ROGÉRIO DE SOUSA GOMES

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DEFICIENTES NO ACÚMULO DE
PHA E CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES
PARA O CONTROLE DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA**

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

**São Paulo
2009**

ROGÉRIO DE SOUSA GOMES

**OBTENÇÃO DE MUTANTES DEFICIENTES NO ACÚMULO DE
PHA E CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES
PARA O CONTROLE DA COMPOSIÇÃO MONOMÉRICA**

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

**Área de concentração:
Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera
Gomez**

**São Paulo
2009**

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

© reprodução total

Gomes, Rogério de Sousa.

Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica. / Rogério de Sousa Gomes. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Jose Gregorio Cabrera Gomez.

Tese (Doutorado) – 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: Polímeros biodegradáveis.

Versão do título para o inglês: Mutants deficient on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation and construction of recombinants to control monomer composition on PHA.

Descritores: 1. Polímeros biodegradáveis 2. Polihidroxialcanoatos 3. *Pseudomonas* 4. PHA sintase 5. 3-Cetoacil-CoA redutase 6. Transposon mini-Tn5 I. Gomez, José Gregório Cabrera II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0205/2009

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

Candidato: Rogério de Sousa Gomes

Título da Tese: Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica

Orientador: José Gregório Cabrera Gomez

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../..... considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

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

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 289, referente ao projeto intitulado: *“Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica”* sob a responsabilidade de **Rogério de Sousa Gomes**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

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

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

**A todos que de alguma forma contribuíram
para a realização deste trabalho.**

AGRADECIMENTOS

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

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

À Dra. Marilda Keiko Taciro por todo o apoio durante a realização de ensaios no Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo.

Aos meus valiosos amigos que tanto me ajudaram durante este longo caminho: Juliana, Marco Antonio, Soninha. E ao final do trabalho ainda reforçaram a revisão deste.

À amiga Sayuri, pela paciência, pela ajuda, pelas conversas e pelo carinho, muito obrigado.

Aos companheiros de laboratório, técnicos, auxiliares, professores e todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, familiares e amigos pelos esforços realizados para minha formação.

À nova família que me deu suporte em momentos difíceis, principalmente. Obrigado Dna Ana.

À Damaris Miyashiro, pelo carinho, pelos sorrisos e todo amor dedicado. Obrigado

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

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

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

RESUMO

GOMES, R. S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica.** 100 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Pseudomonas putida IPT046 produz eficientemente polihidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) a partir de carboidratos e óleos vegetais. Para avaliar o potencial bacteriano em acumular P3HB-co-3HA_{MCL}, com diferentes composições monoméricas, foram construídos recombinantes pela introdução de genes de biossíntese de P3HB (poli-3-hidroxibutirato) de *Ralstonia eutropha* em *P. putida* IPT046 selvagem ou seus mutantes afetados no acúmulo de PHA_{MCL}. A expressão de *phaC*, codificador da PHA sintase, conferiu aos recombinantes a capacidade de acumular PHA com alto teor de 3HB, indicando que *P. putida* apresenta atividades de β -cetotiolase e 3-cetoacil-CoA redutase suficientes para gerar monômeros de 3HB. A expressão do gene *phaB* em *P. putida* IPT046 e no mutante *pha* IPT 463 mostrou que o produto deste gene (3-cetoacil-CoA redutase) supre monômeros 3HB e 3-hidroxihexanoato (3HHx), canalizados a partir da β -oxidação, para a PHA sintase. Quando o gene *phaC* de *R. eutropha* foi expresso no mutante IPT 461, provavelmente afetado na PHA sintase, cerca de 30% de P3HB-co-3HHx-co-3HO foram acumulados a partir de carboidratos, mostrando que *P. putida* apresenta vias metabólicas eficientes para suprir monômeros 3HA_{MCL}, que são incorporados ao PHA mesmo pela PHA sintase de *R. eutropha*. Mutantes deficientes na biossíntese de PHA a partir de glicose ou glicose e octanoato foram gerados usando o transposon mini-Tn5. Uma vez que mutantes exclusivamente deficientes no acúmulo de PHA a partir de octanoato não foram detectados, sugere-se que diferentes produtos gênicos devam contribuir para o direcionamento de intermediários de β -oxidação para a biossíntese de PHA.

Palavras-chave: Polímeros biodegradáveis. Polihidroxialcanoatos. *Pseudomonas*. PHA sintase. 3-cetoacil-CoA redutase. Transposon mini-Tn5.

ABSTRACT

GOMES, R.S. **Mutants deficient on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation and construction of recombinants to control monomer composition on PHA.** 100 p. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Pseudomonas putida IPT 046 produces efficiently medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (PHA_{MCL}) from carbohydrates and plant oils. To evaluate the potential of bacteria in accumulating P3HB-co-3HA_{MCL} with different monomer composition, recombinants harboring the P3HB (polyhydroxybutyrate) biosynthesis genes from *Ralstonia eutropha* were constructed using *P. putida* IPT046 wild type and mutants unable to accumulate PHA_{MCL}. The expression of the *phaC* gene, encoding PHA synthase, conferred the ability to synthesize a PHA with high 3HB content, indicating that *P. putida* presents enough β -ketothiolase and 3-ketoacyl-CoA reductase activities to generate 3HB monomers. Expression of the *phaB* gene on *P. putida* wild type and IPT 463 *pha* mutant showed that the product of this gene (3-ketoacyl-CoA reductase) supplies 3HB and 3-hydroxyhexanoate (3HHx) monomers, channeled from the β -oxidation of fatty acids, to the PHA synthase. When the *R. eutropha phaC* gene was expressed on IPT 461, a mutant possibly affected in the PHA synthase, approximately 30% of P3HB-co-3HHx-co-3HO were accumulated from carbohydrates, showing that *P. putida* presents metabolic pathways efficient to supply 3HA_{MCL} monomers, which are incorporated into PHA even by the PHA synthase of *R. eutropha*. Mutants deficient on the biosynthesis of PHA from glucose or glucose and octanoate were produced using the mini-*Tn5* transposon. Since mutants deficient exclusively on the PHA biosynthesis from octanoate were not detected, it is suggested that different gene products may contribute to the channeling of metabolic intermediates from the β -oxidation to the PHA biosynthesis.

Keywords: Biodegradable polymers. Polyhydroxyalkanoates. *Pseudomonas*. PHA synthase. 3-Ketoacyl-CoA reductase. mini-*Tn5* transposon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.	Estrutura genérica de polihidroxialcanoatos	17
Figura 2.2	Vias metabólicas de biossíntese de PHA.	19
Figura 5.1	Plasmídios pJM9131 (KIDWELL et al., 1995) e pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995).	42
Figura 5.2.	Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; A. 1) DNA λ digerido com <i>Hind</i> III, Invitrogen; 2) fragmento contendo o operon <i>phaCAB</i> digerido com <i>Hind</i> III; 3) pJM9131 digerido com <i>Hind</i> III; B. 1) DNA λ digerido com <i>Hind</i> III, Invitrogen; 2) fragmento contendo o operon <i>phaCB</i> digerido com <i>Hind</i> III; 3) pJM9131 Δ <i>phaA</i> digerido com <i>Hind</i> III; C. 1) DNA λ digerido com <i>Hind</i> III, Invitrogen; 2) pJM9131 Δ <i>phaCA</i> digerido com <i>Hind</i> III.	43
Figura 5.3	Perfis de migração em gel de agarose 0,8% ; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> digerido com <i>Hind</i> III; 3) pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i> digerido com <i>Hind</i> III; 4) pBBR1MCS-2:: <i>phaB</i> digerido com <i>Hind</i> III; 5) pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> digerido com <i>Eco</i> RI; 6) pBBR1MCS-2 digerido com <i>Hind</i> III.	45
Figura 5.4	Perfis de migração em gel de agarose 0,8 %; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) amplicon contendo o gene <i>phaC</i> ; 3) o pBBR1MCS-2 digerido com <i>Eco</i> RI; 4) pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> digerido com <i>Mfe</i> I; 5) pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> digerido com <i>Eco</i> RI ; 6) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas	46
Figura 5.5	Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA λ digerido com <i>Hind</i> III, Invitrogen; 2) pGEM [®] -T Easy:: <i>rhlG</i> digerido sequencialmente com <i>Mfe</i> I e <i>Eco</i> RI; 3) fragmento contendo o gene <i>rhlG</i> purificado a partir de gel de agarose 0,8 %.	48
Figura 5.6	Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; A. 1) DNA λ digerido com <i>Hind</i> III, Invitrogen; 2) pBBR1MCS-2:: <i>rhlG</i> digerido <i>Eco</i> RI; 3) pBBR1MCS-2:: <i>rhlG</i> _{Pa} digerido <i>Bam</i> HI; B. 1) pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i> - <i>rhlG'</i> digerido com <i>Bam</i> HI; 2) <i>phaC'</i> - <i>rhlG'</i> digerido com <i>Eco</i> RI; 3 e 4) pBBR1MCS-2 digerido com <i>Eco</i> RI.	48
Figura 5.7.	Perfis de migração em gel de agarose 0,8 %; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2 e 3) pBBR1MCS-2 digerido com <i>Eco</i> RV; 4) pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> digerido com <i>Eco</i> RV; 5) pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i> digerido com <i>Eco</i> RV ; 6) pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> digerido com <i>Eco</i> RV; 7) pBBR1MCS-2:: <i>phaB</i> digerido com <i>Eco</i> RV	50
Figura 5.8.	Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2 e 3) pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i> digerido com <i>Eco</i> RV; 4) pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i> digerido com <i>Eco</i> RV.	51

Figura 5.9.	Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	54
Figura 5.10.	Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	56
Figura 5.11.	Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	59
Figura 5.12.	Fração molar de 3HD em PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> 046 ou IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	60
Figura 5.13.	Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	63
Figura 5.14.	Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	64
Figura 5.15	Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R.eutropha</i> .	65
Figura 5.16.	Teor de 3HB no PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	66
Figura 5.17.	Teor de 3HB no PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	67
Figura 5.18.	Teor de 3HB no PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	67
Figura. 5.19.	Espectro de massas relativos a propil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos. A. 3-hidroxi-butiril-propil-éster. B. 3-hidroxi-hexanoil-propil-éster. C. 3-hidroxi-octanoil-propil-éster.	70
Figura 5.20	Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.	75
Figura 5.21	Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.	75

- Figura 5.22.** Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases. 77
- Figura 5.23.** Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase. 79
- Figura 5.24.** Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase. 79
- Figura 5.25.** Teor de 3HB no PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 (esquerda) ou IPT463 (direita) abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase. 80
- Figura 5.26.** Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase. 81
- Figura 5.27.** Teor de 3HB no PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase. 81
- Figura 5.28.** Mutante LFM 824 quando cultivado em MM contendo glicose (a esquerda) e MM contendo octanoato (a direita). 83
- Figura 5.29.** Mutante LFM 814 quando cultivado em MM contendo glicose (a esquerda) e MM contendo octanoato (a direita). 83

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros	21
Tabela 4.1	Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho	32
Tabela 4.2	Plasmídeo utilizados neste trabalho	33
Tabela 4.3	Concentrações utilizadas de antibióticos	33
Tabela 4.4	Oligonucleotídeos iniciadores de PCR.	39
Tabela 4.5	Condições de amplificação dos fragmentos de DNA.	37
Tabela 5.1	Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	53
Tabela 5.2	Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	55
Tabela 5.3.	Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	58
Tabela 5.4.	Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	62
Tabela 5.5	Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	63
Tabela 5.6	Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de <i>R. eutropha</i> .	64
Tabela 5.7	Composição de PHA produzido por linhagem recombinante de <i>P. putida</i> IPT461 a partir de carboidratos. Análise de células liofilizadas e polímero purificado.	68
Tabela 5.8	Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 ou IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.	74
Tabela 5.9	Alteração na composição de PHA produzido por <i>P. putida</i> IPT046 devido a ação do produto do gene <i>phaB</i> .	76
Tabela 5.10	Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases	76
Tabela 5.11	Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 ou IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.	78
Tabela 5.12	Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de <i>P. putida</i> IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.	80
Tabela 5.13	Produção de PHA por <i>P. putida</i> IPT046 ou seus mutantes obtidos utilizando o transposono mini-Tn5.	84

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 O QUE SÃO POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)?	17
2.2 PHA COMO MATERIAIS	20
2.3 PRODUÇÃO DE P3HB-CO-HA _{MCL} .	21
2.3.1 LINHAGENS NATURAIS	22
2.3.2. LINHAGENS RECOMBINANTES	24
2.3.2.1 A ESPECIFICIDADE DA PHA SINTASE	25
2.3.2.2 ENZIMAS SUPRIDORAS DE MONÔMEROS	28
3 OBJETIVOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDIOS	32
4.2 ANTIBIÓTICOS	33
4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	34
4.4 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E SOLUÇÕES ESTOQUE	34
4.5 MANIPULAÇÕES COM DNA	36
4.5.1 ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO	36
4.5.2 ISOLAMENTO E ANÁLISE DE DNA PLASMIDIAL	36
4.5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO OS GENES <i>PHAC_{RE}</i> E <i>RHLG_{PA}</i>	37
4.5.3.1 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS EM VETOR DE EXPRESSÃO	38
4.5.4 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDIOS POR TRANSFORMAÇÃO	38
4.6 OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE <i>P. PUTIDA</i>	39
4.7 PRODUÇÃO DE PHA	39
4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.9 EXTRAÇÃO DE PHA	41
4.10 CG-MS	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDIOS CONTENDO GENES DE BIOSÍNTESE DE P3HB DE <i>RALSTONIA EUTROPHA</i>	42
5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA POR LINHAGENS RECOMBINANTES	52

5.2.1 LINHAGENS RECOMBINANTES PRODUTORAS DE MISTURAS POLIMÉRICAS	52
5.2.2 LINHAGENS RECOMBINANTES POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE P3HB-<i>co</i>-3HA_{MCL}	61
5.2.3 LINHAGENS RECOMBINANTES EXPRESSANDO GENES QUE DIRECIONAM INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO CELULAR PARA BIOSÍNTESE DE PHA	72
5.3. Avaliação de mutantes de <i>P. putida</i> IPT 046 deficientes na biossíntese de PHA	82
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

Polihidroxialcanoatos (PHA) tem despertado interesse, pois apresentam propriedades termoplásticas e elastoméricas e podem ser sintetizados a partir de matérias-primas renováveis. Atualmente, diferentes PHA podem ser sintetizados apresentando propriedades térmicas e mecânicas diferentes, adequadas para diversas aplicações. Em especial, tem despertado interesse a produção de polímeros formados principalmente por ácido 3-hidroxiбутírico (3HB) e contendo frações molares menores (<20 mol%) de 3-hidroxialcanoatos de cadeia média (HA_{MCL} - C6 a C12), pois apresentam propriedades muito semelhantes ao polietileno de baixa densidade. Esses polímeros podem ser biossintetizados por linhagens bacterianas naturais e recombinantes.

Diversas espécies de *Pseudomonas* são capazes de produzir PHA contendo essencialmente monômeros HA_{MCL}, seja a partir de carboidratos, seja a partir de ácidos graxos. Assim, essas bactérias apresentam vias metabólicas que eficientemente geram monômeros HA_{MCL}.

O objetivo deste trabalho é avaliar o potencial de *Pseudomonas putida* IPT 046 ou seus mutantes como linhagens hospedeiras para a expressão de genes de biossíntese de PHA e produção desses polímeros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O QUE SÃO POLIHIDROXIALCANOATOS (PHA)?

Poli-hidroxi-álcanoatos (PHA) são poliésteres acumulados por bactérias na forma de grânulos intracelulares (ANDERSON e DAWES, 1990). Os monômeros que constituem PHA classicamente têm sido divididos em dois grandes grupos: monômeros de cadeia de carbonos curta (short-chain-length - HA_{SCL}), contendo de 3 a 5 átomos de carbono na cadeia principal e monômeros de cadeia de carbonos média (medium-chain-length - HA_{MCL}), contendo de 6 a 14 átomos de carbono na cadeia principal (Figura 1).

Figura 2.1. Estrutura genérica de polihidroxiálcanoatos.

Poli-3-hidroxibutirato (P3HB), produzido por uma linhagem de *Bacillus*, foi o primeiro PHA descoberto (LEMOIGNE, 1926). Apenas ao final da década de 1950, é que a função destes grânulos como reserva de carbono e energia passa a ser aceita e, também neste período, descobre-se que a ocorrência destes biopolímeros é algo natural entre a maioria das linhagens bacterianas Gram-negativas (LENZ e MARCHESSAULT, 2005). Por volta de 1974, Wallen e Rohwedder, contrariando o que se pensava sobre estes poliésteres bacterianos serem formados apenas por monômeros 3HB, identificaram a presença de outros monômeros diferentes do 3HB em amostras de lodo ativado, dentre os quais 3-hidroxivalerato (3HV) e 3-hidroxihexanoato (3HHx). Anos mais tarde, é demonstrada a presença de unidades 3HB, 3-hidroxieptanoato

(3HHp) (FINDLAY e WHITE, 1983) e 3-hidroxiocetanoato (3HO) no polímero extraído de *B. megaterium* (SUDESH et al., 2000).

Durante a década de 80, um número crescente de outros constituintes HA_{SCL} foi identificado como co-monômeros de PHA que continham ainda o 3HB como principal unidade monomérica (DOI, 1990; STEINBÜCHEL e SCHLEGEL, 1991). Nesse mesmo período, foi demonstrada a produção de PHA contendo HA_{MCL} por *Pseudomonas oleovorans* e outras *Pseudomonas* (DE SMET et al., 1983; BRANDL et al., 1988; LAGEVEEN et al., 1988; HUISMAN et al., 1989). Assim, PHA eram divididos em dois grandes grupos: PHA_{SCL}, produzidos por bactérias pertencentes a diversos gêneros bacterianos, sendo *Ralstonia eutropha* (na época denominada *Alcaligenes eutrophus*) a espécie melhor caracterizada, e PHA_{MCL} produzidos por diferentes espécies de *Pseudomonas*. Além disso, acreditava-se que as PHA sintases (enzimas responsáveis pela polimerização dos monômeros ao PHA) de *R. eutropha* e *Pseudomonas* apresentariam especificidades por monômeros diferentes e que não se sobreporiam.

Atualmente, PHA sintases são divididas em quatro grupos com base na estrutura protéica e especificidade pelo substrato. PHA sintases dos tipos I e II são compostas por uma subunidade protéica (codificadas pelo gene *phaC*) e apresentam, respectivamente, especificidade maior por HA_{SCL} e HA_{MCL}. PHA sintases dos tipos III e IV são formadas por duas subunidades protéicas diferentes (PhaC e PhaE ou PhaC e PhaR) e apresentam especificidade por HA_{SCL} (REHM, 2003).

Para a síntese de P3HB a partir de acetil-CoA, inicialmente duas moléculas de acetil-CoA são condensadas para formar acetoacetil-CoA, pela ação de uma β -cetotiolase (PhaA, BktB) (SLATER et al., 1998); em seguida, acetoacetil-CoA é reduzido a (*R*)-3-hidroxiacil-CoA pela ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) e finalmente (*R*)-3-hidroxiacil-CoA é incorporado a uma cadeia polimérica pela ação de uma PHA sintase (PhaC), ocorrendo a liberação de Coenzima A. A incorporação de outros monômeros HA_{SCL} é obtida geralmente com o fornecimento de precursores estruturalmente relacionados a esses monômeros (STEINBÜCHEL, 1991).

A síntese de PHA_{MCL} tanto pode ocorrer a partir de fontes de carbono estruturalmente relacionadas aos monômeros (ácidos graxos, álcoois e alcanos) como a partir de outras fontes de carbono não relacionadas estruturalmente (carboidratos, por exemplo). No primeiro caso, a fonte de carbono é metabolizada através da β -oxidação

et al., 1989; LIEBERGESELL et al., 1993; ABE et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1994), demonstrando que as PHA sintases dessas bactérias apresentariam sobreposição na especificidade por monômeros, embora claramente com preferência diferenciada por cada um deles. Devido ao interesse que esses PHA têm despertado, diversas linhagens recombinantes têm sido obtidas capazes de sintetizá-los.

2.2 PHA COMO MATERIAIS

Com base em características termoplásticas semelhantes às apresentadas pelo polipropileno, iniciou-se na década de 60, o primeiro empreendimento piloto para produção de P3HB pela empresa W.R. Grace (STEINBUCHER, 1991; HOLMES, 1985). Porém, dificuldades quanto à produção, purificação e características do próprio material levaram ao abandono do projeto, que foi retomado apenas anos mais tarde, no início da década de 1980, pela Imperial Chemical Industries – ICI, que iniciou de forma pioneira a produção de um copolímero de P3HB-*co*-3HV comercializado sob o nome de BIOPOLTM. A inserção de monômeros 3HV ao polímero permite modular suas propriedades térmicas e mecânicas, obtendo-se materiais com uma faixa mais ampla de aplicações (HOLMES, 1985). Um parâmetro que é melhorado nos copolímeros de 3HB e 3HV é o alongamento para ruptura. P3HB apresenta um valor de apenas 5%, ou seja, apresenta-se como um material duro e quebradiço. Com a incorporação de unidades 3HV esse valor pode ser aumentado até cerca de 50% (Tabela 1). A incorporação de outros HA_{SCL} como co-monômeros ao P3HB, tais como 4HB e 3HP, também têm se mostrado efetivos em promover mudanças nas propriedades do poliéster, permitindo ampliar as aplicações possíveis (FENG et al., 2002). Esses dois co-monômeros têm se mostrado mais efetivos em reduzir a cristalinidade do polímero quando comparado aos efeitos obtidos com a inserção de unidades 3HV (Tabela 2.1). Isso permite a obtenção de materiais mais flexíveis e resistentes.

PHA_{MCL} por outro lado são elastômeros com propriedades semelhantes à borracha (DE KONING et al., 1994), assim, seu espectro de aplicações é bastante diferente daquele proposto para P3HB e seus copolímeros.

Recentemente, copolímeros de P3HB-*co*-3HA_{MCL} contendo elevada fração de 3HB (>80 mol%) têm despertado grande interesse uma vez que apresentam

características mecânicas semelhantes ao polietileno de baixa densidade (MATSUSAKI et al., 2000; NODA et al., 2005) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Propriedades físicas de diferentes PHA e outros polímeros.

Polímero	T _m (°C)	T _g (°C)	Resistência Tensão (MPa)	Alongamento para Ruptura (%)	Cristalinidade (%)	Referência
P3HB	180	4	40	5	69	Sudesh et al., 2000
P3HB Alto peso molecular	185	4	43	5	60	Tsuge, 2002
P(3HB-co-20 mol% 3HV)	145	-1	20	50	45	Sudesh et al., 2000
P4HB	53	-51	50	1000		Martin e William, 2003
P(3HB-co-16mol% 4HB)	150	-7	26	444	45	Tsuge, 2002
P(3HB-co-11mol% 3HHx)	136	-1		400	36	Sudesh et al., 2000
P(3HB-co-6mol% 3HA*)	133	-8	17	680	45	Tsuge, 2002
P(3HO-co-12mol% 3HHx)	61	-35	9	380		Martin e William, 2003
Polipropileno	176	-10	38	400	50-70	Verlinden et al., 2007
Polietileno Baixa Densidade	130	-30	10	620	---	Sudesh et al., 2000

T_m – Temperatura de fusão; T_g – Temperatura de transição vítrea; Monômeros 3HA: 3HO (< 1mol%); 3HD (3 mol%); 3HDd (3 mol%); 3-hidroxi-cis-5-dodecanoato (< 1mol%).

2.3 PRODUÇÃO DE P3HB-CO-HA_{MCL}

P3HB-co-HA_{MCL} podem ser obtidos tanto a partir de linhagens naturais como de linhagens recombinantes. O objetivo em geral é obter um PHA contendo como principal monômero o 3HB (>80 mol%) e que 3HA_{MCL} representem componentes em menor quantidade (<20 mol%), uma vez que são esses polímeros que apresentam propriedades muito semelhantes ao polietileno de baixa densidade (MATSUSAKI et al., 2000; NODA et al., 2005). Em alguns trabalhos, também se preconiza a produção de P3HB-co-HA_{MCL} contendo frações HA_{MCL} muito pequenas (<2 mol%). Nesse caso, o argumento é que o interesse por P3HB reascendeu com o desenvolvimento de técnicas de processamento que permitem produzir fios e filmes resistentes desse homopolímero (IWATA, 2005) e a inserção de pequenas quantidades de HA_{MCL} teria o objetivo de

reduzir a temperatura de fusão do polímero aumentando a janela de processabilidade (NOMURA et al., 2008).

2.3.1 LINHAGENS NATURAIS

O primeiro relato da síntese de copolímeros contendo 3HB e 3HA_{MCL} em linhagens naturais (não recombinantes) foi apresentado por Brandl e colaboradores (1989), que detectaram o acúmulo de cerca de 10% da massa seca celular de PHA contendo 91,1 mol% de 3HB e 8,9 mol% de 3HHx a partir de ácido hexanóico por *Rhodospirillum rubrum*. Os autores apontaram que a variedade de monômeros diferentes no polímero demonstrava que o sistema de polimerização não se apresentava estritamente específico para HA_{SCL}.

Liebergesell e colaboradores (1991) demonstraram a produção de PHA contendo 3HB, 3HV e 3HHp como constituintes a partir de heptanoato por *Rhodocyclus gelatinosus*. Nesse mesmo trabalho, os autores também observaram a incorporação de pequenas quantidades de 3HHx e 3HO por diferentes linhagens de *Ralstonia eutropha* quando cultivadas com os ácidos hexanóico ou octanóico. A produção de P3HB-co-3HHx contendo 2,2 mol% de 3HHx por *R. eutropha* já havia sido detectada anteriormente (GROSS et al., 1989; ULMER et al., 1989).

A avaliação de várias bactérias isoladas a partir de amostras de solo ou lodo de esgoto com relação à capacidade de produção de PHA a partir de óleos vegetais ou ácidos graxos revelou um isolado identificado como *Aeromonas caviae* capaz de produzir P3HB-co-3HHx contendo entre 5 e 25 mol% de 3HHx (SHIOTANI e KOBAYASHI, 1993; SHIMAMURA et al., 1994; KOBAYASHI et al., 1994; DOI et al., 1995). A capacidade de produzir um PHA de composição similar também foi demonstrada para um isolado de *Aeromonas hydrophila* (LEE et al., 2000; CHEN et al., 2001). Em nosso laboratório, também foram obtidos recentemente seis isolados de *Aeromonas* capazes de produzir P3HB-co-3HHx a partir de óleo de soja (MATSUDA et al., 2008).

Caballero e colaboradores (1995) detectaram a produção de um copolímero contendo 3HB e pequena fração de 3HHx e/ou 3HO a partir dos ácidos hexanóico ou octanóico por *Comomonas testosteroni*, *Bacillus cereus* e um isolado não identificado.

Todos os relatos acima se referem a bactérias não recombinantes apresentando PHA sintases que naturalmente apresentam especificidade por HA_{SCL} e que conseguem incorporar monômeros HA_{MCL} utilizando fontes de carbono que funcionam como precursores desses monômeros (ácidos graxos ou óleos vegetais). Nesses casos, intermediários da β -oxidação de ácidos graxos são direcionados à biossíntese de PHA permitindo a incorporação de HA_{MCL}. Como mecanismo de aumentar o direcionamento de intermediários da β -oxidação para biossíntese de PHA, Green e colaboradores (2002) utilizaram um inibidor dessa via metabólica (ácido acrílico). Dessa forma, a fração molar de 3HHx atingiu quase 6 mol% e quantidades muito pequenas de 3HO (<0,1 mol%) também foram detectadas em *R. eutropha* cultivada em ácido octanóico.

Embora em princípio tenha sido proposto que as PHA sintases encontradas em linhagens de *Pseudomonas* (tipo II) não apresentariam especificidade por 3HB, um número crescente de relatos tem demonstrado essa capacidade.

Steinbüchel e Wiese (1992) isolaram uma *Pseudomonas* sp. GP4BH1 capaz de produzir um PHA contendo 3HB e 3HA_{MCL}. Entretanto, baseados na heterogeneidade visual e em análise por RNM os autores concluíram que se tratava de uma mistura de dois poliésteres e não de um copolímero propriamente.

Pseudomonas sp. 61-3 foi isolada de solo e apresentou um comportamento semelhante à linhagem de *Pseudomonas* sp. GP4BH1, entretanto, a separação do PHA em frações solúvel e insolúvel em acetona revelou a produção de dois poliésteres diferentes: um contendo essencialmente 3HB e outro contendo 3HB e 3HA_{MCL} (ABE et al., 1994). A composição molar da fração polimérica solúvel em acetona variava de acordo com a fonte de carbono suprida. A partir de carboidratos ou ácido glicônico, a fração molar de 3HB foi de aproximadamente 40 mol% (ABE et al., 1994; KATO et al., 1996a), enquanto a partir de ácidos graxos, a fração molar desse monômero foi entre 4 e 11 mol% (KATO et al., 1996b).

Embora seja afirmado que a PHA sintase de *Pseudomonas* sp. 61-3 apresente especificidade para uma ampla gama de 3HA, que permite a incorporação de monômeros de 3HB, além dos 3HA_{MCL}, a capacidade de incorporação de 3HB certamente não se restringe à PHA sintase presente nesta linhagem de *Pseudomonas*. Lee e colaboradores (1995) demonstraram a produção de PHA por diferentes linhagens de *Pseudomonas* contendo 3HB que variou entre 1,1 e 21,6 mol%. Schroll e colaboradores (1996) demonstraram que a fração molar de 3HB no PHA produzido por *Pseudomonas* sp. PHA1 variou entre 1 e 10% e em *Pseudomonas fluorescens* entre 1 e

40% dependendo da fonte de carbono fornecida. Chen e colaboradores (2001) também verificaram a incorporação de até 3,7 mol% de 3HB ao poliéster produzido por *P. stutzeri* 1317. Mesmo a PHA sintase de *P. oleovorans*, considerada como modelo de PHA sintase do tipo II e que se acreditava incorporaria apenas monômeros HA_{MCL}, foi capaz de incorporar cerca de 6 mol% de 3HB quando expressa em mutante incapaz de acumular PHA de *P. putida* (SHEU et al., 2004).

2.3.2 LINHAGENS RECOMBINANTES

A produção de PHA em linhagens recombinantes desperta um interesse especial, pois é possível controlar a composição do polímero de diferentes formas. Em princípio, a composição do PHA é determinada pela especificidade da PHA sintase bem como pela capacidade da linhagem hospedeira em suprir os diferentes monômeros. Dessa forma, a expressão de uma determinada PHA sintase em uma linhagem hospedeira pode revelar uma especificidade por monômeros não detectada na linhagem natural. Isto ocorre pois esta linhagem hospedeira pode apresentar vias metabólicas que conduzem a um suprimento mais efetivo de um determinado monômero. Além disso, as linhagens recombinantes podem ser construídas abrigando genes que codificam enzimas envolvidas no suprimento de intermediários do metabolismo para biossíntese de PHA. Dependendo da especificidade dessas enzimas por intermediários do metabolismo, diferentes monômeros podem ser supridos e em quantidades variáveis, permitindo sintetizar PHA de diferentes composições e de forma controlada.

Embora diversas PHA sintases já tenham sido clonadas e muitas ainda poderiam ser com base em dados de genomas disponíveis, a construção de linhagens recombinantes tem se baseado em poucas linhagens hospedeiras e genes recombinantes. Os principais genes utilizados na construção de linhagens recombinantes são aqueles que codificam: PHA sintases de *R. eutropha* (*phaC_{Re}*), *Aeromonas caviae* (*phaC_{Ac}*) e *Pseudomonas* sp. 61-3 (*phaC_{Ps}*). Os genes supridores de monômeros são aqueles que codificam β-cetotiolase (*phaA_{Re}*) e 3-cetoacil-CoA redutase (*phaB_{Re}*) de *R. eutropha*, enoil-CoA hidratase *R*-específica de *A. caviae* (*phaJ_{Ac}*) ou *P. aeruginosa* (*phaJ_{Pa}*), 3-cetoacil-ACP redutase de *Pseudomonas* (*fabG_{Ps}*) ou *E. coli* (*fabG_{Ec}*) e 3-hidroxiacil-ACP:CoA transacilase de *Pseudomonas* (*phaG_{Ps}*). Os hospedeiros utilizados são

principalmente diferentes linhagens de *E. coli* e o mutante *R. eutropha* PHB-04 incapaz de acumular PHA. *P. putida* GPp104 um mutante da linhagem *P. putida* KT2442 incapaz de produzir PHA também é utilizado com certa frequência. Uma das vantagens de se utilizar linhagens de *Pseudomonas* como hospedeira é que elas são muito efetivas no suprimento de diferentes 3HA a partir das vias de β -oxidação ou biossíntese de ácidos graxos. Assim, tornam-se hospedeiras ideais para produção de PHA contendo 3HB e 3HA_{MCL} em linhagens recombinantes abrigando genes de PHA sintase com maior especificidade por monômeros HA_{SCL}.

2.3.2.1 A ESPECIFICIDADE DA PHA SINTASE

Como já mencionado a especificidade da PHA sintase é um fator determinante para estabelecer a composição do PHA produzido. Entretanto, dependendo da linhagem hospedeira todo o potencial dessa enzima pode não ser exercido devido à incapacidade no suprimento de monômeros. Um exemplo interessante dessa ocorrência é a PHA sintase de *Thiocapsa pfennigii*. A linhagem natural é capaz de produzir apenas P3HB (LIEBERGESELL et al., 1991), entretanto quando a PHA sintase foi clonada e expressa no mutante *P. putida* GPp104 foi produzido a partir de octanoato um PHA contendo quantidades quase equimolares de 3HB e 3HHx, além de pequena quantidade de 3HO (LIEBERGESELL et al., 1993).

A PHA sintase de *R. eutropha*, como já havia sido demonstrado em experimentos com a linhagem selvagem, deve apresentar especificidade principalmente por 3HB, embora também deva apresentar uma pequena especificidade por monômeros 3HHx e 3HO (ULMER et al., 1989; LIEBERGESELL et al., 1991). Com objetivo de aumentar o direcionamento de monômeros HA_{MCL}, Dennis e colaboradores (1998) expressaram os genes *phaC_{Re}* (PHA sintase) e *phaB_{Re}* (3-cetoacil-CoA redutase) em diferentes linhagens recombinantes. Co-polímeros de 3HB e 3HHx foram produzidos por *R. eutropha* PHB-04, *Klebsiella aerogenes* e *P. putida* GPp104 abrigando os genes *phaC* e *phaB*. A fração molar de 3HHx, quando ácidos graxos foram supridos, atingiu até cerca de 10 mol% em *R. eutropha* ou *K. aerogenes*, mas não ultrapassou 2 mol% em *P. putida* GPp104. Linhagem recombinante de *E. coli* produziram apenas o homopolímero P3HB.

Antonio e colaboradores (2000) expressaram o operon completo de biossíntese de PHA de *R. eutropha* (*phaCAB*) em linhagem de *E. coli* afetada no metabolismo de ácidos graxos (*fadB*) e obtiveram um PHA contendo 98 mol% de 3HB e 2 mol% de 3HO a partir de ácidos graxos. Linhagens de *E. coli* não afetada no metabolismo de ácidos graxos (JM109) ou afetada no gene *fadR* (RS3097) produziram apenas o homopolímero P3HB.

Alterações na PHA sintase de *R. eutropha* por evolução dirigida também se mostrou eficaz para aumentar a especificidade dessa enzima por 3HHx. Quando expressas em *E. coli* LS5218 (*fadR*, *atoC*[con]), expressando também o gene *phaJ* de *A. caviae*, observou-se um aumento na fração de 3HHx de 0,2 mol% (*phaC* selvagem) para 0,7 mol% (*phaC* mutado) utilizando ácido láurico como fonte de carbono (TSUGE et al., 2004).

Claramente, a PHA sintase de *Aeromonas* spp. apresenta especificidade para monômeros 3HB, 3HV e 3HHx, como é demonstrada pela síntese de PHA por essas espécies a partir de ácidos graxos e óleos vegetais (KOBAYASHI et al., 1994; DOI et al., 1995). A confirmação de uma maior especificidade da PHA sintase por monômeros 3HHx vem de trabalhos nos quais o gene da PHA sintase de *A. caviae* ou outras *Aeromonas* foi expresso em outras linhagens hospedeiras. Fukui e Doi (1997), clonaram um fragmento de DNA de *A. caviae* abrigando genes de biossíntese de PHA. *R. eutropha* PHB-04 abrigando esses genes produziram P3HB-co-3HHx a partir de ácidos hexanóico ou octanóico contendo entre 4 e 67 mol% de 3HHx (FUKUI e DOI, 1997; KICHISE et al., 1999). A partir dos ácidos heptanóico e nonanóico foram produzidos terpolímeros P3HB-co-3HV-co-3HHp (KICHISE et al., 1999). Deve-se destacar que a capacidade da PHA sintase de *A. caviae* incorporar monômeros 3HHp foi revelada apenas nessa linhagem recombinante e não havia sido detectada na linhagem selvagem (DOI et al., 1995). A expressão desses genes em *P. putida* GPp104 também levou a produção de P3HB-co-3HHx, com 3HHx variando entre 29 e 40 mol%. A partir de óleos vegetais, *R. eutropha* PHB-04 abrigando apenas o gene *phaC_{Ac}* produziu P3HB-co-3HHx contendo 4-5 mol% de 3HHx, enquanto a linhagem selvagem (*R. eutropha* H16) produziu apenas o homopolímero P3HB (FUKUI e DOI, 1998).

Em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando genes de biossíntese de PHA de *A. caviae* também foi possível sintetizar P3HB-co-3HHx, entretanto, a biossíntese desses copoliésteres só foi obtida com a co-expressão dos genes *phaC_{Ac}* (PHA sintase) e *phaJ* (enoil-CoA hidratase *R*-específica) (FUKUI et al., 1999).

A evolução dirigida da PHA sintase de *Aeromonas* têm se mostrado uma estratégia interessante para alterar sua especificidade por monômeros 3HHx, capacidade de acúmulo de PHA e a massa molar do polímero sintetizado e tem sido explorada em diferentes trabalhos (KICHISE et al., 2002; AMARA et al., 2002; TSUGE et al., 2004; TSUGE et al., 2007a; TSUGE et al., 2007b).

A PHA sintase 1 (PhaC1) de *Pseudomonas* sp. 61-3 claramente apresenta uma especificidade por 3HB, sendo que a partir de ácidos graxos o polímero contém entre 4 e 11% de 3HB (KATO et al., 1996b) e a partir de carboidratos cerca de 40% (ABE et al., 1994; KATO et al., 1996a). Matsusaki e colaboradores (1998) clonaram a PHA sintase 1 de *Pseudomonas* sp. 61-3. A expressão do gene *phaC1* em *P. putida* GPp104 levou a produção de um PHA_{MCL} contendo entre 3 e 5 mol% de 3HB a partir de ácidos graxos e não foi detectado 3HB quando gliconato foi fornecido como fonte de carbono. Quando o gene *phaC1* foi expresso em *R. eutropha* PHB-04, a partir de gliconato foi produzida pequena quantidade do homopolímero P3HB. A partir de ácidos graxos foram produzidos P3HB-co-3HA_{MCL} nos quais as frações de 3HB oscilaram entre 31 e 46 mol%. A co-expressão do genes *phaA* e *phaB* de *R. eutropha*, juntamente com o gene *phaC1* em *P. putida* GPp104 levou a um aumento expressivo na fração de 3HB a partir de gliconato (MATSUSAKI et al., 2000). Em *R. eutropha* PHB-04, essa mesma combinação de genes sob o controle de diferentes promotores permitiu produzir polímeros contendo até 85 mol% de 3HB a partir de óleos vegetais (MATSUSAKI et al., 2000).

Estudos de evolução dirigida da PHA sintase 1 de *Pseudomonas* sp. 61-3 avaliaram o efeito sobre sua especificidade por monômeros 3HB, capacidade de acúmulo de PHA e a massa molar do polímero sintetizado. Um dos focos principais foi aumentar a especificidade por monômeros 3HB sem reduzir o teor total de PHA acumulado (TAKASE et al., 2003; TAKASE et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006). Trabalhos de evolução dirigida demonstram que é possível aumentar a especificidade por 3HB, mesmo na PHA sintase 1 de *P. oleovorans* (SHEU e LEE, 2004).

2.3.2.2 ENZIMAS SUPRIDORAS DE MONÔMEROS

Além da especificidade da PHA sintase, outro fator importante para o controle da composição do PHA sendo sintetizado são enzimas que promovem o suprimento de monômeros para a PHA sintase. Deve-se destacar que mesmo as enzimas supridoras de monômeros apresentam especificidade variável pelos diferentes substratos e, dessa forma, podem aumentar ou diminuir a quantidade de determinados monômeros disponibilizados para a PHA sintase.

O produto do gene *phaP* embora tenha sido reconhecido como uma proteína estrutural do grânulo de PHA, que determinaria o tamanho destes, recentemente também foi apontado como sendo responsável por alterar a composição do PHA produzido (FUKUI et al., 2001; TIAN et al., 2005).

Algumas destas enzimas estão envolvidas diretamente na síntese dos monômeros, tais como β -cetotiolases (PhaA, BktB) e 3-cetoacil-ACP sintases (FabH), que dependem da ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase (PhaB) para promover a redução do grupo ceto em hidróxi. A expressão dos genes *phaA* e *phaB* tem sido amplamente utilizada como estratégia para aumentar o suprimento de 3HB-CoA e dessa forma aumentar a fração de 3HB no polímero produzido pela PHA sintase de *A. caviae* (QIU et al., 2006) ou *Pseudomonas* sp. 61-3 (MATSUSAKI et al., 2000; TAKASE et al., 2003; TAKASE et al., 2004; CHEN et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2005; MATSUMOTO et al., 2006). O produto do gene *fabH* após mutação no resíduo 87 tem se mostrado efetivo para o suprimento de 3HHx, 3HO e 3HD uma vez que apresenta tanto atividade 3-cetoacil-ACP sintase, como uma atividade transacilase (NOMURA et al., 2004a, NOMURA et al., 2004b).

Foi estabelecida uma via metabólica para síntese de P3HB-co-3HHx em *R. eutropha* PHB-04 expressando o gene *ccr* (crotonil-CoA redutase) de *Streptomyces cinnamonensis* juntamente com os genes *phaC* e *phaJ* ou somente o gene *phaC* de *A. caviae*. Nessa via metabólica, a síntese de 3HHx, depende da ação de uma β -cetotiolase que catalisaria a condensação entre butiril-CoA e acetil-CoA (FUKUI et al., 2002). Uma forma alternativa de se obter esses intermediários seria através do suprimento de ácido butírico como co-substrato.

A partir da biossíntese de ácidos graxos, intermediários são direcionados para biossíntese de PHA através da ação de uma 3-hidroxiacil-ACP:CoA transacilase (PhaG)

(REHM et al., 1998). A inativação do gene *phaG* de *Pseudomonas* sp. 61-3 levou a um aumento da fração de 3HB na mistura de PHA sendo sintetizada, enquanto a super-expressão desse gene leva a uma redução da fração 3HB, resultados esses coerentes com o papel do produto de *phaG* dirigir HA_{MCL} da biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de PHA (MATSUMOTO et al., 2001a). A expressão do gene *phaG* juntamente com o gene *phaC1* de *Pseudomonas* sp. 61-3 em *R. eutropha* PHB-04 (MATSUMOTO et al., 2001b) ou juntamente com os genes *phaC* de *A. caviae*, *phaB* de *R. eutropha* e *phaG* de *P. putida* em *P. putida* GPP104 (QIU et al., 2005) permitiu a síntese, respectivamente, de P3HB-co-3HA_{MCL} e P3HB-co-3HHx.

Diversas enzimas têm sido identificadas que promovem o direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para a biossíntese de PHA, permitindo a síntese de P3HB-co-3HA_{MCL} a partir de ácidos graxos e contribuindo para aumentar a fração 3HA_{MCL} no polímero. O primeiro gene identificado com essa propriedade foi aquele denominado *phaJ* e associado com a enoil-CoA hidratase *R*-específica de *A. caviae* (FUKUI et al., 1998). Com base na sequência desse gene, foram identificados inicialmente dois genes *phaJ* (TSUGE et al., 2000) e posteriormente mais dois (TSUGE et al., 2003b) no genoma de *P. aeruginosa* codificando enzimas que apresentam especificidade por enoil-CoA com cadeias de carbono de extensão diferente. Os genes *phaJ* vêm sendo bastante utilizados na construção de linhagens recombinantes para biossíntese de P3HB-co-3HA_{MCL}, além disso, técnicas de evolução dirigida foram aplicadas para modificar a especificidade da enoil-CoA hidratase pelo substrato (TSUGE et al., 2003a; HU et al., 2007).

Com base no gene *fadB*, que codifica uma enzima apresentando um domínio com atividade enoil-CoA hidratase e sendo essencial para a β -oxidação de ácidos graxos em *E. coli*, foram identificados outros genes homólogos e que contribuem para o direcionamento de intermediários da β -oxidação para a biossíntese de PHA, são eles: *yfcX* (SNELL et al., 2002), *maoC* (PARK e LEE, 2003), *paaG*, *paaF*, *bhbD*, *sceH* e *ydbU* (PARK e Lee, 2003).

A super-expressão de genes como *fadD* (QIU et al., 2004) ou do gene *yafH* em *A. hydrophila* (LU et al., 2004) ou ainda do gene *yafH* em linhagem recombinante de *E. coli* abrigando os genes *phaC* e *phaJ* de *A. caviae* (LU et al., 2003) permitiu aumentar a quantidade de P3HB-co-3HHx produzido, sugerindo que um aumento no fluxo da β -

oxidação permite aumentar o fornecimento de intermediários para a biossíntese de PHA pela enoil-CoA hidratase.

O papel da 3-cetoacil-CoA redutase codificada pelo gene *phaB* em promover o direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para biossíntese de PHA foi demonstrado (DENNIS et al., 1998). A busca por genes similares a *phaB* no genoma de *E. coli* revelou o gene *fabG*, que em princípio correspondia a uma 3-cetoacil-ACP redutase essencial para biossíntese de ácidos graxos. A co-expressão de *fabG* e *phaC* de *A. caviae* ou *phaC1* de *Pseudomonas* sp. 61-3 em *E. coli*, permitiu o acúmulo de P3HB-co-3HHx e PHA_{MCL}, respectivamente (TAGUCHI et al., 1999). Também foi possível estabelecer a síntese de PHA_{MCL} em *E. coli* recombinante abrigando o gene *phaC2* de *Pseudomonas* sp. 61-3 e *fabG* (PARK et al., 2002). Recentemente, foi demonstrada a síntese de P3HB-co-3HA_{MCL} mesmo a partir de carboidratos em um mutante de *E. coli* que super-expressa genes da β -oxidação de ácidos graxos, expressando genes *phaC1* de *Pseudomonas* sp. 61-3 mutados e *fabG* de *E. coli* ou *Pseudomonas* (NOMURA et al., 2008).

O gene *rhlG* foi inicialmente identificado como essencial para a biossíntese de ramnolipídios em *P. aeruginosa* e apresentando similaridade a *fabG* (CAMPOS-GARCIA et al., 1998). A co-expressão de *rhlG* e *phaC2* de *Pseudomonas* sp. 61-3 levou ao acúmulo de PHA_{MCL} em linhagens recombinantes de *E. coli* (PARK et al., 2002)

3 OBJETIVOS

Avaliar o potencial de *Pseudomonas putida* IPT 046 ou seus mutantes como hospedeiros para expressão de genes associados à biossíntese de PHA com vistas à produção de P3HB-*co*-3HA_{MCL}.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS E PLASMÍDIOS

As linhagens bacterianas e plasmídios utilizados neste trabalho estão descritos nas Tabelas 4.1 e 4.2

Tabela 4.1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Designação original	Características	Referência
<i>E. coli</i> XL1 Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	BULLOCK et al., 1987
<i>E. coli</i> S17-1	Genes <i>recA</i> e <i>tra</i> do plasmídio RP4 integrados ao cromossomo	SIMON et al., 1983
<i>P. putida</i> IPT 046	Linhagem selvagem produtora de PHA _{MCL} isolada a partir de solo de canavial	GOMEZ, 2000
<i>P. aeruginosa</i> UCBPP PA14	Linhagem selvagem	
<i>P. putida</i> IPT 461	Mutante de IPT046 deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose e octanoato (<i>phaC</i> ⁻)	GOMEZ, 2000
<i>P. putida</i> IPT 463	Mutante de IPT046 deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose (<i>phaG</i> ⁻)	GOMEZ, 2000
<i>P. putida</i> LFM 814	Mutante transposon mini- <i>Tn5</i> de IPT046 deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose e octanoato (<i>phaC</i> ⁻)	Este trabalho
<i>P. putida</i> LFM 824	Mutante transposon mini- <i>Tn5</i> de IPT046 deficiente no acúmulo de PHA a partir de glicose (<i>phaG</i> ⁻)	Este trabalho
<i>R. eutropha</i> H16	Linhagem selvagem produtora de PHA _{SCL}	GOMEZ, 2000

Tabela 4.2. Plasmídios utilizados neste trabalho.

Designação original	Características	Referência
pJM9131	Plasmídio abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>R. eutropha</i> .	KIDWELL et al., 1995
pJM9131 Δ <i>phaA</i>	Plasmídio abrigando o operon sintético <i>phaCB</i> de <i>R. eutropha</i> .	Este Trabalho
pJM9131 Δ <i>phaCA</i>	Plasmídio abrigando o gene <i>phaB</i> de <i>R. eutropha</i>	Este Trabalho
pBBR1MCS-2	Vetor de amplo espectro de hospedeiro, <i>lacPOZ'</i> , <i>Km^r</i>	KOVACH et al., 1995
pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaCAB</i>	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaCB</i>	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaC</i>	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>phaB</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaB</i>	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>rhlG'</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>P. aeruginosa</i> Pa14 <i>rhlG'</i> (<i>MfeI</i> / <i>EcoRI</i> ⁺)	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>phaC'-rhlG'</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaC'</i> (<i>MfeI</i> / <i>EcoRI</i> ⁺), <i>P. aeruginosa</i> Pa14 <i>rhlG'</i> (<i>MfeI</i> / <i>EcoRI</i> ⁺)	Este Trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i>	Derivado pBBR1MCS-2, <i>R. eutropha phaC'</i> (<i>MfeI</i> / <i>EcoRI</i> ⁺)	Este Trabalho
pGEM [®] – T Easy	<i>lacPOZ'</i> , <i>mcs</i> , <i>Amp^r</i> , pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	Promega
pGEM [®] – T Easy:: <i>rhlG</i>	Derivado pGEM [®] – T Easy, <i>P. aeruginosa</i> PA14 <i>rhlG</i>	Este Trabalho

4.2 ANTIBIÓTICOS

As soluções de antibióticos empregadas foram preparadas de acordo com Sambrook e Russell (2001) e filtradas em filtro com porosidade 0,22 μ m, estéril. Alíquotas de soluções estoque de antibióticos foram mantidas a -22 °C, e adicionadas aos meios de cultura após esterilização e resfriamento destes a 50 °C. As concentrações dos antibióticos foram utilizadas conforme Tabela 4.35

Tabela 4.3. Concentrações utilizadas de antibióticos.

Antibiótico	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (μ g/mL)
Ampicilina (Ap) sal sódica	100 (em H ₂ O bidestilada)	100
Canamicina	50 (em H ₂ O bidestilada)	50

4.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO E PRESERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Preservação por glicerol:

Para uso de rotina, as culturas bacterianas foram criopreservadas em glicerol, como descrito por Sambrook e Russell (2001). Foram distribuídas alíquotas de 1 mL em microtubos, os quais foram armazenados em freezer a -80 °C. Para reativação, um microtubo foi retirado do freezer e 0,5 mL da cultura foi inoculado no meio caldo nutriente, e este incubado em condições adequadas de acordo com o microrganismo.

Preservação por liofilização (SILVA et al., 1992)

Culturas de linhagens mutantes ou recombinantes obtidas neste trabalho foram cultivadas em LB (24 h), contendo o antibiótico adequado quando necessário, centrifugadas (10000xg por 10 minutos a 4 °C) e ressuspensas em agente protetor (leite desnatado a 10% e glutamato de sódio a 5%). A suspensão de células foi distribuída em ampolas esterilizadas, congeladas e liofilizadas. As células liofilizadas foram mantidas em refrigerador (4 a 8 °C) nas ampolas seladas a vácuo.

4.4 MEIOS DE CULTURA, CONDIÇÕES DE CULTIVO E SOLUÇÕES ESTOQUE

A composição dos meios sólidos é idêntica à dos meios líquidos acrescidos de 15 g/L de ágar-ágar. As soluções de sais e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, por 20 min, a 121 °C, 1 atm.

Meio Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK e RUSSELL, 2001)

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L

NaCl	10 g/L
------	--------

Meio Mineral (MM) (RAMSAY et al., 1991)

KH ₂ PO ₄	1,5 g/L
Na ₂ HPO ₄	3,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,2 g/L
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,01 g/L
Citrato férrico amoniacal	0,06 g/L
Solução de Elementos Traços	1,0 mL/L

Solução de elementos traços SL6

H ₃ BO ₃	0,3 g/L
CoCl ₂ .6 H ₂ O	0,2 g/L
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,1 g/L
MnCl ₂ .4 H ₂ O	30 mg/L
NaMoO ₄ .2 H ₂ O	30 mg/L
NiCl ₂ .6 H ₂ O	20 mg/L
CuSO ₄ .5 H ₂ O	10 mg/L

Para o preparo do meio mineral, as soluções de sais, de fontes de carbono e de ágar (no caso dos meios sólidos) foram esterilizadas separadamente e misturadas à temperatura de aproximadamente 50 °C.

As fontes de carbono utilizadas neste trabalho foram glicose e octanoato na concentração de 15 g/L e 5 g/L, respectivamente.

4.5 MANIPULAÇÕES COM DNA

4.5.1 ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO

Para o isolamento do DNA genômico total da linhagem *P. aeruginosa* Pa14, empregou-se o método descrito por Ausubel e colaboradores (1987), baseado na extração fenol/clorofórmio. A concentração de DNA foi estimada pela visualização do DNA em gel de agarose de 0,8%, corado em brometo de etídeo.

4.5.2 ISOLAMENTO E ANÁLISE DE DNA PLASMIDIAL

DNA plasmidial foi obtido utilizando o método descrito por Birnboim e Doly (1979) modificado pela inclusão de uma digestão com lisozima com a solução GET (Glicose, EDTA, Tris HCl). DNA genômico foi obtido pelo método descrito por Ausubel e colaboradores (1989). A análise da pureza e concentração das amostras de DNA foi realizada por leitura de densidade ótica a 260 e 280 nm. Para a digestão de DNA foram utilizadas endonucleases de restrição segundo instruções do fabricante (Invitrogen). A quantidade de enzima adicionada representou no máximo 10% do volume de reação. A digestão foi realizada a 37 °C por 16 horas. A ligação de fragmentos de DNA foi obtida utilizando a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen ou New England Biolabs) segundo indicações dos fabricantes, com incubação a 14 °C por 16 horas. As amostras de DNA após digestão ou não com endonuclease de restrição foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.5.3 AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA CONTENDO OS GENES *PHAC_{RE}* E *RHLG_{PA}*

O fragmento de DNA contendo o gene *phaC_{Re}* foi amplificado a partir do plasmídeo pJM9131, já o fragmento contendo o gene *rhlG_{Pa}* foi amplificado a partir do DNA genômico de *P. aeruginosa* PA14. Oligonucleotídeos utilizados condições de PCR são apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5, respectivamente. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit MasterMix (Fermentas), conforme especificações do fabricante.

Tabela 4.4. Oligonucleotídeos iniciadores de PCR.

Gene	DNA molde	Seqüência 5' – 3'	Fragmento
<i>phaC_{Re}</i>	pJM9131	AAA <u>CAATTG</u> TAGGTCGGGAAGCGTGCAGT AAA <u>GAATTCT</u> TGGAAACGGGAGGGAACCTG	2,2 Kb
<i>rhlG_{Pa}</i>	<i>P. aeruginosa</i> PA14	AAA <u>CAATTG</u> GAGCCGAATGAGCTATCGCCTG AAA <u>GAATTTC</u> GGCGTCATGTTACCCGGATTGG	1,2 Kb

Sequências em destaque: sítio restrição para enzimas *MfeI* (Forward) e *EcoRI* (Reverso).

Tabela 4.5. Condições de amplificação dos fragmentos de DNA.

Fragmento de interesse	Desnaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação	Anelamento	Extensão
<i>phaC_{Re}</i>	95 °C/3 min	35	95 °C/45s	55 °C/2 min	72 °C/2,5 min
<i>rhlG_{Pa}</i>	94 °C/5 min	35	94 °C/45s	62 °C/2 min	72 °C/2 min

Para purificação dos fragmentos de DNA amplificados, utilizou-se o *kit* QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), conforme recomendações do fabricante. A purificação foi feita a partir dos fragmentos isolados em gel de agarose 0,8%.

4.5.3.1 CLONAGEM DOS FRAGMENTOS EM VETOR DE EXPRESSÃO

Os fragmentos amplificados contendo os genes *phaC_{Re}* e *rhlG_{Pa}* foram clonados no vetor pGEM[®] T-Easy seguindo as instruções do fabricante (Promega). Os plasmídios pGEM[®] T-Easy abrigando o gene *phaC_{Re}* e *rhlG_{Pa}* foram digeridos independentemente com as enzimas *EcoRI* e *MfeI* e os fragmentos de DNA contendo estes genes foram ligados ao vetor pBBR1MCS-2, previamente digerido com a enzima *EcoRI*.

Para a clonagem dos fragmentos contendo os genes *phaCAB*, *phaCB* e *phaB* foram feitas digestões com enzima *HindIII* dos plasmídeos pJM9131, pJM9131Δ*phaA* e pJM9131Δ*phaCA*, respectivamente. Em seguida os fragmentos de DNA de interesse foram transferidos para o vetor pBBR1MCS-2.

4.5.4 TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDIOS POR TRANSFORMAÇÃO

As linhagens *E. coli* XLI Blue ou *E. coli* S17-1 foram inoculadas em 25 mL de meio LB contendo MgCl₂ 10 mM e MgSO₄ 10 mM e incubadas em agitador rotativo a 37 °C até um DO₆₅₀ = 0,3-0,5. Em tubos estéreis, foram centrifugadas 8 mL da cultura por 15 min, 4000 rpm, 4 °C e o “pellet” foi ressuspensão com 4 mL de tampão de transformação, as células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, a massa de células foi ressuspensa em 0,8 mL do tampão de transformação, dividida em alíquotas de 200 µL e mantida em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente.

Para cada 200 µL de células competentes, adicionaram-se 5µL de DNA, (~250 ng) incubou-se em banho de gelo por 30 min e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 90 s e imediatamente resfriada em gelo. Adicionou-se 600µL de meio LB, e incubou-se por 1 hora a 37 °C. Clones transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico apropriado, suplementado com IPTG (isopropil-tio-β-D-galactosídeo) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) para diferenciar clones recombinantes contendo o inserto de DNA.

Tampão de transformação

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
CaCl ₂	50 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Água destilada qsp	1000 mL

4.6 OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECOMBINANTES DE *P. PUTIDA*

O vetor pBBR1MCS-2 abrigando genes de interesse foi transferido para a linhagem *Pseudomonas putida* IPT046, bem como para seus mutantes PHA negativo *P. putida* IPT461 e *P. putida* IPT 463 por conjugação com *Escherichia coli* S17-1 (SIMON et al., 1983). Clones das linhagens de *E. coli* S17-1 foram cultivadas em meio LB contendo 50 µg/mL de canamicina por 16-24 horas a 37 °C. As linhagens receptoras (*P. putida* IPT046, IPT461 ou IPT463) foram cultivadas por 24 horas a 30 °C. Um mililitro das culturas doadoras e receptoras foi centrifugado, lavado e ressuspensão em 100 µL de solução salina. As suspensões provenientes das culturas de células doadoras e receptoras foram reunidas e espalhadas na superfície de meio mineral contendo glicose (1 g/L) e canamicina (10 µg/mL) (GK10). Colônias recombinantes crescidas em meio de cultura GK10 foram re-estriadas nesse meio de cultura para confirmar o isolamento.

4.7 PRODUÇÃO DE PHA

Cada uma das linhagens recombinantes foi estriada em meio de cultura LBK e cultivada por 72 horas a 30 °C. Colônias isoladas dessa cultura foram utilizadas para inocular 25 mL de meio de cultura LBK e as células foram incubadas por 24 horas (30 °C/150 rpm). A cultura em LBK foi utilizada para inocular meio mineral (RAMSAY et al., 1990) contendo excesso de glicose (15 g/L) ou octanoato (3 g/L) e limitado na fonte

de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 1 g/L e 0,5 g/L, respectivamente) de forma a proporcionar condições adequadas para o acúmulo de PHA. Após 72 horas de cultivo (30 °C/150 rpm), foram determinados: pH, massa seca celular, teor e composição do PHA.

4.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

O pH foi determinado no sobrenadante, após centrifugação da cultura, em potenciômetro (Mettler - modelo Delta 350) utilizando padrões de pH 4,0; 7,0 e 9,2 (Ingold).

A massa seca celular foi determinada gravimetricamente após centrifugação de volume conhecido da cultura, filtração e lavagem das células com água destilada em membrana de poro 0,45 μm (Millipore) e secagem a 100 °C por 4 horas.

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS e MAI, 1988). Entre 10 e 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 1,5 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 1,5 mL de 1,2-dicloroetano e 100 μL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação após os primeiros 30 minutos de propanólise. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 μL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra ("split" 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 μm). A análise foi conduzida nas seguintes condições:

Gás de arraste: Hélio (0,8 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 1 minuto, elevação da temperatura até 200 °C a 8 °C/min e 200 °C por 15 minutos.

Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. putida* a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich) foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB, 3HV, 3HHx, 3HHp, 3HO, 3HN, 3HD e 3HDd.

4.9 EXTRAÇÃO DE PHA

PHA foi extraído em clorofórmio por 24 horas a 30 °C, filtrado em papel filtro, precipitado em 10 volumes de etanol e seco ao ar.

4.10. CG-MS

A identidade de monômeros foi confirmada por CG-MS (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) em um cromatógrafo gasoso Shimadzu GC17A operado nas mesmas condições descritas no item 4.6.1. Os espectros de massa dos fragmentos de propil-ésteres foram obtidos por impacto de elétrons (EI) a 70 eV em um espectrômetro de massa Shimadzu QP5050A.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDIOS CONTENDO GENES DE BIOSÍNTESE DE P3HB DE *RALSTONIA EUTROPHA*

O primeiro conjunto de construções realizado neste trabalho foi baseado nos genes presentes no operon *phaCAB* de *Ralstonia eutropha*, cujo produto gênico deles derivado é responsável pela biossíntese de P3HB neste organismo. Os trabalhos de construção foram iniciados com a transferência do operon *phaCAB* presente no plasmídeo pJM9131 para um novo vetor. Tal transferência de vetor tornou-se necessária, uma vez que o plasmídeo pJM9131 não é capaz de se replicar nas linhagens escolhidas para expressão dos genes de interesse. Sendo assim, um novo vetor com capacidade de expressão em ampla gama de hospedeiros foi escolhido, denominado pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995). A Figura 5.1 apresenta um esquema destes plasmídios.

Figura 5.1. Plasmídios pJM9131 (KIDWELL et al., 1995) e pBBR1MCS-2 (KOVACH et al., 1995).

Inicialmente procedeu-se com a digestão do pJM9131 com a enzima de restrição *Hind*III, o que resultou em dois fragmentos de aproximadamente 6,0 Kb e 2,60 Kb portando, respectivamente, os genes correspondentes ao operon *phaCAB* e ao restante do plasmídio pJM9131 (Figura 5.2 - A). Em seguida o fragmento de DNA contendo os genes de interesse foi separado do restante da digestão e, então, ligado ao vetor pBBR1MCS-2, também previamente digerido com a enzima de restrição *Hind*III. O produto de ligação foi transferido para linhagem de *E. coli* XL1-Blue por transformação pelo método de cloreto de cálcio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001), sendo esta então semeada em placa de Petri contendo meio Luria-Bertani sólido contendo canamicina (LBK), e suplementado com excesso de fonte de carbono (glicose 10 g/L). Após período de incubação foram selecionados clones capazes de crescer em canamicina e que apresentassem coloração opaca. Uma vez que células bacterianas acumulando excesso de P3HB apresentam-se como colônias opacas (STEINBÜCHEL, 1991), a opacidade das colônias pode ser utilizada como critério preliminar para seleção de clones portando o novo vetor ligado ao operon *phaCAB*. Colônias selecionadas tiveram então seu DNA plasmidial recuperado, digerido com a enzima de restrição *Hind*III e avaliado em gel de agarose (0,8% m/v). O resultado final é apresentado na Figura 5.3 (coluna 2).

Figura 5.2. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; **A.** 1) DNA λ digerido com *Hind*III, Invitrogen; 2) fragmento contendo o operon *phaCAB* digerido com *Hind*III; 3) pJM9131 digerido com *Hind*III; **B.** 1) DNA λ digerido com *Hind*III, Invitrogen; 2) fragmento contendo o operon *phaCB* digerido com *Hind*III; 3) pJM9131 Δ *phaA* digerido com *Hind*III; **C.** 1) DNA λ digerido com *Hind*III, Invitrogen; 2) pJM9131 Δ *phaCA* digerido com *Hind*III.

Para obtenção do plasmídio contendo apenas os genes *phaC* e *phaB* procedeu-se a digestão do plasmídio pJM9131 com a enzima de restrição *StuI*, o que resultou na deleção da maior parte do gene *phaA*. Após esta primeira digestão, o plasmídio foi religado, dando origem ao plasmídio pJM9131 Δ *phaA*, e transferido por transformação por cloreto de cálcio para *E. coli* XL1-Blue. Clones brancos obtidos em meio LB contendo IPTG/Xgal tiveram seu DNA plasmidial recuperado e novamente digeridos com a enzima de restrição *HindIII*, aqueles que apresentaram após digestão perfil em gel de agarose contendo dois fragmentos (Figura 5.2 – B), dos quais um deles deveria ter cerca de 5,0 kb foram escolhidos como sendo portadores do operon *phaCB*. Com o intuito de se obter um plasmídio contendo apenas o gene *phaB*, o plasmídio pJM9131 Δ *phaA* sofreu duas novas rodadas independentes de digestões com as enzimas *StuI* e *EcoRV*, respectivamente. Tais digestões resultaram na deleção de mais de 80% do gene *phaC*. O vetor selecionado (Figura 5.2 – C) contém um fragmento de aproximadamente 3,5 kb e foi denominado pJM9131 Δ *phaCA*. Em ambas as construções o promotor σ^{70} original do operon *phaCAB* foi mantido.

Dando sequência a obtenção dos novos vetores de expressão, os plasmídios pJM9131 Δ *phaA* e pJM9131 Δ *phaCA* foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII* e os fragmentos de interesse ligados ao plasmídio pBBR1MCS-2. Subsequentemente, os produtos de ligação foram transferidos para linhagem *E. coli* XL1-Blue, sendo estas então semeadas em meio LBK sólido contendo IPTG/Xgal. Colônias brancas foram selecionadas para extração do DNA plasmidial e, após isto os plasmídios recuperados foram digeridos com a enzima de restrição *HindIII*. Foram selecionadas como positivos os vetores que após digestão com a enzima citada aqueles apresentavam fragmentos correspondentes aos fragmentos contendo o operon *phaCB* (cerca de 5,0 kb) ou o gene *phaB* (cerca de 3,5 kb). Os resultados dos perfis analisados em gel de agarose 0,8% são apresentados na Figura 5.3.

Figura 5.3. Perfis de migração em gel de agarose 0,8% ; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pBBR1MCS-2::*phaCAB* digerido com *Hind*III; 3) pBBR1MCS-2::*phaCB* digerido com *Hind*III; 4) pBBR1MCS-2::*phaB* digerido com *Hind*III; 5) pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *Eco*RI; 6) pBBR1MCS-2 digerido com *Hind*III.

Para criação do vetor pBBR1MCS-2 portando o gene *phaC* uma abordagem diferente foi realizada. Iniciadores (*primers*) foram desenhados e o gene foi amplificado a partir do plasmídio pJM9131. O produto de amplificação foi então ligado ao plasmídio pGEM[®]-T Easy (Promega). Durante a elaboração dos iniciadores foram inseridos sítios de restrição para as enzimas *Mfe*I e *Eco*RI, tal procedimento permitiu que os produtos amplificados apresentassem sítios de corte a montante e a jusante para estas enzimas, respectivamente. Visando a futura formação de operons híbridos, o fragmento contendo o gene *phaC* foi removido do plasmídio pGEM[®]-T Easy em duas etapas. Na primeira etapa o plasmídio foi digerido com a enzima *Mfe*I, numa segunda etapa o vetor foi então digerido com a enzima de restrição *Eco*RI. Em seguida, o fragmento contendo o material genético de interesse foi purificado a partir de gel de agarose e unido ao plasmídio pBBR1MCS-2, também previamente digerido com a enzima de restrição *Eco*RI. Esta estratégia foi baseada no fato de que tais enzimas de restrição são isoquizômeros entre si, o que significa que apesar de reconhecerem sequências de restrição diferentes, as extremidades geradas por ambas são complementares e podem ser ligada uma a outra. Entretanto, uma vez ligadas estas

extremidades, a nova sequência formada não é mais reconhecida por qualquer das enzimas, resultando na perda do sítio de restrição. Com isto, buscou-se não apenas controlar a orientação na qual o gene *phaC* seria inserido no plasmídio, mas também direcionar os próximos genes a serem clonados. O vetor gerado em tal processo foi denominado pBBR1MCS-2::*phaC* (*phaC* “linha”). A Figura 5.4 apresenta gel de agarose analisando DNA dos diferentes passos de construção do vetor pBBR1MCS-2::*phaC*.

Figura 5.4. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) amplicon contendo o gene *phaC*; 3) o pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*; 4) pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *MfeI*; 5) pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *EcoRI*; 6) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas.

O gene alvo cuja expressão pretende-se avaliar juntamente com o *phaC* de *Raltonia eutropha* é o gene *rhlG*. O gene *rhlG* apresenta homologia com o gene *fabG* de *Pseudomonas*, entretanto não apresenta função essencial durante a biossíntese de ácidos graxos e foi inicialmente vinculado a síntese de ramnolipídios (CAMPOS-GARCIA et al., 1998). Em mutantes de *P. aeruginosa* afetados no gene *rhlG*, observou-se alteração no teor de PHA_{MCL} acumulado, bem como em sua composição monomérica, com aumento da fração molar de 3HD e redução na fração 3HDd quando cultivadas em gliconato (REHM et al., 2001). Park e colaboradores (2002) também avaliaram o efeito da expressão do gene *rhlG* em linhagem recombinante de *E. coli* também abrigando o

gene *phaC2* de *Pseudomonas* sp. 61-3 e cultivadas em ácidos graxos. A expressão desse gene proporcionou um aumento da fração molar de 3HO e 3HD no PHA_{MCL} sendo produzido. Até o momento não foi avaliado o efeito do gene *rhlG* sobre a produção de PHA por PHA sintases com maior especificidade por HA_{SCL}.

O gene *rhlG*_{Pa} utilizado neste trabalho foi clonado a partir da linhagem *P. aeruginosa* Pa14. A estratégia consistiu em inicialmente amplificar o fragmento e este foi clonado no vetor pGEM[®]-T Easy (Figura 5.5). Em seguida, realizou-se a transferência do fragmento contendo *rhlG* para os vetores pBBR1MCS-2 (Figura 5.6) e pBBR1MCS-2::*phaC'*. Esta transferência foi conduzida de maneira muito semelhante à utilizada para clonagem do gene *phaC*, de forma que o fragmento amplificado, com cerca de 1,2 kb, contém sítios de restrição para as enzimas de restrição *MfeI* e *EcoRI* a montante e a jusante da sequência codificante, respectivamente. A análise em gel de agarose do vetor pBBR1MCS-2::*rhlG* (Figura 5.6A, coluna 2) demonstrou que os sítios de restrição para a enzima *MfeI* não foi eliminado, embora a orientação do gene estava nesse vetor se encontrava de tal forma que o promotor *lac* poderia dirigir sua transcrição. Esta orientação foi verificada, pois após digestão com a enzima *BamHI* foram observados dois fragmentos e o gene *rhlG* apresenta um sítio de restrição para essa enzima na sua extremidade 5'. O outro sítio de restrição para *BamHI* está localizado a jusante do sítio *EcoRI* no qual o fragmento foi clonado.

Por outro lado, a análise em gel de agarose da construção contendo o gene *rhlG* clonado no plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaC'* demonstrou que o sítio *MfeI* foi eliminado, mantendo-se apenas um sítio para a enzima *EcoRI* (Figura 5.6B, coluna 2). A análise de restrição com a enzima *BamHI* (Figura 5.6B, coluna 1) demonstrou que o gene *rhlG* foi clonado nesse plasmídeo na mesma orientação que o gene *phaC*. Desta forma, a transcrição de ambos pode ser dirigida tanto pelo promotor original do operon *phaCAB*, como pelo promotor *lac*.

Figura 5.5. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA λ digerido com *HindIII*, Invitrogen; 2) pGEM[®]-T Easy::*rhlG* digerido sequencialmente com *MfeI* e *EcoRI*; 3) fragmento contendo o gene *rhlG* purificado a partir de gel de agarose 0,8%.

Figura 5.6. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; **A.** 1) DNA λ digerido com *HindIII*, Invitrogen; 2) pBBR1MCS-2::*rhlG* digerido *EcoRI*; 3) pBBR1MCS-2::*rhlG*_{Pa} digerido *BamHI*; **B.** 1) pBBR1MCS-2::*phaC'*-*rhlG'* digerido com *BamHI*; 2) *phaC'*-*rhlG'* digerido com *EcoRI*; 3 e 4) pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRI*.

De maneira a tentar compreender a relevância do promotor *lacZ* na expressão dos genes de biossíntese de P3HB inseridos no vetor pBBR1MCS-2, procedeu-se com ensaios para avaliar a orientação na qual cada operon ou gene isolado de *R. eutropha* foi clonado. As manipulações realizadas levaram em conta a presença de sítios de restrição únicos que ocorressem tanto no vetor utilizado, quanto no gene inserido.

Para elucidar a orientação na qual o operon *phaCAB_{Re}* se inseriu em relação ao promotor *lac* presente no vetor, optou-se pela digestão do mesmo com a enzima de restrição *EcoRV*. Esta corta numa região cerca de 230 bp abaixo (*downstream*) ao códon de iniciação do gene *phaC*, cortando também alguns pares de bases abaixo do local escolhido para inserção do fragmento de DNA no vetor (ou seja o sítio de restrição *HindIII*). Após digestão com *EcoRV*, a expectativa era que um de dois possíveis perfis fosse visualizado no gel de agarose: (i) caso o operon estivesse na orientação que permitisse a transcrição a partir do promotor *lac* presente no vetor, duas bandas seriam visualizadas no gel de agarose, uma das quais representando o operon e pouco menor que o tamanho original deste (aproximadamente 6,2 kb), e outra representando o plasmídeo (que apresenta 5,1 kb); (ii) por outro lado, caso o fragmento se encontrasse na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lac*, seriam visualizadas no gel uma banda representando a quase que totalidade da soma dos tamanhos do vetor e do inserto e uma outra muito menor (com cerca de 1,16 kb). O perfil de migração em gel de agarose 0,8% (Figura 5.6 – coluna 4) demonstrou que o operon encontrava-se inserido em posição contrária àquele que permitiria que a transcrição fosse dirigida pelo promotor *lac*.

A mesma estratégia foi utilizada para verificação da orientação do operon *phaCB_{Re}* e do gene *phaC_{Re}*. Para o plasmídeo portando os genes *phaCB*, caso estivesse orientado no sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lac* do vetor utilizado, os fragmentos de restrição obtidos utilizando a enzima *EcoRV* seriam de aproximadamente 4,0 kb para o fragmento contendo o operon *phaCB* e outra contendo cerca de 6,2 kb para o restante do plasmídeo. Entretanto, caso o operon estivesse inserido em orientação contrária, os fragmentos possuiriam cerca de 9,2 kb e 1,1 kb, representando o primeiro fragmento, o vetor ligado a maior parte do operon e o segundo fragmento, uma pequena parte de ambos. Segundo o padrão de migração observado no gel de agarose (Figura 5.6 – coluna 5), o operon *phaCB* também encontra-se invertido em relação ao promotor *lac*.

Figura 5.7. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2 e 3) pBBR1MCS-2 digerido com *EcoRV*; 4) pBBR1MCS-2::*phaCAB* digerido com *EcoRV*; 5) pBBR1MCS-2::*phaCB* digerido com *EcoRV* ; 6) pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *EcoRV*; 7) pBBR1MCS-2::*phaB* digerido com *EcoRV*.

Já para o vetor portando o gene *phaC*, no caso do gene estar orientado no mesmo sentido do promotor *lac*, os dois fragmentos gerados apresentariam tamanho em torno de 6,8 kb e 0,6 kb (Figura 5.7 – colunas 2 e 3). O plasmídio pBBR1MCS-2 portando o gene *phaC* apresentado na Figura 5.7 foi denominado pBBR1MCS-2::*phaC'* (*phaC* “linha”), pois apresenta o fragmento de DNA inserido na orientação que permitiria a transcrição do gene *phaC* pelo promotor *lac* do vetor. Entretanto, na situação contrária, os fragmentos obtidos seriam de aproximadamente 5,8 kb e 1,6 kb. Outra vez a análise de perfil de migração em gel de agarose 0,8% revelou que a orientação do gene *phaC*, era contrária àquela que permitiria sua transcrição a partir do promotor *lac* presente no vetor pBBR1MCS-2, como visto nas Figura 5.6 (coluna 6) e Figura 5.7 (coluna 4).

Figura 5.8. Perfis de migração em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2 e 3) pBBR1MCS-2::*phaC*' digerido com *EcoRV*; 4) pBBR1MCS-2::*phaC* digerido com *EcoRV*.

O conjunto de digestões utilizadas para identificação da orientação do gene *phaB* no plasmídio pBBR1MCS-2 seguiu um roteiro semelhante, porém foi utilizada a enzima de restrição *SmaI*. Esta enzima é capaz de clivar o fragmento contendo o gene *phaB* em uma região anterior ao início do gene, enquanto no pBBR1MCS-2 ela cliva numa região posterior ao sítio de restrição para a enzima *HindIII* (local onde foi clonado o fragmento de DNA contendo o gene *phaB*). Logo, digestões do vetor contendo o inserto em orientação que permitiria sua transcrição pelo promotor *lac* com a enzima *SmaI* deveriam gerar dois fragmentos, um com aproximadamente 5,1 kb e outro com aproximadamente 3,5 kb. No caso de orientação contrária, os fragmentos teriam aproximadamente 7,5 kb e 1,0 kb. Segundo perfil analisado na Figura 5.6 (coluna &), o gene *phaB*, apresentava-se em posição que permite sua transcrição pelo promotor *lac*. Diversas foram as tentativa de se conseguir o conjunto de genes empregados neste trabalho em ambas orientações, entretanto apenas o genes *phaC* e *rhlG*, além do operon *phaCAB* foram clonados em ambas as orientações. Para critério de diferenciação estes vetores foram denominados pBBR1MCS-2::*phaC*', pBBR1MCS-2::*rhlG*' e pBBR1MCS-2::*phaCAB*'.

5.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA POR LINHAGENS RECOMBINANTES

A linhagem selvagem *P. putida* IPT046 é capaz de acumular PHA_{MCL} contendo apenas uma pequena parcela de 3HB, quando detectável. Os mutantes IPT461 e IPT463 foram obtidos a partir da linhagem IPT046 submetida à mutagênese por radiação ultravioleta e seleção em gradiente de Percoll[®] para mutantes incapazes de acumular PHA a partir de carboidratos (GOMEZ, 2000). Foi proposto que o mutante IPT461 estaria afetado no gene da PHA sintase (*phaC*), uma vez que é incapaz de produzir PHA tanto a partir de carboidratos como a partir de ácidos graxos (octanoato), enquanto, o mutante IPT463 estaria afetado em gene específico para síntese de PHA a partir de carboidratos (provavelmente *phaG*), pois continuava sintetizando esse polímero a partir de ácidos graxos (GOMEZ, 2000).

Os clones recombinantes de *P. putida* IPT046, IPT461 ou IPT463 foram cultivados em meio mineral contendo excesso de glicose ou octanoato de modo a analisar os PHA produzidos a partir dessas fontes de carbono. Com o objetivo de facilitar a análise dos resultados, estes foram divididos em três tópicos diferentes: (i) linhagens recombinantes produtoras de misturas poliméricas, (ii) linhagens recombinantes potencialmente produtoras de P3HB-*co*-3HA_{MCL} e (iii) linhagens recombinantes expressando genes que direcionam intermediários do metabolismo celular para biossíntese de PHA.

5.2.1 LINHAGENS RECOMBINANTES PRODUTORAS DE MISTURAS POLIMÉRICAS

Considerando que a linhagem *P. putida* IPT046 é capaz de produzir PHA_{MCL} tanto a partir de carboidratos como de ácidos graxos e que a linhagem mutante IPT463 é capaz de produzir esse polímero a partir de ácidos graxos, mas não de carboidratos, com a expressão de genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha*, a expectativa é que essas linhagens produzam uma mistura de dois polímeros: um PHA_{MCL} contendo uma baixa fração molar de 3HB e uma PHA contendo 3HB como principal, senão único, constituinte.

Como esperado, a linhagem selvagem IPT046 transformada apenas com o vetor pBBR1MCS-2 acumulou quantidades expressivas de PHA a partir da glicose (cerca de 50% da massa seca celular), apresentando o 3HD como principal constituinte (cerca de 60 mol%) (Tabela 5.1). A linhagem selvagem IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* ainda acumulou quantidades expressivas de PHA (>30% da massa seca celular) a partir de glicose e a fração molar de 3HB foi bastante variável (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombinants	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2	4,33	6,49	0,00	3,07	31,71	62,38	2,84	47,94
	4,33	6,48	0,00	3,10	32,00	63,23	2,66	53,84
	4,01	6,51	0,00	2,94	31,77	62,42	2,88	57,14
Média	4,22	6,49	0,00	3,04	31,83	62,68	2,79	52,97
± Desvio padrão	0,18	0,02	0,00	0,09	0,15	0,48	0,12	4,66
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	3,27	6,44	26,07	3,65	18,46	48,71	3,11	31,17
	3,87	6,26	37,48	2,94	13,84	43,49	2,25	42,50
	4,18	6,46	4,30	3,51	28,69	60,75	2,74	57,85
Média	3,77	6,39	22,62	3,37	20,33	50,98	2,70	43,84
± Desvio padrão	0,46	0,11	16,86	0,38	7,60	8,85	0,43	13,39
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	3,97	5,78	24,88	3,22	20,41	49,36	2,14	57,16
	4,03	6,18	54,55	3,22	10,92	29,72	1,59	46,50
	3,23	5,68	5,31	3,79	24,24	66,65	0,00	30,94
Média	3,74	5,88	28,25	3,41	18,52	48,58	1,24	44,87
± Desvio padrão	0,45	0,26	24,79	0,33	6,86	18,48	1,11	13,19
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	2,84	5,81	5,96	4,01	24,53	61,36	4,15	26,66
	5,25	6,37	44,01	2,13	16,71	35,67	1,47	59,42
	3,26	5,94	34,86	2,64	16,44	44,41	1,65	37,19
Média	3,78	6,04	28,28	2,93	19,23	47,15	2,42	41,09
± Desvio padrão	1,29	0,29	19,86	0,97	4,59	13,06	1,50	16,72

MSC – Massa Seca Celular; 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato;
3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato; %MSC – percentual da massa seca celular.

Não foi observada diferença significativa entre a composição e teor de PHA produzido pelas linhagens recombinantes abrigando diferentes combinações de genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* (Figura 5.9). Esse resultado sugere que *P. putida* deve possuir uma atividade β -cetotilase e 3-cetoacil-CoA redutase suficiente para promover o suprimento de monômeros 3HB, uma vez que mesmo a expressão apenas do gene *phaC* foi suficiente para promover a síntese de uma mistura de polímeros contendo 3HB. Por outro lado, os grandes desvios observados na fração molar de 3HB

(Figura 5.9) sugere que o sistema de biossíntese desses monômeros pode funcionar nessas linhagens de maneira bastante variável, por vezes atingindo a capacidade de sintetizar unidades 3HB nos mesmos níveis em que são sintetizadas unidades 3HA_{MCL} e por vezes representando menos que 10% da capacidade de síntese de 3HA_{MCL}.

Figura 5.9. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrangendo genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Quando glicose é suprida como fonte de carbono, tanto 3HB como 3HA_{MCL} são sintetizados a partir de um mesmo intermediário metabólico (acetil-CoA) e os sistemas enzimáticos devem competir por esse intermediário. Os dados sugerem que o sistema de síntese de 3HB na melhor das hipóteses atinge compete em um nível com o sistema de síntese de 3HA_{MCL}. A grande variação na fração molar de 3HB detectada pode ser decorrente do maior ou menor nível de expressão do sistema capaz de incorporar 3HB à mistura polimérica.

A linhagem selvagem IPT046 transformada apenas com o vetor pBBR1MCS-2 acumulou quantidades expressivas de PHA a partir de octanoato (cerca de 37% da massa seca celular), apresentando o 3HO como principal constituinte (cerca de 75 mol%) (Tabela 5.2).

A linhagem selvagem IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* acumulou quantidades expressivas de PHA (>20% da massa seca celular) a partir de octanoato e a fração de 3HB foi bastante variável (Tabela 5.2). Não foi observada diferença significativa entre a composição e teor de PHA produzido pelas linhagens recombinantes abrigando diferentes combinações de genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* (Figura 5.10).

Tabela 5.2. Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombinants	MSC		PHA (mol%)					PHA (%MSC)
	(g/L)	pH	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2	2,20	7,56	0,88	13,74	75,42	8,25	1,71	37,81
	2,32	7,85	0,87	14,48	75,97	8,68	0,00	36,58
	2,32	7,85	0,85	14,25	74,79	8,55	1,56	37,40
Média	2,28	7,75	0,87	14,16	75,39	8,49	1,09	37,26
± Desvio padrão	0,07	0,17	0,02	0,38	0,59	0,22	0,95	0,63
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	2,34	7,82	77,56	5,38	13,63	2,68	0,75	51,03
	2,58	8,10	66,88	6,56	21,26	4,42	0,87	48,18
	2,02	8,12	22,28	10,61	53,23	11,92	1,97	39,02
Média	2,31	8,01	55,57	7,52	29,37	6,34	1,20	46,08
± Desvio padrão	0,28	0,17	29,32	2,74	21,01	4,91	0,67	6,28
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	2,78	8,23	16,68	16,13	59,18	5,79	2,21	23,87
	2,22	7,54	39,38	10,21	43,32	5,94	1,15	43,56
	2,48	8,01	24,04	16,76	52,46	5,66	1,08	43,72
Média	2,49	7,93	26,70	14,37	51,65	5,80	1,48	37,05
± Desvio padrão	0,28	0,35	11,58	3,61	7,96	0,14	0,63	11,41
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	2,99	8,09	4,67	19,98	66,80	6,73	1,82	30,85
	2,27	7,39	66,81	5,84	21,87	4,50	0,98	48,41
	2,44	8,09	13,98	15,52	62,80	6,39	1,31	42,06
Média	2,57	7,86	28,49	13,78	50,49	5,87	1,37	40,44
± Desvio padrão	0,38	0,40	33,51	7,23	24,87	1,20	0,42	8,89

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.10. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Na síntese de PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos é citado na literatura que os monômeros são derivados principalmente da β -oxidação de ácidos graxos. A detecção do monômero 3HD sugere que a condensação de acetil-CoA e octanoil-CoA pode ocorrer ou ainda que a via de biossíntese de ácidos graxos também pode contribuir com o fornecimento desse monômero.

A síntese de monômeros 3HB a partir de octanoato quando apenas o gene *phaC* foi expresso confirma a presença de uma atividade 3-cetoacil-CoA redutase em *P. putida* IPT046, como já havia sido verificado na biossíntese de PHA a partir de glicose por *P. putida* IPT046 abrigando esse mesmo gene. Entretanto, o cultivo em octanoato não permite concluir sobre a presença de uma atividade β -cetotiolase, uma vez que os monômeros contendo 4 carbonos poderiam ser derivados diretamente a partir do ciclo de β -oxidação, não necessitando de uma reação de condensação catalisada por uma β -cetotiolase.

Novamente, a grande variação na fração molar de 3HB sugere que o sistema de biossíntese desses monômeros pode funcionar de forma bastante variável. Deve-se levar em conta, entretanto, que no caso do uso do octanoato como fonte de carbono, 3HB pode ser suprido tanto a partir da β -oxidação como a partir da condensação de duas moléculas de acetil-CoA.

Shin e colaboradores (2002) observaram que linhagem recombinante de *P. putida* KT2440 abrigando os genes *phaCAB* de *R. eutropha* produziam PHA com composição muito variável dependendo da fonte de carbono suprida. A partir de gliconato (um carboidrato obtido pela oxidação da glicose), o PHA produzido continha cerca de 80% de 3HB e a partir de octanoato continha cerca de 95% de monômeros HA_{MCL}. Misturas de gliconato e octanoato permitiam a síntese de PHA com composições intermediárias. Neste trabalho, a composição de PHA apresentou grande variação independentemente da fonte de carbono fornecida (carboidrato ou ácido graxo), indicando que não é possível utilizar a mesma estratégia apresentada por Shin e colaboradores (2002) para a obtenção de misturas poliméricas de diferentes composições. Os resultados também sugerem que o nível de expressão da PHA sintase do tipo I ou das enzimas geradoras de monômeros 3HB é crucial para promover a síntese desses monômeros ou sua incorporação ao PHA.

Timm e colaboradores (1990) expressaram os genes *phaCAB* de *R. eutropha* em *Pseudomonas oleovorans* (*P. oleovorans* é um biovar de *P. putida* incapaz de acumular PHA a partir de carboidratos, mas ainda capaz de produzi-los a partir de ácidos graxos). Essa linhagem recombinante produziu misturas de polímeros contendo 3HB e 3HA_{MCL}. A fração de 3HB e 3HA_{MCL} variou ao longo do tempo de cultivo. Os resultados obtidos com *P. putida* IPT046 abrigando genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha* sugerem que o nível de expressão e/ou capacidade de competição por intermediários metabólicos devem ter influência sobre a capacidade dessa bactéria sintetizar misturas de PHA.

A análise da orientação dos genes de biossíntese de PHA nos plasmídios indicou que todos eles eram expressos exclusivamente a partir do promotor original do operon de *R. eutropha*, uma vez que encontravam-se na orientação inversa àquela que permitiria a sua transcrição dirigida pelo promotor do gene *lacZ* presente no plasmídio pBBR1MCS-2. Talvez um nível de expressão aumentada dos genes de biossíntese de PHA possa ser mais efetivo em proporcionar uma síntese de quantidades mais expressivas de 3HB nas misturas poliméricas produzidas por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046.

Tabela 5.3. Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombin.ants	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2	1,71	7,84	1,04	15,13	79,55	3,02	1,26	39,48
	2,26	7,84	0,71	14,68	78,34	4,72	1,54	39,33
	1,55	7,66	0,51	17,01	78,80	6,61	0,00	48,99
Média	1,84	7,78	0,75	15,61	78,90	4,78	0,93	42,60
± Desvio padrão	0,37	0,10	0,27	1,24	0,61	1,80	0,82	5,53
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	1,88	7,98	52,00	8,88	36,95	2,17	Tr	52,74
	1,75	8,09	74,12	6,21	17,91	1,14	0,61	67,52
	1,97	8,11	55,46	9,20	33,19	2,15	Tr	65,24
Média	1,87	8,06	60,53	8,10	29,35	1,82	0,61	61,83
± Desvio padrão	0,11	0,07	11,90	1,64	10,08	0,59	0,00	7,96
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	1,81	7,29	6,66	20,18	71,61	1,56	0,00	34,15
	1,94	7,89	30,66	8,47	57,07	2,19	1,61	65,03
	1,87	7,96	53,20	8,86	35,04	1,74	1,15	45,60
Média	1,87	7,71	30,17	12,50	54,57	1,83	0,92	48,26
± Desvio padrão	0,07	0,37	23,27	6,65	18,41	0,32	0,00	15,61
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	2,01	7,90	65,06	7,22	25,42	1,24	0,86	49,31
	1,98	8,01	31,40	12,33	51,82	2,82	1,63	35,99
	2,16	7,86	4,57	15,32	74,30	3,38	2,23	29,03
Média	2,05	7,92	33,68	11,62	50,51	2,48	1,57	38,11
± Desvio padrão	0,10	0,08	30,31	4,10	24,47	1,11	0,00	10,30
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB'</i>	2,58	7,95	86,47	3,90	8,30	0,76	0,57	63,37
	2,90	7,82	72,98	5,85	19,59	0,91	0,68	54,25
	2,45	7,85	62,27	7,55	27,51	1,69	0,98	47,87
Média	2,64	7,87	73,91	5,77	18,47	1,12	0,74	55,16
± Desvio padrão	0,23	0,07	12,13	1,83	9,65	0,50	0,00	7,79

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Nos cultivos em octanoato, as linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT046 ou IPT463 deveriam apresentar um comportamento semelhante já que o mutante IPT463 também é capaz de produzir PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos (GOMEZ, 2000). A linhagem IPT463 transformada apenas com o vetor pBBR1MCS-2 acumulou quantidades expressivas de PHA a partir de octanoato (cerca de 40% da massa seca celular), apresentando o 3HO como principal constituinte (cerca de 79 mol%) (Tabela 5.3), resultados estes muito semelhantes àqueles observados com a linhagem IPT046. A linhagem IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* ainda acumulou quantidades expressivas de PHA (> 30% da massa seca celular) a partir de octanoato e a fração de 3HB foi bastante variável (Tabela 5.3). Não foi observada diferença significativa entre a composição e teor de PHA produzido pelas linhagens recombinantes abrigando diferentes combinações de genes de biossíntese de

PHA de *R. eutropha* (Figura 5.11), como também havia sido observado para as linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046.

Figura 5.11. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Como indicado anteriormente, a presença do monômero 3HD sugere que a condensação de acetil-CoA a octanoil-CoA pode ocorrer ou ainda que a via de biossíntese de ácidos graxos também pode contribuir com o fornecimento de monômeros. Uma vez que o mutante IPT463 deve estar afetado no gene *phaG*, que direciona intermediários do metabolismo de biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de PHA (REHM et al., 1998), este mutante deveria ser incapaz de dirigir os monômeros 3HD para biossíntese de PHA.

A Figura 5.12 compara as frações molares de 3HD presentes no PHA produzido por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 e IPT463. Como se observa, a fração molar de 3HD foi significativamente menor nas linhagens recombinantes de IPT463 abrigando somente o vetor pBBR1MCS-2, bem como aquelas abrigando os genes *phaCB* ou *phaCAB* quando comparadas as linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando os mesmos plasmídeos, compatível com uma redução no suprimento de monômeros 3HD em decorrência da deficiência no produto do gene *phaG*.

Figura 5.12. Fração molar de 3HD em PHA produzidos a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 ou IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Shin e colaboradores propuseram a produção de misturas poliméricas em linhagem recombinante de *P. putida* KT2440. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que esse sistema de produção não deve ser viável, uma vez a fração de 3HB presente na mistura se apresenta bastante variável e não pode ser controlada através da fonte de carbono suprida. Além disso, misturas de dois polímeros como P3HB e PHA_{MCL} não devem ser homogêneas uma vez que apresentam propriedades muito diferentes. P3HB apresenta temperatura de fusão (T_m) próxima a 180 °C (SUDESH et al., 2000), enquanto PHA_{MCL} apresenta uma T_m de cerca de 60 °C (DE KONING et al., 1994). Assim, o uso de temperaturas para o processamento da mistura levaria a fusão dos materiais a temperaturas muito diferentes. PHA_{MCL} apresentam ainda uma taxa de cristalização mais lenta que o P3HB (DE KONING et al., 1994), o que faria com que os polímeros atingissem o estado sólido em tempos também muito diferentes. Dessa forma, o mais interessante seria obter co-polímeros contendo em uma mesma cadeia polimérica 3HB e 3HA_{MCL}.

5.2.2 LINHAGENS RECOMBINANTES POTENCIALMENTE PRODUTORAS DE P3HB-CO-3HA_{MCL}.

Para a produção de co-polímeros contendo 3HB e 3HA_{MCL} a estratégia proposta seria expressar o gene da PHA sintase de *R. eutropha* combinado ou não a outros genes em mutantes de *P. putida* deficientes no acúmulo de PHA_{MCL}. Dessa forma, o metabolismo da linhagem hospedeira supriria os monômeros 3HB e 3HA_{MCL} e a PHA sintase recombinante, caso apresente especificidade por esses monômeros, os incorporaria à cadeia polimérica. A expressão dos genes *phaA* e *phaB* poderia ainda contribuir para a síntese de 3HB alterando a composição do PHA. Neste item, serão analisados os PHA produzidos por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 quando cultivada em glicose ou octanoato e linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 quando cultivada em glicose, ou seja, naquelas condições em que essas linhagens não são capazes de sintetizar PHA_{MCL}.

O mutante IPT461 abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2 demonstrou uma deficiência no acúmulo de PHA, sendo que a quantidade detectada, tanto a partir de glicose (Tabela 5.4) como a partir de octanoato (Tabela 5.5), foi muito pequena (<2% da massa seca celular). Provavelmente, esses 3HA detectados correspondem a monômeros livres e não a um polímero propriamente. Da mesma forma, para o mutante IPT463 abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2 quando cultivado em glicose (Tabela 5.6), detectou-se apenas uma pequena quantidade de 3HA (<2% da massa seca celular), que, provavelmente, também correspondem a monômeros livres e não PHA propriamente.

A expressão de genes de *R. eutropha* em *P. putida* IPT 461 levou ao acúmulo de quantidades expressivas de PHA a partir de glicose (Tabela 5.4 - até cerca de 40% da massa seca celular) ou octanoato (Tabela 5.5 - até cerca de 55% da massa seca celular). Linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 acumularam PHA correspondendo até cerca de 40% da massa seca celular a partir de octanoato (Tabela 5.6). Não foi observada diferenças significativas no teor de PHA acumulado pelas linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 ou IPT463 abrigando diferentes combinações de genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*, quando cultivadas em glicose (Figuras 5.13 e 5.15), mesmo quando comparadas as expressões dos genes *phaCAB* sob o

controle apenas do promotor original do operon (*phaCAB*) ou podendo também ser dirigida pelo promotor *lac* (*phaCAB*⁺). Por outro lado, no cultivo utilizando octanoato, observaram-se diferenças significativas no teor de PHA acumulado por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 (Figura 5.14). O gene *phaC* expresso isoladamente levou ao maior acúmulo de PHA e a combinação *phaCB* ao menor acúmulo de PHA. O teor de PHA acumulado em linhagens expressando os genes *phaCAB* (seja com a expressão dirigida pelo promotor do operon ou também pelo promotor *lac*) não foi significativamente diferente (Figura 5.14).

Tabela 5.4. Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombinantes	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2	1,81	5,76	0,00	0,00	15,57	45,81	38,63	1,84
	2,16	5,04	0,00	0,00	0,00	100	0,00	0,63
	2,19	5,17	0,00	0,00	0,00	100	0,00	0,64
Média	2,05	5,32	0,00	0,00	5,19	81,94	12,88	1,04
± Desvio padrão	0,21	0,38	0,00	0,00	8,99	31,29	0,00	0,70
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	2,74	5,27	95,01	1,71	1,48	0,81	0,99	27,28
	2,88	5,03	95,11	1,71	1,38	0,84	0,97	29,53
	3,50	5,45	95,19	1,84	1,46	0,70	0,81	33,68
Média	3,04	5,25	95,10	1,75	1,44	0,78	0,92	30,16
± Desvio padrão	0,40	0,21	0,09	0,08	0,05	0,07	0,00	3,25
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	2,99	5,70	95,78	2,18	0,70	0,57	0,76	32,05
	3,43	5,44	96,98	1,88	0,61	0,42	0,00	43,45
	3,94	5,72	95,83	2,46	0,72	0,44	0,55	42,79
Média	3,45	5,62	96,20	2,17	0,68	0,48	0,44	39,43
± Desvio padrão	0,48	0,16	0,68	0,29	0,06	0,08	0,00	6,40
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	4,01	6,51	96,95	0,46	0,00	1,24	1,64	22,25
	4,18	6,51	96,66	0,41	0,00	1,23	1,70	21,42
	3,99	6,52	97,37	0,41	0,16	0,86	1,21	28,44
Média	4,06	6,51	96,99	0,43	0,05	1,11	1,52	24,04
± Desvio padrão	0,10	0,01	0,36	0,03	0,09	0,22	0,00	3,84
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i> ⁺	4,01	6,45	98,58	0,12	0,00	0,57	0,73	40,33
	4,07	6,47	98,49	0,12	0,00	0,58	0,81	40,56
	3,98	6,46	98,60	0,12	0,00	0,56	0,73	38,87
Média	4,02	6,46	98,56	0,12	0,00	0,57	0,76	39,92
± Desvio padrão	0,05	0,01	0,06	0,00	0,00	0,01	0,00	0,92

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.13. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Tabela 5.5. Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombinantes	MSC		PHA (mol%)					PHA (%MSC)
	(g/L)	pH	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2	0,98	7,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,14	7,65	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	1,22	7,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média	1,11	7,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
± Desvio padrão	0,12	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	2,14	8,12	93,60	4,05	1,86	0,00	0,49	49,68
	2,39	7,84	93,55	4,04	1,73	0,27	0,41	62,22
	2,15	8,18	93,18	4,24	1,74	0,33	0,52	56,19
Média	2,23	8,05	93,44	4,11	1,78	0,20	0,47	56,03
± Desvio padrão	0,14	0,18	0,23	0,11	0,07	0,18	0,00	6,27
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	1,80	7,01	93,06	2,22	0,00	2,73	1,98	13,07
	1,11	7,58	88,62	2,52	1,95	2,79	4,13	12,52
	1,40	7,97	89,73	3,92	1,76	1,84	2,74	18,82
Média	1,44	7,52	90,47	2,89	1,24	2,45	2,95	14,80
± Desvio padrão	0,35	0,48	2,31	0,91	1,08	0,53	0,00	3,49
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	1,75	8,17	94,48	2,51	1,17	0,74	1,09	37,40
	2,13	8,21	94,32	2,77	1,18	0,71	1,01	38,45
	2,02	8,26	94,46	2,55	1,27	0,70	1,02	37,07
Média	1,97	8,21	94,42	2,61	1,21	0,72	1,04	37,64
± Desvio padrão	0,20	0,05	0,09	0,14	0,06	0,02	0,00	0,72
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB'</i>	2,06	8,3	97,04	0,62	0,51	0,68	1,15	35,16
	2,09	8,22	97,08	0,69	0,52	0,61	1,09	37,66
	2,13	8,33	96,93	0,71	0,57	0,66	1,13	33,19
Média	2,09	8,28	97,02	0,67	0,53	0,65	1,12	35,34
± Desvio padrão	0,04	0,06	0,08	0,05	0,03	0,04	0,00	2,24

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxi butirato 3HHx – 3-hidroxi hexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxi decanoato 3HDd – 3-hidroxi dodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.14. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Tabela 5.6. Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Linhagens recombinantes	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2	1,15	5,40	0,00	0,00	0,00	41,39	58,61	1,57
	2,00	4,92	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	1,12
	2,40	5,08	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	1,21
Média	1,85	5,13	0,00	0,00	0,00	80,46	19,54	1,30
± Desvio padrão	0,64	0,24	0,00	0,00	0,00	33,84	0,00	0,24
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	2,83	5,06	98,14	0,00	0,00	0,80	1,06	25,79
	2,86	5,01	97,79	0,20	0,12	0,84	1,05	28,59
	3,22	5,49	98,12	0,17	0,11	0,70	0,90	32,46
Média	2,97	5,19	98,02	0,12	0,08	0,78	1,00	28,95
± Desvio padrão	0,22	0,26	0,20	0,11	0,07	0,07	0,00	3,35
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCB</i>	2,94	4,93	98,22	0,00	0,00	0,84	0,94	28,53
	3,07	5,09	98,06	0,13	0,09	0,81	0,88	35,88
	3,79	5,60	98,49	0,13	0,08	0,62	0,68	41,09
Média	3,27	5,21	98,26	0,09	0,06	0,76	0,83	35,17
± Desvio padrão	0,46	0,35	0,22	0,08	0,05	0,12	0,00	6,31
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB</i>	1,97	5,58	96,33	0,00	0,00	1,71	1,95	18,76
	2,01	7,90	98,28	0,00	0,00	0,81	0,91	39,14
	2,69	5,05	95,09	0,26	0,33	2,03	2,28	22,01
Média	2,22	6,18	96,57	0,09	0,11	1,52	1,71	26,64
± Desvio padrão	0,40	1,52	1,61	0,15	0,19	0,63	0,00	10,95
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaCAB'</i>	2,41	5,65	87,52	0,40	0,00	6,18	5,90	9,58
	2,39	5,55	96,67	0,22	0,26	1,47	1,38	27,24
	2,87	5,66	95,82	0,28	0,33	1,82	1,74	25,04
Média	2,56	5,62	93,34	0,30	0,20	3,16	3,01	20,62
± Desvio padrão	0,27	0,06	5,06	0,09	0,17	2,62	0,00	9,62

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidcanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.15. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Nos PHA produzidos por todas essas linhagens recombinantes, o 3HB foi detectado como principal constituinte correspondendo a mais que 90% dos monômeros detectados. A expectativa era que as linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT463 produzissem apenas o homopolímero P3HB, uma vez que na ausência de uma transacilase ativa (PhaG), os intermediários da biossíntese de ácidos graxos não poderiam ser canalizados e utilizado pela PHA sintases de *R. eutropha* ou da própria *P. putida*. Entretanto, a fração molar de 3HA_{MCL} observada para essa linhagem foi igual ou superior àquela observada para linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT461. Estudos adicionais serão necessários para comprovar se o PHA produzido por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 é realmente um co-polímero ou se os monômeros 3HA_{MCL} estão livres e não polimerizados, ou ainda, polimerizados formando pequena quantidade de um PHA_{MCL} como resultado da PHA sintase do tipo II presente nesse mutante.

A linhagem IPT 461 quando abrigando os genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* produziu a partir de glicose uma quantidade expressiva de PHA (20-40% da massa seca celular) contendo uma importante fração de 3HB (>95 mol%). Uma vez que esta linhagem não apresentam a PHA sintase original de *P. putida* ativa, devem sintetizar um PHA contendo essencialmente 3HB, a partir da ação da PHA sintase

proveniente de *R. eutropha*. Além disso, como este mutante deve apresentar uma transacilase ativa (PhaG) poderia direcionar intermediários (3HA_{MCL}) da biossíntese de ácidos graxos para serem incorporados pela PHA sintase de *R. eutropha*. Assim, seria gerado um polímero contendo 3HB e 3HA_{MCL}. A análise de células liofilizadas é compatível com essa proposição, uma vez que foram detectados 3HHx, 3HO, 3HD e 3HDd, embora com frações molares semelhantes àsquelas detectadas para linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463, o que não exclui a possibilidade de se tratarem de monômeros livres e não propriamente incorporados ao PHA.

A análise da fração molar de 3HB detectada nos PHA pode ainda ser utilizada para avaliar a contribuição dos produtos dos genes *phaA* e *phaB* para síntese desses monômeros. Não foram observadas diferenças significativas na fração molar de 3HB nos cultivos de linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando diferentes combinações de genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha* a partir de glicose (Figura 5.16).

Figura 5.16. Teor de 3HB no PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Por outro lado, diferenças significativas foram observadas para linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT461. A fração molar de 3HB parece aumentar gradativamente quando são expressos os genes *phaB* e *phaAB*, sobretudo quando a expressão desses é dirigida pelo promotor *lac* quando glicose foi suprida como fonte de carbono (Figura 5.17). A partir de octanoato, a mesma tendência foi observada

(Figura 5.18), com exceção da expressão da combinação de genes *phaCB*, na qual se observa uma redução da fração 3HB. Deve-se considerar, entretanto, que essa combinação de genes nessa fonte de carbono levou ao acúmulo de teores reduzidos de PHA (Figura 5.14).

Figura 5.17. Teor de 3HB no PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Figura 5.18. Teor de 3HB no PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*.

Com o objetivo de excluir a hipótese que os HA_{MCL} detectados nos PHA produzidos por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 corresponderiam a monômeros livres não efetivamente incorporados ao PHA, o polímero foi extraído de células liofilizadas utilizando clorofórmio e analisado por CG (cromatografia gasosa) e CG-MS (cromatografia gasosa associada espectrometria de massas). A Tabela 5.7 apresenta os resultados de composição do polímero quando analisado nas células liofilizadas e após extração por CG.

Tabela 5.7. Composição de PHA produzido por linhagem recombinante de *P. putida* IPT461 a partir de carboidratos. Análise de células liofilizadas e polímero purificado.

Linhagens recombinantes	Fonte de carbono	Material	PHA (mol%)				
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2	Glicose	Cel. Liof.	0,00	0,00	0,00	47,99	52,01
		Polímero	-	-	-	-	-
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2 <i>phaC</i>	Glicose	Cel. Liof.	91,59	4,10	3,28	1,03	Tr
		Polímero 1	92,38	4,33	3,29	0,00	0,00
		Polímero 2	93,25	3,60	2,88	0,27	0,00
		Polímero 3	92,83	4,35	2,82	0,00	0,00
		Composição média (Polímeros 1, 2 e 3)	92,82	4,09	3,00	0,09	0,00
		± Desvio padrão (Polímeros 1,2 e 3)	0,44	0,43	0,26	0,16	0,00

3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato
 3HDd – 3-hidroxidodecanoato Cel. Liof. – células liofilizadas Polímeros 1, 2 e 3 – polímeros purificados em três produções independentes.

Como pode ser observado na Tabela 5.22, não foi possível purificar PHA a partir da linhagem *P. putida* IPT461 abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2, corroborando a afirmação que os monômeros detectados na análise de células liofilizadas devem estar livres e não polimerizados. No PHA purificado a partir de células de *P. putida* IPT461 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaC* e cultivada em glicose ainda foram detectados os monômeros 3HHx e 3HO, além do 3HB. 3HD foi detectado em pequena quantidade em uma das amostras e 3HDd não foi detectado em qualquer das amostras. Os dados de análise por CG do polímero produzido por *P. putida* IPT461 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaC* sugerem a produção do copolímero P93%3HB-co-4%3HHx-co-3%3HO.

O PHA purificado foi analisado por CG-MS e os espectros de massas correspondentes aos picos 3HB, 3HHx e 3HO foram analisados (Figura 5.19). O perfil

de massas dos fragmentos obtidos são compatíveis com os valores esperados para esses monômeros. Para todos os picos foi detectado o fragmento de m/e 131, correspondente a alfa-clivagem do grupo funcional hidroxil de propil-ésteres de 3-hidroxiácidos (LEE e CHOI, 1995). Além disso, são também detectados os fragmentos com $m/e = [M-59]$ que correspondem a 87, 115 e 143, respectivamente, para os propil-ésteres dos ácidos 3-hidroxibutírico, 3-hidroxihexanóico e 3-hidroxiocetanóico.

Figura 5.19. Espectro de massas relativos a propil-ésteres de 3-hidroxiálcanoatos.
A. 3-hidroxi butiril-propil-éster. **B.** 3-hidroxi hexanoil-propil-éster.
C. 3-hidroxi octanoil-propil-éster.

Trabalhos anteriores demonstraram que a PHA sintase de *R. eutropha* é capaz de incorporar 3HHx (Dennis *et al.*, 1998) e 3HO (ANTONIO *et al.*, 2000) ao PHA sendo sintetizado, mas esta é a primeira vez que se demonstra a síntese desse terpolímero em um mesmo cultivo. Além disso, deve-se destacar que nos outros trabalhos o PHA foi obtido somente a partir de ácidos graxos e neste trabalho foi possível obtê-lo utilizando glicose como fonte de carbono. É possível que IPT 461 abrigando genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha* também seja capaz de produzir um PHA contendo 3HB e 3HA_{MCL} a partir de ácido octanóico (Tabela 5.5 e Figura 5.14), embora para confirmar essa capacidade será necessário purificar o PHA produzido.

Chen *et al.*, (2006) demonstraram que a expressão de uma das PHA sintases de *P. stutzeri* (*phaC2*) em mutante *pha* negativo de *R. eutropha* permitiu o acúmulo de P3HB a partir de gliconato e de PHA_{MCL} contendo 3HB a partir de ácidos graxos, a composição do PHA pode ser controlada com o fornecimento de misturas de gliconato e ácidos graxos, permitindo a produção de PHA contendo entre 37 e 90 mol% de 3HB. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a PHA sintase de *R. eutropha* (tipo I), embora permita a incorporação de HA_{MCL}, é muito mais específica que a PHA sintase de *P. stutzeri* (tipo II), uma vez que a fração molar de 3HB foi muito semelhante nos PHA produzidos a partir de glicose (Tabela 5.4) e octanoato (Tabela 5.5).

Embora seja presumível que mutantes de *Pseudomonas* incapazes de acumular PHA seriam hospedeiros adequados para a expressão de genes de PHA sintase do tipo I em trabalhos com o objetivo de produção de P3HB-*co*-3HA_{MCL}, pois essas linhagens podem apresentar um suprimento expressivo de 3HA_{MCL} mesmo a partir de carboidratos, poucos trabalhos exploraram esse aspecto. Em alguns casos, os genes de PHA sintases do tipo I foram expressos mais em linhagens selvagens de *P. putida* (TIMM e STEINBÜCHEL, 1990; SHIN *et al.*, 2002) e a comprovação da produção do copolímero dependeria de experimentos de fracionamento e análise das frações poliméricas, não realizadas. Recentemente, foi obtido um mutante de *P. putida* KT2442 por nocaute dos genes *phaC1-phaZ-phaC2* e foram expressas nesse mutante diferentes PHA sintases (OUYANG *et al.*, 2007). Quando as PHA sintases de *A. hydrophila* e *P. stutzeri* foram expressas foi detectada a produção de P3HB-*co*-3HHx e P3HB-*co*-3HA_{MCL}, respectivamente, a partir de ácido láurico. Entretanto, a expressão da PHA sintase de *R. eutropha* levou à produção apenas do homopolímero P3HB. Estes resultados sugerem que *P. putida* KT2442 não apresenta um suprimento suficiente de monômeros 3HA_{MCL} capaz de ser utilizado pela PHA sintase de *R. eutropha* que

apresenta baixa especificidade por esses monômeros. Por outro, lado o mutante de *P. putida* IPT046 analisado neste trabalho levou a produção de P3HB-*co*-3HA_{MCL} mesmo a partir de carboidratos, sugerindo que *P. putida* IPT046 é uma linhagem melhor supridora de monômeros 3HA_{MCL}.

5.2.3 LINHAGENS RECOMBINANTES EXPRESSANDO GENES QUE DIRECIONAM INTERMEDIÁRIOS DO METABOLISMO CELULAR PARA BIOSÍNTESE DE PHA

O gene *phaB* codifica uma 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente, que catalisa a conversão de um 3-cetoacil-CoA em um (*R*)-3-hidroxiacil-CoA. Claramente PhaB participa da formação de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA no processo de biossíntese de P3HB (HAYWOOD et al., 1988). Além disso, também deve catalisar a conversão de 3-cetohexanoil-CoA a (*R*)-3-hidroxihexanoil-CoA (HAYWOOD et al., 1988; DENNIS et al., 1998).

Campos-Garcia e colaboradores (1998) propuseram que o produto do gene *rhlG* estaria envolvido na conversão de 3-cetodecanoil-ACP em 3-hidroxi-decanoil-ACP no processo de biossíntese de ramnolipídios. Ramnolipídios são biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa* que apresentam 3-hidroxi-alcanoatos em sua composição. A relevância de RhlG na biossíntese de ramnolipídios foi confirmada por Rehm e colaboradores (2001). Entretanto, com base em estudos bioquímicos e estruturais, Miller e colaboradores (2006) sugerem que RhlG não poderia representar a enzima que faria a interligação entre biossíntese de ácidos graxos e a biossíntese de ramnolipídios. Recentemente, Zhu e Rock (2008), analisando mutantes deficientes no gene *rhlG* propuseram que o produto desse gene não apresentaria qualquer papel na biossíntese de ramnolipídios. Park e colaboradores (2002) analisaram a expressão do gene *rhlG* em linhagens recombinantes de *E. coli* produtoras de PHA_{MCL} e propuseram um papel relevante do produto desse gene na biossíntese desses polímeros, levando a um aumento da fração molar de 3HD detectada no PHA. Embora seja ainda bastante controverso o papel desempenhado pelo produto do gene *rhlG*, sua função foi proposta com base em sua similaridade a outros genes que codificam 3-cetoacil redutases (CAMPOS-GARCIA et al., 1998).

Neste trabalho, foram utilizadas linhagens recombinantes de *P. putida* com o objetivo de avaliar a relevância dos produtos dos genes *phaB* e *rhlG* no direcionamento de intermediários do metabolismo de ácidos graxos para a biossíntese de PHA.

Inicialmente, foram analisadas linhagens recombinantes capazes de produzir PHA_{MCL}, ou seja, linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT461, quando cultivadas em octanoato (Tabela 5.8) ou glicose (Tabela 5.9), e linhagens recombinantes obtidas a partir de *P. putida* IPT463, quando cultivadas em octanoato (Tabela 5.8).

Os teores de PHA acumulados por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 ou IPT463 quando cultivadas em octanoato foram semelhantes (Tabela 5.8 e Figuras 5.20 e 5.21). A composição do polímero produzido por linhagens recombinantes expressando o gene *phaB* indicou um aumento significativo das frações de 3HB e 3HHx, bem como uma redução da fração de 3HO (Figuras 5.20 e 5.21). A fração de 3HB detectada nas linhagens recombinantes expressando o gene *phaB* foi superior a três vezes a fração detectada nas linhagens expressando apenas o vetor pBBR1MCS-2. O aumento na fração de 3HHx com a expressão do gene *phaB* foi de cerca de 30-35%. Esses resultados são compatíveis com aqueles observados por Haywood e colaboradores (1988) que detectaram uma atividade de 3-cetoacil-CoA redutase em *R. eutropha* que correspondia 3,6% para 3-cetohexanoil-CoA em relação à atividade dessa mesma enzima para 3-cetobutiril-CoA.

Não foram observadas alterações significativas na composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 ou IPT463 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*rhlG* (Figuras 5.20 e 5.21) quando comparados as linhagens controle (abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2). No trabalho de Park e colaboradores (2002), foi observado um aumento na fração de 3HD no PHA produzido a partir de ácido decanóico quando *rhlG* foi expresso. Nos experimentos realizados neste trabalho talvez não se tenha observado o efeito do produto do gene *rhlG* devido ao fato de se ter utilizado ácido octanóico como fonte de carbono.

Com o objetivo de confirmar as alterações na composição do PHA_{MCL} produzido por *P. putida* IPT 046 expressando o gene *phaB*, o polímero foi extraído com clorofórmio a partir das células liofilizadas e analisada sua composição (Tabela 5.9). Os resultados são compatíveis com um fluxo aumentado de 3HB e 3HHx decorrente da expressão de *phaB*.

Nos cultivos em glicose utilizando linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 (Tabela 5.10 e Figura 5.22) foi observado também um aumento da fração molar de 3HB com a expressão do gene *phaB*. A fração molar de 3HD também sofreu um aumento e a de 3HO uma redução. Embora o valor médio da fração de 3HHx também foi maior na linhagem expressando o gene *phaB* quando comparada à linhagem abrigando apenas o vetor, esse valor não foi significativo em relação à situação controle. Não foi observada alterações significativas na composição do PHA com a expressão do gene *rhlG* em *P. putida* IPT046 a partir de glicose.

Tabela 5.8. Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 ou IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.

Linhagens recombinantes	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2	2,20	7,56	0,88	13,74	75,42	8,25	1,71	37,81
	2,32	7,85	0,87	14,48	75,97	8,68	0,00	36,58
	2,32	7,85	0,85	14,25	74,79	8,55	1,56	37,40
Média	2,28	7,75	0,87	14,16	75,39	8,49	1,09	37,26
± Desvio padrão	0,07	0,17	0,02	0,38	0,59	0,22	0,00	0,63
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaB'</i>	2,95	7,78	3,49	20,87	70,17	3,91	1,56	40,10
	2,15	7,81	3,11	21,35	68,28	6,82	0,45	39,36
	2,52	8,06	3,27	22,03	67,86	5,7	1,15	44,23
Média	2,54	7,88	3,29	21,42	68,77	5,48	1,05	41,23
± Desvio padrão	0,40	0,15	0,19	0,58	1,23	1,47	0,00	2,62
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>rhlG'</i>	2,29	7,79	0,85	15,80	74,83	6,67	1,85	39,21
	2,26	8,03	0,01	14,05	74,99	8,49	2,45	31,79
	2,50	8,02	0,01	13,89	74,49	9,00	2,61	29,13
Média	2,35	7,95	0,29	14,58	74,77	8,05	2,30	33,38
± Desvio padrão	0,13	0,14	0,48	1,06	0,26	1,22	0,00	5,22
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2	1,71	7,84	1,04	15,13	79,55	3,02	1,26	39,48
	2,26	7,84	0,71	14,68	78,34	4,72	1,54	39,33
	1,55	7,66	0,51	17,01	78,80	6,61	0,00	48,99
Média	1,84	7,78	0,75	15,61	78,90	4,78	0,93	42,60
± Desvio padrão	0,37	0,10	0,27	1,24	0,61	1,80	0,00	5,53
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>phaB'</i>	1,69	7,98	3,47	20,91	72,92	1,79	0,9	38,34
	1,89	7,97	3,53	20,99	71,65	2,5	1,38	38,69
	1,89	7,95	2,79	19,99	72,98	2,81	1,44	41,98
Média	1,82	7,97	3,26	20,63	72,52	2,37	1,24	39,67
± Desvio padrão	0,12	0,02	0,41	0,56	0,75	0,52	0,00	2,01
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2 <i>rhlG'</i>	2,29	7,79	1,02	16,48	78,39	2,39	1,71	41,99
	2,54	7,88	1,21	16,24	76,49	3,92	2,15	29,94
	2,30	8,03	0,65	14,71	78,57	4,14	1,92	38,10
Média	2,38	7,90	0,96	15,81	77,82	3,48	1,93	36,68
± Desvio padrão	0,14	0,12	0,28	0,96	1,15	0,95	0,00	6,15

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.20. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.

Figura 5.21. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.

Tabela 5.9. Alteração na composição de PHA produzido por *P. putida* IPT046 devido a ação do produto do gene *phaB*.

Linhasgens recombinantes	Fonte de carbono	Material	PHA (mol%)				
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2	Octanoato	Cel. Liof.	0,71	13,69	73,72	9,95	1,34
		Polímero	0,86	14,35	75,14	9,65	Tr
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaB</i>	Octanoato	Cel. Liof.	0,00	15,13	57,02	12,10	15,76
		Polímero	2,75	20,52	74,99	1,73	Tr

3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato 3HD – 3-hidroxidecanoato
 3HDd – 3-hidroxidodecanoato Cel. Liof. – células liofilizadas Polímero – polímero purificado.

Tabela 5.10. Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.

Linhasgens recombinantes	MSC		PHA (mol%)					PHA (%MSC)
	(g/L)	pH	3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2	4,33	6,49	0,00	3,07	31,71	62,38	2,84	47,94
	4,33	6,48	0,00	3,10	32,00	63,23	2,66	53,84
	4,01	6,51	0,00	2,94	31,77	62,42	2,88	57,14
Média	4,22	6,49	0,00	3,04	31,83	62,68	2,79	52,97
± Desvio padrão	0,18	0,02	0,00	0,09	0,15	0,48	0,00	4,66
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>phaB</i> '	3,40	5,77	3,95	6,61	23,32	65,82	3,30	46,57
	3,10	5,35	4,33	3,44	22,36	66,31	3,56	37,43
	3,39	5,45	4,10	3,50	23,12	65,70	3,58	40,15
Média	3,30	5,52	4,13	4,52	22,93	65,94	3,48	41,38
± Desvio padrão	0,17	0,22	0,19	1,81	0,51	0,32	0,00	4,69
<i>P.putida</i> IPT046 pBBR1MCS-2 <i>rhIG</i> '	4,14	6,28	0,00	2,71	30,04	64,33	2,92	61,08
	4,34	6,51	0,00	2,87	30,50	63,79	2,84	50,25
	4,52	6,49	0,00	2,78	30,52	63,79	2,91	47,14
Média	4,33	6,43	0,00	2,79	30,35	63,97	2,89	52,82
± Desvio padrão	0,19	0,13	0,00	0,08	0,27	0,31	0,00	7,32

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.22. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT046 abrigando genes de 3-cetoacil redutases.

Com o objetivo de avaliar ainda o papel dos produtos dos genes *phaB* e *rhlG* em promover a alteração na composição do copolímero de P3HB-*co*-3HAm_{MCL}, foram construídas as linhagens recombinantes IPT461 pBBR1MCS-2::*phaC*'*rhlG*' e IPT463 pBBR1MCS-2::*phaC*'*rhlG*. Os polímeros produzidos pela linhagem recombinante obtida a partir de IPT461 em glicose (Tabela 5.11) ou octanoato (Tabela 5.12) foram comparados àqueles obtidos pelas linhagens contendo os plasmídeos pBBR1MCS-2::*phaC* e pBBR1MCS-2::*phaCB*. Além disso, os polímeros produzidos pelas linhagens recombinantes obtidas a partir de IPT463 em glicose (Tabela 5.11) foram comparados àqueles obtidos pelas linhagens contendo os plasmídeos pBBR1MCS-2::*phaC* e pBBR1MCS-2::*phaCB*.

Em todas as linhagens recombinantes abrigando os genes *phaC* e *rhlG* o teor de PHA acumulado foi inferior àquele detectado nas linhagens abrigando apenas o gene *phaC* ou os genes *phaCB* seja nos cultivos utilizando glicose ou octanoato (Figuras 5.23, 5.24 e 5.26). As linhagens abrigando os genes *phaC* e *rhlG* apresentaram frações molares de 3HB menores que a linhagem abrigando apenas o gene *phaC* (Figura 5.25) e as frações molares de 3HD e 3HDd foram maiores nos cultivos em glicose (Tabela 5.11). Esses dados sugerem que o produto do gene *rhlG* pode contribuir com o direcionamento de intermediários com 10 e 12 carbonos do ciclo de biossíntese de

ácidos graxos para a biossíntese de PHA, embora certamente esse efeito não foi muito pronunciado. Nos cultivos em octanoato, também se observa uma redução na fração molar de 3HB com a expressão do gene *rhlG* (Figura 5.27), mas os aumentos nas frações molares de 3HD e 3HDd são bem menos expressivas (Tabela 5.12).

De maneira geral, nem a expressão do gene *phaB*, nem do gene *rhlG*, levou a alterações expressivas na composição do copolímero produzido por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461.

Tabela 5.11 Produção de PHA a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 ou IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Linhagens recombinantes	MSC (g/L)	Ph	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i>	2,74	5,27	95,01	1,71	1,48	0,81	0,99	27,28
	2,88	5,03	95,11	1,71	1,38	0,84	0,97	29,53
	3,50	5,45	95,19	1,84	1,46	0,70	0,81	33,68
Média	3,04	5,25	95,10	1,75	1,44	0,78	0,92	30,16
± Desvio padrão	0,40	0,21	0,09	0,08	0,05	0,07	0,00	3,25
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i>	2,99	5,70	95,78	2,18	0,70	0,57	0,76	32,05
	3,43	5,44	96,98	1,88	0,61	0,42	0,00	43,45
	3,94	5,72	95,83	2,46	0,72	0,44	0,55	42,79
Média	3,45	5,62	96,20	2,17	0,68	0,48	0,44	39,43
± Desvio padrão	0,48	0,16	0,68	0,29	0,06	0,08	0,00	6,40
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i> <i>rhlG'</i>	3,16	5,10	94,90	1,20	1,07	1,33	1,50	23,86
	3,05	5,36	94,46	1,53	1,39	1,27	1,35	24,90
	3,24	4,81	94,09	1,26	1,31	1,57	1,76	21,89
Média	3,15	5,09	94,48	1,33	1,26	1,39	1,54	23,55
± Desvio padrão	0,10	0,28	0,41	0,18	0,17	0,16	0,00	1,53
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i>	2,83	5,06	98,14	0,00	0,00	0,80	1,06	25,79
	2,86	5,01	97,79	0,20	0,12	0,84	1,05	28,59
	3,22	5,49	98,12	0,17	0,11	0,70	0,90	32,46
Média	2,97	5,19	98,02	0,12	0,08	0,78	1,00	28,95
± Desvio padrão	0,22	0,26	0,20	0,11	0,07	0,07	0,00	3,35
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i>	2,94	4,93	98,22	0,00	0,00	0,84	0,94	28,53
	3,07	5,09	98,06	0,13	0,09	0,81	0,88	35,88
	3,79	5,60	98,49	0,13	0,08	0,62	0,68	41,09
Média	3,27	5,21	98,26	0,09	0,06	0,76	0,83	35,17
± Desvio padrão	0,46	0,35	0,22	0,08	0,05	0,12	0,00	6,31
<i>P.putida</i> IPT463 pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i> <i>rhlG'</i>	2,91	5,79	96,88	0,19	0,00	1,35	1,58	22,44
	2,95	5,07	97,03	0,00	0,00	1,29	1,68	22,30
	2,83	5,15	96,74	0,00	0,20	1,46	1,60	22,27
Média	2,90	5,34	96,88	0,06	0,07	1,37	1,62	22,34
± Desvio padrão	0,06	0,39	0,15	0,11	0,12	0,09	0,00	0,09

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.23. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Figura 5.24. Teor e composição do PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT463 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Figura 5.25. Teor de 3HB no PHA produzido a partir de glicose por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 (esquerda) ou IPT463 (direita) abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Tabela 5.12. Produção de PHA a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Linhagens recombinantes	MSC (g/L)	Ph	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
			3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaC</i>	2,14	8,12	93,60	4,05	1,86	0,00	0,49	49,68
	2,39	7,84	93,55	4,04	1,73	0,27	0,41	62,22
	2,15	8,18	93,18	4,24	1,74	0,33	0,52	56,19
	2,23	8,05	93,44	4,11	1,78	0,20	0,47	56,03
	0,14	0,18	0,23	0,11	0,07	0,18	0,00	6,27
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaCB</i>	1,80	7,01	93,06	2,22	0,00	2,73	1,98	13,07
	1,11	7,58	88,62	2,52	1,95	2,79	4,13	12,52
	1,40	7,97	89,73	3,92	1,76	1,84	2,74	18,82
	1,44	7,52	90,47	2,89	1,24	2,45	2,95	14,80
	0,35	0,48	2,31	0,91	1,08	0,53	0,00	3,49
<i>P.putida</i> IPT461 pBBR1MCS-2:: <i>phaC'</i> :: <i>rhlG'</i>	2,09	8,21	92,74	4,12	2,04	0,43	0,67	51,53
	2,38	8,25	93,71	3,39	1,73	0,48	0,70	47,67
	2,38	8,25	92,05	4,40	2,26	0,66	0,64	51,22
	2,28	8,24	92,83	3,97	2,01	0,52	0,67	50,14
	0,17	0,02	0,83	0,52	0,27	0,12	0,00	2,14

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

Figura 5.26. Teor e composição do PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

Figura 5.27. Teor de 3HB no PHA produzido a partir de octanoato por linhagens recombinantes de *P. putida* IPT461 abrigando genes de 3-cetoacil redutases e PHA sintase.

5.3 AVALIAÇÃO DE MUTANTES DE *P. PUTIDA* IPT 046 DEFICIENTES NA BIOSÍNTESE DE PHA

Com o objetivo de caracterizar melhor os genes relevantes para biossíntese de PHA em *P. putida* IPT046, foram obtidos mutantes dessa linhagem utilizando o transposon mini-*Tn5*. Foram selecionados mutantes afetados na capacidade de produzir PHA a partir de glicose (fonte de carbono não relacionada) e a partir de ácido octanóico (fonte de carbono relacionada). Os mutantes foram selecionados com base na formação de colônias transparentes quando cultivadas em meio mineral sólido limitado na fonte de nitrogênio. Um mutante (LFM814) que não acumulava PHA especificamente a partir de glicose foi o primeiro a ser obtido (Figura 5.28). Em seguida, os esforços foram dirigidos para a obtenção de mutantes afetados na produção de PHA a partir de octanoato, tendo se obtido o mutante LFM824 (Figura 5.29), que também se apresenta deficiente na síntese de PHA a partir de glicose. Esforços exaustivos foram empreendidos para a obtenção de mutantes especificamente afetados na produção de PHA a partir de octanoato, ou seja, que ainda fossem capazes de produzir PHA a partir de carboidratos, entretanto, nenhum mutante apresentando essas características foi obtido. Alguns mutantes aparentemente parcialmente afetados na produção de PHA a partir de octanoato foram obtidos. Este resultado sugere que diferentes genes podem estar envolvidos no direcionamento de intermediários do metabolismo de ácidos graxos para a biossíntese de PHA, impossibilitando a obtenção de mutantes afetados especificamente na produção de PHA a partir de ácidos graxos.

Figura 5.28. Mutante LFM 824 quando cultivado em MM contendo glicose (a esquerda) e MM contendo octanoato (a direita).

Figura 5.29. Mutante LFM 814 quando cultivado em MM contendo glicose (a esquerda) e MM contendo octanoato (a direita).

Todos os mutantes foram cultivados em meio mineral líquido contendo glicose ou octanoato como fonte de carbono e, após 72 horas de cultivo, foi analisado o polímero produzido (Tabela 5.13).

Cultivos paralelos com as linhagens *P. putida* IPT046, IPT461 e IPT463 confirmaram suas características com relação ao acúmulo de PHA já descritas neste trabalho quando analisando essas linhagens abrigando apenas o vetor pBBR1MCS-2.

Os mutantes LFM814 e LFM824 apresentam perfis de acúmulo de PHA equivalentes às linhagens IPT463 e IPT461, respectivamente. No caso do mutante LFM814 se observa também o aumento da fração de 3HO e redução na fração de 3HD, que pode representar o efeito da ausência do gene *phaG*, cujo produto direciona intermediários da biossíntese de ácidos graxos para biossíntese de PHA. Na ausência desse gene deveria ser esperada a não contribuição da biossíntese de ácidos graxos com monômeros 3HD para biossíntese de PHA, como já foi discutido neste trabalho.

Tabela 5.13. Produção de PHA por *P. putida* IPT046 ou seus mutantes obtidos utilizando o transposon mini-Tn5.

Linhagem Bacteriana	Fonte de Carbono	MSC (g/L)	pH	PHA (mol%)					PHA (%MSC)
				3HB	3HHx	3HO	3HD	3HDd	
<i>P. putida</i> IPT 046	Glicose	1,58	6,9	0,00	2,68	30,03	63,40	0,00	42,31
	Octanoato	2,01	7,9	0,00	14,76	77,74	7,50	0,00	53,77
<i>P. putida</i> IPT461	Glicose	0,89	7,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Octanoato	0,63	7,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>P. putida</i> IPT463	Glicose	0,98	6,4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Octanoato	2,10	7,9	0,00	16,71	83,29	0,00	0,00	52,29
<i>P. putida</i> LFM814	Glicose	0,85	6,6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Octanoato	2,08	7,9	0,00	16,21	81,74	2,05	0,00	36,77
<i>P. putida</i> LFM824	Glicose	0,83	6,5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Octanoato	0,01	7,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

MSC – Massa Seca Celular 3HB – 3-hidroxibutirato 3HHx – 3-hidroxihexanoato 3HO – 3-hidroxi octanoato
 3HD – 3-hidroxidecanoato 3HDd – 3-hidroxidodecanoato %MSC – percentual da massa seca celular.

6 CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *Pseudomonas putida* IPT 046 ou seus mutantes como hospedeiros para expressão de genes associados à biossíntese de PHA com vistas à produção de P3HB-co-3HA_{MCL}. Os resultados obtidos permitem estabelecer as seguintes conclusões:

- A expressão de genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha* em linhagens de *P. putida* ainda capazes de produzir PHA_{MCL} levou a produção de misturas de dois polímeros. Entretanto, a quantidade de polímero contendo 3HB como principal senão único constituinte foi bastante variável, indicando que a produção dessas misturas em processos biotecnológicos não seria viável devido à dificuldade de controle sobre a composição da mistura polimérica produzida.
- A expressão de genes de biossíntese de P3HB de *R. eutropha* em mutantes de *P. putida* incapazes de produzir PHA_{MCL} levou a produção de co-polímeros de P3HB-co-3HHx-co-3HO, mesmo quando apenas o gene *phaC* foi expresso. Esses resultados demonstram que *P. putida* apresenta atividades de β -cetotilase e 3-cetoacil-CoA redutase suficientes para promover a síntese de monômeros 3HB. Além disso, a linhagem de *P. putida* utilizada demonstrou ser bastante eficiente no suprimento de monômeros HA_{MCL}, permitindo a síntese de co-polímeros mesmo pela PHA sintase de *R. eutropha* que apresenta baixa especificidade por esses monômeros.
- A expressão do gene *phaB* de *R. eutropha* demonstrou que seu produto aumenta o direcionamento de intermediários com 4 e 6 carbonos a partir da β -oxidação de ácidos graxos para biossíntese de PHA. O efeito desse direcionamento foi facilmente percebido quando o polímero foi produzido pela PHA sintase do tipo II, que apresenta baixa especificidade por esses monômeros. Por outro lado, quando a PHA sintase de tipo I foi utilizada, o seu efeito em promover modificações na composição polimérica foi pouco expressivo.
- Foram obtidos mutantes deficientes na síntese de PHA a partir de glicose ou ainda a partir de glicose e octanoato utilizando o transposon mini-*Tn5*. Entretanto, mesmo após uma busca intensa, não foram detectados mutantes

afetados na biossíntese de PHA especificamente a partir de octanoato, sugerindo que diferentes produtos gênicos devem contribuir para o direcionamento de intermediários da β -oxidação de ácidos graxos para biossíntese de PHA.

REFERÊNCIAS¹

ABE, H.; DOI, Y.; FUKUSHIMA, T.; EYA, H.; Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoate by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 16, n. 3, p. 115-119, 1994.

AMARA, A.A.; STEINBUCHER, A.; REHM, B.H. *In vivo* evolution of the *Aeromonas punctata* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: isolation and characterization of modified PHA synthases with enhanced activity. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, n. 4-5, p.477-82, 2002.

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

ANTONIO, R.V.; STEINBÜCHER, A.; REHM, B.H.A. Analysis of *in vivo* substrate specificity of the PHA synthase from *Rasltonia eutropha*: formation of novel copolyesters in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 182, p. 111-117, 2000.

AUSUBEL, E.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SEIDMAN, J.G.; SMITH, J.A.; STUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 1987.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BRANDL, H.; KNEE JR, E.J; FULLER, R.C.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W. The ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(α -hydroxyalkanoates): potential sources for biodegradable polyesters. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 11, p. 49-55, 1989.

BRANDL, H.; GROSS, R.A.; LENZ, R.W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, pp. 1977-1982, 1988.

BULLOCK, W.O.; FERNANDEZ, J.M.; SHORT, J.M. XL1 Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. **J. Biotechnol.**, v. 5, p. 376-379, 1987.

¹ De acordo com:

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

CABALLERO, K.P.; KAREL, S.F.; REGISTER, R.A. Biosynthesis and characterization of hydroxybutyrate-hydroxycaproate copolymers. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 17, n. 2, p. 86-92, 1995.

CAMPOS-GARCIA, J.; CARO, A.D.; NÁJERA, R.; MILLER-MAIER, R.M.; AL-TAHHAN, R.A.; SOBERÓN-CHAVES. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes an NADPH-dependent β -ketoacyl reductase which is specifically involved in Rhamnolipid synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 17, p. 4442-4451, 1998.

CHEN, J. Y.; SONG, G.; CHEN, G.Q. A lower specificity PhaC2 synthase from *Pseudomonas stutzeri* catalyses the production of copolyesters consisting of short-chain-length and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 89, p.157-167, 2006.

CHEN, G.Q.; ZHANG, G.; PARK, S.J.; LEE, S.Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbial Biotechnol.**, v. 57, p. 50-55, 2001.

DE KONING, G.J.; VANBILSEN, H.M.; LEMSTRA, P.J.; HAZENBERG, W.; WITHOLT, B.; PREUSTING, H.; VANDERGALIEN, J.G.; SCHIRMER, A.; JENDROSSEK, D. A biodegradable rubber by crosslinking poly(hydroxyalkanoates) from *Pseudomonas oleovorans*. **Polymer**, v. 35, n. 10, p. 2090-2097, 1994.

DE SMET, M.J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; KINGMA, J.; WYNBERG, H. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, v. 154, n. 2, 870-878, 1983.

DENNIS, D.; MCCOY, M.; STANGL, A.; VALENTIN, H.E.; WU, Z. Formation of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. **J. Biotechnol.**, v. 64, p. 177-186, 1998.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 28, p. 4822-4828, 1995.

DOI, Y. **Microbial polyesters**. New York: VCH Publishers, 1990.

FENG, L.; WATANABE, T.; WANG, Y.; KICHISE, T.; FUKUCHI, T.; CHEN, G.; DOI, Y.; INOUE, Y. Studies on comonomer compositional distribution of bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)s and the thermal characteristics of their fractions. **Biomacromolecules**, v. 3, n.5, p. 1071-1077, 2002.

FINDLAY, R.H.; WHITE, D.C. Polymeric β -hydroxyalkanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 71-78, 1983.

FUKUI, T.; ABE, H.; DOI, Y. Engineering of *Ralstonia eutropha* for production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from fructose and solid-state properties of the copolymer. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 618-624, 2002.

FUKUI, T.; KICHISE, T.; IWATA, T.; DOI, Y. Characterization of 13 kDa granule-associated protein in *Aeromonas caviae* and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. **Biomacromolecules**, v. 2, 148-153, 2001.

FUKUI, T.; YOKOMIZO, S.; KOBAYASHI, G.; DOI, Y. Co-expression of polyhydroxyalkanoate synthase and (*R*)-enoyl-CoA hydratase genes of *Aeromonas caviae* establishes copolyester biosynthesis pathway in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 170, p. 69-75, 1999.

FUKUI, T.; KATO, M.; MATSUSAKI, H.; IWATA, T.; DOI, Y. Morphological and ¹³C-nuclear magnetic resonance studies for polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas* sp. 61-3. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 164, p. 219-225, 1998.

FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of polyhydroxyalkanoates from plant oils by *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 333-336, 1998.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-Hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 15, p. 4821-4830, 1997.

GOMEZ, J.G.C. **Produção por *Pseudomonas* sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes.** 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, 2000.

GREEN, P.R.; KEMPER, J.; SCHECHTMAN, L.; GUO, L.; SATWOSKI, M.; FIEDLER, S.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Formation of short chain length/Medium chain length polhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid β -oxidation inhibited *Raltonia eutropha*. **Biomacromolecules**, v. 3, p. 208-213, 2002.

GROSS, R. A., BRANDL, H.; ULMER, H. W.; POSADA, M. A.; FULLER, R. C.; LENZ, R. W. The biosynthesis and characterization of new poly(P-hydroxyalkanoates). **Polymer Prepr.**, v. 30, p. 492-493, 1989

HAN, J.; QIU, Y.Z.; LIU, D.C.; Chen, G.C. Engineered *Aeromonas hydrophila* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxyhexanoate) with alterable monomers composition. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 239, p. 195-201, 2004.

HAYWOOD, G.W., ANDERSON, A.J., EWING, D.F., DAWES, E.A. Accumulation of polyhydroxyalkanoate containing primary 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrates by *Pseudomonas* sp Strain NCIMB 40135. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 3354-3359, 1990.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E.A. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 52, p. 91-96, 1988.

HOLMES, P.A. Applications of PHB – a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physics Technol.**, v.16, p. 32-36, 1985.

HU, F.; CAO, Y.; JIN, XIAO. F; ZHANG, J.; LI, H. Site-directed mutagenesis of *Aeromonas hydrophila* enoyl Coenzyme A hydratase enhancing 3-hydroxyhexanoate fractions of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Curr. Microbiol.**, v. 55, p. 20-24, 2007.

HUIJBERTS, G.N.; EGGINK, G.; DE WAARD, P.; HISMANN, G.W.; WITHOLT, B. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1949-1954, 1992.

HUIJBERTS, G.N.M.; DE RIJK, T.C.; DE WAARD, P.; EGGINK, G. ¹³C Nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **J. Bacteriol.**, v.176, p. 1661-1666, 1994.

HUISMAN, G.W.; LEEUW, O.; EGGINK, G.; WHITOLT, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonas. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, n. 8, p. 1949-1954, 1989.

IWATA T. Strong fibers and films of microbial polyesters. **Macromol Biosci.**, v, 5, p. 689–701, 2005.

KATO, M.; BAO, H. J.; KANG, C.K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Production of a novel copolyester of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids by *Pseudomonas* sp. 61-3. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 45, p. 363–370, 1996a.

KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Biosynthesis of polyester blends by *Pseudomonas* sp. 61-3 from alkanic acids. **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, v. 69, p. 515–520, 1996b.

KICHISE, T.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced accumulation and changed monomer composition in polyhydroxyalkanoate (PHA) copolyester by *in vitro* evolution of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n.5, p. 2411-2419, 2002.

KICHISE, T.; FUKUI, T.; YOSHIDA, Y.; DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) by recombinant *Ralstonia eutropha* and effects of PHA synthase activity on *in vivo* PHA biosynthesis. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25, p. 69-77, 1999.

KIDWELL, J.; VALENTIN, H.E.; DENNIS, D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* PHA biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n 4, p. 1391-1398, 1995.

KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y.; DOI, Y. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from oils and fats by *Aeromonas* sp. OL-338 and *Aeromonas* sp. FA440. In: DOI, Y.; FUKUDA, K. (Ed.). **Biodegradable Plastics and Polymers**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p. 410–416.

KOVACH, M.E.; ELZER, P.H.; HILL, D.S.; ROBERTSON, G.T.; FARRIS, M.A.; ROOP, 2nd; R.M.; PETERSON, K.M. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v.166, n. 1; p.175-6, 1995.

KRAAK, M.N.; KESSLER, B.; WITHOT, B. *In vitro* Activities of Granule-Bound Poly[(R)-3-Hydroxyalkanoate] Polymerase C1 of *Pseudomonas oleovorans*. **Eur. J. Biochem.**, v. 250, p. 432-439, 1997.

LAGEVEEN, R.; HUISMAN, G.W.; PREUSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition do poly-(R)-3hydroxyalkanoates and poly-(R)-3-hydroxyalkenoates. **Appl. Environm. Microbiol.**, v. 54, n. 12, p. 2924-2932, 1988.

LEE, S.H.; OH, D.H.; AHN, W.S.; LEE, Y.; CHOI, J.; LEE, S.Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by high-cell-density cultivation of *Aeromonas hydrophila*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 67, p.240-244, 2000.

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

LEE, E.Y.; JENDROSSEK, D.; SCHIMER, A.; CHOI, C.Y.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of copolyesters consisting of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from 1,3-butanediol or from 3-hydroxybutyrate by *Pseudomonas* sp. A33. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 42, p. 901-909, 1995.

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

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 1-8, 2005.

LIEBERGESELL, M.; REHALKAR, S.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of *Thiocapsa pfeningii* polyhydroxyalkanoate synthase: subcloning, molecular characterization and generation of hybrid synthases with the corresponding *Chromatium vinosum* enzyme. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p 186-194, 2000.

LIEBERGESELL, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Analysis of polyhydroxyalkanoic acid-biosynthesis genes of anoxygenic phototrophic bacteria reveals synthesis of a polyester exhibiting an unusual composition. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 292-300, 1993.

LIEBERGESELL, M.; HUSTEDE, E.; TIMM, E.; STEINBÜCHEL, A.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W.; SCHLEGEL, H.G. Formation of poly(3-hydroxyalkanoic acids) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 155, p. 42-521, 1991.

- LU, X.; ZHANG, W.; JIAN, J.; WU, Q.; CHEN, G. Molecular cloning and functional analysis of two polyhydroxyalkanoate synthase from two strains of *Aeromonas hydrophila* spp. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 243, n. 1, p. 149-155, 2005.
- LU, X.; ZHANG, J.; WU, Q.; CHEN, G. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 221, p. 97-101, 2003.
- LU, X.; WU, Q.; CHEN, G.Q. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) with flexible 3-hydroxyhexanoate content in *Aeromonas hydrophila* CGMCC 0911. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 64, p. 41-45, 2004.
- MARTIM, D.P.; WILLIAMS, S. Medical application of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. **Biochem. Eng. J.**, v. 16, p. 97-105, 2003.
- MATSUDA, T.S.; SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; PRADELLA, J.G.C. Produção de PHA em *Aeromonas* isoladas de lodo de esgoto. CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador/BA. **Anais...** Salvador: CBG, 2008.
- MATSUMOTO, K.; AOKI, E.; TAKASE, K.; DOI, T.; TAGUCHI, S. *In vivo* and characterization of Ser477X mutation in polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase 1 from *Pseudomonas* sp. 61-3: effects of beneficial mutations on enzymatic activity, substrate specificity, and molecularweight of PHA. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2436-2442, 2006.
- MATSUMOTO, K.; TAKASE, K.; AOKI, E.; DOI, Y.; Taguchi, S. Synergistic effects of Glu130Asp substitution in the type II polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase: enhancement of PHA production and alteration of polymer molecular weight. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 99-104. 2005.
- MATSUMOTO, K.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; SEKI, M.; DOI, Y. Cloning and characterization of the *Pseudomonas* sp. 61-3 *phaG* gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 142-147. 2001a.
- MATSUMOTO, K. NAKAE, S. TAGUCHI, K. MATSUSAKI, H. SEKI, M. DOI, Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) copolymer from sugars by recombinant *Ralstonia eutropha* harboring the *phaC1_{Ps}* and the *phaG_{Ps}* genes of *Pseudomonas* sp 61-3. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 934-939, 2001b.
- MATSUSAKI, H.; ABE, H.; DOI, Y. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 17-22, 2000.
- MATSUSAKI, H.; MANJI, S.; TAGUCHI, K.; KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and Molecular Analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) Biosynthesis Genes in *Pseudomonas* sp. Strain 61-3. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 24, p. 6459-6467, 1998

NODA, I.; GREEN, P.R.; SATKOWSKI, M.M.; SCHECHTMAN, L.A. Preparation and properties of a novel class of polyhydroxyalkanoate copolymer. **Biomacromolecules**, v. 6, p. 580-586, 2005.

NOMURA, C.T.; TANAKA, T.; EQUEN, T.E.; APPAH, A.S.; MATSUMOTO, K.; TAGUCHI, S.; ORTIZ, C.L.; DOY, Y. FabG mediates polyhydroxyalkanoate production from both related and nonrelated carbon sources in recombinant *Escherichia coli* LS5218. **Biotechnol. Prog.**, v. 24, n. 2, p. 341-351, 2008.

NOMURA, C.T.; TAGUCHI K.; TAGUCHI S.; DOI, Y. Coexpression of genetically engineered 3-ketoacyl-ACP synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthase (*phaC*) genes leads to short-chain-length-medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer production from glucose in *Escherichia coli* JM109. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, p. 999-1007, 2004a.

NOMURA C.T; TANAKA, T.; GAN, Z.; KUWABARA, K.; ABE, H.; TAKASE, K.; TAGUCHI, K.; DOI, Y. Effective enhancement of short-chain-length (SCL)-medium-chain-length (MCL) polyhydroxyalkanoate copolymer production by co-expression of genetically engineered 3-ketoacyl-acyl-carrier protein synthase III (*fabH*) and polyhydroxyalkanoate synthesis genes. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1457-1464, 2004b.

OUYANG. S.; LIU, Q.; FANG, L.; CHEN, G. Construction of pha-operon-defined knockout mutants of *Pseudomonas putida* KT2442 and their Applications in Poly(hydroxyalkanoate) Production. **Macromol. Biosci.**, v. 7, p. 227-233, 2007.

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

PARK, S.J.; AHN, W.S.; GREEN, P.R.; LEE, S.Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74, n. 1, p. 81-86, 2001a.

PARK, S.J.; AHN, W.S.; GREEN, P.R.; LEE, S.Y. Production of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 248-254, 2001b.

PEOPLES, O.P.; SINSKEY, A.J. Poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (*phbC*). **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 26, p. 15298-15303, 1989.

QIU, Y.; HAN, J.; CHEN, G. Metabolic engineering of *Aeromonas hydrophila* for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 69, p. 537-542, 2006.

QIU, Y.; HAN, J.; GUO, J.; CHEN, G. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) from gluconate and glucose by recombinant *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas putida*. **Biotechnol. Lett.**, v. 27, p. 1381-1386, 2005.

QIU, Y.; OYUANG, S.; SHEN, Z.; WU, Q.; CHEN, G. Metabolic engineering for the production copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate by *Aeromonas hydrophila*. **Macromol. Biosci.**, v. 4, p. 255-261, 2004.

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

REHM, B.H.A. Biogenesis of microbial polyhydroxyalkanoate granules: a platform technology for the production of tailor-made bioparticles. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 9, p. 41-62, 2007.

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

REHM, H.A.; MITSKY, T.A.; STEINBÜCHEL, A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and Rhamnolipid synthesis by *Pseudomonas* : establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 7, p. 3102-3109, 2001.

REHM, B.H.A.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 37, p. 24044-24061, 1998.

REN, Q.; DE ROO, G.; KESSLER, B.; WITHOLT, B. Recovery of active medium-chain-length-poly-3-hydroxyalkanoate polymerase from inactive inclusion bodies using ion-exchange resin. **Biochem. J.**, v. 349, p. 599–604, 2000.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SHEU, D.; LEE, C. Altering the substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase 1 derived from *Pseudomonas putida* GPo1 by localized semirandom mutagenesis. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 13, p. 4177-4184, 2004.

SCHROL, G.; DENNER, E.B.M.; RÖLLEKE, S.; LUBITZ, W.; BUSSE, H. Characterization of a new *Pseudomonas* isolate, capable of accumulating polyesters of medium chain length 3-hydroxyalkanoic acids. **J. Biotechnol.**, v. 47, p. 53-63, 1996.

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.

SHIMAMURA, E.; KASUYA, K.; KOBAYASHI, G.; SHIOTANI, T.; SHIMA, Y.; DOI, Y. Physical properties and biodegradability of microbial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Macromolecules**, v. 27, p. 878-880, 1994.

SHIN, H.D, LEE, J.N., LEE, Y.H. *In vivo* blending of medium chain length polyhydroxy-alkanoates and polyhydroxybutyrate using recombinant *Pseudomonas putida* harboring *phbCAB* operon of *Ralstonia eutropha*. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, n° 20, p. 1729-1735, 2002.

SHIOTANI, T.; KOBAYASHI, G. JPN Patent Application n. 93049, 1993.

SILVA, L.F.; GOMEZ, J.G.C.; OLIVEIRA, M.S. ALTERTHUM, F. Freeze-drying of industrial yeast strains: influence of growth conditions, cooling rates and suspending media on the viability of recovered cells. **Revi. Microbiol.**, v. 23, n 2, p. 117-122, 1992.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilisation system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technol.**, v. 1, p. 784-91, 1983.

SLATER S.; HOUMIEL, K.L.; TRAN, M.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, N.B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K.J. Multiple β -ketothiolases mediate poly(β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n 8, p.1979-1987, 1998.

SNELL, K.D.; FENG, F.; ZHONG, L.; MARTIN, D.; MADDISON, L.L. YfcX enables medium-chain-length poly(β -hydroxyalkanoate) formation from fatty acids in recombinant *Escherichia coli fadB* strain. **J. Bacteriol.**, v. 184, p. 5696-5705, 2002.

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

STEINBÜCHER, A.; SCHLEGEL, H.G. Physiology and molecular genetics of poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 535-542, 1991.

STEINBÜCHER, A.; SCHUBERT, P. Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly(β -hydroxybutyric acid)- synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. **Arch. Microbiol.**, v. 153, p. 101-104, 1989.

STEINBÜCHER, A.; WIESE, S. A *Pseudomonas* strain accumulating polyesters of 3-hydroxybutyric acid and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acid. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 691-697, 1992.

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

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

TAGUCHI, K.; AOYAGI, T.; MATSUSAKI, K.; FUKUI, T.; DOI, Y. Over-expression of 3-ketoacyl-ACP synthase III or malonyl-CoA-ACP transacylase gene induces monomer supply for the polyhydroxybutyrate production in *Escherichia coli* HB101. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 579-584, 1999.

TAKASE, K.; MATSUMOTO, K.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Alteration of substrate chain-length specificity of type II synthase for polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *in vitro* evolution: *in vivo* and *in vitro* enzyme assays. **Biomacromolecules**, v. 5, 480-485, 2004.

TAKASE, K.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Enhanced synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* by means of error-prone PCR mutagenesis, saturation mutagenesis, and *in vitro* recombination of the Type II polyhydroxyalkanoate synthase gene. **J. Biochem.**, v. 133, p. 139-145, 2003.

TIAN, S.; LAI, W.; ZHENG, Z.; WANG, H.; CHEN, G. Effect of over-expression of phasin gene from *Aeromonas hydrophila* on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, p. 19-25, 2005.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, n. 11, p. 3360-3367, 1990.

TSUGE, T.; WATANABE, S.; SHIMADA, D.; ABE, H.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Combination of N171G mutations in *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate synthase and impact on polyhydroxyalkanoate synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 277, p. 217-222, 2007a.

TSUGE, T.; WATANABE, S.; SAYO, S.; HIRAISHI, T.; ABE, H.; DOI, Y.; TAGUCHI, S. Variation in copolymer composition and molecular weight of polyhydroxyalkanoate generated by mutagenesis of *Aeromonas caviae* PHA synthase. **Macromol. Biosci.**, v. 7, p. 846-854, 2007b.

TSUGE, T.; YANO, K.; IMAZU, S.; NUMATA, K.; KIKKAWA, Y.; ABE, H.; TAGUCHI, S.; DOI, Y. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer from fructose using wild-type and laboratory-evolved PHA synthases. **Macromol. Biosci.**, v. 5, n° 2, p. 112-117, 2005.

TSUGE, T.; SAITO, Y.; NARIKE, M.; MUNETA, K.; NORMI, Y.M.; KIKKAWA, Y.; HIRAISHI, T.; DOI, Y. Mutation effects of a conserved alanine (Ala510) in type I polyhydroxyalkanoate synthase from *Ralstonia eutropha* on polyester biosynthesis. **Macromol. Biosci.**, v. 4, n. 10, p. 963-970, 2004.

TSUGE, T. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 94, n. 6, p. 579-584, 2002.

TSUGE, T.; HISANO, T.; TAGUCHI, S.; DOI, T. Alteration of chain length specificity of *Aeromonas caviae* *R*-enantiomer-specific enoyl-Coenzyme A hydratase through site-direct mutagenesis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, n. 8, p.4830-4836, 2003.

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

TSUGE, T.; FUKUI, T.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, S.; KOBAYASHI, G.; ISHIZAKI, A.; DOI, Y. Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 184, p. 193-198, 2000.

ULMER, HW.; GROSS, R.A.; WEISBACH, P.; FULLER, R.C.; LENZ, R.W. The bacterial synthesis of functional poly(β -hydroxyalkanoate). **Polymer Prep.**, v. 30, n.2, p.402-407, 1989.

VERLINDEN, R.A.J; HILL, D.J.; KENWARD, M.A.; WILLIAMS, C.D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of polyhydroxyalkanoates. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 1437-1449.

ANEXO A –

Sequência da região do genoma de *R. eutropha* contendo o operon *phaCAB*. Em azul vemos os locais utilizados para desenhar os iniciadores, em negrito vemos os sítios *StuI*, e em marrom as sequências Shine-Delgarno. As regiões –35 e –10 do promotor sigma 70 estão sublinhadas.

```

CCCGGGCAAGTACCTTGCCGACATCTATGCGCTGGCGCGCACGCGCTGGCGCGCGCCGGCTGTACCGAGGTCTACGGCGGCGACGCC
TGACCGTGGCCGACGCGCGTCTTACTCCTATCGGCGCGATGGCGTGACCGGCCGATGGCCAGCCTGGTCTGGCTGGCGGACT
GAGCCCGCGCTGCTCACTCGTCTTGGCCCTGGCGCGCTGCGCGCTCGGCTTCAGCCTTGCCTCGGCGGCGGCGGCGTGGCC
ATGATGTAGAGCACCACGCCACCGCGCCATGCCATACATCAGGAAGGTGGCAACGCTGCCACCACGTTGTGCTCGGTGATCGCCAT
CATCAGCGCCACGTAGAGCCAGCCAATGGCCACGATGTACATCAAAATTCATCCTTCTCGCCTATGCTCTGGGGCTCGGCAGATGC
GAGCGCTGCATACCGTCCGGTAGGTTCGGGAAGCGTGAGTGCCGAGGCGGATTCCCGCATTGACAGCGCGTGCGTTGCAAGGCAACAA
TGGACTCAATGTCTCGGAATCGTGACGATTCCAGGTTTCTCCGGCAAGCATAGCGCATGGCGTCTCCATGCGAGAATGTCGCGCT
TGCCGATAAAAGGGGAGCCGCTATCGGAATGGACGCAAGCCACGGCCGAGCAGGTGCGGTGAGGGCTTCCAGCCAGTTCAGGGC
AGATGTGCCGGCAGACCTCCCGCTTTGGGGGAGGCGCAAGCCGGGTCCATTTCGGATAGCATCTCCCATGCAAAGTGCCGGCCAGGG
CAATGCCCGGAGCCGGTTTGAATAGTGACGGCAGAGAGCAATCAATCATGGCGACCGGCAAAGGCGCGGAGCTTCCACGCAGGAA
GGCAAGTCCCAACCATTCAGGTCACGCCGGGGCCATTTCGATCCAGCCACATGGCTGGAATGGTCCCGCCAGTGGCAGGGCACTGAAG
GCAACGGCCACGCGGCCGCTCCGGCATTCGGGCTGGATGCGCTGGCAGGCGTCAAGATCGCGCCGCGCAGCTGGGTGATATCCA
GCAGCGCTACATGAAGGACTTCTCAGCGCTGTGGCAGGCCATGGCCGAGGGCAAGGCCGAGGCCACCGGTCCGCTGCACGACCGGCGC
TTGCCCGGCGACGCATGGCGCACCAACCTCCCATATCGCTTCGCTGCCGCGTTTACCTGCTCAATGCGCGCGCTTGACCGAGCTGG
CCGATGCCGTCGAGGCCGATGCCAAGACCCGCCAGCGCATCCGCTTCGCGATCTCGCAATGGGTGATGCGATGTCGCCGCCAACTT
CCTTGCCACCAATCCGAGGCGCAGCGCTGCTGATCGAGTCGGGCGGCAATCGCTGCGTGCCGCGTGCACAACATGATGAAGAC
CTGACACGCGGAAGATCTCGCAGACCGAGAGCGCGTTTGGGTTCGGCCGAATGTGCGGTGACCGAAGGCGCGGTGGTCTTCG
AGAACGAGTACTTCCAGCTGTTGCAGTACAAGCCGCTGACCGACAAGGTGCACGCGCGCCGCTGCTGATGGTGCCCGCTGCATCAA
CAAGTACTACATCCTGGACCTGCAGCCGAGAGCTCGCTGGTGCGCCATGTGGTGGAGCAGGGACATACGTTGTTTCTGGTGCTGG
CGCAATCCGACGCCAGCATGGCCGGCAGCACCTGGGACGACTACATCGAGCACGCGCCATCCGCGCATCGAAGTCGCGCGCGACA
TCAGCGGCCAGGACAAGATCAACGTGCTCGGCTTCTGCGTGGGCGGCACCATGTCTCGACCGCGCTGGCGGTGCTGGCCGCGCGCGG
CGAGCACCCGGCGCGCAGCGTCACGCTGCTGACACGCTGCTGGACTTTGCCGACACGGGCATCTCGACGCTTTGTGACGAGGGC
CATGTGCAGTTGCGCGAGGCCACGCTGGGCGGCGCGCGCGCGCGCTGCGCGCTGCTGCGCGGCTTGAGCTGGCCAATACCTTCT
CGTTCTTGCGCCGAACGACCTGGTGTGGAATACGTGGTCGACAACCTGAAGGGCAACACGCCGTGCCGTTCGACCTGCTGTT
CTGGAACGGCGACGCCACCAACCTGCCGGGGCGTGGTACTGCTGGTACCTGCGCCACACCTACCTGCAGAACGAGCTCAAGGTACCG
GGCAAGCTGACCGTGTGCGCGTGGCGGTGGACCTGGCCAGCATCGAGTGGCACCTATATCTACGGCTCGCGCGAAGACCATATCG
TGCCGTGGACCGCGCTATGCTCGACCGCGCTGCTGGCGAACAAGCTGCGCTTCGTGCTGGGTGCGTGGGCCATATCGCCGGTGT
GATCAACCCGCGGCCAAGAACAAGCGCAGCCACTGGACTAACGATGCGCTGCCGAGTCGCCGAGCAATGGGTGGCCGGCGCCATC
GAGCATCACGGCAGCTGGTGGCCGACTGGACCGCATGGCTGGCCGGCAGGCCGCGGAAACGCGCCGCGCCGCAACTATGGCA
ATGCGCGCTATCGCGCAATCGAACC CGCGCTGGCGGATACGTCAAAGCCAAGGCATGACGCTTGATGAGTGCCGCGCTGCGTCATG
CACGGCGCCGGCAGGCTGAGGCTGAGGTTCCCTCCGTTCCATTGAAAGGACTACACAATGACTGACGTTGTATCGTATCCGCCGCCGC
ACCGCGGTTCGGCAAGTTTGGCGGCTCGCTGGCCAAGATCCCGGCACCGGAAGTGGGTGCCGTGGTATCAAGGCCGCGCTGGAGCGCG
CCGCGCTCAAGCCGAGCAGGTGAGCGAAGTCATCATGGGCCAGGTGCTGACCGCGGTTTCGGGCCAGAACCCGCGACGCCAGGCCG
GATCAAGGCCGCGCTGCCGCGATGGTGCCGCCATGACCATCAACAAGGTGTGCGGCTCGGGCTGAAGGCCGTGATGCTGGCCGCC
AACCGCATCATGGCGGCGACGCCGAGATCGTGGTGCCGGCGGCCAGGAAAACATGAGCGCCGCCCGCACGTGCTGCCGGGCTCGC
GCGATGGTTTCCGCATGGGCGATGCCAAGCTGGTCGACACCATGATCGTCGACGGCTGTGGGACGTGTACAACAGTACCATATGGG
CATCACCGCCGAGACGTGGCCAAGGAATACGGCATCACACGCGAGGCGCAGGATGAGTTCGCCGTCGGCTCGCAGAACAAGGCCGAA
GCCGCGCAGAAGGCCGCAAGTTTACGAAGAGATCGTCCCGGTGCTGATCCCGCAGCGCAAGGGCGACCCGGTGGCCTTCAAGACCG

```

ACGAGTTCGTGCGCCAGGGCGCCACGCTGGACAGCATGTCCGGCCTCAAGCCCGCCTTCGACAAGGCCGGCACGGTGACCGCGGCCAA
CGCCTCGGGCCTGAACGACGGCGCCGCGGGTGGTGGTATGTTCGGCGGCCAAGGCCAAGGAAGTGGGCCTGACCCCGCTGGCCACG
ATCAAGAGCTATGCCAACGCCGGTGTGATCCCAAGGTGATGGGCATGGGCCGGTGC CGGCCTCCAAGCGCGCCCTGTGCGCGCCG
AGTGGACCCCGCAAGACCTGGACCTGATGGAGATCAACG**AGGCCT**TTGCCGCGCAGGCGCTGGCGGTGCACCAGCAGATGGGCTGGGA
CACCTCCAAGGTCAATGTGAACGGCGGCCCATCGCCATCGGCCACCCGATCGGCGCGTTCGGCTGCCGTATCCTGGTGACGCTGCTG
CACGAGATGAAGCGCCGTGACGCGAAGAAGGGCCTGGCCTCGCTGTGCATCGGCGCGGCATGGGCGTGGCGCTGGCAGTCGAGCGCA
AATAAGGAAAGGGGTTTTCGGGGCCGCGCGCGGTGGCGCGGACCCGGCGACGATAACGAAGCCAATCA**AGGA**TGGACAT**GACTCAG**
CGCATTGCGTATGTGACCGCGGCATGGGTGGTATCGGAACCGCCATTTGCCAGCGGCTGGCCAAGGATGGCTTTTCGTGTGGTGGCCG
GTTGCGGCCCCAACTCGCCGCGCCGCGAAAAGTGGCTGGAGCAGCAGAAGGCCCTGGGCTTCGATTTCATTGCCTCGGAAGGCAATGT
GGCTGACTGGGACTCGACCAAGACCGCATTCGACAAGGTCAAGTCCGAGGTGGCGAGGTTGATGTGCTGATCAACAACGCCGTATC
ACCCGCGACGTGGTGTTCGCAAGATGACCCGCGCCGACTGGGATGCGGTGATCGACACCAACCTGACCTCGCTGTTCAACGTCACCA
AGCAGGTGATCGACGGCATGGCCGACCGTGGCTGGGGCCGCATCGTCAACATCTCGTCGGTGAACGGGCAGAAGGGCCAGTTCGGCCA
GACCAACTACTCCACCGCCAAGGCCGGCCTGCATGGCTTCACCATGGCACTGGCGCAGGAAGTGGCGACCAAGGGCGTGACCGTCAAC
ACGGTCTCTCCGGGCTATATCGCCACCGACATGGTCAAGGCGATCCGCCAGGACGTGCTCGACAAGATCGTCGCGACGATCCCGGTCA
AGCGCCTGGGCCTGCCGGAAGAGATCGCCTCGATCTGCGCCTGGTTGTCGTCGGAGGAGTCCGGTTTCTCGACCGGCGCCGACTTCTC
GCTCAACGGCGGCCTGCATATGGGCTGACCTGCCGGCCTGGTTCAACCAAGTCGGCAGCCGGCGCTGGCGCCCGCGTATTGCGGTGCAG
CCAGCGCGGCGCACAAAGCGCGGGCGGTTTCGTTTCGCCGCCCGTTTCGCGGGCCGTCAAGGCCCGGAATCGTTTCTGCCCGCGCGG
CATTCCTCGCTTTTTGCGCCAATTCACCGGGTTTTTCCTTAAGCCCCGTCGCTTTTCTTAGTGCCTTGTTGGGCATAGAATCAGGGCAG
CGGCGCAGCCAGCACCATGTTTCGTGCAGCGCGGCCCTCGCGGGGGCGAGGCTGCAG

ANEXO B

Sequência da região do genoma de *P. aeruginosa* PA14 contendo o gene *rhlG*. Em amarelo vemos os locais utilizados para desenhar, em azul a região codificante para o gene *rhlG*.

```
CGAGAACAAATGAACGCTTCTCTCGGCACCGCTTTTCCCTGACTCTACAGGTTCAATGTATGCGCCCACTGA
AACAGGCAACTCCTACTACTCCAGCCGTACCGCTGACAAATTCGTCTGTTCTGCTCTGCCCCAGGGCATGCG
TGAGCAGATCGCAGAAGTCGCTCGCAGCCATCACCGCAGCATGAACTCCGAGATCATCGCCCGACTCGAG
CAGAGCCTGCTCCAGGAAGGGGCGCTGCAAGACAATCTCGGTGTTTCGCCTGGACAGCCCGGAACCTCAGCC
TGCACGAGCGCGAGCTGCTGCAGCGTTTCCGCCAGCTGACCCACCGTCAGCAGAACGCGCTGGTCGCCCT
GATCGCACACGATGCGGAGCTGGCCCAGGCCTGAGCGCCGAAGCCACGCGTAGCGCTTGAAATGGCCGG
CATTCGCCCGGCTTTTCTTTATGGATGGCCCCAACCATGGGCGAGTAACCGCAAGGCGGTTATCCGCCGGC
CCCTGTAGCGGTGGCGTTATCCCTCCAACGCCACGAGGGAAGAGCCGAATGAGCTATCGCCTGGCCGCCGA
TGCCCTGGTCTGGCTGCACCTGGGCTTCATCCTGTTCTGTCCTGTTTCGGCGGCCCTGCTGCCGTTGCGTTGG
CCACGCCTGGCCTGGCTGCACCTGCCGGCGGTGGCTGGGGGTGCGCCGTTGAGTTCCCTCGGCCTGCCCT
GTCCGCTGACCCCGCTGGAGAATCGTCTGCGCCGGGCGCCGGGGACGCCGGCTACAGCGCGCGGCTTCGT
CGAGCACTACCTGTTGCCGCTGATCTATCCCGCCGGCTGACCCGGCGGTGCAATGGATCCTTGGCGCC
ATCGTTCTGCTGGTCAACCTGATCGCCTACCTGTATCTGTGGCATCGCCGAGTAGCCGCTGAGCCACGG
ATGCCACGTCATTCCGTATCTGGATAGTGCTGCGCCGGCAGCGAGGCGAATCGTAGGCTGGTCACCCCTG
CCACGCCCGAGTGTGTTTCCCATGTCATCCCTATTTTCAGCCTCGCCGGCCGCGTTCGCCCTGGTACCCGGCGG
CAGCCGCGGCATCGGCCAGATGATCGCCAGGGTCTTCTCGAAGCCGGCGCCCGCGTCTTCATCTGCGCA
CGTGACGCAGAGGCTGCGCCGACACCGCCACACACCTCTCGGCCCTACGGCGATTGCCAGGCGATCCCTG
CCGACCTTTCCAGCGAAGCCGGTGCCCGGCGCCTGGCGCAGGCGCTCGGCGAACTCAGCGCGCGGCTGGA
TATCCTGGTGAACAACGCCGGCACCAGTTGGGGCGCAGCGCTGGAAAGCTATCCGGTGTCCGGCTGGGAA
AAGGTCATGCAGCTCAATGTCACTCGGTGTTTTCTGCATCCAGCAACTGCTGCCGCTGCTGCGCCGCT
CGGCCAGCGCGGAAAAATCCGGCGCGAGTGATCAACATCGGCTCGGTGGCGGGCATCAGCGCCATGGGCGA
ACAAGCCTATGCCTACGGCCGAGCAAGGCCGCGCTGCATCAACTGTCGCGGATGCTGGCGAAGGAACTG
GTCGGCGAGCACATCAATGTCAACGTGATCGTCCCAGACGCTTCCCAGCCGCATGACCCGTACATCG
CCAATGACCCGCAGGCACTGGAGGCGGACAGCGCTCGATTCCCATGGGCCGCTGGGGTTCGCCCGGAGGA
GATGGCGGCGCTGGCGATCAGCCTGGCCGGCACCGCCGGCGCCTACATGACCGGAACGTGATCCCCATC
GACGGCGGTTTTCATCTCTGAGCGCCGCAATCCGGGTAAACATGACGCCCGCCGACCGCTCGCCTCGTCCC
GCCATGACCCACAGCGTTTCTCCCATCGGCTACATCCGCTCCTCTGCTTCATGGAGAAGTTCCGCCATCCCGC
GCCAGCCGCTGCTCGCGCCGGCGGCGCGGGGACCCTGGAAGTGTGCGCCGCTTCGACCAGGTGGAAGC
GCTGGAAGGCCTGGAGCAGGTGAGCCATGTCTGGCTGCTGTTCTCTTCCACCAGGCCCTGGAAGACAAG
CCGCGACTGAAGGTGCGCCCGCCGCGCCTGGGCGGCAACCGCTCGCTGGGAGTCTTCGCCACCCGCGCCA
CCCATCGGCCGAACGGCATCGGCCAGTCGGTGGTGCGCCTGGAGGGCTTCGAAGCGGGGCGCCTGTGGCT
GTCCGGAATCGACCTGCTCGACGGCACCCCGTACTCGATATCAAGCCCTACGTACCCCTACGCCGACGCC
GTGGCCGACGCCCCGCAACGCCATCGCCGACGCGCCGCGCCGGGCATCGCCGTGGAGTGAGCGAGCAGG
CGCGGCGCCAGGCCCATGAGCACGGCCAGCGGTTGCGGCAGCCGGTGGCCGAGCTGATCGAGCAATGCCT
GGCCAGGACCCGCTCCGGCTACCAGAAAGCCGGAGCCCGGGCGCCGTACGGGGTGGCCTGTGGGAC
CTCGACGTGCATTGGCACTACCCGCGCCCGGACCTGATCCGCGTGCTGGACGTGCGCCGCGGCGACTGAG
CCTTCTCAGCGCAGCGGATTGAGCGCCAGCGCTCGCTTTTCAAGACTTCTGTTCGAGGATCAGCGGCT
CGACCAACGGCCGGCTGTGCGGAAATGCGCGGTGCGGGTGTGCGCCTCGTAGGCCGCGTCATCGCGATA
GATCTCGTAGAGATAGACCAGGTGAGGGTCTGTGCGGTGCGGGAAACGTCGAACACCAGGCAGCCGGGC
TCGGTGGACACGGAAGCGGCGGCTTGACCTGGATGGCATC
```