

GABRIELA CAZONATO LOZANO SAKALAIUSKAS

**EFEITO DE LonA NOS PROCESSOS DE SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, para obtenção do Título de Doutora em
Ciências.

São Paulo

2018

GABRIELA CAZONATO LOZANO SAKALOUSKAS

**EFEITO DE LonA NOS PROCESSOS DE SÍNTESE E MOBILIZAÇÃO DE POLI-3-
HIDROXIBUTIRATO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

Versão original

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cazonato Lozano Sakalauskas, Gabriela
Efeito de LonA nos processos de síntese e
mobilização de poli-3-hidroxiacetato / Gabriela
Cazonato Lozano Sakalauskas; orientador José
Gregório Cabrera Gomez. -- São Paulo, 2018.
133 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Poli-3-hidroxiacetato. 2. Síntese e
mobilização de P3HB. 3. Proteína LonA. 4. Ralstonia
eutropha. 5. Escherichia coli recombinantes. I.
Cabrera Gomez, José Gregório, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Universidade de São Paulo

Candidato(a): Gabriela Cazonato Lozano Sakalauskas
Título da Tese: Efeito de LonA nos processos de síntese e mobilização de poli-3-hidroxi-butirato
Orientador(a): Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez

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

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

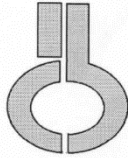
Examinador(a):
Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

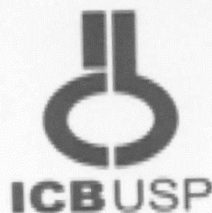
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 639/14 referente ao projeto intitulado: “*Caracterização da proteína LonA envolvida no acúmulo e mobilização de poli-3-hidroxi butirato*” sob a responsabilidade de **Gabriela Cazonato Lozano**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 26 de fevereiro de 2014.

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

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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl.CEUA.158.2018

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção nº **639/2014**, do estudo intitulado "*Caracterização da proteína LonA envolvida no acúmulo e mobilização de poli-3-hidroxi-butirato*", sob responsabilidade da aluna **Gabriela Cazonato Lozano** e orientado pela Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva, teve sua responsabilidade transferida para o Prof. Dr. **José Gregório Cabrera Gomez**, do Departamento de Microbiologia, bem como seu título foi alterado para "**Efeito de LonA nos processos de síntese e mobilização de poli-3-hidroxi-butirato**", a partir de 11/10/2016.

São Paulo, 24 de outubro de 2018.

Luciane Valéria Sita

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Camila Squarzoni Dale

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPESH-ICB/USP

*“A vida é breve, mas cabe nela muito mais
do que somos capazes de viver.”*

(José Saramago)

**Aos meus filhos Lorena e Guilherme,
as maiores obras da minha existência.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, pelo conhecimento transmitido todos esses anos, e pela ajuda durante toda a elaboração deste trabalho.

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

Aos queridos técnicos MSc Aline Carolina da Costa Lemos, Aelson Luiz Santos e Kaique Josuel Silva, por estarem presentes em todos os momentos, salvando nosso trabalho. Sem vocês a jornada seria muito mais dura. Meus sinceros agradecimentos.

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

Aos amigos que o bioproducto me deu, Dra. Thatiane Teixeira Mendonça, Dra. Jhoanne Hansen, Dra. Amanda Bília Flora, MSc Aline Carolina da Costa Lemos, MSc. Edmar Ramos de Oliveira Filho, MSc Henrique da Costa Oliveira e MSc Thandara Garcia Ravelli. Pessoas que contribuíram muito mais do que em ensaios, reatores e trabalhos em geral, e que vou levar para a vida.

À MSc Fernanda Cristina Rodrigues de Paiva, por toda a ajuda e paciência nos ensaios de purificação de proteínas.

Ao Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias e à Profa. Dra. Andrea Ballan Fernandes, por disponibilizarem as instalações de seus laboratórios e equipamentos para que eu pudesse realizar os experimentos de purificação de proteínas.

À Profa. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins e à Dra. Érika Nakajima pela ajuda no processamento de amostras no *French Press*.

Ao Prof. Dr. Thiago Olitta Basso, pela disponibilidade e por desprender de seu tempo me ajudando na análise de amostras em HPLC.

A todos os funcionários do ICB-USP, em especial aos do departamento de Microbiologia, por todo auxílio prestado.

Aos meus pais Márcia Regina Cazonato Lozano e Wagner Edvaldo Fadel Lozano, pela dedicação, esforço e confiança, sempre acreditando que eu poderia chegar mais longe do que eu mesma imaginava. Por me acudirem nos momentos que mais precisei. Pelo amor incondicional. Amo vocês!

Ao meu irmão Wilson Lozano Neto, pela parceria, cumplicidade e carinho de toda nossa caminhada.

Ao meu marido e grande amor Caio Bruschi Sakalauskas, por estar sempre ao meu lado, me incentivando em todos os momentos, cuidando da nossa família quando eu não podia estar,

por compreender todo o tempo que foi preciso dedicar a este trabalho, por acreditar no meu potencial, e principalmente por ser minha fortaleza.

Aos meus filhos Lorena Lozano Sakalauskas e Guilherme Lozano Sakalauskas, por me transformarem em uma mulher melhor, por virarem minha vida de cabeça para baixo, por me mostrarem que eu posso ser mais e por serem a grande razão do meu existir. Obrigada por me escolherem. Mamãe ama vocês com o todo o coração!

À Deus por todos os privilégios que me concedes, por guiar meus passos, e por permitir que eu viva para concretizar meus sonhos.

Agradecimento à agência de financiamento:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

LOZANO-SAKALOUSKAS, G. C. **Efeito de LonA nos processos de síntese e mobilização de poli-3-hidroxibutirato**. 2018. 133 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres armazenados intracelularmente em diversas bactérias. Estes são sintetizados principalmente em condições de excesso de fonte de carbono e limitação de nutrientes essenciais, e degradados pela mobilização dos grânulos quando há escassez de carbono e/ou energia. O PHA mais conhecido é o poli-3-hidroxibutirato (P3HB). Sabe-se que a síntese de PHA depende principalmente das PHA sintases (PhaC), enquanto a mobilização ocorre pela ação das PHA despolimerases intracelulares (sendo PhaZa1 a de maior destaque). Um estudo anterior com linhagens recombinantes de *Escherichia coli* capazes de acumular P3HB demonstrou que a expressão simultânea dos genes *lonA* e *phaZa1*, de *Ralstonia eutropha*, resulta em altas taxas de mobilização do polímero previamente acumulado. Porém, não se observa mobilização expressiva quando um ou outro gene encontra-se isolado na célula. Surpreendentemente, a presença de LonA isoladamente na cepa recombinante de *E. coli* leva a um aumento significativo no acúmulo de P3HB intracelular, sugerindo que LonA desempenhe papel também na síntese do polímero. O presente trabalho avaliou o teor de P3HB em diferentes linhagens de *E. coli* (XL1-Blue, LS5218 e MG1655), capazes de acumular este polímero por meio de dois diferentes plasmídeos (pSK⁻::*phaCAB* e pJM9131), com e sem a presença do gene *lonA*, clonado no vetor pBBR1MCS-5. Nos cultivos realizados em agitador rotativo, todas as cepas analisadas apresentaram significativo aumento das taxas de P3HB acumulados quando há expressão de *lonA*. A cepa recombinante de *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídeo pJM9131 se mostrou mais eficiente no acúmulo do biopolímero quando *lonA* era expresso, atingindo mais de 65% da MSC, sendo esta cepa eleita para cultivos em biorreator. Os resultados dos cultivos em biorreatores indicam que a presença de LonA leve a uma alteração geral no metabolismo celular, favorecendo não apenas o acúmulo de P3HB, mas também o crescimento celular. Deste modo, LonA parece ter um efeito pleotrópico neste processo. Paralelamente a este trabalho, foram construídas linhagens de *E. coli* capazes de acumular P3HB, abrigando o gene *phaP1*, que codifica a PHAsina mais abundante na célula, e outra combinando os genes *phaP1* e *phaZa1*. PHAsinas são proteínas que estão associadas à superfície dos grânulos de PHA, conferindo maior estabilidade aos mesmos. Alguns autores demonstram que a coexpressão de PHAsinas e PHA despolimerases intracelulares influencia na capacidade da célula de degradar o polímero intracelular. Desta forma, este trabalho buscou comparar o efeito de LonA e de PhaP1 no processo de mobilização de P3HB, através de cultivos *in vivo* e da tiólise dos grânulos *in vitro*. Os dados apresentados mostram que, embora ambas as proteínas avaliadas sejam importantes ativadores da mobilização em linhagens de *E. coli*, o efeito decorrente da presença de LonA é mais expressivo, sugerindo que essa enzima seja essencial para que a degradação ocorra. Os ensaios *in vitro* apontam ainda que LonA não seja uma proteína associada ao grânulo. Foi realizada a expressão e purificação das proteínas recombinantes LonA, PhaC e PhaZa1, individuais ou combinadas (LonA+PhaC e LonA+PhaZa1), em fusão com um peptídeo composto por múltiplos resíduos de histidina. Entretanto, não foi possível demonstrar uma interação direta pela copurificação de LonA com PhaC ou com PhaZa1. Todos os genes clonados neste trabalho foram obtidos a partir do genoma de *R. eutropha*.

Palavras-chave: Poli-3-hidroxibutirato. Síntese e mobilização de P3HB. Proteína LonA. *Ralstonia eutropha*. *Escherichia coli* recombinantes. Purificação de proteínas.

ABSTRACT

LOZANO-SAKALOUSKAS, G. C. **Effect of LonA on synthesis and mobilization of poly-3-hydroxybutyrate processes.** 2018. 133 p. PhD thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Polyhydroxyalkanoates (PHA) are polymers stored intracellularly in several bacteria strains. PHA are synthesized mainly under conditions of carbon source excess and limitation of essential nutrients, and degraded by the granules mobilization when in carbon and/or energy starvation. The best known PHA is the poly-3-hydroxybutyrate (P3HB). It is known that the PHA synthesis depends mainly on PHA synthases (PhaC), while the mobilization occurs through the intracellular PHA depolymerase action (PhaZa1 being the most prominent). An earlier study using recombinant *E. coli* strains able to accumulating P3HB, shown that the simultaneous expression of *lonA* and *phaZa1* genes, from *Ralstonia eutropha*, results in high rates of polymer mobilization. However, no significant mobilization was observed when only one gene was expressed in the cell. Surprisingly, the *LonA* presence singly in recombinant *E. coli* strain cause a significant increase in P3HB accumulation, suggesting that *LonA* also plays a role in polymer synthesis. This work evaluated the P3HB rates in different *E. coli* strains (XL1-Blue, LS5218 and MG1655), able to accumulate this polymer by two different plasmids (pSK-::phaCAB and pJM9131), with and without the *lonA* gene, cloned in pBBR1MCS-5 vector. In shake flasks cultures, all analyzed strains showed a significant increase in P3HB accumulation rates when *lonA* was expressed. The recombinant *E. coli* strain XL1-Blue, harboring pJM9131 plasmid, was shown to be more efficient in biopolymer accumulation with *LonA* presence, reaching more than 65% of DWC. This strain was selected to bioreactor assays. The results of cultures in bioreactors indicate that *LonA* presence cause a generalized alteration in cellular metabolism, favoring not only P3HB accumulation, but also the cellular growth. In this way, *LonA* appears to have a pleiotropic effect in this process. Parallel to this work, *E. coli* strains able to accumulate P3HB, harboring the *phaP1* gene, that encodes the most abundant PHAsin in the cell, and another combining *phaP1* and *phaZa1* genes, were constructed. PHAsins are protein that are associated with the surface of PHA granules, conferring more stability to them. Some authors demonstrated that the coexpression of PHAsins and intracellular PHA depolymerase influences the ability of cell degradation. Thus, this work aimed TO compare the *LonA* and *PhaP1* effect in P3HB mobilization, through in vivo assay and in vitro granule thiolysis. The presented results show that, although both proteins evaluated are important activators of the mobilization in *E. coli* strains, the *LonA* effect is more expressive, suggesting that this enzyme is essential for the granules degradation to occur. In vitro assays indicate, that *LonA* is not a granules-associated protein. The expression and purification were accomplished in the recombinant proteins *LonA*, *PhaC* and *PhaZa1*, alone or combine (LonA+PhaC and LonA+PhaZa1), in fusion with peptide of multiple histidine residues. However, it was not possible to demonstrate a direct interaction by the co-purification of *LonA* and *PhaC* or *PhaZa1*. All genes cloned in this work was obtained from *R. eutropha* genome.

Keywords: Poly-3-hydroxybutyrate. P3HB synthesis and mobilization. *LonA* protein. *Ralstonia eutropha*. *Escherichia coli* recombinant strain. Protein purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-	Fórmula geral dos polihidroxialcanoatos.	30
Figura 2.2-	Modelo <i>in vivo</i> do grânulo de P3HB de <i>R. eutropha</i> . PhaM – proteína multifuncional; PhaR – proteína repressora; PGAPS – proteínas associadas ao grânulo; PhaP1 – principal PHAsina de <i>R. eutropha</i> .	31
Figura 2.3-	Via metabólica simplificada de síntese de P3HB em <i>R. eutropha</i> .	33
Figura 2.4-	Classificação das diferentes PHA sintase, considerando sua estrutura proteica e afinidade pelo substrato.	34
Figura 2.5-	Via metabólica de síntese e mobilização de P3HB em <i>R. eutropha</i> .	38
Figura 5.1-	Cinética de crescimento de linhagens de <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 em meio mineral, utilizando glicose como fonte de carbono. A – Crescimento bacteriano (D.O. ₆₀₀). B – Escala logarítmica do crescimento bacteriano.	69
Figura 5.2-	Crescimento bacteriano medido pela biomassa total (Xt) de linhagens <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 em cultivos em meio biorreator. GLS03 (lonA); GLS04 (Controle).	71
Figura 5.3-	Cinética de crescimento de linhagens de <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 em meio mineral modificado, contendo 4,0 g/L de NaCl, utilizando glicose como fonte de carbono. A – Crescimento bacteriano (D.O. ₆₀₀). B – Escala logarítmica do crescimento bacteriano	73
Figura 5.4-	Cultivos de <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> (GLS05) <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5 \emptyset (GLS06), em meio mineral contendo glicose e NaCl. Biomassa total produzida (Xt); biomassa residual produzida (Xr); formação de P3HB (P3HB); ácido acético produzido (AA); glicose consumida; nitrogênio consumido.	75
Figura 5.5-	Cultivos de <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i> (GLS05) e <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5 \emptyset (GLS06), em meio mineral contendo glicose e NaCl. A – Concentração de glicose no meio de cultura em g/L; B – Concentração de nitrogênio no meio de cultura em mg/L.	77

- Figura 5.6-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de amplificação por PCR, a partir do DNA molde de *R. eutropha*. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, fragmento contendo o gene *phaP1* (891 pb); 2, fragmento contendo o gene *phaZa1* (1723 pb). 78
- Figura 5.7-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de *screening* de produtos de amplificação por PCR dos genes *phaP1* e *phaZa1* de *R. eutropha*, a partir de clones selecionados. A. Amplificação do gene *phaP1* (891 pb). P, padrão 1 kb (Fermentas); 1 - 5, clones selecionados; 6, controle positivo; 7, controle negativo. B. Amplificação do gene *phaZa1* (1723 pb). P, padrão 1 kb (Fermentas); 1 - 9, clones selecionados; 10, controle negativo; 11, controle positivo. 79
- Figura 5.8-** Avaliação da mobilização de P3HB em linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131, em meio mineral. 80
- Figura 5.9-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de amplificação por PCR dos genes *lonA*, *phaC* e *phaZa1*, a partir do DNA molde de *R. eutropha*. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, fragmento de *lonA* amplificado com os iniciadores *lonANdeFw* e *lonABamRv*; 2, fragmento de *lonA* amplificado com os iniciadores *lonANdeFw* e *lonAMfeRv*; 3, fragmento de *phaC* amplificado com os iniciadores *phaCNdeFw* e *phaCBamRv*; 4, fragmento de *phaC* amplificado com os iniciadores *phaCBamFw* e *phaCBspRv*; 5, fragmento de *phaZa1* amplificado com os iniciadores *phaZNdeFw* e *phaZBamRv*; 6, fragmento de *phaZa1* amplificado com os iniciadores *phaZBamFw* e *phaZSalRv*. 85
- Figura 5.10-** Perfil de migração em gel de agarose 0,8% após digestão dos plasmídeos construídos. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, pET3a::*lonA* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 2, pET28a::*lonA* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 3, pET28a::*phaC* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 4, pET28a::*phaZa1* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 5, pETDuet-1::*lonA+phaC* digerido com *NdeI*, *MfeI*, *BamHI* e *BspTI*; 6, pETDuet-1::*lonA+phaZa1* digerido com *NdeI*, *MfeI*, *BamHI* e *SalI*. 85
- Figura 5.11-** SDS-PAGE 10% (A) Proteína LonA (~89 kDa). M. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração insolúvel expressando LonA; 2. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de LonA (pico maior); 3. Fração de purificação por 87

cromatografia de afinidade de LonA (pico menor); 4. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de LonA. (B) Proteína PhaC (~64 kDa). M. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração insolúvel expressando PhaC isolada; 2. Fração insolúvel expressando PhaC expressa juntamente com LonA; 3. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaC isolada; 4. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaC expressa juntamente com LonA; 5. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaC isolada; 6. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaC expressa juntamente com LonA.

Figura 5.12- A. Cromatografia de afinidade de PhaZa1. B. SDS-PAGE 12% da proteína PhaZa1 (~47 kDa). P. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaZa1; 2. Fração insolúvel expressando PhaZa1 (banda de ~47 kDa). 88

Figura 5.13- SDS-PAGE 10% da proteína PhaZa1 (~47 kDa). 1. Fração insolúvel expressando PhaZa1 isolada; 2. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaZa1 isolada; 3. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaZa1; 4. Fração insolúvel expressando PhaZa1 expressa juntamente com LonA; 5. Fração de purificação por cromatografia de afinidade PhaZa1 expressa juntamente com LonA; 6. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaZa1 expressa juntamente com LonA. M. Marcador de proteína Dual Color - kDa (Bio-Rad). 89

Figura B1- Vetor de clonagem pBBR1MSC-5, com marca de resistência à gentamicina, indicando sítio de clonagem MCS. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo; MCS – sítio múltiplo de clonagem. 119

Figura B2- Plasmídeo contendo o inserto de *lonA* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MCS, indicando o sítio de restrição *SmaI* interrompido. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência 119

à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

- Figura B3-** Plasmídeo contendo os insertos de *lonA* e *phaZa1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MCS, indicando os sítios de restrição *XbaI* e *SacI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo. 120
- Figura B4-** Plasmídeo contendo o inserto de *phaP1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MSC, indicando os sítios de restrição *SalI* e *ClaI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo. 120
- Figura B5-** Plasmídeo contendo os insertos de *phaP1* e *phaZa1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MSC, indicando os sítios de restrição *SalI* e *ClaI*, bem como *SpeI* e *SacI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo. 121
- Figura D1-** Representação do plasmídeo construído pET28a::*lonA*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina. 124
- Figura D2-** Representação do plasmídeo construído pET28a::*phaC*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina. 124
- Figura D3-** Representação do plasmídeo construído pET28a::*phaZa1*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem 125

ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina.

- Figura D4-** Representação do plasmídeo construído pETDuet-1::*lonA+phaC*. Amp^R – gene que codifica proteína que confere resistência à ampicilina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida. 125
- Figura D5-** Representação do plasmídeo construído pETDuet-1::*lonA+phaZa1*. Amp^R – gene que codifica proteína que confere resistência à ampicilina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida. 126
- Figura E1-** A. Cromatografia de afinidade de LonA. B. Cromatografia de exclusão molecular de LonA. 127
- Figura E2-** A. Cromatografia de afinidade de PhaC. B. Cromatografia de afinidade de LonA+PhaC. C. Cromatografia de exclusão molecular de PhaC. D. Cromatografia de exclusão molecular de LonA+PhaC. 129
- Figura E3-** A. Cromatografia de afinidade de PhaZa1. B. Cromatografia de afinidade de LonA+PhaZa1. C. Cromatografia de exclusão molecular de PhZa1 D. Cromatografia de exclusão molecular de LonA+PhaZa1. 131
- Figura F1-** Alinhamento das sequências de aminoácidos da protease ATP-dependente LonA de *R. eutropha* e *E. coli* K-12, indicando 70% de identidade e 83% de similaridade. 132
- Figura F2-** Alinhamento de parte das sequências de aminoácidos da protease ATP-dependente LonA de *E. coli* K-12, *R. eutropha* e *Burkholderia* spp. Asterisco: mostra a similaridade de resíduos de aminoácidos entre as espécies. Em cinza: ênfase para os resíduos de Ser⁶⁷⁹ (S) e Lys⁷²² (K), reportados como formadores da díade catalítica da proteína 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1-	Plasmídeos utilizados neste trabalho.	52
Tabela 4.2-	Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.	53
Tabela 4.3-	Sequência de oligonucleotídeos utilizados.	53
Tabela 4.4-	Enzimas de restrição utilizadas nas clonagens em vetor plasmidial.	57
Tabela 4.5-	Linhagens de <i>E. coli</i> obtidas e avaliadas para acúmulo e mobilização de P3HB.	58
Tabela 5.1-	Acúmulo de P3HB em linhagens de <i>E. coli</i> recombinantes.	68
Tabela 5.2-	Avaliação de meios com diferentes concentrações de NaCl para crescimento celular e acúmulo de P3HB, em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM3191, após 48 horas de cultivo.	72
Tabela 5.3-	Consumo de glicose e ácido acético e formação de bioprodutos em cultivos em biorreatores de <i>E. coli</i> , entre 50 e 72 horas de cultivo. Ensaio GLS05 e GLS06.	77
Tabela 5.4-	Ensaio <i>in vitro</i> da tiólise de nP3HB.	83
Tabela A1-	Ensaio GLS01 e GLS02. Valores de concentrações de glicose (G), biomassa celular total (Xt).	116
Tabela A2-	Ensaio GLS03 e GLS04. Valores de concentrações de glicose (G), biomassa celular total (Xt).	116
Tabela A3-	Curva de crescimento em meio mineral contendo 1 g/L de extrato de levedura e 4 g/L de NaCl, em agitadores rotativos. Valores de densidade ótica (D.O. 600 nm). Linhagens <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCs-5:: <i>lonA</i> (LonA) e <i>E. coli</i> XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5 \emptyset (Controle).	117
Tabela A4-	Ensaio GLS05 e GLS06. Valores de biomassa total (Xt), biomassa celular residual (Xr), produção de P3HB, glicose consumida e concentração de glicose no meio (G), consumo de nitrogênio e concentração de nitrogênio no meio (N) e produção de ácido acético (AA).	118
Tabela C1-	Ensaio de mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> . Valores de biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), teor de P3HB, mobilização de P3HB intracelular.	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA+ – ATPases associadas à diversas atividades

Amp^R – resistente à ampicilina

Amp^S – sensível à ampicilina

aPHA – grânulos artificiais de PHA

atoC2 – mutação do gene *atoC2*

CER – do inglês *carbon evolution rate*

C/N – relação carbono nitrogênio

dcm - metilação de citosina no segundo C de sítios existentes CCWGG

D.M.S.O – dimetil sulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleotídeos fosfatados

D.O. – densidade ótica

dPHA – grânulos de PHA desnaturados

DTT – do inglês *dithiothreitol*

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)

e-PHA despolimerase – PHA despolimerase extracelular

e-PHA_{MCL} – PHA despolimerase extracelular com especificidades para monômeros de cadeia média

e-PHA_{SCL} – PHA despolimerase extracelular com especificidades para monômeros de cadeia curta

F⁻ – deleção do plasmídeo F

F⁺ – presença do plasmídeo F

fadR601 – mutante deficiente na degradação de ácidos graxos

gal – não metaboliza galactose

Gm^R – resistente à gentamicina

Gm^S – sensível à gentamicina

GxSxG – sequência de aminoácidos denominada *lipase box*

hdsS(r_B⁻ m_B⁻) – ausência de restrição e metilação na sequência

HPLC – do inglês *high performance liquid chromatography*

i-PHA despolimerase – PHA despolimerase intracelular

i-PHA_{MCL} – PHA despolimerase intracelular com especificidades para monômeros de cadeia média

i-PHA_{SCL} – PHA despolimerase intracelular com especificidades para monômeros de cadeia curta

IPTG – do inglês *isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

i- P3HB despolimerase – P3HB despolimerase intracelular

Kan^R – resistente à canamicina

Kan^S – sensível à canamicina

lac⁻ – deleção parcial do gene *lacZ*

lacI^f – gene que codifica o repressor *lacI*

lacPOZ' – promotor lac (*lacP*), operador lac (*lacO*) e peptídeo α da β-galactosidase (*lacZ'*)

LB – Luria-Bertani

lon⁻ – mutação na protease Lon

lonA – gene codificador da protease LonA ATP dependente

LonA – protease ATP dependente

MCS – sítio múltiplo de clonagem

MM – meio mineral

MMG – meio mineral glicose

mob – gene codificador de proteína envolvida na replicação plasmidial

MSC – massa seca celular

nPHA – grânulos de PHA nativos

ompT - mutação na proteína da membrana externa de protease VII

OUR – do inglês *oxygen uptake rate*

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PGAPS – proteínas associadas ao grânulo

PHA – polihidroxialcanoatos

PHA⁻ – sem acúmulo de PHA

phaA – gene codificador da enzima β-cetotiolase

PhaA – β-cetotiolase

phaB – gene codificador da enzima acetoacetyl-CoA redutase

PhaB – acetoacetyl-CoA redutase

phaC – gene codificador da enzima PHA sintase ou polimerase

PhaC – PHA sintase ou polimerase

phaCAB – operon de biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha*

PhaE – subunidade da enzima PHA sintase de classe III

PhaM – proteína multifuncional

PHAMCL – polihidroxiálcanoatos com monômeros de cadeia média (do inglês *medium chain length*)

phaP – genes codificadores de PHAsinas

phaP1 – gene codificador da principal PHAsina de *Ralstonia eutropha*

PhaP1 – PHAsina, proteína associada ao grânulo

phaR – gene codificador de proteínas repressoras

PhaR – subunidade da enzima PHA sintase de classe IV

PHASCL – polihidroxiálcanoatos com monômeros de cadeia curta (do inglês *short chain length*)

phaY – genes codificadores de oligômero hidrolases

PhaY – oligômero hidrolases

phaZ – genes codificadores das enzimas PHA despolimerases intracelulares

phaZa1 – gene codificador de uma PHA despolimerase intracelular de *Ralstonia eutropha*

PhaZa1 – PHA despolimerase intracelular de *Ralstonia eutropha*

P3HB – poli-3-hidroxi butirato

P3HB⁺ – capaz de sintetizar P3HB

QS – do inglês *quorum sensing*

rep – gene codificador da proteína envolvida na replicação plasmidial

SDS-PAGE – do inglês *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

TAE – tampão Tris-base, ácido acético e EDTA

Tc^R – resistente à tetraciclina

UHMW – do inglês *ultra-high molecular weight*

UV – ultravioleta

X- Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo

Xr – biomassa residual

Xt – biomassa total

3HB – 3-hidroxi butirato

3HHp – 3-hidroxiheptanoato

3HHx – 3-hidroxi hexanoato

3HO – 3-hidroxi octanoato

3HV – 3-hidroxi valerato

3H4MV – 3-hidroxi-4-metil valerato

4HB – 4-hidroxibutirato

λ^- – deleção do fago lambda

λ (DE3) – carrega fago λ que codifica T7 RNA polimerase e *lacI^q*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1 Plásticos e o problema ambiental.....	28
2.2 Polihidroxicanoatos	29
2.3 Estrutura e características dos grânulos de PHA.....	31
2.4 Síntese de PHA.....	32
2.4.1 PHA sintase.....	33
2.5 Degradação de PHA.....	34
2.5.1 Degradação Extracelular.....	35
2.5.2 Degradação Intracelular.....	37
2.6 Outras enzimas envolvidas no metabolismo de PHA.....	42
2.7 Síntese e mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i>...	43
2.8 LonA protease ATP dependente.....	47
3 OBJETIVOS GERAIS.....	51
3.1 Objetivos Específicos.....	51
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1 Linhagens e Plasmídeos.....	52
4.2 Oligonucleotídeos.....	53
4.3 Manipulação de DNA.....	54
4.3.1. Extração de DNA genômico e plasmidial.....	54
4.3.2 Digestão de DNA genômico e plasmidial.....	54
4.3.3 Ligação do DNA.....	54
4.3.4 Eletroforese em gel de agarose.....	54
4.3.5 Inserção de DNA em bactérias por transformação por choque elétrico.....	55
4.4 Amplificação do fragmento de DNA por PCR.....	55
4.5 Clonagem em vetor plasmidial.....	56
4.6 Obtenção de linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> para acúmulo e mobilização de P3HB.....	57
4.7 Condições de cultivo para acúmulo de P3HB em agitadores rotativos.....	57
4.8 Condições de cultivo para acúmulo de P3HB em biorreatores.....	58

4.9 Composição dos meios de cultura	59
4.9.1 Luria-Bertani (LB)	59
4.9.2 Meio Mineral (MM)	60
4.9.3 Meios de cultura utilizados em ensaios de biorreatores	61
4.10 Condições de cultivo para mobilização de P3HB em agitadores rotativos	61
4.11 Procedimentos analíticos	62
4.12 Avaliação da atividade enzimática de LonA na mobilização de P3HB	63
4.12.1 Isolamento de grânulos nativos de P3HB	63
4.12.2 Tiólise de P3HB	63
4.12.3 Condições de análise em HPLC	64
4.13 Expressão e purificação de proteínas	64
4.13.1 Teste de expressão de proteínas em <i>E. coli</i>	65
4.14 Preservação de linhagens bacterianas	66
5 RESULTADOS	67
5.1 Síntese de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	67
5.1.1 Cultivos em agitador rotativo	67
5.1.2 Cultivos em biorreatores	70
a. Ensaios GLS01 e GLS02	70
b. Ensaios GLS03 e GLS04	70
c. Avaliação da influência de NaCl no crescimento e acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	71
d. Ensaios GLS05 e GLS06	73
5.2. Mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	78
5.2.1 Construção dos plasmídeos <i>pBBR1MCS-5::phaP1</i> e <i>pBBR1MCS-5::phaZa1+phaP1</i>	78
5.2.2 Avaliação da capacidade de mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>, em agitadores rotativos	79
5.2.3 Avaliação da atividade de mobilização de LonA	80
5.3 Clonagem de genes <i>lonA</i>, <i>phaC</i> e <i>phaZa1</i> em vetores pET	84
5.4 Purificação de proteínas	85
6 DISCUSSÃO	90
7 CONCLUSÃO	96

8 REFERÊNCIAS.....	98
ANEXOS.....	115
ANEXO A.....	116
ANEXO B.....	119
ANEXO C.....	122
ANEXO D.....	124
ANEXO E.....	127
ANEXO F.....	132

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O uso de embalagens descartáveis se tornou crescente nas últimas décadas estando presente na maioria dos produtos consumidos pela sociedade, e os plásticos ainda lideram os materiais de eleição para tal uso. De forma geral, estes plásticos são oriundos de polímeros sintéticos que, além de terem origem petroquímica, são degradados lentamente na natureza, implicando em diversos problemas ambientais. A substituição destes produtos derivados de petróleo por outros de origem biológica tem se mostrado uma boa alternativa. Uma abordagem promissora é utilização dos polihidroxialcanoatos (PHA), uma família de poliésteres sintetizados e armazenados intracelularmente na forma de grânulos, em diversas bactérias, atuando como reserva de carbono e energia para esses micro-organismos.

Tecnicamente, os PHA poderiam substituir parcialmente os plásticos petroquímicos. No entanto, a sua produção em larga escala ainda não é competitiva quando comparada aos plásticos tradicionais, embora algumas aplicações específicas possam ser justificadas, como em biomedicina. Desta forma, o desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitem melhorias nesse processo, poderia ter um forte impacto no custo industrial da produção de PHA.

Os PHA são sintetizados e degradados naturalmente por diversos micro-organismos, e a bactéria *Ralstonia eutropha* é um organismo modelo para os estudos destes polímeros. Uma ampla variedade de PHA pode ser produzida, sendo sua composição fortemente influenciada pelas vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, pelo substrato fornecido na fase acúmulo e pelo tipo de enzima PHA sintase (PhaC) presente no organismo produtor. Dentre os muitos polímeros possíveis, o P3HB (poli-3-hidroxibutirato) é o PHA mais amplamente estudado, apresentando monômeros de quatro carbonos.

Os micro-organismos produtores de PHA são dotados também de uma maquinaria de despolimerização, que permite a mobilização do polímero. A mobilização consiste na degradação do polímero previamente acumulado, em situações de deficiência ou ausência de fonte exógena de carbono e/ou energia. Alguns estudos sugerem que o metabolismo de PHA é um processo cíclico, no qual as PHA sintases e PHA despolimerases intracelulares (i-PHA despolimerases) atuam simultaneamente. Entretanto, as taxas de polimerização costumam ser cerca de 10 vezes mais elevadas que as taxas de despolimerização intracelular sob condições de acúmulo de polímero.

Dentre os diferentes metabolismos de síntese de PHA, a rota de biossíntese de P3HB em *R. eutropha* é a melhor caracterizada. Neste processo, os genes *phaA*, *phaB* e *phaC* codificam as enzimas envolvidas na síntese do biopolímero a partir de acetil-CoA e, assim como em diversas outras bactérias como *Azohydromonas lata* e *Burkholderia sacchari*, estes genes encontram-se

organizados no *operon phaCAB*. Já no processo de mobilização, a degradação se inicia pela ação das i-P3HB despolimerases, codificadas pelos genes *phaZ*, que hidrolisam o polímero formando monômeros e/ou oligômeros de ácido *R*-3-hidroxi-butírico (3HB). O processo conta ainda com as oligômero hidrolases (PhaY), que clivam os oligômeros formados, em monômeros de 3HB. Embora no genoma de *R. eutropha* exista pelo menos nove genes anotados como codificadores de enzimas relacionadas à mobilização de P3HB (sendo que sete codificariam i-P3HB despolimerases e dois oligômero hidrolases), apenas o gene *phaZa1* teve seu papel efetivamente caracterizado.

Uma das estratégias desenvolvidas para maximizar a produção de P3HB, e para esclarecer o papel das proteínas envolvidas no metabolismo do polímero, é a clonagem dos genes de interesse em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. Por não ser um produtor natural de PHA, linhagens de *E. coli* recombinantes são fortes candidatas para produção industrial desses biopolímeros, principalmente devido a ausência de mecanismos naturais de mobilização, o que possibilita ignorar um sistema de regulação natural em torno do metabolismo de PHA. Embora diversos estudos estejam descritos na literatura, a produção de P3HB em *E. coli* representa ainda um desafio interessante, uma vez que diferentes aspectos podem influenciar e modular a capacidade celular de sintetizar este polímero. Há muito para ser esclarecido, principalmente no que diz respeito a cultivos em biorreatores para o entendimento do metabolismo celular, a fim de alcançar taxas de acúmulo de P3HB mais eficientes.

Além dos genes cujos produtos estão sabidamente envolvidos no metabolismo de P3HB, estudos anteriores em nosso laboratório apontaram o envolvimento do produto do gene *lonA* tanto nos processos de síntese como de mobilização deste bioplástico. A proteína LonA, anotada como uma protease ATP dependente, teve seu papel relacionado a diversos processos nos diferentes organismos, como divisão celular, biossíntese flagelar, síntese da cápsula, tolerância a acidez, mobilidade, formação de biofilme, regulação da resposta SOS no reparo de DNA, virulência, adaptação a escassez nutricional, regulação do sistema *Quorum Sensing* (QS), regulação produção de ramnolipídeos, entre outros. Entretanto, mesmo sendo uma proteína amplamente estudada, LonA nunca havia sido apontada até então em outros trabalhos relacionados ao metabolismo de PHA.

Em nossos estudos anteriores, avaliamos a mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando os genes de acúmulo (*phaCAB*) e de mobilização de P3HB (*phaZa1* e *lonA*) de *R. eutropha*. Neste trabalho, foi possível observar que quando *phaZa1* e *lonA* estavam presentes simultaneamente, as taxas de mobilização superaram 50% do polímero previamente acumulado, embora não tenha havido mobilização efetiva quando apenas um destes genes estava presente. Inesperadamente, o mesmo trabalho demonstrou que a presença do gene *lonA*, sem simultânea expressão de *phaZa1*, levou a um aumento expressivo das taxas de acúmulo

de P3HB pela linhagem recombinante de *E. coli*, podendo atingir mais de 70% de sua massa seca celular, em cultivos em frascos agitados, utilizando glicose como fonte de carbono. Nossos resultados prévios, nos sugerem a existência de uma interação entre LonA e as proteínas envolvidas no acúmulo e na degradação intracelular de P3HB, possivelmente PhaC (P3HB sintase) e PhaZa1 (i-P3HB despolimerase), respectivamente. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo o estudo de LonA, tanto no processo de síntese quanto de mobilização de P3HB, através de cultivos de linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, visando o melhor entendimento desta proteína no metabolismo deste biopolímero.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plásticos e o problema ambiental

Materiais plásticos, normalmente de origem petroquímica, apresentam características como peso leve, ser durável e baixo custo de produção, que os colocam como produtos de grande importância econômica, sendo amplamente empregados em diversos setores, dentre eles alimentos, embalagens, engenharia, eletrônica, automotiva, aplicações médicas e outros (AL-SALEM et al., 2017; IVLEVA et al., 2017). Por esse motivo, nos últimos 50 anos a produção mundial de plásticos aumentou mais de 20 vezes, atingindo 322 milhões de toneladas em 2015 (PLASTIC EUROPE, 2017). Acredita-se que estes valores podem quadruplicar até 2050 devido ao crescimento econômico e ao aumento populacional dos próximos anos (WORLD ECONOMIC FORUM, 2016).

Uma vez que a maioria dos produtos plásticos tem aplicações de uso único, baixo valor de recuperação e são de difícil degradação ambiental (WANG et al., 2016), seu uso excessivo gera uma preocupação com os resíduos plásticos resultantes que se acumulam no ambiente, sobretudo nos oceanos, onde 60% a 80% do lixo flutuante consiste em detritos plásticos (MOORE, 2008; GEWERT et al., 2015; CAI et al., 2018). Estudos apontam que possa haver mais de 5 trilhões de pedaços plásticos nos oceanos ao redor do mundo (ERIKSEN et al., 2014), sendo estimado que cerca de 4,8 a 12,7 milhões de toneladas de resíduos plásticos foram depositados só no ano de 2010 (JAMBECK et al., 2015). Os riscos associados aos resíduos plásticos, especialmente aos microplásticos (que possuem diâmetro <5 mm), são preocupações crescentes da sociedade científica, pois estes podem conter compostos tóxicos que se acumulam na cadeia alimentar impactando diretamente a fauna marinha e a saúde humana (THOMPSON et al., 2009; LI et al., 2018).

A reciclagem seria uma alternativa para diminuir os resíduos plásticos, uma vez que estes costumam ter potencial para serem reciclados muitas vezes, podendo manter suas propriedades funcionais e seu valor agregado. Entretanto, o setor de reciclagem de plásticos, ainda hoje, enfrenta diversas barreiras tecnológicas e regulatórias, e se mantém subdesenvolvido e fragmentado (SHOGREN; TAYLOR, 2008; HENNLOCK et al., 2014; PLASTICS RECYCLERS EUROPE, 2016). Um balanço recente mostrou que de 1950 até 2015 apenas 9% do lixo plástico foi reciclado em todo o mundo (GEYER et al., 2017). Atualmente, na Europa a reciclagem de plásticos atinge menos de 30% do total dos plásticos consumidos, e no Brasil os números ficam em torno de 21% (PLASTIVIDA, 2012; PLASTICS EUROPE, 2017). Embora os índices nacionais estejam a frente de países como Reino Unido (20%) e França (19%) (PLASTIVIDA, 2012), ainda estamos muito

distantes de números satisfatórios, dado os problemas ambientais relacionados.

Neste contexto, observa-se um aumento na demanda por alternativas ambientalmente amigáveis para substituir os plásticos petroquímicos, e os plásticos biodegradáveis têm se mostrado fortes candidatos para tal (GOMEZ et al., 2012; CHUNG et al., 2015; AL-SALEM et al., 2017). Dentre os diversos polímeros biodegradáveis atualmente em destaque estão os polihidroxicanoatos (PHA), uma família de poliésteres produzida por micro-organismos e que apresentam propriedades termoplásticas e biocompatíveis (SUDESH; ABE; DOI, 2000; AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010).

2.2 Polihidroxicanoatos

Os polihidroxicanoatos (PHA) constituem um grupo de poliésteres produzidos e armazenados como inclusões intracelulares por diversos micro-organismos. Os grânulos de PHA atuam, principalmente, como reserva de carbono e energia para o organismo produtor, e sua síntese é influenciada pelas condições ambientais, sendo mais expressiva quando há excesso de fonte carbono e simultânea limitação de algum nutriente essencial ao crescimento microbiano, como nitrogênio, fósforo ou enxofre (ANDERSON; DAWES, 1990; BRANDL; GROSS; LENZ, 1990; ULMER et al., 1994; STEINBÜCHEL; VALENTIM, 1995; GOMEZ; BUENO NETTO, 2001). Entretanto, há autores que apontam os PHA também como auxiliares à tolerância às condições de estresses ambientais, como pressão osmótica, radiação UV e dessecação, tornando sua produção ainda mais interessante para estes micro-organismos (WANG et al., 2009).

Por apresentarem propriedades biodegradáveis, termoplásticas e biocompatíveis, e por serem obtidos a partir de matérias-primas de fácil e rápida renovação, os PHA têm despertado grande interesse industrial, sendo uma alternativa para substituir parcialmente os plásticos de origem petroquímica (SUDESH; ABE; DOI, 2000; AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; GOMEZ et al., 2012).

Quimicamente, os PHA apresentam uma fórmula geral de seus monômeros com um radical R (Figura 2.1), e este pode variar desde um átomo de hidrogênio até uma cadeia com 13 carbonos, podendo conter insaturações, ramificações, átomos como Br, F e Cl, cadeias cíclicas e grupos aromáticos (REHM; STEINBÜCHEL, 1999). Por este motivo, há uma enorme variedade de PHA produzidos por diversas bactérias, dentre os quais já foram identificados pelo menos 150 monômeros diferentes (REHM; STEINBÜCHEL, 1999; LUENGO et al., 2003; REHM, 2003). A estrutura química dos monômeros presentes resultam em diferentes propriedades químicas e físicas do polímero final, influenciando na qualidade do bioplástico e em suas possíveis aplicações

(RODRIGUES et al., 1995). O monômero a ser produzido e incorporado na cadeia polimérica é determinado pela linhagem bacteriana em questão e pela fonte de carbono metabolizada durante o acúmulo do polímero. Polímeros compostos por um único tipo de monômeros são ditos homopolímeros, enquanto aqueles que possuem mais de um tipo de monômeros em sua cadeia são chamados de copolímeros.

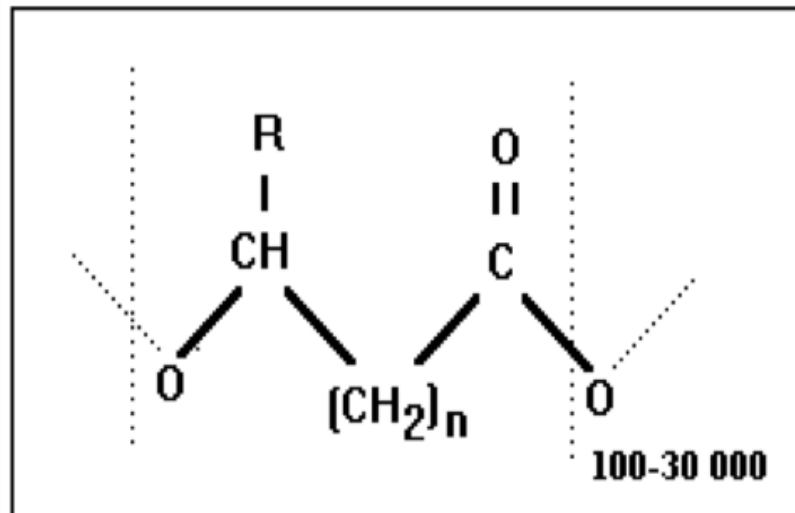


Figura 2.1 – Fórmula geral dos polihidroxicanoatos.

O comprimento da cadeia carbônica dos monômeros de PHA nos permite classificá-los em PHA_{SCL} e PHA_{MCL}. Os PHA_{SCL} (*short chain length*) contêm monômeros de cadeia curta, com 3 a 5 átomos de carbono, enquanto que os PHA_{MCL} (*medium chain length*) apresentam monômeros de cadeia média, com 6 a 16 átomos de carbono (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995; FÜCHTENBUSCH; FABRITIUS; STEINBÜCHEL, 1996; JENDROSSEK; SCHIRMER; SCHLEGEL, 1996; FÜCHTENBUSCH et al., 1998; SURIYAMONGKOL et al., 2007). Dentre os muitos PHA possíveis, o P3HB (poli-3-hidroxibutirato), um PHA_{SCL} que apresenta monômeros de quatro carbonos, é o mais amplamente estudado e conhecido. O P3HB pode ser sintetizados por diversas bactérias, dentre elas a *Ralstonia eutropha*, organismo modelo para estudos relacionados ao metabolismo deste polímero (REINECKE; STEINBÜCHEL, 2009).

2.3 Estrutura e características dos grânulos de PHA

Os grânulos de PHA consistem em inclusões supramoleculares localizadas no citoplasma bacteriano, que são constituídas por um cerne de PHA e uma camada superficial de proteínas

estruturais e funcionais. Durante muitos anos acreditou-se que a superfície destas inclusões contava com a presença de fosfolípidos, baseado em dados de análise *in vitro* de grânulos de P3HB. Entretanto, recentemente Bresan e colaboradores (2016) demonstraram, através de análises *in vivo* de grânulos de diferentes grupos de procariotos (α -proteobactérias, β -proteobactérias e γ -proteobactérias), que sua camada superficial é livre de fosfolípidos, sendo formada apenas de proteínas. A Figura 2.2 traz um modelo da estrutura granular *in vivo* de P3HB.

A formação dos grânulos ocorre de forma ordenada dentro da célula, sendo o modelo de brotamento o melhor aceito para descrever esse processo. Assim, acredita-se que nos estágios iniciais de síntese, os grânulos surgem próximos aos polos da célula e à membrana citoplasmática, porém, nos estágios tardios de acúmulo, os mesmos são distribuídos mais aleatoriamente no citoplasma celular (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

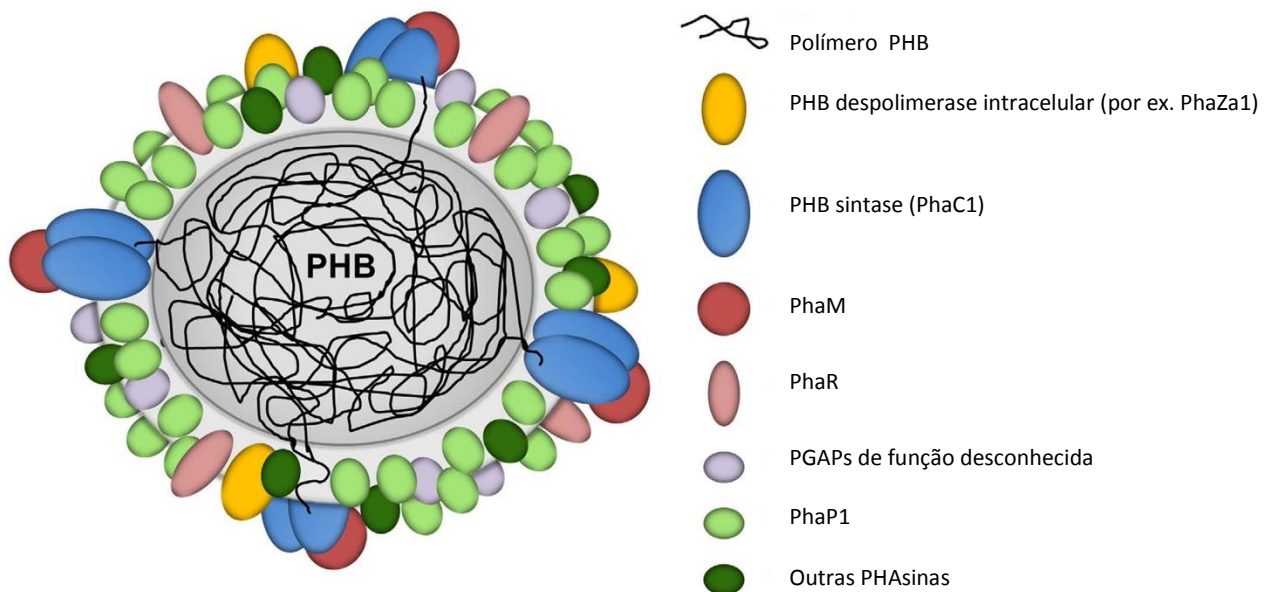


Figura 2.2 – Modelo *in vivo* do grânulo de P3HB de *R. eutropha*. PhaM – proteína multifuncional; PhaR – proteína repressora; PGAPS – proteínas associadas ao grânulo; PhaP1 – principal PHAsina de *R. eutropha* (Adaptado de BRESAN et al., 2016).

A estrutura física do PHA pode assumir diferentes formas, de acordo com sua localização: i) forma nativa (nPHA) ou estado amorfo, quando o polímero é endógeno, apresentando cadeias carbônicas móveis e desordenadas, e revestido por uma camada superficial de proteínas; ii) forma desnaturada (dPHA) ou estado cristalino, após extração do biopolímero ou morte e lise celular, com

sua camada superficial danificada e as cadeias polimérica assumindo forma helicoidal (MAYER, 1992; STEINBÜCHEL et al., 1995; PÖTTER; STEINBÜCHEL, 2005). É possível se obter ainda grânulos artificiais de PHA (aPHA), que são preparados a partir de uma solução de polímero cristalino emulsificado em solvente orgânico. Estes grânulos possuem propriedades semelhantes aos nPHA, e são costumeiramente utilizados em ensaios de atividade enzimática (HOROWITZ; SANDERS, 1994).

2.4 Síntese de PHA

O acúmulo de PHA acontece principalmente quando o micro-organismo produtor se encontra em ambiente com excesso de fonte de carbono e limitação de algum nutriente essencial ao crescimento, e sua síntese tem como enzima chave a PHA sintase (PhaC), que catalisa a polimerização de monômeros de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA, determinando o polímero final formado (STEINBÜCHEL, 1996; SOLAIMAN; ASHBY, 2005). Outros fatores que influenciam este processo são vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras e o substrato fornecido durante a fase de acúmulo, gerando as moléculas de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA que serão adicionadas à cadeia polimérica (ALDOR; KEASLING, 2003).

Uma das rotas de biossíntese melhor caracterizada é a do P3HB em *R. eutropha* (Figura 2.3). Neste processo, a produção do biopolímero se dá a partir da condensação de duas moléculas de acetil-CoA, pela ação da β -cetotiolase (PhaA), resultando em um acetoacetil-CoA, que será reduzido a (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA, pela atividade da 3-acetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB), formando os monômeros de (*R*)-3-hidroxiacetil-CoA. Estes monômeros são então polimerizados pela P3HB sintase (PhaC) (ANDERSON; DAWES, 1990; STEINBÜCHEL, 1991).

A enzimas envolvidas na síntese de P3HB (PhaA, PhaB e PhaC), em *R. eutropha*, são codificadas pelo operon *phaCAB*. Esta configuração gênica está presente também em outras bactérias como *Azohydromonas lata*, *Burkholderia cepacia* e *B. sacchari* (SCHUBERT; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1991; REHM; STEINBÜCHEL, 1999; ALEXANDRINO et al., 2015), entretanto outras organizações também são conhecidas em bactérias produtoras de PHA.

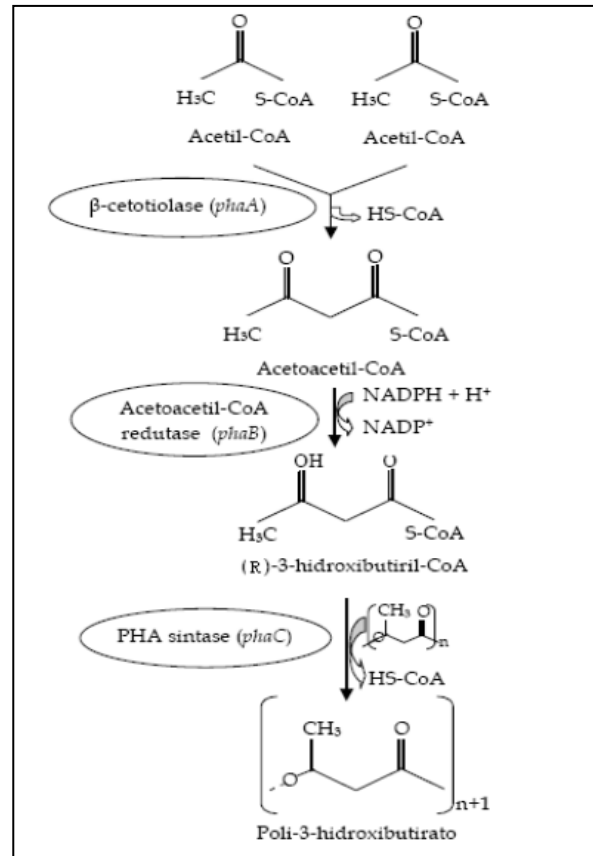


Figura 2.3 – Via metabólica simplificada de síntese de P3HB em *R. eutropha* (PIEMOLINI, 2004).

2.4.1 PHA sintase

Todas as bactérias produtoras de PHA são dotadas de uma enzima PHA sintase (PhaC), e cerca de 30 genes codificadores de PhaC já foram analisados, demonstrando que há similaridade entre as sequências nos diferentes organismos, além de resíduos conservados, como cisteína, histidina e aspartato em seu sítio catalítico (REHM, 2003; REHM; STEIBÜCHEL, 2005; NOMURA; TAGUCHI, 2007; REHM, 2007). De acordo com a estrutura primária proteica, número de subunidades e especificidade ao substrato, as PHA sínteses podem ser classificadas em 4 grupos (Figura 2.4): i) Classe I – compostas por apenas um tipo de unidade proteica (PhaC) e com especificidade por HA_{SCL} ; ii) Classe II – constituídas por um tipo de unidade polipeptídica (PhaC1 ou PhaC2), e apresentam especificidade por HA_{MCL} ; iii) Classe III – formada por duas subunidades proteicas diferentes (PhaC e PhaE), e tem afinidade por HA_{SCL} e, pelo menos em alguns casos, também por HA_{MCL} ; iv) Classe IV – possuem duas subunidades polipeptídicas diferentes (PhaC e PhaR), e tem afinidade por HA_{SCL} (REHM, 2003).



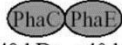
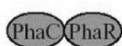
Classe	Subunidades	Espécies	Substrato
I	 ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	$3HA_{SCL}\text{-CoA}$ (~C3-C5) $4HA_{SCL}\text{-CoA}$, $5HA_{SCL}\text{-CoA}$, $3MA_{SCL}\text{-CoA}$
II	 ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$3HA_{MCL}\text{-CoA}$ (~ \geq C5)
III	 ~40 kDa ~40 kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	$3HA_{SCL}\text{-CoA}$ ($3HA_{MCL}\text{-CoA}$ [~C6-C8], $4HA\text{-CoA}$, $5HA\text{-CoA}$)
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	$3HA_{SCL}\text{-CoA}$

Figura 2.4 – Classificação das diferentes PHA sintase, considerando sua estrutura proteica e afinidade pelo substrato (Adaptado de REHM, 2003).

Embora exista esta classificação, algumas PHA sintases vêm demonstrando uma certa flexibilidade quanto a sua afinidade. A linhagem *Pseudomonas* sp. 61-3 possui PhaC de amplo espectro de substrato, sendo descrita como uma produtora natural de P(HA_{SCL-co}-PHA_{MCL}) (ABE et al., 1994). As linhagens de *R. eutropha* H16 e B5786, que apresentam PhaC do tipo I, foram capazes de incorporar monômeros de 3HB (3-hidroxi butirato), 3HV, (3-hidroxi valerato), 3HHx (3-hidroxi hexanoato), 3HHp (3-hidroxi heptanoato) e 3HO (3-hidroxi octanoato), na presença de CO₂ ou frutose e ácidos graxos (VOLOVA; KALACHEVA; STEINBÜCHEL, 2008). A bactéria *B. sacchari* (BRÄMER et al., 2001; ALEXANDRINO et al., 2015) possui PhaC também do tipo I, e se mostrou capaz de incorporar, além de 3HB, 4HB (4-hidroxi butirato) e 3HV, até 2 mols% de monômeros de 3HHx em sua cadeia polimérica (MENDONÇA, 2013). *Aeromonas caviae*, por sua vez, apresenta afinidade por 3HB, 3HHx e 3H4MV (3-hidroxi-4-metil valerato) (LAU et al., 2010).

Recentemente, foi determinada a estrutura cristalina e a reconstrução do modelo 3D da PHA sintase de *R. eutropha*. Neste trabalho, foi proposto que os domínios C e N terminal da proteína desempenhem funções diferentes e detalhado os mecanismos moleculares da síntese de PHA (KIM et al., 2016a, 2016b).

2.5 Degradação de PHA

Os mecanismos de degradação de PHA podem ser mediados por diversos micro-organismo, produtores ou não do biopolímero, pela ação das enzimas PHA despolimerases. Estas enzimas são classificadas como PHA despolimerases extracelulares e intracelulares, de acordo com a localização do polímero a ser degradado (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

A degradação extracelular consiste na utilização do polímero exógeno, a partir de materiais formados por PHA no solo e/ou da morte e lise de organismos produtores dos mesmos. Neste processo, o polímero que se encontra no estado desnaturado (dPHA) é catabolizado por e-PHA despolimerases (PHA despolimerases extracelulares), provenientes de fungos e bactérias, que não necessariamente são capazes de sintetizar PHA (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Já a degradação intracelular é a degradação ativa dos grânulos endógenos, previamente acumulados, e ocorre obrigatoriamente em organismos produtores do polímero. Este processo é denominado mobilização intracelular de PHA. Os grânulos endógenos se encontram no estado nativo (nPHA), e são então degradados por uma maquinaria de mobilização de PHA, formada principalmente pelas enzimas i-PHA despolimerases (SAEGUSA, et al., 2001; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002).

Assim como as PHA sintases, as PHA despolimerases apresentam afinidade pelo tipo de monômero que compõe a cadeia polimérica, o que permite classificá-las em i-PHA_{SCL} e e-PHA_{SCL}, capazes de degradar grânulos formados por monômeros de cadeia curta; i-PHA_{MCL} e e-PHA_{MCL}, que degradam polímeros com monômeros de cadeia média (HANDRICK et al., 2001; KNOLL et al., 2009).

2.5.1 Degradação Extracelular

A facilidade de degradação de PHA em ambientes naturais é um dos principais pontos que os colocam como produtos de interesse para a substituição de plásticos petroquímicos. Suas propriedades físico-químicas, como taticidade da cadeia, cristalinidade e composição monoméricas, contribuem fortemente para sua biodegradabilidade, entretanto, o ponto chave para que o processo ocorra depende da secreção de e-PHA despolimerases, codificadas por fungos e bactérias (ANDERSON; DAWES, 1990; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). A degradação de PHA em sistemas aeróbios leva à formação de água e gás carbônico, ao passo que em sistemas anaeróbios resulta-se em água, gás carbônico e gás metano (COX, 1992; BRANDL et al., 1995).

O isolamento de micro-organismos que secretam e-PHA despolimerases vem sendo relatado desde a década de 1960, e desde então vários estudos relataram a secreção de e-PHA despolimerases por micro-organismos isolados em diversos ecossistemas aeróbios ou anaeróbios, como solo, lodo, ambientes aquáticos, ar, esgoto e sedimentos estuário (CHOWDHURY, 1963; DELAFIELD et al., 1965; MERGAERT et al., 1993; BRIESE et al., 1994; HAN et al., 1998; GONDA; JENDROSSEK; MOLITORIS, 2000; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002, BOYANDIN et al., 2012). Recentemente, um grupo de pesquisadores isolou bactérias degradadoras de P3HB também no trato gastrointestinal de animais aquáticos (LIU et al., 2010).

Diversas metodologias sensíveis e fáceis de executar são descritas na literatura para a detecção da atividade de e-PHA despolimerases, favorecendo o estudo destas enzimas nos mais diferentes micro-organismos. Dentre elas podemos ressaltar o ensaio de turbidez, adotado em diversos estudos publicados (CHOWDHURY, 1963; DELAFIELD et al., 1965; TANIO et al., 1982; MERRICK; DOUDOROFF, 1964; JENDROSSEK et al., 1993; 1995; HANDRICK et al.; 2001; ABE et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2005; AZAMI et al., 2017). Nesta técnica, a atividade de e-PHA despolimerase é avaliada indiretamente por meio de medições de turbidez de suspensões opacas de grânulos de dPHA. Quando ocorre a hidrólise do polímero, o diâmetro dos grânulos de dPHA diminui, resultando numa redução da densidade óptica da suspensão de dPHA. Outro método bastante utilizado consiste na determinação de formação de ácido em suspensões aquosas de grânulos de dPHA, não tamponado ou pouco tamponado em sistema pH-*stat*. A reação acontece pela formação de um grupo carboxílico a cada hidrólise que se procede, levando a diminuição do pH (BACHMANN; SEEBACH, 1999; GEBAUER; JENDROSSEK, 2006; JENDROSSEK, 2007). Outros métodos menos usuais também são citados na literatura, como medições de perda de massa, microscopia eletrônica, ¹H-RMN (hidrogênio-ressonância magnética nuclear), ¹³C-RMN (carbono-ressonância magnética nuclear) e rastreamento de polímeros marcados com isótopos, entretanto, estes não parecem ser adequados para ensaios de rotina (JENDROSSEK, 2007).

As e-PHA despolimerases são codificadas pelos genes da família *phaZ*, que têm sido estudados desde 1989 por Saito e colaboradores. Estas enzimas são carboxilesterases, com afinidade por PHA em estado cristalino ou desnaturado (dPHA), e apresentam um trio catalítico em seu sítio ativo (Serina-Histidina-Ácido Aspártico), sendo este resíduo de serina constituinte de uma sequência dita *lipase box* (GxSxG). De modo geral, as e-PHA despolimerases compartilham diversas características, como alta estabilidade em condições adversas de pH, temperatura e força iônica, massa molecular relativamente baixa (<70 kDa), pH alcalino ótimo, inibição pela ação de agente redutores e inibidores de serino-hidrolases e forte afinidade com materiais hidrofóbicos (JENDROSSEK; SCHIRMER; SCHLEGEL, 1996; JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Ao longo dos anos, diversos genes foram caracterizados como codificadores de proteínas envolvidas na degradação extracelular. A maioria dos genes anotados é codificador de e-PHA_{SCL}, porém trabalhos de diversas e-PHA_{MCL} também foram identificadas (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; GANGOITI et al., 2012; MARTÍNEZ et al., 2012; SANTOS et al., 2013; LEE et al., 2018).

2.5.2 Degradação Intracelular

A degradação intracelular de PHA, também denominada mobilização, consiste no rompimento da cadeia polimérica, previamente formada, de modo a atender as necessidades da célula, quando esta se encontra em situação de deficiência ou ausência de carbono exógeno. Desta forma, esse processo ocorre apenas em organismos dotados também de uma maquinaria de síntese de PHA. Para que a mobilização ocorra, estes organismos contam com a ação das i-PHA despolimerases, codificadas pela família de genes *phaZ*, e das oligômeros hidrolases, produtos dos genes *phaY*, enzimas estas capazes de agir apenas sobre os grânulos nativos de PHA (nPHA) (DOI et al., 1990; MERRICK; STEGER; DOMBROSKI, 1999).

Os primeiros estudos de mobilização de PHA ocorreram na década de 1960, quando Merrick e colaboradores avaliaram grânulos de P3HB isolados de *Bacillus megaterium*. Os resultados demonstraram que a atividade de auto-hidrólise dos grânulos era baixa, entretanto estes eram rapidamente degradados quando tratados com extratos de *Rhodospirillum rubrum*, levando a formação de monômeros e oligômeros de 3HB. Foi demonstrado ainda, que o extrato de *R. rubrum* continha uma despolimerase termolável e um ativador termoestável, que permitiam que a hidrólise ocorresse. Acredita-se que o ativador, que parece se tratar de uma protease, interaja com a superfície do grânulo, deixando o polímero mais acessível para a despolimerase (MERRICK; DOUDOROFF, 1964; MERRICK; LUNDGREN; PFISTER, 1965).

Anos depois, foi proposto que os processos de síntese e mobilização de PHA ocorressem de forma cíclica, em que PHA sintases e i-PHA despolimerases atuem simultaneamente (DOI et al., 1990; DOI et al., 1992; KAWAGUCHI; DOI, 1992; TAIDI; MANSFIELD; ANDERSON, 1995). Um dos modelos de metabolismo de síntese e mobilização de P3HB em *R. eutropha*, está esquematizado na Figura 2.5.

Neste exemplo, para que a mobilização se inicie, os grânulos de P3HB previamente acumulados são hidrolisados pelas i-PHA despolimerases, levando a formação de monômeros e/ou oligômeros de 3HB. Quando há formação de oligômeros, as bactérias contam com as oligômeros hidrolases, que clivam estas moléculas formando monômeros de 3HB (SCHERER et al., 2000; SAITO; KOBAYASHI, 2001; SUGIYAMA et al., 2004). Estes monômeros são então oxidados a acetoacetato, pela ação da 3-hidroxiubutirato desidrogenase NAD^+ específica, que será convertido em acetoacetyl-CoA, pela succinil-CoA transferase ou pela acetoacetyl-CoA sintetase. Este acetoacetyl-CoA é por sua vez clivado em duas moléculas de acetyl-CoA, pela β -cetiolase (PhaA), podendo seguir pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos (SENIOR; DAWES, 1973; DOI et al., 1990; SUGIYAMA et al., 2004; SHIRAKI; ENDO; SAITO, 2006).

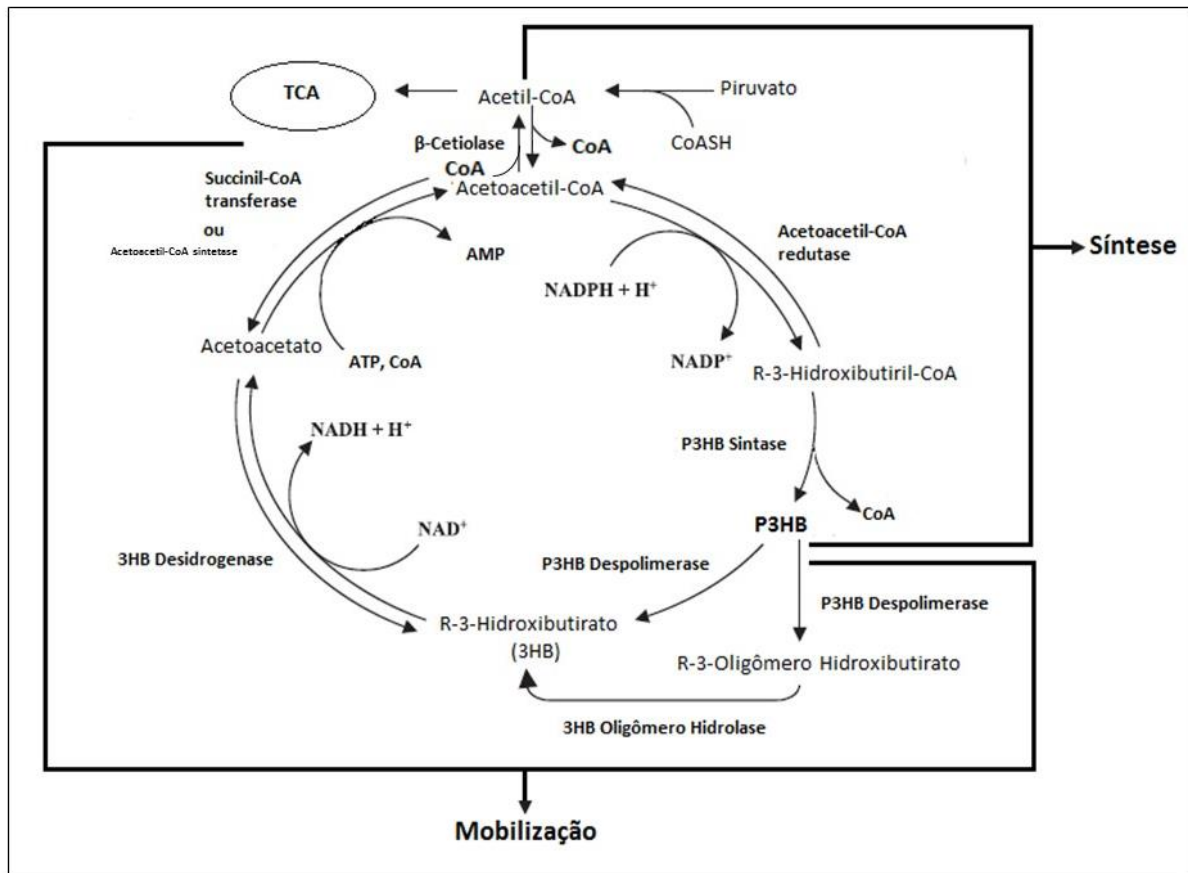


Figura 2.5 – Via metabólica de síntese e mobilização de P3HB em *R. eutropha* (Adaptado de SHIRAKI; ENDO; SAITO, 2006).

Entretanto, um estudo posterior demonstrou que a atividade tiolítica de grânulos isolados de nP3HB resulta na liberação de 3HB-CoA, e não 3HB livre, como acreditava-se até o momento (UCHINO; SAITO, 2006). Os autores demonstraram ainda, que P3HB sintase pode desempenhar uma função reversa, levando a degradação dos grânulos nP3HB e a formação de 3HB-CoA, embora em pequenas concentrações. No ano seguinte, a formação de 3HB-CoA como resultado da tiólise dos grânulos de nP3HB foi confirmada. Outro resultado surpreendente deste trabalho foi a constatação de que, sob condições apropriadas, os mesmos grânulos de nP3HB isolados eram capazes de catalisar a formação de P3HB a partir de acetil-CoA e a degradação de P3HB para acetil-CoA *in vitro* (UCHINO et al., 2007). Estes resultados permitiram a total compreensão do modelo proposto por Doi e colaboradores (1990; 1992) e Taidi e colaboradores (1995), em que a síntese e mobilização ocorrem simultaneamente na célula, sem que isto gere um ciclo fútil de dissipação de energia. Entretanto, o equilíbrio entre as taxas de polimerização e de degradação intracelular é controlado de acordo com a condição ambiental em que a célula se encontra, alternando a expressão

gênica ao longo do crescimento, e conseqüentemente a concentração dos metabólitos-chave de cada processo (UCHINO et al., 2007; REN et al., 2009; WANG et al., 2009; BRIGHAM et al., 2012).

Embora os estudos com i-PHA despolimerases tenham iniciado na década 1960, a investigação bioquímica da mobilização de P3HB foi dificultada pois esperava-se que, assim como nas e-PHA despolimerases, os produtos finais da degradação intracelular fossem monômeros livres de 3HB (ou oligômeros de 3HB). Com a descoberta de que grânulos isolados de nPHB liberam 3HB-CoA a partir da tiólise dos grânulos, percebeu-se que muitos estudos buscavam pela atividade errada (UCHINO; SAITO, 2006; UCHINO et al., 2007).

Atualmente, pelo menos nove genes foram anotados como relacionados à mobilização de P3HB em *R. eutropha*, sendo que 7 codificariam P3HB despolimerases intracelulares (*phaZa1* a *phaZa5*, bem como *phaZd1* e *phaZd2*) e 2 oligômero hidrolases (*phaY1* e *phaY2*). Entretanto, muitos dos genes anotados como de possíveis i-P3HB despolimerase, não tem sua atividade bioquímica com grânulos nP3HB confirmada experimentalmente, permanecendo sua verdadeira função *in vivo* obscura (HANDRICK; REINHARDT; JENDROSSEK, 2000; SAEGUSA et al., 2001; KOBAYASHI; SAITO, 2003; KOBAYASHI et al., 2003; YORK et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2004; ABE; KOBAYASHI; SAITO, 2005; KOBAYASHI et al., 2005; POHLMANN et al., 2006; JENDROSSEK, 2009; BRIGHAM et al., 2012; SZNAJDER; JENDROSSEK, 2014).

A primeira i-PHA despolimerase descrita em *R. eutropha* foi denominada PhaZ (atualmente PhaZa1), quando Saegusa e colaboradores (2001) identificaram um gene cujo produto era capaz de degradar grânulos artificiais de P3HB. Embora PhaZa1 não tenha sua atividade hidrolítica detectável quando adicionada à grânulos de nP3HB e apenas uma pequena atividade detectada com grânulos aP3HB *in vitro* (ABE et al., 2005; UCHINO et al., 2007), esta é a mais provável despolimerase intracelular fisiológica de *R. eutropha*. Isto se dá pelo fato de PhaZa1 estar associada ao grânulo de P3HB, além de resultados com um mutante de *R. eutropha* cujo gene *phaZa1* estava interrompido, ter sua capacidade de mobilização muito diminuída *in vivo*, porém não completamente anulada (SAEGUSA et al., 2001; UCHINO et al., 2007; BRESAN et al., 2016). Um trabalho com cepas recombinantes de *E. coli* pôde observar a excreção de 3HB quando o gene *phaZa1* de *R. eutropha* era expresso nestas linhagens, evidenciando o papel de PhaZa1 como i-P3HB despolimerases. O mesmo não pode ser observado quando eram expressos outros genes anotados como codificadores de possíveis i-P3HB despolimerases (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008).

O trabalho de Saegusa et al. (2001) sugere que PhaZa1 tenha uma ação como i-P3HB despolimerase, entretanto não seria a única enzima atuando nesse sentido, já que foram detectadas taxas de mobilização, ainda que baixas, em mutantes com deleção de *phaZa1*. Partindo desse

pressuposto, outros trabalhos buscaram, por similaridade de sequência, novas enzimas possivelmente envolvidas na mobilização de P3HB em *R. eutropha*. Em 2003, foram identificadas duas novas sequências de proteínas possivelmente envolvidas no processo de mobilização em *R. eutropha* (PhaZa2 e PhaZa3). Foram obtidos mutantes combinados ($\Delta phaZa1$, $\Delta phaZa2$, $\Delta phaZa3$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa2$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa3$, $\Delta phaZa2\Delta phaZa3$, $\Delta phaZa1\Delta phaZa2\Delta phaZa3$), e observou-se que o papel de PhaZa1 na mobilização de P3HB é mais expressivo que as demais possíveis despolimerases avaliadas (KOBAYASHI et al., 2003; YORK et al., 2003). No mesmo ano foi determinada a tríade catalítica de PhaZa1, a partir da obtenção de mutantes pontuais nos resíduos mais conservados da sequência primária desta proteína. Foi demonstrado que os resíduos C183, D355 e H388 constituem a tríade catalítica de PhaZa1 (KOBAYASHI; SAITO, 2003). A despolimerase hoje denominada PhaZd1, foi identificada por *Western Blotting* e se mostrou capaz de degradar grânulos de nP3HB, liberando principalmente oligômeros de 3-hidroxibutirato (ABE et al., 2005). As oligômeros hidrolases foram identificadas por similaridade de sequência com e-PHA despolimerases, e demonstrado sua atividade utilizando grânulos artificiais, indicando uma cooperação destas enzimas com a i-P3HB despolimerases (SUGIYAMA et al., 2004, KOBAYASHI et al., 2005).

Em 2006, Pholmann e colaboradores relataram a sequência completa do genoma dos dois cromossomos de *R. eutropha* H16. Foi possível identificar sete genes codificadores de isoenzimas da i-P3HB despolimerase, phaZ1 a phaZ7 (*phaZ6* e *phaZ7*, atualmente denominadas *phaZd1* e *phaZd2*), além de duas oligômeros hidrolases de P3HB (*phaY*).

Mais recentemente, foi abordada interação entre os produtos de *phaZa1*, *phaZa2*, *phaZa3* e *phaZa5* em *R. eutropha*, através de mutantes combinados destes genes. Os resultados deste estudo apontam apenas para o papel de PhaZa2 na mobilização de P3HB, provavelmente remodelando o grânulo para a degradação (BRIGHAM et al., 2012).

As enzimas PhaZd1 e PhaZd2 de *R. eutropha*, também foram avaliadas em diferentes abordagens *in vitro* e *in vivo*. Foi determinada a tiólise de grânulos isolados de nP3HB, com remoção parcial da camada proteica da superfície dos grânulos de nP3HB, pelo tratamento com tripsina ou pelo uso de linhagens mutantes nos genes codificadores de PHAsinas, se procedeu a expressão constitutiva dos genes de interesse, a fusão com proteína fluorescente (EYFP) a fim de determinar alguma colocalização destas enzimas com os grânulos de P3HB, experimentos *in vivo*, avaliando a capacidade de acúmulo e de mobilização de P3HB, em mutantes com deleção cromossômica dos genes *phaZd1* e *phaZd2*, além da análise proteômica do grânulos de nPHB purificados e o estudo de fusão com *lacZ* a fim de obter alguma indicação de que as proteínas PhaZd1 ou PhaZd2 estavam presente de forma detectável na fração de grânulos de P3HB ou expressos durante o crescimento

celular. Após todas essas análises, os autores concluem que PhaZd1 e PhaZd2 são P3HB despolimerases com alta capacidade de degradar o P3HB, quando expressas artificialmente, mas não se mostram envolvidas na mobilização do polímero na cepa selvagem, permanecendo incertos seus reais papéis *in vivo* (SZNAJDER; JENDROSSEK, 2014).

A mobilização de P3HB, a partir de genes provenientes de *R. eutropha*, vêm sendo estudada também através de linhagens recombinantes de *E. coli* capazes de sintetizar o biopolímero, por diversos autores. Embora diferentes abordagens sobre o assunto tenham sido aplicadas, a ação das enzimas nestes recombinantes ainda tem muitos para ser esclarecida (LEE; LEE, 2003; UCHINO et al., 2007; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009, LOZANO, 2013; EGGERS; STEINBÜCHEL, 2014). O item 2.7 traz uma revisão mais detalhada destes estudos.

Os estudos de mobilização de P3HB utilizando genes de *R. eutropha* em nosso laboratório se iniciaram com a expressão dos genes *phaZa1*, *phaZa2* e *phaZa3* de *R. eutropha* em mutantes por UV de *Burkholderia sacchari* afetados na mobilização do biopolímero. Os produtos dos três genes avaliados recuperaram a atividade de mobilização de P3HB dos mutantes, sendo o produto de *phaZa1* o que apresentou o resultado mais expressivo (CASTELLANOS, 2010). O mesmo trabalho obteve dois mutantes de *B. sacchari* por transposon mini-*Tn5*, afetados na mobilização de P3HB, que tiveram os genes *phaZa1* e *lonA* interrompidos pelo transposon. Diferente do produto de *phaZa1*, o envolvimento do produto de *lonA* neste processo foi um resultado inesperado, uma vez que LonA, uma protease ATP dependente, nunca havia sido mencionada como envolvida no metabolismo de PHA anteriormente (CASTELLANOS, 2010). A partir desses resultados, Lozano (2013) avaliou o efeito dos produtos de *phaZa1* e *lonA* na mobilização de linhagens recombinantes de *E. coli*. Foi demonstrado que, para que a mobilização de P3HB seja efetiva nestes recombinantes, é preciso que os dois genes sejam expressos concomitantemente. Entretanto, a função de LonA na mobilização de P3HB não está clara.

Diversos trabalhos apontaram para genes ortólogos relacionados à mobilização de PHA em diferentes espécies bacterianas, como *B. sacchari* (CASTELLANOS, 2010), *Rhodospirillum rubrum* (HANDRICK et al., 2004; SZNAJDER; JENDROSSEK, 2011), *Pseudomonas putida* (EUGENIO et al., 2007; PRIETO et al., 2010; REN et al., 2010), *Paucimonas lemoignei* (JENDROSSEK et al., 2013), *Azotobacter vinelandii* (ADAYA et al., 2013; 2018).

Embora a literatura relate diversos trabalhos com possíveis i-PHA despolimerases, o mecanismo bioquímico pelo qual a mobilização de PHA ocorre ainda é pouco esclarecido. Seu estudo ainda é dificultado por limitações técnicas, uma vez que o substrato polimérico *in vivo* se trata de grânulos amorfos de PHA (nPHA). Estes grânulos são cobertos por uma camada superficial de proteínas, que pode ser facilmente danificada, alterando a conformação dos grânulos (JENDROSSEK, 2009; BRESAN et al., 2016). Diversos trabalhos utilizaram de grânulos artificiais

(aPHA) para avaliar atividades despolimerases (HOROWITZ; SANDERS, 1994; SAEGUSA et al., 2001; SUGIYAMA et al., 2004; ABE et al., 2005), no entanto estes grânulos não são estruturas fisiológicas, ou seja, as proteínas *in vivo* ligadas à superfície do polímero estão ausentes em aPHA. Dado que a maioria das enzimas nas células vivas são hidrolases ou esterases, muitas das enzimas estudadas podem se mostrar capazes de hidrolisar a ligação éster dos PHA a partir de aPHA *in vitro*, no entanto, não hidrolisam nPHA *in vivo*, pois estão localizadas em diferentes compartimentos celulares e/ou não podem se ligar ao polímero amorfo devido à camada de proteínas que o reveste. A utilização de grânulos de nPHA purificados cuidadosamente a partir de gradiente de glicerol (MERRICK; DOUDOROFF, 1964), como substrato para ensaios *in vitro* de i-PHA despolimerases, pode levar a resultados mais significativos, embora essa metodologia tenha sido pouco utilizada (JENDROSSEK, 2007; 2009).

2.6 Outras enzimas envolvidas no metabolismo de PHA

Além das enzimas já descritas como envolvidas na síntese e mobilização de PHA, o metabolismo destes biopolímeros conta com a ação de outras enzimas, que se associam aos grânulos de PHA. Dentre elas podemos falar principalmente de PHAsinas, de enzimas repressoras e de PhaM.

PHAsinas são as proteínas dominantes associadas à superfície dos grânulos de PHA, codificadas pelos genes *phaP*. A principal função das PHAsinas é influenciar o tamanho e número de grânulos formados, pois conferem estabilidade a estes e evitam que os mesmos de coalesçam. Estas proteínas se ligam fortemente à superfície hidrofóbica dos grânulos de PHA em crescimento, de modo a impedir a ligação de outras proteínas. Desta forma, os níveis de expressão de PhaP na célula bacteriana afetam a hidrofobicidade dos grânulos, levando a formação de pequenas inclusões (WIECZOREK et al., 1995). As PHAsinas podem ainda afetar positivamente a síntese destes polímeros, atuando como ativadores da PHA sintase (JOSSEK; REICHEL; STEINBÜCHEL, 1998; YORK, STUBBE; SINSKEY, 2001; USHIMARU et al., 2014), além de se mostrarem importantes na mobilização do polímero, quando associadas à i-PHA despolimerases (UCHINO et al., 2007; EGGERS; STEINBÜCHEL, 2014). Sete genes já foram descritos como codificadores de PHAsinas em *R. eutropha* (*phaP1* a *phaP7*), sendo o gene *phaP1* o melhor caracterizado e codificador da PHAsina mais abundante na superfície do grânulo de P3HB (PÖTTER et al., 2004; 2005; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2011; PFEIFFER; WAHL; JENDROSSEK, 2011; BRIGHAM et al., 2012; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2013; BRESAN et al., 2016).

As proteínas repressoras, codificadas pelo gene *phaR*, atuam na regulação da síntese de PHA, pois é capaz de se ligar tanto no DNA, reprimindo a expressão de *phaP*, como diretamente ao

biopolímero, o que funciona como um mecanismo indireto de regular positivamente a expressão de PhaC durante a síntese de PHA (MAEHARA et al., 2001; 2002; PÖTTER et al., 2002; MA et al., 2013).

Já a proteína multifuncional PhaM de *R. eutropha*, foi identificada em um trabalho utilizando abordagem de duplo-híbrido, como capaz de interagir fortemente com as enzimas PhaC e PhaP5 (PFEIFFER; JENDROSSEK, 2011). Estudos posteriores demonstraram que PhaM atua como um ativador fisiológico da atividade enzimática da P3HB sintase, confirmando sua forte ligação com PhaC (PFEIFER et al., 2011; PFEIFER; JENDROSSEK, 2014).

Uma análise proteômica recente dos grânulos de P3HB de *R. eutropha*, revelou ainda a presença de quatro novas proteínas associadas à superfície granular. Duas destas proteínas estão anotadas como possíveis α/β -hidrolases (H16_B1632 e H16_A0671), outra delas como uma possível fosfolipase (H16_A0225), e por fim, a quarta é anotada com uma proteína hipotética (H16_A2001) (SZNAJDER; PFEIFFER; JENDROSSEK, 2015).

2.7 Síntese e mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*

Linhagens de *Escherichia coli* são geralmente o sistema mais utilizado em engenharia genética, resultando em um importante organismo para o desenvolvimento de bioprodutos (VICKERS; KLEIN-MARCUSCHAMES; KROEMER, 2012). Não sendo um produtor natural de PHA, as cepas recombinantes de *E. coli* são fortes candidatas à produção industrial desses biopolímeros, pois são capazes de consumir diversas fontes de carbono, apresentam uma fragilidade celular desejada para extração de polímeros, rápido crescimento e são facilmente transformáveis. Outra vantagem das linhagens de *E. coli* é que estas não possuem sistemas naturais de degradação intracelular de PHA, fazendo deste organismo um sistema adequado para estudar enzimas envolvidas na mobilização, além de possibilitar o acúmulo de altas taxas de polímero com alto peso molecular (UHMW - *ultra-high molecular weight*), podendo assim reduzir os custos de produção (LEE, 1996; LI et al., 2007; NOMURA; TAGUCHI, 2007; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009; CHEN et al., 2011; BOCANEGRA et al., 2013).

Os primeiros estudos com a expressão heteróloga de PHA em *E. coli* foram relatados no final dos anos 1980, quando o operon *phaCAB* de *R. eutropha* foi clonado e expresso (SCHUBERT; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1988; SLATER et al., 1988; PEOPLE; SINSKEY, 1989). A partir deste trabalho, foi possível demonstrar a viabilidade da produção heteróloga de PHA, e desde então diversos estudos buscam por estratégias que levem a melhorias aos processos de síntese destes biopolímeros em linhagens de *E. coli* recombinante.

O papel dos produtos dos genes de biossíntese de PHA de outras bactérias como *P. aeruginosa* (PhaC de classe II) *Azohydromonas lata* (PhaC de classe I), *Thiocapsa pfennigii* (PhaC de classe III), *Azotobacter* sp. e *Streptomyces aureofaciens* (PhaC de classe I) foram analisados em cepas recombinantes de *E. coli* (QI; REHM; STEINBÜCHEL, 1997; CHOI; LEE; HAN, 1998; LIU; STEINBÜCHEL, 2000; MAHISHI; TRIPATHI; RAWAL, 2003). Embora, muitas linhagens produtoras de PHA tenham tido seus genes de biossíntese clonados, expressos e caracterizados em *E. coli*, os genes de *R. eutropha* ainda são os mais estudados, e a literatura dos últimos anos traz diferentes abordagens para maximizar o acúmulo de P3HB neste organismo.

Bocanegra e colaboradores (2013) avaliaram a produção de P3HB de alto peso molecular (UHMW) com linhagens *E. coli* recombinante, em cultivos em biorreatores. Foi possível produzir biopolímero com peso molecular variando entre 2,0 e 2,5 MDa, a partir de glicose, entretanto o P3HB de alto peso molecular também foi sintetizado quando xilose foi utilizada como fonte de carbono, evidenciando a possibilidade de produzir esses polímeros com fontes de lignocelulose. Os autores ressaltam ainda que o pH do cultivo não interferiu na produção de P3HB de alto peso molecular. Buscando também fontes de carbono alternativas, os trabalhos de Ganesh e colaboradores (2015), e Bhatia e colaboradores (2015) testaram a capacidade de *E. coli* recombinante produzir P3HB a partir de glicerol e amido, respectivamente. No primeiro trabalho, os cultivos em biorreatores resultaram na produção de P3HB de alto peso molecular e cristalinidade reduzida, comprovando a viabilidade do uso de subprodutos do biodiesel para gerar o biopolímero (GANESH et al., 2015). Já com o objetivo de produzir P3HB a partir de amido como única fonte de carbono, os pesquisadores construíram uma linhagem de *E. coli* que abrigasse o gene da amilase de *Panibacillus* sp. e genes de síntese de P3HB de *R. eutropha*. A cepa modificada pode acumular até 57,4% de P3HB intracelular da sua massa seca celular (BHATIA et al., 2015).

Hiroe e colaboradores (2013) demonstraram que o etanol endógeno produzido por *E. coli* recombinante atua como um agente de transferência de cadeia igualmente eficaz como o etanol exógeno, e que o controle da produção de etanol é um importante fator para regular o peso molecular do P3HB produzido. No mesmo ano, a capacidade de acúmulo de P3HB foi avaliada em mutantes por evolução sítio dirigida cuja enzima PhaB fosse modificada. Neste trabalho, os autores sugerem que as mutações afetam a interação com os substratos, levando a um aumento na capacidade de acúmulo de P3HB (MATSUMOTO et al., 2013).

Outra abordagem demonstrou que a coexpressão de chaperonas moleculares é eficaz para produzir a forma ativa da PHA sintase e pode ser usada para controlar a concentração desta enzima. Os autores sugerem que a PhaC, quando super-expressa em *E. coli* recombinante, forma um corpo

de inclusão, e por esse motivo a coexpressão de chaperonas favorece a forma ativa da sintase (THOMSON et al., 2013).

A fim de avaliar a integração dos genes de síntese de P3HB no cromossomo de *E. coli*, um estudo mostrou que a capacidade de acúmulo do polímero é influenciada pelos *locus* cromossômicos onde os genes são integrados. Segundo os autores, esse efeito ocorre devido as inserções aleatórias gerarem diferentes regulações transcricionais dos genes integrados. Em uma biblioteca de clones mostrando diferentes inserções aleatórias, uma seleção baseada na capacidade de acúmulo de P3HB, revelou clones atingindo níveis intracelulares de polímero comparáveis àqueles obtidos quando usando o operon de síntese expresso em plasmídeos (MARTÍNEZ-GARCÍA et al., 2014).

Para otimização da via de síntese de P3HB altamente eficiente em *E. coli* recombinante, foi utilizada uma abordagem semi-razional ajustando os níveis de expressão dos três genes, *phaA*, *phaB* e *phaC*, de *R. eutropha*. Para cada um destes genes foi construída uma biblioteca de sítio de ligação ribossomal (RBS) com base em plasmídeos de alto ou baixo número de cópias. Esta abordagem resultou em cepas capazes de acumular até 92% de P3HB de massa seca celular, com pesos moleculares médios, variando de 2,7 a 6,8 x 10⁶ Da (LI et al., 2016).

Em 2016, um grupo de pesquisadores utilizou a abordagem de CRISPRi para regular a intensidade de expressão dos genes *ftsZ* e/ou *mreB* em *E. coli*, codificadores das proteínas formadoras do anel Z e do esqueleto de actina na fissão binária, respectivamente. As repressões combinadas nas expressões de *ftsZ* e *mreB* geraram células longas e maiores, com diversas morfologias. Em todos os casos, a capacidade de acúmulo de P3HB foi diretamente proporcional ao volume intracelular, variando as taxas de P3HB de 40% a 80% da massa seca bacteriana (ELHADI et al., 2016). No mesmo sentido, Wu e colaboradores (2016) mostraram que as mudanças do padrão de crescimento comum de *E. coli* JM109, passando de fissão binária para múltiplos padrões de fissão, juntamente com mudanças no controle da forma celular, resultaram em acúmulo de mais de 80% de massa seca celular. A divisão múltipla e a morfologia celular maior resultaram em mais espaço de armazenamento nas células, levando ao aumento da síntese de P3HB.

A tecnologia de CRISPRi também foi empregada para regular a atividade da P3HB sintase, influenciando a síntese do polímero. Os autores demonstraram que quanto maior a atividade da PhaC, maior o acúmulo de P3HB intracelular, porém menor os pesos moleculares do polímero produzido. Este estudo permitiu que os teores de P3HB fossem controlados nos intervalos de 1,47 a 75,21% da massa seca de células, e os pesos moleculares de 2 a 6 x 10⁶ Da (LI et al., 2017).

Embora muitos trabalhos visem a uma melhora nos processos de síntese de P3HB, as linhagens recombinantes de *E. coli* têm servido como promissora plataforma para estudos dos produtos dos genes envolvidos na mobilização do polímero também. Diversos trabalhos avaliaram

a coexpressão de *phaZa1* e *phaCAB* em *E. coli* (LEE; LEE, 2003; UCHINO et al., 2007; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009; LOZANO, 2013). Com exceção do trabalho de Lee e Lee (2003), os resultados apresentados sugerem que, embora o produto de *phaZa1* desempenhe importante papel da mobilização de P3HB, esta não é expressiva quando *phaZa1* é expresso isoladamente em linhagens de *E. coli* recombinante.

Lee e Lee (2003) indicaram que a coexpressão de *phaZa1* e *phaCAB* levava a produção e excreção de quantidades expressivas de 3HB no meio de cultura, alcançando aproximadamente 10 g/L, após 30 horas de cultivo. Uchino e colaboradores (2008) vislumbraram no modelo experimental de Lee e Lee (2003) uma estratégia para avaliar o papel de outros genes anotados como codificadores de i-P3HB intracelular. Entretanto, mesmo após diversas tentativas, os autores conseguiram apenas demonstrar uma pequena excreção de 3HB em linhagens de *E. coli* abrigando simultaneamente *phaCAB* e *phaZa1*, que atingiu cerca de 0,02 g/L, não sendo possível reproduzir os resultados de Lee e Lee (2003). Wang e colaboradores (2009) também avaliaram a coexpressão de *phaCAB* e *phaZa1* em linhagens de *E. coli*. Estes autores obtiveram uma excreção de 0,2 g/L de 3HB, embora após 20 dias de cultivo. O trabalho de Lozano (2013) avaliou a mobilização de P3HB em *E. coli* quando o produto dos genes *phaZa1* e *lonA* são expressos isolados ou combinados na célula hospedeira. Os resultados de Lozano também não demonstraram mobilização evidente quando apenas *PhaZa1* se encontrava presente. Foram obtidos cerca de 0,018 g/L de 3HB excretado no sobrenadante, o que equivale a menos de 5% do polímero previamente acumulado. Entretanto, foi possível demonstrar que a mobilização em *E. coli* pode ser significativa quando há concomitante expressão de *phaZa1* e *lonA*, obtendo taxas de mobilização de mais de 50% do P3HB acumulado intracelularmente.

Em 2006, Uchino e Saito demonstraram a presença de uma atividade tiolítica da P3HB sintase de *R. eutropha*, clonada em *E. coli* recombinante. A atividade foi analisada por HPLC a partir de uma reação de mistura contendo PhaC, grânulos nP3HB e CoASH. Foi observado a formação e liberação de 3HB-CoA da mistura, indicando pela primeira vez a atividade reversa da P3HB sintase, no entanto a atividade observada foi bastante baixa, atingindo apenas cerca de 0,01 mM 3HB-CoA.

Uchino e colaboradores (2007) avaliaram a atividade tiolítica de *PhaZa1* isolada e expressa junto com a PHAsina *PhaP1*. Foi observado que, apenas quando ambos dos genes, *phaZa1* e *phaP1*, são coexpressos na célula é possível detectar a formação de 3HB-CoA (aproximadamente 0,2 mM), como consequência da tiólise do grânulo de nP3HB. Tais resultados corroboram com a ideia de que *PhaZa1* isolada não é capaz de efetuar uma mobilização efetiva das células recombinantes. No mesmo sentido, o trabalho de Eggers e Steinbüchel (2014), avaliou a expressão dos genes

codificadores de diferentes despolimerases (PhaZ1, PhaZ2, PhaZ3 e PhaP7) combinados com genes codificadores de PHAsinas (PhaP1, PhaP2 e PhaP4). Os resultados apontam que a coexpressão de PHAsinas e i-P3HB depolimerases influenciou a quantidade de P3HB armazenada nas células, indicando que estas enzimas influenciam na mobilização do biopolímero.

Em suma, o estudo do metabolismo de P3HB em *E. coli* pode provocar diversas respostas regulatórias e metabólicas globais, muitas delas exploradas no nível transcricional. Entretanto, do que se diz respeito a como esses processos são inseridos na rede metabólica bacteriana, o conhecimento ainda é limitado (LOPEZ et al., 2015). Entender melhor esses processos se fazem necessário, uma vez que pode resultar em melhorias para produção destes biopolímeros, e consequentemente diminuição dos custos de produção.

2.8 LonA protease ATP dependente

O produto do gene *lonA* consiste em uma protease ATP dependente que, assim como outras proteases ATP dependentes, pertence à superfamília proteínas AAA+ (ATPases Associadas à diversas Atividades). Membros desta superfamília compartilham um domínio ATPase altamente conservado, e são capazes de realizar uma ampla variedade de funções celulares, e esta versatilidade muitas vezes é definida pelos parceiros funcionais aos quais se associam (NEUWALD et al., 1999; MAURIZI; LI, 2001; IYER et al., 2004; ROTANOVA et al., 2006; SNIDER; THIBAUT; HOURY, 2008; STRIEBEL; KRESS; WEBER-BAN, 2009).

A protease Lon se mostra muito conservada, podendo ser encontrada em procariotos e em organelas eucarióticas. Em *E. coli*, esta foi a primeira protease a ser identificada, e então denominada protease La. (CHUNG; GOLDBERG, 1981; SWAMY; GOLDBERG, 1981). Atualmente, o gene que codifica a protease Lon de *E. coli* é anotado como diversos nomes: *lonA*, *lon*, *capR*, *deg*, *dir*, *ECK0433*, *JW0429*, *lopA*, *muc* (GenBanK). Embora a protease LonA tenha sido a primeira protease ATP dependente estudada, o conhecimento de sua estrutura, bioquímica e mecanismos de ação estão aquém, quando comparado a outras enzimas similares (ROTANOVA et al., 2006). Sabe-se que, entre outras funções, estas proteases são enzimas chaves responsáveis pela proteólise seletiva intracelular, que controla a qualidade da proteína e mantém a homeostase celular (GOLDBERG, 1992; WICKNER; MAURIZI; GOTTESMAN, 1999).

Em busca de caracterizar sua atividade, foram obtidos mutantes no gene *lonA* de *E. coli* K12, o que resultou em uma variedade de fenótipos, incluindo superexpressão da cápsula polissacarídica, aumento da sensibilidade a UV e radiação iônica e defeito na divisão celular (CHARETTE;

HENDERSON; MARKOVITZ, 1981). Outro trabalho com mutantes de *E. coli* K12 no gene *lonA*, mostrou que LonA parece não ser essencial em condições normais de crescimento, uma vez que seus mutantes se mostraram viáveis, embora tenham sido mais sensíveis à agente que danificam DNA e acumulem uma maior quantidade de proteínas anormais (GOTTESMAN, 2003). Nos últimos anos, LonA teve seu papel relacionado a diversos processos nos diferentes organismos, como divisão celular, biossíntese flagelar, síntese da cápsula, tolerância a acidez, mobilidade, formação de biofilme, regulação da resposta SOS no reparo de DNA, virulência, adaptação a escassez nutricional, regulação do sistema *Quorum Sensing* (QS), entre outros (ROTANOVA et al., 2006; MELDEREN; AERTSEN, 2009; BREIDENSTEIN; BAINS; HANCOCK, 2012).

Um das atuações de LonA mais estudada é regulação da resposta SOS. Embora haja diferentes hipóteses de como LonA regula esse sistema, a degradação de Sula é provavelmente a melhor explicação para tal. A expressão do gene *sula* é induzido diretamente por danos causados no DNA. Sula impede a formação do septo celular e atrasa a divisão celular pois se liga à proteína de divisão celular FtsZ, assim a célula tem tempo hábil para reparar o DNA danificado. Quando o DNA é reparado, LonA degrada Sula e a divisão celular é retomada, desligando a expressão de *sula*. Devido aos vários impactos de Sula na divisão celular, outras proteases ATP dependentes podem degradar esta proteína, quando LonA está ausente. No entanto, LonA continua sendo a principal protease envolvida neste processo (MIZUSAWA; GOTTESMAN, 1983; WU; ZHOU; GOTTESMAN, 1999; MELDEREN; AERTSEN, 2009).

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

Vários estudos demonstraram que mutações no gene *lonA* pode conferir uma redução significativa no fenótipo de patogenicidade e/ou virulência, em várias espécies de bactérias Gram-negativas, como *Salmonella enterica* (TAKAYA et al., 2003), *Brucella abortus* (ROBERTSON et al., 2000), *Campylobacter jejuni* (COHN et al., 2007), *Agrobacterium tumefaciens* (SU et al., 2006), *Pseudomonas syringae* (LAN et al., 2007) e *P. aeruginosa* (BREIDENSTEIN et al., 2012). Estes patógenos, muitas vezes utilizam sistema de secreção tipo III para infectar as células eucarióticas. A expressão do sistema de secreção tipo III é regulada por LonA, que modula a

quantidade de reguladores transcricionais chave para a expressão dos genes envolvidos neste sistema (MELDEREN; AERTSEN, 2009).

Foi demonstrado ainda que em *E. coli*, quando a célula se encontra em escassez de aminoácidos, diversas proteínas ribossomais livres são degradadas por LonA, na presença de polifosfato (polyP), resultando em aminoácidos livres. Estes aminoácidos serão, por sua vez, utilizados na síntese de enzimas biossintéticas, permitindo que a célula se adapte às condições de escassez de nutrientes (KURODA et al., 2001). Heuveling e colaboradores (2008) demonstraram que os genes chave para resistência a acidez em *E. coli* (*gadE*, *gadA* e *gadBC*) também são regulados por LonA. Os autores acreditam que esta protease possa controlar a quantidade do repressor secundário destes genes. Foi demonstrado, que o gene *lonA* pode ser induzido em condições de estresses como desequilíbrio de sais, presença de etanol, estresses oxidativo, choque térmico, acidez e escassez de nutrientes (RIETHDORF et al., 1994; MELDEREN; AERTSEN, 2009; JIAHN et al., 2012), entretanto ainda não se determinou o seu papel preciso no gerenciamento de estresses.

Um trabalho com *Burkholderia cenocepacia* indicou a importância de LonA na síntese de N-acil-homoserinalactonas (AHL), moléculas sinais para a regulação do sistema *Quorum Sensing* (QS). Acredita-se que LonA possa degradar as proteínas repressoras da expressão de genes cujos produtos estão envolvidos na síntese de AHL (CepR e CicR), uma vez que este processo diminuiu drasticamente em cepas com o gene *lonA* mutado (VESELOVA et al., 2012). Recentemente, o produto deste gene foi apontado como envolvido na produção de ramnolipídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores demonstraram que as proteínas Crc-Hfq/Lon/RhlI atuam em uma cascata regulatória pós-transcricional na regulação da produção de ramnolipídeos e *rhl* QS nesta linhagem (YANG et al., 2015).

Entretanto, mesmo sendo uma proteína amplamente estudada, nenhum trabalho anterior aos do nosso laboratório mencionou o envolvimento de LonA no metabolismo de PHA. Em 2010, o trabalho de Castellanos identificou dois mutantes de *B. sacchari* por transposon mini-*Tn5*, deficientes na mobilização de P3HB. A análise dos mutantes revelou que, em um deles o transposon havia interrompido o gene *phaZa1*, que codifica a i-P3HB despolimerase melhor descrita na literatura, enquanto o outro mutante teve o gene *lonA* inativado, resultando no fenótipo deficiente na mobilização. O envolvimento de LonA neste processo era algo inesperado, assim o trabalho de Lozano (2013) avaliou a mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando os genes de acúmulo (*phaCAB*) e de mobilização de P3HB (*phaZa1* e *lonA*) de *R. eutropha*, uma vez que o genoma de *B. sacchari* não havia sido sequenciado.

Lozano (2013) demonstrou que quando os genes supostamente envolvidos na mobilização foram expressos separadamente, não se observou mobilização efetiva de P3HB, porém quando

ambos estavam presentes simultaneamente na célula, as taxas de mobilização superaram 50% do polímero previamente acumulado. Os resultados indicavam uma interação entre os produtos dos genes *phaZa1* e *lonA* para que possa ocorrer uma mobilização efetiva do polímero, em linhagens recombinantes de *E. coli*. Inesperadamente, o mesmo trabalho demonstrou que a presença do gene *lonA*, sem simultânea expressão de *phaZa1*, levou a um aumento expressivo das taxas de acúmulo de P3HB pela linhagem recombinante de *E. coli*, podendo atingir mais de cerca de 70% de sua massa seca celular, em cultivos em frascos agitados, utilizando glicose como fonte de carbono (LOZANO, 2013). Um trabalho anterior em nosso laboratório, com linhagens de *E. coli* recombinantes visando ao acúmulo de P3HB, apontou, em seus melhores resultados, teores de acúmulo de P3HB correspondendo a cerca de 40-45% da massa seca celular em frascos agitados e aproximadamente 30% em biorreator, também a partir de glicose (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012). As elevadas taxas de acúmulo apresentadas por Lozano (2013), quando o gene *lonA* está expresso concomitantemente com o operon *phaCAB*, nos sugere a existência de uma interação também entre LonA e umas das proteínas envolvidas na síntese, possivelmente PhaC (P3HB sintase).

Desta forma, o presente trabalho visou o estudo de LonA, tanto no processo de síntese como de mobilização de P3HB, através de cultivos de linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, a fim de melhor entender o efeito desta proteína nos processos metabólicos do biopolímero.

3 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de LonA nos processos de síntese e mobilização de P3HB, através de linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, capazes de acumular este biopolímero.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o envolvimento de LonA, de *R. eutropha*, sobre a produção de P3HB em cultivos em agitadores rotativos, comparando seu efeito em diferentes linhagens recombinantes de *E. coli*, bem como em dois diferentes vetores de expressão do operon *phaCAB*;
- Avaliar o efeito de LonA, de *R. eutropha*, sobre a produção de P3HB em cultivos em biorreatores, em linhagens recombinantes de *E. coli*;
- Avaliar o efeito de LonA e PhaP1, de *R. eutropha*, sobre a mobilização de P3HB em cultivos em agitadores rotativos, em linhagens recombinantes de *E. coli*;
- Avaliar a atividade enzimática de LonA e PhaP1, de *R. eutropha*, na ativação da mobilização de P3HB;
- Purificar LonA e avaliar sua interação com as principais proteínas envolvidas no metabolismo de P3HB, P3HB sintase (PhaC) e i-P3HB despolimerase (PhaZa1), ambas provenientes de *R. eutropha*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens e Plasmídeos

As linhagens bacterianas e plasmídeos que foram utilizados neste trabalho estão apresentadas nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 – Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Referência
pBluescript II SK(-) pSK::phaCAB	Amp ^R pBluescript II SK(-) abrigando <i>phaCAB</i> de <i>R. eutropha</i>	Stratagene Bocanegra-Rodriguez, 2012
pJM9131 pBBR1MCS-5	Kan ^R , abrigando <i>phaCAB</i> de <i>R. eutropha</i> Vetor de amplo espectro de hospedeiros, <i>lacPOZ'</i> , Gm ^R , MCS, Mob	Kidwell et al., 1995 Kovach et al., 1995
pBBR1MCS-5::phaZa1	pBBR1MCS-5 abrigando o fragmento de DNA contendo o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i>	Castellanos, 2010
pBBR1MCS-5::lonA	pBBR1MCS-5 abrigando o fragmento de DNA contendo o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i>	Lozano, 2013
pBBR1MCS-5::lonA+phaZa1	pBBR1MCS-5 abrigando os fragmentos de DNA contendo os genes <i>lonA</i> e <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i>	Lozano, 2013
pBBR1MCS-5::phaP1	pBBR1MCS-5 abrigando o fragmento de DNA contendo o gene <i>phaP1</i> de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-5::phaZa1+phaP1	pBBR1MCS-5 abrigando os fragmentos de DNA contendo os genes <i>phaZa1</i> e <i>phaP1</i> de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
pET28a	Kan ^R , MCS, expressão de proteína com sequência de histidina em N-terminal, por T7 RNA polimerase	Novagen
pETDuet-1	Amp ^R , duplo MCS, coexpressão de proteínas com e sem sequência de histidina em N-terminal, por T7 RNA polimerase	Novagen
pET28a::lonA	pET28a abrigando o gene <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
pET28a::phaZa1	pET28a abrigando o gene <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
pET28a::phaC	pET28a abrigando o gene <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i>	Este trabalho
pETDuet-1::lonA+phaZa1	pETDuet-1 abrigando simultaneamente os genes <i>lonA</i> e <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> , sendo o último portador sequência de histidina em N-terminal	Este trabalho
pETDuet-1::lonA+phaC	pETDuet-1 abrigando simultaneamente os genes <i>lonA</i> e <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i> , sendo o último portador sequência de histidina em N-terminal	Este trabalho

Amp^R – resistente à ampicilina; Gm^R – resistente à gentamicina; Kan^R – resistente à canamicina; *lacI^q* – superexpressão do repressor *lacI*; *lac⁻* – deleção parcial do gene *lacZ*; *lacPOZ'* – abrigando promotor *lac* (*lacP*), operador *lac* (*lacO*) e peptídeo α da β -galactosidase (*lacZ'*); MCS – sítio múltiplo de clonagem; Mob – capaz de ser mobilizado.

Tabela 4.2 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

Linhagens	Características	Referência
<i>R. eutropha</i> H16	Linhagem selvagem produtora de PHA _{SCL}	Schlegel et al., 1961
<i>E. coli</i> XL1-Blue	PHA ⁻ , lac ⁻ , <i>lacI^q</i> , Tc ^R , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S	Bullock et al., 1987
<i>E. coli</i> MG1655	PHA ⁻ , F ⁻ , λ ⁻ , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S	Guyet et al., 1981
<i>E. coli</i> LS5218	PHA ⁻ , F ⁺ , <i>fadR601</i> , <i>atoC2</i> , Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S	Spratt et al., 1981
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B; F ⁻ ; <i>dcm</i> ; <i>ompT</i> ; <i>hdsS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻); <i>lon</i> ⁻ ; <i>gal</i> ; λ(DE3), Kan ^S , Amp ^S , Gm ^S	Studier, 1986

PHA⁻ – sem acúmulo de PHA; Kan^S – sensível à canamicina; Amp^S – sensível à ampicilina; Gm^S – sensível à gentamicina; Tc^R – resistente à tetraciclina, F⁻ – deleção do plasmídeo F; λ⁻ – deleção do fago lambda; F⁺ – presença do plasmídeo F; *fadR601* – mutante deficiente na degradação de ácidos graxos; *atoC2* – mutação do gene *atoC2*; *dcm* – metilação de citosina no segundo C de sítios existentes CCWGG; *ompT* – mutação na proteína da membrana externa de protease VII; *hdsS*(r_B⁻ m_B⁻) – ausência de restrição e metilação na sequência; *lon*⁻ – mutação na protease Lon; *gal* – não metaboliza galactose; λ(DE3) – carrega fago λ que codifica T7 RNA polimerase e *lacI^q*.

4.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Sequência de oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência	Finalidade
lonABamRv	CGTAATGGATCCTCAGTGATGCAGACGCTCAACCTTG	Amplificação de <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetores pET
lonAMfeRv	CGTAATCAATTGTCAGTGATGCAGACGCTCAACCTTG	
lonANdeFw	CTAATAGCATATGATGTCCGGAACACAACCTCCTC	
phaCBamFw	CAATAGGGATCCGATGGCGACCGGCAAAGGCGCGGCA	Amplificação de <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetores pET
phaCBamRv	CGTATTGGATCCTCATGCCTTGGCTTTGACGTATCGC	
phaCBspRv	CGTAATCTTAAGTCATGCCTTGGCTTTGACGTATCGC	
phaCNdeFw	CAATAGCATATGGCGACCGGCAAAGGCGCGGCA	
phaZBamFw	CGTAATGGATCCGATGCTCTACCAATTGCATGAGTTC	Amplificação de <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetores pET
phaZBamRV	CACAATGGATCCTTACCTGGTGGCCGAGGCCTGG	
phaZNdeFw	CGTATTCATATGCTCTACCAATTGCATGAGTTC	
phaZSalRv	CACAATGTCGACTTACCTGGTGGCCGAGGCCTGG	Amplificação de <i>phaZa1</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetor pBBR1MCS-5
phaZa1SpeFw	AAAAAACTAGTGGTGGCGACTGGGCGAAGCG	
phaZa1SacRv	AAAAAAGAGCTCGCTATACCATCAGTGCCGTG	Amplificação de <i>phaP1</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetor pBBR1MCS-5
phaP1SalFw	AAAAAAGTCGACCGTTGTTTGTGCATTGCACA	
phaP1ClaRv	AAAAAAATCGATGGCAAACACACCGCAAACG	Amplificação de <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetor pBBR1MCS-5
lonAFw	AAAAAACTCGAGTGGACGTCATGTACGACCTGC	
lonARv	AAAAAAGTCGACGTGATGCSGACGCTCAACCTT	Amplificação de <i>lonA</i> de <i>R. eutropha</i> , para clonagem em vetor pBBR1MCS-5

4.3 Manipulação de DNA

4.3.1. Extração de DNA genômico e plasmidial

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

4.3.2 Digestão de DNA genômico e plasmidial

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

4.3.3 Ligação do DNA

As ligações dos diferentes fragmentos de DNA ocorreram com o uso da enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), em volume final de 10 µL ou 20 µL, com incubação a 16 °C, seguindo concentração e tempo de incubação indicados pelo fabricante.

4.3.4 Eletroforese em gel de agarose

As extrações, digestões, ligações e produtos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), realizados a partir de DNA genômico e plasmidial, foram analisados por eletroforese em gel de agarose (0,8%) com tampão de corrida TAE 1X (Tris-base, EDTA 2 mN, ácido acético glacial). As corridas foram realizadas a 70 V, 70 mA, 70 W, por 60 minutos. Os fragmentos foram observados com coloração do gel por SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) e visualização sob luz UV (253 nm) em transiluminador (Loccus, São Paulo, SP, Brasil).

4.3.5 Inserção de DNA em bactérias por transformação por choque elétrico

Células eletrocompetentes de *E. coli* foram preparadas conforme descrito por Ausubel et al. (1992). Uma colônia da bactéria foi incubada em meio LB líquido durante 16 horas a 37 °C em agitador rotativo. Após a incubação, a densidade ótica (D.O._{610nm}) foi determinada e um volume adequado de meio LB foi adicionado ao cultivo, de modo a se obter D.O._{610nm} inicial de 0,1 unidades de absorvância e 500 mL de cultura final. O cultivo foi então incubado a 37 °C em agitador rotativo e medições de D.O. foram realizadas, até atingir D.O._{610nm} = 0,5 – 0,6. Atingida a densidade adequada, a cultura foi transferida para tubos de centrifuga pré-resfriados, mantida em banho de gelo (15 minutos), e centrifugadas (15 minutos, 8000 rpm, 4 °C). Desprezando o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 100 mL de água milli-Q estéril e gelada, e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 50 mL de água milli-Q estéril e gelada, e centrifugadas. O sobrenadante foi mais uma vez descartado e as células foram agora ressuspensas em 25 mL de glicerol 10% gelado, e centrifugadas. Por fim, as células obtidas foram ressuspensas em 1,0 mL de glicerol 10% gelado, distribuídas em alíquotas de 40 µL e conservadas em freezer -80 °C.

Para transformação das células eletrocompetentes com os plasmídeos de interesse, foram adicionadas as alíquotas 2 µL da ligação de DNA. A mistura foi então transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm, previamente resfriadas. As células foram eletroporadas a pulsos de 2500 V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. Adicionou-se 1,0 mL de meio LB às células, que foram incubadas a 37 °C, por 1 hora. Posteriormente, as células foram semeadas em meio LB sólido contendo o antibiótico adequado e incubadas a 37 °C, por 24 horas.

4.4 Amplificação do fragmento de DNA por PCR

Os genes *lonA*, *phaZa1*, *phaC* e *phaP1* foram obtidos por amplificação a partir do DNA genômico de *R. eutropha* H16, utilizando a técnica de PCR, com o auxílio de iniciadores de oligonucleotídeos descritos na Tabela 4.3. A amplificação foi realizada com Termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf, São Paulo, SP, Brasil). Para verificar a eficácia dos iniciadores e detectar a presença do gene de interesse, a reação foi realizada nas seguintes condições:

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

Para a clonagem dos genes, a amplificação se realizou com o uso da DNA polimerase de alta fidelidade *Phusion - High Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific), e as condições das reações obedeceram às instruções do fabricante, conforme indicado abaixo. As condições de amplificação de cada um dos fragmentos foram determinadas conforme a polimerase, os iniciadores de DNA utilizados e o tamanho do gene amplificado.

Água Livre de Nuclease	22,0 µL
5x <i>Phusion HF Buffer</i>	10,0 µL
10 mM dNTPs	1,0 µL
Iniciador LonA <i>forward</i> (0,1-1,0 µM)	5,0 µL
Iniciador LonA <i>reverse</i> (0,1-1,0 µM)	5,0 µL
DNA molde (<i>R. eutropha</i>) (0,02 pg - 0,2 ng/µL)	5,0 µL
D.M.S.O. (dimetil sulfóxido)	1,5 µL
<i>Phusion – High Fidelity DNA Polymerase</i>	0,5 µL

4.5 Clonagem em vetor plasmidial

Os genes de interesse amplificados por PCR a partir do DNA genômico de *R. eutropha* foram clonados no vetor pBBR1MCS-5 (Kovach et al., 1995), pET28a (Novagen, São Paulo, SP, Brasil) e/ou pETDuet-1 (Novagen). Os produtos das amplificações foram purificados com *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, São Paulo, SP, Brasil), digeridos com as respectivas enzimas de restrição (Tabela 4.4), e ligados ao vetor previamente digeridos com as mesmas enzimas de restrição, conforme especificações do fabricante. Os produtos de ligação foram transformados por choque elétrico em linhagens de *E. coli* XL1-Blue (para ligações no vetor pBBR1MCS-5) ou *E. coli* BL21(DE3) (para ligações em vetores pET), e as células transformadas foram incubadas em meio LB sólido suplementado com 20 µL de isopropil-tio-β-D-galactosídeo – IPTG (0,1 M), 50 µL de 5-

bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo – X-Gal (20 mg/mL) e o respectivo antibiótico. Foram selecionadas as colônias brancas que cresceram em meio contendo o antibiótico de interesse. Para a confirmação da ligação, os clones selecionados foram submetidos a PCR, ou tiveram seus plasmídeos extraídos, digeridos com as respectivas enzimas de restrição, a fim de avaliar a presença do inserto, e posteriormente a sequenciamento.

Tabela 4.4 – Enzimas de restrição utilizadas nas clonagens em vetor plasmidial.

Ligação	Enzimas de restrição
pBBR1MCS-5:: <i>phaP1</i>	<i>SalI/ClaI</i>
pBBR1MCS-5:: <i>phaP1+phaZa1</i>	<i>SalI/ClaI</i> e <i>SpeI/SacI</i>
pET28a:: <i>lonA</i>	<i>NdeI/BamHI</i>
pET28a:: <i>phaC</i>	<i>NdeI/BamHI</i>
pET28a:: <i>phaZa1</i>	<i>NdeI/BamHI</i>
pETDuet-1:: <i>lonA+phaC</i>	<i>NdeI/MfeI</i> e <i>BamHI/SalI</i>
pETDuet-1:: <i>lonA+phaZa1</i>	<i>NdeI/MfeI</i> e <i>BamHI/BspTI</i>

4.6 Obtenção de linhagens recombinantes de *E. coli* para acúmulo e mobilização de P3HB

A partir dos plasmídeos obtidos neste trabalho e daqueles já disponíveis em nosso laboratório, foram construídas linhagens recombinantes de *E. coli* capazes de acumular P3HB. Todas as linhagens abrigam dois plasmídeos, sendo um contendo o *operon* de síntese de polímero (*phaCAB*) e outro contendo os genes de estudo deste trabalho, visando entender o envolvimento de seus produtos no acúmulo e/ou na mobilização de P3HB. As linhagens construídas e avaliadas neste estudo se encontram na Tabela 4.5.

4.7 Condições de cultivo para acúmulo de P3HB em agitadores rotativos

Os ensaios com as linhagens de *E. coli* recombinantes foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura líquido correspondente a 20% da capacidade máxima do frasco, a 150 rpm e 37°C. Inicialmente, as células foram cultivadas em Luria-Bertani (LB - triptona, 10 g/l; extrato de levedura, 5 g/l; NaCl, 5 g/l), por 12 horas, a fim de promover o crescimento celular. Passado esse período, as cepas foram inoculadas em Meio Mineral - MM (ROCHA et al., 2008) contendo 15 g/L de fonte de carbono (glicose) e 1 g/L de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), de forma a se obter condições para acúmulo de P3HB.

As linhagens foram mantidas nas condições de acúmulo por 48 horas, durante as quais foram tiradas amostras com 0 h, 24 h e 48 h de incubação, a fim de avaliar os teores de P3HB acumulado, a biomassa formada e a glicose consumida. Antibióticos foram adicionados aos cultivos sempre que

necessários para a manutenção de plasmídeos (ampicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL e gentamicina 15 µg/mL).

Tabela 4.5 – Linhagem de *E. coli* obtidas e avaliadas para acúmulo e mobilização de P3HB

Linhagem de <i>E. coli</i>	Plasmídeos abrigados	Finalidade
XL1-Blue	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese de P3HB
	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese e mobilização de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i>	Avaliar a mobilização de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>lonA+phaZa1</i>	Avaliar a mobilização de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>phaP1</i>	Avaliar a mobilização de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>phaP1 +phaZa1</i>	Avaliar a mobilização de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle
LS5218	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese de P3HB
	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle
MG1655	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese de P3HB
	pSK:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle
	pJM9131 e pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	Avaliar a síntese de P3HB
	pJM9131 e pBBR1MCS-5∅	Linhagem controle

4.8 Condições de cultivo para acúmulo de P3HB em biorreatores

A linhagem *E. coli* abrigando os plasmídeos pJM3191 (P3HB⁺) e pBBR1MCS-5::*lonA*, bem como seu controle (abrigando pBBR1MCS-5 vazio), que apresentaram melhor desempenho quanto a síntese de P3HB em agitador rotativo, foram avaliadas em ensaios em biorreatores.

- *Pré-inóculo*: as culturas estocadas em freezer a -80 °C foram inoculadas em meio sólido LB contendo canamicina e gentamicina, e mantidas por 24 horas em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram inoculadas em 25 mL de meio LB contendo canamicina e gentamicina, e cultivadas por 12 horas, 37 °C e agitação de 150 rpm.
- *Inóculo*: o volume total do pré-inóculo foi transferido para 250 mL de Meio Mineral (ROCHA et al., 2008) contendo 6 g/L de fonte de carbono (glicose) e 3 g/L de fonte de nitrogênio (sulfato de amônio), e mantido sob agitação (150 rpm) a 37 °C, por cerca de 20 horas. Após o crescimento, o cultivo foi inoculado no meio do biorreator, representando uma fração de 10% do volume total do cultivo.

Os cultivos foram conduzidos em modo descontínuo alimentado (batelada alimentada), com glicose como fonte de carbono. As condições estabelecidas para o meio de cultura (Item 4.9.3) continham concentrações limitadas da fonte de carbono e nitrogênio. Após um período inicial de

crescimento celular, foi realizado a alimentação da fonte de carbono e nitrogênio a partir de uma solução concentrada a uma vazão constante, permitindo a multiplicação celular e acúmulo de P3HB simultâneos, a relação C/N foi pré-definida por Bocanegra-Rodriguez (2012).

Todos os ensaios foram realizados com pH e temperatura controlados a 7,0 e 37 °C, respectivamente. Para o controle do pH, foram utilizadas soluções de NaOH e H₂SO₄ (2,0 N). O oxigênio dissolvido foi mantido acima de 30% da saturação, garantindo que não houvesse limitação desse composto. Os ensaios foram realizados em biorreatores *ez-Control Applikon*[®] Biotechnology (Delft, Holanda do Sul, Holanda) com dorna de 7 litros, utilizando 2,5 L como volume total de ensaio. Amostragens periódicas foram realizadas para análise de biomassa celular, teor de P3HB, concentração das fontes de carbono e nitrogênio e produção de ácidos orgânicos. O controle de possíveis contaminantes foi realizado ao longo do ensaio, através de observação microscópica de lâminas coradas (coloração de Gram) e crescimento em placas em meio sólido LB, contendo canamicina e gentamicina.

4.9 Composição dos meios de cultura

4.9.1 *Luria-Bertani (LB)*

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

4.9.2 Meio Mineral (MM)

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

*Solução de Elementos Traços

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

De acordo com a necessidade, os meios minerais sólidos e líquidos foram modificados, adicionando diferentes concentrações de fontes de carbono e sulfato de amônio (MM6/3 – 6 g/L de glicose e 3 g/L de sulfato de amônio para crescimento celular; MM15/1 – 15 g/L de glicose e 1 g/L de sulfato de amônio para acúmulo de P3HB; MM0/3 – livre de glicose e 3 g/L de sulfato de amônio para mobilização de P3HB).

4.9.3 Meios de cultura utilizados em ensaios de biorreatores

Composto	Ensaio GLS01 e GLS02	Ensaio GLS03 e GLS04	Ensaio GLS05 e GLS06
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/L	1,0 g/L	1,0 g/L
KH ₂ PO ₄ ^a	0,5 g/L	0,5 g/L	0,5 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O sol. 20% (m/v) ^a	1,0 mL/L	1,0 mL/L	1,0 mL/L
CaCl ₂ .2H ₂ O sol. 1% (m/v) ^a	1,0 mL/L	1,0 mL/L	1,0 mL/L
Solução de Elementos Traços ^a	2,0 mL/L	2,0 mL/L	2,0 mL/L
Citrato Férrico Amoniacal sol. 6% (m/v)	1,0 mL/L	1,0 mL/L	1,0 mL/L
Extrato de Levedura	-	1,0 g/L	1,0 g/L
NaCl	-	-	4,0 g/L
Glicose Inicial ^a	5,0 g/L	5,0 g/L	5,0 g/L
Canamicina ^b	50 mg/mL	50 mg/mL	50 mg/mL
Gentamicina ^b	15 mg/mL	15 mg/mL	15 mg/mL
Tiamina ^b	10 mg/mL	10 mg/mL	10 mg/mL

a. Esterilizado em autoclave separadamente.

b. Concentração da solução estoque; esterilizado por filtração.

4.10 Condições de cultivo para mobilização de P3HB em agitadores rotativos

As linhagens de *E. coli* cultivadas em LB sólido foram inoculadas em LB líquido e incubadas em agitador rotativo a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 10 mL do inóculo foram depositados em MMG15/1 (com glicose como fonte de carbono) e incubados novamente em agitador rotativo a 37 °C por 48 horas. Procedeu-se então a separação das células com P3HB acumulado por centrifugação (5000 rpm, 10 minutos, 4 °C) e estas foram transferidas para MM0/3. Quando necessário, foi adicionado ao meio tiamina (10 µL/mL), durante a fase de acúmulo. Nestas condições, as linhagens foram mantidas por 72 horas, em agitador rotativo, durante as quais foram retiradas amostras periódicas, determinando a massa seca celular, o teor de P3HB acumulado intracelularmente, a porcentagem de P3HB mobilizado. Todos os meios foram suplementados com os antibióticos de interesse.

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

$$\%P3HB \text{ mobilizado} = \left[1 - \left(\frac{P3HB(g/L)_{final}}{P3HB(g/L)_{inicial}} \right) \right] \times 100$$

4.11 Procedimentos analíticos

- Teor de P3HB acumulado:* Células ou sobrenadantes liofilizados foram submetidos à propanólise (RIIS; MAI, 1988). Entre 10 a 20 mg de células ou 5 mL de sobrenadante liofilizados foram transferidas para tubos de vidro, aos quais foram adicionados 2 mL de solução de ácido clorídrico e propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 µL de solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram hermeticamente fechados, agitados e colocados em banho quente a 100 °C por 3 horas, com agitações intermitentes. Passado este tempo, os tubos foram resfriados e adicionou-se 4 mL de água destilada, sendo agitados vigorosamente por 30 segundos. Após a separação das fases, a fase aquosa (superior) foi descartada e fase orgânica (inferior) foi utilizada para análise. Os propil-ésteres obtidos foram analisados por cromatografia gasosa (GOMEZ et al., 1996) em cromatógrafo HP7890A Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos da América), equipado com coluna HP-1 (100% dimethylsiloxane, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm e espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: gás de arraste - Hélio (0,6 mL/min); temperatura do injetor - 250 °C; temperatura do detector - 300 °C; sistema de detecção - ionização de chama (FID); programa de temperaturas do forno - 100 °C por 3 minutos (6 °C/min), elevação da temperatura até 180 °C por 5 minutos (6 °C/min) e até 240 °C por 1 minuto.
- Análise de carboidratos:* A concentração de glicose foi determinada em cromatógrafo líquido (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min, e volume de injeção de 20 µL. Os carboidratos foram detectados através de índice de refração (GOMEZ et al., 1996).
- Análise de ácidos orgânicos:* A produção e concentração de ácidos orgânicos foi determinada por cromatografia de fase líquida (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex), com detector de luz ultravioleta (214 nm), coluna HPX-87H (Bio-Rad), a 40 °C, fase móvel de H₂SO₄ (5 mM), com fluxo de 0,6 mL/min e volume de injeção de 10 µL.

- *Análise da massa seca celular*: A massa seca celular total (Xt) foi determinada centrifugando-se 10 mL do cultivo (10600 xg, 10 minutos, 4°C). As células foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) e liofilizadas. A massa obtida foi determinada gravimetricamente. A massa seca residual (Xr) corresponde à massa seca total, descontando a massa de polímero acumulado.

4.12 Avaliação da atividade enzimática de LonA na mobilização de P3HB

As seguintes linhagens foram avaliadas quanto a atividade enzimática de mobilização:

- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5 Ø;
- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5::*lonA*
- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5::*phaZa1*;
- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5::*lonA+phaZa1*;
- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5::*phaP1*;
- *E. coli* XL1-Blue pJM9131, pBBR1MCS-5::*phaP1+phaZa1*;
- *R. eutropha* H16.

4.12.1 Isolamento de grânulos nativos de P3HB

A partir de cultivos em meio mineral, sob condições de acúmulo, as células foram centrifugadas (1448 g a 4 °C, por 20 min) e ressuspendidas em tampão contendo Tris-HCl 50 mM e DTT 1 mM (pH 7,5) e lisadas em *French Press*. Os grânulos de nP3HB foram isolados por meio centrifugação em dois gradientes de glicerol (primeiro gradiente: 87% e 50%; segundo gradiente 87%, 80%, 60% e 40%) em Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), como descrito por (MERRICK; DOUDOROFF, 1964; JENDROSSEK; 2007; UCHINO et al., 2007; ADAYA et al., 2018). As centrifugações foram realizadas a 4472 g, por 40 min, a 4 °C.

A purificação dos grânulos se deu por diálise em 5 mL de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), contra Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), durante 24 horas.

4.12.2 Tiólise de P3HB

Para cada amostra a ser avaliada foi preparada uma reação de mistura com volume final 1250 µL contendo: 625 µL de nP3HB (100 a 200 mg/mL dependendo da cultura), 50 mM de fosfato de

potássio (pH 7,0), 1 mM de CoA e 1 mM de DTT. A mistura foi incubada a 30 °C. A cada tempo de análise foram coletados 300 µL de amostra, acidificadas com 30 µL HCl (1,0 N), e submetidas a centrifugação (20.800 g, por 5 min). O sobrenadante obtido foi analisado por HPLC, a fim de avaliar a presença de CoA, acetil-CoA e 3HB-CoA nas amostras.

4.12.3 Condições de análise em HPLC

A análises de CoA, acetil-CoA e 3HB-CoA foram realizadas conforme determinado por Uchino et al., 2007.

De cada reação de mistura, 5 µL de sobrenadante foram submetidas a análise em HPLC em coluna de fase reversa C₁₈ (Phenomenex - Luna 5µm C18, 250 x 4,60 mm). As amostras foram eluídas em taxa fluxo de 0,8 mL/min, a 30 °C e detector de UV (254 nm). Os tampões utilizados foram 0,05 M de fosfato de potássio (pH 4,7) (solução A) e metanol puro (solução B). As condições de eluição foram: gradiente de 5% de solução B para 25% de solução B em 25 min; gradiente para 50% de solução B, em 8 min; gradiente para solução B pura, em 1 min. Feito isso, procedeu uma corrida isocrática com 5% de solução B por 5 min.

4.13 Expressão e purificação de proteínas

A partir de colônias isoladas em meio LB sólido, as linhagens de *E. coli* BL21(DE3) abrigando os vetores pET28a ou pETDuet-1, com os respectivos genes foram inoculadas em 10 mL de meio LB com canamicina ou ampicilina e mantidas por 12 horas a 37 °C, sob agitação de 200 rpm. O volume total da cultura foi transferido para 1,0 L de LB com canamicina e incubadas a 37 °C e 200 rpm, até atingir densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,6. Foi adicionado então ao meio, 1,0 mL de IPTG (1,0 M), e mantido a 18 °C, 200 rpm, por 20 horas, a fim de induzir a expressão das proteínas híbridas com calda de histidina.

O volume total da cultura foi centrifugado a 1600 g e 4 °C por 30 minutos. A massa celular obtida foi então ressuspensa em tampão A (hepes pH 8,0 – 50 mM; NaCl – 300 mM; glicerol – 10%) e foi adicionado à mistura 200 µL de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfoni), 200 µL de DNase e 200 µL de lisozima. Na purificação de LonA não foi utilizado PMSF, uma vez que se trata de um inibidor de protease que poderia degradar a proteína de interesse. As células foram então rompidas por meio de sonicador ultrassônico, e posteriormente submetidas a centrifugação (4200 g, 60 minutos e 4 °C), para separação das fases solúvel e insolúvel.

As proteínas solúveis expressas, devido a sequência de histidinas na porção animo-terminal, foram purificadas inicialmente por cromatografia de afinidade ao níquel em coluna HisTrap HP de 5 mL (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente por meio de cromatografia de exclusão molecular, ambas utilizando aparelho ÄKTA (GE Healthcare). A coluna HisTrap HP foi previamente equilibrada com 5 vc (volumes de coluna) com tampão A. Após a aplicação da fração solúvel do lisado, a coluna foi lavada com 10 vc de tampão A, ou até que nenhuma leitura de absorbância a 280 nm fosse observada. A eluição das proteínas que se ligaram à coluna foi realizada por gradiente de concentração crescente com o tampão A de lise contendo 500 mM de imidazol (tampão B).

As amostras proteicas purificadas pela cromatografia de afinidade foram submetidas a uma nova etapa de purificação utilizando cromatografia de exclusão molecular, em coluna Superdex 16/60, 200 µg, utilizando tampão como Hepes - pH 8 (50 mM) e NaCl (300 mM). A coluna foi equilibrada com 1,2 vc de tampão e eluída com 1,2 vc após a amostra ser injetada. Frações dessa etapa de purificação que continham as proteínas de interesse foram unidas, concentradas em filtros Amicon (Merck Millipore®, São Paulo, SP, Brasil) e estocadas em freezer -80 °C. Amostras recolhidas ao longo de todo o processo foram submetidas à análise por SDS-PAGE.

4.13.1 Teste de expressão de proteínas em *E. coli*

Para a melhor purificação de PhaZa1, foi necessário realizar um teste de expressão com as linhagens capazes de expressar estas proteínas, a fim de determinar as melhores condições para tal. Foram testadas diferentes temperaturas e tempos de cultivo (15 °C - *overnight*, 25 °C – 4 horas e 37 °C – 3 horas), bem como diferentes concentrações de IPTG (0,5 M e 1,0 M) para a indução.

Assim, uma colônia das cepas de *E. coli* BL21(DE3) pET28a::*phaZa1* e *E. coli* BL21(DE3) pETDuet-1::*lonA+phaZa1* foram inoculadas em 6 mL de meio LB líquido, contendo os respectivos antibióticos, e mantidas a 37 °C e agitação de 200 rpm, por cerca de 3 a 4 horas. A cultura foi então separada em diferentes tubos, com 1 mL em cada tubo, e mantidas nas respectivas temperaturas de teste (15 °C, 25°C ou 37 °C), por 30 minutos. Passado esse período, foi adicionado 1 µL de IPTG nas concentrações a serem testadas (0,5 M ou 1,0 M) em cada tubo, a fim de induzir a expressão das proteínas de interesse. Os cultivos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, nas respectivas temperaturas e tempos predeterminados.

Passado o período de incubação, 500 µL de cada amostra foi centrifugada por 1 minuto a 13000 rpm, e os sobrenadantes foram desprezados. Às massas celulares foram adicionados 1/10 de volume de cultura de reagente BugBuster (Novagen), agitadas vigorosamente, e incubadas à

temperatura ambiente por 10 a 15 minutos. As mesmas foram então centrifugadas por 3 minutos, 13000 rpm. Os sobrenadantes foram armazenados em tubos limpos e as massas celulares foram ressuspensas em mesmo volume de BugBuster diluído 5 vezes, e posteriormente submetidas à centrifugação por 3 minutos, 13000 rpm. As massas resultantes foram novamente ressuspensas em mesmo volume de BugBuster, e todas as amostras, de massa celular e sobrenadante, foram submetidas a SDS-PAGE.

4.14 Preservação de linhagens bacterianas

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

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

5 RESULTADOS

5.1 Síntese de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*

5.1.1. Cultivos em agitador rotativo

Um estudo anterior realizado em nosso laboratório, que avaliava o efeito da expressão de *lonA* na mobilização de P3HB, revelou outra surpreendente característica dessa proteína, uma vez que a sua presença levou a um significativo aumento das taxas de acúmulo do polímero em linhagens recombinantes de *E. coli*, podendo atingir até 74% de sua massa seca celular (LOZANO, 2013). Para avaliar se este comportamento é extensível a outras cepas de *E. coli* recombinante, foram construídos novos recombinantes, a partir de três linhagens (XL1-Blue, MG1655, LS5218), abrigando dois plasmídeos diferentes com o operon *phaCAB*, pSK⁻::*phaCAB* (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012) e pJM9131 (KIDWELL et al., 1995), bem como um outro plasmídeo que carrega o gene *lonA* (pBBR1MCS-5::*lonA*), todos provenientes de *R. eutropha*. Como controle foram utilizadas as linhagens abrigando o pBBR1MCS-5 vazio (Tabela 5.1).

Em todos os recombinantes analisados, a presença do gene *lonA* promoveu um significativo aumento na capacidade de acúmulo de P3HB, quando comparadas com os respectivos controles. A concentração de P3HB intracelular foi 1,3 a 3,2 vezes maior nas cepas que expressam *lonA* juntamente com *phaCAB*. Em todos os casos é possível notar, que as taxas de acúmulo são maiores quando utilizado o plasmídeo pJM9131, em comparação ao pSK⁻::*phaCAB*. Esse efeito pode ser explicado pela marca de resistência de cada um dos vetores, sendo o pJM9131 portador do gene de resistência à canamicina, um aminoglicosídeo, e o pSK⁻::*phaCAB* à ampicilina, um β-lactâmico. Além do aumento na produção de P3HB, os valores médios de biomassa residual (X_r) se mostraram quase que invariavelmente menores nas linhagens que expressam *lonA*, embora muitas vezes as diferenças não sejam estatisticamente significativas. Considerando estes resultados, a linhagem de *E. coli* XL1-Blue abrigando pJM9131 foi aquela que apresentou maior aumento dos teores de P3HB acumulado quando o gene *lonA* era expresso, comparado ao seu controle. Sendo assim, esta cepa (*E. coli* XL1-Blue pJM3191 pBBR1MCS-5::*lonA*) foi selecionada para a realização dos cultivos em biorreator. Em todos os experimentos, a linhagem *E. coli* XL1-Blue carregando o pJM9131 e o pBBR1MCS-5 vazio foi utilizada como controle.

Tabela 5.1 – Acúmulo de P3HB em linhagens de *E. coli* recombinantes.

Linhagem	Tempo (h)	PHB		Xt (g/L)	Xr (g/L)	Glicose (g/L)
		% MSC	g/L			
XL1-Blue	0	5,22±2,01	0,01±0,00	0,18±0,03	0,17±0,03	15,41±0,78
pSK::phaCAB	24	26,13±1,60	0,62±0,09	2,38±0,20	1,76±0,12	5,70±0,68
pBBR1MCS-5::lonA	48	51,79±1,38	2,86±0,14	5,52±0,14	2,66±0,04	1,18±0,17
XL1-Blue	0	2,00±0,15	0,01±0,00	0,27±0,02	0,26±0,02	14,96±0,69
pSK::phaCAB	24	25,85±2,88	0,87±0,06	3,37±0,16	2,50±0,21	5,77±0,20
pBBR1MCS-5 Ø	48	33,73±3,58	1,50±0,24	4,46±0,49	2,95±0,36	2,65±0,33
XL1-Blue	0	9,75±3,78	0,01±0,00	0,14±0,02	0,13±0,02	15,08±0,18
pJM9131	24	57,16±1,84	1,77±0,33	3,09±0,49	1,31±0,17	2,68±0,06
pBBR1MCS-5::lonA	48	65,88±2,88	2,25±0,16	3,42±0,30	1,17±0,18	1,34±0,17
XL1-Blue	0	0,56±0,79	0	0,13±0,01	0,13±0,01	14,82±0,83
pJM9131	24	21,74±4,39	0,40±0,12	1,79±0,26	1,39±0,15	4,59±0,35
pBBR1MCS-5 Ø	48	27,35±4,98	0,70±0,13	2,56±0,01	1,86±0,12	2,82±0,07
LS5218	0	0	0	0,17±0,01	0,17±0,01	14,36±0,57
pSK::phaCAB	24	24,54±1,29	0,37±0,02	1,50±0,08	1,13±0,08	8,32±0,20
pBBR1MCS-5::lonA	48	25,90±2,99	0,43±0,09	1,64±0,16	1,21±0,09	5,45±0,38
LS5218	0	0	0	0,17±0,03	0,17±0,03	15,00±0,50
pSK::phaCAB	24	15,95±0,77	0,23±0,02	1,44±0,07	1,21±0,05	8,24±0,20
pBBR1MCS-5 Ø	48	16,12±0,52	0,24±0,02	1,48±0,10	1,24±0,08	5,45±0,38
LS5218	0	7,55±1,17	0,01±0,00	0,14±0,02	0,13±0,02	15,01±1,30
pJM9131	24	52,04±2,53	1,11±0,00	2,14±0,11	1,03±0,11	3,62±0,43
pBBR1MCS-5::lonA	48	52,41±1,37	1,13±0,12	2,23±0,15	1,02±0,06	2,41±0,07
LS5218	0	3,34±0,18	0,01±0	0,15±0,01	0,14±0,01	15,04±0,35
pJM9131	24	33,55±6,38	0,41±0,08	1,22±0,15	0,82±0,15	4,06±0,70
pBBR1MCS-5 Ø	48	33,89±5,20	0,44±0,11	1,36±0,11	0,92±0,01	3,83±0,30
MG1655	0	1,39±0,95	0	0,20±0,02	0,20±0,02	15,05±0,58
pSK::phaCAB	24	1,38±0,78	0,01±0,01	1,09±0,08	1,07±0,09	9,18±0,38
pBBR1MCS-5::lonA	48	1,49±1,03	0,02±0,01	1,12±0,03	1,11±0,04	7,47±0,23
MG1655	0	1,47±0,15	0	0,21±0,02	0,20±0,02	15,34±0,32
pSK::phaCAB	24	0,42±0,04	0,01±0,00	1,34±0,21	1,33±0,21	8,41±0,10
pBBR1MCS-5 Ø	48	0,38±0,02	0,01±0,00	1,47±0,08	1,46±0,08	6,93±0,22
MG1655	0	0	0	0,83±0,25	0,83±0,25	14,84±1,23
pJM9131	24	61,92±3,66	2,43±0,12	3,93±0,31	1,50±0,25	6,15±0,66
pBBR1MCS-5::lonA	48	65,22±1,70	3,69±0,46	5,67±0,82	1,98±0,37	0,83±1,29
MG1655	0	0,18±0,43	0	1,21±0,33	1,21±0,33	13,49±3,42
pJM9131	24	45,73±2,89	1,61±0,06	3,53±0,16	1,92±0,18	6,52±0,47
pBBR1MCS-5 Ø	48	52,78±3,74	2,74±0,25	5,19±0,31	2,45±0,24	0,80±0,66

MSC – massa seca celular Xt – biomassa total Xr – biomassa residual.

A fim conhecer o comportamento das linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 eleitas para os cultivos em biorreatores, as mesmas tiveram sua cinética de crescimento avaliadas em agitadores rotativos. A partir de cultivo em meio LB, as células foram transferidas para meio mineral contendo 6 g/L de glicose e 3 g/L de sulfato de amônio (MMG6/3), e mantidas sob agitação por 24 horas a 37 °C. Durante este período, foram tiradas amostras a cada hora, e o crescimento celular foi determinado por densidade ótica (D.O. 600 nm), em espectro Cole-Parmer Scanning Double-Beam UV (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, Estados Unidos da América). Ambas as linhagens apresentam crescimento exponencial até cerca de 13 horas de cultivo, seguida de um crescimento linear (Figura 5.1). A partir destes dados, foi definido que os inóculos seriam cultivados por 20 horas, quando

alcançam D.O. de 5,95 em na cepa que expressa *lonA* e 6,01 na cepa controle, antes de serem transferidos para crescimento em biorreatores.

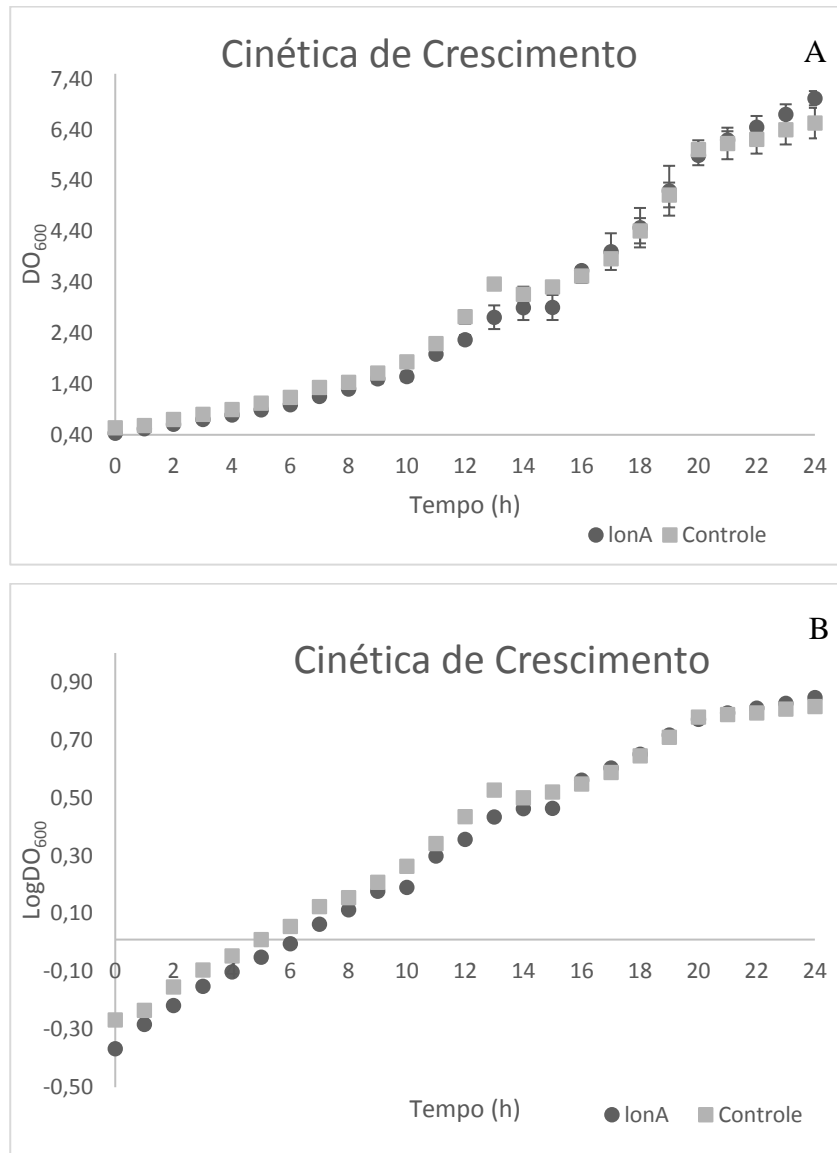


Figura 5.1 – Cinética de crescimento de linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 em meio mineral, utilizando glicose como fonte de carbono. A – Crescimento bacteriano (D.O.₆₀₀). B – Escala logarítmica do crescimento bacteriano.

5.1.2 Cultivos em biorreatores

a. Ensaio GLS01 e GLS02

A fim de avaliar o metabolismo de síntese de P3HB das cepas de interesse, e verificar o efeito de LonA neste processo, as linhagens foram crescidas em biorreatores, com meio mineral contendo 5 g/L de glicose inicial (conforme apresentado no item 4.9.3). O ensaio GLS01 corresponde a linhagem que carrega pBBR1MCS-5::*lonA*, ao passo que GLS02 corresponde a linhagem controle (abrigando pBBR1MCS-5 vazio). Entretanto, diferente do esperado, a taxa de crescimento total de ambas as linhagens foi muito baixa, atingindo 0,11 g/L de biomassa total na cepa que expressa *lonA* e 0,15 g/L na cepa controle, mesmo depois de 43 horas de cultivo. Neste período, a concentração de glicose no meio se manteve em 4,24 g/L na linhagem que apresenta LonA e 4,56 g/L na linhagem controle, garantindo que o efeito do crescimento não ocorreu por limitação desse nutriente. Devido ao baixo valor do crescimento celular, os demais parâmetros não foram avaliados. Os resultados detalhados desses cultivos estão apresentados no Anexo A.

b. Ensaio GLS03 e GLS04

Na tentativa de diminuir a extensa fase *lag* observada no ensaio anterior, foi adicionado 1 g/L de extrato de levedura ao meio mineral do inóculo e ao meio de biorreator. O cultivo GLS03 corresponde à cepa que expressa *lonA* e GLS04 à cepa controle. Entretanto, novamente as taxas de crescimento de ambas as linhagens foram muito reduzidas, e a extensa fase *lag* foi observada após horas de cultivo. Avaliando as condições do meio de cultura de outros trabalhos já realizados em biorreatores com *E. coli*, notou-se a frequente suplementação do meio com cloreto de sódio (NaCl), assim, com cerca de 18 horas de cultivo, decidiu-se adicionar ao meio 1 g/L desse composto, a fim de verificar o que poderia estar limitando o crescimento celular (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012; CHOUMAN, 2012). Foi observado então, que 6 horas após a adição de NaCl, a biomassa total do ensaio GLS03 começou a aumentar, enquanto na linhagem controle, o aumento de X_t foi observado após aproximadamente 12 horas da adição de NaCl. Ao final de 46 horas de cultivo, os valores de X_t atingiram 3,7 g/L e 4,1 g/L, nas cepas com *lonA* e controle, respectivamente (Figura 5.2). Os dados detalhados destes cultivos, estão apresentados no Anexo A.

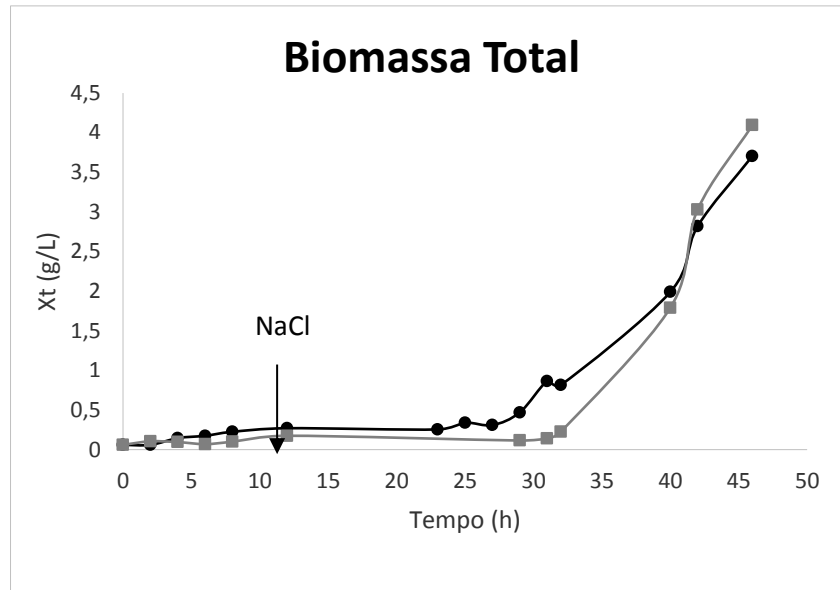


Figura 5.2 – Taxa de crescimento de biomassa total (X_t) de linhagens *E. coli* XL1-Blue pJM9131 em cultivos em meio biorreator. GLS03 (lonA); GLS04 (Controle).

c. Avaliação da influência de NaCl no crescimento e acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de E. coli

Uma vez demonstrado a necessidade de suplementar o meio de *E. coli* com cloreto de sódio, foram realizados cultivos em agitador rotativo utilizando diferentes concentrações desse sal, a fim de determinar aquela em que o crescimento e o acúmulo seriam mais eficientes. Durante 48 horas de cultivo, foram testadas as seguintes concentrações: ausência de NaCl, 0,5 g/L, 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L e 5 g/L. Os resultados indicam que em ambas as cepas, após 48 horas de cultivo, a concentração de NaCl equivalente a 4,0 g/L é a que melhor favorece o crescimento e o acúmulo de P3HB (Tabela 5.2), estabelecendo esta concentração para cultivos em biorreatores.

Tabela 5.2 – Avaliação de meios com diferentes concentrações de NaCl para crescimento celular e acúmulo de P3HB, em linhagens recombinantes de *E. coli* XL1-Blue pJM3191, após 48 horas de cultivo.

Concentração de NaCl	Xt (g/L)		Xr (g/L)		P3HB (g/L)	
	LonA	Controle	LonA	Controle	LonA	Controle
0,0 g/L	2,40±0,51	1,03±0,09	1,77±0,40	0,86±0,11	0,64±0,12	0,17±0,02
0,5 g/L	1,56±0,19	1,52±0,14	1,16±0,14	1,19±0,17	0,40±0,06	0,33±0,04
1,0 g/L	1,98±0,47	2,00±0,31	1,37±0,33	1,44±0,28	0,61±0,14	0,56±0,04
2,0 g/L	3,12±0,42	2,38±0,13	2,32±0,25	1,70±0,11	0,80±0,17	0,68±0,02
3,0 g/L	3,05±0,24	2,67±0,06	2,29±0,24	1,75±0,02	0,75±0,03	0,88±0,07
4,0 g/L	4,65±0,39	2,72±0,10	2,45±0,09	1,78±0,09	2,20±0,30	0,98±0,01
5,0 g/L	3,47±0,03	2,60±0,07	2,31±0,11	1,81±0,08	1,16±0,08	0,79±0,04

Xt – biomassa total; Xr – biomassa residual.

Um experimento prévio em agitador rotativo foi realizado, a fim de avaliar as taxas de crescimento celular das linhagens de interesse. A avaliação do crescimento celular foi obtida por medida de densidade óptica ($D.O_{600}$), durante 26 horas (Figura 5.3). Pode-se notar que, nas primeiras horas de cultivo, a linhagem controle é capaz crescer mais rapidamente que a linhagem portando o gene *lonA*, com velocidades específicas máximas de crescimento de $0,07\text{ h}^{-1}$ e $0,04\text{ h}^{-1}$, respectivamente. Porém a linhagem expressando *lonA* apresenta uma fase exponencial mais longa, até cerca de 16 horas de cultivo, quando comparada com a mesma fase na linhagem controle, que se acontece até 6 horas de cultura. Uma vez que o acúmulo de P3HB em *E. coli* está associado ao crescimento celular (LEE, 1996), estes resultados podem indicar que a presença deste gene *lonA* afete o crescimento celular, e por consequência favoreça o acúmulo de P3HB. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para esclarecer esse efeito. Todos os dados obtidos nestes ensaios estão apresentados no Anexo A.

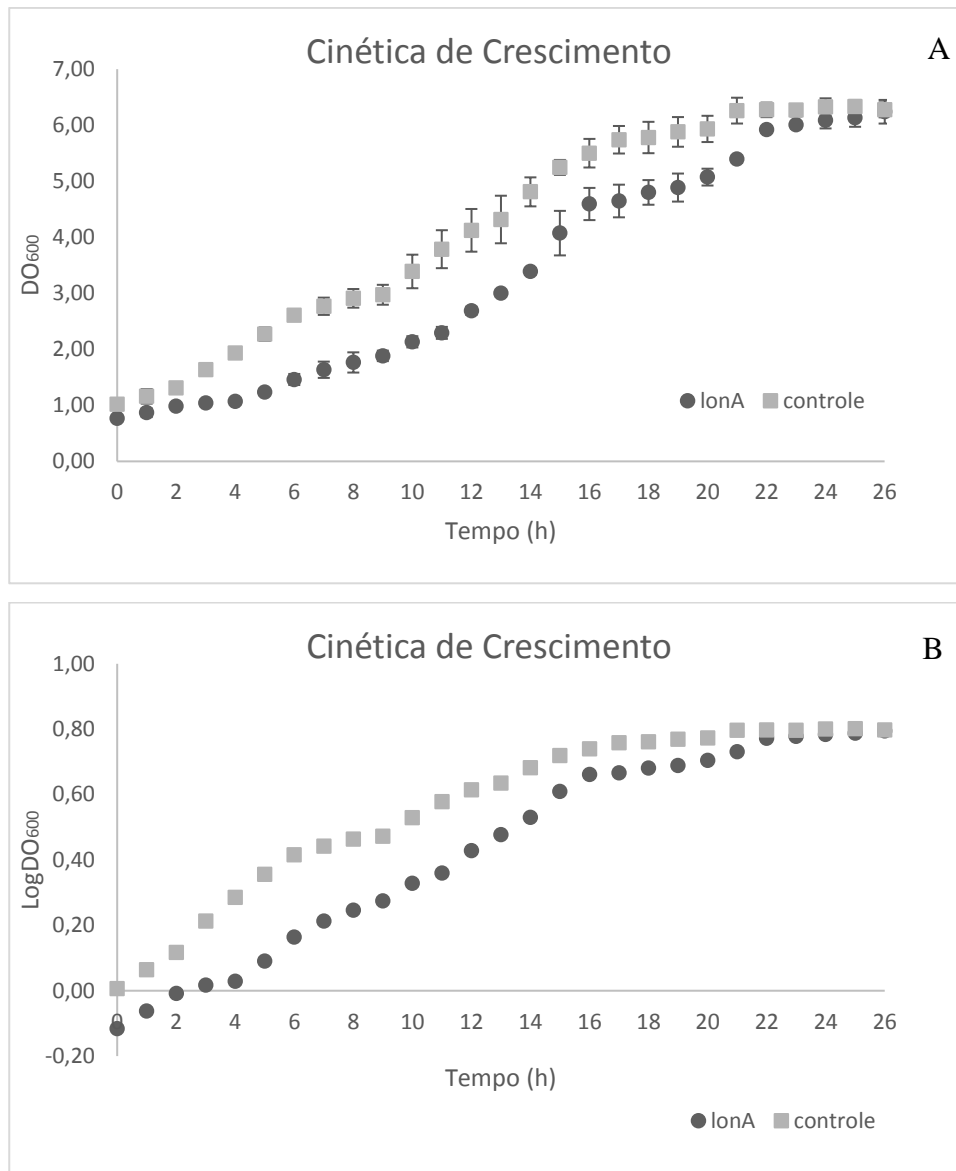


Figura 5.3 – Cinética de crescimento de linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 em meio mineral modificado, contendo 4,0 g/L de NaCl, utilizando glicose como fonte de carbono. A – Crescimento bacteriano (D.O.₆₀₀). B – Escala logarítmica do crescimento bacteriano.

d. Ensaio GLS05 e GLS06

Os ensaios GLS05 e GLS06 correspondem as linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5::*lonA* e pBBR1MCS-5 vazio, respectivamente, cultivadas em meio mineral contendo 4,0 g/L de NaCl, 1,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de glicose inicial. Ao longo do ensaio, os cultivos foram alimentados de modo contínuo com uma solução de 200 g/L de glicose e 25,1 g/L de sulfato de amônio, que corresponde a 5,33 g/L de nitrogênio, como estabelecido por Bocanegra-Rodriguez (2012). Ao se detectar queda da concentração de glicose no

meio, com cerca de 19 horas de cultivo, a alimentação foi ligada em ambos os reatores, com vazão de 0,16 mL/min. Entretanto, cerca de 90 minutos depois foi constatado que a glicose começou a se acumular no meio, sendo imediatamente interrompida a alimentação. No cultivo GLS05, a alimentação se iniciou novamente com aproximadamente 31 horas, com uma vazão inicial de 0,08 mL/min. No intervalo de 31 a 42 horas de cultivo, a vazão de alimentação foi aumentada gradativamente, até que atingisse 0,16 mL/min, vazão essa que foi mantida constante até o término do experimento. O mesmo se deu com o cultivo GLS06, porém neste caso a alimentação foi novamente iniciada após aproximadamente 36 horas do início do ensaio, com vazão inicial de 0,08 mL/min. Entre 36 e 42 horas de cultivo, a vazão de alimentação alcançou 0,16 mL/min, e mantida nesse valor até o final do ensaio (Figura 5.4). Os resultados detalhados de ambos os cultivos se encontram descritos no Anexo A.

Na análise geral dos resultados, se observa que a linhagem abrigando LonA é capaz de acumular mais P3HB do que a cepa controle, confirmando o que havia sido anteriormente apresentado nos cultivos em agitadores rotativos (Tabela 5.1 e 5.2). É possível notar que no ensaio GLS05 os teores de P3HB intracelular começam a aumentar com cerca de 20 horas de ensaio, porém sua produção se torna mais expressiva quando a alimentação atinge a vazão constante de 0,16 mL/min, com 42 horas. Já no cultivo GLS06 só se observa um aumento significativo do P3HB acumulado após o início da alimentação, ou seja, quando o experimento atinge 36 horas. Novamente, a síntese do polímero parece ser mais intensa quando a vazão de alimentação é constante. Ao término do cultivo foi possível observar um acúmulo do polímero de 5,26 g em GLS05 e 3,09 g em GLS06. Quanto a formação de biomassa residual, no início do cultivo, na cepa que expressa o gene *lonA* ocorre um atraso no crescimento celular, quando comparado com a biomassa residual produzida pelo seu controle. Embora aqui está variação não seja muito expressiva, um efeito semelhante foi observado nos experimentos em agitador rotativo (Figura 5.3). Nas fases mais tardias de cultura, a linhagem com LonA parece ser capaz de produzir mais células que a linhagem controle. É possível notar em GLS05, que a velocidade de crescimento atinge seus maiores valores após o início da alimentação, sobretudo no intervalo de 34 a 47 horas quando este parâmetro é de 0,30 g/h, e ao final de 72 horas o teor de Xr chegou a 13,35 g. Já no ensaio GLS06, a maior velocidade de formação de biomassa é de 0,25 g/h, entre 28 e 47 horas de cultivo, sendo a biomassa final do cultivo de 10,29 g.

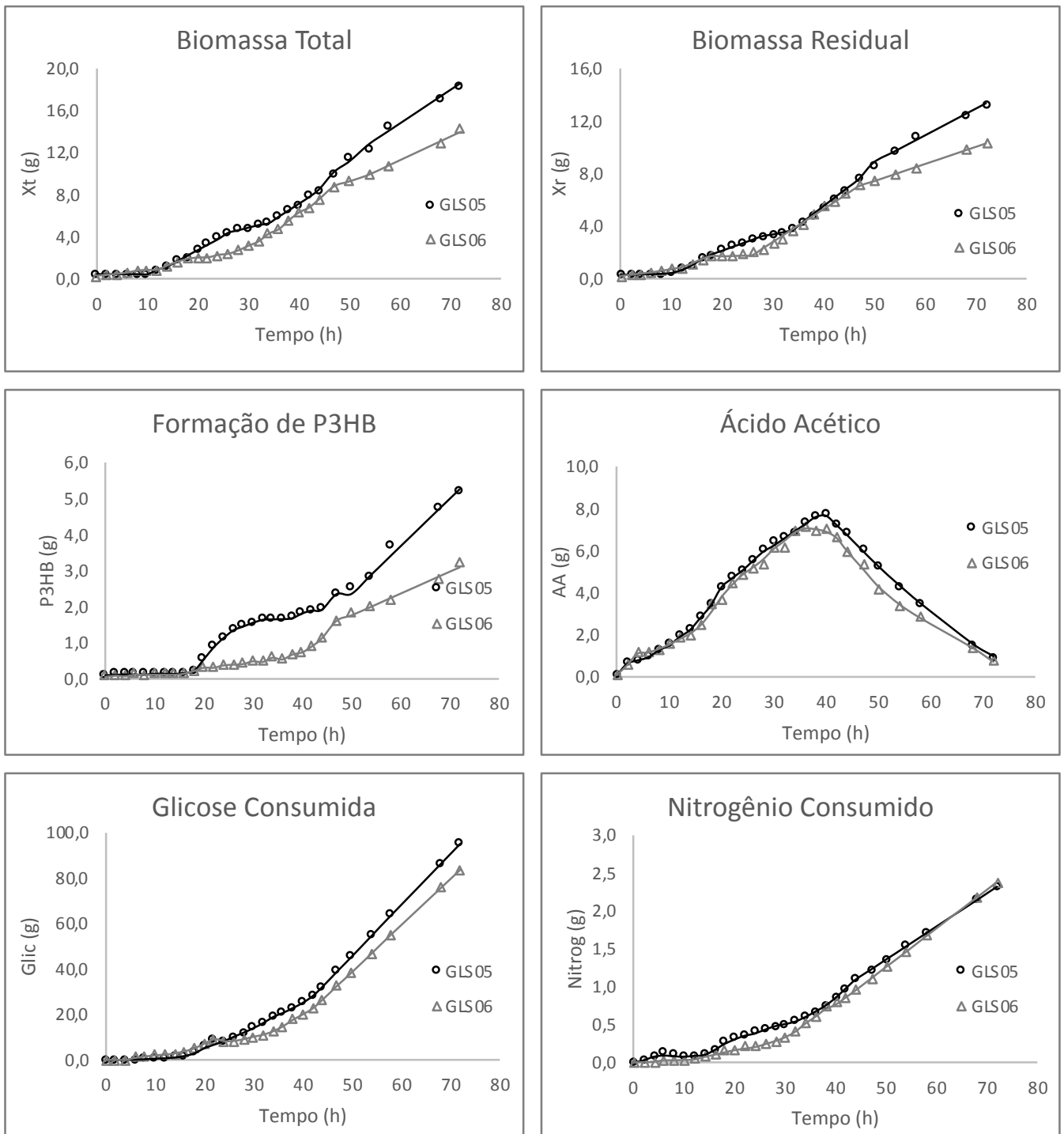


Figura 5.4 – Cultivos de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5::*lonA* (GLS05) e *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5 \emptyset (GLS06), em meio mineral contendo glicose e NaCl. Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); formação de P3HB (P3HB); ácido acético produzido (AA); glicose consumida; nitrogênio consumido.

É curioso notar que, em ambos os casos, há intensa produção de ácido acético nas primeiras horas de cultivo, alcançando mais de 7,0 g do ácido nos dois ensaios. A elevada concentração de

ácido acético no meio provavelmente é um fator limitante para as taxas de crescimento celular no início dos cultivos. Contudo, conforme vai se esgotando a disponibilidade de glicose no meio de cultura, as cepas avaliadas passam a consumir este ácido acético produzido no início do cultivo, tendo agora duas fontes de carbonos disponíveis. Assim, de acordo com o período do cultivo avaliado, o ácido acético pode ser considerado um produto ou um substrato celular.

No período entre 20 e 30 horas de cultivo, nota-se uma clara diferença na capacidade de crescimento celular e de acúmulo de P3HB, nas cepas analisadas. A linhagem que expressa *lonA*, neste intervalo, apresenta até 3,5 vezes mais teores de P3HB acumulado e cerca de 1,5 vezes mais formação de biomassa, que a linhagem controle. As concentrações de glicose no meio diminuíram mais rapidamente no cultivo GLS05, em relação ao cultivo GLS06. As concentrações de glicose variam de 3,41 g/L a 0,40 g/L, entre 20 e 30 horas de ensaio, no cultivo GLS05, e de 3,05 g/L a 2,08 g/L no mesmo período em GLS06 (Figura 5.5A). Já as concentrações de nitrogênio, variaram de 180 mg/L a 135 mg/L quando há presença de *LonA* e de 222 mg/mL a 175 mg/mL na linhagem controle, entre 20 e 30 horas. Embora na cepa controle as concentrações deste último parâmetro sejam maiores que na cepa expressando *lonA*, a variação da concentração de nitrogênio que ocorreu no intervalo avaliado foi a mesma em ambos os cultivos, indicando que houve o mesmo consumo de nitrogênio (Figura 5.5B). A análise dos parâmetros acima sugere que há uma diferença no metabolismo das cepas avaliadas, demonstrada pelo consumo de substrato e formação de produtos. Entretanto, como as condições de cultivos estabelecidas para os dois ensaios, neste intervalo, foram as mesmas, as análises realizadas não nos permitem explicar o que está ocasionando esta variação entre as linhagens.

Após 42 horas de cultivo, quando a vazão de alimentação de glicose e nitrogênio é constante, pode-se determinar um estado pseudoestacionário para GLS05 e GLS06. Uma avaliação global dos parâmetros verificados nestes cultivos em biorreatores, sobretudo das taxas de consumo de O₂ e produção de CO₂ (OUR – *oxygen uptake rate* e CER – *carbon evolution rate*, respectivamente), nos sugere que o intervalo de 50 a 72 horas corresponda a um estado pseudoestacionário, pois neste período não há alteração dessas taxas. Assim, foram avaliados os percentuais de carbono que foi convertido em cada um dos produtos formados durante este período (Tabela 5.3).

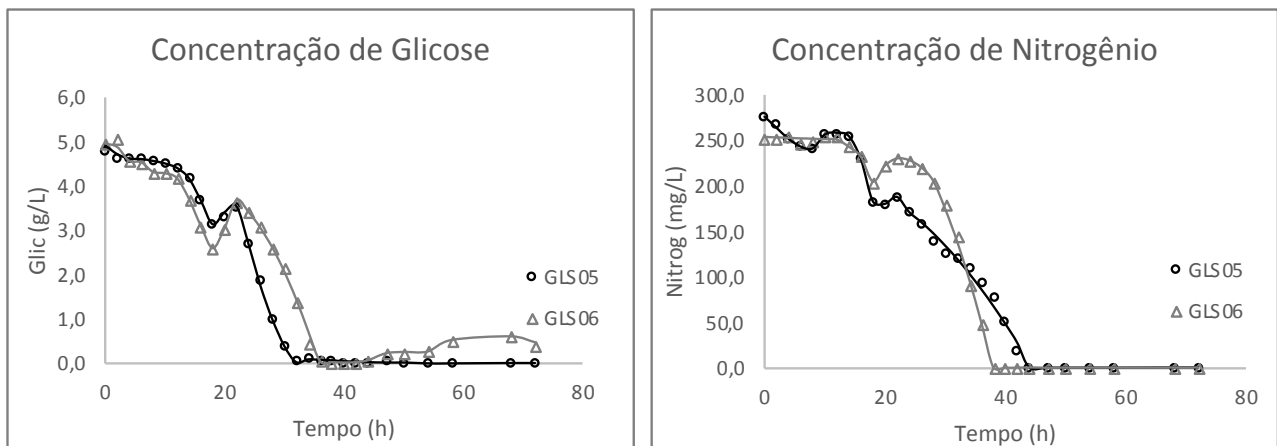


Figura 5.5 – Cultivos de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigoando pBBR1MCS-5::*lonA* (GLS05) e *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigoando pBBR1MCS-5 \emptyset (GLS06), em meio mineral contendo glicose e NaCl. A – Concentração de glicose no meio de cultura em g/L; B – Concentração de nitrogênio no meio de cultura em mg/L.

Neste balanço, pode-se observar que apenas 64,5% do carbono foi recuperado no ensaio GLS05, e 52,4% em GLS06. Estes valores não nos permitem fazer uma análise de fluxos metabólicos, uma vez que grande parte do carbono consumido não teve seu destino determinado. Provavelmente exista algum subproduto sendo formado que não está quantificado. Entretanto, a análise comparativa dos percentuais de carbonos destinados a cada um dos produtos nas duas linhagens avaliadas, indica que a cepa que expressa *lonA* é capaz de dirigir cerca de 38% mais do carbono consumido para a formação de biomassa (Xr) e quase 95% mais de carbono para produção de P3HB, enquanto a formação de CO₂ representa um aumento de apenas 13,6% do carbono, em relação à linhagem controle. Estes dados evidenciam a existência de um diferente direcionamento do carbono metabolizado para os produtos formados, em que a presença de LonA favorece a produção de P3HB e crescimento celular, em detrimento da respiração.

Tabela 5.3 – Consumo de glicose e ácido acético e formação de bioprodutos em cultivos em biorreatores de *E. coli*, entre 50 e 72 horas de cultivo. Ensaio GLS05 e GLS06.

Ensaio		Glicose	Ác. Acético	Xr	P3HB	CO ₂	Recuperação de carbono (%)
GLS05	g/h	2,25	0,20	0,20	0,13	-	64,5%
	mmol/h	12,50	3,33	-	1,51	38,27	
	Cmmol/h	75,00	6,66	8,33	6,05	38,27	
	% de C	91,80	8,20	10,2	7,4	46,9	
GLS06	g/h	2,05	0,15	0,13	0,06	-	52,4
	mmol/h	11,38	2,50	-	0,70	30,24	
	Cmmol/h	68,33	5,00	5,42	2,79	30,24	
	% de C	93,2	6,80	7,40	3,80	41,20	

5.2. Mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*

5.2.1 Construção dos plasmídeos *pBBR1MCS-5::phaP1* e *pBBR1MCS-5::phaZa1+phaP1*

A partir das sequências de nucleotídeo dos genes *phaZa1* e *phaP1* de *R. eutropha* H16 recuperadas do *GenBank* (BLASTn), iniciadores foram desenhados, adicionando a cada extremidade um sítio correspondente à enzima de restrição para efetuar a clonagem desejada. O resultado das amplificações foi confirmado por eletroforese em gel de agarose (Figura 5.6), obtendo os fragmentos de DNA de cerca de 1700 pb e 800 pb para *phaZa1* e *phaP1*, respectivamente. Os *amplicons* foram então purificados e digeridos, e posteriormente ligados com a enzima T4 DNA ligase no vetor de interesse, previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição. O fragmento *phaP1* foi inserido no vetor de forma isolada e também em conjunto com o fragmento de *phaZa1*. Os produtos das ligações foram transformados em *E. coli* XL1-Blue e crescidas em meio LB sólido com gentamicina. Os clones selecionados foram submetidos a PCR (Figura 5.7) e a sequenciamento, para confirmar as inserções. Os plasmídeos construídos foram extraídos e inseridos em *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídeo pJM9131, e as cepas obtidas foram avaliadas quanto à sua capacidade de mobilização de P3HB. As estruturas dos plasmídeos utilizados estão representadas no Anexo B.

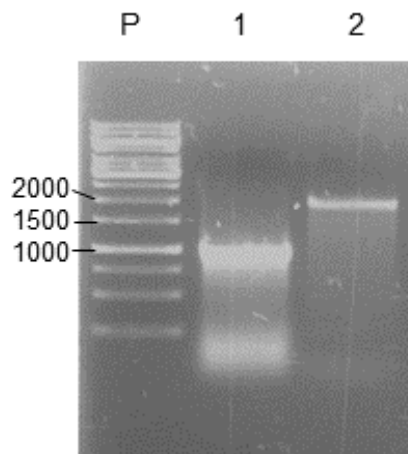


Figura 5.6 – Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de amplificação por PCR, a partir do DNA molde de *R. eutropha*. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, fragmento contendo o gene *phaP1* (891 pb); 2, fragmento contendo o gene *phaZa1* (1723 pb).

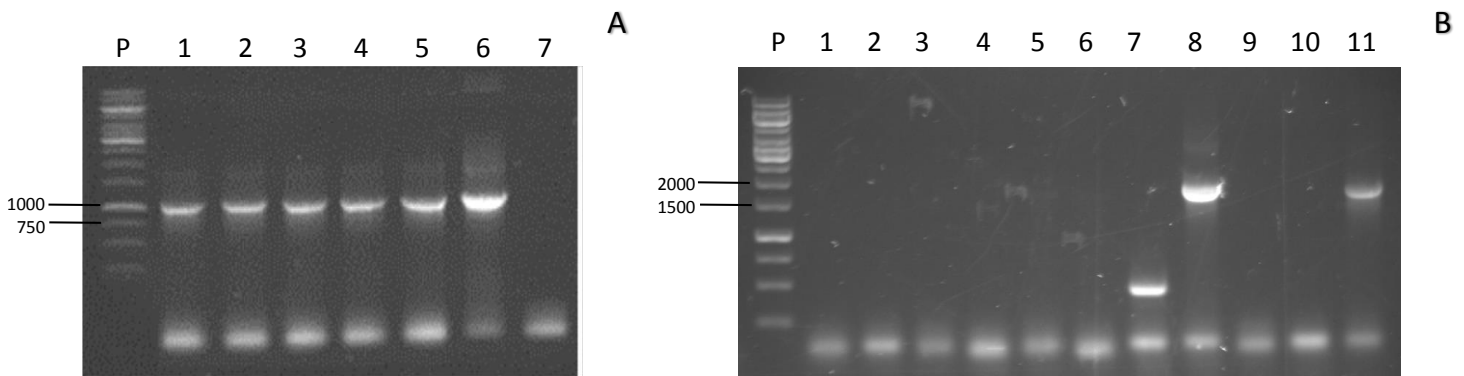


Figura 5.7 – Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de *screening* de produtos de amplificação por PCR dos genes *phaP1* e *phaZa1* de *R. eutropha*, a partir de clones selecionados. A. Amplificação do gene *phaP1* (891 pb). P, padrão 1 kb (Fermentas); 1 - 5, clones selecionados; 6, controle positivo; 7, controle negativo. B. Amplificação do gene *phaZa1* (1723 pb). P, padrão 1 kb (Fermentas); 1 - 9, clones selecionados; 10, controle negativo; 11, controle positivo.

5.2.2 Avaliação da capacidade de mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*, em agitadores rotativos

As linhagens de *E. coli* XL1-Blue, capazes de acumular P3HB pela presença do plasmídeo pJM9131, e que abrigam os genes cujos produtos possivelmente estão associados à mobilização deste biopolímero, foram avaliadas em cultivos de agitadores rotativos, por 72 horas (Figura 5.8). Para tal, avaliou-se o produto dos seguintes genes, clonados no vetor pBBR1MCS-5: *lonA*, *phaZa1*, *phaP1*, *lonA+phaZa1*, *phaP1+phaZa1*. A linhagem abrigando o pBBR1MCS-5 vazio, foi utilizada como controle.

Nota-se que, apesar de *phaZa1* codificar a principal P3HB despolimerase intracelular até então conhecida, sua expressão isolada em linhagens de *E. coli* não resulta em mobilização expressiva deste biopolímero, o que corrobora com outros trabalhos descritos da literatura (UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009; LOZANO, 2013; EGGERS; STEINBÜCHEL, 2014). Entretanto, quando esta despolimerase se encontra coexpressa com LonA ou PhaP1, as taxas de mobilização de P3HB passam a ser evidentes. A simultânea expressão de *lonA* e *phaZa1* atinge uma degradação de cerca de 50% do polímero previamente acumulado, já quando os genes *phaP1* e *phaZa1* são expressos na mesma célula, a mobilização alcança 17% do P3HB intracelular. Os dados detalhados destes experimentos estão descritos no Anexo C.

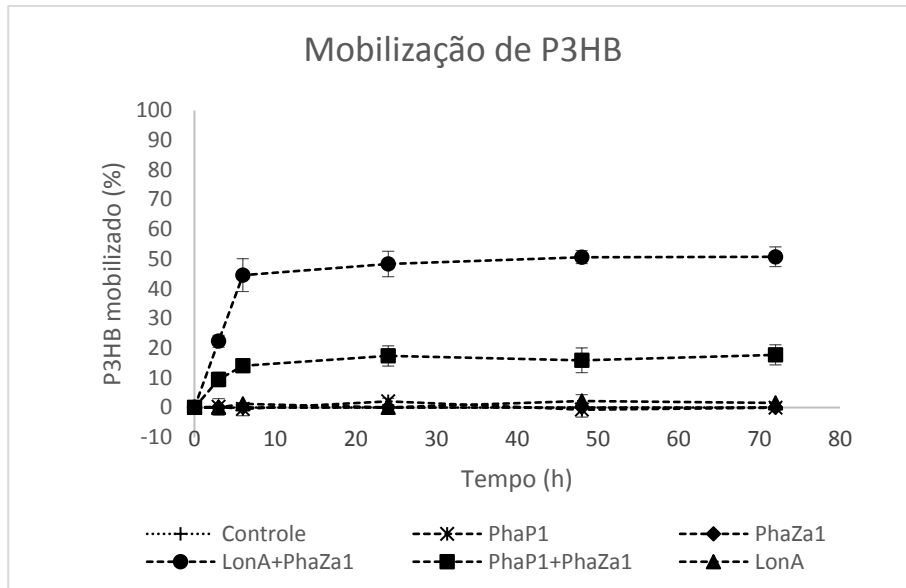


Figura 5.8 – Avaliação da mobilização de P3HB em linhagens de *E. coli* XL1-Blue pJM9131, em meio mineral.

Alguns estudos apontam o papel de PhaP1 na ativação na mobilização de P3HB, o que também é evidenciado em nossos resultados, demonstrando que a presença desta PHAsina leva a um aumento na capacidade da célula em degradar o polímero intracelular (UCHINO et al., 2007; EGGERS; STEINBÜCHEL, 2014). Quando comparamos as taxas de mobilização observadas com a presença de PhaP1+PhaZa1 e LonA+PhaZa1, observamos um aumento de quase 3 vezes na capacidade da linhagem em degradar o P3HB quando o gene *lonA* está sendo expresso. Assim, como já demonstrado previamente por Lozano (2013), há claros indícios de que o produto de *lonA* tem um importante papel na ativação da mobilização de P3HB por PhaZa1, em linhagens recombinantes de *E. coli*. No entanto, o ensaio aqui descrito demonstrou ainda que o efeito decorrente de LonA é mais expressivo na degradação do polímero do que o observado pela expressão do produto de *phaP1*.

5.2.3 Avaliação da atividade de mobilização de LonA

A avaliação da atividade de mobilização nas linhagens recombinantes de *E. coli*, se deu pela análise da tiólise dos grânulos de nP3HB isolados das cepas em questão. As cepas capazes de acumular P3HB que abrigam os genes supostamente envolvidos na mobilização (*lonA*, *phaZa1*, *phaP1*, *lonA+phaZa1*, *phaP1+phaZa1*), foram avaliadas. As cepas de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5 \emptyset e *R. eutropha* H16, foram utilizadas como controles negativo e positivo,

respectivamente. As concentrações de CoA, acetil-CoA e 3HB-CoA, dos experimentos de 1 a 11 detectados em HPLC, estão apresentadas na Tabela 5.4.

Nas primeiras análises (experimentos de 1 a 7), os grânulos de nP3HB isolados foram incubados com CoA (1 mM) a 30 °C, e amostras intermitentes foram submetidas à análise em HPLC, como descrito no item 4.12. As análises de HPLC detectaram a diminuição da concentração de CoA (de 0,84 mM para 0,22 mM) e concomitante aumento de acetil-CoA (atingindo em 2 horas 0,55 mM) no experimento 1, referente ao controle positivo. Este resultado indica que houve mobilização completa do P3HB previamente acumulado, levando a formação de acetil-CoA, uma vez que essa se trata de uma cepa selvagem, o que nos permite validar a metodologia utilizada, conforme descrito por Uchino e colaboradores (2007). Nos experimentos 2 a 6, a concentração de CoA se manteve constante ao longo do tempo, sem ser possível detectar a formação de quaisquer produtos resultantes da degradação dos grânulos, indicando que não houve mobilização, nem mesmo na linhagem abrigando os genes *lonA* e *phaZa1* concomitantemente (experimento 5). Entretanto, no experimento 7, em que *phaP1* e *phaZa1* são coexpressos, nota-se a diminuição da concentração de CoA, variando de 0,87 mM para 0,10 mM em 2 horas, e concomitante formação de 3HB-CoA, que atingiu 0,12 mM no mesmo período. Fica claro aqui que houve degradação dos grânulos, levando a produção de 3HB-CoA, embora não tenha sido detectado concentrações significantes de acetil-CoA. Isso é explicado pelo fato de se tratar de linhagens recombinantes, que não possuem enzimas naturais capazes de realizar os próximos passos para que a mobilização seja completa.

Uchino e colaboradores (2007) apresentaram um resultado semelhante em seu trabalho, embora os autores não tenham avaliado a atuação de LonA neste processo. Com o que foi demonstrado, os autores concluem que PHAsinas, em simultânea expressão de i-P3HB despolimerases, desempenham importante papel na tiólise de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. Estes resultados demonstram ainda que uma possível tiólise dos grânulos de nP3HB pela ação isolada da i-P3HB despolimerase PhaZa1, ou pela ação da P3HB sintase, como descrito por Uchino e Saito (2006), se existir, atinge concentrações tão baixas, que não puderam ser detectadas.

Em um segundo momento, os grânulos isolados de nP3HB provenientes das linhagens abrigando os genes *lonA*, *phaZa1* e *lonA+phaZa1*, bem como o controle negativo, foram reavaliadas. Neste caso, a mesma mistura descrita no item 4.12 foi procedida, sendo então adicionada a esta 125 µL de extrato celular, proveniente de células expressando a proteína LonA (experimentos de 8 a 11). Nestes resultados, foi possível demonstrar que na linhagem controle e na linhagem que expressa apenas o gene *lonA* (experimentos 8 e 9, respectivamente), não houve tiólise dos grânulos, uma vez que as concentrações de CoA se mantiveram constantes, e não houve

formação de 3HB-CoA e/ou acetil-CoA. Isso comprova que LonA, quando isolada, não é capaz de promover a mobilização do P3HB.

Contudo, nos experimentos 10 e 11, em que havia expressão celular de PhaZa1 e adição de extrato celular contendo LonA, foi possível detectar significativa atividade de tiólise dos grânulos, com consumo de CoA (variando de 0,90 mM a 0,14 mM no experimento 10, e 0,86 mM a 0,04 mM no experimento 11) e formação de 3HB-CoA (atingindo 0,21 mM no experimento 10, e 0,16 mM no experimento 11). Ao que tudo indica, LonA não é uma proteína associada ao grânulo, e por isso não foi possível detectar a tiólise dos grânulos no experimento 5. Porém quando esta proteína é adicionada a mistura da reação, fica evidente seu envolvimento no processo. Estes resultados sugerem que, LonA desempenhe um papel ainda mais expressivo que PhaP1 na ativação da mobilização de P3HB, quando na presença de PhaZa1, em linhagens recombinantes de *E. coli*.

Tabela 5.4 – Ensaio *in vitro* da tiólise de nP3HB

Experimento	[CoA] (mM)				[Acetil-CoA] (mM)				[3HB-CoA] (mM)			
	0 h	0,5 h	1 h	2 h	0 h	0,5 h	1 h	2 h	0 h	0,5 h	1 h	2 h
1 <i>R. eutropha</i> H16, nP3HB, CoA	0,84	0,43	0,27	0,22	<0,03	0,35	0,50	0,55	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
2 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB</i>) nP3HB, CoA	0,79	0,79	0,80	0,76	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
3 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + lonA</i>) nP3HB, CoA	0,85	0,86	0,87	0,83	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
4 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + phaZa1</i>) nP3HB, CoA	0,82	0,82	0,82	0,79	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
5 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + lonA + phaZa1</i>) nP3HB, CoA	0,93	0,94	0,94	0,95	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,03	0,03	0,04	0,05
6 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + phaP1</i>) nP3HB, CoA	0,87	0,86	0,86	0,84	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
7 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + phaP1 + phaZa1</i>) nP3HB, CoA	0,87	0,56	0,18	0,10	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,02	0,04	0,06	0,12
Adição de extrato celular com LonA												
8 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB</i>) nP3HB, ext. cel com LonA, CoA	0,80	0,78	0,78	0,78	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
9 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + lonA</i>) nP3HB, ext. cel. Com LonA, CoA	0,86	0,88	0,87	0,87	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
10 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + phaZa1</i>) nP3HB, ext. cel. Com LonA, CoA	0,90	0,54	0,24	0,14	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,04	0,07	0,16	0,21
11 <i>E. coli</i> (<i>phaCAB + lonA + phaZa1</i>) nP3HB, ext. cel. Com LonA, CoA	0,86	0,56	0,18	0,04	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	0,06	0,08	0,16

5.3 Clonagem de genes *lonA*, *phaC* e *phaZa1* em vetores pET

As sequências de nucleotídeo dos genes *lonA*, *phaC* e *phaZa1* de *Ralstonia eutropha* H16 foram recuperadas do *GenBank* (BLASTn), e iniciadores foram desenhados, de modo a amplificar o fragmento desejado. Foram adicionados a cada iniciador um sítio correspondente à enzima de restrição para efetuar a clonagem desejada. Os sítios de cada enzima de restrição utilizados foram determinados de acordo com a sequência dos vetores utilizados, que se encontra disponível na base de dados de vetores (Addgene).

O resultado das amplificações, utilizando as devidas combinações de iniciadores, foi confirmado por eletroforese em gel de agarose, obtendo os fragmentos de DNA de *lonA* (cerca de 2,4 kb), *phaC* (cerca de 1,8 kb) e *phaZa1* (cerca de 1,2 kb), como era esperado (Figura 5.9). Os amplicons foram, após purificação e digestão, ligados aos respectivos vetores pET, previamente digeridos com as enzimas de restrição de interesse, com auxílio da enzima T4 DNA Ligase. Os seguintes plasmídeo foram obtidos:

- pET3a::*lonA* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/BamHI*);
- pET28a::*lonA* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/BamHI*);
- pET28a::*phaC* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/BamHI*);
- pET28a::*phaZa1* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/BamHI*);
- pETDuet-1::*lonA+phaC* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/MfeI* e *BamHI/BspTI*);
- pETDuet-1::*lonA+phaZa* (utilizando as enzimas de restrição *NdeI/MfeI* e *BamHI/SalI*).

O produto da ligação foi transferido por transformação em *E. coli* BL21(DE3) e crescidas em meio LB sólido suplementado com o respectivo antibiótico. Para confirmar as ligações, cada plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição específicas, e analisado por eletroforese em gel de agarose (Figura 5.10). Em todos os casos foram obtidos fragmentos correspondentes ao tamanho do vetor e ao(s) gene(s) esperados. Os plasmídeos foram ainda submetidos a sequenciamento, confirmando a inserção dos insertos desejados. As estruturas dos plasmídeos construídos estão representadas no Anexo D.

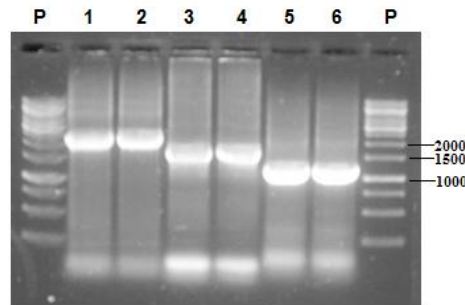


Figura 5.9 – Perfil de migração em gel de agarose 0,8% de produtos de amplificação por PCR dos genes *lonA*, *phaC* e *phaZa1*, a partir do DNA molde de *R. eutropha*. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, fragmento de *lonA* amplificado com os iniciadores lonANdeFw e lonABamRv; 2, fragmento de *lonA* amplificado com os iniciadores lonANdeFw e lonAMfeRv; 3, fragmento de *phaC* amplificado com os iniciadores phaCNdeFw e phaCBamRv; 4, fragmento de *phaC* amplificado com os iniciadores phaCBamFw e phaCBspRv; 5, fragmento de *phaZa1* amplificado com os iniciadores phaZNdeFw e phaZBamRv; 6, fragmento de *phaZa1* amplificado com os iniciadores phaZBamFw e phaZSalRv.

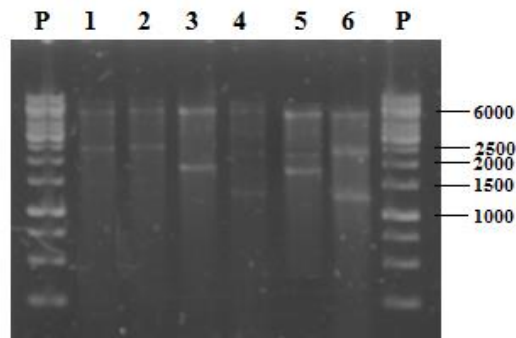


Figura 5.10 – Perfil de migração em gel de agarose 0,8% após digestão dos plasmídeos construídos. P, padrão 1 kb (Fermentas); 1, pET3a::*lonA* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 2, pET28a::*lonA* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 3, pET28a::*phaC* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 4, pET28a::*phaZa1* digerido com *NdeI* e *BamHI*; 5, pETDuet-1::*lonA+phaC* digerido com *NdeI*, *MfeI*, *BamHI* e *BspTI*; 6, pETDuet-1::*lonA+phaZa1* digerido com *NdeI*, *MfeI*, *BamHI* e *SalI*.

5.4 Purificação de proteínas

Para avaliar uma possível interação entre LonA e as proteínas de síntese e mobilização de P3HB (PhaC e PhaZa1, respectivamente), estas foram expressas simultaneamente através dos plasmídeos pETDuet-1::*lonA+phaC* ou pETDuet-1::*lonA+phaZa1*, de modo que se houver interação entre elas, LonA será purificado juntamente com PhaC e/ou PhaZa1, respectivamente.

Como parâmetro de comparação para as possíveis copurificações, foram realizadas as purificações, por cromatografia de afinidade a níquel, das proteínas LonA, PhaC e PhaZa1 expressas isoladamente no vetor pET28a. Todas as proteínas purificadas por afinidade foram analisadas também por cromatografia de exclusão molecular. Todos os resultados obtidos nas purificações por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular deste trabalho estão apresentados no Anexo E.

Na purificação de LonA, a cromatografia de afinidade detectou um pico duplo, indicando uma coeluição de duas proteínas (Anexo E). O pico de maior intensidade (~1300 mAU) possivelmente se trata de LonA. Para confirmar esta hipótese, as frações coletadas referentes aos dois picos obtidos foram analisadas por SDS-PAGE, confirmando que a proteína de interesse foi purificada (Figura 5.11a). A fração correspondente à LonA foi então purificada por cromatografia de exclusão molecular. Novamente foi observado uma coeluição de proteínas, e estas amostras foram também submetidas a SDS-PAGE (Figura 5.11a). Foram encontradas duas bandas na fração enriquecida com LonA, das quais a de maior intensidade apresenta peso molecular correspondente a LonA (~89 kDa) e a outra pode ser uma proteína contaminante ou ainda alguma proteína que se ligue a LonA, uma vez que LonA parece ser capaz de interagir com diversas proteínas.

Do mesmo modo, procedeu-se a purificação de PhaC quando expressa isoladamente no vetor pET28a, e quando expressa em conjunto com LonA através do vetor pETDuet-1. No segundo caso, apenas PhaC resulta em um peptídeo híbrido contendo uma sequência de histidina no C-terminal. Desta forma, espera-se que ao realizar a cromatografia de afinidade por níquel, PhaC seja purificada e LonA venha acoplada a ela, caso haja uma interação entre elas. Nas duas situações, a cromatografia de afinidade detectou apenas um pico, o de maior intensidade (~1300 mAU) se refere a expressão de PhaC isolada, enquanto o de menor intensidade se refere a PhaC expressa em conjunto com LonA (~500 mAU). Isso se deve ao fato da maquinaria celular estar sendo utilizada para expressar duas proteínas simultaneamente, gerando um menor rendimento. As amostras coletadas referentes aos picos obtidos, em cada uma das purificações, foram concentradas e submetidas à cromatografia de exclusão molecular. Os picos de ambas as amostras foram detectados no mesmo tempo de corrida, entre 80 mL e 100 mL de lavagem com tampão de gel de filtração. Ao longo das purificações, todas as amostras foram avaliadas por SDS-PAGE, e apenas uma banda correspondente ao tamanho de PhaC (~64 kDa) foi encontrada, indicando que não houve copurificação de LonA e PhaC (Figura 5.11b).

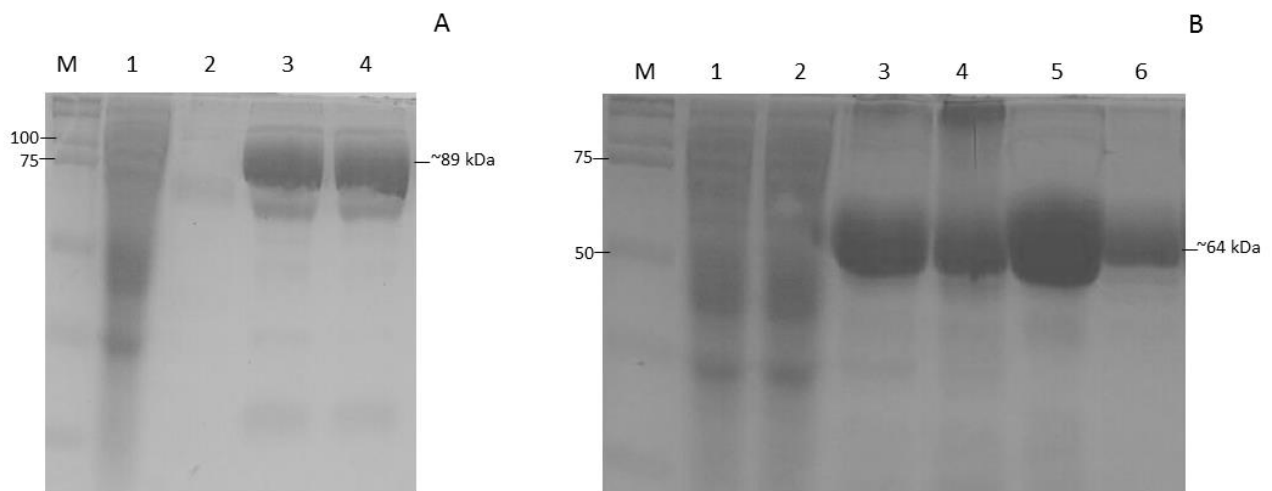


Figura 5.11 – SDS-PAGE 10% (A) Proteína LonA (~89 kDa). M. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração insolúvel expressando LonA; 2. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de LonA (pico maior); 3. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de LonA (pico menor); 4. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de LonA. (B) Proteína PhaC (~64 kDa). M. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração insolúvel expressando PhaC isolada; 2. Fração insolúvel expressando PhaC expressa juntamente com LonA; 3. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaC isolada; 4. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaC expressa juntamente com LonA; 5. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaC isolada; 6. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaC expressa juntamente com LonA.

Por fim, foi realizada a cromatografia por afinidade de PhaZa1, entretanto foram detectados níveis muito baixos da proteína. Pode-se observar que valores obtidos na purificação de PhaZa1 (em torno de 200 mAU), é cerca de 2,5 vezes menor que o detectado no pico antes da lavagem com o tampão B (com aproximadamente 550 mAU) (Figura 5.12a). Para verificar se a amostra detectada, mesmo que em valores reduzidos, corresponde a PhaZa1, a mesma foi analisada por gel de SDS-PAGE, revelando que a proteína expressa se encontrava insolúvel, uma vez que uma banda forte, com peso molecular equivalente a PhaZa1 (~47 kDa), apareceu no *pellet* celular, enquanto a fração purificada por cromatografia de afinidade apresentou algumas bandas fracas e inespecíficas (Figura 5.12b).

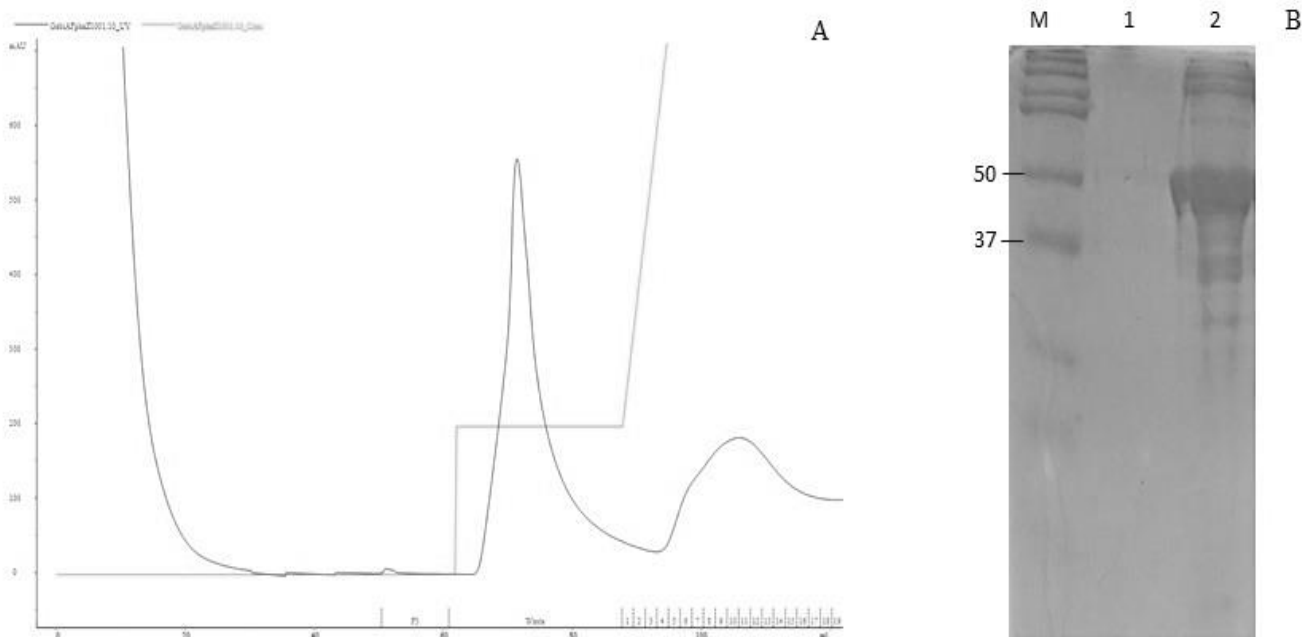


Figura 5.12 – A. Cromatografia de afinidade de PhaZa1; linha azul: absorvância a 280 nm; linha verde: gradiente de concentração de tampão B (contendo imidazol). B. SDS-PAGE 12% da proteína PhaZa1 (~47 kDa). P. Marcador de proteína Kaleidoscope - kDa (Bio-Rad); 1. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaZa1; 2. Fração insolúvel expressando PhaZa1 (banda de ~47 kDa).

Por esse motivo, foi realizado um teste de expressão para PhaZa1, no qual foram avaliadas variações temperaturas e tempos de cultivo (15 °C - *overnight*, 25 °C – 4 horas e 37 °C – 3 horas), bem como diferentes concentrações de IPTG (0,5 M e 1,0 M) para a indução. O cultivo a 25 °C, por 4 horas, foi o que apresentou melhor expressão de PhaZa1, entretanto não houve diferenças significativas na expressão com 0,5 M ou 1,0 M de IPTG (dados não apresentados). Assim, foi procedida novos cultivos para a expressão de PhaZa1 isolada e coexpressa com LonA.

Após a cromatografia de afinidade, nas condições de cultivo pré-estabelecidas, detectou-se um único pico em ambas as análises, sendo o maior com ~1300 mAU referente a PhaZa1 isolada, e o de ~650 mAU a PhaZa1 coexpressa com LonA. Na cromatografia de exclusão molecular, novamente não foi possível detectar uma copurificação de PhaZa1 e LonA, uma vez que ambos os cultivos tiveram pico único detectados no mesmo tempo de análise, entre 90 mL e 100 mL de lavagem com tampão de gel filtração (Anexo E). As amostras foram avaliadas por SDS-PAGE, no qual foi possível detectar uma banda com cerca de 47 kDa,

tamanho que corresponde à enzima PhaZa1, reforçando que não houve copurificação desta proteína com LonA (Figura 5.13).

Os resultados das purificações aqui realizadas indicam que não existe uma ligação direta entre PhaC e LonA ou entre PhaZa1 e LonA, ou pelo menos não forte o suficiente para que estas proteínas possam ser copurificadas pelas metodologias aqui utilizadas.

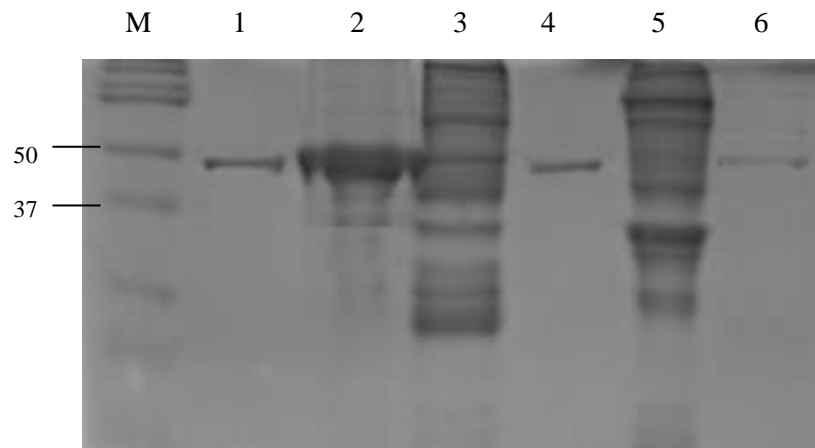


Figura 5.13 – SDS-PAGE 10% da proteína PhaZa1 (~47 kDa). M. Marcador de proteína Dual Color - kDa (Bio-Rad); 1. Fração de purificação por cromatografia de afinidade de PhaZa1 isolada; 2. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaZa1; 3. Fração insolúvel expressando PhaZa1 isolada; 4. Fração de purificação por cromatografia de afinidade PhaZa1 expressa juntamente com LonA; 5. Fração de purificação por cromatografia de exclusão molecular de PhaZa1 expressa juntamente com LonA; 6. Fração insolúvel expressando PhaZa1 expressa juntamente com LonA.

6 DISCUSSÃO

A bactéria *Escherichia coli*, em suas diferentes cepas, não possui a maquinaria necessária para a síntese de PHA naturalmente, entretanto, são consideradas hospedeiras ideais para esse metabolismo, uma vez que apresentam diversas vantagens quando comparadas às linhagens selvagens produtoras destes polímeros (JIAN et al., 2010). Diversos fatores podem influenciar nos teores de polímero acumulados em linhagens recombinantes, entre eles se destaca as características da linhagem cultivada, o meio de cultura empregado e o vetor utilizado para expressão dos genes de síntese (LEE et al., 1994; HO et al., 1999). Os resultados apresentados neste trabalho quanto ao acúmulo de P3HB com diferentes cepas de *E. coli* cultivadas em agitadores rotativos, demonstraram significativa variação dos teores de P3HB, quando diferentes vetores foram utilizados, resultado do gene marcador presente em cada um dos plasmídeos utilizados, sendo resistência à ampicilina no vetor pSK⁺::*phaCAB* e resistência à canamicina no pJM9131. Os plasmídeos portadores de genes de resistência à ampicilina são mais instáveis devido a atividade β -lactamase, que hidrolisam o anel β -lactâmico do antibiótico, eliminando a seleção sobre as células não portadoras do plasmídeo, e por consequência resultando em menores teores do biopolímero intracelular (WILLIAMS, 1999; FRIEHS, 2004; BUSH; JACOBY, 2009).

Ainda nestes cultivos, foi possível notar que, em todas as cepas avaliadas, a presença do gene *lonA* de *Ralstonia eutropha* levou a um aumento na capacidade celular de sintetizar P3HB, comparado com as linhagens controle, que não expressam essa proteína. Os resultados mais expressivos foram obtidos na linhagem de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 abrigando pBBR1MCS-5::*lonA*, que acumulou cerca de 65% de sua massa seca celular, em agitadores rotativos, enquanto seu respectivo controle atingiu taxas de cerca de 27% da massa seca celular. Este resultado é interessante, uma vez que um estudo anterior também em frascos agitados, com linhagens recombinantes de *E. coli* para a produção de P3HB a partir de genes de *R. eutropha*, atingiu um acúmulo máximo deste polímero de cerca de 40% de sua massa seca celular com a linhagem LS5218 e 11% da biomassa em cultivos com a cepa XL1-Blue, ambas sem a presença de *LonA* de *R. eutropha* (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012). Estes dados reforçam o envolvimento de *LonA* na síntese de P3HB, como já havia sido reportado por Lozano (2013), e evidencia este efeito mesmo quando utilizamos outras linhagens de *E. coli*, ou ainda outro vetor para a expressão dos genes de acúmulo.

Nos cultivos em biorreatores realizados neste trabalho, o efeito de *LonA* sobre a síntese do biopolímero se repete, entretanto, podemos notar também que há outras variações

metabólicas atribuídas a expressão deste gene, como um atraso no crescimento celular nas primeiras horas de cultivos, bem como um aumento maior do desvio de carbonos destinados à produção de P3HB e ao crescimento celular, do que para a formação de CO₂, nas fases finais do experimento. Em um estudo anterior em nosso laboratório, diversas linhagens, plasmídeos e condições de cultivos em biorreatores para a produção de P3HB em *E. coli* foram avaliadas. Os melhores resultados obtidos neste estudo foram com a linhagem de *E. coli* LS5218, em condições de cultivos semelhantes aos utilizados neste trabalho, quando as taxas de acúmulo de P3HB chegaram a 15,5% de massa seca celular, após 43 horas de cultivo (BOCANEGRA-RODRIGUEZ, 2012). Neste mesmo período de tempo, nossa cepa de XL1-Blue que abriga o gene *lonA* foi capaz de acumular 23,8% de biomassa total, e ao final do cultivo de 72 horas, mais de 28% do mesmo. Os melhores valores de acúmulo de P3HB obtidos por Bocanegra-Rodriguez (2012) com a linhagem XL1-Blue em biorreatores são menores de 3% de massa seca celular, após 58 horas de ensaio, embora as condições de cultivos aqui utilizadas tenham sido diferentes.

Não há outros dados na literatura do envolvimento do produto de *lonA* no metabolismo de PHA em linhagens bacterianas naturalmente produtoras de polímero, contudo, nossos resultados são sólidos ao mostrar que sua expressão favorece à síntese de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. O mecanismo de ação de LonA no acúmulo de P3HB, ainda não está totalmente esclarecido, mas os dados apresentados neste trabalho sugerem que esta protease tenha um efeito indireto neste processo.

Sabe-se que a síntese de P3HB em linhagens de *E. coli* recombinante não requer limitação de um nutriente específico, mas depende da quantidade de acetil-CoA disponível, assim o acúmulo deste polímero ocorre apenas associado ao crescimento celular (LEE, 1996b). Partindo desse pressuposto, nossos resultados em agitador rotativo sustentaram uma hipótese inicial de que o aumento do acúmulo de P3HB, quando LonA é expresso, seria decorrente de uma redução no crescimento celular e, por consequência, maior direcionamento de carbono para a produção do biopolímero. No entanto, os dados obtidos em biorreatores nos mostram que a presença de LonA resulta em um efeito pleotrópico mais generalizado no metabolismo celular. A análise dos percentuais de carbono direcionado para a formação de bioprodutos, indicaram que a presença de LonA leva a um maior direcionamento de carbono para crescimento celular e para a produção de P3HB, em relação a cepa controle. Com isso, sugere-se que a ação de LonA não resulte em um simples efeito da redução do crescimento celular, mas sim em uma redistribuição de carbonos no metabolismo celular. No futuro, este efeito pode ser melhor investigado por estudos detalhados de fluxômica.

LonA está descrito na literatura como envolvido nas mais diversas atividades celulares em diferentes espécies bacterianas (CLARET; HUGHES, 2000; ROBERTSON et al., 2000; TAKAYA et al., 2003; TOMOYASU et al., 2003; ROTANOVA et al., 2006; SU et al., 2006; COHN et al., 2007; LAN et al., 2007; MARR et al., 2007; MELDEREN; AERTSEN, 2009; BREIDENSTEIN; BAINS; HANCOCK, 2012; BREIDENSTEIN et al., 2012; VESELOVA et al., 2012; YANG et al., 2015), entretanto, de forma geral, proteases do tipo AAA+ são as enzimas chaves para a manutenção da homeostase celular (GOLDBERG, 1992; WICKNER; MAURIZI; GOTTESMAN, 1999). Em *Pseudomonas aeruginosa* LonA foi apontado como uma das enzimas envolvidas na produção de ramnolipídeos. Neste metabolismo, esta protease também desempenha um efeito indireto, atuando como um modulador da degradação proteína RhlI, a responsável por sintetizar o sinal *rhl* de *quórum sensing*, afetando assim geração final do bioproduto (YANG et al., 2015). Em *E. coli*, um estudo demonstrou que embora LonA não seja uma proteína essencial em condições normais de crescimento, sua presença favorece estas células quando as mesmas se encontram em alguma condição de estresse ambiental (GOTTESMAN, 2003). Neste mesmo sentido, LonA parece atuar quando em condições de acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*, uma vez que a célula se encontra em limitações nutricionais, sendo seu efeito pleotrópico no metabolismo celular.

É curioso notar que a bactéria *Escherichia coli* possui em seu genoma um gene codificador da protease ATP-dependente LonA. Um alinhamento da sequência de aminoácidos de LonA de *E. coli* K-12, com as respectivas sequências de *R. eutropha*, indica que haja entre elas 70% identidade e 83% de similaridade (Anexo F). É possível encontrar regiões altamente conservadas entre LonA destas espécies, bem como em outras Burkholderiaceae. Dentre os resíduos conservadas, destaca-se Ser⁶⁷⁹ e Lys⁷²² (Anexo F), que formam a díade catalítica de LonA (ROTAVONA; MELNIKOV; TSIRULNIKOV, 2003; BOTOS et al., 2004; ROTANOVA et al., 2004). Mesmo se tratando de uma proteína altamente conservada, LonA de *E. coli* não parece desempenhar papel expressivo no metabolismo de P3HB, como é observado quando se expressa *lonA* de *R. eutropha*. Ao que tudo indica, o efeito observado com o gene de *R. eutropha* seja decorrente da superexpressão do mesmo, por meio do plasmídeo de alto número de cópias pBBR1MCS-5.

No que diz respeito à mobilização de PHA, o produto de *lonA* foi mencionado pela primeira vez como envolvido neste processo no ano de 2010 (CASTELLANOS, 2010). Neste estudo, foram obtidos dois mutantes de *B. sacchari* por transposon mini-*Tn5*, interrompidos nos genes *phaZa1* e *lonA*, que levava a um fenótipo deficiente na mobilização de P3HB. (CASTELLANOS, 2010). A partir destes resultados, Lozano (2013) avaliou o efeito dos genes

phaZa1 e *lonA* através da reconstrução do sistema de mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. No entanto, o genoma de *B. sacchari* não havia sido sequenciado até aquele momento, e por isso o trabalho de Lozano (2013) se procedeu com os genes de *R. eutropha*. Os resultados obtidos com expressão heteróloga de PhaZa1 isolada resultou em concentrações muito baixas de 3HB excretados no sobrenadante, corroborando com outros dados da literatura (UCHINO et al., 2007; UCHINO; SAITO; JENDROSSEK, 2008; WANG et al., 2009). Já a expressão concomitante da i-P3HB despolimerase PhaZa1 e da protease LonA, levou a um expressivo aumento na capacidade celular de mobilizar o polímero previamente acumulado (LOZANO, 2013).

Outras enzimas foram reportadas anteriormente em estudos de mobilização. A tiólise de grânulos de nP3HB e formação de 3HB-CoA, mesmo que em pequenas concentrações, demonstrou uma atividade reversa da P3HB sintase, atuando também como proteína mobilizadora (UCHINO; SAITO, 2006). Foi sugerido ainda que PHAsinas, as principais proteínas associadas aos grânulos de PHA, são importantes ativadores da mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. Um ensaio *in vitro* demonstrou a mobilização de P3HB pela formação de 3HB-CoA, a partir de nP3HB, na presença de CoA. Foi demonstrado que a expressão combinada de *phaCAB*, *phaZa1* e *phaP1* (que codifica a principal PHAsina de *R. eutropha*), em linhagens recombinantes de *E. coli*, resultou em tiólise dos grânulos de nP3HB (UCHINO et al., 2007). Em 2014, foi demonstrado que a despolimerização de P3HB por PhaZa1, em *E. coli* recombinante, requer a presença de PHAsinas, como PhaP1, PhaP2 e PhaP4, sustentando a hipótese de PHAsinas estarem envolvidas no metabolismo de mobilização de P3HB (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2014). Sznajder e colaboradores (2015) demonstraram ainda fortes evidências de que PhaZa1 seja capaz de interagir não apenas com os grânulos de PHA, mas também com proteínas associadas a estas inclusões, como as PHAsinas. Assim, baseado neste pressuposto, no presente trabalho foram clonados os genes *phaZa1* e *phaP1*, de *R. eutropha*, no vetor pBBR1MCS-5, e inseridos na *E. coli* XL1-Blue abrigando pJM9131, capaz de acumular P3HB, de modo a avaliar a capacidade de mobilização do polímero, tanto *in vitro* como *in vivo*. Com isso, visamos a comparar o efeito de PhaP1 e de LonA na mobilização de P3HB, quando coexpressos com a despolimerase intracelular, PhaZa1.

Nossos resultados corroboram com o apresentado na literatura, uma vez que PhaZa1 isolada não leva a uma mobilização efetiva de P3HB, seja em cultivos agitados, ou na tiólise dos grânulos *in vitro*, entretanto a mobilização passa a ser expressiva quando esta i-P3HB despolimerase é expressa juntamente com PhaP1 ou LonA. Foi possível demonstrar ainda, que embora a presença da PHAsina permita que uma parcela do polímero seja mobilizada, a

expressão do gene *lonA* resulta em valores mais expressivos de degradação intracelular. As taxas de mobilização atingidas nos cultivos agitados são maiores com a presença de LonA, quando comparado com a presença de PhaP1, bem como a tiólise dos grânulos de nP3HB, pela formação de 3HB-CoA. Este último caso, nos leva a sugerir ainda que LonA não seja uma proteína associada ao grânulo, uma vez que a mistura da reação contendo os grânulos purificados e as proteínas a estes associadas, não resultou em tiólise dos grânulos, mesmo quando LonA estava supostamente presente. Em contrapartida, a adição do extrato celular das linhagens abrigando o gene *lonA*, levou a expressiva formação de 3HB-CoA, indicando que LonA, em linhagens recombinantes de *E. coli*, seja essencial para que uma mobilização efetiva ocorra. Em nenhum dos casos avaliados neste estudo, foi demonstrado qualquer degradação intracelular na ausência de PhaZa1, confirmando ser esta a enzima central do processo de mobilização de P3HB.

A fim de verificar uma possível interação direta de LonA com as principais proteínas do metabolismo de P3HB (PhaC e PhaZa1), os genes codificadores destas três proteínas em *R. eutropha* foram clonados em vetores pET isoladamente e de forma combinada, de modo que elas pudessem ser copurificadas, caso a interação ocorra. Os vetores do tipo pET consistem em vetores de expressão de proteínas, sob o controle de um promotor T7 (STUDIER et al., 1990). Neste trabalho, foram utilizados dois diferentes vetores: i) pET28a – que permite que uma proteína híbrida seja codificada com uma sequência de aminoácidos de histidina na sua região C-terminal; ii) pETDuet-1 – que permite realizar a clonagem de dois genes simultaneamente, sendo que apenas uma das proteínas produzidas carregará a sequência codificadora da cauda de histidina. Esta sequência de aminoácidos de histina permite a purificação da proteína de interesse através de cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Os plasmídeos construídos foram transformados em *E. coli* BL21(DE3), linhagem que abriga em seu genoma um gene codificador da RNA polimerase do fago T7, necessária para a transcrição dos genes clonados nos vetores pET.

Os resultados obtidos neste trabalho não demonstraram que haja uma interação direta e/ou forte o bastante para que LonA fosse copurificada com PhaC ou PhaZa1. Pfeiffer e colaboradores (2011) buscaram por proteínas associadas ao grânulo capazes de interagir com a P3HB sintase em uma biblioteca genômica de *R. eutropha*, utilizando a abordagem do duplo-híbrido descrita por Karimova, et al. (2000). Os resultados apontaram para a interação de PhaC com uma proteína multifuncional, PhaM, mas não indicaram a interação entre LonA e PhaC, o que sustenta o apresentado em nossos resultados, de que não ocorre uma interação direta entre estas proteínas.

Neste trabalho, fica evidente que LonA desempenha um importante papel favorecendo tanto síntese como a mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. Tudo leva a crer que a ação desta proteína no acúmulo do polímero seja resultante um efeito indireto neste processo, que permite que mais intermediários metabólicos sejam destinados à produção do bioplástico. Estudos de fluxômica podem auxiliar na melhor compreensão dos efeitos desta protease sobre a redistribuição de fluxos no metabolismo de *E. coli*, que levam a um maior acúmulo de P3HB. Entretanto, no que se diz respeito ao processo de mobilização, LonA parece ser uma peça chave para que a degradação intracelular ocorra. Neste sentido, novas abordagens devem ser realizadas, a fim de verificar em maiores detalhes o mecanismo de ação de LonA sobre a mobilização de P3HB.

7 CONCLUSÃO

As conclusões deste trabalho estão apresentadas a seguir.

As linhagens de *Escherichia coli* avaliadas neste trabalho (XL1-Blue, LS5218 e MG1655) tiveram sua capacidade de síntese de P3HB aumentada quando o gene *lonA* está presente, em comparação com as respectivas cepas controle que não expressam esse gene, sustentando a hipótese de que LonA é requerido para atingir maiores taxas de produção desse biopolímero nas mesmas. Contudo, esta protease parece ter um efeito pleotrópico neste metabolismo, favorecendo de forma indireta o acúmulo de P3HB.

Dentre as cepas de *E. coli* avaliadas em cultivos em agitadores rotativos, as linhagens XL1-Blue e MG1655 foram as que apresentaram maiores teores de acúmulo de P3HB intracelular, entretanto o papel de LonA na síntese do biopolímero se mostrou mais evidente na linhagem XL1-Blue, quando comparado a linhagem controle.

Os primeiros experimentos com a linhagem de *E. coli* XL1-Blue em biorreatores demonstraram que esta cepa apresenta dificuldades em crescer em meio mínimo, sendo necessário a adição de extrato de levedura ao cultivo. Além disso, é preciso adicionar cloreto de sódio ao meio de cultura, para que o crescimento celular seja efetivamente observado.

Os testes em agitadores rotativos sugerem que a concentração de 4,0 g/L de NaCl ao meio de cultura é a que melhor favorece a formação de biomassa, bem como o acúmulo de P3HB, nas células de *E. coli* XL1-Blue.

A expressão de LonA na linhagem de *E. coli* XL1-Blue pJM9131 ocasiona um atraso no crescimento celular desta cepa nas primeiras horas do cultivo, quando comparado à formação de biomassa da cepa controle, tanto em cultivos em agitadores rotativos, como em biorreatores. Entretanto, após 20 horas de cultivo em biorreatores, este cenário se inverte e a linhagem com a presença de LonA aumenta sua produção celular em relação à linhagem controle. Estes dados indicam que LonA leva a uma alteração no metabolismo geral da célula, de modo a favorecer tanto a síntese de P3HB, como a formação de biomassa celular, em relação à linhagem controle.

As cepas avaliadas de *E. coli* XL1-Blue em biorreatores produzem altas concentrações de ácido acético até cerca de 38 horas de cultivos, o que dever ser um inibidor para o crescimento celular. Contudo, nas fases finais de cultivo, quando a concentração de glicose se torna limitante no meio, este subproduto passa ser consumido pela célula, atuando como fonte de carbono alternativa para as células.

A análise dos percentuais de carbonos recuperados na formação dos respectivos produtos metabólicos, sugere que a presença de LonA faça com que mais carbono seja desviado

para a produção de P3HB e formação de biomassa celular, do que para a respiração, demonstrando clara alteração na distribuição de fluxos metabólicos quando esse gene é expresso, em relação ao controle. Estes dados sustentam a hipótese de que LonA desempenha um papel pleotrópico na síntese deste biopolímero.

A expressão isolada da i-P3HB despolimerase PhaZa1, de *R. eutropha*, em linhagens recombinantes de *E. coli* não resulta em mobilização expressiva de P3HB. Entretanto as taxas de mobilização de P3HB nestes recombinantes passam a ser evidentes quando há coexpressão de PhaZa1 e LonA ou PhaZa1 e PhaP1, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, a concomitante expressão de LonA e PhaZa1 resulta em taxas de mobilização de P3HB até 3 vezes maiores que a degradação do polímero na presença de PhaP1 e PhaZa1, em cultivos em agitador agitado.

A tiólise dos grânulos purificados de nP3HB, com conseqüente formação de 3HB-CoA, confirma que a degradação de P3HB ocorre na presença concomitante de PhaP1 e PhaZa1 ou LonA e PhaZa1, sendo mais expressivas neste último caso.

Embora seja evidente que LonA desempenhe um papel chave para que a mobilização de P3HB em *E. coli* recombinante ocorra, está proteína parece não estar associada ao grânulo, uma vez que a tiólise dos grânulos só pode ser detectada quando foi adicionado à mistura extrato celular contendo LonA, e não quando havia apenas os grânulos purificados.

Não há uma ligação direta entre as proteínas LonA e PhaC ou LonA e PhaZa1, pelo menos não estável o suficiente para serem copurificadas por cromatografia de afinidade e cromatografia de exclusão molecular.

8 REFERÊNCIAS*

- ABE, T.; KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Properties of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase with high specific activity (PhaZd) in *Wautersia eutropha* H16. *J. Bacteriol.*, v. 187, p. 6982-6990, 2005.
- ABE, H.; DOI, Y.; FUKUSHIMA, T.; EYA, H. Biosynthesis from gluconate of a random copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates by *Pseudomonas* sp. 61-3. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 16, n. 3, p. 115–119, 1994.
- ADAYA, L.; GUZMÁN, J.; MORENO, S.; MILLÁN, M.; CARLOS, P.; GUADELUPE, E.; SEGURA, D. Characterization of the PHB depolymerase Avin03910, the main responsible for PHB mobilization in *Azotobacter vinelandii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOPOLYMERS 2013, 2013. Lisboa. Book os Abstract. Lisboa: Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa, 2013, 161 f.
- ADAYA, L.; MILLÁN, M.; PENA, C.; JENDROSSEK, D.; ESPÍN, G.; TINOCO-VALÊNCIA, R.; GUZMÁN, J.; PFEIFER, D.; SEGURA, D. Inactivation of intracelular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniforme high molecular mass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 102, p. 2693-2707, 2018.
- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, v. 85, p. 732-743, 2010.
- ALDOR, L.; KEASLING, J. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 14, p. 475-483, 2003.
- AL-SALEM, S. M.; ANTELAVA, A.; CONSTANTINO, A.; MANOS, G.; DUTTA, A. A review on thermal and catalytic pyrolysis of plastic solid waste (PSW). *J. of Environm. Mannag*, v. 197, p; 177-198, 2017.
- ALEXANDRINO, P. M. R.; MENDONÇA, T. T.; GUAMÁN-BAUTISTA, L. P.; CHERIX, J.; LOZANO-SAKALOUSKAS, G. C.; et al. Draft Genome Sequence of the Polyhydroxyalkanoate-Producing Bacterium *Burkholderia sacchari* LMG 19450 Isolated from Brazilian Sugarcane Plantation Soil. *Genome Announcem.* v. 3, p. 13-15, 2015.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.*, v. 54, p. 450-472, 1990.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G.; SMITH, J.; STRUHL, K. *Current protocols in molecular biology*. New York: John Wiley & Sons, 1992.
- AZAMI, N. A.; WIRJON, I. A.; KANUSAMY, S.; TEH, A. H.; ABDULLAH, A. A. A. Enhanced degradations of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by newly isolated *Burkholdeia cepacian* DP1 with high depolymerase activity. *Biotech.*, v. 7, n. 1, p. 75-85, 2017.
- BACHMANN, B.; SEEBACH, D. Investigaytion of the enzymatic cleavage of olig(3-hydroxybutanoates) containing two to eight HB units. A model for the stereoselectivity of PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1. *Macromolec.*, v. 32, p. 1777-1784, 1999.

BHATIA, S. K.; SHIM, Y. H.; JEON, J. M.; BRIGHAM, C. J.; KIM, Y. H.; KIM, H. J.; SEO, H. M.; LEE, J. H.; KIM, J. H.; YI, D. H.; LEE, Y. K.; LEE, Y. H. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosyst Eng.*, v. 38, n. 8, p. 1479-1484, 2015.

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

BOCANEGRA, J. K.; PADRELLA, J. G. C.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K.; GOMEZ, J. G. C. Influence of pH on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyric acid (P3HB) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 170, p-1336–1347, 2013.

BOTOS, I.; MELNIKOV, E. E.; CHERRY, S.; TROPEA, J. E.; KHALATOVA, A. G.; RASULOVA, F.; DAUTER, Z.; MAURIZI, M. R.; ROTANOVA, T. V.; WLODAWER, A.; GUSTCHINA, A. The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 8140-8148, 2004.

BOYANDIN, A. N.; PRUDNIKOVA, S. V.; KARPOV, V. A.; IVONIN V. N.; ĐÔ, N. L.; NGUYÊN, T. H.; GITENLSON, II. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *Int. Biodet. Biodegrad.*, v. 83, p. 77-84, 2012.

BRÄMER, C.O.; SILVA, L.F., GOMEZ, J.G.C.; VANDAMME, P.; STEINBÜCHEL, A. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate- accumulating bacterium isolated from soil of a sugar cane plantation in Brazil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, p. 1709- 1713, 2001.

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

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

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

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

BRESSAN, S.; SZNAJDER, A.; WALDERMAR, H.; FORCHHAMMER, K.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scient. Repor.*, v.6, n. 26612, 2016.

BRIESE, B. H.; JENDROSSEK, D.; SCHLEGEL, H. G. Degradations of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage sludge. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 117, p. 107-111, 1994.

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

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

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2009.

CAI, L.; WANG, J.; PENG, J.; WU, Z.; TAN, X. Observation of the degradation of three types of plastic pellets exposed to UV irradiation in three different environments. *Sci. of the Tot. Environm.* v. 628–629, p. 740–747, 2018.

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

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

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

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

CHOUMAN, K. *Produção de polímeros biodegradáveis por Escherichia coli recombinante a partir de açúcares do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar*. 2012. 113 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

CHOWDHURY, A. A. Poly-beta-hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. *Arch. Mikrobiol.*, v. 47, p. 167-200, 1963.

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

CHUNG, H.; YANG, J. E.; HA, J. Y.; CHAE, T. U.; SHIN, J. H.; GUSTAVSSON, M.; LEE, S. Y. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganisms. *Curr. Opin. in Biotech.*, v. 36, p. 73–84, 2015.

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

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

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

DELAFIELD, F. D.; DOUDOROFF, M.; PALLERONI, N. J.; LUSTY, C. J.; CONTOPOULOS, R. Decomposition of poly- β -hydroxybutyrate by pseudomonads. *J. Bacteriol.*, v. 90, p. 1455-1466, 1965.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 55, p. 165-169, 1990.

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

EGGERS, J.; STEINBÜCHEL, A. Impact of *Ralstonia eutropha*'s poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerases and phasins on PHB storage in recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environm. Microbiol.* v. 80, n. 24, p. 7702-7709, 2014.

ELHADI, D.; LV, L.; JIANG, X. R.; WU, H.; CHEN, G. Q. CRISPRi engineering *E. coli* for morphology diversification. *Metabol. Eng.*, v. 38, p. 358-369, 2016.

ERIKSEN, M.; LEBRETON, L. C.; CARSON, H. S.; THIEL, M.; MOORE, C. J.; BORERRO J. C.; GALGANI, F.; Ryan, P. G.; REISSER, J. Plastic pollution in the world's oceans: more than 5 trillion plastic pieces weighing over 250,000 tons afloat at sea. *PLoS One* 9, 111913, 2014.

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

FRIEHS, K. Plasmid copy number and plasmid stability. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, v. 86, p. 47-82, 2004.

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

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

GANESH, M.; SENTHAMARAI, A.; SHANMIGHAPRIYA, S.; NATARAJASEENIVASAN, K. Effective production of low crystallinity Poly(3-

hydroxybutyrate) by recombinant *E. coli* strain JM109 using crude glycerol as sole carbon source. *Bioresour. Technol.*, v. 192, p. 677-681, 2015.

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

GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Assay of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase activity and product determination. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 6094-6100, 2006.

GEWERT, B.; PLASSMANN, M. M.; MACLEOD, M. Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts* v. 17, p. 1513–1521, 2015.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made *Sci. Adv.* v. 3, n. 7, p. 700-782, 2017.

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

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

GOMEZ, J. G. C.; MÉNDEZ, B. S.; NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; PRIETO, M. A.; SILVA, L. F. Making Green Polymers Even Greener: Towards Sustainable Production of Polyhydroxyalkanoates from Agroindustrial By-products. In: Petre, M. (Org.). *Adv. in Appl. Biotech.*. InTech Open Access Publisher, v. 1. p. 41–62, 2012.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLUI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 45, p. 785-791, 1996.

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

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

GUYER, M.S.; R.E. REED, T.; STEITZ, K.B. Identification of a sex-factor-affinity site in *E. coli* as gamma delta. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 45, p. 135-140, 1981.

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

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

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

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

HENLOCK, M.; zu CASTELL-RÜDENHAUSEN, M.; WAHLSTRÖM, M.; KJAER, B.; MILIOS, L.; VEA, E.; WATSON, D.; HANSEN, O. J.; FRANE, A.; STENMARK, A.; TEKIR, H. Economic Policy Instruments for Plastic Waste – A review with Nordic perspectives. Nordic Council of Ministers, *Tema. Nord.* p. 569, 2014.

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

HIROE, A.; HYAKUTAKE, M.; THOMSON, N.M.; SIVANIAH, E.; TSUGE, T. Endogenous ethanol affects biopolyester molecular weight in recombinant *Escherichia coli*. *ACS Chem. Biol.*, v. 8, n. 11, p. 2568-2576, 2013.

HO, W.; WEGEN, R.; CHOI, J.; LEE, S.; MIDDELBERG, A. Metabolic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 9, p. 593-603, 1999.

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

IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F. Biotechnologically Produced Biodegradable Polyesters. In *Handbook of Biodegradable Polymers: Isolation, Synthesis, Characterization and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2011.

IVLEVA, N. P.; WIESHEU, A. C.; NIESSNER R. Microplastic in aquatic ecosystems. *Angew. Chem. Int. Ed.* v. 56, n. 7, p. 1720-1739, 2017.

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

JAMBECK, J.; GEYER, R.; WILCOX, C.; SIEGLER, T. R.; PERRYMAN, M.; ANDRADY, A. L.; NARAYAN, R.; LAW, K. L. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* v. 347, p. 768–771, 2015.

JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 74, p. 1186-1196, 2007.

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

JENDROSSEK, D.; FRISSE, A.; BEHREND, A.; ANDERMANN, M.; KRATZIN H. D.; STANISLAWSKI, T.; SCHLEGEL, H. G. Biochemical and molecular characterization of the

Pseudomonas lemoignei polyhydroxyalkanoate depolymerase system. *J. Bacteriol.*, v. 177, n. 3, p. 596-607, 1995.

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

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

JENDROSSEK, D.; KNOBE, I.; HABIBIAN, R. B.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purifications of a novel PHA depolymerase from *Comamonas* sp. *J. Environ. Polym. Degrad.*, v. 1, p. 53-63, 1993.

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

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

JIAN, J. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 87, n. 6, p. 2247-2256, 2010.

JOSSEK, R.; REICHEL, R.; STEINBÜCHEL, A. *In vitro* biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using purified poly(hydroxyalkanoic acid) synthase of *Chromatium vinosum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 49, p. 258–266, 1998.

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

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

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.

KIM, J.; KIM Y. J.; CHOI, S. Y.; LEE, S. Y.; KIM K. J. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnology Journal*, v. 1600648, p. 1–23, 2016a.

KIM, Y.J.; CHOI, S. Y.; KIM, J.; JIN, K. S.; LEE, S. Y.; KIM, K. J. Structure and function of the N-terminal domain of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase, and the proposed structure and mechanisms of the whole enzyme. *Biotechnology Journal*, v. 1600649, p. 1–23, 2016b.

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

KOBAYASHI, T.; SAITO, T. Catalytic triad of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase (PhaZ1) in *Ralstonia eutropha* H16. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 96, n. 5, p. 487-492, 2003.

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

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

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

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

LAN, L.; DENG, X.; XIAO, Y.; ZHOU, J. M.; TANG, X. Mutation of Lon protease differentially affects the expression of *Pseudomonas syringae* type III secretion system genes in rich and minimal media and reduces pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.*, v. 20, p. 682-696, 2007.

LAU, N. S.; CHEE, J. Y.; TSUGE, T.; SUDESH, K. Biosynthesis and mobilization of a novel polyhydroxyalkanoate containing 3-hydroxy-4-methylvalerate monomer produced by *Burkholderia* sp. USM (JCM15050), *Bioresour. Technol.*, v.101 ,p. 7916-7923, 2010.

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

LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 49, p. 1-14, 1996b.

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

LEE, M. C.; LIU, H.; YANH, C. H.; HSIAO, L. J.; WU, T. M.; LI, S. Y. Co-expression of ORFCma with PHB depolymerase (PhaZCma) in *Escherichia coli* induces efficient whole-cell biodegradation of polyesters. *Biotechnol. J.*, v. 13, n. 4, 2018.

LEE, S. Y.; YIM, K. S.; CHANG, H.N.; CHANG, Y. K. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* v.32, n. 2, p. 203-211, 1994.

LI J.; LIU, H.; CHEN, P. Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water Resea.* v. 137, p. 362-374, 2018.

LI, D.; LV, L.; CHEN, G.Q. Controlling microbial PHB synthesis via CRISPRi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 101, n. 14, p. 5861-5867, 2017.

LI, T.; YE, J.; SHEN, R.; ZONG, Y.; ZHAO, X.; LOU, C.; CHEN, G.Q. Semirational Approach for Ultrahigh Poly(3-hydroxybutyrate) Accumulation in *Escherichia coli* by Combining One-Step Library Construction and High-Throughput Screening. *ACS Synth. Biol.*, 2016.

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

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

LIU, Y.; DE SCHRYVER, P.; VAN DELSEN, B.; MAIGNIEN, L.; BOON, N.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOSSIER, P.; DEFOIRDT, T. PHB-degrading bacteria isolated from the gastrointestinal tract of aquatic animals as protective actors against luminescent vibriosis. *FEMS Microbiol. Ecol.*, v. 74, p. 196-204, 2010.

LÓPEZ, N. I.; PETTINARI, M. J.; NÍKEL, P. I.; MÉNDEZ, B. S. Polyhydroxyalkanoates: Much More than Biodegradable Plastics. *Appl. Microbiol.*, v. 93, p.73-106, 2015.

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

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

MA, H. K.; LIU, M. M. ; LI, S. Y.; WU, Q.; CHENA, J. C.; CHEN, G. Q. Application of polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis regulatory protein PhaR as a bio-surfactant and bactericidal agent. *J. Biotechnol.*, v. 166, p. 34– 41, 2013.

MAEHARA, A. Y.; DOI, T.; NISHIYAMA, Y.; TAKAGI, S.; UEDA, H.; NAKANO; YAMANE, T. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acid-producing bacteria, is a DNA- binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression *in vitro*. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 200, p. 9–15, 2001.

MAEHARA, A.; TAGUCHI, S.; NISHIYAMA, T.; YAMANE, T.; DOI, Y. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *J. Bacteriol.*, v. 184, p. 3992–4002, 2002.

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

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

MARTÍNEZ, V.; PEÑA, F.; GARCÍA-HIDALGO, J.; MATA, I.; GARCÍA, J. L.; PRIETO, M. A. Identification and biochemical evidence of a medium-chain-length

polyhydroxyalkanoate depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* predatory hydrolytic arsenal. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, n. 17, p. 6017-6026, 2012.

MARTÍNEZ-GARCÍA, E.; APARICIO, T.; DE LORENZO, V., NIKEL, P. I. New transposon tools tailored for metabolic engineering of gram-negative microbial cell factories. *Front. Bioeng. Biotechnol.* v. 2, p-46, 2014.

MATSUMOTO, K.; TANAKA, Y.; WATANABE, T.; MOTOHASHI, R.; IKEDA, K.; TOBITANI, K.; YAO, M.; TANAKA, I.; TAGUCHI, S. Directed evolution and structural analysis of NADPH-dependent Acetoacetyl Coenzyme A (Acetoacetyl-CoA) reductase from *Ralstonia eutropha* reveals two mutations responsible for enhanced kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 79, n. 19, p. 6134-6139, 2013.

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

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

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

MENDONÇA, T. T.; GOMEZ, J. G. C.; BUFFONI, E.; SÁNCHEZ-RODRIGUEZ, R. J.; SCHRIPEMA J.; LOPES, M. S., SILVA, L. F. Exploring the potential of *Burkholderia sacchari* to produce polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, v. 116, p. 815-829, 2013.

MERGAERT, J.; WEBB, A.; ANDERSON, C.; WOUTERS, A.; SWINGS, J. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 59, p. 3233-3238, 1993.

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

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

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

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

MOORE, C. J. Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* v. 108, p. 131-139, 2008.

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

NOMURA, C.T.; TAGUCHI, S. PHA synthase engineering toward superbio-catalysts for custom-made biopolymers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 73, p. 969–979, 2007.

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

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol.* V.157, p. 2795-2807, 2011.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in Gram-negative bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 79, p. 2989-2999, 2013.

PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 80, p. 555-563, 2014.

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

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

PLASTIC EUROPE, 2017. Plastics – the Facts 2016. An analysis of European plastics production, demand and waste data. *PlasticsEurope – Association of Plastics Manufacturers*. Brussels, 2017.

PLASTICS RECYCLES EUROPE, 2016. 20 years later & the way forward. Making more from plastics waste. *Plastics Recyclers Europe*. Brussels, 2016.

PLASTIVIDA, 2012. Disponível em: http://www.plastivida.org.br/images/temas/Apresentacao_IRMP_2012.pdf Acessado em: 08 de maio de 2018

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

PÖTTER, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBÜCHEL, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol.*, v. 148, p. 2413-2426, 2002.

PÖTTER, M.; MULLER, H.; REINECK, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B.; STEINBÜCHEL, A. The complex structure of polyhydroxybutyrate

(PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiol. v.*, 150, p.2301-2311, 2004.

PÖTTER, M.; MULLER, H.; STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiol.*, v. 151, p. 825-833, 2005.

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

PRIETO, M. A.; EUGENIO, L. I.; ESCAPA, V. M.; GALÁN, B.; GARCIA, J. L. The turnover of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* KT2442 and the fundamental role of PhaZ depolymerise for the metabolic balance. *Environ. Microbiol.*, v. 12, n. 1, p. 207-221, 2010.

Qi, Q.; Rehm, B. H.; Steinbüchel, A. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene phaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 157, p. 155–162, 1997.

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

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

REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: the key enzymes of PHA synthesis. **Biopolymers Online**, v. 1, p. 173–180, 2005.

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

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

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

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

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

RODRIGUES, M. F. A.; SILVA, L. F., GOMEZ, J. G. C.; VALENTIN, H. E., STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxy-4-pentenoic acid) from unrelated substrates by *Burkholderia* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 43, p. 880-86, 1995.

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

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

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

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

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

SANTOS, M.; GANGOITI, J.; KEUL H.; MÖLLER, M.; SERRA, J. L., LLAMA, M. J. Polyester hydrolytic and synthetic activity catalyzed by the medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoate) depolymerase from *Streptomyces venezuelae* S01. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 97, n. 1, p. 211-222, 2013.

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

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

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

SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis *operon*: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter. *J. Bacteriol.*, v. 173, p. 168-175, 1991.

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

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

SHOGREN, J.; TAYLOR, L. On behavioral-environmental economics. *Rev. Environ. Econ. Policy* v. 2, p. 26-44, 2008.

SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 Poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* v. 170, p. 4431-4436, 1988.

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

SOLAIMAN D.K.Y; ASHBY R.D. Genetic characterization of the poly(hydroxyalkanoate) synthases of various *Pseudomonas oleovorans* strains. *Curr. Microbiol.*, v. 50, p. 329-333, 2005.

SPRATT, S.; GINSBURGH, C.; NUNN, W. Isolation and genetic characterization of *Escherichia coli* mutant defective in propionate metabolism. *J. Bacteriol.*, v. 146, p. 1166-1169, 1981.

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

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

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

STUDIER, F. W.; MOFFAT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* v. 189, p. 113-130, 1986.

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

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

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

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

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

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. Biochemical characterization of a new type of intracellular PHB depolymerase from *Rhodospirillum rubrum* with high hydrolytic activity on native PHB granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 89, n. 5, p. 1487-1495, 2011.

SZNAJDER, A.; JENDROSSEK, D. To be or not to be a poly(3-Hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase: PhaZd1 (PhaZ6) and PhaZd2 (PhaZ7) of *Ralstonia eutropha*, highly active PHB depolymerases with no detectable role in mobilization of accumulated PHB. *Appl. and Environm. Microb.*, v.80, n. 16, p. 4936-4946, 2014.

SZNAJDER, A.; PFEIFFER, D.; JENDROSSEK, D. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (PHB) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl. Environ. Microbiol.*, v, 81, p. 1847-1858, 2015.

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

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

TANIO, T.; FUKUI, T.; SHIRAKURA, Y.; SAITO, T.; TOMITA, K.; KAIHO, K.; MASAMUNE, S. An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *Eur. J. Biochem.*, v. 124, p. 71-77, 1982.

THOMPSON, R. C.; MORRE, C. J.; vom SAALI F. S.; SWAN, S. H. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, v. 364, p. 2153-2166, 2009.

THOMSON, N. M.; SAIKA, A.; USHIMARU, K.; SANGIAMBUT, S.; TSUGE, T.; SUMMERS, D. K.; SIVANIAH, E. Efficient production of active polyhydroxyalkanoate synthase in *Escherichia coli* by coexpression of molecular chaperones. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 79, p. 1948-1955, 2013.

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

UCHINO, K.; SAITO, T. Thiolysis of poly(3-hydroxybutyrate) with polyhydroxyalkanoate synthase from *R. eutropha*. *J. Biochem.*, v. 139, p. 615-621, 2006.

UCHINO, K.; SAITO, T.; GEBAUER, B.; JENDROSSEK, D. Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.*, v. 189, n. 22, p. 8250-8256, 2007.

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

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

USHIMARU, K.; MOTODA, Y.; NUMATA K.; TSUGE, T. Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 9, p. 2867-2873, 2014.

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

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

VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of multi-component polyhydroxyalkanoates by the bacterium *Wautersia eutropha*. *Macromolec. Symp.*, v. 269, n. 1, p. 1-7, 2008.

WANG, J.; TAN, Z.; PENG, J.; QIU, Q.; Li, M. The behaviors of microplastics in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* v. 113, p. 7-17, 2016.

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

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

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBÜCHEL, A.; MAYER, F. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* v. 177, p-2425-2435, 1995.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, v. 12, p 3-7, 1999.

WORLD ECONOMIC FORUM, 2016. The New Plastics Economy: Rethinking the future of plastics. *Industry Agenda* REF 080116. Geneva, Switzerland, 2016.

WU, H.; FAN, Z.; JIANG, X.; CHEN, J., CHEN, G.-Q. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing *E. coli*. *Microb. Cell Fact.* v. 15, p. 1-13, 2016.

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

YANG, N.; DING, S.; FEIFEI, C.; ZHANG, X.; XIA, Y.; et al. The Crc protein participates in down-regulation of the Lon gene to promote rhamnolipid production and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec. Microb.* 2015.

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

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxy- butyrate. *J. Bacteriol.*, v. 183, p. 2394–2397, 2001.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A1. Ensaio GLS01 e GLS02. Valores de concentrações de glicose (G), biomassa celular total (Xt).

Tempo (h)	G (g/L)		Xt (g/L)	
	GLS01	GLS02	GLS01	GLS02
0	5,85	5,56	0,06±0,05	0,06±0,00
2	5,61	5,52	0,10±0,04	0,10±0,00
4	5,34	5,40	0,14±0,01	0,11±0,01
6	5,33	5,48	0,13±0,01	0,07±0,01
9	5,31	5,37	0,18±0,02	0,10±0,01
15	4,86	4,96	0,24±0,02	0,11±0,01
18	4,56	5,13	0,29±0,01	0,33±0,04
23	6,10	5,51	0,27±0,02	0,12±0,02
26	4,23	5,06	0,25±0,05	0,12±0,01
28	5,84	6,79	0,19 ±0,01	0,11±0,04
30	7,41	8,48	0,15±0,05	0,11±0,02
43	7,75	8,84	0,11±0,01	0,15±0,03

Tabela A2. Ensaio GLS03 e GLS04. Valores de concentrações de glicose (G), biomassa celular total (Xt).

Tempo (h)	G (g/L)		Xt (g/L)	
	GLS03	GLS04	GLS03	GLS04
0	5,44	5,69	0,06±0,06	0,06±0,03
2	6,19	5,95	0,06±0,00	0,10±0,02
4	6,15	5,95	0,14±0,02	0,09±0,05
6	5,90	5,72	0,17±0,02	0,07±0,07
8	6,06	5,76	0,22±0,08	0,10±0,04
12	5,71	5,61	0,27±0,04	0,17±0,11
23	5,55	-	0,25±0,08	-
25	5,61	-	0,34±0,04	-
27	5,35	-	0,31±0,03	-
29	5,12	5,46	0,47±0,00	0,11±0,04
31	4,78	5,25	0,86±0,02	0,14±0,01
32	4,03	5,09	0,81±0,05	0,22±0,01
40	5,79	4,78	1,99±0,11	1,79±0,17
42	4,97	4,49	2,82±0,27	3,03±0,01
46	3,85	3,49	3,70±0,06	4,09±0,18

Tabela A3. Curva de crescimento em meio mineral contendo 1 g/L de extrato de levedura e 4 g/L de NaCl, em agitadores rotativos. Valores de densidade ótica (D.O. 600 nm). Linhagens *E. coli* XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5::*lonA* (LonA) e *E. coli* XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5 \emptyset (Controle).

Tempo (h)	LonA	Controle
0	0,77±0,04	1,02±0,06
1	0,87±0,08	1,16±0,13
2	0,98±0,02	1,31±0,09
3	1,04±0,02	1,64±0,07
4	1,07±0,05	1,93±0,04
5	1,23±0,02	2,27±0,12
6	1,46±0,10	2,61±0,05
7	1,63±0,15	2,77±0,15
8	1,77±0,18	2,91±0,17
9	1,88±0,08	2,97±0,18
10	2,13±0,10	3,39±0,30
11	2,29±0,11	3,79±0,34
12	2,69±0,08	4,12±0,38
13	3,00±0,06	4,32±0,42
14	3,39±0,06	4,81±0,26
15	4,07±0,40	5,25±0,13
16	4,59±0,29	5,50±0,26
17	4,65±0,29	5,74±0,25
18	4,80±0,22	5,78±0,28
19	4,89±0,25	5,88±0,26
20	5,07±0,15	5,93±0,23
21	5,39±0,06	6,26±0,23
22	5,92±0,02	6,27±0,13
23	6,01±0,07	6,27±0,11
24	6,09±0,14	6,33±0,15
25	6,13±0,16	6,33±0,12
26	6,24±0,21	6,27±0,13

Tabela A4. Ensaio GLS05 e GLS06. Valores de biomassa total (Xt), biomassa celular residual (Xr), produção de P3HB, glicose consumida e concentração de glicose no meio (G), consumo de nitrogênio e concentração de nitrogênio no meio (N) e produção de ácido acético (AA).

Tempo (h)	Xt (g)		Xr (g)		P3HB (g) (% de MSC)				G (g)		G (g/L)		N (g)		N (mg/L)		AA (g)	
	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06	GLS05	GLS06
0	0,45	0,28	0,30	0,21	0,10	0,06	32,54	20,57	0,00	0,00	4,92	4,96	0,00	0,00	276,20	253,89	0,05	0,08
2	0,42	0,41	0,32	0,31	0,11	0,09	27,42	21,27	0,00	0,00	4,72	4,88	0,02	0,00	263,82	253,40	0,62	0,55
4	0,42	0,46	0,33	0,39	0,12	0,08	26,19	16,37	0,00	0,00	4,62	4,57	0,07	0,01	251,71	252,91	0,78	1,10
6	0,43	0,59	0,35	0,48	0,12	0,12	29,79	19,51	0,11	0,90	4,61	4,54	0,09	0,03	243,26	252,42	0,92	1,15
8	0,44	0,78	0,37	0,61	0,12	0,11	24,36	13,85	0,25	1,45	4,57	4,32	0,08	0,03	241,22	251,92	1,25	1,32
10	0,44	0,84	0,44	0,73	0,14	0,11	18,95	13,40	0,46	1,96	4,51	4,29	0,07	0,03	256,62	251,43	1,49	1,52
12	0,86	0,87	0,66	0,88	0,14	0,11	11,03	13,10	0,70	2,25	4,41	4,18	0,09	0,04	258,53	250,94	1,88	1,79
14	1,19	1,28	0,99	1,15	0,14	0,11	9,40	8,85	1,04	2,88	4,18	3,72	0,10	0,07	254,65	243,10	2,22	2,05
16	1,69	1,64	1,50	1,50	0,16	0,14	9,51	8,71	1,67	3,79	3,68	3,11	0,16	0,10	229,39	232,07	2,80	2,44
18	2,23	1,91	1,85	1,75	0,22	0,22	10,79	11,41	2,90	5,10	3,14	2,60	0,24	0,13	183,29	205,05	3,39	3,05
20	2,74	2,02	2,13	1,71	0,54	0,31	19,72	15,30	5,12	7,15	3,41	3,05	0,30	0,16	180,48	222,40	4,25	3,78
22	3,25	2,04	2,41	1,74	0,87	0,31	25,71	15,04	6,69	9,10	3,54	3,68	0,35	0,18	188,05	230,28	4,67	4,35
24	3,76	2,27	2,69	1,76	1,13	0,37	29,20	16,42	8,21	8,20	2,70	3,42	0,38	0,20	171,70	228,51	5,05	4,84
26	4,37	2,37	2,97	1,80	1,35	0,39	31,04	16,62	10,21	8,49	1,76	3,06	0,44	0,23	160,65	220,69	5,50	5,19
28	4,62	2,70	3,25	2,30	1,45	0,41	30,90	15,26	12,01	9,27	0,99	2,61	0,48	0,27	148,37	206,00	5,95	5,59
30	4,86	3,14	3,37	2,80	1,55	0,49	32,20	15,53	13,97	10,35	0,40	2,08	0,51	0,33	134,87	175,30	6,24	6,07
32	5,10	3,55	3,54	3,30	1,64	0,47	31,41	13,21	16,26	11,26	0,09	1,45	0,54	0,40	120,14	139,22	6,58	6,45
34	5,28	4,29	3,74	3,80	1,65	0,58	31,16	13,63	18,92	12,78	0,09	0,73	0,61	0,50	104,19	97,77	6,91	6,86
36	5,90	4,72	4,33	4,30	1,65	0,54	26,46	11,44	20,74	15,01	0,08	0,08	0,68	0,59	87,01	50,96	7,25	7,05
38	6,53	5,57	4,93	4,80	1,68	0,67	25,94	12,09	22,81	17,93	0,07	0,06	0,76	0,70	68,61	1,44	7,59	7,02
40	7,15	6,31	5,52	5,30	1,81	0,74	26,21	11,67	25,14	20,37	0,05	0,02	0,87	0,76	48,98	0,76	7,66	6,90
42	7,77	6,78	6,12	5,79	1,90	0,90	23,85	13,30	28,07	23,12	0,04	0,03	0,99	0,86	28,13	0,73	7,22	6,61
44	8,52	7,57	6,72	6,29	1,91	1,12	22,34	14,83	32,24	27,20	0,03	0,07	1,12	0,95	0,91	1,07	6,75	5,99
47	10,20	8,82	7,61	7,04	2,35	1,61	23,54	18,29	39,00	33,66	0,02	0,23	1,26	1,10	0,85	0,70	6,00	5,15
50	11,18	9,26	8,88	7,43	2,36	1,76	21,96	19,84	45,64	39,90	0,02	0,26	1,40	1,26	0,76	0,73	5,26	4,30
54	12,86	9,93	9,69	7,95	2,88	2,00	21,76	19,99	54,75	48,60	0,00	0,27	1,59	1,46	0,81	0,77	4,36	3,45
58	14,14	10,83	10,50	8,47	3,41	2,24	21,59	20,13	63,78	57,30	0,01	0,53	1,77	1,65	0,84	0,75	3,51	2,80
68	17,34	13,08	12,54	9,77	4,73	2,85	28,55	22,13	86,25	78,62	0,01	0,61	2,24	2,13	1,10	0,93	1,58	1,38
72	18,62	13,97	13,35	10,29	5,26	3,09	27,95	22,01	95,22	87,12	0,01	0,48	2,43	2,33	1,21	1,05	0,98	0,71

ANEXO B

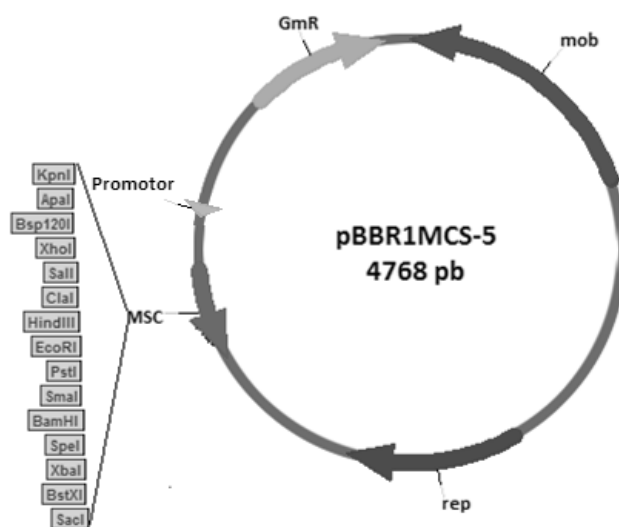


Figura B1 – Vetor de clonagem pBBR1MCS-5, com marca de resistência à gentamicina, indicando sítio de clonagem MCS. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo; MCS – sítio múltiplo de clonagem.

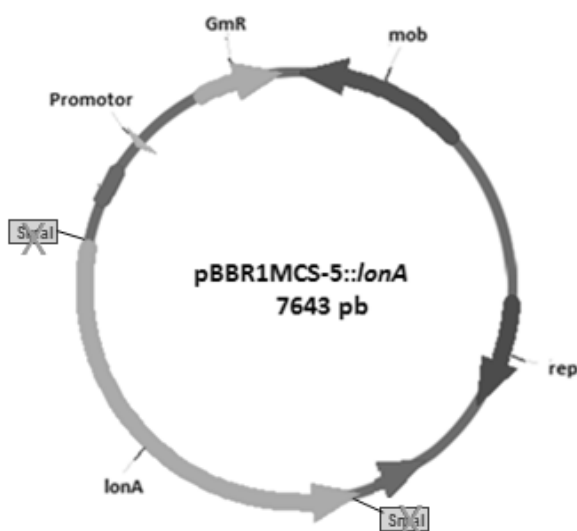


Figura B2 – Plasmídeo contendo o inserto de *lonA* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MCS, indicando o sítio de restrição *SmaI* interrompido. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

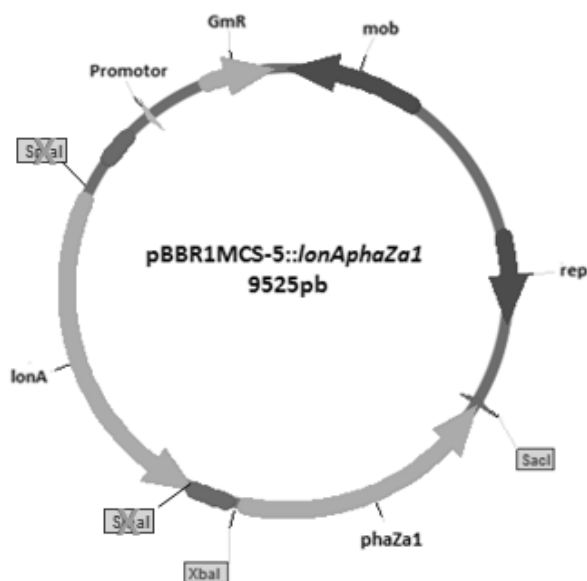


Figura B3 – Plasmídeo contendo os insertos de *lonA* e *phaZa1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MCS, indicando os sítios de restrição *XbaI* e *SacI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

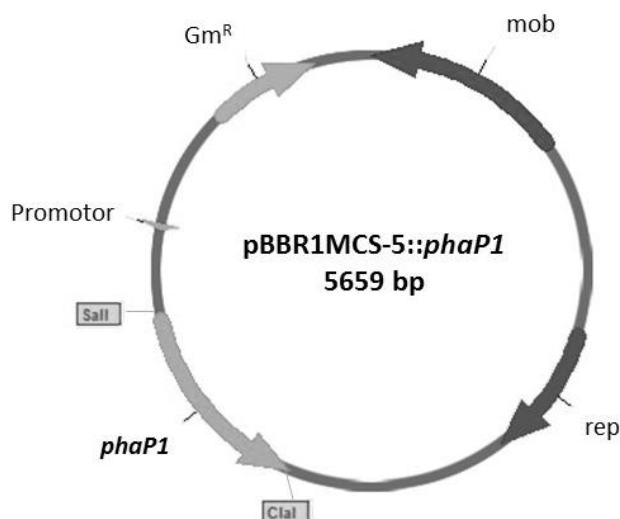


Figura B4 – Plasmídeo contendo o inserto de *phaP1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MSC, indicando os sítios de restrição *SalI* e *ClaI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

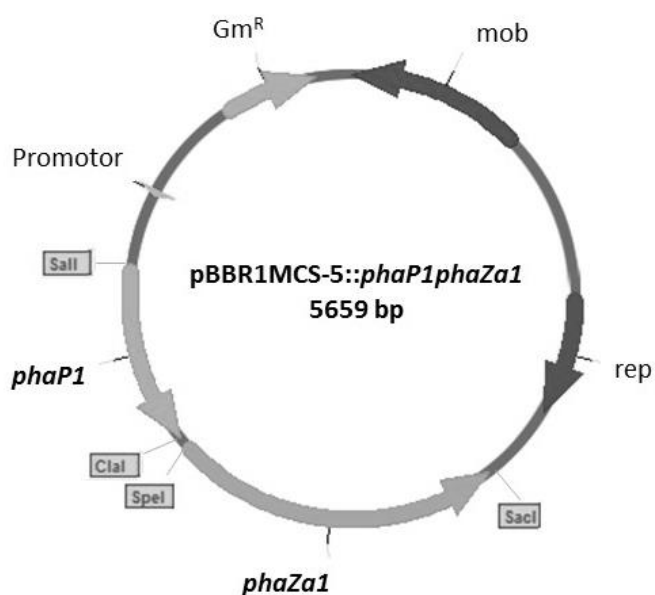


Figura B5 – Plasmídeo contendo os insertos de *phaP1* e *phaZa1* de *R. eutropha*, interrompendo o sítio de clonagem MSC, indicando os sítios de restrição *SalI* e *ClaI*, bem como *SpeI* e *SacI*. Gm^R – gene que codifica proteína que confere resistência à gentamicina; *mob* – gene que codifica proteína utilizada na mobilização do plasmídeo; *rep* – gene que codifica proteína envolvida na replicação do plasmídeo.

ANEXO C

Tabela C1. Ensaio de mobilização de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*. Valores de biomassa total (Xt), biomassa residual (Xr), teor de P3HB, mobilização de P3HB intracelular.

Linhagem	Tempo (h)	Xt (g/L)	Xr (g/L)	P3HB		Mobilização (%)
				(g/L)	(% de MSC)	
XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5 \emptyset	0	1,07 \pm 0,12	0,71 \pm 0,04	0,37 \pm 0,08	33,88 \pm 4,15	0,00
	3	1,09 \pm 0,08	0,69 \pm 0,08	0,40 \pm 0,06	36,58 \pm 4,91	0,00
	6	1,14 \pm 0,06	0,77 \pm 0,03	0,36 \pm 0,04	31,89 \pm 2,10	0,00
	24	1,12 \pm 0,02	0,75 \pm 0,02	0,36 \pm 0,01	32,59 \pm 1,08	0,00
	48	1,01 \pm 0,20	0,68 \pm 0,12	0,34 \pm 0,08	33,03 \pm 1,01	0,00
	72	1,07 \pm 0,05	0,71 \pm 0,02	0,36 \pm 0,05	33,70 \pm 3,02	0,00
XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5:: <i>lonA</i>	0	3,02 \pm 0,56	0,90 \pm 0,26	2,12 \pm 0,32	70,45 \pm 3,17	0,00
	3	3,05 \pm 0,12	0,82 \pm 0,03	2,22 \pm 0,10	73,01 \pm 0,77	0,00
	6	2,85 \pm 0,22	0,79 \pm 0,09	2,07 \pm 0,15	72,43 \pm 1,54	0,00
	24	2,83 \pm 0,39	0,72 \pm 0,16	2,11 \pm 0,24	74,82 \pm 1,94	0,00
	48	2,92 \pm 0,65	0,85 \pm 0,30	2,07 \pm 0,34	71,62 \pm 3,89	0,00
	72	2,79 \pm 0,63	0,76 \pm 0,19	2,02 \pm 0,45	72,67 \pm 2,61	0,00
XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5:: <i>phaZa1</i>	0	1,26 \pm 0,05	0,76 \pm 0,06	0,50 \pm 0,01	39,61 \pm 2,31	0,00
	3	1,19 \pm 0,06	0,69 \pm 0,04	0,50 \pm 0,08	42,12 \pm 4,73	0,00
	6	1,22 \pm 0,02	0,71 \pm 0,01	0,51 \pm 0,01	41,82 \pm 0,62	0,00
	24	1,19 \pm 0,09	0,68 \pm 0,05	0,51 \pm 0,08	42,88 \pm 4,25	0,00
	48	1,26 \pm 0,45	0,73 \pm 0,23	0,53 \pm 0,22	41,88 \pm 2,48	0,00
	72	1,15 \pm 0,03	0,64 \pm 0,03	0,51 \pm 0,04	44,08 \pm 2,97	0,00
XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5:: <i>lonA+phaZa1</i>	0	1,42 \pm 0,28	0,72 \pm 0,15	0,70 \pm 0,13	49,54 \pm 1,04	0,00 \pm 0,00
	3	1,42 \pm 0,31	0,87 \pm 0,20	0,55 \pm 0,11	38,70 \pm 0,81	22,33 \pm 2,01
	6	1,38 \pm 0,22	0,99 \pm 0,16	0,39 \pm 0,06	28,00 \pm 0,65	44,57 \pm 5,53
	24	1,30 \pm 0,23	0,94 \pm 0,17	0,36 \pm 0,06	27,80 \pm 0,80	48,33 \pm 4,30
	48	1,37 \pm 0,04	1,00 \pm 0,03	0,38 \pm 0,01	27,51 \pm 0,47	50,65 \pm 2,20
	72	1,28 \pm 0,17	0,94 \pm 0,13	0,34 \pm 0,04	26,82 \pm 0,69	50,75 \pm 3,31
XL1-Blue pJM9131 pBBR1MCS-5:: <i>phaP1</i>	0	4,63 \pm 0,10	0,85 \pm 0,16	3,77 \pm 0,07	81,57 \pm 3,09	0,00
	3	4,57 \pm 0,06	0,81 \pm 0,12	3,76 \pm 0,16	82,31 \pm 2,84	0,00
	6	4,56 \pm 0,04	0,77 \pm 0,03	3,79 \pm 0,01	83,20 \pm 0,48	0,00
	24	4,49 \pm 0,06	0,80 \pm 0,03	3,69 \pm 0,08	82,20 \pm 0,74	0,00
	48	4,41 \pm 0,18	0,61 \pm 0,14	3,80 \pm 0,06	86,14 \pm 2,61	0,00
	72	4,50 \pm 0,18	0,72 \pm 0,08	3,77 \pm 0,10	83,96 \pm 1,19	0,00

Tabela C1. Continuação

	0	2,97±0,71	1,00±0,20	1,97±0,53	66,02±3,24	0,00±0,00
XL1-Blue pJM9131	3	2,70±0,58	0,93±0,15	1,78±0,44	65,41±3,24	9,46±2,46
pBBR1MCS-	6	2,65±0,58	0,96±0,16	1,69±0,43	63,41±3,48	14,04±1,72
5:: <i>phaP1+phaZa1</i>	24	2,62±0,53	1,00±0,16	1,62±0,37	61,52±1,82	17,36±3,38
	48	2,79±0,42	1,14±0,05	1,65±0,37	58,57±4,77	15,89±4,17
	72	2,83±0,57	1,22±0,21	1,61±0,37	56,65±2,52	17,72±3,40

ANEXO D

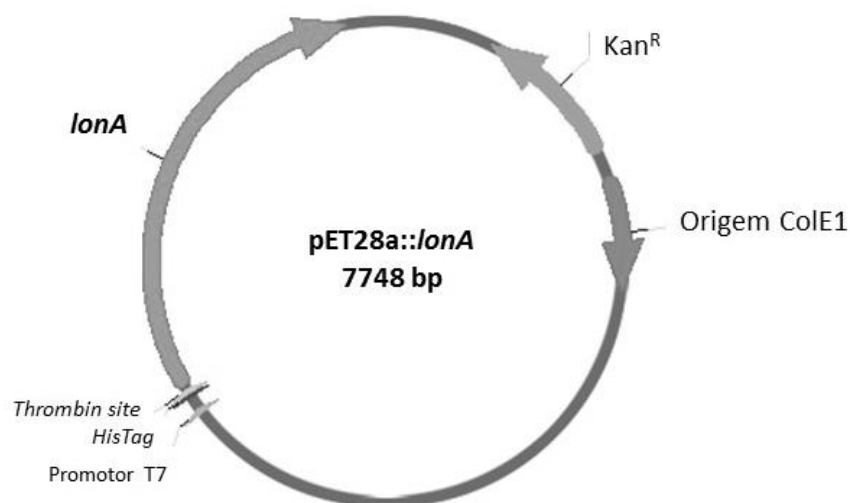


Figura D1 – Representação do plasmídeo construído pET28a::*lonA*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina.

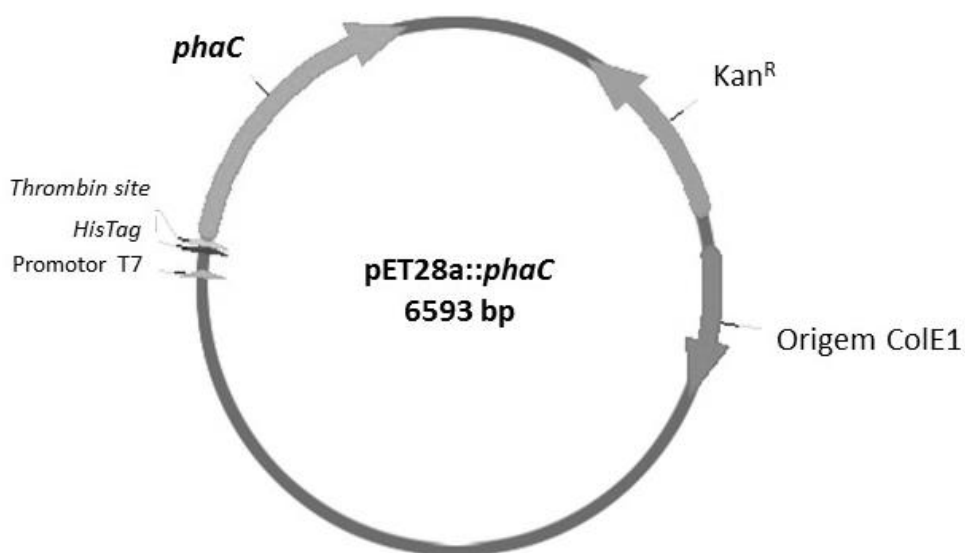


Figura D2 – Representação do plasmídeo construído pET28a::*phaC*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina.

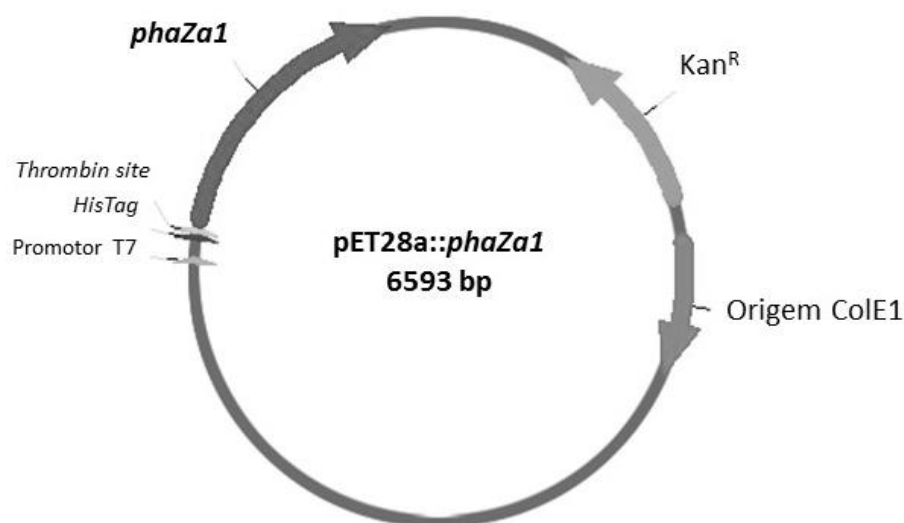


Figura D3 – Representação do plasmídeo construído pET28a::*phaZa1*. Kan^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida; *Thrombin site* – site de reconhecimento de trombina.

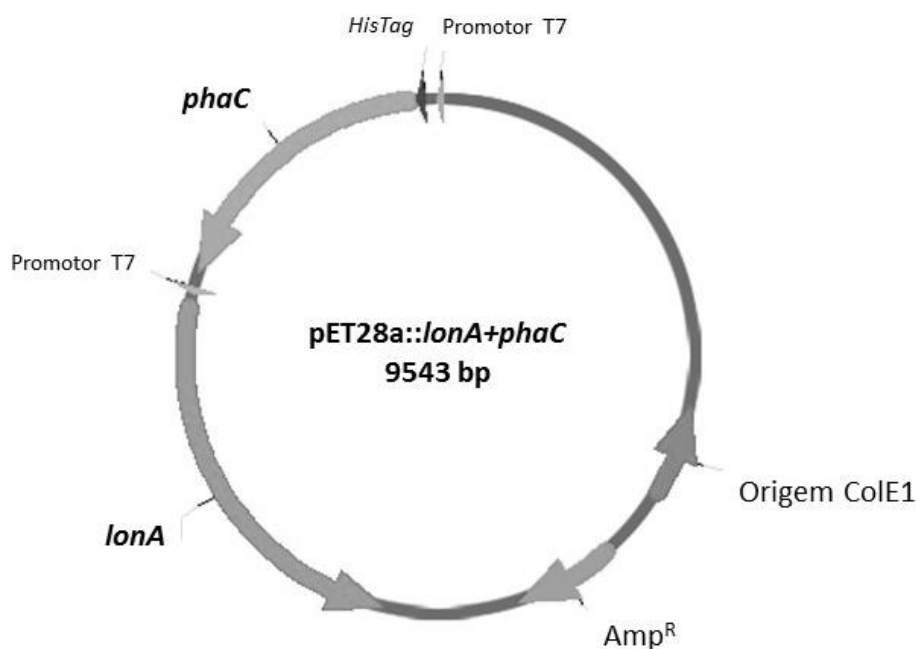


Figura D4 – Representação do plasmídeo construído pETDuet-1::*lonA+phaC*. Amp^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; *HisTag* – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida.

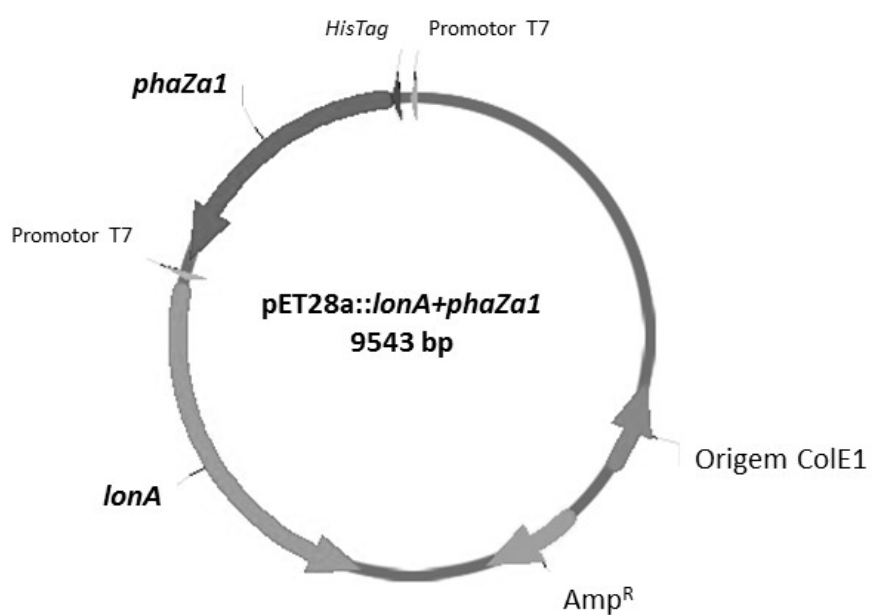


Figura D5 – Representação do plasmídeo construído pETDuet-1::lonA+phaZa1. Amp^R – gene que codifica proteína que confere resistência à canamicina; Origem ColE1 – origem de replicação; Promotor T7 – promotor dependente da RNA polimerase do fago T7; HisTag – sequência que codifica três Histidinas para posterior purificação da proteína híbrida.

ANEXO E

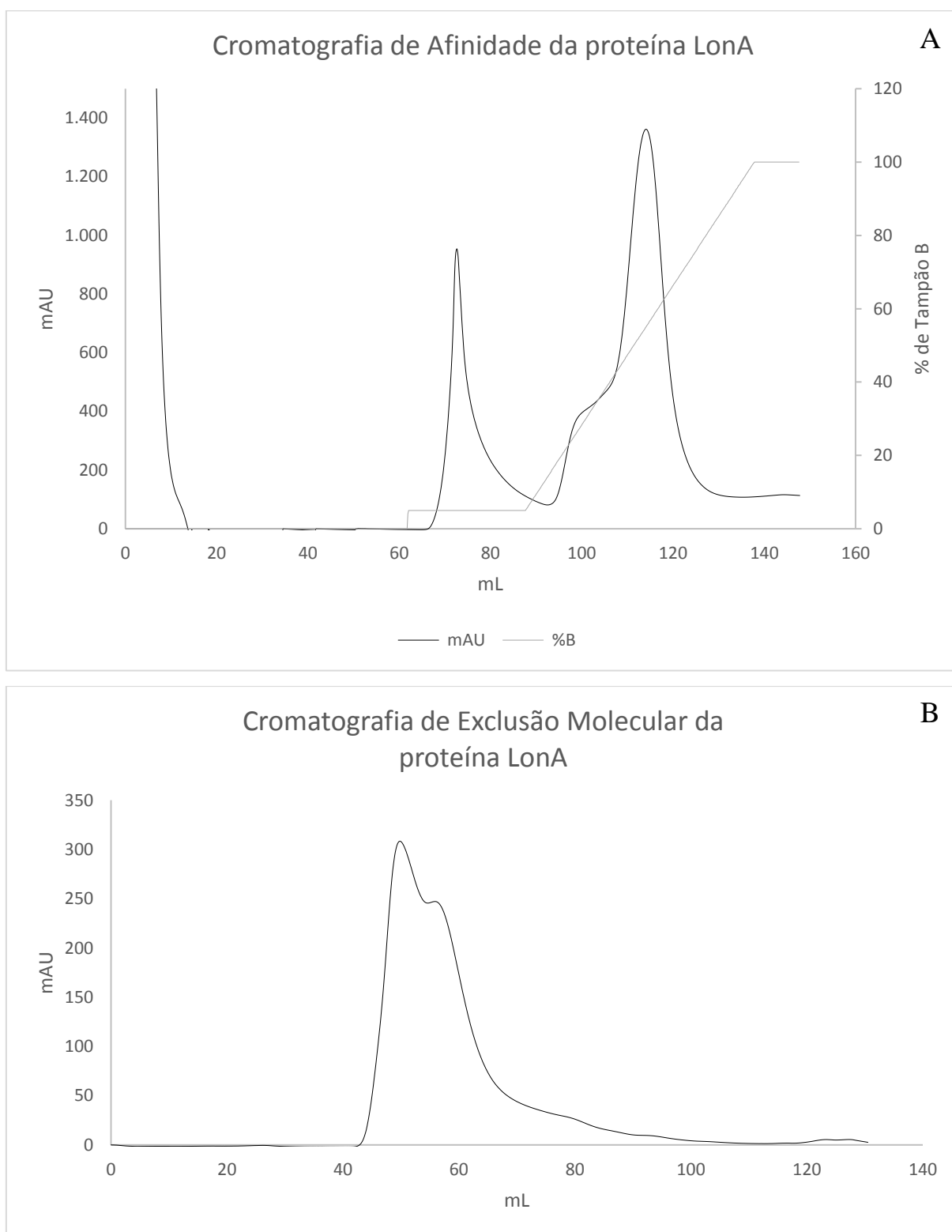
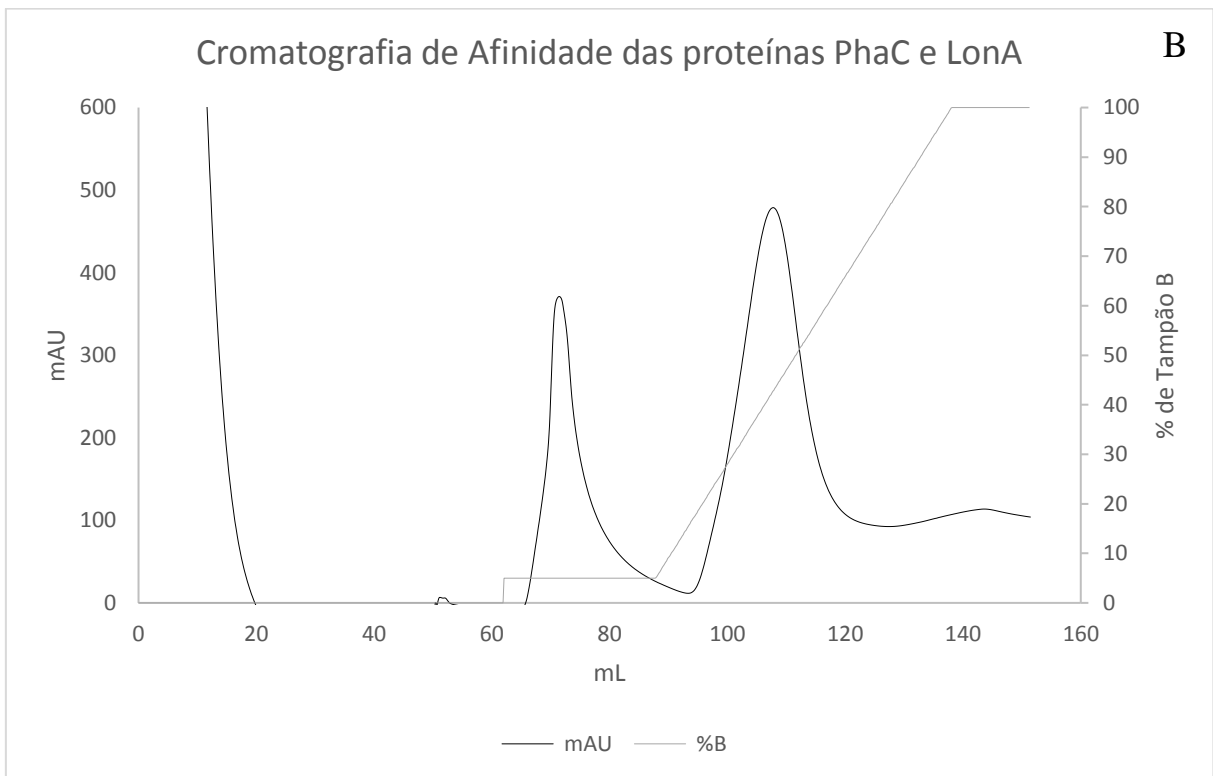
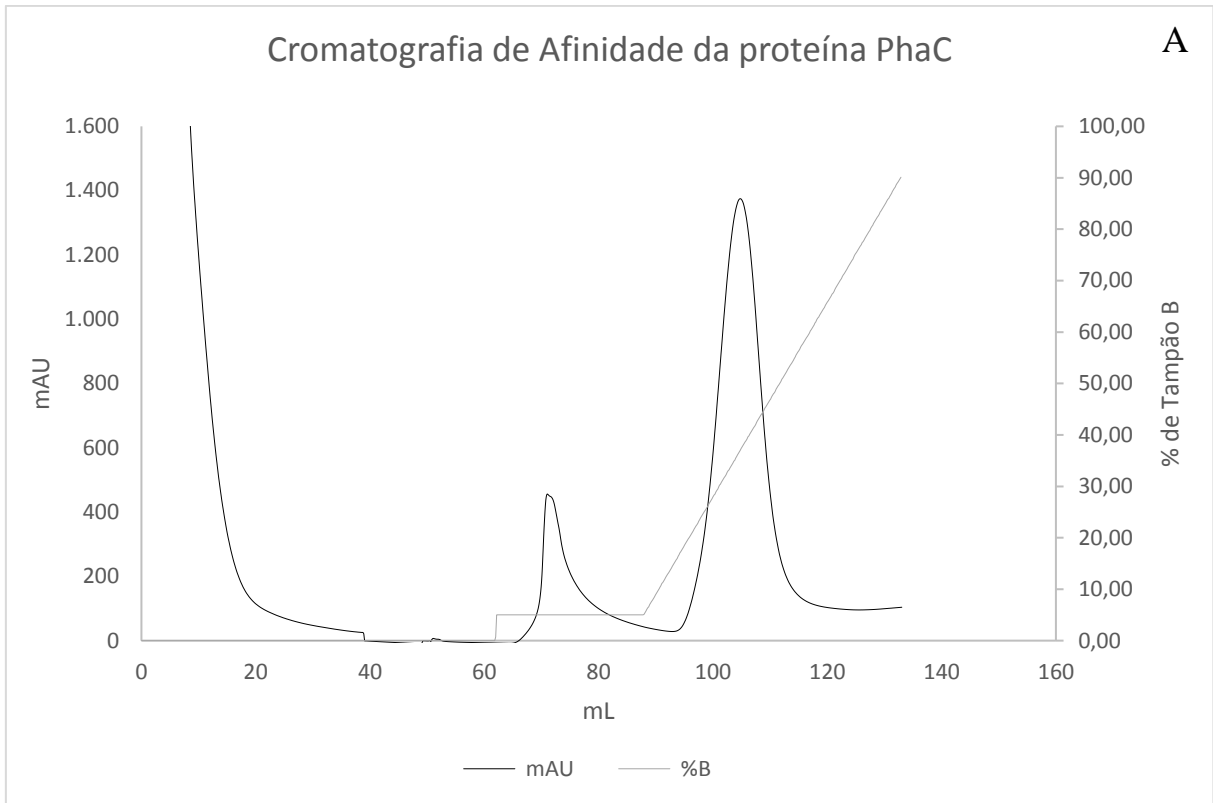


Figura E1 – A. Cromatografia de afinidade de LonA. B. Cromatografia de exclusão molecular de LonA.



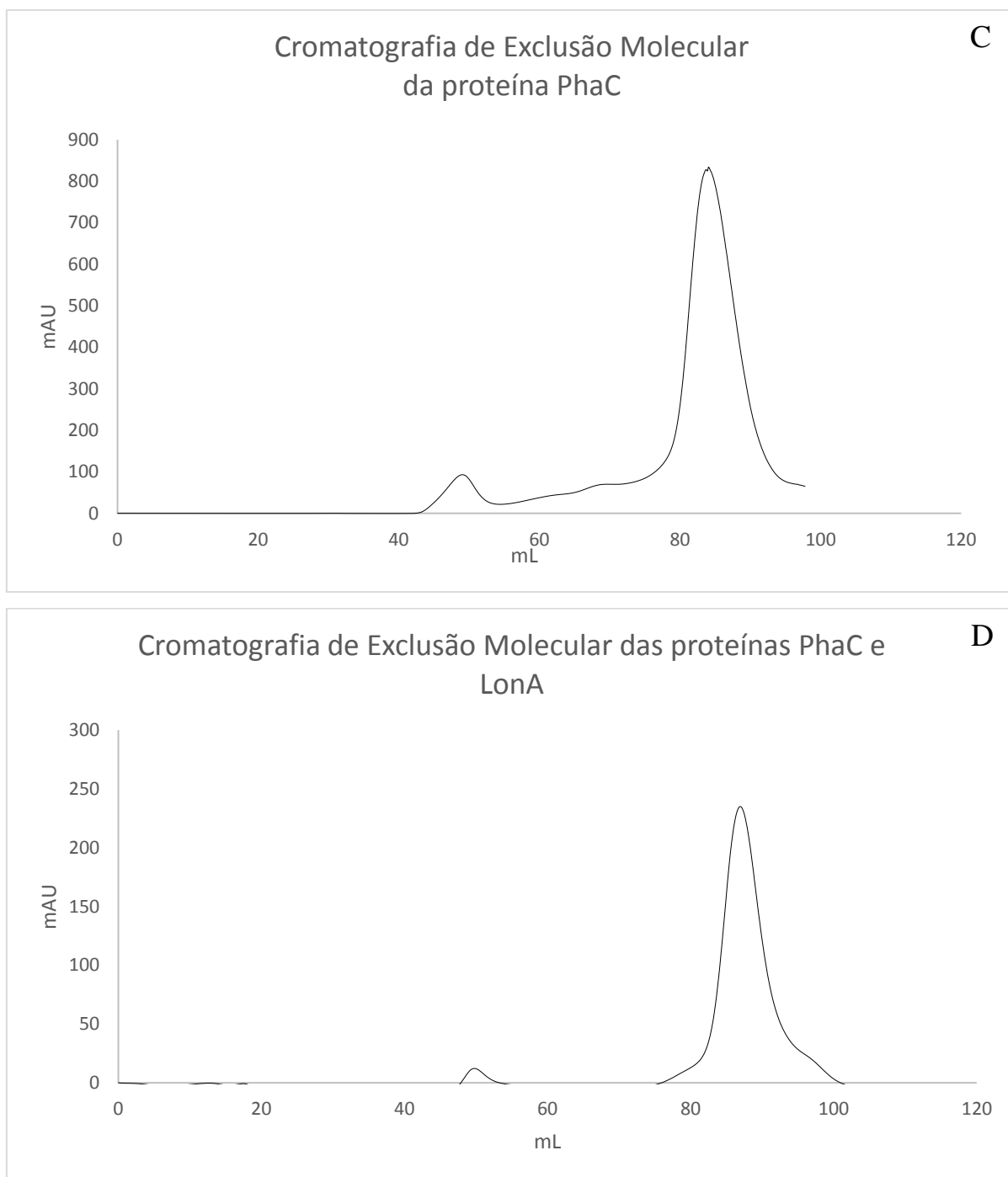
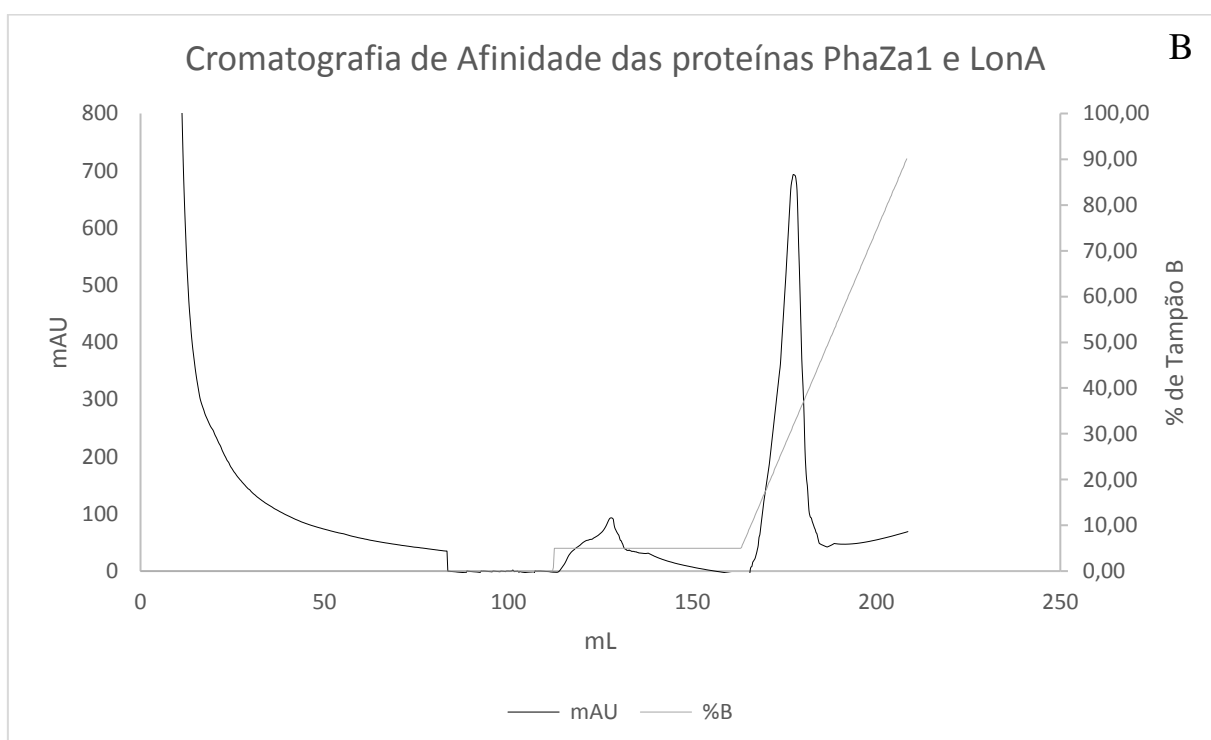
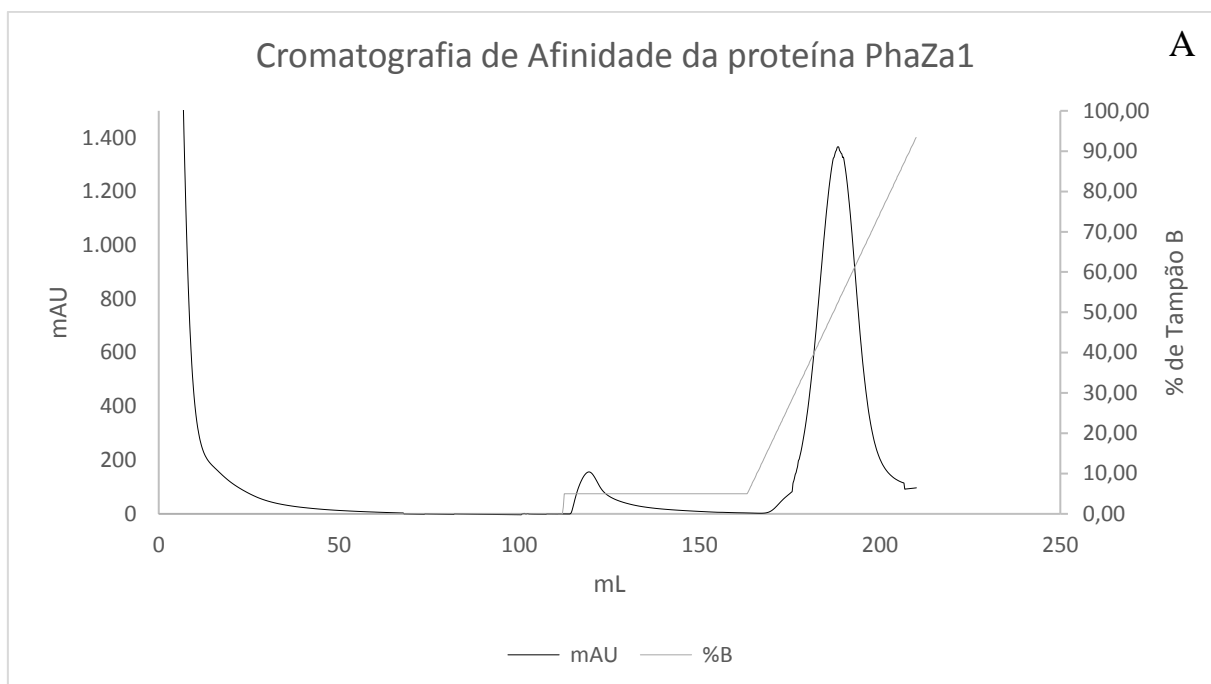


Figura E2 – A. Cromatografia de afinidade de PhaC. B. Cromatografia de afinidade de LonA+PhaC. C. Cromatografia de exclusão molecular de PhaC. D. Cromatografia de exclusão molecular de LonA+PhaC.



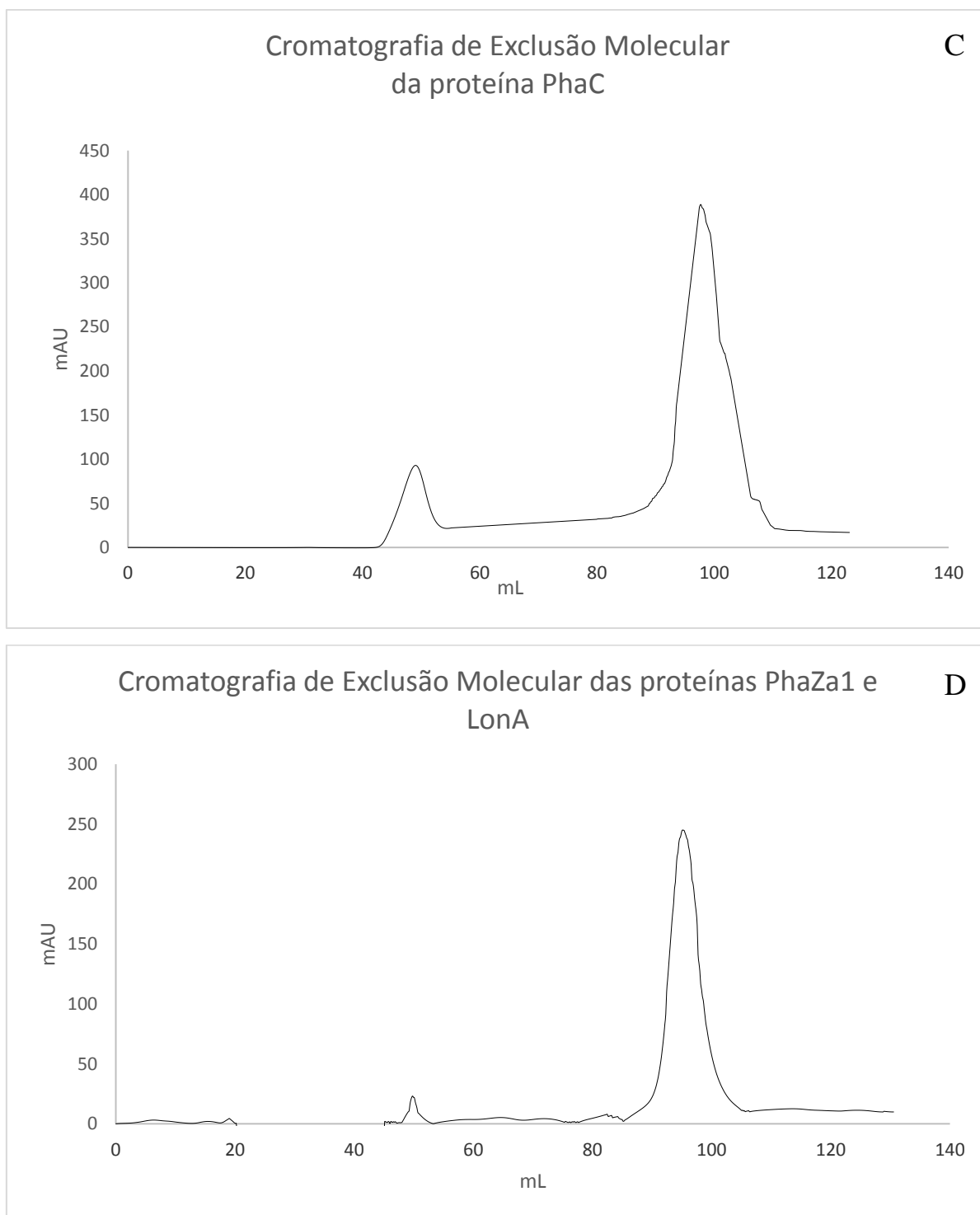


Figura E3 – A. Cromatografia de afinidade de PhaZa1. B. Cromatografia de afinidade de LonA+PhaZa1. C. Cromatografia de exclusão molecular de PhZa1C. D. Cromatografia de exclusão molecular de LonA+PhaZa1.

ANEXO F

Download ▾ GenPept Graphics						
ATP-dependent protease [Escherichia coli str. K-12 substr. W3110]						
Sequence ID: AAA16837.1 Length: 784 Number of Matches: 1						
Range 1: 6 to 778 GenPept Graphics			▽ Next Match ▲ Previous Match			
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
1100 bits(2844)	0.0	Compositional matrix adjust.	540/773(70%)	643/773(83%)	1/773(0%)	
Query 10	AEP I R L P L L P L R D V V V F P H M V I P L F V G R P K S I K A E T A M E A G K S I M L V A Q K T A A K D E P T A	69				
Sbjct 6	SERIEIPVLP L R D V V V V Y P H M V I P L F V G R E K S I R C L E A A M D H D K K I M L V A Q K E A S T D E P G V	65				
Query 70	DDL Y E V G C I A N I L Q M L K L P D G T V K V L V E G T Q R A N I R E V S E D D A H F M C E A V P V P P A P G E S A	129				
Sbjct 66	NDL F T V G T V A S I L Q M L K L P D G T V K V L V E G L Q R A R I S A L S D N G E H F S A K A E Y L E S P T I D E R	125				
Query 130	E T E A L R R A I V S Q F D Q Y V K N K K I P P E I L T S L S G I D E A G R L A D T I A A H L P I K L E Q K Q K I L E	189				
Sbjct 126	E Q E V L V R T A I S Q F E G Y I K L N K K I P P E V L T S L N S I D D P A R L A D T I A A H M P L K L A D K Q S V L E	185				
Query 190	M V N V T E R L E S L L S Q L E G E I D I L Q V E K R I R G R V K R Q M E K S Q R E Y L N E Q V K A I Q K E L G E G E	249				
Sbjct 186	M S D V N E R L E Y L M A M M E S E I D L L Q V E K R I R N R V K K Q M E K S Q R E Y L N E Q M K A I Q K E L G E M D	245				
Query 250	E G A D L E E - L D K R I K A A R M P K E A K K K A D A E F F K L K L M S P M S A E A T V V R N Y I D T L V N L P W R K	308				
Sbjct 246	D A P D E N E A L K R K I D A A K M P K E A K E K A E R E L Q K L M M S P M S A E A T V V R G Y I D M W V Q P W N A	305				
Query 309	K S K V N N D L A N A E R V L D E D H Y G L E K V K E R I L E Y L A V Q R V D K V K A P I L C L V G P P G V G K T S L	368				
Sbjct 306	R T K V K K D L R Q A Q E I L D T D H Y G L E R V K D R I L E Y L A V Q S R V N K I K G P I L C L V G P P G V G K T S L	365				
Query 369	G Q S V A R A T N R K F V R M A L G G V R D E A E I R G H R R T Y I G S M P G K I L Q S L S K V G V R N P L F L D E I	428				
Sbjct 366	G Q S I A K A T G R K Y V R M A L G G V R D E A E I R G H R R T Y I G S M P G K ++ Q ++ K V G V +N P L F L D E I	425				
Query 429	D K M G M D F R G D P S S A L L E V L D P E Q N H T F Q D H Y I E V D F D L S D V M F V A T S N S N I P P L D R M	488				
Sbjct 426	D K M S S D M R G D P A S A L L E V L D P E Q N V A F S D H Y L E V D Y D L S D V M F V A T S N S M N I P A P L D R M	485				
Query 489	E V I R L S G Y T E D E K V N I A Q R Y L L P K Q I K N N G L K A G E I E V A E S A I R D I I R Y T T R E A G V R S L E	548				
Sbjct 486	E V I R L S G Y T E D E K +N I A + R + L L P K Q I +N L K G E + V + S A I I I R Y T T R E A G V R L E	545				
Query 549	R E V S K I A R K V V K L L L L K K E S G T I K V D S E N L D K F L G V R K Y D F L A G K E N Q V G Q V T G L A W T E	608				
Sbjct 546	R E I S K L C R K A V K Q L L L D K S L K H I E I N G D N L H D Y L G V Q R F D Y G R A D N E N R V G Q V T G L A W T E	605				
Query 609	V G G D L L T I E A A I M P G K G N I T R T G S L G D V M K E S V E A A R S V V R S R A R R L G I T D E M F E K R D I H	668				
Sbjct 606	V G G D L L T I E T A C V P G K G L T Y T G S L G E V M Q E S I Q A A L T V V R A R A E K L G I N P D F Y E K R D I H	665				
Query 669	I H V P E G A T P K D G P S A G G A M T T A L V S V L T G I P V R A D V A M T G E I T L R G E V L P I G L K E K L L A	728				
Sbjct 666	V H V P E G A T P K D G P S A G I A M C T A L V S C L T G N P V R A D V A M T G E I T L R G Q V L P I G L K E K L L A	725				
Query 729	A H R G G I K L V L I P E N V K D L A E I P D N V K N A I E I V P V R W I D K V L E L A L E R K P E A L 781					
Sbjct 726	A H R G G I K T V L I P F E N K R D L E E I P D N V I A D L D I H P V K R I E E V L T L A L R N E P S G M 778					

Figura F1 – Alinhamento das sequências de aminoácidos da protease ATP-dependente LonA de *R. eutropha* e *E. coli* K-12, indicando 70% de identidade e 83% de similaridade.

<i>E. coli</i> K-12	PEGATPKDGP	SAGIAMCTALV	SCLTGNPVRADV	AMTGEITLRQVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKTVLIP	737
<i>R. eutropha</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. cenocepacia</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. ambifaria</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. cepacia</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. multivorans</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. pyrrocinia</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. ubonensis</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. pseudomallei</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	737
<i>B. thailandensis</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. oklahomensis</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. glumae</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. bannensis</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. phymatum</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	738
<i>B. fungorum</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. phenoliruptrix</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. xenovorans</i>	PEGATPKDGP	SAGIAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	739
<i>B. phytotfirmans</i>	PAGAVPKDGP	SAGVAMFIAIAS	LLMGRAVRS	CAVTGEISLRGIVLP	VGGIKEKVLAAHRGGIKTVLLP	757
<i>B. sacchari</i>	PEGATPKDGP	SAGGAMTTALV	SVLTGIPVRADV	AMTGEITLRGEVLP	IGGLKEKLLAAHRGGIKLVLP	712
* *.***** ** *:. * * * . * *.: *:*****:** ***:***:***:*** ***** **:						

Figura F2 – Alinhamento de parte das sequências de aminoácidos da protease ATP-dependente LonA de *E. coli* K-12, *R. eutropha* e *Burkholderia* spp. Asterisco: mostra a similaridade de resíduos de aminoácidos entre as espécies. Em cinza: ênfase para os resíduos de Ser⁶⁷⁹ (S) e Lys⁷²² (K), reportados como formadores da díade catalítica da proteína.