracelular é amplamente distribuída entre bactérias e fungos. Estes micro-organismos podem estar presentes em solo, ambientes aquáticos (dulcícolos ou marinhos), sedimentos de estuário, ar e esgoto aeróbio e anaeróbio, (GONDA; JENDROSSEK; MOLITORIS, 2000; HAN et al., 1998; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). A degradação em sistemas aeróbios resulta na formação de água e gás carbônico, ao passo que em condições anaeróbias obtêm-se água, gás carbônico e gás metano (BRANDL et al., 1995; COX, 1992).

As e-PHA despolimerases, de modo geral, compartilham diversas características. Podemos ressaltar, a alta estabilidade em condições adversas de pH, temperatura e força iônica, massa molecular relativamente baixa (<70 kDa), pH alcalino ótimo, inibição pela ação de agente redutores e inibidores de serino-hidrolases e forte afinidade com materiais hidrofóbicos. Acredita-se, que a maioria destas enzimas possui atividades de endo e exohidrolases (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). De acordo com a despolimerase, o produto final varia, podendo ser apenas monômeros, uma mistura de monômeros e dímeros, ou diferentes oligômeros. Neste último caso, as bactérias contam ainda com a ação de oligômero hidrolases ou dímero hidrolases para clivagem em monômeros (SAITO; KOBAYASHI, 2001; SCHERER et al., 2000). Estes monômeros, quando dentro da célula, são oxidados, no caso do 3HB, a acetoacetato, pela ação de P3HB desidrogenase NAD específica, e seguem para a formação de acetil-CoA, via acetoacetil-CoA sintetase (DOI et al., 1990; SUGYAMA et al., 2004).

Os genes que codificam as e-PHA despolimerases formam a família dos *phaZ*, e têm sido clonados e analisados desde 1989, por Saito e colaboradores. Diversos genes tiveram seus produtos envolvidos na degradação extracelular. A maioria deles é codificador de e-PHA_{SCL}, porém trabalhos recentes identificaram diversas e-PHA_{MCL} (GANGOITI et al., 2012; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; MARTÍNEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

2.4.2 Degradação Intracelular

Considerando que os PHA são inclusões de armazenamento de carbono e/ou energia, os organismos capazes de sintetizarem esses polímeros são dotados também de uma maquinaria de despolimerização intracelular, para sua utilização. Este processo de degradação é denominado mobilização, no qual o grânulo nativo (nPHA) é mobilizado para atender as necessidades da célula. Para tal, as bactérias contam com as PHA despolimerases intracelulares (PhaZs) e com as oligômeros hidrolases (PhaYs), que geram monômeros e/ou oligômeros.

Estudos que avaliaram os processos de síntese e de mobilização destes bioplásticos sugeriram que o metabolismo de PHA é um processo cíclico, no qual as PHA sintases e PHA despolimerases intracelulares (i-

PHA despolimerases) atuam simultaneamente. Entretanto, as taxas de polimerização costumam ser cerca de 10 vezes mais elevadas que as taxas de despolimerização intracelular sob condições de acúmulo de polímero (DOI et al., 1990; DOI et al., 1992; KAWAGUCHI; DOI, 1992; REN et al., 2009; WANG et al., 2009). Um trabalho envolvendo glicose marcada com carbono-14 para a produção de P3HB confirmou a hipótese de síntese e mobilização simultânea, uma vez que as bactérias incorporaram altas taxas de P3HB mesmo após a fase de acúmulo, ou seja, durante a degradação (TAIDI; MANSFIELD; ANDERSON, 1995).

A Figura 2.4 esquematiza o metabolismo de síntese e mobilização de P3HB em *R. eutropha*. Neste processo, a degradação se inicia pela ação das i-P3HB despolimerases que hidrolisam o polímero formando monômeros e/ou oligômeros de ácido R-3-hidroxibutírico (3HB). Estes monômeros são então oxidados a acetoacetato, pela 3-hidroxibutirato desidrogenase NAD⁺ específica, que posteriormente será convertido em acetoacetil-CoA, pela acetoacetato-succinil-CoA transferase ou pela acetoacetil-CoA sintetase, passo que requer gasto de energia. Por fim, a enzima β -cetiolase (PhaA) cliva o acetoacetil-CoA em duas moléculas de acetil-CoA, que pode seguir pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos (DOI et al., 1990; SENIOR; DAWES, 1973).

Os primeiros trabalhos sobre a despolimerização de PHA datam da década de 60 no laboratório do Dr. Merrick, empregando grânulos isolados de *Bacillus megaterium* contendo P3HB. Os grânulos apresentaram baixa atividade de auto-hidrólise, mas foram rapidamente hidrolisados quando tratados com extratos de *Rhodospirillum rubrum*, gerando monômeros de 3HB e oligômeros. Curiosamente, este extrato de *R. rubrum* continha dois componentes solúveis necessários para a hidrólise, sendo uma despolimerase termolábil e um ativador termoestável. Sob certas condições, o ativador pôde ser substituído por tripsina, o que indica tratar-se de uma protease. Supõe-se que o ativador, de alguma forma, interaja com a superfície do grânulo, deixando o polímero acessível para a despolimerase (MERRICK; DOUDOROFF, 1964; MERRICK; LUNDGREN; PFISTER, 1965).



Figura 2.4 - Via metabólica de síntese e degradação de P3HB em *R. eutropha* (Adaptado de SHIRAKI; ENDO; SAITO, 2006).

Em *R. eutropha*, a primeira P3HB despolimerase intracelular foi descrita no início da década de 2000 e denominada PhaZ (atualmente PhaZa1). Sua caracterização se deu quando o grupo de Saito identificou um gene codificador de uma enzima capaz de degradar grânulos artificiais do polímero. Na análise da sequência de PhaZa1, notou-se que esta não possui uma sequência de *lipase box* (GxSxG), comum as demais despolimerases descritas. O mesmo trabalho avaliou ainda mobilização de um mutante de *R. eutropha* que teve o gene *phaZa1* interrompido, e foi possível notar que a taxa de mobilização caiu, sugerindo sua ação como i-P3HB despolimerase (SAEGUSA, et al., 2001).

Em 2003, com base na similaridade das sequências, foram identificadas duas novas enzimas possivelmente envolvidas no processo de mobilização em *R. eutropha* (PhaZa2 e PhaZa3). Foram obtidos e avaliados mutantes ($\Delta phaZa1$, $\Delta phaZa2$, $\Delta phaZa3$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa2$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa3$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa2$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa3$, e observou-se que o papel de PhaZa1 na mobilização de P3HB é mais expressivo que as demais possíveis despolimerases (KOBAYASHI et al., 2003; YORK et al., 2003).

Diversos autores estudaram o papel do produto de *phaZa1* de *R. eutropha* na mobilização de P3HB, quando expresso em linhagens recombinantes de *E. coli* com

concomitante expressão do operon de síntese (*phaCAB*), ou seja, capazes de produzir o polímero, porém sua ação nestes recombinantes ainda não está totalmente esclarecida (LEE; LEE, 2003; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009).

Atualmente, pelo menos nove genes foram anotados como relacionados à mobilização de P3HB em *R. eutropha*, sendo que 7 codificariam P3HB despolimerases intracelulares (*phaZa1* a *phaZa5*, bem como *phaZd1* e *phaZd2*) e 2 oligômero hidrolases (*phaY1* e *phaY2*) (ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; BRIGHAM et al., 2012; HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; JENDROSSEK, 2009; KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2005; KOBAYASHI; SAITO, 2003; POHLMANN et al., 2006; SAEGUSA et al., 2001; YORK et al., 2003).

Um estudo demonstrou que os produtos dos genes *phaZa1*, *phaZa2* e *phaZa3* de *R*. *eutropha* apresentam atividade de mobilização de P3HB quando expressos em mutantes de *Burkholderia sacchari* afetados na mobilização do polímero. Entre estes, o produto de *phaZa1* foi o que apresentou resultado mais efetivo na mobilização. A análise comparativa entre os genomas de *R. eutropha* com os genomas do gênero *Burkholderia* foram encontrados genes ortólogos a *phaZa1*, *phaZd1*, *phaY1* e *phaY2* em todas as espécies avaliadas. Algumas espécies apresentam genes ortólogos a *phaZa2* e *phaZd2*. Foram identificados ainda genes, denominados *phaZa6* e *phaZd1b*, que não apresentam ortólogos em *R. eutropha* (CASTELLANOS, 2010). O mesmo trabalho obteve dois mutantes de *B. sacchari* por transposon mini-*Tn5* (NAM03 e NAM04) afetados na mobilização. Foi identificado que estes mutantes tiveram os genes *phaZa1* e *lonA*, respectivamente, interrompidos pelo transposon. A ação do produto de *lonA*, anotado como LonA protease ATP dependente, ainda não está bem esclarecida. Neste trabalho, os mutantes NAM03 (*ΔphaZa1*) e NAM04 (*ΔlonA*) foram denominados LFM587 e LFM588, respectivamente.

Mais recentemente, foi abordada interação entre os produtos de *phaZa1*, *phaZa2*, *phaZa3 e phaZa5* em *R. eutropha*, através de mutantes combinados destes genes. Os resultados deste estudo sugerem que, além do já relatado envolvimento de PhaZa1 na mobilização de P3HB, PhaZa2 também desempenhem papel neste processo, provavelmente remodelando o grânulo para a degradação (BRIGHAM et al., 2012).

Na última década diversos trabalhos apontaram para genes ortólogos relacionados à mobilização de PHA em diferentes espécies bacterianas, incluindo aqueles que codificam i-PHA_{MCL} despolimerases, como *B. sacchari* (CASTELLANOS, 2010), *Rhodospirillum rubrum* (HANDRICK et al., 2004, SZNAJDER; JENDROSSEK, 2011), *Pseudomonas putida* (EUGENIO et al., 2007; PRIETO et al., 2010; REN et al., 2010), *Paucimonas lemoignei* (JENDROSSEK et al., 2013), *Azotobacter vinelandii* (ADAYA et al., 2013).

Além das PHA despolimerase intracelulares, algumas oligômero hidrolases já foram associadas a esse processo (DOI et al., 1990; KOBAYASHI et al., 2003; 2005; SENIOR; DAWES, 1973; SUGIYAMA et al., 2004; UEDA et al., 2002).

O mecanismo bioquímico pelo qual os PHA são mobilizados é pouco compreendido, pois mesmo que a literatura relate diversas i-PHA despolimerases putativas, os pesquisadores ainda enfrentam muitas limitações técnicas para avaliá-las (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008). O estudo da mobilização de PHA se faz relevante, uma vez que esse processo pode interferir na eficiência de acúmulo do polímero ou na massa molecular deste. Outro aspecto importante é que a mobilização de PHA pode ser empregada para a obtenção de monômeros do polímero, que podem ser utilizados como compostos quirálicos para biossíntese de compostos bioativos (LEE; LEE, 2003; LEE; LEE; WANG 1999; PRIETO et al., 2010).

2.5 LonA protease ATP dependente

As proteases do tipo Lon consistem em uma família de proteases ATP dependentes conservadas em procariotos e em organelas eucarióticas (ROTANOVA et al., 2006). Proteínas Lon, como outras proteases ATP dependentes (FTSH proteases, ClpAP, ClpXP, HsIVU, proteassoma 26 S), pertencem à superfamília das proteínas AAA+ (ATPases Associadas à diversas Atividades celulares) (IYER et al., 2004; MAURIZI; LI, 2001; NEUWALD et al., 1999). Membros desta família compartilham um domínio ATPase altamente conservado (SNIDER; THIBAULT; HOURY, 2008; STRIEBEL; KRESS; WEBER-BAN, 2009). Com isso, estas proteínas são capazes de realizar uma ampla gama de funções celulares. A versatilidade das AAA+ proteases muitas vezes é definida pelos parceiros funcionais com os quais se associam, a saber: desdobramento de proteínas, proteólise, fusão de membrana, translocação de proteínas e organelas, desenrolamento de DNA e RNA, montagem e desmontagem de complexos multiproteicos, para citar os mais conhecidos (ROTANOVA et al., 2006).

A protease Lon de *E. coli* foi a primeira a ser identificada, e denominada protease La (CHUNG; GOLDBERG, 1981; SWAMY; GOLDBERG, 1981). A clonagem e caracterização de seu gene se deram anos depois (AMERIK et al., 1988; 1990). Atualmente, o gene que

codifica a protease Lon de *E. coli* é anotado com diversos nomes, como: *lonA, lon, capR, deg, dir, ECK0433, JW0429, lopA, muc* (GenBanK).

Foi reportado que as Lon proteases possuem um domínio ATPase central e um domínio proteolítico C-terminal. A família Lon é dividida em duas subfamílias, LonA e LonB, que se caracterizam por diferenças no número de domínios e nas características destes (Figura 2.5) (AMERIK et al., 1990; ROTANOVA; MELNIKOV; TSIRULNIKOV, 2003; ROTANOVA et al., 2004; 2006). Em adição ao domínio catalítico, a subfamília LonA, encontrada em bactérias e eucariotos, apresenta um grande domínio N-terminal, o qual acredita-se estar envolvido no reconhecimento do substrato (MELNIKOV et al., 2008). Já a subfamília LonB, característica de arqueas, além de não apresentar o referido domínio N-terminal, possui um domínio transmembrânico inserido na região ATPase que ancora proteínas no lado citoplasmático da membrana (ROBERTSON et al., 2000; ROTANOVA et al., 2006).





Embora as proteínas do tipo Lon tenham sido as primeiras proteases ATP dependente a serem estudadas, o conhecimento atual de sua estrutura, bioquímica e mecanismos de ação estão aquém, quando comparado a outras enzimas similares (ROTANOVA et al., 2006). É sabido que entre as diversas funções, estas proteases são enzimas chaves responsáveis pela proteólise seletiva intracelular, que controla a qualidade da proteína e mantém a homeostase celular (GOLDBERG, 1992; WICKNER; MAURIZI; GOTTESMAN, 1999).

Desde que a protease LonA foi identificada, busca-se caracterizar sua atividade. A obtenção de mutantes no gene *lonA* de *E. coli* K12 resultou em uma variedade de fenótipos,

incluindo superexpressão da cápsula polissacarídica, aumento da sensibilidade a UV e radiação iônica e defeito na divisão celular (CHARETTE; HENDERSON; MARKOVITZ, 1981).

O produto do gene *lonA* teve seu papel relacionado a diversos processos nos diferentes organismos, como divisão celular, biossíntese flagelar, síntese da cápsula, tolerância a acidez, mobilidade, formação de biofilme, regulação da resposta SOS no reparo de DNA, virulência, adaptação a escassez nutricional, regulação do sistema *Quorum Sensing*, entre outras (BREIDENSTEIN; BAINS; HANCOCK, 2012; MELDEREN; AERTSEN, 2009; ROTANOVA et al., 2006).

Umas das atuações de LonA mais estudada é regulação da resposta SOS, e provavelmente a melhor explicação para o controle de LonA sobre esse sistema, compreende a degradação de SulA. O gene *sulA* é induzido diretamente por danos causados no DNA. Por se ligar à proteína de divisão celular FtsZ, SulA impede a formação do septo celular e atrasa a divisão celular, de modo que a célula tenha tempo hábil para reparar o DNA danificado. Quando o DNA é reparado, SulA é degradado por LonA, a divisão celular é retomada e a expressão de *sulA* é desligada. Devido aos vários impactos de SulA na divisão celular, outras proteases ATP dependentes podem degradar esta proteína, quando LonA está ausente. No entanto, LonA continua sendo a principal protease de SulA (MELDEREN; AERTSEN, 2009; MIZUSAWA; GOTTESMAN, 1983; WU; ZHOU; GOTTESMAN, 1999).

Outra atividade atribuída a LonA, juntamente com outras protease ATP dependente, é a de degradar a proteína FlhDC, que regula positivamente a expressão dos genes responsáveis pela regulação flagelar em *Salmonella typhimurium* e *Proteus mirabilis*, e acredita-se que *E. coli* deva ter um mecanismo similar a este. Assim, a proteólise ATP-dependente controla a síntese flagelar desligando a expressão dos genes envolvidos nesse processo (CLARET; HUGHES, 2000; TOMOYASU et al., 2003). A proteólise dependente de LonA também está envolvida no controle de outros mecanismos de mobilidade como o mecanismo de enxame (pulular) e o rastejamento através do pili IV em *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que mutante $\Delta lonA$ desta espécie apresentou deficiência nesses mecanismos e na formação de biofilme (MARR et al., 2007).

Mutações no gene *lonA* também pode conferir uma redução significativa no fenótipo de patogenicidade e/ou virulência, em várias espécies de bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enterica* (TAKAYA et al., 2003), *Brucella abortus* (ROBERTSON et al., 2000), *Campylobacter jeujeni* (COHN et al., 2007), *Agrobacterium tumefaciens* (SU et al., 2006), *Pseudomonas syringae* (LAN et al., 2007) e *P. aeruginosa* (BREIDENSTEIN et al., 2012 b).

Estes patógenos, muitas vezes utilizam sistema de secreção tipo III para infectar as células eucarióticas. A expressão do sistema de secreção tipo III é regulada por LonA, que modula a quantidade de reguladores transcricionais chave para a expressão dos genes envolvidos neste sistema (MELDEREN; AERTSEN, 2009).

Foi demonstrado ainda, que em condições de escassez de aminoácidos uma gama de proteínas ribossomais livres são degradas por LonA, na presença de polifosfato (polyP) em *E. coli*. O polyP forma um complexo com LonA e proteínas ribossomais específicas, que serão degradas resultando em aminoácidos livres. Estes aminoácidos serão, por sua vez, utilizados na síntese de enzimas biossintéticas, permitindo que a célula se adapte às condições de escassez de nutrientes (KURODA et al., 2001).

Heuveling e colaboradores (2008) demonstraram que os genes chave para resistência a acidez em *E. coli* (*gadE, gadA* e *gadBC*) também são regulados em mutantes $\Delta lonA$, e consideraram que LonA possa controlar a quantidade do repressor secundário destes genes.

Recentemente, um trabalho com *Burkholderia cenocepacia* indicou a importância de LonA na síntese de N-acil-homoserinalactonas (AHL), moléculas sinais para a regulação do sistema *Quorum Sensing* (QS). Acredita-se que LonA possa degradar as proteínas repressoras da expressão de genes, cujos produtos estão envolvidos na síntese de AHL (CepR e CicR), uma vez que a síntese de AHL diminuiu drasticamente em cepas com o gene *lonA* mutado (VESELOVA et al., 2012).

Apesar do fato da atividade de LonA estar relacionada a diversos processos, esta protease parece não ser essencial em condições normais de crescimento, pois mutantes de *E. coli* K12 no gene *lonA* se mostraram viáveis, embora tenham sido mais sensíveis à agente que danificam DNA e acumularem uma maior quantidade de proteínas anormais (GOTTESMAN, 2003; MELDEREN; AERTSEN, 2009).

Foi demonstrado, que o gene *lonA* pode ser induzido em condições de estresses como desequilíbrio de sais, presença de etanol, estresses oxidativo, choque térmico, acidez e escassez de nutrientes (JIAHN et al., 2012; MELDEREN; AERTSEN, 2009; RIETHDORF et al., 1994), entretanto ainda não se determinou o seu papel preciso no gerenciamento de estresses.

Recentemente, Jiahn e colaboradores (2012) salientaram a existência de um novo tipo de protease similar a Lon (LonC), que pode estar envolvida na reparação de danos excessivos ou desdobramento de proteínas durante condições de estresse, porém sem consumo de energia.

Não há trabalhos, até o momento, que relatem o envolvimento do produto de *lonA* nos processos de síntese e mobilização de PHA. Pfeiffer e colaboradores (2011) utilizaram uma abordagem de duplo-híbrido para identificar proteínas associadas aos grânulos de P3HB de *R. eutropha*. O sistema de duplo-híbrido representa uma importante abordagem para analisar interações entre macromoléculas *in vivo* e selecionar polipeptídeos que se ligam a uma dada proteína, que serve de isca para as demais. Neste trabalho, foi identificada uma proteína multifuncional, PhaM, capaz de interagir fortemente com a P3HB sintase (PhaC) e com a phasina (proteína associada ao grânulo de P3HB que possui putativa função estrutural) PhaP5. Contudo, não foi observado qualquer envolvimento do produto do gene *lonA*, identificado por sua inativação na mutagênese de *B. sacchari* (CASTELLANOS, 2010).

Foi proposto então que LonA poderia agir de duas formas no processo de degradação do polímero. Uma das hipóteses consiste em *lonA* codificar uma proteína ativadora da hidrólise do polímero pelas PHA despolimerases intracelulares. Esta hipótese se sustenta por ter sido observado em *Rhodospirillum rubrum*, uma mobilização de P3HB mais eficiente quando os grânulos eram previamente tratados com tripsina, sugerindo a existência de uma proteína ativadora de hidrólise do polímero neste organismo (HANDRICK et al., 2004). Entretanto até o momento não há relatos deste perfil em *R. eutropha* ou *Burkholderia* spp. A segunda teoria, por sua vez, propõe que o produto de *lonA* seja uma PHA despolimerase não descrita anteriormente, uma vez que LonA apresenta uma *lipase box*, sequência característica na composição do sítio catalítico de algumas PHA despolimerases (CASTELLANOS, 2010).

2.6 Linhagens de Escherichia coli recombinantes para síntese e mobilização de P3HB

A bactéria *Escherichia coli*, é um dos sistemas mais comumente utilizados nos trabalhos de engenharia genética, incluindo a produção de proteínas recombinantes heterólogas, resultando em um importante organismo no desenvolvimento de produtos biológicos e bioquímicos em larga escala (VICKERS; KLEIN-MARCUSCHAMES; KROEMER, 2012). Isto se deve ao fato dessas bactérias serem de fácil manipulação, crescerem rapidamente, exigirem meios relativamente simples, além de serem genética e bioquimicamente bem conhecidas. Atualmente, existe um grande número de ferramentas que abrangem sistemas de clonagem e expressão de genes em *E. coli*, bem como diversas linhagens com características peculiares que permitem a implantação de tecnologias, criando produtos recombinantes (CHEN; COOTE; HISCOX, 2003; HUANG; LIN; YANG, 2012; LUGOVSKAYA et al., 2006; WOO et al., 2005).

Embora *E. coli* não seja capaz de sintetizar PHA naturalmente, suas linhagens recombinantes são fortes candidatas para a produção industrial destes polímeros, uma vez que apresentam várias vantagens sobre outros micro-organismos, como a utilização de uma grande variedade de fontes de carbono, fragilidade das células para extração do polímero, rápido crescimento, além da ausência de despolimerases intracelulares permitindo acumular teores mais altos de polímero (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012; CHEN et al., 2011; LEE, 1996; LI; ZHANG; QI, 2007).

Diversos trabalhos desenvolveram linhagens recombinantes de *E. coli* capazes de produzir PHA. Os primeiros estudos datam a década de 1980, quando o operon de síntese de *R. eutropha, phaCAB*, foi clonado e expresso nesta bactéria (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SCHUBERT; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1988). Isso impulsionou o desenvolvimento de inúmeras pesquisas que, até os dias atuais, visam melhorias na produção destes biopolímeros a partir de linhagens de *E. coli* recombinantes (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012). Outros organismos, incluindo produtores de PHA_{MCL}, tiveram seus genes de biossíntese clonados e expressos em *E. coli*, como *Pseudomonas aeruginosa, Alcaligenes latus, Thiocapsa pfennigii, Azotobacter* sp. e *Streptomyces aureofaciens* (CHOI; LEE; HAN, 1998; LANGENBACH; REHM; STEINBÜCHEL, 1997; LIU; STEINBÜCHEL, 2000; MAHISHI; TRIPATHI; RAWAL, 2003).

Além de abrigar genes de síntese de PHA, alguns autores vislumbraram na bactéria *Escherichia coli* um sistema adequado para estudar também os genes que tenham seus produtos supostamente envolvidos no processo de mobilização destes biopolímeros, uma vez que esse micro-organismo é desprovido de sistemas naturais específicos para realizarem este processo (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009).

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o processo de mobilização de P3HB, através de mutante de *B. sacchari* e de linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando tanto os genes de acúmulo de P3HB como os genes supostamente envolvidos na mobilização desse polímero.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a cinética de mobilização dos mutantes de *B. sacchari* LFM587 e LFM588, que possuem os genes *phaZa1* e *lonA*, respectivamente, interrompidos pelo transposon mini-*Tn5*;
- Busca de genes ortólogos ao gene *lonA* em Burkholderiaceae;
- Avaliar a cinética de mobilização dos mutantes de *B. sacchari* LFM587 e LFM588, após teste de complementação heteróloga, como genes *phaZa1* e *lonA* de *R. eutropha*;
- Avaliar a cinética de mobilização de P3HB em *E. coli* recombinante abrigando o operon de síntese, *phaCAB*, e o gene *phaZa1*;
- Avaliar a cinética de mobilização de P3HB em *E. coli* recombinante abrigando o operon de síntese, *phaCAB*, e o gene *lonA*;
- Avaliar a cinética de mobilização de P3HB em *E. coli* recombinante abrigando o operon de síntese, *phaCAB*, e os genes *phaZa1* e *lonA* simultaneamente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens e Plasmídeos

As linhagens de *B. sacchari, E. coli, R. eutropha* e os plasmídeos utilizados no presente trabalho estão listados nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente.

| Tabela 4.1 - Linhagens de bactérias utilizadas. |
|---|
|---|

| Linhagem | Genótipo e fenótipo | Referência |
|-----------------|--|-------------------------------|
| B. sacchari | | |
| LFM101 | Sac ⁺ , P3HB ⁺ , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S , linhagem isolada de solo de canavial | Gomez, 1994 |
| LFM344 | Sac ⁺ , P3HB ⁻ , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S , mutante obtido por radiação UV | Filipov, 2000 |
| LFM403 | Sac ⁺ , P3HB ⁺ , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S , mutante obtido por radiação UV deficiente na mobilização de P3HB | Filipov, 2000 |
| LFM587 | Sac ⁺ , P3HB ⁺ , Kan ^R , Amp ^S , Gm ^S , mutante mini- <i>Tn5</i> , deficiente na mobilização de P3HB, afetado no gene <i>phaZa1</i> | Castellanos, 2010 |
| LFM588 | Sac ⁺ , P3HB ⁺ , Kan ^R , Amp ^S , Gm ^S , mutante mini- <i>Tn5</i> , deficiente na mobilização de P3HB, afetado no gene <i>lonA</i> | Castellanos, 2010 |
| LFM1126 | Gm ^R , mutante LFM587 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> | Este trabalho |
| LFM1127 | Gm ^R , mutante LFM587 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |
| LFM1128 | Gm ^R , mutante LFM588 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |
| LFM1129 | Gm ^R , mutante LFM588 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> | Este trabalho |
| E. coli | | |
| XL1-Blue | PHA ⁻ , lac ⁻ , Tc ^R , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S , <i>lacI</i> ^q | Bullock et al., 1987 |
| LFM280 | P3HB ⁺ , Amp ^R , XL1-Blue abrigando pSK:: <i>phaCAB</i> de <i>R. eutropha</i> | Bocanegra- Rodriguez, 2012 |
| LFM1133 | Gm ^R , LFM280 abrigando pBBR1MCS-5::lonA de R. eutropha | Este trabalho |
| LFM1134 | Kan ^R , LFM280 abrigando pBBR1MCS-2::phaZa1 de R. eutropha | Este trabalho |
| LFM1135 | Kan ^R , Gm ^R LFM280 abrigando pBBR1MCS-2:: <i>phaZa1</i> e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |
| LFM1136 | Gm ^R , LFM280 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>lonA+phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |
| R. eutropha H16 | Linhagem selvagem produtora de PHA _{SCL} | Schlegel et al., 1961 |

LFM – Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos do ICB-USP; sac⁺ - crescimento em sacarose; PHA⁻ – sem acúmulo de PHA; P3HB⁺ - acúmulo de P3HB; Kan^S – sensível à canamicina; Amp^S – sensível à ampicilina; Gm^S – sensível à gentamicina; P3HB⁻ - sem acúmulo de P3HB; Kan^R – resistente à canamicina; Tc^R – resistente à tetraciclina, Gm^R – resistente

à gentamicina; Amp^{R} – resistente à ampicilina; $lacI^{q}$ – superexpressão do do repressor lacI; lac^{-} – deleção parcial do gene lacZ.

| Plasmídeos | Descrição | Referência |
|---------------------------|---|-------------------------------|
| pBluescript II SK(-) | Amp ^R , <i>lacPOZ'</i> , MCS | Strategene |
| pSK ⁻ ::phaCAB | pBluescript II SK(-) abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> . | Bocanegra- Rodriguez, 2012 |
| pBBR1MCS-2 | Vetor de amplo espectro de hospedeiro, <i>lacPOZ'</i> , Kan ^R , MCS, Mob | Kovach et al., 1995 |
| pBBR1MCS-2::phaZa1 | pBBR1MCS-2 abrigando fragmento de DNA de 1,9Kb contendo o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> | Castellanos, 2010 |
| pBBR1MCS-5 | Vetor de amplo espectro de hospedeiro, <i>lacPOZ'</i> , Gm ^R , MCS, Mob | Kovach et al., 1995 |
| pBBR1MCS-5::phaZa1 | pBBR1MCS-5 abrigando fragmento de DNA de 1,9 Kb contendo o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> | Castellanos, 2010 |
| pBBR1MCS-5::lonA | pBBR1MCS-5 abrigando fragmento de DNA de 2,7 Kb contendo o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |
| pBBR1MCS-5::lonA+phaZa1 | pBBR1MCS-5 abrigando simultaneamente os fragmentos de DNA de 2,7 Kb contendo o gene <i>lonA</i> , e de 1,9 Kb contendo o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> | Este trabalho |

Tabela 4.2 – Plasmídeos utilizados.

lacPOZ' – abrigando promotor lac (*lacP*), operador lac (*lacO*) e peptídeo α da β -galactosidase (*lacZ'*); MCS – sítio múltiplo de clonagem; Mob – capaz de ser mobilizado.

4.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados de modo a amplificar o gene de interesse, bem como uma região anterior a este, abrangendo uma possível sequência promotora deste gene (Tabela 4.3).

| Nome | Sequência | Finalidade |
|--------|------------------------------------|---|
| PhaZa1 | 5'-TGCGCAACGAGCATGGCATCTACG-3' | Amplificação de <i>phaZa1</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> |
| | 5'-TGTTCCGCGACGATATCGACGTGC-3' | Amplificação de <i>phaZa1</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> |
| LonA | 5'-CTCGAGTGGACGTCATGTACGACCTGC-3' | Amplificação de <i>lonA</i> de <i>R</i> . <i>eutropha</i> |
| | 5'- GTCGACTCAGTGATGCAGACGCTCAAC-3' | Amplificação de <i>lonA</i> de <i>R</i> . eutropha |

Tabela 4.3 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados.

4.3 Condições de crescimento e meios de cultura
As linhagens de *B. sacchari* e seus mutantes avaliados neste trabalho foram cultivados a 30 °C em Caldo Nutriente (CN) ou Meio Mineral (MM) (RAMSAY et al., 1990) contendo ou não sacarose como fonte de carbono. As linhagens de *E. coli*, por sua vez, foram inoculadas a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) ou Meio Mineral (RAMSAY et al., 1990) contendo ou não glicose como fonte de carbono. Quando necessário, os meios foram suplementados com antibióticos ampicilina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) ou gentamicina (15 µg/mL) e com tiamina (10 µg/mL).

4.4 Composição dos meios de cultura

4.4.1 Caldo Nutriente (CN) ou Ágar Nutriente (AN)

| Peptona | 5 g/L |
|--------------------------------|--------|
| Extrato de carne | 3 g/L |
| Ágar (apenas para meio sólido) | 20 g/L |

4.4.2 Luria-Bertani (LB)

| Triptona | 10 g/L |
|--------------------------------|--------|
| Extrato de levedura | 5 g/L |
| NaCl | 5 g/L |
| Ágar (apenas para meio sólido) | 20 g/L |

4.4.3 Meio Mineral (MM)

| Na ₂ HPO ₄ | 3,5 g/L |
|--|---------|
| KH ₂ PO ₄ | 1,5 g/L |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1,0 g/L |
| MgSO ₄ .7H ₂ O sol 20% (m/v) | 1 mL/L |
| CaCl2.2H2O sol 1% (m/v) | 1 mL/L |
| Citrato Férrico Amoniacal sol 6% (m/v) | 1 mL/L |
| Solução de Elementos Traços* | 1 mL/L |
| Ágar (apenas para meio sólido) | 20 g/L |

*Solução de Elementos Traços

| H ₃ BO ₃ | 0,30 g/L |
|---------------------------------------|----------|
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,20 g/L |
| ZnSO ₄ .4H ₂ O | 0,10 g/L |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,03 g/L |
| NaMoO ₄ .2H ₂ O | 0,03 g/L |
| NiCl ₂ .6H ₂ O | 0,02 g/L |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,01 g/L |

De acordo com a necessidade, os meios minerais sólidos e líquidos foram modificados, adicionando diferentes concentrações de fontes de carbono e sulfato de amônio (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Modificações do Meio Mineral

| - | Meio de Cultura | Fonte de Carbono (sacarose ou glicose) | Sulfato de Amônio | Finalidade |
|---|-----------------|---|-------------------|-----------------------|
| - | MM15/1 | 15 g/L | 1 g/L | Acúmulo de P3HB |
| | MM0/3 | | 3 g/L | Mobilização de P3HB |
| | MM5/0,5 | 5 g/L | 0,5 g/L | Acúmulo e Mobilização |

4.5 Manipulação de DNA

4.5.1 Extração de DNA genômico e plasmidial

Para a extração de DNA genômico foi utilizado o kit DNeasy[®] Blood & Tissue (QiaGEM, São Paulo, SP, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A extração de DNA plasmidial, foi realizada com o kit Qiaprep[®] Spin Miniprep (QuiaGEM), conforme as instruções do fabricante.

4.5.2 Digestão de DNA genômico e plasmidial

Os DNAs plasmidiais previamente extraídos foram digeridos com enzimas de restrição do tipo *FastDigest*[®] (Fermentas *Life Sciences*, São Paulo, SP, Brasil), com volume final de 10 μ L ou 20 μ L. As reações de digestão ocorreram de acordo com as orientações do fabricante, seguindo as concentrações, temperatura e tempo de incubação, específicos de cada enzima.

4.5.3 Ligação do DNA

As ligações dos diferentes fragmentos de DNA ocorreram com o uso da enzima T4 DNA Ligase (Fermentas *Life Sciences*), em volume final de 10 µL ou 20 µL, com incubação a 22° C, seguindo concentração e tempo de incubação indicados pelo fabricante.

4.5.4 Eletroforese em gel de agarose

As extrações, digestões, ligações e produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), realizados a partir de DNA genômico e plasmidial, foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) com tampão de corrida TAE 1X (Tris-base – 242 g/L, EDTA 0,5 M – 100 mL, ácido acético glacial – 57,1 g/L). As corridas foram realizadas a 70 V, 70 mA, 70 W, por 60 minutos.

Os fragmentos foram observados com coloração do gel por SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e visualização sob luz UV (253nm) em transiluminador (UVP[®]).

4.5.5 Inserção de DNA em bactérias por transformação

4.5.5.1 Choque térmico

Células de *E. coli* XL1-Blue foram inoculadas em 25 mL de meio LB líquido contendo MgCl₂ (10 mM) e MgSO₄ (10 mM) e incubadas em agitador rotativo a 37 °C até atingir densidade ótica (D.O._{650nm}) de 0,3 – 0,5 unidade de absorbância. Após a incubação, 8 mL da cultura foram centrifugadas (15 min, 4.200 g, 4 °C). As células obtidas foram ressuspensas com 4 mL de tampão de transformação, mantidas 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Para a obtenção de células competentes, a massa celular obtida após a centrifugação foi novamente ressuspensa em 1,0 mL de tampão de transformação, divididas em alíquotas de

200 μ L. Para cada alíquota de células competentes adicionou-se 5 μ L da ligação de DNA de interesse. A mistura foi então incubada em banho de gelo por 30 minutos e submetida a choque térmico por 120 segundos a 42 °C, e imediatamente resfriadas em gelo. Adicionou-se 0,6 mL de meio LB às células, que foram então incubadas por 1 hora a 37 °C.

Para a seleção dos clones transformantes, o cultivo foi incubado em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado, 20 μ L de solução de IPTG – isopropil-tio- β -D-galactosídeo (0,1 M) e 50 μ L de solução de X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo (20 mg/mL), a 37 °C, por 24 horas.

Tampão de transformação

| Tris/HCl | 10mM – pH 8,0 |
|-----------------------|---------------|
| CaCl ₂ | 50 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| Água destilada q.s.p. | 1000 mL |

4.5.5.2 Choque elétrico

Células eletrocompetentes da linhagem *E. coli* XL1-Blue e *B. sacchari* foram preparadas conforme descrito por Ausubel et al. (1992). Uma colônia da bactéria foi inoculada em meio LB líquido durante 16 horas a 37 °C ou 30 °C em agitador rotativo. Após a incubação, a densidade ótica (D.O._{610nm}) foi determinada e um volume adequado de meio LB foi adicionado ao cultivo, de modo a se obter D.O._{610nm} inicial de 0,1 unidades de absorbância e 500 mL de cultura final. O cultivo foi então incubado a 37 °C em agitador rotativo e medições de D.O. foram realizadas, até atingir D.O._{610nm} = 0,5 – 0,6.

Atingida a densidade celular adequada, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga pré-resfriados, mantida em banho de gelo (15 min), e centrifugadas (15 min, 10.600 g, 4 °C). Desprezando o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 mL de água milli-Q estéril e gelada, e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 50 mL de água milli-Q estéril e gelada, e centrifugadas nagora ressuspendidas. O sobrenadante foi mais uma vez desprezado e as células foram agora ressuspendidas em 25 mL de glicerol 10% gelado, distribuídas em alíquotas de 40 μ L e conservadas em freezer -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes com os plasmídeos de interesse, foram adicionadas as alíquotas 2 μ L da ligação de DNA. A mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm, previamente resfriadas. As células foram eletroporadas a pulsos de 2500 V, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω . Adicionou-se 1,0 mL de meio LB às células, que foram incubadas a 37 °C ou 30 °C, por 1 hora. Posteriormente, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37 °C ou 30 °C, por 24 horas ou 48 horas. Para as linhagens de *E. coli* XL1-Blue foi adicionado ainda 20 μ L de solução de IPTG (0,1 M) e 50 μ L de solução de X-Gal (20 mg/mL), permitindo diferenciar colônias brancas (contendo inserto) e azuis (sem inserto).

4.6 Amplificação do fragmento de DNA por PCR

4.6.1 Gene lonA

O gene *lonA* foi obtido por amplificação a partir do DNA genômico de *R. eutropha* H16, utilizando a técnica de PCR, com o auxílio de iniciadores de oligonucleotídeos descritos na Tabela 4.3. A amplificação foi realizada com Termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil). Para verificar a eficácia dos iniciadores e detectar a presença do gene de interesse, foi utilizado o kit GoTaq Master Mix (Promega, São Paulo, SP, Brasil) e a reação foi realizada nas seguintes condições:

| Água Livre de Nuclease | 0,25 μL |
|-------------------------------------|---------|
| D.M.S.O. (dimetil sulfóxido) | 0,25 μL |
| Kit PCR Máster Mix (Promega) | 3,0 µL |
| Iniciador LonA forward (0,1-1,0 µM) | 0,5 μL |
| Iniciador LonA reverse (0,1-1,0 µM) | 0,5 μL |
| DNA molde (0,1-1,0 ng/µL) | 0,5 μL |

Para a clonagem do gene, a amplificação do gene se realizou com o uso de DNA polimerase de alta fidelidade. A enzima utilizada foi *Phusion - High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo, São Paulo, SP, Brasil), e as condições da reação obedeceram às instruções do fabricante, indicado a seguir.

| Água Livre de Nuclease | 22,0 µL |
|--|---------|
| D.M.S.O. (dimetil sulfóxido) | 1,5 μL |
| 5x Phusion HF Buffer | 10,0 µL |
| 10mM dNTPs | 1,0 µL |
| Iniciador LonA forward (0,2-1,0 µM) | 5,0 μL |
| Iniciador LonA <i>reverse</i> (0,2-1,0 µM) | 5,0 μL |
| DNA molde (1-5 ng/µL) | 5,0 μL |
| Phusion DNA Polimerase | 0,5 μL |

As condições de amplificação do fragmento lonA estão apresentadas na Tabela 4.5.

4.6.2 Gene phaZa1

A amplificação do gene *phaZa1* de *R. eutropha* foi realizada de acordo com as especificações de Castellanos (2010). Foram utilizados iniciadores específicos da Tabela 4.3. As reações se procederam com kit GoTaq Master Mix (Promega), seguindo as mesmas concentrações descritas anteriormente, e as condições de amplificação deste fragmento estão apresentadas na Tabela 4.5.

 Tabela 4.5 - Condições de amplificação dos fragmentos de DNA.

| Fragmento | DNA polimerase | Desnaturação inicial | Nº de ciclos | Desnaturação | Anelamento | Extensão |
|-----------|----------------------------|-------------------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|
| lonA | Kit Máster Mix | 94 °C/2 min | 35 | 94 °C/1 min | 65 °C/2,5 min | 72 °C/2,5 min |
| lonA | Phusion - High Fidelity | 98 °C/30 s | 35 | 98 °C/10 s | 65 °C/30 s | 72 °C/2 min |
| phaZa1 | Kit Máster Mix | 94 °C/2 min | 35 | 94 °C/1 min | 60 °C/3 min | 72 °C/3 min |

4.7 Clonagem do fragmento lonA em vetor de clonagem

O fragmento de *lonA* amplificado foi purificado a partir de gel de agarose utilizado o kit QIAquick[®] Gel Extraction (QiaGEM). O vetor de clonagem pBBR1MCS-5 foi digerido com a enzima de restrição *Sma*I, gerando extremidades abruptas, e posteriormente o amplicon *lonA* foi ligado a esse vetor. O produto da ligação foi transferido para *E. coli* XL1-Blue através de transformação por choque térmico. As colônias resistentes à gentamicina e que apresentavam coloração branca, na presença de IPTG e X-Gal, foram selecionadas.

O DNA plasmidial dos clones selecionados foi extraído, submetidos a PCR, a fim de confirmar a presença do gene, digeridos com enzima de restrição *Kpn*I e analisados em gel de agarose, de modo a se saber a orientação em que o gene foi inserido no vetor. Após a seleção, o produto da ligação foi submetido a sequenciamento (ANEXO B).

4.8 Clonagem do fragmento *lonA* e *phaZa1* em vetor de clonagem

O fragmento *phaZa1* foi obtido a partir do plasmídeo pBBR1MCS-5::*phaZa1* (CASTELLANOS, 2010), que foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sac*I. O plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA* foi digerido com as mesmas enzimas de restrição, obtendo assim extremidade coesivas. Os produtos da digestão foram purificados com o kit QIAquick[®] Gel Extraction (QiaGEM), e posteriormente submetidos a ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Fermentas *Life Sciences*). A eficácia da ligação foi confirmada por reações de PCR de ambos os fragmentos, *phaZa1 e lonA*, bem como por sequenciamento (ANEXO B). O produto da ligação, pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1* (ANEXO C), foi transferido para *E. coli* XL1-Blue LFM280 através de transformação por choque térmico. As colônias resistentes à gentamicina e que apresentavam coloração branca, na presença de IPTG e X-Gal, foram selecionadas.

4.9 Obtenção de linhagens recombinantes

4.9.1 B. sacchari

Os plasmídeos pBBR1MCS-5::*lonA* e pBBR1MCS-5::*phaZa1* foram transferido para os mutantes LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$) por meio de transformação por choque elétrico, permitindo a realização de teste de complementação heteróloga cruzada destes mutantes (LFM1126, LFM1127, LFM128, LFM1129). Como controle foram criadas linhagens abrigando, pelo mesmo procedimento, o vetor pBRR5MSC-1 sem nenhum inserto, para as linhagens LFM101, LFM344, LFM587 e LFM588. As colônias capazes de crescer em meio contendo gentamicina foram selecionadas e avaliadas.

A partir da linhagem LFM280 (*E. coli* XL1-Blue que abriga o plasmídeo pKS:*phaCAB*), foram criados novos recombinantes. A transferência de DNA plasmidial ocorreu por transformação com choque térmico e choque elétrico e as linhagens obtidas estão descritas na Tabela 4.6. As colônias de coloração branca, capazes de sobreviver em meio sólido contendo os respectivos antibióticos, foram selecionadas e submetidas a reações de PCR para a confirmar a inserção dos genes de interesse.

Tabela 4.6 – Linhagens recombinantes de *E.coli* construídas a partir de LFM280 (abrigando pSK::*phaCAB*).

| Linhagem | Abrigando os plasmídeos | | |
|------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| Bacteriana | pBBR1MCS-2::phaZa1 | pBBR1MCS-5::lonA | pBBR1MCS-5::lonA+phaZa1 |
| LFM1133 | - | + | - |
| LFM1134 | + | - | - |
| LFM1135 | + | + | - |
| LFM1136 | - | - | + |
| | | | |

Foram construídas também linhagens controles contendo apenas o vetor, sem os respectivos insertos, como demonstrado na Tabela 4.7.

| Linhagem | Abrigando os vetores | | |
|---------------|----------------------|------------|--|
| Bacteriana | pBBR1MCS-2 | pBBR1MCS-5 | |
| CABpBBR2 | + | - | |
| CABpBBR5 | - | + | |
| CABpBBR2pBBR5 | + | + | |

Tabela 4.7 - Linhagens controle de E. coli construídas a partir de LFM280

4.10 Avaliação qualitativa da mobilização de P3HB em meio mineral sólido

As linhagens de *B. sacchari* obtidas foram dispostas em MMS5/0,5 sólido, contendo sacarose como fonte de carbono, e incubadas a 30 °C por 8 dias, a fim de promover o acúmulo de P3HB e de esgotar a fonte de carbono. Passado esse período, adicionou-se 20 μ L de uma solução de sulfato de amônio (100 g/L), em poços perfurados no meio de cultura sólido (Figura 4.1) e incubou-as a 30 °C por mais 7 dias, nos quais ocorreu a mobilização do polímero (Castellanos, 2010).



Figura 4.1 - Estratégia de avaliação da mobilização em meio mineral sólido.

A análise qualitativa é feita pela opacidade das colônias já que, quando há polímero acumulado intracelularmente estas se mostram mais opacas, e quando o mesmo não está presente apresentam-se mais translúcidas.

4.11 Avaliação quantitativa de mobilização de P3HB

As linhagens cultivadas em AN (*B. sacchari*) ou LB (*E. coli*) sólido foram inoculadas em CN ou LB líquido e incubadas em agitador rotativo a 30 °C (*B. sacchari*) ou 37 °C (*E. coli*) por 24 horas. Após esse período, 10 mL do inóculo foram depositados em MM15/1 (com sacarose ou glicose como fonte de carbono) e incubados novamente em agitador rotativo a 30 °C por mais 24 horas ou a 37 °C por 48 horas, a fim de promover o acúmulo de P3HB. Nos cultivos de *E. coli*, o meio foi suplantado ainda com tiamina (10 µL/ mL), durante esta fase de acúmulo. Procedeu-se então a separação das células com o polímero acumulado por centrifugação (4.200 g, 10 min, 4 °C) e estas foram transferidas para MM0/3, permitindo agora a mobilização do P3HB acumulado anteriormente. Nestas condições, as linhagens foram mantidas por 72 horas, em agitador rotativo, durante as quais foram retiradas amostras periódicas, determinando a massa seca celular, o teor de P3HB intracelular, a concentração de 3HB excretado no sobrenadante e a viabilidade celular.

A porcentagem de P3HB mobilizado foi calculada segundo a fórmula abaixo:

%P3HB mobilizado =
$$\left[1 - \left(\frac{P3HB(g/L)final}{P3HB(g/L)inicial}\right)\right] x100$$

Sempre que necessário, foram adicionados aos meios os antibióticos de interesse.

4.12 Métodos analíticos

As análises descritas abaixo foram realizadas em triplicata biológica.

4.12.1 Determinação de biomassa

A massa seca celular (Xt) foi determinada centrifugando-se 10 mL do cultivo (10.600 g, 10 min, 4 °C). As células foram lavadas com solução salina 0,85% (m/v) e liofilizadas. A massa obtida foi mensurada gravimetricamente. A biomassa residual (Xr) consiste na massa seca celular desconsiderando a massa do polímero acumulado intracelularmente.

4.12.2 Teor de P3HB e 3HB

Células ou sobrenadantes liofilizados foram submetidos à propanólise (RIIS; MAI, 1988). Entre 10 a 20 mg de células ou 5 mL de sobrenadante liofilizados foram transferidas para tubos de vidro aos quais foram adicionados 2 mL de solução de ácido clorídrico e propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram hermeticamente fechados, agitados e colocados em banho quente a 100 °C por 3 horas, com agitações intermitentes. Passado este tempo, os tubos foram resfriados e adicionou-se 4 mL de água destilada, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases, a fase aquosa (superior) foi descartada e fase orgânica (inferior) foi utilizada para análise.

Os propil-ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa (GOMEZ et al., 1996) em cromatógrafo HP7890A Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos da América), equipado com coluna HP-1 (100 % dimethylolysiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 320 mm e espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste - Nitrogênio (0,6 mL/min); temperatura do injetor - 250 °C; temperatura do detector - 300 °C; sistema de detecção - ionização de chama (FID); programa de temperaturas do forno - 100 °C por 3 minutos, elevação da temperatura até 180 °C mantida por 5 minutos e, elevação da temperatura até 240 °C (6 °C/min), mantida por 1 minuto.

Foram realizadas diluições decimais da amostra em solução fisiológica (NaCl 0,85% - m/v). Gotas (25 μL) de cada uma das diluições foram inoculadas em meio de cultura LB sólido, suplementado com antibiótico quando necessário, e incubadas a 30°C ou 37 °C por 24 horas. Procedeu-se a contagem das colônias obtidas a partir de cada gota e os dados foram tratados de acordo com a fórmula a seguir, de modo a estimar o número de células viáveis, em UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro).

Viabilidade celular = <u>Número médio de colônias x 40</u> Diluição

4.13 Preservação de linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas foram preservadas em freezer a -80 °C em glicerol e por liofização. No primeiro caso, cada uma das cepas foi cultivada em meio LB por 12 horas e, em seguida, a cultura foi diluída em 500 μ L de solução aquosa de glicerol a 20%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em alíquotas de 500 μ L em tubos de microcentrífuga, mantidas em congelador de refrigerador doméstico por 90 minutos e posteriormente congeladas em freezer a -80 °C.

Para a preservação das linhagens bacterianas por liofilização, 25 mL de cultivo em meio LB (12 horas) foram centrifugadas e as células ressuspensas em 2,5 mL de solução aquosa de leite desnatado (10%) e glutamato de sódio (5%). A suspensão de células no lioprotetor foi distribuída em alíquotas de 0,2 mL em ampolas de vidro, congeladas lentamente até -35 °C e liofilizadas em aparelho Labconco Triad (Labconco, Kansas City, MO, Estados Unidos da América). As ampolas foram fechadas a vácuo e estocadas entre 4 a 8 °C.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de mutantes LFM587 (ΔphaZa1) e LFM588 (ΔlonA) de B. sacchari

O estudo da mobilização de P3HB teve grande avanço no ano de 2001, quando Saegusa e colaboradores identificaram e caracterizaram o primeiro gene envolvido no processo, o gene *phaZ* (atualmente chamado *phaZa1*). A partir da análise da sequência de *phaZa1* foram encontrados por homologia outros seis genes, identificados como putativos codificadores de P3HB despolimerases intracelulares (ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI; SAITO, 2003; POHLMANN, et al., 2006; JENDROSSEK, 2009; YORK et al., 2003). Dentro deste cenário, Castellanos (2010) em seu trabalho buscou novos genes envolvidos na mobilização de P3HB, através da análise de mutantes por transposon mini-*Tn*5 de *B. sacchari*. Foram obtidos dois mutantes, NAM03 e NAM04 (neste trabalho denominados LFM587 e LFM588, respectivamente), afetados na mobilização de P3HB, cujo sequenciamento acusou terem os genes *phaZa1* e *lonA* interrompidos pelo transposon, respectivamente.

Em seu trabalho, Castellanos (2010) selecionou os mutantes através de teste qualitativo e posteriormente procedeu a análise quantitativa da mobilização de P3HB dos mesmos. A análise da mobilização de P3HB é realizada após uma etapa precedente de acúmulo do polímero, já que o processo a ser avaliado consiste na degradação dos grânulos previamente acumulado intracelularmente. Assim, foi demonstrado que tanto o mutante LFM587 ($\Delta phaZa1$) como LFM588 ($\Delta lonA$), apresentavam uma capacidade de mobilização inferior àquela exibida pela linhagem selvagem (LFM101). Contudo, este estudo não realizou a caracterização detalhada da cinética de mobilização nestes mutantes.

Desta forma, o presente trabalho visa, em um primeiro momento, confirmar o fenótipo descrito por Castellanos (2010) nos mutantes LFM587 e LFM588, seguindo de uma análise da cinética de mobilização de P3HB nestas linhagens.

A reavaliação qualitativa dos mutantes LFM587 e LFM588 ($\Delta phaZa1$ e $\Delta lonA$, respectivamente) se deu através do teste de mobilização em meio mineral sólido (CASTELLANOS, 2010). Foram utilizadas como controle as linhagens LFM101 (linhagem selvagem), LFM344 (mutante UV afetado no acúmulo P3HB) e LFM403 (mutante UV afetado na mobilização de P3HB). A cepa LFM344, por não apresentar polímero intracelularmente, é uma referência comparativa para a mobilização total do polímero, ao

passo que a linhagem LFM403, por mobilizar apenas 40% do P3HB previamente acumulado (FILIPOV, 2000), passa a ser referência para baixas taxas de mobilização. Este teste consiste em uma etapa de cultivo para o acúmulo e outra para a mobilização do polímero, permitindo avaliar o fenótipo das cepas através da opacidade das colônias. As linhagens que se mostram mais opacas ao final das duas etapas de cultivo, possuem P3HB acumulado intracelularmente e as mais translúcidas têm quantidades reduzidas de polímero presente em seu interior. Os resultados obtidos na avaliação qualitativa da capacidade de mobilização de P3HB estão na Figura 5.1.



Figura 5.1 – Avaliação da capacidade de mobilização de P3HB detectada por opacidade das colônias. LFM403 – mutante por UV deficiente na mobilização de P3HB; LFM587 – $\Delta phaZa1$; LFM588 – $\Delta lonA$; LFM101 – linhagem selvagem; LFM344 – mutante por UV deficiente no acúmulo de P3HB.

A linhagem selvagem (LFM101), em sua análise qualitativa da mobilização de P3HB, se mostra bastante translúcida, em comparação com os mutantes LFM587 e LFM588, ou ainda com o controle LFM403 (afetado na mobilização). Entretanto, quando LFM101 é comparada com a cepa LFM344 (incapaz de acumular P3HB e, portanto referência à mobilização total de P3HB), esta se mostra mais opaca, sugerindo que a mobilização de P3HB na linhagem selvagem atinge altas taxas, porém não é total.

O mutante LFM587 apresentou, ao final das duas etapas de cultivo, opacidade semelhante ao controle LFM403, indicando que taxa de mobilização neste mutante é muito baixa ou ausente. Já LFM588 se mostrou mais opaca que a cepa selvagem, entretanto mais translúcida que o controle LFM403 (Figura 5.1). Deste modo, é possível apontar uma deficiência na taxa de mobilização em ambos os mutantes, corroborando com os resultados de Castellanos (2010), que os mutantes avaliados estão afetados na mobilização de P3HB.

Partiu-se então para ensaios quantitativos, de modo a analisar as cinéticas de mobilização de P3HB destas linhagens. Para tal, as cepas analisadas foram previamente cultivadas em meio mineral com excesso de fonte de carbono (15 g/L de sacarose) e limitação de fonte de nitrogênio (1 g/L de sulfato de amônio) por 24 horas, a fim de promover o acúmulo intracelular do polímero. Passado este período, as células foram transferidas para meio mineral livre de fonte exógena de carbono e excesso de fonte de nitrogênio (3 g/L de sulfato de amônio), ideal para mobilização de P3HB, onde foram cultivadas por 72 horas.

Nestas condições foram retiradas amostras periódicas, possibilitando a análise quantitativa da mobilização de P3HB. Foram avaliados, ao longo do ensaio, o teor de P3HB intracelular, a massa seca celular residual e a viabilidade celular (Figura 5.2). Além dos mutantes LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$), foram analisadas também as linhagens LFM101 (selvagem) e LFM344 (mutante incapaz de acumular P3HB) como controle.



Figura 5.2 - Cinética de mobilização de P3HB por *B. sacchari* em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular; (C) Biomassa residual. LFM101-selvagem (—), LFM344-incapaz de acumular P3HB (—), LFM587-Δ*phaZa1* (—) e LFM588-Δ*lonA* (—).

Os cultivos de mobilização de P3HB podem ser divididos em duas fases: a primeira compreendendo as 6 primeiras horas de cultivo e a segunda a partir desse momento. Durante este primeiro período do cultivo, observou-se a maior taxa de mobilização de P3HB pela linhagem selvagem que mobilizou cerca de 70% deste. Na segunda fase do cultivo, a taxa de mobilização do polímero foi bastante reduzida. Os mutantes LFM587 e LFM588 apresentaram redução expressiva na taxa de mobilização de P3HB quando comparados à linhagem selvagem, apontando o envolvimento do produto dos genes *phaZa1* e *lonA* neste processo.

Nas primeiras 6 horas de cultivo, foi observado um aumento da concentração de células viáveis da linhagem selvagem (LFM101) e nos momentos seguintes do cultivo tem-se uma redução nesse parâmetro. Embora ocorra uma redução na concentração de células viáveis, o mesmo não se observa na concentração de biomassa residual, que aumenta no início do cultivo, porém se mantem constante nas horas seguintes, sugerindo que possivelmente ocorra morte celular, mas sem lise destas.

Não foi observado um aumento acentuado da concentração de células viáveis ou de biomassa residual para os mutantes afetados na mobilização de P3HB ou no acúmulo. Tais resultados indicam que pequena parcela de P3HB mobilizado por LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$) foi utilizado para manutenção celular. Estes resultados são compatíveis com a deficiência destes mutantes. O mutante LFM344, que não acúmula P3HB, teve seu crescimento impedido pela ausência de fonte de carbono endógena e exógena. Já nos mutantes afetados na mobilização, embora a fonte de carbono endógena esteja disponível ela não é eficientemente mobilizada, devido à mutação.

Estudos com *R. eutropha* selvagem indicam um aumento da concentração de células viáveis nas primeiras 8 horas de cultivo, quando o P3HB é mobilizado. Entretanto, passado este momento inicial do cultivo de mobilização observa-se que a concentração de UFC se mantem constante (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000).

Ainda neste trabalho, Handrick e colaboradores (2000) afirmam que na ausência de P3HB, as células cultivadas em condições de mobilização, morrem rapidamente, diferente do que foi observado para *B. sacchari*, já que não foi observada uma redução na concentração de células viáveis do mutante incapaz de acumular P3HB (LFM344), durante as 72 horas de cultivo analisadas. Tais dados sustentam a hipótese de que o P3HB não desempenhe papel

essencial na manutenção de *B. sacchari* sob condições de ausência de uma fonte exógena de carbono, pelo menos em períodos relativamente curtos (72 horas).

Os dados completos deste experimento de mobilização de P3HB estão apresentados no ANEXO D.

A relevância do produto do gene *phaZa1* para mobilização de P3HB foi verificada em diferentes trabalhos (CASTELLANOS, 2010; SAEGUSA et al., 2001; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008). Entretanto, apenas recentemente foi indicado que o produto do gene *lonA* estaria envolvido na mobilização de P3HB. Desta forma, esse gene passou a ser o principal objeto deste estudo.

5.2 Busca de genes ortólogos a lonA em R. eutropha e Burkholderia spp.

A partir da sequência do gene *lonA*, interrompida pelo transposon mini-*Tn*5, de *B. sacchari*, recuperou-se as sequências de genes ortólogos a este em outras linhagens deste gênero e em *R. eutropha*. A busca foi realizada comparando a sequência de nucleotídeos disponíveis no GenBank (BLASTn). Diversas linhagens de *Burkholderia* spp. apresentaram genes com alta identidade (87%) com a região interrompida pelo transposon mini-*Tn*5 no genoma de *B sacchari*. Mesmo o gene ortólogo de *lonA* em *R. eutropha* apresentou 85% de identidade com a sequência interrompida de *B. sacchari* (CASTELLANOS, 2010).

A fim de compreender a organização do gene *lonA*, buscou-se pelos genes com maior identidade em linhagens de *Burkholderia* spp. e em *R. eutropha*, analisando também os genes adjacentes a ele.

Foram identificados genes ortólogos a *lonA* em 74 linhagens de *Burkholderia* spp., apresentando pelo menos 84% de identidade. Entretanto, destas linhagens apenas em 42 foi possível alinhar as sequências dos genes adjacentes a *lonA* e determinar sua organização espacial. Todas as linhagens encontradas apresentam a montante de *lonA* um gene que codifica uma ClpX protease ATP dependente, contendo aproximadamente 1270 pb, na maioria das linhagens alinhadas. Entretanto a sequência a jusante do gene variou, o que permitiu a divisão de três subgrupos.

Vinte e cinco linhagens de *Burkholderia* spp. têm anotado, após *lonA*, uma sequência correspondente a um RNA transportador (tRNA-Val contendo 76 pb, para a maioria). Esse grupo tem organização muito similar ao arranjo dos genes anotados em *R. eutropha*.

O segundo grupo, formado por 12 linhagens, apresenta a jusante da sequência de *lonA*, um gene codificador de uma proteína de ligação à DNA, a proteína Hbs (273 pb), sendo que,

na maioria dos casos, esta região é seguida por uma sequência correspondente a um tRNA-Val.

Já o terceiro grupo se formou com 5 linhagens, nas quais é indicado a presença de uma sequência gênica que codifica uma proteína hipotética (com cerca de 140 pb) a jusante de *lonA*. O alinhamento dos nucleotídeos das proteínas hipotéticas sugere tratar-se de sequências codificadoras de uma proteína similar, já que estas possuem 93% de identidade entre si.

A alinhamento completo das sequências de *lonA*, bem como dos genes que o flanqueiam, estão apresentados no ANEXO A.

Com o recente sequenciamento do genoma de *B. sacchari*, foi possível estabelecer o arranjo genético de *lonA* também neste micro-organismo (Figura 5.3). A análise indicou que o gene *lonA* encontra-se flanqueado por uma sequência codificadora de uma ClpX protease ATP dependente e de uma proteína Hbs, como ocorre em diversas espécies do gênero. O arranjo estrutural desses genes sugere que *lonA* se trate de uma sequência bem conservada nas diferentes linhagens bacterianas analisadas.



Figura 5.3 - Organização estrutural do gene lonA em Burkholderia sacchari

5.3 Amplificação e clonagem do fragmento lonA de R. eutropha

A partir da sequência nucleotídeos de *lonA* de *R. eutropha* H16 recuperada no GenBank (BLASTn), foram desenhados iniciadores específicos capazes de amplificar o gene de interesse, bem como um possível promotor da expressão desse gene. Para tal, foi utilizado o programa *FastPCR*. A sequência dos *primers* está descrita na Tabela 4.3. A sequência do possível promotor foi obtida através do programa *Soft Berry* – BPROM, que identificou três regiões semelhantes a outros promotores conhecidos (*rpoD*, *rpoS* e *malT*) (ANEXO C).

O resultado da amplificação foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, obtendo um fragmento de DNA de cerca de 2,7 kb, como esperado (Figura 5.4). O amplicon foi, após purificação, ligado ao vetor pBBR1MCS-5 digerido com a enzima de restrição *Sma*I, obtendo-se o plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA*. Para confirmar a ligação, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Apa*I e *Spe*I, e analisado por eletroforese em gel de

agarose (Figura 5.5). A estrutura do vetor pBBR1MCS-5 e o resultado da clonagem de *lonA* estão representados no ANEXO B.



Figura 5.4 - Perfil de migração em gel de agarose 0,8% do produto de amplificação por PCR do gene *lonA* a partir do DNA molde de *R. eutropha*. 1, fragmento contendo o gene *lonA* (2,7 kb); P, padrão 1kb plus (Fermentas).



Figura 5.5 - Perfil de migração em gel de agarose 0,8% do plasmídeo pBBR1MSC-5 abrigando o gene *lonA* de *R. eutropha*. P, padrão 1kb plus (Fermentas); 1, pBBR1MCS-5; 2, pBBR1MCS-5 digerido com *Sal*I; 3, pBBR1MCS-5::*lonA*; 4, pBBR1MCS-5::*lonA* digerido com *Apa*I; 5, pBBR1MCS-5::*lonA* digerido com *Apa*I e *Spe*I; P, padrão 1kb plus (Fermentas).

Para confirmar a orientação de *lonA* no plasmídeo pBBR1MCS-5 foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *Kpn*I. Como apresentado na Figura 5.6, foi observado um fragmento de 530 pb e outro de 7113 pb, compatível com a inserção do gene em uma orientação que permite também sua transcrição a partir do promotor presente no vetor.



Figura 5.6 - Plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA* digerido com *KpnI*. (A) Perfil de migração em gel de agarose 0,8% após digestão. P, padrão 1kb plus (Fermentas); 1, pBBR1MCS-5::*lonA* digerido com *KpnI*; (B) Representação do plasmídeo indicando os sítios de restrição de *KpnI*. GmR – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; mob – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

O inserto contendo o gene *lonA* foi submetido a sequenciamento, confirmando sua identidade (ANEXO C). Assim, o plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA* foi transferido por transformação em diferentes linhagens bacterianas, a fim de avaliar sua atividade e papel na mobilização de P3HB.

5.4 Teste de complementação heteróloga dos mutantes de *B. sacchari* LFM587 (Δ*phaZa1*) e LFM588 (Δ*lonA*)

A fim de confirmar que o fenótipo observado nos mutantes LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$) é decorrente da interrupção destes genes pelo transposon mini-Tn5, foi realizado teste de complementação heteróloga dos genes referidos, utilizando seus ortólogos a partir do genoma de *R. eutropha*. A análise qualitativa da mobilização de P3HB (resultados não apresentados), demonstrou que a presença de *phaZa1* restituía a capacidade de mobilização dos mutantes LFM587 e LFM588, entretanto quando o teste foi realizado com o gene *lonA*, os resultados indicavam que apenas o mutante LFM588 ($\Delta lonA$) teve se fenótipo restabelecido. Assim, foi realizada a análise quantitativa em experimentos cinéticos de

mobilização de P3HB. As linhagens recombinantes construídas estão apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Linhagens recombinantes de *B. sacchari* construídas.

| Linhagem | Descrição |
|------------|--|
| Bacteriana | |
| LFM1126 | Mutante LFM587 (Δ <i>phaZa1</i>) abrigando pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> . |
| LFM1127 | Mutante LFM587 (ΔphaZa1) abrigando pBBR1MCS-5::lonA de R. eutropha. |
| LFM1128 | Mutante LFM588 (ΔlonA) abrigando pBBR1MCS-5::lonA de R. eutropha. |
| LFM1129 | Mutante LFM588 ($\Delta lonA$) abrigando pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> . |

Foram utilizadas como linhagens controles LFM101 (linhagem selvagem), LFM344 (mutante UV incapaz de acumular P3HB), LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$), todas abrigando o vetor pBBR1MCS-5 sem inserto, de forma a poderem ser comparados com as linhagens abrigando o vetor e os genes avaliados.

Os dados completos destes experimentos estão apresentados no ANEXO D.

5.4.1 Teste de complementação com pBBR1MCS-5::lonA

Para a avaliação da mobilização de P3HB dos recombinantes de *B. sacchari*, estes foram cultivados em condições prévias propícias para o acúmulo do polímero, em meio mineral com excesso de fonte de carbono (15 g/L de sacarose) e limitação de fonte de nitrogênio (1 g/L de sulfato de amônio) por 24 horas. Posteriormente, iniciou-se a fase de mobilização de P3HB, na qual as células foram transferidas para meio mineral livre de fonte exógena de carbono e excesso de fonte de nitrogênio (3 g/L de sulfato de amônio) e cultivadas por 72 horas. Foram retiradas amostras intermitentes para avaliar o teor de P3HB intracelular, a massa seca celular residual e a viabilidade celular.

A cinética de mobilização da linhagem LFM1128 ($\Delta lonA$ abrigando pBBR1MSC-5::*lonA*) está apresentada na Figura 5.7.

A complementação do mutante LFM588 ($\Delta lonA$) com o gene *lonA* de *R. eutropha* (LFM1128) restabeleceu o fenótipo selvagem, possibilitando a mobilização do P3HB previamente acumulado nesta linhagem. Entretanto, é curioso notar que esse processo se mostrou mais acentuado na linhagem recombinante do que na linhagem selvagem, atingido 100% de mobilização de P3HB em 24 horas de cultivo.



Figura 5.7 - Cinética de mobilização de P3HB por mutante LFM588 ($\Delta lonA$) de *B. sacchari* complementado com o pBBR1MCS-5:*lonA* de *R. eutropha* em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular. LFM101 (\frown), LFM588 (\frown), LFM1128 (\frown) e LFM344 (\frown).

A expressão de genes através de vetores plasmidiais pode resultar em uma superexpressão desse gene, quando comparados com a expressão do mesmo em cópia única no DNA genômico. Tal fenômeno ocorre pelo fato de a maioria dos plasmídeos apresentarem várias cópias em seus hospedeiros, como ocorre com pBBR1MCS-5::*lonA*. Com isso, a superexpresão de *lonA*, quando expresso através do plasmídeo, pode justificar a elevada taxa de mobilização de LFM1128. Este resultado indica que atividade de LonA pode ser limitante na mobilização de P3HB pela linhagem selvagem.

O número de células viáveis de LFM1128 ($\Delta lonA$ abrigando pBBR1MSC-5::lonA) e de LFM101 (selvagem) apresentou um aumento acentuado durante as primeiras horas do cultivo, seguida de queda desse parâmetro. Tal evento condiz com as taxas de mobilização desses micro-organismos, que se mostra mais intensa nas primeiras 6 horas de amostragem, permitindo a multiplicação celular. Já o mutante LFM588 ($\Delta lonA$) não apresentou aumento considerável da viabilidade celular nas primeiras horas de cultivo, seguindo de declínio

gradual ao final do experimento. Os resultados evidenciam que a viabilidade celular aumenta proporcionalmente as taxas de mobilização de P3HB de cada linhagem, sugerindo a utilização do polímero para multiplicação celular.

Diante dos resultados apresentados, fica claro o envolvimento do produto de *lonA* na mobilização de P3HB em *B. sacchari*, no entanto, ainda não é possível afirmar que papel essa proteína desempenha no processo.

A fim de avaliar o efeito do gene *lonA* no mutante de *B. sacchari* que possui o gene *phaZa1* interrompido pelo transposon mini-*Tn5* (LFM587), construiu-se a linhagem LFM1127. A avaliação da mobilização na linhagem LFM1127 ($\Delta phaZa1$ abrigando pBBR1MCS-5::*lonA*) está apresentada na Figura 5.8.



Figura 5.8 - Cinética de mobilização de P3HB por mutante LFM587 ($\Delta phaZa1$) de *B. sacchari* abrigando pBBR1MCS-5:*lonA* de *R. eutropha* em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular. LFM101 (\rightarrow), LFM587 (\neg), LFM1127 (\rightarrow) e LFM344 (\neg).

O mutante LFM587 (Δ*phaZa1*) quando carregando o gene *lonA* no plasmídeo pBBR1MCS-5, não teve a capacidade de mobilização de P3HB restabelecida. Nesta linhagem, a mobilização atingiu pouco mais de 20% após as 72 horas de cultivo, enquanto a linhagem selvagem (LFM101) mobilizou mais de 90% do polímero previamente acumulado, neste mesmo período.

O número de células viáveis em LFM1127 ($\Delta phaZa1$ abrigando pBBR1MCS-5::*lonA*), ao longo do cultivo de mobilização, segue o mesmo padrão observado no mutante LFM587 ($\Delta phaZa1$). A viabilidade nestas duas cepas apresentam um aumento pouco significativo nas primeiras horas do cultivo, diferente da LFM101 (selvagem) que aumenta consideravelmente a concentração de UFC na fase inicial, seguida de queda gradual. Novamente, fica evidente que a viabilidade celular aumenta proporcionalmente as taxas de mobilização de P3HB de cada linhagem, indicando o consumo do polímero como fonte de carbono para multiplicação celular.

Os resultados indicam que, como descrito na literatura, *phaZa1* codifica uma P3HB despolimerase intracelular essencial no processo de mobilização de P3HB (BRIGHAM, et al., 2012; HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; SAEGUSA et al., 2001), uma vez que seu papel não foi suprimido pela superexpressão do gene *lonA*.

5.4.2 Teste de complementação com pBBR1MCS-5::phaZa1

A fim de avaliar o perfil de mobilização nos mutantes de *B. sacchari* LFM587 e LFM588 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-5::*phaZa1*, foram construídas linhagens recombinantes a partir destes mutantes (LFM1126 e LFM1129, respectivamente). Procedeuse então analise quantitativa destes (Figura 5.9).

Em ambos os mutantes, a expressão do gene *phaZa1* restabeleceu a capacidade de mobilização do P3HB previamente acumulado, como no fenótipo selvagem. Entretanto, notase que esse processo se mostrou mais acentuado nas linhagens recombinantes do que na linhagem selvagem, atingido 100% de mobilização de P3HB em 24 horas de cultivo, provavelmente resultado da superexpressão de *phaZa1* devido às várias cópias do vetor plasmidial.



Figura 5.9 - Cinética de mobilização de P3HB por mutantes LFM587 ($\Delta phaZa1$) e LFM588 ($\Delta lonA$) de *B. sacchari* abrigando o pBBR1MCS-5:*phaZa1* de *R. eutropha* em meio mineral. (A) Mobilização de P3HB; (B) Viabilidade celular. LFM101-selvagem (\rightarrow -), LFM587- $\Delta phaZa1$ (\rightarrow -), LFM1126- $\Delta phaZa1$ abrigando pBBR1MCS-5::*phaZa1* (\rightarrow -), LFM588- $\Delta lonA$ (\rightarrow --), LFM1129- $\Delta lonA$ abrigando pBBR1MCS-5::*phaZa1* (\rightarrow --) e LFM344-incapaz de acumular P3HB (\rightarrow --).

Na cepa LFM1126 ($\Delta phaZa1$ abrigando pBBR1MCS-5::phaZa1) este efeito era esperado, já que este apresenta o gene phaZa1 de seu genoma interrompido pelo transposon mini-Tn5. Entretanto, o restabelecimento da capacidade de mobilização de P3HB na linhagem LFM1129 ($\Delta lonA$ abrigando pBBR1MCS-5::phaZa1) foi inesperado. A superexpressão de phaZa1 parece anular a deficiência de mobilização causada pela interrupção do gene lonA (LFM1129). É possível que lonA possa codificar uma P3HB despolimerase intracelular cuja função é suprimida por outra enzima com a mesma função, quando superexpressa. Desta forma, o papel de LonA poderia ser exercido por produto gênico alternativo, quando phaZa1 é superexpresso.

Outra hipótese seria que LonA facilite o acesso de PhaZa1 ao grânulo de P3HB, e quando PhaZa1 se encontra em diversas cópias na célula é capaz de forçar sua ação de despolimerase junto ao polímero, mesmo sem a presença de LonA.

Embora o envolvimento de LonA no processo de mobilização de P3HB esteja evidente, seu exato papel ainda não está claro. Na tentativa de entender melhor o mecanismos de ação de LonA na mobilização de P3HB foram construídas linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando tanto genes cujos produtos promovem o acúmulo de P3HB (*phaCAB*) como envolvidos na mobilização (*phaZa1* e *lonA*).

5.5 Avaliação das linhagens de E. coli recombinantes

Os dados dos experimentos descritos a seguir estão detalhados no ANEXO D.

5.5.1 Padronização das condições de acúmulo e mobilização

De acordo com as condições determinadas por Bocanegra-Rodriguez (2012), foi estabelecido um período de incubação de 48 horas para acúmulo de P3HB para as linhagens recombinantes de *E. coli* XL1-Blue, abrigando o operon *phaCAB* de *R. eutropha*. Estas foram cultivadas em meio mineral com excesso de fonte de carbono (15 g/L de glicose) e limitação de fonte de nitrogênio (1 g/L de sulfato de amônio), visando o acúmulo do polímero, e em seguida foram transferidas para meio mineral propício para a mobilização (livre de fonte exógena de carbono e excesso de nitrogênio – 3 g/L de sulfato de amônio).

A fim de padronizar as condições experimentais de mobilização e eliminar a possibilidade de interferência dos vetores no processo de mobilização, foram avaliadas as linhagens controle de *E. coli* XL1-Blue: abrigando apenas o plasmídeo pSK::*phaCAB* (LFM280), abrigando também os vetores pBRR1MCS-2 (CABpBBR2), pBBR1MCS-5 (CABpBBR5), ou contendo ambos simultaneamente (CABpBBR2pBBR5) (Figura 5.10).



Figura 5.10 - Teor de P3HB presente intracelularmente em *E. coli* pSK::*phaCAB* (LFM280) em meio mineral sob condições de mobilização de P3HB. LFM280 (→), CABpBBR2 (→), CABpBBR5 (→), CABpBBR2 pBBR5 (→).

Durante o cultivo, pode ser observado que em nenhum dos casos houve mobilização de P3HB, o que confirma a ausência de sistemas de mobilização na linhagem. Os dados demonstram também que não há alteração quanto à mobilização,nas linhagens que abrigam os

diferentes vetores. Contudo, o mesmo não pode ser dito quando se analisa o acúmulo do polímero. As linhagens que abrigam o vetor com marca de resistência para canamicina (pBBR1MCS-2), apresentaram um aumento no teor de P3HB, que pode chegar a cerca de 30 - 35%, ao passo que as linhagens que não possuem esse vetor acumulam cerca de 20-25% do poliéster em relação à sua massa seca celular.

Uma possível explicação para o observado seria que o antibiótico adicionado ao meio poderia ter interferido na capacidade de acúmulo de P3HB, uma vez que os vetores pBBR1MCS, seja com marca de resistência à canamicina ou à gentamicina, não possuem qualquer inserto.

Para elucidar esses dados, foram realizados novos experimentos, analisando sobretudo o acúmulo de P3HB nestes recombinantes, durante 48 horas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Concentração de P3HB acumulado intracelularmente durante 48 horas de cultivos em linhagens recombinantes de *E. coli*.

| Linhagem | РЗНВ | |
|---------------|-----------------|------------|
| | g/L | % |
| LFM280 | 0,71±0,09 | 37,99±5,68 |
| CABpBBR2 | 0,69±0,04 | 37,10±2,31 |
| CABpBBR5 | 0,65±0,06 | 36,40±1,04 |
| CABpBBR2pBBR5 | $0,67{\pm}0,06$ | 35,72±2,44 |

Os resultados não apontam uma variação expressiva nas taxas de P3HB acumulados entre as diferentes linhagens controles, que permaneceu em cerca de 36% da massa seca celular. Portanto, a marca de resistência dos vetores utilizados não interfere no teor de P3HB acumulado.

5.5.2 Avaliação dos recombinantes portando o gene phaZa1 de R. eutropha

O recombinante de *E.coli*, LFM1134, que abriga os genes de biossíntese de P3HB (*phaCAB*), bem como o gene *phaZa1*, que codifica uma P3HB despolimerase intracelular, foi submetido a ensaios em meio mineral líquido a fim de promover a mobilização de P3HB previamente acumulado (Figura 5.11). Foi utilizado como controle a linhagem de *E. coli* que abriga, além do plasmídeo pSK::*phaCAB*, o vetor pBBR1MSC-2 (CABpBBR2).



Figura 5.11 - Teor de P3HB presente intracelularmente em *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando o gene *phaZa1* de *R. eutropha* em meio mineral sob condições de mobilização de P3HB. LFM1134 (----), CABpBBR2 (---).

Durante as 72 horas de cultivo, a mobilização de P3HB não foi observada. Ambas as linhagens, controle e LFM1134 (que abriga pBBR1MCS-2::*phaZa1*), mantiveram o teor de polímero intracelular constante. Os resultados sugerem que o gene *phaZa1*, apesar de codificar uma P3HB despolimerase intracelular, não é capaz de exercer sua atividade quando expresso isoladamente em *E. coli* recombinante.

Três outros trabalhos avaliaram a co-expressão dos genes de biossíntese (phaCAB) e mobilização (phaZal) de R. eutropha em linhagens recombinantes de E. coli. Lee e Lee (2003) indicaram que a co-expressão de phaZa1 e phaCAB levava a produção e excreção de quantidades expressivas de 3HB no meio de cultura. Uma carta patente foi obtida por esses autores para um processo de produção de 3HB (LEE; LEE, 2003b). Uchino e colaboradores (2008) vislumbraram no modelo experimental de Lee e Lee uma estratégia para avaliar o papel dos produtos de alguns genes de mobilização de P3HB. Entretanto, mesmo após diversas tentativas, os resultados de Lee e Lee (2003; 2003b) não foram reproduzidos. Uchino e colaboradores (2008) conseguiram apenas demonstrar uma pequena excreção de 3HB em linhagens de E. coli abrigando simultaneamente phaCAB e phaZa1, mas claramente diferente do que foi observado com a linhagem controle que expressava apenas o operon phaCAB. Assim, concluíram que *phaZa1* desempenha um papel na mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de E. coli, mas apenas uma pequena parcela do P3HB acumulado é mobilizado e excretado ao meio na forma de 3HB. Wang e colaboradores (2009) também avaliaram a coexpressão de phaCAB e phaZal em linhagens de E.coli. Estes autores obtiveram uma excreção de 3HB mais expressiva que os valores reportados por Uchino e colaboradores (2008), embora após vários dias de cultivo. Entretanto, os valores de 3HB excretados foram muito inferiores àqueles reportados por Lee e Lee (2003; 2003b)

Para comparar os dados deste trabalho com os dados da literatura, foi realizada a análise do teor de 3HB excretados no meio do cultivo (Figura 5.12). A análise deste parâmetro, nos mostra um aumento gradual da concentração de 3HB no meio de cultura da cepa LFM1134 (que abriga pBBR1MCS-2::phaZa1), não observado no controle. Tais dados são qualitativamente semelhantes ao observado em trabalho anterior (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008). Entretanto, a concentração de monômeros encontrada extracelularmente é pouco substancial (0,018 g/L em 72 horas de cultivo), quando comparada com a concentração de P3HB intracelular, que atingiu mais de 0,49 g/L neste mesmo período (dados completos deste experimento estão apresentados no ANEXO D). Ou seja, o 3HB detectado extracelularmente representa menos que 5% do P3HB acumulado e não pode ser considerado evidência de uma mobilização efetiva do polímero intracelular.



Figura 5.12 - Teor de monômeros de 3HB excretado no meio extracelular por *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando o gene *phaZa1* de *R. eutropha* em meio mineral. LFM1134 (-----), CABpBBR2 (----).

Portanto, os resultados apresentados demonstram que a presença do gene *phaZa1* promove apenas a mobilização de uma pequena parcela do P3HB acumulado intracelularmente em linhagens recombinantes de *E. coli* XL1-Blue.

5.5.3 Avaliação dos recombinantes portando o gene lonA de R. eutropha

A avaliação da mobilização de P3HB pelo recombinante abrigando o operon *phaCAB* e o gene *lonA* (LFM1133), bem como do controle abrigando o vetor pBBR1MCS-5 (CABpBBR5), está apresentada na Figura 5.13.



Figura 5.13 - Avaliação da mobilização de P3HB em *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando o gene *lonA* de *R. eutropha* em meio mineral. (A) Teor de P3HB intracelular; (B) Teor de 3HB no sobrenadante. CABpBBR5 (---), LFM1133 (-■-).

Assim como a linhagem abrigando apenas o gene *phaZa1* para a mobilização, esta linhagem, que abriga apenas *lonA*, não apresentou mobilização do P3HB acumulado intracelularmente. A análise do sobrenadante constatou uma fração muito pequena de monômeros de 3HB, quando comparado com os teores de polímero presente intracelularmente, indicando que não houve excreção significativa de 3HB para o meio extracelular.

Surpreendentemente, a cepa abrigando *lonA* (LFM1133) apresentou um aumento expressivo na síntese do polímero, quando comparado ao controle (que acumulou cerca de 30% de P3HB), atingindo cerca 70% de sua massa seca. Não há relatos do envolvimento do produto de *lonA* na mobilização, nem tão pouco na síntese de PHA nas linhagens bacterianas naturalmente produtoras de polímeros, mas os resultados sugerem que o produto deste gene favorece, de forma significativa, o acúmulo de P3HB em *E. coli* recombinante. Este perfil não foi observado também nos demais recombinantes que abrigam outros genes com seus produtos putativamente envolvidos no processo de mobilização de P3HB deste ou de outros trabalhos semelhantes (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009).

Pfeiffer e colaboradores (2011) em seu trabalho buscaram por proteínas associadas ao grânulo capazes de interagir com a P3HB sintase (PhaC) em uma biblioteca genômica de *R. eutropha*. Para isso, foi utilizada a abordagem do duplo-híbrido descrita por Karimova et al., 2000. Os resultado apontam para a interação de PhaC com uma proteína multifuncional, PhaM, mas não indicaram a interação entre LonA e a P3HB sintase.

Os dados da biomassa residual das linhagens avaliadas (Figura 5.14) indicam que não há diferença expressiva entre a massa seca celular de LFM1133 (que abriga pBBR1MCS-5::*lonA*) em relação ao controle CABpBBR5, sugerindo que a atividade do produto de *lonA* não interfira no processo de manutenção celular.



Figura 5.14 - Biomassa residual de *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando o gene *lonA* de *R. eutropha* em meio mineral. CABpBBR5 (----), LFM1133(--).

Novos experimentos foram realizados visando analisar o acúmulo de P3HB pela linhagem expressando *lonA* de *R. eutropha* durante 48 horas de cultivo, a fim de confirmar a alteração nas taxas de P3HB sintetizados intracelularmente (Tabela 5.3).

| Linhagem | РЗНВ | | Xr |
|----------|---------------|------------|---------------|
| | g/L | % | g/L |
| CABpBBR5 | $0,65\pm0,06$ | 36,36±1,82 | $1,14\pm0,09$ |
| LFM1133 | 2,16±0,22 | 54,10±5,60 | 1,84±0,29 |

Tabela 5.3 – Concentração de P3HB acumulado intracelularmente durante 48 horas de cultivos em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando o gene *lonA* de *R. eutropha*

Aqui, os teores de P3HB acumulado pela cepa LFM1133 (que abriga o operon de síntese, *phaCAB*, e o gene *lonA*) ficaram próximos de 54% de sua biomassa seca, ao passo que a linhagem controle (CABpBBR5) manteve em aproximadamente 36% esta variável. A análise da biomassa residual (Xr) demonstra que houve variação desse parâmetro entre a cepa controle e LFM1133, porém não tão acentuada quanto a variação do polímero intracelular. Micrografias das duas linhagens recombinantes ao final do cultivo de acúmulo (Figura 5.15) demonstram a diferença entre o teor dos grânulos intracelulares.

Estes resultados corroboram com os apresentados anteriormente, indicando que a presença do gene *lonA* interfere de modo expressivo no mecanismo de síntese de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. Este resultado se faz interessante, uma vez que um estudo anterior com linhagens recombinantes de *E. coli*, para a produção de P3HB, atingiu um acúmulo máximo deste polímero de cerca de 40% de sua massa seca (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012). Entretanto, a forma de atuação do produto do gene *lonA* neste processo ainda precisa ser elucidada em trabalhos posteriores.



Figura 5.15 – Micrografia de *E. coli* recombinantes cultivadas sobre condições de acúmulo de P3HB. (A) LFM1133; (B) CABpBBR5.

5.5.4 Avaliação dos recombinantes portando, simultaneamente, os genes phaZa1 e lonA de R. eutropha

A fim de avaliar a interação dos genes *phaZa1* e *lonA* na mobilização de P3HB, a linhagem recombinante construída a partir de LFM280 (*E. coli* XL1-Blue pSK::*phaCAB*) abrigando simultaneamente estes dois gene, clonados em vetores diferentes (LFM1135) foi submetida a análise, utilizando como controle a linhagem CABpBBR2pBBR5 (LFM280 abrigando os vetores pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5). Dois clones de LFM1135 (que abriga pBBR1MCS-2::*phaZa1* e pBBR1MCS-5::*lonA*) foram avaliados (LFM1135 I e LFM1135 II).

Testes preliminares com estes recombinantes (Figura 5.16) apontaram taxas expressivas de mobilização intracelular, na presença de PhaZa1 e LonA concomitantemente. Após 72 horas de cultivo, a mobilização atingiu mais de 45% e 70% em cada um dos recombinantes, respectivamente.



Figura 5.16 - Mobilização de P3HB em *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando simultaneamente os genes *phaZa1* e *lonA* de *R. eutropha* em meio mineral após 72 horas de cultivo.

Partiu-se então para a avaliação da cinética de mobilização de P3HB nos mesmos mutantes (Figura 5.17). Em ambos os clones, os resultados evidenciam uma mobilização do polímero intracelular eficiente. Os valores mais expressivos foram observados no clone II (LFM1135 II), que em média mobilizou mais de 50% do P3HB previamente acumulado intracelularmente, durante as 72 horas de cultivo, ao passo que o clone I (LFM1135 I) atingiu cerca de 30% de mobilização neste mesmo período.



Figura 5.17 - Avaliação da mobilização de P3HB em *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando simultaneamente os genes de *phaZa1* e *lonA* de *R. eutropha* em meio mineral. CABpBBR2pBBR5 (-----), LFM1135 I (------), LFM1135 II (-------).

A análise dos monômeros de 3HB presente no sobrenadante resultou em baixos teores destes quando comparados com a concentração do polímero intracelular, sugerindo que a parcela de P3HB mobilizada tenha sido utilizada para manutenção ou crescimento celular.

Apesar dos resultados apresentados terem evidenciado a existência de uma mobilização expressiva de P3HB na presença de PhaZa1 e LonA simultaneamente, notou-se também que os valores apresentados variaram consideravelmente entre as diferentes amostras da triplicata, de ambos os clones. Acredita-se que esta diferença seja consequência dos vetores utilizados (pBBR1MCS-2 e pBBR1MCS-5). Como ambos pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade, é natural que ocorra uma competição entre eles para permanecerem dentro da célula. Com a pressão seletiva dos diferentes antibióticos presentes no meio, sabe-se que ambos são mantidos pelos organismos, porém não é possível quantificar a proporção em que cada um deles se encontra. Assim, de acordo com o plasmídeo que estiver em maior quantidade, seja pBBR1MCS-2::*phaZa1* ou pBBR1MCS-5::*lonA*, o fenótipo apresentado será diferente. Se está hipótese estiver correta, talvez exista uma proporção ideal de PhaZa1 e LonA para promover a mobilização de P3HB de forma mais eficiente.

Para solucionar este problema, foi realizada nova clonagem de modo a inserir *phaZa1* e *lonA* em um mesmo plasmídeo, contornando assim a competição dos plasmídeos pelo sistema que realiza sua replicação.

A partir do plasmídeo pBBR1MSC-5::*phaZa1* de *R. eutropha*, construído por Castellanos (2010), foi possível obter o gene *phaZa1*. Para tal, o plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição *Xba*I e *Sac*I, resultando em dois fragmentos, sendo um com aproximadamente 5000 pb, que corresponde ao vetor pBBR1MCS-5, e outro com cerca de 2000 pb, referente ao gene *phaZa1* (Figura 5.18-A). A banda referente ao gene de interesse foi então purificada. Concomitantemente, o plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA* foi digerido com as mesmas enzimas de restrição (*Xba*I e *Sac*I).

Procedeu-se então a ligação do plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA* com o fragmento de *phaZa1*, obtendo o produto pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*. O produto da ligação foi digerido com a enzima de restrição *Hind*III, de modo a se tornar linear, com cerca de 9000 pb (Figura 5.18-B), e posteriormente foi submetido à PCR de ambos os genes, resultando em fragmentos com cerca 2,7 kb (*lonA*) e 1,9 kb (*phaZa1*), como mostra a Figura 5.18-C, e à sequenciamento para a confirmação da clonagem (ANEXO C).



Figura 5.18 - Perfil de migração em gel de agarose 0,8%. (A) P, padrão 1kb plus (Fermentas); 1, pBBR1MCS-5::*phaZa1* digerido com *XbaI* e *SacI*; (B) 1, pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*; 2, pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1* digerido com *Hind*III; P, padrão 1kb plus (Fermentas); (C) P, padrão 1kb plus (Fermentas); 1, fragmento de *lonA* amplificado a partir de pBBR1MCS-5::*lonApha+Za1*; 2, fragmento de *phaZa1* amplificado a partir de pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*; 2,

Foi então avaliada a cinética de mobilização desta linhagem, LFM1136, que abriga os genes *lonA* e *phaZa1* no mesmo vetor (Figura 5.19).



Figura 5.19 – Cinética de mobilização de P3HB em *E. coli* pSK::*phaCAB* abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1* de *R. eutropha* (LFM1136) em meio mineral. (\longrightarrow) Taxa de mobilização de P3HB; ($-\bullet$ -) Concentração de biomassa residual (Xr).

Foi observada uma mobilização expressiva nesta linhagem, atingindo cerca de 50% após as 72 horas de cultivo. Os dados são compatíveis com os obtidos no ensaio anterior, no qual os genes *phaZa1* e *lonA* estavam sendo expressos em vetores diferentes, porém do mesmo grupo de incompatibilidade. Este resultado nos indica que deva ocorrer uma interação entre os produtos de *phaZa1* e *lonA* para que se tenha uma mobilização de P3HB efetiva. Entretanto, quando estes genes foram expressos em vetor separados, foi possível obter taxas de mobilização superiores a 70% da massa seca celular, o que remete a hipótese de que exista uma proporção ideal de PhaZa1 e LonA para obter taxas mais elevadas de mobilização de P3HB.

A massa seca residual, ao longo deste período, não apresentou grandes variações, o que sugere que o P3HB mobilizado tenha sido utilizado para a manutenção celular.

Considerando o modelo de Lee e Lee (2003), em que os monômeros de 3HB são excretados em altas concentrações no meio extracelular, analisamos também esse parâmetro na linhagem em questão. Novamente, a excreção dos monômeros ocorre, porém em concentrações muito baixas, atingindo 0,018 g/L após 72 horas de cultivo. Esses valores são marginais quando comparados às taxas de P3HB acumulado intracelularmente que foi de aproximadamente 0,33 g/L neste mesmo período. Os dados corroboram com a ideia de que o P3HB mobilizado é utilizado no crescimento ou manutenção celular, e não nos permite

afirmar que este seja um modelo a ser seguido para produção de monômeros de 3HB, como foi proposto por Lee e Lee (2003b).

Diante do exposto, fica claro o envolvimento de LonA na mobilização de P3HB, entretanto, ainda não foi possível elucidar qual o real mecanismo de ação desta proteína no processo. Considerando o papel proteolítico descrito na literatura do produto de *lonA*, podemos supor que LonA possa agir sobre PhaZa1, clivando esta enzima de forma a torná-la ativa. Outra hipótese seria considerar que esta protease aja sobre outras proteínas, de modo a permitir a expressão de *phaZa1*, e talvez de outros genes que codifiquem P3HB despolimerases intracelulares. Um vasto campo de estudos futuros é possível e necessário para investigar seu papel no processo de síntese e mobilização de P3HB.
6 CONCLUSÕES

- Em *B. sacchari* o P3HB previamente acumulado não desempenha papel essencial na manutenção celular sob condições de ausência de uma fonte exógena de carbono, pelo menos após 72 horas de cultivo;
- A deficiência da mobilização de P3HB no mutante LFM588 (Δ*lonA*) de *B sacchari* é decorrente da interrupção do gene *lonA* pelo transposon mini-*Tn5*, comprovando a relevância do produto deste gene para mobilização de P3HB;
- A superexpressão do gene *phaZa1* permite suprimir a mutação no gene *lonA* do mutante LFM588;
- A presença do gene *phaZa1* de *R. eutropha* não exerce função de mobilização de P3HB quando expresso isoladamente em *E. coli* recombinante;
- A presença do gene *lonA* de *R. eutropha* não exerce função de mobilização de P3HB quando expresso isoladamente em *E. coli* recombinante;
- A presença de *lonA* de *R. eutropha*, quando superexpresso através de vetor plasmidial, tem efeito na síntese de P3HB, aumentando significativamente os teores de polímero acumulado intracelularmente;
- A presença dos genes *phaZa1* e *lonA* de *R. eutropha*, quando expressos simultaneamente em recombinantes de *E. coli*, são capazes de mobilizar significativamente o P3HB acumulado previamente, em 72 horas de cultivo, sugerindo que a mobilização de P3HB depende da interação do produto destes genes.

REFERÊNCIAS*

ABE, T.; KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 6982-6990, 2005.

ADAYA, L.; GUZMÁN, J.; MORENO, S.; MILLÁN, M.; CARLOS, P.; GUADELUPE, E.; SEGURA, D. Characterization of the PHB depolymerase Avin03910, the main responsible for PHB mobilization in *Azotobacter vinelandii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOPOLYMERS 2013, 2013. Lisboa. Book os Abstract. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa, 2013, 161 f.

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 85, p. 732-743, 2010.

ALDOR, L.; KEASLING, J. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 14, p. 475-483, 2003.

AMERIK, A. Y.; ANTONOV, V. K.; OSTROUMOYA, N. I.; ROTANOVA, T. V.; CHISTYAKOVA, L. G. Cloninf, structure and expression of the full-size *lon* gene in *Escherichia coli* coding for ATP-dependent La-proteinase. *Bioorg. Khim.*, v. 16, p. 869-880, 1990.

AMERIK, A. Y.; CHISTYAKOVA, L. G.; OSTROUMOYA, N. I.; GUREVICH, A. I.; ANTONOV, V. K. Cloning, expression and structure of the functionally active shortened *lon* gene in *Escherichia coli*. *Bioorg. Khim.*, v. 14, p. 408-411, 1988.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, v. 54, p. 450-472, 1990.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G.; SMITH, J.; STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1992.

BOCANEGRA-RODRIGUEZ, J. K. *Produção de polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes de Escherichia coli*. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BRANDL, H.; BACHOFEN, R.; MAUER, J.; WINTERMANTEL, E. Degradation and application of polyhydroxyalkanoates. *Can. J. Microbiol.*, v. 14, p. 143-153, 1995. Suppl. 1.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(β-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, v. 41, p. 77-93, 1990.

*De acordo com:

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

BREIDENSTEIN, E. B. M.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. W. Involvement of the Lon protease in the SOS response triggered by ciprofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, v. 56, n. 6, p. 2879, 2887, 2012.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; JANOT, L.; STREHMEL, J.; FERNANDEZ, L.; TAYLOR, P. K.; KUKAVICA-IBRULJ, I.; GELLATLY, S. L.; LEVESQUE, R. C.; OVERHAGE, J.; HANOCOCK, R. E. W. The Lon protease is essential for full virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One*, v. 7, n.11, p. 1-9, 2012 b.

BRIGHAM, C. J.; REIMER, E. N.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. Examination of PHB depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further elucidation of the roles of enzymes in PHB homeostasis. *AMB Express*, v. 2, p. 26-38, 2012.

BULLOCK, W. O.; FERNANDEZ, J. M.; SHORT, J. M. XL1 Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with a beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, v. 5, p. 276-278, 1987.

BYROM, D. Industrial production of copolymer from *Alcaligenes eutrophus*. In: DAWESM, E.A. (Ed.). *Novel biodegradable microbial polymers*. Dordrecht: Kluwer Academisc Publisher, 1990. p.113-117.

CASTELLANOS, N. A. M. Avaliação do sistema de mobilização de poli-3-hidroxibutirato em Burkhloderia sacchari. 112 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHARETTE, M. F.; HENDERSON, G. W.; MARKOVITZ, A. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *lon* (*capR*) protein of *Escherichia coli* K-12.*Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 78, n. 8, p. 4728-4732, 1981.

CHEN, H.; COOTE, B.; HISCOX, J. A. Evaluation of a nucleoprotein-based enzymelinked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.*, Huntingdon v. 32, n. 5, p. 519-526, 2003.

CHEN, Q.; WANG, Q.; WEI, G.; LIANG, Q.; QI, Q. Production in *Escherichia coli* of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxuvalerate) wiht differing monomer composition from unrelated carbon sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 14, p. 4886-4893, 2011.

CHOI, J.; LEE, S.; HAN, K. Cloning of *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use these genes for enhanced production of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 4897-4903, 1998.

CHUNG, C. H.; GOLDBERG, A. L. The product of the *lon* (*capR*) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Biochem.*, v. 78, p. 4931-4935, 1981.

CLARET, L.; HUGHES, C. Rapid turnover of FlhD and FlhC, the flagellar regulon transcriptional activator proteins, during *Proteus swarming*. J. *Bacteriol.*, v. 182, p. 833-836, 2000.

COHN, M. T.; INGMER, H.; MULHOLLAND, F.; JORGENSEN, K.; WELLS, J. M.; BRONDSTED, L. Contribution of conserved ATP-dependent proteases of *Campylobacter jejuni* to stress tolerance and virulence. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 73, p. 7803-7813, 2007.

COX, M. K. The effect of material parameters on the properties and biodegradation of "BIOPOL". In: VERT, M.; FEIJEN, J.; ALBERTSSON, A.; SCOTT, G.; CHIELLINI, E. (Ed.). *Biodegradable polymers and plastic*. Cambridge: Royal Society od Chemestry, 1992. p. 95-100.

DOI, Y.; KANESAWA, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Hydrolytic degradation of microbial poly(hydroxyalkanoates). *Macromol. Chem. Rapid. Commun.*, v. 10, p. 227-230, 1990.

DOI, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M.; NAKAMURA, S.; HIRAMITSU, M.; YOSHIDA, Y.; KIMURA, H. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus. FEMS Microbiol. Rev.*, v. 103, p. 103-108, 1992.

EUGENIO, L. I.; GARCIA, P.; LUENGO, J. M.; SANZ, J. M.; ROMAN, J.S. GARCIA, J. L. Biochemical evidence that *phaZ* gene encodes a specific intracellular medium chain length polyhydroxyalkanoate depolymerase in *Pseudomonas putida* KT2442. Characterization of a paradigmatic enzyme. *J. Biol. Chemis.*, v. 7, p. 4951-4962, 2007.

FILIPOV, M. C. O. Obtenção e caracterização de mutantes de Burkhloderia sp. IPT101 deficientes na síntese ou recosumo de poli-3-hidroxibutirato – um plástico biodegradável. 2000. 154 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Instituto de Pesquisas Tecnológicas – Instituto Butantã, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; STEINBÜCHEL, A. Incorporation of 2-methyl-3hydroxybutyric acid into polyhydroxyalkanoic acids by axenic cultures in defined media. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 138, p. 153-160, 1996.

FÜCHTENBUSCH, B.; FABRITIUS, D.; WÄLTERMANN, M.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of novel copolyesters containing 3-hydroxypivalic acid by *Rhodococcus ruber* NCIMB 40126 and related bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 159, p. 85-92, 1998.

GANGOITI, J.; SANTOS, M.; PRIETO, M. A.; MATA, I.; SERRA, J. L.; LLAMA, M. J. Characterization of a Novel Subgroup of Extracellular Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Depolymerases from Actinobacteria. *Appl. Envirom. Microbiol.*, v. 78, n. 20, p. 7229-7237, 2012.

GOLDBERG, A. L. The mechanism and functions of ATP-dependent proteases in bacterial and animal cells. *Eur. J. Biochem.* v. 203, p. 9–23, 1992.

GOMEZ, J. G. C. *Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos*. 1994. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLUI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evalution of soil gram-negative bacteria

yieldins polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 45, p. 785-791, 1996.

GOMEZ, J. G. C.; FONTOLAN, V.; ALLI, R. C. P.; RODRIGUES, M. F. A.; BUENO NETTO, C. L.; SILVA, L.F.; SIMÕES, D.A. Production od poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-*co*-3HV) by soil isolated bacteria able to use sucrose. *Rev. Microbiol.*, v. 28, p. 43-48, 1997.

GOMEZ, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de poliésteres bactecianos In: Biotecnologia Industrial, v. 3. Processos fermentativos e enzimáticos. Lima, Aquarone, Borzani e Schmidell (Ed.) *Editora Edgar Blücher Ltda*. SP, 2001.

GONDA, K. E.; JENDROSSEK, D.; MOLITORIS, H. P. Fungal degradation of thermoplastic polymers under simulated deep sea conditions. *Hydrobiol.*, v. 426, p. 73–183, 2000.

GOTTESMAN, S. Proteolysis in bacterial regulatory circuits. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v. 19, p. 564-587, 2003.

HAN, J. S.; SON, Y. J.; CHANG, C. S.; KIM, M. N. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase produced by *Penicillium pinophilum .J. Microbiol.* v. 36, p. 67–73, 1998.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; JENDROSSEK, D. Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha. J. Bacteriol.*, v. 182, p. 5916-5918, 2000.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; FOCARETE, M. L.; SCANDOLA, M.; ADAMUS, G.; KOWALCZUK, M.; JENDROSSEK, D. A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas lemoignei* with high specificity for amorphouspolyesters of short-chain-length hydroxyalkanoic acids. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 36215-36224, 2001.

HANDRICK, R.; REINHARDT, S.; KIMMIG, P.; JENDROSSEK, D. The "intracellular" poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerase. *J. Bacteriol.*, v. 186, p. 7243-7253, 2004.

HEUVELING, J.; POSSLING, A.; HENGGE, R. A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, v. 69, p. 534-547, 2008.

HOROWITZ, D. M.; SANDERS, K. M. Amorphous, biomimetic granules of polyhydroxybutyrate preparation, characterization and biological implications. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 116, p. 2695-2702, 1994.

HUANG, J. R.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 39, n. 3, p. 383-399, 2012.

IYER, L. M.; LEIPE, D. D.; KOONIN, E. V.; ARAVIND, L. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J. Struct. Biol.*, v. 146, p. 11–31, 2004.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 10, p. 3195-3202, 2009.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 56, p. 403-432, 2002.

JENDROSSEK, D.; HERMAWAN, S.; SUDEBI, B.; PAPAGEORGIOU, A. C. Biochemical analysis and structure determination of *Paucimonas lemoignei* poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase PhaZ7 muteins reveal the PHB binding site and details of substrate–enzyme interactions. *Molec. Microbiol.*, 2013.

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

JIAHN, H. L.; CHIAO, I. K.; YA, Y. H, YU, C. L.; YEN, C. L.; CHEN, Y. Y.; WAN, L. W.; WEI, H. C.; YEN, C. L.; LI, H. L.; CHUNG, I. C; SHIH, H. W. A Lon-Like protease with no ATP-powered unfolding activity. *PLOS One*, v. 7, n. 7, p. 1-13, 2012.

KARIMOVA, G. ULLMANN, A.; LADANT, D. A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.*, v. 328, p. 59-73, 2000.

KAWAGUCHI, Y.; DOI, Y. Kinetics and mechanism of synthesis and degradation of poly(3-ydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Macromol.*, v. 25, p. 2324-2329, 1992.

KNOLL, M.; HAMM, M. T.; WAGNER, F.; MARTINEZ, V.; PLEISS, J. The PHA depolymerase engineering database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinform.*, v. 10, p. 89, 2009.

KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 96, p. 487-492, 2003.

KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; ABE, T.; SUGIYAMA, A.; SAITO, T. Purification and properties of an intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase (PhaZ2) in *Ralstonia eutropha* H16 and its identification as a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 3485-3490, 2003.

KOBAYASHI, T.; UCHINO, K.; ABE, T.; YAMAZAKI, Y.; SAITO, T. Novel intracellular 3-hydroxybutyrate-oligomer hydrolase in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 5129-5135, 2005.

KOVACH, M. E.; PHILLIPS, W.; ELZER, P. H.; ROOP, R. M.; PETERSON, K. M. pBBR1MCS: a broad-host-range cloning vector. *Biotech.*, v. 16, p. 800-802, 1995.

KURODA, A.; NOMURA, K.; OHTOMO, R.; KATO, J.; IKEDA, T.; TAKIGUCHI, N.; OHTAKE, H.; KORNBERG, A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli. Science*, v. 293, p. 705-708, 2001.

LAN, L.; DENG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. M.; TANG, X. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes

in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 20, p. 682-696, 2007.

LANGENBACH, S.; REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 150, p. 303-309, 1997.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.*, v. 14, p. 98-105, 1996.

LEE, S. Y.; LEE, Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of enantiomerically pure (*R*)-(_)-hydroxycarboxylic acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 69, p. 3421–3426, 2003.

LEE, S. Y.; LEE, Y. (*R*)-Hydroxycarboxylic acid producing recombinant microorganisms and process for preparing (*R*)-hydroxycarboxylic acid using the same. WIPO patent WO03/046159, 2003b.

LEE, S. Y.; LEE, Y.; WANG, F. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 63, n. 3, p. 363-368, 1999.

LI, R.; ZHANG, H.; QI, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli. Bioresou. Technol.*, v. 98, p. 2313-2320, 2007.

LIU, S.; STEINBÜCHEL, A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly (hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli. Appl. Envirom. Microbiol.*, v. 66, p. 739-743, 2000.

LUENGO, J. M.; GARCÍA, B.; SANDOVAL, G. N.; OLIVEIRA, E. R. Bioplastics from microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 6, p. 251-260, 2003.

LUGOVSKAYA, N. .; SCHERBAKOV, A. V.; YAKOVLEVA, A. S.; TSYVANYUK, M. A.; MUDRAK, N. S.; DRYGIN, V. V.; BORISOV, A. V. Detection of antibodies to avian infectious bronchitis virus by a recombinant nucleocapsid protein-basead enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Virol. Method.*, Amsterdam, v. 135, n. 2, p. 292-296, 2006.

MAHISHI, L.; TRIPATHI, G.; RAWAL, S. Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB synthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. *Microbiol. Res.*, v. 158, p. 19-27, 2003.

MARR, A. K.; OVERHAGE, J.; BAINS, M.; HANCOCK, R. E. The Lon protease of *Pseudomonas aeruginosa* is induced by aminoglycosides and is involved in biofilm formation and motility. *Microbiol.*, v. 153, p. 474-482, 2007.

MARTÍNEZ, V.; PEÑA, F.; GARCÍA-HIDALGO, J.; MATA, I.; GARCÍA, J. L.; PRIETO, M. A. Identification and biochemical evidence of a medium-chain-length polyhydroxyalkanoate pepolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* predatory hydrolytic arsenal. *Appl. Envirom. Microbiol.*, v. 78, n. 17, p. 6017-6026, 2012.

MAURIZI, M. R.; LI, C. C. AAA proteins: In search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins. *Embo Rep.*, v. 2, p. 980–985, 2001.

MAYER, F. Structural aspects of poly-β-hydroxybutyrate granules. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 103, p. 265-268, 1992.

MELDEREN, L. V.; AERTSEN, A. Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. *Res. Microbiol.*, v. 160, p. 645-651, 2009.

MELNIKOV, E. E.; ANDRIANOVA, A. G.; MOROZKIN, A. D.; STEPNOV, A. A.; MAKHOVSKAYA, O. V.; BOTOS, I.; GUSTCHINA, A.; WLODAWER, A.; ROTANOVA, T. V. Limited proteolysis of *E. coli* ATP-dependent protease LonA unified view of the subunit architecture and characterization of isolated enzyme fragments. *Acta Biochem. Pol.*, v. 55, p. 281-296, 2008.

MERRICK, J. M.; DOUDOROFF, M. Depolymerization of poly-β-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.*, v. 88, p. 60-71, 1964.

MERRICK, J. M.; LUNDGREN, D. G.; PFISTER, R. M. Morphological changes in poly- β - hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. *J. Bacteriol.*, v. 89, p. 234-239, 1965.

MERRICK, J. M.; STEGER, R.; DOMBROSKI, D. Hydrolysis of native poly(hydroxybutyrate) granules (PHB), crystalline PHB, and artificial amorphous PHB granules by intracellular and extracellular depolymerases. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 25, p. 129-134, 1999.

MIZUSAWA, S.; GOTTESMAN, S. Protein degradation in *Escherichia coli*: the *lon* gene controls the stability of SulA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 80, p. 358-362, 1983.

NEUWALD, A. F.; ARAVIND, L.; SPOUGE, J. L.; KOONIN, E. V. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.*, v. 9. p. 27–43, 1999.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PFEIFFER, D.; WAHL, A.; JENDROSSEK, D. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molec. Microbiol.*, v. 82, n. 4, p. 936-951, 2011.

PIEMOLINI, L. Modelagem estruturural de PHA sintase de Chromobacterium violaceum para estudos de mutação sítio-dirigida. 91 f, Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PRIETO, M. A.; EUGENIO, L. I.; ESCAPA, V. M.; GALÁN, B.; GARCIA, J. L. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442

and the fundamental role of PhaZ depolymerise for the metabolic balance. *Envirom. Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 207-221, 2010.

POHLMANN, A.; FRICKE, F.; REINECKE, F.; KUSIAN, B.; LIESEGANG, H.; CRAMM, R; EITINGER, T.; EWERING, C.; POTTER, M.; SCHWARTZ, E.; STRITTMATTER, A.; VOSS, I.; GOTTSCHALAK, G.; STEINBÜCHEL, A. FRIEDRICH, B; BOWIEN, B. Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.*, v. 24, p. 1257-1262, 2006.

PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hidronybutyrate) granule-associated Proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolec.*, v. 6, p. 552-560, 2005.

RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K. CHAVARIE C.; DUBE, B.; BATILLE, P.; RAMSAY, J. Production of poly- β -hydroxybutyric-*co*- β -hydroxybuleric acids. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

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

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

REINECKE, A.; STEINBÜRCHEL, A. *Rasltonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically intersesting biopolymers. *J. Mol. Microbiol. and Biotechnol.*, v. 16, p. 91-108, 2009.

REN, Q.; ROO, G.; RUTH, K.; WITHOLT, B.; ZINN, M.; THONY-MEYER, L. Simultaneous accumulation and degradation of polyhydroxyalkanoates: futile cycle or clever regulation? *Biomacromolec.*, v. 10, p. 916-922, 2009.

REN, Q.; ROO, G.; WITHOLT, B.; ZINN, M.; THÖNY-MEYER, L. Influence of growth stage on activities of polyhydroxyalkanoate (PHA) polymerase and PHA depolymerase in *Pseudomonas putida* U. *BMC Microbiol.*, v. 10, p. 254, 2010.

RIETHDORF, S.; VOLKER, U.; GERTH, U.; WINKLER, A.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* lon gene. *J. Bacteriol.*, v.176, p. 6518-6527, 1994.

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

ROBERTSON, G. T.; KOVACH, M. E.; ALLEN, C. A.; FICHT, T. A.; ROOP 2nd, R. M. The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol. Microbiol.*, v. 35, p. 577-588, 2000.

RODRIGUES, M. F. A; SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C.; VALENTIN, H. E., STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic

acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 43, p. 880-86, 1995.

ROTANOVA, T. V.; BOTOS, I.; MELNBIKOV, E. E.; RASULOVA, F.; GUSTCHINA, A.; MAURIZI, M. R.; WLODAWER, A. Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains. *Prot. Scienc.*, v. 15, p. 1815-1828, 2006

ROTANOVA, T. V.; MELNIKOV, E. E.; TSIRULNIKOV, K. B. Catalytic dyad Ser-Lys at the active site of Escherichia coli ATP-dependent Lon-proteinase. *Bioorg. Khim.*, v. 29, p. 97–99, 2003.

ROTANOVA, T. V.; MELNIKOV, E. E.; KHALATOVA, A. G.; MAKHOVSKAYA, O. V.; BOTOS, I.; WLODAWER, A.; GUSTCHINA, A. Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.*, v. 271, p. 4865–4871, 2004.

SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. Cloning an intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 94-100, 2001.

SAITO, T.; KOBAYASHI, T. Intracellular degradation of PHAs. In: STEINBÜCHEL, A.; DOI, Y., (Ed.). *Biopolymers, polyesters II, properties and chemical synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 23–40, 2001.

SAITO, T.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO, J.; FUKUI, T.; MIWA, K. Cloning, nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of the gene for poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *J. Bacteriol.*, v. 171, p. 184-189, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANTOS, M.; GANGOITI, J.; KEUL H.; MÖLLER, M.; SERRA, J. L., LLAMA, M. J. Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from Streptomyces venezuelae SO1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 97, n. 1, p. 211-222, 2013.

SCHERER, T. M.; FULLER, C.; GOODWIN, S.; LENZ, R. W. Enzymatic hydrolysis of oligomeric models of poly-3-hydroxybutyrate. *Biomacromolec.*, v. 1, p. 577–83, 2000.

SCHLEGEL, H. G.; KALTWASSER, H.; GOTTSCHALK, G. Ein Submersverfahren zur Kultur Wasserstoff oxydierender Bakterien: wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.*, v. 38, p. 209–222, 1961.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli. J. Bacteriol.*, v. 170, p. 5837-5847, 1988.

SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis operon: identification of the N terminus of

poly(3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 168-175, 1991.

SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. The regulation of poly-3-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii. J. Biochem.*, v. 34, p. 225-238, 1973.

SHIRAKI, M.; ENDO, T.; SAITO, T. Fermentative production of (R)-(-)-3-Hydroxybutyrate using 3-Hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli. J. Biosc. Bioeng.*, v. 102, n. 6, p. 529-534, 2006.

SNIDER, J.; THIBAULT, G.; HOURY, W. A. The AAA+ superfamily of functionally diverse proteins. *Genome Biol.*, v. 9, p 216, 2008.

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

STEINBÜCHEL, A. P3HB and other polyhydroxyalkanoic acids. (Ed.). *Products of primarymetabolism.* New York: Willey, John and Sons, 1996, p. 405-464.

STEINBÜCHEL, A.; AERTS, K.; BABEL, W., FÖLLNER, C.; LIEBERGESELL M.; et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acids inclusions. *Can. J. Microbiol.*, v. 41, p. 94–105, 1995. Suppl. 1.

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

STRIEBEL, F.; KRESS, W.; WEBER-BAN, E. Controlled destruction: AAA+ ATPase in protein degradation from bacterial to eukayotes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 19, p. 209-217, 2009.

SU, S.; STEPHENS, B. B.; ALEXANDRE, G.; FARRAND, S. K. Lon protease of the alphaproteobacterium *Agrobacterium tumefaciens* is required for normal growth, cellularmorphology and full virulence. *Microbiol.*, v. 152, p. 1197-1207, 2006.

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

SUGIYAMA, A.; KOBAYASHI, T.; SHIRAKI, M.; SAITO, T. Roles oh poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase and 3HB-oligomer hydrolase in bacterial P3HB metabolism. *Curr. Microbiol.*, v. 48, p. 424-427, 2004.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S., MOLONEY, M. SHAH, S. Biotechnological approaches for the production oh polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - a review. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, n. 2, p. 148-175, 2007.

SWAMY, K. H.; GOLDBERG, A. L. *E. coli* contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. *Nature*, v. 292, p. 652, 1981.

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic

activity on native PHB granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, n. 5, p. 1487-1495, 2011.

TAIDI, B.; MANSFIELD, D. A.; ANDERSON, A. J. Turnover of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 129, p. 201-261, 1995.

TAKAYA, A.; SUZUKI, M.; MATSUI, H.; TOMOYASU, T.; SASHINAMI, H.; NAKANE A.; YAMAMOTO T. Lon, a stress-induced ATP-dependent protease, is critically important for systemic *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection of mice. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 690-696, 2003.

TOMOYASU, T.; TAKAYA, A.; ISOGAI, E.; YAMAMOTO T. Turnover of FlhD and FlhC, master regulator proteins for *Salmonella* flagellum biogenesis, by the ATP-dependent ClpXP protease. *Mol. Microbiol.*, v. 48, p. 443-452, 2003.

UCHINO, K.; SAITO, T.; JENDROSSEK, D. Poly(3-hydroxybutyrate) (P3HB) depolymerase PhaZa1 is involved in mobilization of accumulated P3HB in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 74, p. 1058-1063, 2008.

UEDA, S.; SANO, K.; GAO, D.; TOMIHARI, N.; YAMANE, I. E. Purification and properties of D-(3)-3-hydroxybutyrate oligomer-hydrolase of *Paracoccus denitricans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 206, p. 179-184, 2002.

ULMER, H. W.; GROSS, R. A.; POSADA, M.; WEISBACH, P; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. Bacterial production of poly(β -hydroxyalkanoates) containing unsaturated repeating units by *Rhodospirillum rubrum*. *Macromolec.*, v. 27, p. 1675-1679, 1994.

VESELOVA, M. A.; LIPASOVA, V. A.; ZAITSEVA, V.; KOKSHAROVA, O. A.; CHERNUKHA, M. Y.; ROMANOVA, Y. M.; KHMEL', A. Mutants of *Burkholderia cenocepacia* with a change in synthesis of N-acyl-homoserine lactones—signal molecules of Quorum Sensing regulation. *Russian J. Genet.*, v. 48, n. 5, p. 513-521, 2012.

VICKERS, E.; KLEIN-MARCUSCHAMES, D.; KROEMER, O. Examining the feasibility of bulk commodity production in *Escherichia coli*. *Biotechnol*. *Lett.*, v. 34, n. 4, p. 585-596, 2012.

WANG, Q., YU, H.; XIA, Y.; KANG, Z.; QI, Q. Complete PHB mobilization in *Escherichia coli* enhances the stress tolerance: a potential biotechnological application. *Microb. Cell Fact.*, v. 8, p. 47-55, 2009.

WICKNER, S.; MAURIZI, M. R.; GOTTESMAN, S. Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, v. 286, p. 1888–1893, 1999.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; WONG, B. H. L.; TSOI, H.; FUNG, A. M. Y.; KAO, R. Y. T.; CHAN, K; MALIK-PEIRIS, J. S.; YUEN, K. Differential sensitivities of severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus spike polypeptide enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of SARS coronavirus pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 43, n. 7, p. 3054-3058, 2005.

WU, W. F.; ZHOU, Y.; GOTTESMAN, S. Redundant in vivo proteolytic activities of *Escherichia coli* Lon and the ClpYQ (HslUV) protease. *J. Bacteriol.*, v. 181, p. 3681-3687, 1999.

YORK, G. M.; LUPBERGER, J.; TIAN, J. LAWRENCE, A. G.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. Ralstonia eutropha H16 encodes two and possibly three intracellular poly[D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene. *J. Bacteriol.*, v. 185, p. 3788-3794, 2003.

ANEXOS



ANEXO A - Organização estrutural do gene lonA em Burkholderiaceae

Organização estrutural do gene *lonA* em *Burkholderia* spp. e *R. eutropha* H16, contendo uma sequência correspondente a tRNA a jusante.



Organização estrutural do gene *lonA* em *Burkholderia* spp., contendo uma sequência codificadora de proteína Hbs a jusante.



Organização estrutural do gene *lonA* em *Burkholderia* spp., contendo uma sequência codificadora de proteína hipotética a jusante.



ANEXO B – Vetor clonagem e plasmídeos utilizados

Vetor de clonagem pBBR1MSC-5, com marca de resistência à gentamicina, indicando sítio de clonagem MCS. GmR – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; mob – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; rep – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo; MCS – sítio múltiplo de clonagem.



Plasmídeo contendo o inserto de *lonA* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MSC. GmR – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; mob – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; rep – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.



Plasmídeo contendo o inserto de *lonA* e *phaZa1* de *R. eutropha* interrompendo o sítio de clonagem MSC, indicando os sítios de restrição *Xba*I e *Sac*I. GmR – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; mob – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; rep – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

ANEXO C – Sequências dos genes utilizados

Sequência do gene *lonA* de *R. eutropha* recuperada no GenBank, destacando os códons de iniciação e parada (grifado em cinza) e as regiões de anelamento dos *primers* utilizados (vermelho).

ATTTCTACCGACGAGGGGGGGGGAAACGCGGGTATGCTGTTTCAGAGGGGCCCAGCAAGTGCAGGGAGCG GCATCTGCCTGCCTTGATGAATCGATTGGCACGTATCTTGTAATCGATTCGGGCGGCCCAATTTACGC CTTAAATGACTGACTTGGGGAAAATGATGTCCGGAACACAACTCCTCCCGGCCGAGCCGATTCGCCTC CCACTGTTGCCGCCGCGACGTGGTGGTGTTTCCGCACATGGTGATCCCGCTGTTCGTGGGACGCCC GAAGTCCATCAAGGCGCTTGAGACTGCGATGGAGGCGGGCAAGAGCATCATGCTCGTGGCCCAGAAGA CGGCGGCCAAGGACGAGCCGACCGCCGACGACCTGTATGAGGTCGGCTGCATCGCCAATATCCTGCAA ATGCTGAAACTGCCCGACGGTACCGTGAAGGTGCTGGTCGAGGGTACCCAGCGCGCGAATATCCGCGA CCGAGACCGAGGCCCTGCGCGCGCGCGATCGTGCGCAGTTCGACCAGTACGTGAAGCTCAACAAGAAG ATCCCGCCCGAGATCCTGACCTCGCTGTCGGGCATCGACGAGGCCGCCTGGCGGACACCATCGC CGCGCACCTGCCGATCAAGCTCGAGCAGAAGCAGAAGATCCTGGAGATGGTCAATGTGACCGAACGCC TGGAAAGCCTGCTGTCGCAGCTCGAGGGCGAGATCGACATCCTCCAGGTTGAAAAGCGCATCCGTGGC CGCGTCAAGCGCCAGATGGAGAAGAGCCAGCGCGAGTACTACCTGAACGAGCAGGTCAAGGCCATCCA GAAGGAACTCGGCGAGGGCGAAGAAGGCGCCGACCTGGAAGAACTCGACAAGCGCATCAAGGCTGCGC GGATGCCGAAGGAAGCCAAGAAGAAGGCCGACGCCGAATTCAAGAAGCTCAAGCTGATGTCGCCGATG TCGGCCGAAGCCACCGTCGTGCGCAACTACATCGACACGCTGGTGAACCTGCCATGGCGCAAGAAGAG CAAGGTCAACAACGACCTCGCCAACGCCGAGCGCGTGCTGGATGAAGACCACTACGGCCTGGAGAAGG TCAAGGAACGCATTCTCGAGTACCTCGCGGTGCAACAGCGCGTGGACAAGGTGAAGGCACCTATCCTC CAAGTTCGTGCGCATGGCACTGGGTGGCGTGCGTGACGAGGCCGAAATCCGCGGCCACCGCAGGACCT ATATCGGCTCGATGCCGGGCAAGATCCTGCAGAGCCTGTCCAAGGTCGGCGTGCGCAATCCGCTCTTC CTGCTCGACGAGATCGACAAGATGGGCATGGATTTCCGCGGCGATCCGTCGTCGGCGCTGCTCGAGGT GCTGGACCCGGAACAGAACCACACGTTCCAGGACCACTACATCGAAGTGGATTTCGACCTGTCCGACG TGATGTTCGTGGCCACGTCGAACTCGCTCAACATCCCGCCGCCGCTGCTCGATCGTATGGAGGTGATC CGCCTGTCGGGTTACACCGAGGACGAGAAGGTCAATATCGCGCAGCGCTACCTGTTGCCCAAGCAGAT CAAGAACAACGGTCTGAAGGCAGGCGAGATCGAGGTTGCCGAAAGCGCGATCCGCGACATCATCCGCT ACTACACGTGAAGCGGGGGGGGGCGCGCTCGCTGGAACGCGAGGTCTCCAAGATCGCGCGCAAGGTGGTC AAGCTGCTGCTGCAAGAAGGAGTCGGGCACGATCAAGGTCGATTCCGAGAACCTGGACAAATTCCT CGGCGTGCGCAAGTACGATTTCGGCCTGGCCGGCAAGGAAAACCAGGTTGGCCAGGTCACCGGTCTGG CGTGGACCGAGGTGGGCGGCGATCTGCTGACCATCGAAGCCGCGATCATGCCGGGCAAGGGCAACATC GCGGGCACGTCGCCTGGGTATCACGGATGAGATGTTCGAGAAGCGCGACATCCACATCCACGTGCCTG AAGGCGCCACGCCCAAGGACGGCCCGTCCGCAGGCGGTGCCATGACCACGGCGCTGGTGTCGGTGCTG ACCGGCATCCCGGTGCGCGCGGATGTCGCCATGACCGGCGAGATCACGCTGCGCGGCGAGGTGCTGCC GATCGGGGGCCTCAAGGAGAAGCTGCTGGCGGCCGCCCCCGGGGCGGCATCAAGCTGGTGCTGATCCCGG AGGAAAACGTCAAGGATCTGGCCGAGATCCCCGACAACGTGAAGAACGCCATCGAGATCGTGCCGGTC CGCTGGATCGACAAGGTGCTGGAACTGGCGCTCGAGCGCAAGCCCGAGGCGTTGCCTGAAGAAGATGC CAAGCCCGCCGAAGTGGCGGACAAGGCCACGGCCAAG<mark>GTTGAGCGTCTGCATCAC</mark>TG<mark>A</mark>GTCGAC

Resultado do sequenciamento de *lonA* de *Ralstonia eutropha* amplificado e clonado no plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA*.

| | Save Search Strategies Format | ting options ► Download | | | | | | You Tube How | to read this page | Blast report de |
|--|---|---|---|---|---------|----------------|----------|--------------------------|--------------------------------|----------------------|
| eotide Seque | nce (909 letters) | | | | | | | | | |
| Query ID lo | cl 61261 | | | Database N | Name | Representative | genomes | | | |
| olecule type n uery Length 9 | iucleic acid 109 | | | Prog | gram | BLASTN 2.2.28 | Citation | l. | | |
| | | tal (Distance base of any day | | | | | | | | |
| anhic Summa | | rts) [Distance tree of results | 1 | | | | | | | |
| ipnic Summa | <u>u y</u> | | | | | | | | | |
| | | Distribut | tion of 1 Blast Hit | ts on the Query Sequ | uence 🤅 | 9 | | | | |
| | | Mouse over to see the defi | Color kov | v alignments | | | - 1 | | | |
| | | <40 | 40-50 | 50-80 | 80-200 | >=20 | | | | |
| | | 1 150 | 300 | 450 6 | l 00 | 750 | 900 | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| scriptions | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Select: All Non | Doucing significant alignments: | | | | | | | | | |
| 1 Alignments | Bownload v GenBank Graphic | <u>Distance tree of results</u> | | | | | | | | 0 |
| | | Descrip | tion | | | | | Max Total score score | Query E Ma cover value ide | nt Accession |
| Cupriavidus | s necator N-1 chromosome 1, comple | te sequence | | | | | | 1258 1258 | 92% 0.0 92 | % <u>NC 015726.1</u> |
| | | | | | | | | | | |
| unments | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| Bownload > | GenBank Graphics | | | | | | | 1 🔻 | lext 🔺 Previous | A Descriptions |
| Cupriavidus | necator N-1 chromosome 1, co | mplete sequence | | | | | | | | |
| Sequence ID: F | refINC 015726.1 Length: 3872936 | NUMBER OF MAILIES. | | | | | | | | |
| Sequence ID: <u>r</u> Range 1: 1543 | refINC_015726.1 Length: 3872936 3621 to 1544475 <u>GenBank</u> <u>Graphics</u> | V Next I | Match 🔺 Previous | s Match | | | | Related | Information | |
| Range 1: 1543 Score 1258 bits(6) | refINC_015726.1 Length: 3872936 3621 to 1544475 GenBank Graphics Expect Identities 81) 0.0 789(856/9) | Gaps 16/856(1%) | Match A Previous Strand Phus/Phus | s Match | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Range 1: 1543 Score 1258 bits(68 Features: ATT | EffNC_015726.11 Length: 3872936 3621 to 1544475 GenBank Graphica Expect Identities 81) 0.0 789/856(9) P-dependent Cip protease ATP-bindir | Gaps 2%) 16/856(1%) ng subunit ClpX | Match A Previous Strand Plus/Plus | s Match — | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: <u>r</u> Range 1: 1543 Score 1258 bits(68 Features: ATI ATI Query 3 | EefilvC_015726.11 Length: 3872936 3621 to 1544475 GenBank Graphics Expect Identities 81) 0.0 789/856(92) P-dependent Cip protease ATP-bindip P-dependent Lon protease AGGGCGTGCA-KAGGYGGTGATCSI | Caps Caps Caps Caps Children | Match A Previous Strand Plus/Plus CACCTCCGYTG 60 | s Match — | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: <u>r</u> Range 1: 1543 Score 1258 bits(66 Features: AII AII Query 3 Sbjct 1543 | tentility Length: 3872936 9631 to 1544479 GenBank Grabhank | Gaps 2%) 16/856(1%) na subunit CIaX Ards-ActinXKATCAAYKAGCGATGC 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 11 | Match Previous Strand Plus/Plus Plus/Plus CACCTCCGYTG 60 | s Match 0 543679 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: AT Query 3 Sbjct 1543: Query 61 Sbjct 1543: | teffIVC_015/26.1 Length: 3872936 3021to 1544475 GenBank, Graphica Expect Identities 81) 0.0 789/856(9: P-dependent Clo protease ATP-bindi P-dependent Clo protease ATP-bindi ATP-bin | Whent i Gaps Gaps Caps | Match Previous Strand Plus/Plus CACCTCCGYTG 60 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII | 9 Match | | | | Related | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: AT AT Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 | teffNC_015/26.11 Length: 3872936 3621to 1544475 GenBank, Graphica Expect Identities 81) 0.0 789/856(9: P-desendent Cis protease ATP-bindi P-desendent Lin protease A009C0TCCA-XA009C0TCTS2 111111111111111111111111111111111111 | Whent is Gaps Gap Gaps | Match Previous Strand Plus/Plus caccrocceyrg 60 HIIIIIII Accrococro 15 Laccroccer 15 L | Match | | | | Related | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: AII Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 | tentility 1 Length: 3872936 9621 to 1544475 GenBank Graphick Expect Identities 81) 0.0 789/856(9; P-dependent Cip_protease ATP-bindip P-dependent Cin_protease ATP-bindip P-dependent Cin_protease ATP-bindip P-dependent Cin_protease ATP-bindip C1 Address Category Address Category C1 Address Category CinatrotocAbaBacoAcceAccecc C1 CINATROTACABABACARCACCCC CinatrotocAbaBacoAcceAcceccc C1 CIGNATROTACABABACARCACCCCC CicclifortalAclabacoCabaCaCcCacce C1 CicclifortalAclabacoCabaCaCcacce CicclifortalAclabacoCabaCaCcacce C1 CicclifortalAclabacoCabaCaCcacce CicclifortalAccidertocedeacCacce C1 CicclifortalAccidertocedeacCacce CicclifortalAccidertocedeacCacce C1 CicclifortalAccidertocedeacCacce CicclifortalAccidertocedeacCacce C1 CicclifortalAccidertocedeacCacce CicclifortalAccidertocedeacCacce C1 CicclifortalAccidertocedeacCacce CicclifortalAccidertocedeacCacce C1 CicclifortalAccicedacocedace CicclifortalAccidertocedea | Winner of Marcuest 1 Caps Caps 22%) 16/856(1%) na subunit Clax ATG-ACATYKACCAATGG AlastroscosofticaArtegocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg Cosocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg Cosocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg Cosocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg Cosocaatgg AlastroscosofticaArtegocaatgg Al | Match Previous Strand Plus/Plus CACCTCCEYTS 60 CACCTCCECTS 15 CACCTCCECTS 15 CACC | Match | | | | Related | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: AII Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 | teffNC_015726.11 Length: 3872305 3021 to 154475 GenBank Graphics Expect Identities 0.0 789/855(9; P-dependent Clo norbease ATP-bindig Association of the second s | Wither of Malcuest 1 | Natch Previous Strand Plus/Plus caccrocceyrs 60 hilling second strand second strand strand second strand st | - Match | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: A ₁₁ Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 241 | tedfNC_015726.11 Length: 3872305 3621to 154475 GenBank Graphics Expect Identities 0.0 P-dependent Clo protease ATP-bindip P-dependent Clo protease ATP-bindip Construction Addression Addression Addression Construction Addression Addression Addression< | Wither of Markels 1 \[| Natch Previous Strand Plus/Plus CACCTCCGYTG 60 HILLIIII ACCTCCCGT 55 AGGTCFMCCCAG 15 SGGTCFACAC 15 SGGTCFACAC 15 SGGTCFACAC 15 SGGTCFACAC 15 SGGTCFACAC 15 SGGTCFACAC 15 SATGGCCGTTC 24 HILLIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII | - Match | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1543 Score 1258 bits(61 Features: AT Query 3 Sbjct 1543 Query 161 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 201 | tedfNC_015726.11 Length: 3872336 5821to 154475 Genetics Expectance Identities 81) 0.0 759/855(9) Tedentities P-dependent Clop proteases Applexity Applexity Applexity Applexity <td< td=""><td>Watther of Markels 1 ¥ Read 1 Gaps Gaps 2%) 15/856(1%) na aubunit Clax Address 2000 Auf-AcATAYKATCAAYKACCAATGCATTGC Address 2000 AuderGoococococococococococococococococococo</td><td>Match Previous Strand Plus/Plus CACCTCCOYTG 60 LACCTCOOTG 15 LACCTCOOTG 15 LACCTCOOTG 15 SGGGTAGAAGC 15 SGGGTAGAAGC 15 LAGGCTGTTC 24 LAGGCTGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTC 25 LAGGCGGGAAAAC 30 LAGGCGGGAAAAC 30</td><td>- Match </td><td></td><td></td><td></td><td>Related Genome</td><td>Information - Genomic Seque</td><td>nce</td></td<> | Watther of Markels 1 ¥ Read 1 Gaps Gaps 2%) 15/856(1%) na aubunit Clax Address 2000 Auf-AcATAYKATCAAYKACCAATGCATTGC Address 2000 AuderGoococococococococococococococococococo | Match Previous Strand Plus/Plus CACCTCCOYTG 60 LACCTCOOTG 15 LACCTCOOTG 15 LACCTCOOTG 15 SGGGTAGAAGC 15 SGGGTAGAAGC 15 LAGGCTGTTC 24 LAGGCTGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTTC 24 LAGGCGTC 25 LAGGCGGGAAAAC 30 LAGGCGGGAAAAC 30 | - Match | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1543 Score 1258 bits(64 Features: AT, Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 | tellNC_015726.11 Length: 3872336 5821to 154475 GenBank Graphics Experiment Clan protease ATP-bindly P-dependent Clan protease ATP-bindly P-dependent Clan protease AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGGCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGCCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGCCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGCCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGCCOTCA-KAGOYGGTGATCS3 AGGCCOTCACAGO AGGCCOTCACAGOYGGTGATCS3 AGGCCCCACCAGOXGTGATCS3 AGGCCCCACCAGOXGTGATCS3 AGGCCCCCACCAGOXGTGATCS3 AGGCCCCCACCAGOXGTGATCS3 AGGCCCCCCCACGAGOXGTGATCS3 AGGCCCCCCCACGAGOXGTGATCS3 AGGCCCCCCCACGAGOXGTGAGOXGCAGOXGTGA AGGCCCCCCCACGAGOXGTGAGOXGCAGOXGTGAGOXGGAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGCAGOXGC | Warmber of Markuest 1 \[| Match & Previous Strand Plus/Plus Accrocopyre Accrocopyre Accrocopyre Bostware | Watch — — 543679 20 543739 20 5543739 20 543739 20 54359 20 54359 20 50 20 20 20 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: AT, AII Query 3 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Sbjct 1543 | tedINC_015726.11 Length: 3872336 9621to 154475 genBank Graphics Experiment Identities 81) 0.0 Pedependent Clo protease ATP-bindip Pedependent Clo protease ATP-bindip Pedependent Clo protease A06900705CCANARAGONGTGATCS3 A06900705CCANARAGONGTGATCS3 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCS4 A06900705CCANARAGONGTGATCA | Wither of Markels 1 Y Read 1 Caps Y Read 1 Caps Sign 2 29b) 16/856(1%) na audunit Clax NTG-ACTIVICALXXACOAXCOACCOACCOACCOACCOACCOACCOACCOACC | Match & Previous Strand Plus/Plus Accrocopy Match & Accrocopy Match & Accrocopy Match & Accrocopy Match & Accrocopy Match & Accrocopy Match & Accro Match & | Watch — — 543679 20 5543739 20 5543739 20 543739 20 543939 50 543939 50 543939 20 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: [Range 1: 1342] Score 1258 bits(61 Features: AT Query 3 Sbjct 15433 Query 121 Sbjct 15433 Query 121 Sbjct 15433 Query 241 Sbjct 15433 Query 241 Sbjct 15433 Query 301 Sbjct 15433 Query 301 Sbjct 15433 Query 421 | tedfNC_015726.11 Length: 3872336 9631 to 154475 genBank Gradinal Expect Identities 81) 0.0 789/856(9; Proceendent Clos processes Application Application Proceendent Clos processes Application Application Application Application Application CCGNTCALARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO Application CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO Application CCGNTCALCARAPTORECOGN/COGNACCO Application CCGNTCALCARAPTORECOGNACCOCNACCOCNACCONCORNEC Application Application Application A | Witter of Mailland S. 1 Witter of Mailland S. 1 Caps 2%) 16/856(1%) na au-Junit Clax na au-Junit Clax na au-Junit Clax Description Des | Match & Previous Strand Plus/Plus CACCTOOPTG 60 ACCTOOPTG 60 ACCTOOPTG 15 Sequences Sequence | Watch — — 543679 20 5543739 20 5543739 20 543739 20 5435939 50 543939 50 543939 20 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: AIT Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 | tellNC_015726.11 Length: 3872336 9831 to 134473 GenBank Graphics Expect Identities 81) 0.0 Proceededto Toolsass Absort Clossesse Affective Absort Clossesse Affective Absort Clossesse Affective Createridet Longtoresses Absort Clossesse Affective Createridet Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtoresses Longtoresses Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtoresses Addresses Longtorestoresses Addresses< | Wither of Maillands 1 \[| Match & Previous Strand Plus/Plus CACCTOOPTIG 60 Indextrocoptig ACCTOOPTIG 60 Indextrocoptig Indextrocoptig Destrocoptig Contractions 15 Sector Addard 15 Secto | Watch — — 543679 20 543739 30 543739 30 543799 30 543939 50 543939 50 543939 50 544039 50 544039 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: arg Query 3 Sbjot 1543 Query 61 Sbjot 1543 Query 121 Sbjot 1543 Query 181 Sbjot 1543 Query 241 Sbjot 1543 Query 301 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1544 Query 421 Sbjot 1544 | tettinty 0.5726.11 Length: 3872336 5831 to 134473 GenBank, Grabita, Expect Identities 0.0 789/856(9; Pedependent Clo protessa ATP-bindi Pedependent Clo protessa Atportoric Chabric School (Clock) CTGRTATACOARABACACACCCC COGTGRTATOGRAPHICAC ACGTGRTATOGRAPHICAC ACGTGRTATOGRAPHICAC ACGTGRTATOGRAPHICAC </td <td>Witter 01 Mailling: 1</td> <td>Math. Previous Stand Plus/Plus CACTCOOPTG 60 ACTCOOPTG 60</td> <td>Watch </td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Related Genome</td> <td>Information - Genomic Seque</td> <td>nce</td> | Witter 01 Mailling: 1 | Math. Previous Stand Plus/Plus CACTCOOPTG 60 ACTCOOPTG 60 | Watch | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: arg Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 421 Sbjct 1544 Query 481 Sbjct 1544 Query 541 | tettinty_015/26.11 Length: 3872336 9831 to 134473 GenBank Graphics Expect Identities 0.0 759/856(9) Puideendent Concreases ATP-bindi Puideendent Concreases ATP-bindi Puideendent Concreases ATP-bindi Puideendent Concreases ATP-bindi CTGSTCTA-CAARAGCARCACCCC CONCREASES CTGSTCTA-CAARAGCARCACCCC CONCREASES AGGGGCTCTA-CAARAGCARCACCCC CONCREASES CTGSTCTA-CAARAGCARCACCCCC CONCREASES AGGGGCTCTA-CAARAGCARCACCCC CONCREASES AGGGGCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC | Without of Mailland S. 1 Wrent I Gaps 2%b) 16/856(1%b) na subunit Clax Inter-ACTIVITYATCAAVKACGATOR Inter-ACTIVITYATAATOR InterACTIVITYATAATOR Inter-ACTIVIT | Math. Previous Stand Plus/Plus CACTCOOPTG 60 100000000000000000000000000000000000 | Watch | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: arg Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 541 Sbjct 1544 Query 541 | tettinty_015/26.11 Length: 3872336 9831 to 1544479 GenBank Graphics Graphics Graphics Expect Identities 81) 0.0 789/856(9; Pubdemidint Cla accessis ATP-bindi CTGTTATACARABCARCARCT accessis ATP-bindi CTGTTATACCARTAGE accessis ATP-bindi Accessis Attractory Compact Classis accessis Attractory Classis Accessis Attractory Compact Classis accessis Attractory Classis Accessis Attractory Classis accessis Attractory Classis Accessis Attractory Classis accessis Attractory Classis | Without of Mailland S. 1 Without S. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) Ins.aubunit.Clax Inter-ACTIVIATCANYRACCANTRACTANYRACCANTRACTANYRACCANTRACTANYRACCANTRACTANYRACCANTRACTANTRACTANTRACTANTRACTANTRACTANTRACTANTANTRACTANTATANTA | Math. Previous Stand Plus/Plus Accretopyrs 60 Accretopyrs 60 Accre | U Match — — 543679 20 543799 20 543799 10 543599 20 544399 20 544399 20 544039 20 544039 20 544219 50 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: arg Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 241 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 541 Sbjct 1544 Query 541 Sbjct 1544 Query 661 | tettinty_015/26.11 Length: 3872305 9831 to 1544479 GenBank Graphics Graphics Expect Identities 81) 0.0 Pederendent Concreases ATP-bindi Pederendent Concreases Accreases Pederendent Concreases Pederendent Concreases Pederendent Concreases <td< td=""><td>Without of Mailland S. 1 Without S. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) Ins.authunit.Clax Inter-ACTIVERICALIVERACEATEGE Inter-ACTIVERACEATEGE Intere-ACTIVERACEATEGE Inter-ACTI</td><td>Math. Previous Stand Plus/Plus Accrecopyrs</td><td>Watch </td><td></td><td></td><td></td><td>Related Genome</td><td>Information - Genomic Seque</td><td>nce</td></td<> | Without of Mailland S. 1 Without S. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) Ins.authunit.Clax Inter-ACTIVERICALIVERACEATEGE Inter-ACTIVERACEATEGE Intere-ACTIVERACEATEGE Inter-ACTI | Math. Previous Stand Plus/Plus Accrecopyrs | Watch | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: arg Query 3 Sbjot 1543 Query 61 Sbjot 1543 Query 121 Sbjot 1543 Query 181 Sbjot 1543 Query 241 Sbjot 1543 Query 301 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1543 Query 481 Sbjot 1544 Query 541 Sbjot 1544 Query 601 Sbjot 1544 | tedINC_015/26.11 Length: 3872305 9831 to 1544479 GenBank Graphics Expect Identities 81) 0.0 Pedependent Concreases ATP-bindi Pedependent Concreases ACCIGGTATICALOPERCOSECCACM ACCIGGTATICALOPERCOSECCACM ACCIGGTATICALOPERCOSECCACM ACCIGGTATICALOPERCOSECCACM ACCIGGTATICALOPERCOSECACMA <td>Witter of Mailland S. 1 Witter of Mailland S. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) no a subunit.Clax Inter-ACTIVITACTANYABCCANTOS Utabalaticolita Utabalat</td> <td>Math. Previous Stand Plus/Plus Accrocopy Accrocopy accro</td> <td>Watch Watch 0 543679 20 543799 10 543799 10 543979 10 543979 10 543979 10 543979 10 544399 10 544199 10 544199 10 544219 50 544229 20 50 544279 20 50 544279 20 50 50 544379 20 50 544 50 544 50 544 50 544 50 544 50 544 50 545 545</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Related Genome</td> <td>Information - Genomic Seque</td> <td>nce</td> | Witter of Mailland S. 1 Witter of Mailland S. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) no a subunit.Clax Inter-ACTIVITACTANYABCCANTOS Utabalaticolita Utabalat | Math. Previous Stand Plus/Plus Accrocopy Accrocopy accro | Watch Watch 0 543679 20 543799 10 543799 10 543979 10 543979 10 543979 10 543979 10 544399 10 544199 10 544199 10 544219 50 544229 20 50 544279 20 50 544279 20 50 50 544379 20 50 544 50 544 50 544 50 544 50 544 50 544 50 545 545 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: AT Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 181 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 421 Sbjct 1544 Query 541 Sbjct 1544 Query 641 Sbjct 1544 Query 641 Sbjct 1544 | tellNC_015/26.11 Length: 3872305 3831 to 154473 GenBank Graphics Expect Identities 0.0 739/856(9) Pedependent Clo archesse ATP-bindi Pedependent Clo archesse ATP-bindi Accistoff AtProvention Attraction Attraction Accistoff Attraction Attraction Attraction Accistoff Attraction Attracti | Witter of Mailland S. 1 Witter of Mailland S. 1 Capp 2%b) 16/856(1%b) nn a subunit.Clax The control of the control o | Math Previous Stand Plus/Plus CACCTOCOPTS 60 CACCTOCOPTS 60 CACCTO | Match Match Match 543679 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Fautures intro Query 3 Sbjot 1543 Query 61 Sbjot 1543 Query 121 Sbjot 1543 Query 121 Sbjot 1543 Query 121 Sbjot 1543 Query 301 Sbjot 1543 Query 421 Sbjot 1544 Query 421 Sbjot 1544 Query 601 Sbjot 1544 Query 601 Sbjot 1544 Query 601 Sbjot 1544 Query 721 Sbjot 1544 | tedNC_015/26.11 Length: 3872305 9801 to 1544475 GenBank Gradination Expect Identities 81) 0.0 Tagy/856(9) Pedependent Clo. Drothessa APP-binding Pedependent Clo. Drothessa APP-binding Pedependent Clo. Drothessa APP-binding CTGATOTACOLARAGE CACCOCC CTGATOTACOLARAGE CACCOCC CTGATOTACOLARAGE CACCOCC CTGATOTACOLARAGE CACCOCC ACGTGATATOGATOGACACCACC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC VACGTGATATOGATOGACACCACCAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC VACGTGATATOGATOGACCACCACAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC VACGTGATATOGATOGACACCACCAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC ACGTGATATOGATOGACACCACCAC VACGTGATATATOGATOGACGACCACCAC ACGTGATATOGATOGACGACCACCAC ACGTGATATOGATOGACGACCACCACCAC VACGTGATOGATOGACACCACACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCAC | WINNER O'N MARLINES. I W Rest I Gaps 29b) 16/856(1%) In a subunit.Clax Int a subunit.Clax Int a subunit.Clax Under Status Int a subunit.Clax Under Status Int a subunit.Clax Under Status Under Status <td>Math Previous Stand Plus/Plus CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 1 SOCIALARC 1 SO</td> <td>Match Match Match 543679 20 543739 20 543739 20 543399 20 544399 20 554439 554439 5544399 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td>Related Genome</td> <td>Information - Genomic Seque</td> <td>nce</td> | Math Previous Stand Plus/Plus CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 6 CACCTOCOVIC 1 SOCIALARC 1 SO | Match Match Match 543679 20 543739 20 543739 20 543399 20 544399 20 554439 554439 5544399 20 20 20 20 20 20 20 20 20 20 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence IDE E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Fastures: ATL Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 421 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 721 Sbjct 1544 Query 776 | tellNC_015/26.11 Length: 3872305 9801 to 194475 GenBank Graphics B31 D.94475 9801 to 194475 GenBank Graphics 81) O.0 Pedependent Clo. Dreferenter Pedependent Clo. Dreferenter Pedependent Clo. Dreferenter CTGATOTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter Pedependent Clo. Dreferenter CTGATOTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter CTGATOTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter Pedependent Clo. Dreferenter CTGATOTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter CTGATOTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter Pedependent Clo. Dreferenter ACGTGATACTACOLARAGE/OFFCATCS Dreferenter VACTGATATOGATOGE/OFFCATCS Dreferenter Pace-OFFCATATOCATOGE/OFFCATCS Dreferenter VACTGATOTATATOCATOGE/OFFCATCS Dreferenter VACTGATOTATATOCATOGE/OFFCATCS Dreferenter VACTGATOTATATOCATOCOCCACHAGE/OFFCATCS Dreferenter VACTGATOTATATOCATOCOCCACHAGE/OFFCATCCACTOGE/OFFCATCS Dreferenter VAC | WINNER O'N MARLINES. I W Rest I Capps 29b) 16/856(1%) In a subunit.Clax Int a subunit.Clax Int a subunit.Clax Under Status Int a subunit.Clax Under Status Under Status Int a subunit.Clax Under Status Status Under Status | Math Previous Stand Plus/Plus CACCTOCOUVE 6 CACCTOCOUVE 6 | Match Match Match 543679 20 543799 20 543799 20 543599 20 543999 20 544099 10 544099 10 544199 50 544219 50 544219 50 544239 544299 20 244399 28 28 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |
| Sequence ID: E Range 1: 1343 Score 1258 bits(61 Features: ATT Query 3 Sbjct 1543 Query 61 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 121 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 301 Sbjct 1543 Query 421 Sbjct 1544 Query 421 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 611 Sbjct 1544 Query 721 Sbjct 1544 Quer | tellNC_015/26.11 Length: 3872305 9801 to 1544475 GenBank Graphics B31 D.0 259/3502 Telesendent Lon protessa AbsocctorCARodersoftarton Contessa 2010 to 1544475 GenBank Graphics Pedependent Lon protessa APP-binding 2010 to 154475 Contessa 2011 to 154475 Contessa 2021 to 154475 Contessa 2021 to 154475 Contessa 2022 to 154475 Contessa 2031 to 154477 Contessa 2041 to 154477 Contessa 2051 to 154477 Contessa 2061 to 154475 Contessa < | Without of Mailland St. 1 Without St. 1 Capps 2%b) 16/856(1%b) Intra-ACATAWARCAAVGACGATGC Intra-ACATAWARCAAVGACGATGCCCCTGATGC Intra-ACATAWARCAAVGACGATGCCCCGATGCAGGAGGACGAGGACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG | Math Previous Stand Plus/Plus Cherrocovers 6 Cherrocovers 6 Cherro | Matsh — — 543679 20 2543799 20 543599 20 543599 20 543599 20 544399 20 544399 20 544219 20 544219 20 244399 22 243399 25 243399 28 | | | | Related Genome | Information - Genomic Seque | nce |

Resultado do sequenciamento de *phaZa1* de *Ralstonia eutropha* amplificado e clonado no plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*.



Resultado do sequenciamento de *lonA* de *Ralstonia eutropha* amplificado e clonado no plasmídeo pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*.

| d Resubmit Save | | onong. | | | | |
|--|---|---|--|----------------------------|---|--|
| | Search Strategies > Formatting options > Dow | nload | | | | You Tube How to read this page Blast report desi |
| tide Sequence | e (913 letters) | | | | | |
| RID 6G0E | VSUU018 (Expires on 10-25 01:05 am) | | | | | |
| Query ID c 91 | 415 | | | Database Nam | e Representative genome | es |
| escription None ecule type nucle | ic acid | | | Descriptio Progra | m ▷ See details m BLASTN 2.2.28+ ▷ Citat | tion |
| ry Length 913 | | | | | | |
| r reports: > Searc | h Summary [Taxonomy reports] [Distance tree o | of results] | | | | |
| hie Cumment | | | | | | |
| nic summary | | | | | | |
| | | Di | stribution of 1 Blast | lits on the Query Sequence | ce (9) | |
| | | Mouse over to see t | he defline, click to s | low alignments | | |
| | | | Color I | ev for alignment score | | |
| | | <40 | 40-50 | 50-80 80- | 200 >=200 | |
| | | Query | | | 760 000 | |
| | | · · | 150 300 | 450 800 | 750 900 | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| riptions | | | | | | |
| | | | | | | |
| Sequences produc | ing significant alignments: | | | | | |
| Select: All None S | ielected:0 | | | | | |
| Alignments | Download - GenBank Graphics Distance tree of re | esults | | | | 0 |
| | | | lescription | | | Max Total Query E Ident Accession |
| | | U | rescription | | | score score cover value ident Accession |
| Cupriavidus nec | ator N-1 chromosome 1, complete sequence | | | | | 1094 1094 84% 0.0 91% <u>NC 015726.1</u> |
| | | | | | | |
| Cupriavidus nec | ator Ner Chromosome 1, complete sequence | | | | | |
| Cupriavidus nec | ator ner enromosome i, complete sequence | | | | | |
| Sequence ID: refINC | 2_015726.11 Length: 3872936 Number of Matches: 1 | | | | | Related Information |
| Cupriavidus nec Sequence ID: refIN(Range 1: 1543663 Score | 2_015726.11 Length: 3872936 Number of Matches: 1 to 1544458 <u>GenBank</u> <u>Graphics</u> Expect Identities Gaps | Vext Match A Previ | ous Match | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupriavidus nec Sequence ID: <u>reflN(</u> Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) | 2.015726.1] Length: 3872936 Normality Complex Sequence of Matches to 1544458 SenBank: Graphics Expect Identities Gaps 0.0 727/797(91%) 22/797(| Vext Match A Previ Strand (2%) Plus/Plus | ous Match | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupriavidus nec Sequence ID: refN4 Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-dej ATP-dej | 201712 Clinication Critication Criticati Activity Critication Critication Critication Critication Crit | Vext Match Previ Strand (2%) Plus/Plus | ous Match | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupriavidus nec Sequence ID: refiNi Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-der ATP-der Query 44 | Jack FF Citating of the second | Vext Match Previ Strand (2%) Plus/Plus TGGTGGCGTGGACTITAT | ous Match | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupnavidus nec Sequence ID: rofNV Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-do ATP-do Query 44 Sbjct 1543663 | 2015726-11 Length: 3372336 Humber of Matchest 1 to 1544548 GenBank Graphics Expect Identities Gaps 0.0 727/797(91%) C27/97 endedt.Commerces ATP-binding suburt CIaX Gentroscort Rest Commerces Attractions and Commerces Gentroscort Rest Commerces Attractions and Commerces Gentroscort Constructions and Commerces Attractions and Commerces Gentroscort Constructions and Commerces Attractions and Commerces Commerces and Commerces and Commerces and Commerces Attractions and Commerces and Co | Vext Match Previ Strand (2%) Plus/Plus Tegregegeregeregeregeregeregeregeregereg | ous Match 102 1543722 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupnavidus nec Sequence ID: reflN Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-de Query 44 Sbjct 1543663 Query 103 | Joint Production Control | Vest Match Prevv Strand (2%) Plus/Plus Testigecergeactithat Lastreacegerccalati | ous Match 102 1543722 162 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupriavidus nec Sequence ID: roffN4 Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Features: <u>ATP-de</u> Query 44 Sbjct 1543663 Query 103 Sbjct 1543723 | Join The Control | Vest Match Previ Strand (2%) Plus/Plus Testigecerease Astronometrication Costaccoseccatation Costaccoseccatation Costaccoseccatation Costaccoseccatation | ous Match 102 1543722 162 1543782 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence ID: [0][V] Range 1: 1543663 Score 1094 bits(592) Featuress: <u>ATP-66</u> Query 44 Sbjct 1543663 Query 103 Sbjct 1543723 Query 163 | Joint Program (Length: 307233) Humber of Matchest 1 to 1344349 GenBant; Graphica Expect Langth: 307233 Humber of Matchest to 1344349 GenBant; Graphica Expect Langth: Adventure 0.0 727/797(91%) Caps Gaps Goard Caps | rext Match Previ Strand Strand IdeTGeccoregaCTITAT AntifecceseGearCHAAAK CogcAacCegeGeGaAAAK CogcAacCegeGeGaAAAK CcGaCeacGeGeGaAAAK CcGaCeacGeAAGEGAAAK CcGaCeacGeAAGEGAA CcGaCeacGeAAGEGAAAK CcGaCeacGeAAGEGAAAK CcGaCeacGeAAGEGAA CcGaCeacGeAAGEGAA CcGaCeacGeAAGEAA CcGaCeaCGAAGEGAAGEAAA CcGaCeaCGAAGEGAAGEAAA | 102 1543722 1543782 222 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence ID: [m]N Range 1: 1343083 Score 1094 bits(592) Features: ATP-de ATP-de Query 44 Sbjct 1543683 Query 103 Sbjct 1543723 Query 163 Sbjct 1543783 Query 163 Sbjct 1543783 | Joint Free International Conference in Conference 2012 Joint Conference Joint | Head Match & Preve Strand 296) Plus/Plus Togroeceroescreation Datacoccession CoscAccessesCasAak CoscAccessesCasCasAak CoscAccessesCasAak CoscAccessesCasAak CoscAccessesCasA | 102 1543722 1543722 1543782 222 1543842 282 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net sequence ID: [m]N Range 1: 1343083 Score 1094 bits(592) Features: ATP-de ATP-de Query 44 Sbjct 1543683 Query 163 Sbjct 1543723 Query 163 Sbjct 1543783 Query 223 Sbjct 1543984 | 2015726.11 Length: 3372336 Humber of Matches 1 to 154438 GenBank Grashiss Expect Identities Cape 0.0 126726.11 Length: 327297619(s) 227797 227977619(s) 227797 227977 227977 227977 227977 227977 227977 2279 22797 22797 22797 22797 2279 | V React Match & Preve Strand 296) Plus/Plus 1097090017086CTTAT 10970900109807CCAACT C000C00009000000000000000000000000000 | 102 1643722 162 1543782 222 1543842 282 1543902 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus nec Sequence ID: (mRN Range 1: 1343663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-de ATP-de Query 103 Sbjct 1543663 Query 103 Sbjct 1543723 Query 163 Sbjct 1543783 Query 223 Sbjct 1543843 Query 223 | GORFICEL CHARGE CONTRACTOR CONTRACTOR GORFICE CONTRACTOR CONTRACTOR GORFICE CONTRACTOR GORFICE CONTRACTOR CONTRACTOR GORFICE GORFICE CONTRACTOR GORFICE | V React Match: ▲ Prevel Strand 25) Strand Distrocorregation Strand Distrocorregation Consciences Conscience Consci | 102 1543722 162 1543722 222 222 1543842 282 1543902 342 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence ID: (mTM Hange 1: 1343663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-66 Query 44 Shjot 1543763 Query 163 Shjot 1543763 Query 163 Shjot 1543783 Query 283 Shjot 1543943 | Grant Control Con | V Rooct Match ▲ Prevel Strand Strand Strand Strand Strand Strand Costonessesterscare: Costonessesterscare: Costonessesterscare: Social Costoness | 102 1543722 162 1543782 222 1543842 222 1543842 222 1543862 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence UE: (mTM 1094 bits(592) 1094 bits(592) Features: ATD-de Query 44 Shjot 154363 Query 103 Shjot 1543723 Query 163 Shjot 1543723 Query 163 Shjot 1543733 Query 223 Shjot 1543843 Query 243 Shjot 1543903 Query 343 | GORTOCONTRACTORNACIONAL CONTRACTORNACIÓN GORTOCONTRACTORNACIÓN GORTOCONTRACTORNACIÓN GORTOCONTRACTÓNICON GORTOCONTRACTÓNICON GORTOCONTRACTÓNICON | V React Match: ▲ Prevel Strand Plus/Plus TopTopocoroaccritian Apartosocoroaccritian Cosocococoroaccritian Cosocococococococo Cosocococococococo Cosocococococococo Cosocococococococo Cosococococo Cosococococo Cosocococo Cosococo Cosocococo Cosocococo Cosocococo Cosocococo Cosococo Cosoco Cosoco Cosoco Cosoco Cosoco Cosoco Cosoco Cosococo Cosoco Cosoco Cosoco Cosococo Cosoco Cosococo Cosoco Cosoco Cosococo Coso | 102 1543722 1643722 1643782 222 1643842 282 1543902 342 1543962 402 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence ID: (SIN Range 1: 134363 Score 1094 bits(592) Reatures: AT-20 Supor 1: 154363 Query 103 Sbjot 154363 Query 163 Sbjot 1543783 Query 163 Sbjot 1543943 Query 223 Sbjot 1543943 Query 283 Sbjot 1543943 | 2.015726.11 Length: 3372336 humber of Matches 1 to 154438 GenBank Grashiss Expect Jacobias (Grashiss Expect Jacobias) Grashiss Expect Jacobias (Grashiss) Control (Grashiss) Grashiss (Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss (Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss (Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss) GenBank Control (Grashiss) GenBank Control (Grashiss) Grashiss) Grashiss (Grashiss) | Venct Hatch ▲ Prevel Strand Strand Plus/Plus T00700007006ACTITAT Add Decoder ForAct C000CH007000000H0AC C000CH00700000HAA C000CH00700000HAA C000CH0070000HAA C000CH007000CHAA C000CH007000CHAA Add A A | 102 1543722 162 1543782 222 1543782 222 1543982 282 1543902 342 1543962 402 1544022 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence Dit (MTM Range 1: 1343683 Sove 1094 bits(592) Features: ATP-66 Query 44 Sbjct 1543683 Query 163 Sbjct 1543783 Query 163 Sbjct 1543783 Query 223 Sbjct 1543843 Query 23 Sbjct 1543983 Query 43 Sbjct 1543983 Query 43 | Construction of the second secon | ♥ React Match ▲ Prevel Strand 295) | 102 1543722 1543722 1543782 222 1543842 282 1543962 342 1543962 402 1544922 462 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net Sequence Dit (MIN Range 1: 1343663 5000 1094 bits(592) Features: ATD-66 Query 44 Sbjot 1543663 Query 163 Sbjot 1543763 Query 23 Sbjot 1543783 Query 23 Sbjot 1543783 Query 343 Sbjot 1543903 Query 343 Sbjot 154363 Query 403 Sbjot 1544963 Comm 445 | Construction of the second secon | ♥ React Match ▲ Prevel Strand 292) 7007000709ACTTAT 10070000000000000000000000000000000000 | 102 1543722 162 1543722 1543722 222 1543842 222 1543902 342 1543962 402 1544022 462 1544022 154403 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Sequence UE: (sfN) Range 1: 1343663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-66 Query 44 Shjot 1543763 Query 163 Shjot 1543723 Query 163 Shjot 1543733 Query 283 Shjot 1543903 Query 283 Shjot 1543903 Query 343 Shjot 1543903 Query 403 Shjot 1544023 Query 463 Shjot 1544023 Query 463 Shjot 1544023 | Growth Sector Construction Construction Growth Sector Growth Sector Construction Growth Sector Construction Growth Sector Construction Growth Sector Growth Growth Sector Growth Sector Growth Sector Growth | V React Match ▲ Prevel Strand | 102 1543722 1543722 1543722 222 1543842 282 1543962 402 1543962 462 1544081 522 154411 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Range 1:1343663 Score 1094 bits(592). Features: ATL-26 Suport 1636563 Query 44 Sbjot 1543623 Query 163 Sbjot 1543623 Query 223 Sbjot 1543943 Query 283 Sbjot 1543943 Query 283 Sbjot 1543943 Query 433 Sbjot 1544023 Query 463 Sbjot 1544023 Query 453 | 2015726.11 Length: 3372336 Implied 2014 12 2015726.11 Length: 3372336 Implied 2014 12 Expect Length: 3372336 Implied 2014 12 Expect Length: 3372336 Implied 2014 12 Expect Length: 3372376 Implied 2014 12 Expect Length: 33723777777777777777777777777777777777 | Vened Hatch ▲ Prevel Strand Plus/Plus Strand Plus/Plus TopTopCorportTriat AntroportCorportTriat CorportCorportCorport Corport CorportCorportCorport Corport CorportCorportCorport Corport CorportCorportCorport Corport | 102 1543722 162 1543722 1643722 222 1543922 222 1543902 342 1543902 342 1543962 402 1544021 1544021 522 1544141 522 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cuprawidus net: Range 1: 1343633 Score 1094 bits(592) Features:: ATD:26 Query 44 Sbjct Sbjct 1543663 Query 43 Sbjct Sbjct 1543783 Query 223 Sbjct Sbjct 1543963 Query 43 Sbjct Sbjct 1543963 Query 403 Sbjct Sbjct 1543963 Query 403 Sbjct Sbjct Sbjct 1544023 Query 523 Sbjct Sbjct <td>2015726.11 Length: 3072336 Implied 2014 Length: 307236.11 Length: 307236.11 Length: 3072336 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 30723776 Implied 2014 Length: 307237776 Implied 2014 Length: 307237777777777777777777777777777777777</td> <td>V React Match & Preve Strand 25) Strand 26) Plus/Plus 1007090070964711741 1047100005000000000000000000000000000000</td> <td>102 1543722 162 1543782 222 1543842 282 1543982 282 1543982 1543982 402 1544022 462 1544021 292 154401 582</td> <td></td> <td></td> <td>Related Information Genome - Genomic Sequence</td> | 2015726.11 Length: 3072336 Implied 2014 Length: 307236.11 Length: 307236.11 Length: 3072336 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 3072376 Implied 2014 Length: 30723776 Implied 2014 Length: 307237776 Implied 2014 Length: 307237777777777777777777777777777777777 | V React Match & Preve Strand 25) Strand 26) Plus/Plus 1007090070964711741 1047100005000000000000000000000000000000 | 102 1543722 162 1543782 222 1543842 282 1543982 282 1543982 1543982 402 1544022 462 1544021 292 154401 582 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cuprawidus net: Range 1: 1343063 Sowe 1094 bits(592) Features: ATP-26 Query Sbjct 1543663 Query Sbjct 1543663 Query Sbjct 1543763 Query 23 Sbjct Sbjct 1543963 Query Sbjct Sbjct Sbjct 1543963 Query Sbjct Sbjct Sbjct 1544082 Query Sbjct 1544083 Sbjct Sbjct 1544082 Query Sbjct | ADJ 121 Control C | V React Match ▲ Prevel Strand Plus/Plus Strand Plus/Plus Plus Plus/Plus Plus/Plus Plus/Plus Plus/Plu | 102 1543722 162 1543782 252 1543842 252 1543962 402 1544962 462 1544001 522 154401 522 154401 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Range 1: 1343663 5000 = 1:094 bits(592) Features: ATD-66 Query 44 Sbjct 1543663 Query 163 Sbjct 1543763 Query 163 Sbjct 1543763 Query 223 Sbjct 1543783 Query 23 Sbjct 1543783 Query 343 Sbjct 1543903 Query 43 Sbjct 1544923 Query 403 Sbjct 1544023 Query 463 Sbjct 1544022 Query 523 Sbjct 1544022 Query 523 Sbjct 1544022 Query 53 Sbjct 1544022 Query 54 Sbjct 1544022 Query 54 Sbjct 1544022 Query 54 Sbjct 1544022 Query 54 Sbjct 1544022 Query 553 Sbjct 1544022 Query 553 Sbjct 1544022 Query 553 Sbjct 1544022 Query 553 Sbjct 154568 Sbjct 154568 Sbjct 1545688 Sbjct 15456888 Sbjct 1545688888 Sbjct 15568888888888 | 201726.011 Length: 3072336 Immber of Matches 1 to 134438 GenBank Greakhist Expect Advention Strategy (Comparison of Comparison | V Rood Match ▲ Provi Strand 25) Strand 25) Strand 25) Control (1) Contro(1) Control (1) Cont | 102 1543722 162 1543722 222 1543842 222 1543842 222 1543842 222 1543962 402 1544021 462 1544021 554 154401 592 1544201 641 1544261 592 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Sequence UE: (sfN) Range 1: 1343663 Score 1094 bits(592) Features: ATP-66 Query 44 Supot 1543763 Query 46 Supot 1543763 Query 163 Supot 1543763 Query 283 Supot 1543963 Query 283 Supot 1543963 Query 433 Supot 1544023 Query 463 Supot 1544022 Query 523 Supot 1544023 Query 523 Supot 1544023 Query 523 Supot 1544023 Query 523 Supot 1544024 Query 523 Supot 1544024 Query 523 Supot 1544024 Query 525 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Query 642 Supot 1544024 Supot 1 | 2015726.11 Length: 3372336 Humber of Matches 1 to 154726.11 Length: 3372336 Humber of Matches 1 Expect 1 Adentities Capp 0.0.0.12 Length: 3372376 Humber of Matches 1 Expect 1 Adentities Capp 0.0.0.12 Length: 3372376 Humber of Matches 1 Capp 2,7797(91%) Capp 0.0.0.12 Length: 34727(91%) Capp 0.0.0.0.12 Length: 34727(91%) Capp 0.0.0.0.0.0.0.000 0.0.0.0.0.0.000 0.0.0.0. | V React Match ▲ Prevel Strand Strand Plus/Plus Plus Plus/Plus Plus Plus/Plus Plus Plus/Plus Plus P | 102 1543722 162 1543722 222 1543842 222 1543902 342 1543902 342 1543962 402 1544021 54241 554141 552 1544261 5542 1544261 554321 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Range 1: 1343633 Geore 1094 bits(592) Features: ATD-26 Query 4 Sbjct 1543633 Query 163 Sbjct 1543783 Query 163 Sbjct 1543783 Query 163 Sbjct 1543983 Query 23 Sbjct 1543983 Query 23 Sbjct 1543983 Query 43 Sbjct 1543963 Query 43 Sbjct 1544923 Query 43 Sbjct 1544923 Query 43 Sbjct 1544223 Sbjct 1544222 Query 55 Sbjct 1544222 Query 51 Sbjct 1544222 Query 642 Sbjct 1544222 Query 42 Sbjct 1544222 Query 42 Sbjct 1544222 Query 42 Sbjct 1544222 Query 42 Sbjct 1544222 Query 642 Sbjct 1544222 Query 700 | 2015726.11 Length: 3372336 Jumber of Matches 1 to 154726.11 Length: 3372336 Jumber of Matches 1 Expect Jack Science 2 0.0 Internet Control (1970) | V React Match & Preve Strand 250 Strand 295 Diss/Plus/Plus 100709007000471113 10070900700047113 10070907000007000 100700000000000000000 | 102 1543722 162 1543722 222 1543822 222 1543902 342 2543902 342 1544902 154492 154402 154402 154401 522 154401 522 154421 641 154421 649 1544231 752 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus nec Range 1: 1343063 Score 1094 bits(592) Features: ATD-20 Goore Joba bits(592) Features: ATD-20 Suport Suport< | 2015726.11 Length: 3072336 Immber of Matches 1 to 154726.11 Length: 3072336 Immber of Matches 1 to 1544438 GenBanis Greathiss Expect Adventise Carps 0.01 Z27797(9156) 227997 Branch Carps State 2 Control Control Contr | Yeard Match & Preve Strand 235) Strand 245) Strand 245) Strand 245) Strand 245 245 245 245 245 245 245 245 | 102 1543722 162 1543782 222 1543842 222 1543842 222 1543962 402 1544962 154402 154401 582 1544201 641 1544201 641 1544201 643 21 544321 | | | Related Information Genomic Sequence |
| Cuprawidus net: Range 1: 1343683 Sowe 1094 bits(592) Features: ATP-26 Query Sbjct 1543683 Query Sbjct 1543683 Query Sbjct 1543783 Query Sbjct 1543783 Query Sbjct 1543783 Query Sbjct 1543783 Query 30 Sbjct 1543903 Query 30jct 154402 Query Sbjct 154402 Query Sbjct 1544202 Query 63 Sbjct 1544202 Query 70 Sbjct 1544202 Query 1544202 | ACTION CONTRACTOR AND | V Rood Match ▲ Provi Strand 25) Strand 25) Strand 26) Plus/Plus 10070500705ACTTAT 100705005050000000000000000000000000000 | 102 1543722 162 1543782 222 1543842 222 1543842 222 1543842 222 1543962 402 1544021 462 1544021 542 1544021 54111 582 1544201 641 1544201 641 1544201 642 1544311 752 254381 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Range 1: 1343663 Score 1094 bits(522) Features: ATL-26 Supor 163 Supor 163663 Query 103 Supor 163653 Query 103 Supor 164363 Query 223 Supor 1643843 Query 23 Supor 1643843 Query 243 Supor 1643943 Query 403 Supor 1544023 Query 403 Supor 1544023 Query 403 Supor 1544023 Query 463 Supor 1544024 Query 583 Supor 1544022 Query 642 Supor 1544222 Query 62 Supor 1544222 Query 62 Supor 1544222 Query 62 Supor 1544222 Query 642 Supor 1544222 Query 642 Supor 1544222 Query 642 Supor 1544222 Query 642 Supor 1544222 Query 642 Supor 1544222 Query 103 Supor 1544222 Query 103 Supor 1544222 Query 103 Supor 1544222 Query 103 Supor 1544222 Supor 154422 Supor 154422 | 2015726.11 Length: 3372336 Implies of Matches 1 2015726.11 Length: 3372336 Implies of Matches 1 to 1544543 GenBank Greathise Expect Length: 3372356 Implies 227757 Expect Length: 3372356 Expect Length: 3372356 Expect Length: 3372356 Expect Length: 3372376 Expect Length: 3372356 Expect Length: 3372376 Expect Length: 3372377 Expect Length: 33727777 Expect Length: 3372777 Expect Length: 3372777 Expect Length: 3372777 Expect Length: 337277 Expect Length: 3372777 Expect Length: 3372777 Expect Length: 3372777 E | V React Match ▲ Prevel Strand Strand Strand Plus/Plus Strand Plus/Plus Plus/Plus Tostaoconsecurita Tostaoconsecu | 102 1543722 1543722 222 1543822 222 1543842 222 1543902 342 1543902 342 1543962 402 1544021 542 1544021 552 154421 1544251 659 1544251 1544251 1544251 1544251 1544251 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus nec Range 1: 134363 Goare 1094 bits (592) Features: Store 1094 bits (592) Features: Store 1094 bits (592) Features: Store Store S | 2015726.11 Length: 3372336 humber of Matches 1 2015726.11 Length: 3372376 https://doi.org/10.11 Length: 33723777777777777777777777777777777777 | V React Match ▲ Prevel Strand | 102 1543722 162 1543722 222 1543822 222 1543902 342 1543902 342 1543902 342 1544021 1544021 552 1544141 552 1544141 552 1544201 641 641 64321 752 1544381 804 1544441 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cupravidus net: Range 1: 1343063 Sequerce ID: (MTM Range 1: 1343063 Score 1094 bits(592) Features: ATP-20 Query 44 Sbjct 154363 Query 43 Sbjct 1543763 Query 463 Sbjct 1543763 Query 463 Sbjct 1543963 Query 403 Sbjct 1543963 Query 403 Sbjct 1544963 Query 403 Sbjct 1544963 Query 463 Sbjct 1544022 Query 553 Sbjct 1544422 Query 705 Sbjct 1544322 Query 753 Sbjct 1544322 Query 753 Sbjct 1544322 Query 753 Sbjct 1544322 Query 753 Sbjct 1544322 Query 753 Sbjct 1544322 Query 655 Sbjct 1544322 Query 655 Sbjct 1544322 Query 655 Sbjct 1544422 Query 655 Sbjct 1544422 Query 655 Sbjct 1544422 Query 755 Sbjct 1544322 Query 755 Sbjct 1544322 Query 755 Sbjct 1544322 Query 655 Sbjct 1544422 Sbjct 1544322 Sbjct 1544322 Query 755 Sbjct 1544322 Sbjct 154452 Sbjct 15455 Sbjct 154555 Sbjct 154555 Sbjct 154555 Sbjct 154555 Sbjct 154555 Sbjct 154555 Sbjct 1545555 Sbjct 1545555 Sbjct 15455555 Sbjct 155555555 Sbjct 15555555555555555555555 | 2015726.11 Length: 3972336 Humber of Matches 1 to 154438 GenBanis Greathus Expect Adventises Expect Adven | Venet Match ▲ Preve Strand 23) Strand 24) Strand 25) Control (1) | 102 1543722 162 1543782 222 1543842 222 1543842 223 1543962 402 1544021 462 1544021 462 154401 522 2154421 154421 254421 254421 2544321 752 1544321 254331 264331 264331 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |
| Cuprawidus net: Range 1: 1343683 Sowe 1094 bits(592) Features: ATP-26 Query Bjot Sbjot Sbjot < | ADJ 12 - Control | V Rock Match. ▲ Prove Strand 23) Strand 24) Strand 25) Control (1) | 102 1543722 162 1543722 222 1543842 222 1543842 222 1543842 222 1543962 402 1544021 462 1544021 542 154401 592 1544201 641 1544201 642 154431 752 254431 254431 | | | Related Information Genome - Genomic Sequence |

ANEXO D – Dados completos dos experimentos de mobilização de P3HB em linhagens de *B. sacchari* e *E. coli* recombinante

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | РЗН | В | MS | 3HB |
|----------|-------|-----------|--|---------------|-----------------|-------------------|-------|
| - | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual (g/L) | (g/L) |
| LFM101 | | | | | | | |
| | 0 | 2,67±0,12 | $1,75.10^{10}\pm 1,27.10^{10}$ | 36,88±2,06 | 0,98±0,06 | $1,68\pm0,08$ | 0 |
| | 3 | 2,68±0,20 | $4,03.10^{10}\pm4,14.10^{9}$ | 20,08±4,17 | $0,54{\pm}0,07$ | $2,14\pm0,18$ | 0 |
| | 6 | 2,34±0,19 | $5,53.10^{10}\pm4,14.10^{9}$ | 13,45±2,76 | 0,31±0,09 | 2,02±0,28 | 0 |
| | 24 | 2,54±0,13 | $1,74.10^{10}\pm 2,60.10^{9}$ | $7,02\pm0,89$ | 0,18±0,98 | 2,36±0,20 | 0 |
| | 48 | 2,17±0,10 | $1,09.10^{10}\pm 2,38.10^{9}$ | $5,17\pm0,68$ | 0,11±0,08 | 2,06±0,14 | 0 |
| | 72 | 2,29±0,11 | $1,11.10^{10}\pm 2,90.10^{9}$ | 4,26±0,01 | 0,10±0,01 | 2,19±0,14 | 0 |
| LFM344 | | | | | | | |
| | 0 | 1,66±0,15 | $1,25.10^{10}\pm3,07.10^{9}$ | 0 | 0 | 1,66±0,15 | 0 |
| | 3 | 1,64±0,20 | $2,03.10^{10}\pm3,74.10^{9}$ | 0 | 0 | 1,64±0,20 | 0 |
| | 6 | 1,57±0,15 | $1,19.10^{10}\pm 5,82.10^{9}$ | 0 | 0 | 1,57±0,15 | 0 |
| | 24 | 1,46±0,04 | $1,42.10^{10}\pm1,05.10^{10}$ | 0 | 0 | $1,46\pm0,04$ | 0 |
| | 48 | 1,61±0,04 | $7,00.10^9 \pm 1,96.10^9$ | 0 | 0 | 1,61±0,04 | 0 |
| | 72 | 1,42±0,04 | $7,68.10^9 \pm 2,22.10^9$ | 0 | 0 | $1,42\pm0,04$ | 0 |
| LFM587 | | | | | | | |
| | 0 | 2,53±0,08 | $1,75.10^{10}\pm6,29.10^{9}$ | 38,04±1,14 | 0,96±0,19 | $1,57{\pm}0,05$ | 0 |
| | 3 | 2,55±0,11 | $2,35.10^{10}\pm3,78.10^{9}$ | 35,64±0,96 | 0,91±0,09 | 1,64±0,05 | 0 |
| | 6 | 2,50±0,09 | $2,07.10^{10}\pm 1,97.10^{10}$ | 35,93±2,01 | 0,90±0,11 | 1,60±0,12 | 0 |
| | 24 | 2,40±0,07 | $1,36.10^{10}\pm4,06.10^{9}$ | 35,12±0,56 | 0,84±0,23 | 1,56±0,06 | 0 |
| | 48 | 2,52±0,06 | $7,80.10^9 \pm 2,44.10^9$ | 33,30±1,21 | 0,84±0,07 | $1,68\pm0,05$ | 0 |
| | 72 | 2,33±0,09 | 9,53.10 ⁹ ±3,31.10 ⁹ | 32,82±1,63 | 0,76±0,04 | $1,57\pm0,04$ | 0 |
| LFM588 | | | | | | | |
| | 0 | 3,00±0,08 | $6,73.10^9 \pm 1,11.10^9$ | 37,13±0,73 | 1,11±0,02 | $1,88\pm0,10$ | 0 |
| | 3 | 2,81±0,06 | $3,04.10^{10}\pm 2,07.10^{9}$ | 32,38±0,44 | 0,91±0,32 | $1,90\pm0,04$ | 0 |
| | 6 | 2,85±0,10 | $2,07.10^{10}\pm 1,97.10^{10}$ | 30,38±1,65 | 0,86±0,04 | $1,98{\pm}0,07$ | 0 |
| | 24 | 2,76±0,11 | $1,90.10^{10} \pm 1,06.10^{9}$ | 29,75±1,14 | 0,82±0,11 | $1,94{\pm}0,07$ | 0 |
| | 48 | 2,72±0,04 | $1,07.10^{10}\pm 2,50.10^{9}$ | 27,81±,037 | 0,75±0,14 | 1,97±0,05 | 0 |
| | 72 | 2,76±0,06 | 9,20.10 ⁹ ±1,83.10 ⁹ | 26,25±0,99 | 0,72±0,02 | 2,04±0,05 | 0 |

Cinética de mobilização de P3HB em mutantes de *B. sacchari*.

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | РЗНЕ | 3 | MS | 3HB |
|----------|-------|-----------------|--|----------------|-----------------|---------------|-------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual | (g/L) |
| LFM101 | | | | | | | |
| | 0 | 4,32±0,09 | $1,68.10^{10}\pm7,78.10^{8}$ | 41,87±0,34 | 1,81±0,01 | 2,48±0,01 | 0 |
| | 3 | 4,33±0,01 | $2,83.10^{10}\pm 5,49.10^{9}$ | 30,65±1,67 | $1,33\pm0,07$ | 3,00±0,06 | 0 |
| | 6 | 4,27±0,25 | $3,83.10^{10}\pm 2,05.10^{9}$ | 23,59±1,95 | 1,01±0,46 | 3,26±0,11 | 0 |
| | 24 | 3,88±0,36 | $1,94.10^{10} \pm 4,88.10^{9}$ | $11,69\pm1,40$ | $0,45\pm0,13$ | 3,43±0,37 | 0 |
| | 48 | 3,19±0,27 | $1,29.10^{10}\pm 3,60.10^{9}$ | 9,30±0,99 | 0,29±0,01 | 3,55±0,28 | 0 |
| | 72 | 3,97±0,17 | 9,13.10 ⁹ ±7,79.10 ⁸ | 3,61±3,11 | 0,14±0,03 | 3,82±0,04 | 0 |
| LFM344 | | | | | | | |
| | 0 | $2,32{\pm}0,05$ | $1,41.10^9 \pm 2,90.10^8$ | 0 | 0 | 2,32±0,05 | 0 |
| | 3 | $2,26\pm0,06$ | $2,03.10^9 \pm 5,66.10^7$ | 0 | 0 | 2,26±0,06 | 0 |
| | 6 | $2,25\pm0,08$ | $2,26.10^9 \pm 7,07.10^7$ | 0 | 0 | 2,25±0,08 | 0 |
| | 24 | 2,19±0,01 | $2,04.10^9 \pm 1,27.10^8$ | 0 | 0 | 2,19±0,01 | 0 |
| | 48 | 2,41±0,04 | $2,14.10^9 \pm 2,97.10^8$ | 0 | 0 | 2,41±0,04 | 0 |
| | 72 | 2,12±0,11 | $3,71.10^9 \pm 5,37.10^8$ | 0 | 0 | 2,12±0,11 | 0 |
| LFM587 | | | | | | | |
| | 0 | 4,23±0,59 | $1,50.10^{10}\pm 6,37.10^{9}$ | 46,36±0,77 | 1,96±0,31 | 2,27±0,28 | 0 |
| | 3 | $4,11\pm0,07$ | $1,65.10^{10}\pm 1,76.10^{8}$ | 45,31±2,82 | 1,86±0,09 | 2,25±0,15 | 0 |
| | 6 | $4,17{\pm}0,08$ | $2,64.10^{10}\pm7,21.10^{8}$ | 42,73±1,32 | $1,78\pm0,09$ | 2,39±0,01 | 0 |
| | 24 | 4,56±0,95 | $1,25.10^{10}\pm 1,25.10^{9}$ | 37,73±1,45 | $1,72\pm0,21$ | 2,84±0,46 | 0 |
| | 48 | 4,23±0,02 | $1,18.10^{10}\pm6,74.10^{8}$ | 39,48±2,23 | $1,67\pm0,09$ | 2,56±0,08 | 0 |
| | 72 | 3,95±0,03 | $1,18,10^{10}\pm7,07.10^{8}$ | 38,94±3,91 | $1,54{\pm}0,14$ | 2,41±0,12 | 0 |
| LFM1126 | | | | | | | |
| | 0 | 3,85±0,79 | $1,78.10^{10}\pm 6,94.10^{9}$ | 43,17±3,21 | $1,71\pm0,72$ | $2,14\pm0,17$ | 0 |
| | 3 | 3,95±0,61 | $3,78.10^{10}\pm9,46.10^{8}$ | 27,98±6,61 | $1,13\pm0,44$ | 2,82±0,17 | 0 |
| | 6 | 3,97±0,33 | $4,93.10^{10}\pm1,34.10^{9}$ | 11,53±2,91 | $0,47{\pm}0,04$ | 3,49±0,24 | 0 |
| | 24 | 2,93±0,82 | $2,02.10^{10}\pm 2,02.10^{9}$ | 0,33±0,29 | $0,01\pm0,01$ | 2,92±0,81 | 0 |
| | 48 | 3,46±0,29 | $1,74.10^{10}\pm 1,39.10^{9}$ | 0 | 0 | 3,46±0,29 | 0 |
| | 72 | 2,94±0,99 | $1,65.10^{10}\pm 2,27.10^{9}$ | 0 | 0 | 2,94±0,99 | 0 |
| LFM1127 | | | | | | | |
| | 0 | 3,77±0,32 | $1,38.10^{10}\pm 1,68.10^{9}$ | 41,20±1,81 | 1,66±0,19 | 2,11±0,37 | 0 |
| | 3 | 3,99±0,18 | $1,64.10^{10}\pm9,46.10^{8}$ | 39,95±2,53 | 1,60±0,17 | 2,39±0,02 | 0 |
| | 6 | 3,97±0,12 | $2,36.10^{10}\pm7,06.10^{8}$ | 39,43±1,27 | $1,56\pm0,10$ | 2,40±0,02 | 0 |
| | 24 | 3,76±0,27 | $1,49.10^{10}\pm1,11,10^{9}$ | 38,47±,0,93 | 1,45±0,13 | 2,31±0,13 | 0 |
| | 48 | 3,64±0,66 | $1,02.10^{10}\pm 6,30.10^{8}$ | 37,61±0,96 | 1,37±0,28 | 2,27±0,38 | 0 |
| | 72 | 3,47±0,06 | 9,82.10 ⁹ ±1,26.10 ⁹ | 36,98±2,42 | $1,28\pm0,11$ | 2,18±0,04 | 0 |

Mobilização de linhagens de B. sacchari com complementação heteróloga.

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | РЗНВ | | MS Residual | 3HB |
|----------|-------|-----------------|------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | (g/L) | (g/L) |
| LFM588 | | | | | | | |
| | 0 | $5,20\pm0,89$ | $1,73.10^{10}\pm 2,81.10^{9}$ | 48,95±4,27 | 2,54±0,66 | 2,64±0,23 | 0 |
| | 3 | $5,08{\pm}0,60$ | $3,04.10^{10}\pm3,92.10^{9}$ | 43,89±3,99 | 2,23±0,17 | 2,84±0,13 | 0 |
| | 6 | $5,05\pm0,73$ | $2,07.10^{10}\pm9,40.10^{8}$ | 40,58±2,13 | 2,04±0,57 | 2,99±0,33 | 0 |
| | 24 | 4,95±0,86 | $1,90.10^{10} \pm 4,03.10^{9}$ | 35,34±0,32 | $1,74\pm0,84$ | 3,20±0,54 | 0 |
| | 48 | 4,75±0,61 | $1,07.10^{10}\pm 1,41.10^{9}$ | 33,17±1,57 | 1,57±0,73 | 3,17±0,33 | 0 |
| | 72 | 4,81±0,45 | $9,20.10^9 \pm 8,70.10^9$ | 31,90±0,21 | 1,53±0,39 | 3,89±0,01 | 0 |
| LFM1129 | | | | | | | |
| | 0 | 4,23±0,24 | $1,79.10^{10}\pm 2,13.10^{9}$ | 46,35±6,02 | 1,96±0,33 | 2,26±0,19 | 0 |
| | 3 | 4,00±0,32 | $3,73.10^{10}\pm 9,65.10^{8}$ | 30,30±4,68 | 1,22±0,26 | $2,78\pm0,20$ | 0 |
| | 6 | 3,95±0,32 | $4,85.10^{10}\pm 1,27.10^{9}$ | 18,51±7,36 | 0,74±0,33 | 3,21±0,16 | 0 |
| | 24 | 3,39±0,11 | $2,00.10^{10}\pm 1,63.10^{9}$ | 0,63±0,23 | 0,02±0,01 | 3,37±0,11 | 0 |
| | 48 | 3,32±0,11 | $1,\!82.10^{10}\!\pm\!9,\!37.10^8$ | 0,29±0,29 | $0,01{\pm}0,01$ | 3,31±0,11 | 0 |
| | 72 | 3,41±0,16 | $1,70.10^{10} \pm 1,98.10^{9}$ | $0,28\pm0,27$ | 0,01±0,01 | 3,40±0,15 | 0 |
| LFM1128 | | | | | | | |
| | 0 | 3,91±0,61 | $1,75.10^{10}\pm 3,59.10^{9}$ | 36,83±4,80 | 1,44±0,41 | $1,92{\pm}0,80$ | 0 |
| | 3 | 3,88±0,53 | $4,03.10^{10}\pm 2,69.10^{8}$ | 21,54±5,18 | 0,83±0,23 | 3,01±0,30 | 0 |
| | 6 | 3,67±0,64 | $5,53.10^{10}\pm 2,17.10^{9}$ | $5,00\pm 3,51$ | 0,18±0,09 | 3,47±0,47 | 0 |
| | 24 | 3,21±0,55 | $1,74.10^{10}\pm 1,77.10^{9}$ | 0,11±0,16 | 0,01±0,01 | 3,20±0,54 | 0 |
| | 48 | 3,17±0,45 | $1,09.10^{10}\pm 2,90.10^{8}$ | 0 | 0 | 3,17±0,45 | 0 |
| | 72 | 3,37±0,38 | $1,11.10^{10}\pm 5,66.10^{8}$ | 0 | 0 | 3,37±0,38 | 0 |

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | P3HF | 3 | MS | 3HB |
|----------|-------|---------------|--------------------------------|------------|---------------------|-------------------|-------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual (g/L) | (g/L) |
| LFM280 | | | | | | | |
| | 0 | 0,95±0,21 | $1,73.10^{10}\pm1,02.10^{7}$ | 21,42±5,48 | $0,20\pm0,10$ | $0,75\pm0,11$ | 0 |
| | 3 | $1,03\pm0,14$ | $8,94.10^{10} \pm 3,83.10^{7}$ | 20,89±4,65 | 0,21±0,14 | 0,81±0,16 | 0 |
| | 6 | 1,13±0,13 | $7,80.10^{10}\pm 2,73.10^{7}$ | 21,74±5,85 | 0,24±0,12 | 0,88±0,20 | 0 |
| | 24 | $1,08\pm0,21$ | $6,87.10^{10}\pm 2,02.10^{7}$ | 23,31±7,93 | $0,25\pm0,07$ | 0,83±0,28 | 0 |
| | 48 | 0,98±0,13 | $6,95.10^{10} \pm 3,92.10^{7}$ | 21,63±4,94 | 0,21±0,04 | $0,76\pm0,12$ | 0 |
| | 72 | $1,06\pm0,18$ | $6,20.10^9 \pm 7,92.10^7$ | 23,05±7,12 | 0,24±0,00 | 0,82±0,16 | 0 |
| CABpBBR2 | | | | | | | |
| | 0 | 1,24±0,25 | $1,04.10^9 \pm 2,12.10^7$ | 32,74±1,55 | 0,40±0,19 | 0,83±0,25 | 0 |
| | 3 | 1,31±0,04 | $3,00.10^8 \pm 9,86.10^7$ | 33,45±1,59 | $0,44\pm0,04$ | $0,87{\pm}0,04$ | 0 |
| | 6 | 1,31±0,02 | $2,27.10^8 \pm 6,91.10^7$ | 33,49±1,99 | 0,44±0,02 | $0,87{\pm}0,02$ | 0 |
| | 24 | $1,23\pm0,02$ | $2,78.10^8 \pm 2,18.10^7$ | 35,13±3,71 | 0,43±0,02 | $0,80\pm0,02$ | 0 |
| | 48 | $1,24\pm0,00$ | $3,06.10^8 \pm 2,35.10^7$ | 35,40±2,83 | $0,44\pm0,01$ | $0,80{\pm}0,00$ | 0 |
| | 72 | $1,04\pm0,00$ | $3,10.10^8 \pm 8,94.10^7$ | 33,54±0,51 | 0,35±0,16 | 0,69±0,00 | 0 |
| CABpBBR5 | | | | | | | |
| | 0 | 0,95±0,14 | $1,52.10^9 \pm 5,96.10^7$ | 24,63±5,94 | 0,23±0,02 | 0,71±0,01 | 0 |
| | 3 | 1,01±0,03 | $8,20.10^8 \pm 5,55.10^7$ | 23,30±5,29 | $0,24\pm0,09$ | $0,78\pm0,01$ | 0 |
| | 6 | $1,01\pm0,06$ | $8,12.10^8 \pm 2,58.10^8$ | 22,77±3,00 | 0,23±0,02 | $0,78{\pm}0,02$ | 0 |
| | 24 | 0,96±0,09 | $7,78.10^8 \pm 1,95.10^8$ | 24,59±3,25 | 0,23±0,06 | $0,72\pm0,01$ | 0 |
| | 48 | $0,76\pm0,34$ | $7,42.10^8 \pm 4,45.10^7$ | 22.77±1,51 | 0,18±0,04 | 0,61±0,01 | 0 |
| | 72 | 1,09±0,33 | $5,58.10^9 \pm 9,68.10^7$ | 25,13±4,39 | 0,27±0,01 | 0,82±0,01 | 0 |
| CABpBBR2 | | | | | | | |
| pBBR5 | 0 | $1,25\pm0,01$ | $1,80.10^9 \pm 3,24.10^8$ | 32,41±1,09 | 0,40±0,01 | $0,84{\pm}0,01$ | 0 |
| | 3 | $1,27\pm0,06$ | $3,19.10^8 \pm 2,12.10^8$ | 35,44±0,51 | $0,\!45{\pm}0,\!07$ | $0,82\pm0,07$ | 0 |
| | 6 | 1,31±0,02 | $3,53.10^8 \pm 2,08.10^8$ | 38,22±1,96 | 0,50±0,02 | 0,81±0,02 | 0 |
| | 24 | 1,24±0,03 | $2,42.10^8 \pm 1,01.10^8$ | 36,84±1,83 | 0,45±0,03 | 0,78±0,03 | 0 |
| | 48 | 1,34±0,19 | $2,39.10^8 \pm 5,41.10^7$ | 35,45±1,45 | 0,47±0,20 | 0,87±0,19 | 0 |
| | 72 | $1,18\pm0,08$ | $3,31.10^8 \pm 9,18.10^7$ | 37,28±1,91 | $0,44{\pm}0,08$ | $0,74{\pm}0,08$ | 0 |

Cinética de mobilização de linhagens controle de E. coli.

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | P3H | В | MS | 3HB |
|----------|-------|---------------|---------------------------|-------------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual (g/L) | (g/L) |
| CABpBBR2 | | | | | | | |
| | 0 | 2,64±0,18 | $1,08.10^9 \pm 2,34.10^7$ | 28,78±8,31 | $0,77{\pm}0,26$ | $1,87\pm0,11$ | 0 |
| | 3 | 2,71±0,18 | $3,20.10^8 \pm 6,86.10^7$ | 28,14±9,19 | $0,77{\pm}0,28$ | 1,93±0,16 | 0 |
| | 6 | 2,87±0,16 | $2,68.10^8 \pm 5,31.10^7$ | 28,50±7,25 | 0,82±0,22 | 2,05±0,20 | 0 |
| | 24 | 2,75±0,18 | $2,55.10^8 \pm 2,98.10^7$ | 27,61±1,76 | 0,73±0,33 | 2,11±0,39 | 0 |
| | 48 | 2,73±0,18 | 2,38.1081,35.107 | 29,51±7,25 | 0,81±0,23 | 1,92±0,12 | 0 |
| | 72 | 2,75±0,18 | $2,80.10^8 \pm 9,54.10^7$ | 28,79±7,06 | $0,79{\pm}0,22$ | 1,83±0,16 | 0 |
| LFM1134 | | | | | | | |
| | 0 | $1,70\pm0,10$ | $1,23.10^9 \pm 3,02.10^7$ | 27,50±11,22 | 0,47±0,21 | 1,23±0,17 | 0,006±0,002 |
| | 3 | $1,71\pm0,14$ | $4,88.10^8 \pm 2,83.10^7$ | 26,73±10,64 | $0,46\pm0,22$ | 1,24±0,12 | 0,012±0,003 |
| | 6 | $1,78\pm0,11$ | $3,11.10^8 \pm 4,73.10^7$ | 26,87±9,80 | $0,\!48{\pm}0,\!20$ | 1,29±0,13 | $0,014{\pm}0,002$ |
| | 24 | 1,63±0,11 | $2,78.10^8 \pm 1,02.10^7$ | 28,61±10,76 | $0,47\pm0,20$ | 1,16±0,15 | $0,016\pm 0,004$ |
| | 48 | $1,75\pm0,18$ | $2,13.18^9 \pm 5,92.10^7$ | 28,90±13,07 | 0,51±0,27 | 1,24±0,21 | 0,015±0,001 |
| | 72 | $1,70\pm0,19$ | $3,10.10^8 \pm 3,92.10^7$ | 28,04±10,00 | 0,49±0,22 | 1,21±0,06 | 0,018±0,006 |

Cinética de mobilização de linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando o gene *phaZa1* de *R. eutropha*.

| Cinética de mobilização | de linhagens | recombinantes | de <i>E</i> . | coli | abrigando | o gene | lonA | de <i>R</i> . |
|-------------------------|--------------|---------------|---------------|------|-----------|--------|------|---------------|
| eutropha | | | | | | | | |

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | P3H | В | MS | 3HB |
|----------|-------|-----------|---------------------------|------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual (g/L) | (g/L) |
| CABpBBR5 | | | | | | | |
| | 0 | 1,96±0,11 | $2,28.10^9 \pm 2,40.10^8$ | 34,17±4,04 | $0,67{\pm}0,10$ | $1,29\pm0,09$ | 0 |
| | 3 | 2,15±0,23 | $8,01.10^8 \pm 4,65.10^8$ | 33,19±3,39 | $0,71\pm0,05$ | $1,44\pm0,22$ | 0 |
| | 6 | 2,14±0,21 | $7,08.10^8 \pm 3,85.10^8$ | 33,68±3,06 | $0,72\pm0,03$ | $1,42\pm0,21$ | 0 |
| | 24 | 1,89±0,53 | $6,76.10^8 \pm 5,01.10^8$ | 33,27±2,22 | 0,63±0,16 | 1,26±0,38 | 0 |
| | 48 | 2,78±0,32 | $5,63.10^8 \pm 2,5310^8$ | 33,05±3,77 | 0,70±0,16 | 1,41±0,11 | 0 |
| | 72 | 2,10±0,32 | $7,14.10^8 \pm 2,21.10^8$ | 35,13±2,39 | $0,74\pm0,10$ | $1,37\pm0,24$ | 0 |
| LFM1133 | | | | | | | |
| | 0 | 3,06±0,89 | $9,77.10^8 \pm 3,06.10^8$ | 68,19±1,86 | 2,09±0,59 | 1,23±0,17 | 0,008±0,003 |
| | 3 | 3,71±0,15 | $5,63.10^8 \pm 4,63.10^8$ | 69,74±5,27 | 2,59±0,09 | 1,24±0,12 | $0,009\pm0,002$ |
| | 6 | 3,76±0,04 | $5,24.10^8 \pm 4,04.10^7$ | 73,11±2,89 | 2,74±0,13 | 1,29±0,13 | 0,012±0,006 |
| | 24 | 3,82±0,15 | $3,25.10^8 \pm 3,17.10^7$ | 68,91±5,82 | 2,63±0,20 | 1,16±0,15 | 0,011±0,003 |
| | 48 | 3,81±0,22 | $1,16.18^9 \pm 1,41.10^6$ | 74,27±3,20 | 2,83±0,11 | 1,24±0,21 | 0,012±0,001 |
| | 72 | 3,67±0,03 | $1,38.10^8 \pm 4,41.10^7$ | 74,25±4,33 | 2,72±0,14 | 1,21±0,06 | 0,014±0,003 |

| Linhagem | Tempo | MSC | Viabilidade Celular | elular P3HB | | MS | 3HB |
|------------|-------|-----------------|--|-------------|-----------------|----------------|-------------------|
| | (h) | (g/L) | (UFC/mL) | %MSC | g/L | Residual (g/L) | (g/L) |
| CABpBBR2 | | | | | | | |
| pBBR5 | 0 | 2,09±0,82 | $2,00.10^9 \pm 3,24.10^8$ | 31,77±4,68 | 0,65±0,35 | $1,42\pm0,81$ | 0 |
| | 3 | 2,01±0,97 | $3,49.10^8 \pm 2,12.10^8$ | 33,57±4,83 | 0,66±0,41 | 1,36±0,96 | 0 |
| | 6 | $1,78{\pm}1,05$ | $3,93.10^8 \pm 2,08.10^8$ | 34,26±7,04 | 0,64±0,36 | $1,35\pm1,02$ | 0 |
| | 24 | 1,91±0,77 | $2,72.10^8 \pm 1,01.10^8$ | 34,13±5,76 | 0,66±0,29 | 1,33±0,78 | 0 |
| | 48 | 1,91±0,92 | $2,35.10^8 \pm 5,41.10^7$ | 33,68±6,03 | 0,67±0,38 | 1,37±0,89 | 0 |
| | 72 | 2,02±0,80 | $3,25.10^8 \pm 9,18.10^7$ | 33,98±4,25 | 0,64±0,29 | 1,33±0,83 | 0 |
| LFM1135 I | | | | | | | |
| | 0 | 2,94±1,90 | $6,13.10^7 \pm 2,99.10^7$ | 22,16±10,54 | 0,54±0,26 | $1,79\pm0,25$ | 0,013±0,007 |
| | 3 | 2,40±0,95 | $4,60.10^7 \pm 1,41.10^7$ | 21,71±4,78 | $0,47{\pm}0,27$ | $1,58\pm0,04$ | $0,014{\pm}0,005$ |
| | 6 | 1,85±0,23 | $3.16.10^7 \pm 1,51.10^7$ | 19,46±6,24 | 0,34±0,19 | 1,34±0,02 | 0,012±0,010 |
| | 24 | 2,28±0,51 | $4,66.10^7 \pm 1,53.10^7$ | 17,39±6,11 | $0,34{\pm}0,14$ | $1,57\pm0,02$ | 0,018±0,010 |
| | 48 | 2,18±0,38 | $3,31.10^7 \pm 1,69.10^7$ | 17,23±7,61 | 0,34±0,17 | $1,55\pm0,00$ | 0,018±0,015 |
| | 72 | 3,22±0,24 | $1,59.10^7 \pm 4,57.10^6$ | 15,08±6,33 | 0,45±0,22 | 2,41±0,00 | $0,017\pm0,008$ |
| LFM1135 II | | | | | | | |
| | 0 | 3,68±1,11 | $3,09.10^8 \pm 3,56.10^8$ | 41,62±0,91 | 1,62±0,66 | 2,15±0,23 | 0,020±0,007 |
| | 3 | 3,64±0,78 | $2,50.10^8 \pm 1,20.10^8$ | 33,30±2,65 | 1,17±0,39 | 2,28±0,27 | $0,016\pm 0,005$ |
| | 6 | 3,48±0,93 | $1,32.10^8 \pm 5,82.10^7$ | 31,55±5,59 | 0,97±0,28 | 2,50±0,64 | $0,015\pm0,006$ |
| | 24 | 3,39±1,08 | $2,14.10^8 \pm 1,24.10^8$ | 23,13±3,83 | $0,71{\pm}0,07$ | 2,50±0,85 | 0,011±0,004 |
| | 48 | 3,80±2,06 | 9,08.10 ⁷ ±5,88.10 ⁷ | 23,39±2,50 | $0,72\pm0,12$ | 2,66±1,55 | 0,013±0,000 |
| | 72 | 3,61±0,59 | $1,32.10^8 \pm 9,53.10^7$ | 18,95±4,66 | 0,64±0,15 | 2,83±0,62 | 0,015±0,005 |
| LFM1136 | | | | | | | |
| | 0 | 2,36±0,13 | $3,19.10^8 \pm 8,39.10^7$ | 36,21±0,74 | $0,85\pm0,06$ | 1,51±0,06 | 0,003±0,001 |
| | 3 | 2,16±0,07 | $3,17.10^8 \pm 9,07.10^7$ | 27,99±0,52 | 0,60±0,03 | $1,56\pm0,04$ | $0,009\pm0,000$ |
| | 6 | 2,10±0,16 | $1,20.10^8 \pm 5,44.10^7$ | 25,51±0,56 | 0,54±0,03 | 1,56±0,13 | 0,013±0,002 |
| | 24 | 1,89±0,23 | $1,91.10^8 \pm 1,49.10^8$ | 22,87±1,39 | 0,43±0,03 | 1,46±0,20 | 0,016±0,003 |
| | 48 | 1,92±0,04 | $1,22.18^8 \pm 1,01.10^7$ | 19,48±0,16 | 0,39±0,04 | 1,53±0,01 | 0,017±0,001 |
| | 72 | 1,82±0,01 | $1,28.10^8 \pm 3,09.10^7$ | 15,08±3,58 | 0,33±0,01 | 1,49±0,00 | 0,018±0,002 |

Cinética de mobilização de linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando simultaneamente o gene *phaZa1* e *lonA* de *R. eutropha*.