MIREIA RECIO MITTER

Modificação da morfologia de células de *Pseudomonas* sp. LFM046 e avaliação do impacto no acúmulo de polihidroxialcanoato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

MIREIA RECIO MITTER

Modificação da morfologia de células de *Pseudomonas* sp. LFM046 e avaliação do impacto no acúmulo de polihidroxialcanoato

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnólogicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia 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)

Recio Mitter, Mireia Modificação da morfologia de células de Pseudomonas sp. LFM046 e avaliação do impacto no acúmulo de polihidroxialcanoato / Mireia Recio Mitter; orientador José Gregório Cabrera Gomez. --São Paulo, 2018. 66 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. polihidroxialcanoatos. 2. Pseudomonas. 3. morfologia celular. 4. sulA. I. Cabrera Gomez, José Gregório , orientador. II. Título.



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantā, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **771/2015** referente ao projeto intitulado: *"Termoregulação da morfologia celular de Pseudomosas sp LFM046 para aumentar o teor de PHA acumulado"* sob a responsabilidade de Mireia Recio Mitter e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **José Gregório Cabrera Gomez,** do Departamento de Microbiologia, foi analisado 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 06 de outubro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes** Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. Paolo M. A. Zanotto Coordenador CEPSH ICB/USP

Candidato: MIREIA RECIO MITTER

Título da Dissertação: Modificação da morfologia de células de Pseudomonassp. LFM046 e avaliação do impacto no acúmulo de polihidroxial
canoato

Orientador: Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez A Comissão Julgadora dos trabalhos

de Defesa da Dissertação, em sessão pública realizada a ///, considerou

Aprovada () Reprovada ()

Examinador:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador:

Assinatura: Nome: Instituição:

Examinador:

Assinatura: Nome: Instituição:

Presidente:

Assinatura: Nome: Instituição:

Agradecimentos

Agradeço ao prof. José Gregório Cabrera Gomez pela orientação no desenvolvimento deste projeto de mestrado e também pelo apoio na minha participação de duas edições da competição internacional de biologia sintética iGEM. Também agradeço a prof. Luiziana Ferreira da Silva pelo apoio recebido para desenvolver este projeto e também os projetos do iGEM.

Agradeço aos membros do grupo do Laboratório de Bioprodutos que trabalharam junto comigo por toda a ajuda, em especial agradeço ao Henrique da Costa Oliveira e ao Juan Camilo Roncallo por terem me ajudado na minha adaptação ao laboratório.

Agradeço aos membros dos times iGEM USP-UNIFESP 2016 e iGEM USP 2017 pelas experiências compartilhadas e o aprendizado, essencial para o desenvolvimento deste projeto.

Agradeço ao William Cenens por me ajudar a realizar a microscopia de fluorescência e análise de imagens. As imagens de microscopia foram realizadas usando o microscópio Leica DMi8 do laboratório do Alexandre Bruni-Cardoso, adquirido com verbas do projeto FAPESP 2015/02654-3.

Agradeço ao Pedro Henrique Santos Oliveira, ao Jefferson Gonçalves Pinheiro Silva, à Sofia Alejandra López Chávez e à Amanda Billia Flora por conduzirem experimentos em biorreator e fazerem analises químicas das amostras.

Agradeço ao Felipe Morillo Dias por me ajudar a construir os plasmídeos.

Porfim, agradeço à familia Nunes Leite por terem me ajudado com a Elisabeth para poder finalizar a redação deste trabalho. E também agradeço à minha familia pelo apoio apesar da distância.

Este trabalho foi escrito usando a classe $abnT_EX2$, uma suíte que facilica a elaboração de documentos técnicos e científicos brasileiros usando ET_EX , atendendo os requisitos das normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

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

Resumo

A morfologia celular tem sido apontada como um novo alvo na engenharia genética de bactérias na produção de compostos químicos de interesse industrial. Recentemente, uma série de trabalhos têm mostrado que a alteração da morfologia celular de bactérias pode levar a um maior acúmulo de polihidroxialcanoatos de cadeia curta, um tipo de poliéster bacteriano. Neste trabalho, o efeito da alteração da morfologia celular é estudado em *Pseudomonas* sp. LFM046, uma cepa que produz naturalmente polihidroxialcanoato de cadeia média. A proteína SulA, inibidora da divisão celular, foi expressa de forma controlada na bactéria alvo para a obtenção de células filamentosas. O efeito da mudança morfológica no acúmulo do polímero foi determinada através de microscopia de fluorescência e análises químicas de amostras obtidas em cultivos em frascos agitados e biorreator. Além do estudo empírico, este trabalho propõe um modelo matemático para analisar a capacidade de acúmulo de polihidroxialcanoatos baseado na geometria da célula. Comprimentos celulares aumentados de *Pseudomonas* sp. LFM046 foram obtidos de forma controlada e a mudança morfológica resultou em um aumento no acúmulo de polihidroxialcanoato.

Palavras-chave: polihidroxialcanoatos, *Pseudomonas*, morfologia celular, divisão celular, sulA

Abstract

Cell morphology has been pointed out as a new target for genetic engineering of bacteria for bioproduction. Modifying the cell shape of bacteria has been reported to lead to increases in the accumulation of the short-chain-length type of the natural polyester polyhydroxyalkanoate. In this work, the impact of increasing cell length on the production of mediumchain-length polihidroxialcanoate by the natural producer *Pseudomonas* sp. LFM046 is studied. Therefore, the endogenous gene codifying the cell division inhibitor SulA was expressed in this cell strain and both the cell morphology and the polyhydroxyalkanoate accumulation were analyzed in shaken-flask and fed-batch bioreactor cultivations. Further, a mathematical model for predicting accumulation capacity based on cell morphology is proposed. The cell length was successfully increased in a controlled manner in the Brazilian sugarcane soil isolate and the polyhydroxyalkanoate accumulation resulted to be increased when cell length was increased.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, Pseudomonas, cell morphology, cell division, sulA

Sumário

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Polihidroxialcanoatos	8
1.1.1	Biosíntese dos PHAs	10
1.1.2	Grânulos e regulação da síntese dos PHAs	11
1.2	Pseudomonas sp. LFM046	13
1.3	Efeito da morfologia celular no acúmulo de polihidroxialcanoatos .	13
1.3.1	Divisoma bacteriano	15
1.3.1.1	Formação do septo	15
1.3.2	Regulação de posição do anel-Z	16
1.3.2.1	Sistema Min	16
1.3.2.2	Oclusão de nucleoide	16
1.3.3	Regulação da divisão celular pela resposta SOS	17
1.4	Evidências de Chen e colaboradores	17
1.5	Biologia molecular usando <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046	20
1.5.1	Mutantes por exposição a radiação UV	20
1.5.2	Mutantes por transposon	20
1.5.3	Expressão de genes exógenos em plasmídeo	20
1.5.4	Integração de genes exógenos no genoma	21
1.6	Sistema de expressão controlada pJN105	21
1.7	Técnica de clonagem SLIC	22
2	MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1	Microrganismos	23
2.1.1	Construção de linhagens recombinantes	23
2.2	Meios de cultura e preservação	23
2.3	Ensaios de acúmulo de PHA em frasco agitado	24
2.4	Métodos analíticos	24
2.4.1	Glicose	24
2.4.2	Massa seca celular	25
2.4.3	Teor de PHA	25
2.5	Cálculo de parâmetros cinéticos	25
2.6	Análise do genoma	26
2.7	Análise morfológica das células e detecção de grânulos por micros-	
	copia de fluorescência	26
3	RESULTADOS	27

Resultado	s	27			
3.1	Modelagem matemática do efeito do aumento do comprimento ce-				
	lular no acúmulo de PHA	27			
3.2	Efeito da expressão de <i>sulA</i> na morfologia e acúmulo de PHA em				
	Pseudomonas sp. LFM046	32			
3.2.1	Caracterização do sistema de expressão controlada pJN105 em Pseudomo-				
	<i>nas</i> sp. LFM046	32			
3.2.2	Expressão de <i>sulA</i> inibe a divisão celular em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046				
	gerando células filamentosas com comprimentos controláveis	34			
3.2.3	Efeito da expressão de <i>sulA</i> no acúmulo de PHA em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046				
	em ensaio em frasco agitado	40			
3.2.4	Efeito da expressão de <i>sulA</i> no acúmulo de PHA em <i>Pseudomonas</i> sp. LFM046				
	em ensaio de batelada alimentada	41			
4	DISCUSSÃO	44			
	REFERÊNCIAS	48			
	ANEXOS	56			
	ANEXO A – SEQUÊNCIAS DE DNA USADAS NO TRABALHO .	57			

1 Introdução

1.1 Polihidroxialcanoatos

Os polihidroxialcanoatos (PHA) são cadeias de ácidos hidroxialcanóicos (HA) unidos por ligações éster. Estes polímeros hidrofóbicos são encontrados nos citoplasmas de diversas bactérias e também em algumas arqueias na forma de grânulos com proteínas associadas (BRESAN et al., 2016). Existe uma grande variedade de HAs, mais de 150 HAs diferentes haviam sido reportados até o final do século XX como constituintes de PHA (STEINBÜCHEL; LÜTKE-EVERSLOH, 2003; CHEN; HAJNAL, 2015). Todos os monômeros possuem um grupo carboxila e uma hidroxila, e são polimerizados por meio de uma reação de esterificação, que une uma hidroxila de um monômero com o grupo carboxila do próximo monômero, liberando uma molécula de água. Há HAs com a hidroxila na posição 3, 4, 5 e 6, sendo a posição 3 a mais frequente. Quando ocorre esta ligação, os carbonos de posições posteriores à hidroxila formam ramificações ou resíduos (R) da cadeia resultante (Figura 1).

Dependendo do número de carbonos, os HAs são classificados em HAs de cadeia curta (scl) ou cadeia média (mcl) (do inglês *short-* ou *medium-chain-length*). Os primeiros têm de 3 a 5 carbonos, os segundos de 6 a 14 (MADISON; HUISMAN, 1999; LÓPEZ et al., 2015). Existem PHAs compostos por monômeros que contêm insaturações, moléculas de enxofre ou até anéis benzóicos. Quando é analisada a composição monomérica dos polímeros produzidos por bactérias selvagens, se encontram polímeros compostos por um só tipo de HA ou diferentes tipos na mesma cadeia, os segundos são denominados copolímeros. Os copolímeros podem apresentar diferentes monômeros distribuidos de forma aleatória pelo polímero ou podem apresentar trechos de apenas um monômero dentro do polímero. No primeiro caso são chamados de *random copolymers* (copolímeros randômicos) e no segundo de *block copolymers* (copolímeros em blocos). A composição monomérica dos PHAs determina as propriedades físico-químicas do material como densidade, cristalinidade, elasticidade e temperatura de fusão (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Os PHAs têm um papel importante nas comunidades microbianas. Enquanto muitos microrganismos são produtores, um número ainda maior de microrganismos é consumidor destes poliésteres (OBRUCA et al., 2016; PRIETO et al., 2015). Quando conveniente para as células, os polímeros são degradados pela bactéria e utilizados como fonte de carbono e energia (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002). Por isso, eles são considerados um material de reserva. A degradação é catalisada por PHA depolimerases, localizadas nos grânulos dos produtores (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014; PRIETO et al., 2015) e secretadas pelos microrganismos não produtores, muitos deles fungos (JENDROSSEK; SCHIRMER;



Figura 1 – Representação esquemática da estrutura química dos polihidroxialcanoatos. Baseado em (MADISON; HUISMAN, 1999; LÓPEZ et al., 2015)

SCHLEGEL, 1996; MATAVULJ; SAD; MOLITORIS, 2000). Por serem universalmente degradados em ácidos hidroxialcanóicos, os quais podem ser metabolizados por muitos organismos, os PHAs são biodegradáveis. Tem sido demonstrada a degradabilidade de PHA_{scl} em ambientes terrestres e aquáticos e até nas profundidades marinhas (MATAVULJ; SAD; MOLITORIS, 2000). Também os PHA_{mcl} são biodegradáveis (KIM et al., 2007). Alguns PHAs, como o amplamente estudado poli(3-hidroxibutirato) (P3HB ou PHB), podem ser degradados até no corpo humano, liberando monômeros que se encontram naturalmente no sangue (SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013). De fato, existem moléculas de PHB encontradas em conformações diferentes à das inclusões proteolipídicas descritas, tanto em células procariotas como eucariotas, que exercem diferentes funções (ZINN; WITHOLT; EGLI, 2001; REUSCH, 2013). Os PHA_{mcl} também apresentam biocompatibilidade (CHEN; WU, 2005).

As características termoplásticas dos PHAs fazem com que eles possam se tornar uma alternativa de fonte renovável aos plásticos tradicionais, que ainda apresenta biodegradabilidade e biocompatibilidade. A principal barreira na indústria dos PHAs é o alto custo de produção (CHEN, 2009). Isso tem provocado que a principal aplicação migrasse de fabricação de produtos descartáveis como embalagens para produtos com alto valor agregado, na área médica (SUN et al., 2007; SHRIVASTAV; KIM; KIM, 2013).

Embora um grande número de bactérias seja produtor de PHAs, o gênero *Pseudo-monas* se destaca pela síntese de PHA_{mcl} sem necessidade de utilizar uma fonte de carbono relacionada químicamente, como por exemplo a partir de glicose. Para fazer isso, contam com genes específicos, apresentados a seguir.

1.1.1 Biosíntese dos PHAs

A síntese de polihidroxial canoatos é catalizada por um conjunto de enzimas que geram ou preparam os monômeros que serão polimerizados pela ação da PHA sintase. Como mencionado acima, na natureza são encontrados PHAs com composições muito diversas. A capacidade de sintetizar os polímeros diferentes depende da PHA sintase presente no organismo e da presença de alguns genes adicionais. Existem dieferentes tipos de PHA sintases que apresentam diferente especificidade para substratos de cadeia curta ou média (REHM, 2003). O primeiro polímero a ser estudado foi o PHB, a síntese do qual é a mais simples. Para gerar o monômero de quatro carbonos, duas molé1culas de acetil-CoA são condensadas, formando acetoacetil-CoA, que depois é transformado em (R)3-hidroxibutiril-CoA, pronto para ser polimerizado. Assim, somente três enzimas são necessárias para sintetizar PHB a partir de Acetil-CoA: a acetil-CoA acetiltransferase ou β -cetotiolase, a acetoacetil-CoA reductase e a PHA sintase (Figura 2). Os genes que codificam essas três enzimas geralmente se encontram organizados no operon *phaCAB* e as enzimas são chamadas também PhaA, PhaB e PhaC, respectivamente (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

A incorporação de monômeros de mais de quatro carbonos é reforçada nas bactérias que possuem a enzima enoil-CoA hidratase ou PhaJ, pois ela permite usar compostos intermediários da β -oxidação (Figura 2). Por exemplo, bactérias do gênero *Aeromonas* (DOI; KITAMURA; ABE, 1995) acumulam poli(3-hidroxibutirato-co-3-hexanoato) quando é fornecido um ácido alcanóico ou um óleo vegetal, graças ao operon *phaPCJ* que codifica além da enzima mencionada, uma PHA sintase e uma phasina, que é um tipo de proteína específica dos grânulos de PHA, introduzido abaixo (FUKUI et al., 2001).

Por fim, gênero *Pseudomonas*, apresenta outro tipo de síntese de PHAs (SUDESH; ABE; DOI, 2000). As espécies deste gênero geralmente produzem PHAs com monômeros de cadeia média sem necessidade de utilizar uma fonte de carbono relacionada químicamente, como por exemplo a partir de glicose. Além de contar com a enzima PhaJ, que permite usar intermediários da β -oxidação, também possuem a enzima (R)-3-hidroxidecanoil-ACP-CoA transacilase ou PhaG, que fornece monômeros (R)3-hidroxiacil-CoA a partir da síntese de ácidos graxos *de novo* (Figura 2) (PRIETO et al., 2015). Geralmente não produzem PHA_{scl}, porêm existem exeções, como a *Pseudomonas extremaustralis*, uma espécie de *Pseudomonas sensu stricto* isolada da antártica, que produz majoritariamente PHB, mas provavelmente ela adquiriu o operon de síntese de PHB por transferência horizontal (AYUB et al., 2007).



Figura 2 – Representação esquemática da biosíntese dos diferentes tipos de polihidroxialcanoato.Baseado em (SUDESH; ABE; DOI, 2000; PRIETO et al., 2015).

1.1.2 Grânulos e regulação da síntese dos PHAs

Cada vez são encontradas mais evidências de que os grânulos de PHA não são simples acumulações de poliéster, mas sim complexos macromoleculares, para os quais foi proposto o nome carbonossomo (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). Embora eles apresentam uma camada superficial de natureza diferente ao interior do grânulo, como é observado em imagens de microscopia eletrônica, eles não contêm fosfolipídeos (BRESAN et al., 2016), mas várias proteínas têm sido co-localizadas com os grânulos, as quais exercem as mais diversas funções (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014).

As proteínas associadas ao grânulo de PHA são chamadas de *granule associated* protein (GAP). Em diversos organismos foram identificadas como GAP (i) PHA sintases

(PhaC), (ii) PHA depolimerases (PhaZ), (iii) reguladores de transcrição e (iv) proteinas estruturais (JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). As proteínas estruturais são chamadas de phasinas, elas apresentam uma parte hidrofóbica, ligada ao grânulo e uma parte hidrofílica, exposta ao citoplasma (STEINBÜCHEL et al., 1995). Desde que a ausência de fosfolipídeos na superfície dos grânulos foi demonstrada, elas são as únicas moléculas conhecidas que impedem a coalescência dos grânulos hidrofóbicos (BRESAN et al., 2016).

Além da função estrutural, algumas phasinas (PhaP1 e PhaM em *Cupriavidus neca*tor, também conhecida como *Ralstonia eutropha* (REINECKE; STEINBÜCHEL, 2009), e PhaF em *Pseudomonas putida*) controlam o número e o tamanho dos grânulos (GALÁN et al., 2011; WIECZOREK et al., 1995; WAHL et al., 2012). Recentemente ainda foi provado que algumas phasinas (PhaM em *C. necator* e PhaF em *P. putida*) ligam os grânulos ao cromossomo bacteriano, determindo a localização deles na célula, e sendo essenciais para a segregação dos carbonossomos na divisão celular (GALÁN et al., 2011; WAHL et al., 2012). PhaM, em *C. necator*, também demonstrou ativar a PHA sintase PhaC1 (WAHL et al., 2012; BRESAN; JENDROSSEK, 2017).

A proteína PhaF, além das funções de phasina e de localização e segregação dos grânulos em *P. putida*, também afeta a transcrição dos genes do agrupamento *pha* embora a ligação dela ao DNA seja independente da sequência (GALÁN et al., 2011; PRIETO et al., 1999). Em contraste, o regulador transcricional PhaD atua em dois promotores do agrupamento *pha* (De Eugenio et al., 2010). O gene *phaD* se encontra logo depois da segunda PHA polimerase, ou seja nessa ordem: *phaC1*, *phaZ*, *phaC2* e *phaD*. Ele é um regulador positivo que atua no P_{C1} , promotor responsável pela transcrição de *phaIF*. O agrupamento *pha* de *Pseudomonas* possui vários promotores (P_{C1} , P_Z , P_{C2} , P_F e P_I foram identificados), mas os promotores que mostraram ter uma força maior foram P_I e P_{C1} , os dois são regulados positivamente pelo PhaD, sendo que o P_I somente é ativado na presença de PhaD, enquanto P_{C1} também se encontra ativo, embora com uma taxa de transcrição menor, na ausença de PhaD.

Em *C. necator* a proteína repressora PhaR, que também é uma GAP, se liga tanto ao DNA, quanto ao PHA. Ela inibe a transcrição da phasina PhaP1 e também a transcrição do próprio gene *phaR* (YORK; STUBBE; SINSKEY, 2002; PÖTTER et al., 2002; JENDROSSEK; PFEIFFER, 2014). Acredita-se que ela se liga ao polímero quando o grânulo está se iniciando, permitindo a expressão de PhaP, que também se liga ao polímero. Quando a superfície do grânulo não permite mais a ligação de proteínas, PhaR inibe a expressão dessas duas GAPs (PÖTTER et al., 2002; BRIGHAM; SINSKEY, 2012).

Além da atividade dos reguladores transcricionais descritos acima, resultados reportados em *C. necator* e *P. putida*, indicam que existem outros mecanismos de regulação envolvidos na síntese ou degradação dos PHAs, tais como os fatores de transcrição sigma (σ 38, σ 54 e σ 70 (HOFFMANN; REHM, 2004; TIMM; STEINBÜCHEL, 1992; RAIGER-

IUSTMAN; RUIZ, 2008), resposta severa (*stringent response*) (JUENGERT et al., 2017; RUIZ et al., 2001), o sistema Crc, o qual está relacionado com o uso de fontes de carbono (La Rosa et al., 2014), e o sistema GacS/GacA que afeta várias rotas metabólicas bacterianas (RYAN et al., 2013).

Embora a regulação do metabolismo do PHA e a dinâmica dos carbonossomos ainda não estejam completamente elucidadados, o metabolismo do PHA é entendido como um ciclo em que o polímero é sintetizado e degradado suprimdo demandas transientes por metabolitos e equivalentes de redução (PRIETO et al., 2015). Geralmente ele é produzido em grandes quantidades quando há uma fonte de carbono em excesso e uma limitação em um nutriente essencial para o crescimento como o nitrogênio, embora possa ser sintetizado em condições favoráveis ao crescimento. No caso de P. putida, acumula PHA na fase exponencial de crescimento usando octanoato como fonte de carbono, enquanto usando uma fonte de carbono não-relacionada como glicose ela somente acumula quantidades significativas na fase estacionária do crescimento, após limitação de um nutriente essencial para o crescimento (PRIETO et al., 2015).

1.2 Pseudomonas sp. LFM046

A cepa *Pseudomonas* sp. LFM046 é uma cepa isolada de solo canavial que demonstrou ser uma das melhores produtoras de PHA_{mcl} (GOMEZ, 1994; GOMEZ, 2000; DINIZ et al., 2004). O PHA_{mcl} produzido por esta cepa a partir de carboidratos é composto principalmente por ácido 3-hidroxidecanóico (3HD) e ácido 3-hidroxiooctanóico (3HO). O material resultante foi caracterizado como semi-cristalino com alta estabilidade térmica e propriedades termo-mecânicas apropriadas para aplicação como filmes (SÁNCHEZ et al., 2003). Ela acumula até 60% de polímero na massa seca celular (MSC) usando glicose como única fonte de carbono (SÁNCHEZ et al., 2003; SILVA-QUEIROZ et al., 2009). Quando alimentada com diferentes óleos vegetais, a composição monomérica do PHA varia, o que permite produzir PHAs com propriedades diferentes, abrindo assim possibilidades de síntese de polímeros "feitos sob medida" (SILVA-QUEIROZ et al., 2009).

O genoma deste isolado do Laboratório de Bioprodutos foi sequênciado (CARDINALI-REZENDE et al., 2015) e se encontra já na versão completa na plataforma RAST, que oferece um sistema de anotação semi-automático baseado em subsistemas de genes (AZIZ et al., 2008) e onde o genoma pode ser consultado através da ferramenta SEED viewer, que oferece serviços de busca e apresenta as anotações com uma interface amigável para o usuário (OVERBEEK et al., 2005).

1.3 Efeito da morfologia celular no acúmulo de polihidroxialcanoatos

Na literatura, pouca atenção é dada à morfologia celular das bactérias produtoras de PHA. Existe somente um estudo, em que as dimensões das células são analisadas ao longo de um cultivo de *C. necator* em meio mínimo com fructose como fonte de carbono. Interessantemente, as celulas apresentaram um aumento no comprimento ao longo do cultivo. O comprimento celular médio aumentou de 4 µm no começo do cultivo a 12 µm às 48h de cultivo, enquanto o diâmetro celular manteve-se em 0,7 µm durante o cultivo todo (MRAVEC et al., 2016). Uma cepa mutante deficiente na produção de PHA apresentou o mesmo comportamento, indicando que o aumento no comprimento não é provocado pela presença de grânulos de PHA. Embora esse aumento no comprimento não seja provocado pela síntese de PHA, ele poderia ter um efeito no acúmulo de PHA.

O aumento do comprimento não é observado quando a cepa *Pseudomonas* sp. LFM046 é cultivada em meio mínimo, embora não houvesse nenhuma análise detalhada da morfologia dessa bactéria até este trabalho. As dimensões estimadas em 1x1 µm durante todo o cultivo de acúmulo são menores do que as dimensões apresentadas por *C. necator*.

O teor de PHA acumulado, ou seja, a porcentagem de polímero na massa seca celular, ao final do cultivo é um parâmetro muito importante quando o é analisado o custo de produção (KONING; WITHOLT, 1997; WANG et al., 2014).

Pensando nestas observações e na importância do teor de polímero na viabilidade econômica do processo, surgiu a idéia de dar atenção à morfologia da bactéria produtora. Diminuir a biomassa residual, que é a diferença da biomassa total e a massa de PHA, para aumentar a proporção de produto no fim do processo é essencial para diminuir o custo de produção. Por que não fazer com que a célula adquira dimensões maiores, com mais volume disponível? Um modo de fazer isso é inibindo a divisão da célula em um momento do cultivo, fazendo com que o compriment das células aumente, e isso poderia resultar em um acúmulo de polímero maior (Figura 3).

Resultados preliminares do Laboratório de Bioprodutos indicaram que essa idéia era promissora. Foi usado o antibiótico ácido nalidíxico, que age na DNA girase (FÀBREGA et al., 2009) e causa a inibição da divisão celular, formando filamentos quando aplicado em bactérias do gênero *Pseudomonas* (Al Bahry; SIVAKUMAR; AL-KHAMBASHI, 2012). O tratamento com concentrações sub-MIC resulta em células alongadas pela não formação do septo, já que elas não param de crescer. Quando este ácido é adicionado um pouco antes da fase estacionária de crescimento, ele bloqueia as últimas replicações que as células teriam antes de entrar nesse estado fisiológico. Assim, elas entram nesta fase, que é onde ocorre o maior acúmulo de polímero, com um comprimento maior, o que disponibiliza mais espaço no interior das células para o acúmulo do polímero. Quando foi aplicado ácido nalidíxico na



Figura 3 – Representação esquemática do alongamento de um bacilo produtor de PHA.

concentração 15 $\mu g m L^{-1}$ após 8h do inóculo a mudança morfológica esperada foi obtida. O teor de PHA após 27 horas foi 20% maior ao do controle. Este resultado foi obtido usando *B. sacchari* LFM101 e impulsionou o planejamento deste projeto de mestrado, que devia criar um sistema de controle da divisão celular independente do uso de antibiótico.

A estratégia de mudar a morfologia celular para aumentar o teor de PHA acumulado também foi usada por outro grupo de pesquisa. O grupo do Dr. George Chen vem publicando uma série de trabalhos no período de desenvolvimento deste projeto de mestrado relacionados à estratégia introduzida (JIANG; CHEN, 2016). Esses trabalhos, serão apresentados após uma breve introdução à divisão celular bacteriana.

1.3.1 Divisoma bacteriano

Precisamos entender como funciona a divisão celular no organismo estudado para encontrar formas de controlá-la. O processo de divisão celular bacteriana envolve numerosas proteínas, algumas delas, bem conservadas na maior parte das bactérias e arqueias. O conjunto delas recebe o nome "divisoma". Para ocorrer a formação de duas células idênticas a partir de uma progenitora no caso de um bacilo é preciso atingir um certo comprimento, duplicar o material genético, distribuir o conteúdo celular entre elas e finalmente separar os dois espaços. Para que tudo isso aconteça, existem mecanismos de regulação, alguns dos quais estão bem caracterizados para certos organismos modelo como *E. coli, Bacillus subtilis* e *Caulobacter crescentus*. Outros organismos modelo, como a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que é o mais próximo do organismo aqui estudado *Pseudomonas* sp. LFM046, foram protagonistas de bem menos evidências experimentais para entender o funcionamento do divisoma. Entretanto, a comparação genética e protéica *in silico* dos componentes do divisoma permite dizer que os mecanismos elucidados, expostos a seguir para *E. coli*, muito provavelmente ocorram também no gênero *Pseudomonas*.

1.3.1.1 Formação do septo

A proteína central do estrangulamento citoplasmático é a FtsZ. Trata-se de uma GTPase que polimeriza formando filamentos e é comparada com a tubulina, proteína do citoesqueleto eucarioto (ERICKSON, 1997; MINGORANCE et al., 2010). As cadeias de FtsZ são chamadas de protofilamentos. Estes se unem entre si e a outras proteínas para formar o anel-Z, que é ancorado à membrana citoplasmática e é a estrutura responsável pelo estrangulamento do citoplasma. A proteína FtsZ é capaz de polimerizar e formar anéis sem necessidade de outras proteínas in vitro (MINGORANCE et al., 2010). Na localização certa e na hora certa, o anel é bem estabilizado para poder exercer a sua função. Existe uma série de proteínas associadas ao anel. Elas se unem ao sítio de divisão em dois tempos diferentes. No primeiro passo, as seguintes proteínas se encontram associadas ao anel: FtsA, ZipA, ZapA, ZapB, ZapC, ZapD. Estas proteínas ligam o anel-Z à membrana citoplasmática e estabilizam-no. Na segunda etapa, incorporam-se FtsK, FtsQ, FtsB, FtsW, FtsI, FtsN, PBP3. A segunda leva participa no transporte de DNA (FtsK), na união do anel ao peptidoglicano (FtsN) e na síntese do peptidoglicano (PBP3) (ADAMS; ERRINGTON, 2009; EGAN; VOLLMER, 2013). Appear de ftsZ ser um gene essencial para a divisão celular, existem exceções, pois há bactérias capazes de se dividir sem ele (ADAMS; ERRINGTON, 2009).

1.3.2 Regulação de posição do anel-Z

Como as bactérias fazem para posicionar o septo na metade do seu comprimento? Essa é uma pergunta que tem intrigado a comunidade científica por muito tempo e ainda não está completamente respondida. Existem dois mecanismos bem descritos que regulam a posição do anel-Z, mas tem sido demonstrado que há outros mecanismos envolvidos, até agora desconhecidos (MÄNNIK et al., 2012; BAILEY et al., 2014). Os mecanismos conhecidos são o sistema Min e a oclusão de nucleoide (Noc).

1.3.2.1 Sistema Min

Na célula são formados anéis-Z continuamente em diferentes posições, mas eles são despolimerizados em todo lugar inadequado para a fissão (WU et al., 2015). Um mecanismo de controle de posição do anel-Z muito bem caracterizado é o sistema Min. O sistema é composto por três proteínas: MinC, MinD e MinE. MinD é uma ATPase associada à membrana em forma de dímero quando ligada a ATP. Quando o ATP é desfosforilado a proteína se solta da membrana. MinD também se liga a MinC. MinE é outra proteína associada à membrana citoplasmática que estimula a atividade ATPase de MinD, forçando-a a se soltar da membrana. Por fusão da proteína MinD com a proteína fluorescente GFP, observa-se a oscilação do complexo MinCD de um polo da célula bacteriana ao outro, inibindo a formação do anel-Z (WU et al., 2015). Este sistema era entendido como um

gradiente de concentração, no qual como resultado da oscilação nos polos haveria uma maior presença do complexo inibidor de FtsZ. Isso faria com que a formação do anel fosse possível somente na região central da célula (BLAAUWEN, 2013; EGAN; VOLLMER, 2013). Entretanto Ghosal e colaboradores mostraram que MinC e MinD formam cadeias associadas à membrana citoplasmática alternando as duas proteínas ao longo da membrana. Como MinE é encontrada predominantemente no centro da célula formando uma estrutura que lembra um anel e provoca a dissociação de MinCD da membrana, impediria a inibição de FtsZ pelas cadeias MinCD (GHOSAL et al., 2014).

Cepas de *E. coli* mutantes deficientes no sistema Min apresentam divisões nos polos da célula, resultando em células pequenas sem DNA, chamadas *minicells*. Em uma cepa com deleção de *minC* foi observado que 73% das células dividem no centro da célula, e das células restantes, a metade divide em uma pocição de 1:3 e a outra metade nos polos (MÄNNIK et al., 2012). Com esse padrão de divisão, a população ganha células com comprimento aumentado. Para cepas deficientes no sistema Min foi reportado um comprimento celular médio maior quando comparado com as cepas selvagens, sem levar em consideração as *minicells* (TEATHER; COLLINS; DONACHIE, 1974).

1.3.2.2 Oclusão de nucleoide

Outro mecanismo de regulação de localização do anel de estrangulamento citoplasmático bastante estudado é a oclusão de nucleóide ou Noc. Este também é um sistema de regulação negativa, que impede o corte do nucleóide na hora da fissão binária, assegurando que as duas células filhas terão uma cópia inteira do material genético. Em *E. coli*, a proteína SlmA se liga a sequências palindrômicas específicas do DNA. Este tipo de sequências reconhecidas pela proteína SlmA estão distribuídas pelo cromossomo com excepção de regiões terminais. Assim, quando os dois cromossomos estão se separando e no centro da célula se encontram somente regiões terminadoras, o anel-Z pode começar a se formar (EGAN; VOLLMER, 2013; NATALE; PAZOS; VICENTE, 2013; MONAHAN et al., 2014). Não obstante, os resultados de Männik e colaboradores indicam que SlmA não é o único fator envolvido (MÄNNIK et al., 2012).

1.3.3 Regulação da divisão celular pela resposta SOS

Em situação de estresse, a célula pode regular a divisão celular por meio da resposta SOS. Depois de danos ao material genético, é induzida a síntese da proteína SulA como parte da resposta SOS. Esta proteína se liga a FtsZ impedindo a polimerização da mesma. A resposta SOS inibe desta forma a divisão da célula até que o dano no DNA seja reparado (CHEN; MILAM; ERICKSON, 2012).

1.4 Evidências de Chen e colaboradores

O grupo do Prof. George Chen vem publicando uma série de trabalhos no período de desenvolvimento deste projeto de mestrado em que, com o objetivo de aumentar o teor de PHA, foi alterada a morfologia celular de bactérias. O grupo tem demonstrado usando *E. coli* e *Halomonas* spp., que o aumento do volume celular através do controle da divisão binária resulta em aumento no teor de PHA acumulado nas condições testadas. *E. coli* não é produtora natural de PHA, mas pode acumular o polímero por meio de expressão heteróloga dos genes de síntese. Em seus trabalhos provocaram alterações na morfologia e avaliaram o impacto dela no processo de produção de PHA.

Primeiro exploraram o uso da proteína inibidora da divisão celular SulA. A proteína SulA impede a polimerização da proteína FtsZ, que é essencial para a formação do anel-Z, e consequentemente o estrangulamento citoplasmático não ocorre. Isso provoca o alongamento das células. Induzindo a expressão do inibidor às 8h do cultivo foi atingido um teor de PHA final de 27%, enquanto o controle chegou em 12% da MSC. Este resultado foi obtido com *E. coli* BL21DE3 com pet28asulA para obtenção de células alongadas e p15apCAB para a síntese de polihidroxibutirato (WANG et al., 2014).

Também foi testada a deleção e a expressão fraca do gene mreB, que codifica pela proteína MreB, a qual forma uma espiral ancorada à membrana citoplasmática, responsável pela morfologia de bacilo. A deleção desse gene provoca a mudança da morfologia de bacilo para esférica (MADIGAN et al., 2015). Nessa nova linhagem, *E. coli* JM109 Δ mreB, que efetivamente apresenta morfologia de coco, ainda foi induzida a expressão do inibidor da divisão celular *sulA*, visando obter células esféricas maiores (Figura 4). As bactérias assim construídas resultaram ser frágeis e lisar após indução da expressão de *sulA*. Para compensar a fragilidade causada pela falta de proteína MreB, foi introduzido um outro plasmídeo, com o gene *mreB* para ajudar a manter a integridade da célula pela a expressão fraca do gene. Os melhores resultados foram obtidos com essa combinação. A linhagem de *E. coli* recombinante conseguiu acumular PHA correspondendo a 80% da MSC, o controle acumulou 53% da MSC (JIANG et al., 2015).

Os genes minC e minD foram escolhidos pelo grupo para determinar o efeito da deleção deles na produção de PHB por *E. coli*. Como descrito acima (item 1.3.2), esses genes são responsáveis por evitar a formação do septo perto dos polos da célula e a deleção deles provoca uma mudança no padrão de divisão celular, permitindo a formação de septos em diversos locais da célula e resultando em um comprimento celular médio maior que a cepa selvagem quando as *minicells* não são consideradas. Wu e colaboradores reportaram, além do comprimento celular maior de *E. coli* JM109 $\Delta minCD$ quando comparado com a cepa selvagem, células dividindo em diversos sítios ao mesmo tempo, resultando em várias células a partir de uma célula. Com isso, os autores afirmaram ter mudado o padrão de fissão binária para fissão múltipla, que resultou em um crescimento maior da população,



Figura 4 – Representação esquemática da mudança de morfologia de bacilo para coco combinada com a inibição da divisão em uma bactéria produtora de PHA.

com base nas medidas de MSC efetuadas pelo grupo. A deleção de minCD levou a um acúmulo maior pela linhagem modificada em relação ao controle com 60% e 50% de PHA na MSC, respectivamente. Os genes ftsQ, ftsL, ftsW e ftsN, envolvidos na divisão celular, foram expressos todos juntos em *E. coli* JM109 e provocaram um aumento no comprimento das bactérias. Quando esses genes foram expressos na cepa *E. coli* JM109 $\Delta minCD$ houve um aumento no teor de PHA acumulado ainda maior. O teor de PHA da cepa recombinante foi 70% da MSC, enquanto no controle foi 50% da MSC (WU et al., 2016).

Os genes env e nlp estão envolvidos na hidrólise de peptidoglicano para separar a parede celular de duas células resultantes de uma fissão binária. A deleção deles provoca o crescimento filamentoso. A combinação de deleções de minCD e envCnlpD com indução de expressão de sulA, nos trabalhos do grupo chinês, permitiram acúmulos de PHB ao redor de 70% da MSC na cepa de *E. coli* JM109 enquanto o controle ficou em 50% da MSC (WU; CHEN; CHEN, 2016).

Uma outra estratégia foi usada pelo grupo do professor Chen, com os genes *ftsZ* e *mreB* como alvo. Por meio de CRISPRi, com Cas9 sem atividade catalítica, foi abordada a regulação da transcrição destes genes. Desenharam 5 sgRNAs para cada gene, com sequências alvo distribuídas pela região reguladora do gene e no próprio gene. O maior efeito de repressão transcricional para cada gene foi obtido quando foram usadas combinações de sgRNAs. Estas duas combinações também foram combinadas entre si para ter o efeito inibidor da divisão somado à inibição da espiral MreB. A cepa resultante acumulou polímero correspondendo a 80% da MSC, enquanto o controle atingiu 44%. Quando foi inibido somente o gene ftsZ com esta técnica, foi reportado um teor de PHA de 61% da MSC (ELHADI et al., 2016).

Mais recentemente, usando a técnica de CRISPRi também, foi avaliado o efeito que teria a espessura e a rigidez da parede celular no acúmulo de PHA. Para isso foram criadas duas linhagens a partir de *E. coli* Top10, uma com uma parede celular mais grossa e mais rígida que o normal e outra com a parede celular mais fina e frágil. A primeira linhagem foi construida inserindo o promotor constitutivo P_{glta} em vários locais do genoma para controlar a expressão dos genes de síntese de parede celular *murDEFG*, *mraY* e *ftsW*. A segunda cepa foi construida usando CRISPRi. Vários sgRNAs foram desenhados para guiar a dCas9 para se ligar em genes de síntese de parede e inibir a expressão deles. A linhagem com parede celular mais rígida acumulou 25% de PHA enquanto a linhagem com parede celular mais fina (com sgRNAs para *murE* e *murD*) acumulou 93% de PHA (ZHANG et al., 2017).

Na maioria dos trabalhos introduzidos acima foi usada a cepa $E. \ coli \ JM109. O$ grupo também realizou dois trabalhos com bactérias do gênero Halomonas, produtor de PHA natural e interessante por poder ser cultivado usando água marinha. Em Halomonas sp. TD08 os genes *minCD* foram superexpressos. A superexpressão levou a uma morfologia celular mais alongada e a um aumento no acúmulo de PHA, de 69% no controle para 82% na linhagem modificada (TAN et al., 2014). Usando Halomonas campaniensis LS21, produtora natural reforçada expressando um plasmídeo contendo genes de síntese de PHB, foi estudado também o efeito da morfologia celular no acúmulo. Para controlar a morfologia foi criado um sistema baseado na mudança da temperatura para indução da alteração. Os genes mreB e ftsZ foram deletados, e o plasmídeo pTKmf contendo os dois genes foi inserido. Este plasmídeo é capaz de se replicar a 30°C enquanto a 37°C ele é desestabilizado. Na temperatura elevada então, as células não se dividem e nem produzem a proteína que mantém a estrutura de bacilo. Estas células aumentadas de tamanho acumularam um teor de PHA de 70%. Este teor não foi significativamente maior do que o do controle que continha também o plasmídeo contendo genes envolvidos na síntese de PHB (JIANG; CHEN, 2017).

1.5 Biologia molecular usando *Pseudomonas* sp. LFM046

A linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046, como mencionado anteriormente (1.2), foi isolada pelo laboratório (GOMEZ, 1994) e provávelmente é uma espécie nova que somente tem sido estudada pelo grupo. O uso de ferramentas de biologia molecular tem sido relativamente pouco explorado.

1.5.1 Mutantes por exposição a radiação UV

As primeiras modificações genéticas de *Pseudomonas* sp. LFM046 foram realizadas através da geração de mutações aleatórias por exposição à radiação UV, seguida da seleção

do fenotipo desejado. Com esta técnica foram obtidas linhagens como a *Pseudomonas* sp. LFM461, deficiente na produção de PHA (GOMEZ, 2000).

1.5.2 Mutantes por transposon

Mutantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 afetados no metabolismo de ácidos graxos insaturados foram obtidos por Sonia R. S. Queiroz, utilizando-se o sistema de transposon mini-Tn5, alguns dos quais apresentaram maior eficiência na incorporação de monômeros insaturados ao PHA. Através da clonagem e o seqüenciamento de fragmentos de DNA interrompidos pelo transposon, alguns genes afetados nos mutantes foram identificados (QUEIROZ, 2007). Usando a mesma técnica, também foram obtidos mutantes de *Pseudomonas* sp. LFM046 incapazes de sintetizar PHA a partir de glicose (GOMES, 2009).

1.5.3 Expressão de genes exógenos em plasmídeo

No trabalho de doutorado de Rogério Gomes foram expressados genes envolvidos na síntese de PHB de *C. necator* em *Pseudomonas* sp. LFM046 usando o plasmídeo pBBR1MCS-2. Nas construções, genes do operon *phaCAB* se encontram precedidos do promotor nativo de *C. necator* (sequência reconhecida pelo fator sigma 70) e também do promotor *lac*. A produção de PHB foi detectada em todas as construções contendo a PHA sintase *phaC* de *C. necator*. Não foi adicionado indutor IPTG nos cultivos, mas ainda assim não ficou claro se os genes foram expressos pelo vazamento do promotor *lac* ou pelo reconhecimento do promotor exógeno original do operon.

No trabalho de J. Camilo R. Sarmiento, genes de consumo de xilose foram expressados de forma heteróloga em *Pseudomonas* sp. LFM046 usando o plasmídeo pSEVA241 (RONCALLO, 2017). O promotor usado nesse trabalho foi o promotor constitutivo *tac*. A transcrição do operon exógeno (*C. crescentus*) em *Pseudomonas* sp. LFM046 foi confirmada por PCR de cDNA. Mesmo assim, o consumo de xilose não foi muito expressivo, mas o sistema de expressão mostrou-se funcional.

Lucas G. Céspedes desenvolveu vários plasmídeos chamados pCC usando promotor lac com a finalidade de expressar genes envolvidos na síntese de PHB em *Pseudomo*nas sp. LFM461, a cepa mutante deficiente na produção de PHA, de forma controlada. Em primeiro lugar foi observado que o plasmídeo pCC1 era modificado pela bactéria após a transformação por um evento de recombinação homóloga, enquanto em *E. coli* MG1655 isso não acontecia (CESPEDES, 2016). Versões melhoradas do plasmídeo foram criadas successivamente até o pCC5. Esses plasmídeos mostaram-se funcionais em *E. coli* MG1655, mas no organismo alvo a expressão dos genes era do mesmo nível que sem adição do indutor. Isso levou a concluir que o sistema de regulação *lac* não é o adequado para Pseudomonas sp. LFM046 (CESPEDES, 2016).

1.5.4 Integração de genes exógenos no genoma

O sistema de transposons mini-Tn7 foi usado por Edmar R. O. Filho para integrar sequências de PHA sintases exógenas no genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046. A integração no genoma foi bem sucedida, embora a atividade dessas proteínas exógenas foi baixa (OLIVEIRA, 2016). Os genes de PHA sintases das linhagens resultantes estão precedidos apenas pelo promotor exógeno original, de *C. necator, Aeromonas hydrophila* e *Aeromonas* sp. TSM 81.

Até este trabalho, não tem sido caracterizado um sistema de expressão controlada de genes em *Pseudomonas* sp. LFM046. Para isso, aqui foi usado o plasmídeo pJN105, que será descrito a seguir.

1.6 Sistema de expressão controlada pJN105

O plasmídeo pJN105 é um plasmídeo *broad host range* criado para expressão controlada de genes em bactérias Gram-negativas não entéricas. Ele é derivado de pBBR1MCS-5, o qual tem a origem de replicação de *Bordatella bronchisteptica*, que é reconhecido por uma vasta gama de espécies. O sistema de expressão controlada é constituido pelo cassete $araC-P_{BAD}$, ou seja, a sequência codificadora pelo repressor AraC e a do promotor de L-arabinose de *E. coli*. Na ausença de L-arabinose o repressor se encontra ligado à região promotora, impedindo a transcrição dos genes subsequentes. Na presença de L-arabinose, o repressor libera a região promotora, permitindo uma regulação fina da produção das proteínas de interesse (NEWMAN; FUQUA, 1999).

1.7 Técnica de clonagem SLIC

A técnica de clonagem usada neste trabalho, SLIC (sequence and ligase independent cloning), é uma técnica de clonagem, como diz o nome, independente de sequência e de ligase. Se baseia na adição de sequências complementares nos extremos dos fragmentos a serem ligados e utiliza a própria maquinária de recombinação da bactéria receptora para unir eles, depois de serem parcialmente degradados por incubação com a exonuclease T4 DNA polimerase. Em primeiro lugar os fragmentos a serem unidos são preparados. No caso da inserção de um fragmento em um plasmídeo, são adicioados às extremidades do fragmento sequências complementares à sequência da posição desejada do plasmídeo de 20 nucleotídeos. O plasmídeo precisa ser linearizado por PCR ou digestão simples, na posição exata onde o fragmento será inserido. Uma vez prontos os fragmentos, eles são tratados com T4 DNA polimerase, que na ausência de dNTPs e a temperatura ambiente, tem

ação exonuclease, hidrolisando nucleotídeos dos extremos dos fragmentos e tornando-os fita simples (*sticky ends*), que irão estabelecer pontes de hidrogênio com as sequências complementares. Quando introduzidos por choque térmico na bactéria alvo, a maquinária da célula adiciona os nucleotídeos complementares onde ficaram espaços vazios (Figura 5) (LI; ELLEDGE, 2012).



Figura 5 – Representação esquemática da técnica de clonagem SLIC Baseado em (LI; EL-LEDGE, 2012).

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos

Neste trabalho, foram usadas as linhagens Pseudomonas sp. LFM046, Pseudomonas sp. LFM046:pJN105gfp e Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA.

2.1.1 Construção de linhagens recombinantes

O gene sulA foi amplificado do genoma de Pseudomonas sp. LFM046, usando a DNA polimerase Q_5 (NEB) e o par de iniciadores 105S (Anexo A). O amplicon foi purificado do gel de agarose e ligado ao plasmídeo pJN105, préviamente digerido com SmaI, utiliyando a técnica SLIC(LI; ELLEDGE, 2012). O sítio de ligação ao ribossomo (RBS) de Pseudomonas putida KT2440 foi adicionado ao iniciador de forma a se posicionar antecedendo ao gene sulA. O gene qfp foi amplificado usando o par de iniciadores 105G e a DNA polimerase Q_5 (NEB) (Anexo A) de um outro plasmídeo e ligado ao plasmídeo pJN105, préviamente digerido com EcoRI, com a técnica SLIC também adicionando o mesmo RBS no iniciador. Para isso os fragmentos a serem ligados foram incubados com a T4 DNA Polimerase e o Buffer 2.0 da New England Biolabs por 2,75 min em temperatura ambiente. Os 10 μ L da reação foram misturados com 100 µL de Pseudomonas sp. LFM046 quimiocompetentes, preparadas como descrito a seguir. 10 mL de meio LB com adição de 3 g L^{-1} de glicose foram inoculados com *Pseudomonas* sp. LFM046 e incubados por 7h. Depois, elas foram centrifugadas a 4000xg por 3 min e ressuspendidas em uma solução mantida em gelo que continha acetato de sódio 20 mM e CaCl₂ 0,1 mM em (pH 6,5). As células foram incubadas por 10 min no gelo e foram centrifugadas de novo nas mesmas condições. Seguidamente, o pellet foi ressuspendido na mesma solução e incubado no gelo por 30 min. Depois de misturar com a reação de SLIC, foram incubadas mais 30 min no gelo e 45s a 42°C, seguido de 5 min no gelo. As bactérias transformadas foram recuperadas em 1 mL de meio LB contendo gentamicina 50 mg L^{-1} , incubando elas por 1h no agitador rotativo (200 rpm). A inserção do gene sulA no plasmídeo pJN105 foi confirmada por sequenciamento Sanger, enquanto a inserção do gene gfp foi confirmada somente fenotípicamente.

2.2 Meios de cultura e preservação

Foram usados os meios de cultura LB adaptado com base no lysogeny broth (BERTANI, 1951) e Meio Mineral (MM), adaptado a partir de (RAMSAY et al., 1990) líquidos e sólidos: (Para o meio sólido acrescentou-se ágar a uma concentração final de $20g L^{-1}$).

LB: Triptona 10 g L^{-1} , extrato de levedura 5 g L^{-1} e NaCl 5 g L^{-1} .

MM para ensaios de frascos agitados: $(NH_4)_2SO_4 1 g L^{-1}, Na_2HPO_4 3,5 g L^{-1}, KH_2PO_4 1,5 g L^{-1}, MgSO_4 \cdot 7 H_2O 0,2 g L^{-1}, CaCl_2 \cdot 2 H_2O 0,01 g L^{-1}, citrato férrico amoniacal 0,06 g L^{-1}, glicose 15 g L^{-1} e solução de elementos traços 1,0 mL L^{-1}.$

MM para ensaios em biorreator: $(NH_4)_2SO_4$ 2,9 g L⁻¹, KH_2PO_4 0,39 g L⁻¹, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,31 g L⁻¹, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,002 g L⁻¹, citrato férrico amoniacal 0,006 g L⁻¹, $(NaCl \ 1 \ g \ L^{-1}, glicose \ 15 \ g \ L^{-1}e$ solução de elementos traços 2,0 mL L⁻¹.

Solução de elementos traços: $H_3BO_3 \ 0.30 \ g L^{-1}$, $CoCl_2 \cdot 6 \ H_2O \ 0.20 \ g L^{-1}$, $ZnSO_4 \cdot 7 \ H_2O \ 0.10 \ g L^{-1}$, $MnCl_2 \cdot 4 \ H_2O \ 0.03 \ g L^{-1}$, $NaMoO \cdot 2 \ H_2O \ 0.03 \ g L^{-1}$, $NiCl_2 \cdot 6 \ H_2O \ 0.03 \ g \ L^{-1}$, $NiCl_2 \cdot 6 \ H_2O \ 0.03 \ H_2O$

Antibiótico: Para cultivar cepas recombinantes, foi adicionado o antibiótico gentamicina na concentração final 50 mg L^{-1} ao meio LB (LBG) e ao meio MM (MMG).

Preservação: As bactérias foram preservadas, após 12h de cultivo em LB líquido, adicionando glicerina 20% (concentração final) a -80°C para estoque de trabalho.

2.3 Ensaios de acúmulo de PHA em frasco agitado

Um estoque de trabalho foi semeado em placas LB ou LBG, após 72h, foram preparados os inóculos a partir de 2-3 colônias isoladas em meio LB ou LBG líquido e incubados por 9-12h a 30°C em agitador rotativo (150 rpm). Com esta cultura foi inoculado o MM ou MMG, usando um volume correspondente a 10% do volume total. O cultivo foi incubado por até 72h (30°C, 150 rpm). Para induzir a expressão de genes no plasmídio pJN105 foi usada L-arabinose na concentração final de 20 mM.

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Glicose

A concentração de glicose foi determinada por cromatografia líquida (HPLC). Um volume de 10 µL foi injetado em aparelho Dionex (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) equipado com coluna de separação de açúcares (Aminex-HPX-87H). Para detecção, foi usado um refratômetro diferencial (Shodex IR-101) na temperatura 40°C. A vazão da fase móvel (H₂SO₄ 5 mM) foi 0,6 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi 45°C.

2.4.2 Massa seca celular

Foram centrifugados 10 mL de cultura (8000 rpm, 10 min, 4°C). O pellet foi resuspendido e transferido para um frasco Eppendorf de 2 mL pesado previamente, liofilizado e pesado. A diferença de massa entre o tubo sem o pellet e com o pellet foi considerado a massa seca celular (MSC).

2.4.3 Teor de PHA

O teor e composição de polímero foram determinados por cromatografia gasosa de propilésteres. Cerca de 10 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2-dicloroetano e 100 μ L de uma solução de ácido benzoico (40 mg mL⁻¹) em propanol. Os tubos foram mantidos em banho de água a 100°C por 3h. Ao final do tempo de incubação, foram resfriados. Separou-se a fase aquosa da fase orgânica, usando água destilada. A fase aquosa foi retirada e na mistura restante foi adicionado sulfato de sódio anidro para absorção de água remanescente na fase orgânica. A fase orgânica, contendo os propilésteres, foi transferida para frascos de cromatografia. O volume de 1 µL de amostra foi analisado após fracionamento (split 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890A Series GC System, equipado com uma coluna HP-1 (comprimento 30 m, diâmetro 320 mm, espessura do filme 0,25 µm). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Nitrogênio (0.6 mLmin^{-1}) . 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 min, elevar a temperatura até 180°C a uma velocidade de 6° C min⁻¹. Manter 180°C por 5 min. Elevar a temperatura até $240^{\circ}C(6^{\circ}C \min^{-1})$ e manter por 1 min. Como padrão interno foi usado ácido benzóico. Polímeros de produzidos por *Pseudomonas* foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando as quantidades dos monômeros presentes.

2.5 Cálculo de parâmetros cinéticos

A equação de crescimento exponencial (2.1) descreve o crescimento de uma cultura de bactérias, sendo X o número de células, X_0 o número inicial de células, μ a velocidade específica de crescimento e t o tempo de cultivo.

$$X = X_0 e^{\mu t} \tag{2.1}$$

Ela pode ser expressa como:

$$lnX = \mu t + lnX_0 \tag{2.2}$$

Os ln dos valores de DO foram plotados contra o tempo. Por regressão linear dos pontos da fase exponencial de crescimento, foi obtida a equação da reta equivalente a equação 2.2 e μ sendo o coeficiente angular. O tempo de geração foi calculado usando $tg = ln2/\mu$.

2.6 Análise do genoma

O genoma de *Pseudomonas* sp. LFM046, recentemente sequenciado, foi analisado para presença de genes relacionados à divisão e morfologia celular. Foram utilizados os genes de *E. coli* e espécies mais próximas da estudada para detecção dos respectivos ortológos em *Pseudomonas* sp. LFM046. Para a busca foi utilizada a plataforma de livre acesso RAST (Rapid Annotation using System Technology) (OVERBEEK et al., 2005) junto com outras ferramentas bioinformáticas, como o buscador de sequências reguladoras bprom da plataforma SoftBerry e o software de alinhamento de sequências Needleman-Wunsch EMBOSS da EMBL-EBI.

2.7 Análise morfológica das células e detecção de grânulos por microscopia de fluorescência

5 µL de cultivo foram dissolvidos em 10 µL de solução salina. As amostras foram estocadas a 4 °C por até 24h. Uma solução de Nile Red 5 mg µL⁻¹ em DMSO foi dissolvida 1000x em água milli-Q. Dois volumes de corante foram adicionados a um volume de amostra, após 15 a 30 min de incubação a temperatura ambiente, foram tomadas as microfotografias. O microscópio usado foi um Leica DMi8. Foram tomadas fotos em contraste de fase e no canal de fluorescência rhod. As fotografias foram analisadas usando o programa Fiji (SCHINDELIN et al., 2012) com o *plugin* microbeJ (DUCRET; QUARDOKUS; BRUN, 2016), foram medidos comprimento, largura e intensidade de fluorescência das bactérias de vários campos de cada amostra.

3 Resultados

3.1 Modelagem matemática do efeito do aumento do comprimento celular no acúmulo de PHA

Inicialmente, foi estabelecido um modelo matemático para descrever e prever os efeitos da mudança no comprimento da célula em sua capacidade de acumular PHA. O sistema a ser descrito é a célula bacteriana do bacilo Gram negativo *Pseudomonas* sp. LFM046 ao final de um cultivo em meio adequado para o acúmulo de PHA. O objetivo é entender como o aumento no comprimento celular poderia levar a um teor de PHA maior. Foram formuladas as seguintes hipóteses simplificadoras:

1. O formato da célula pode ser aproximada como a de um cilindro. Este cilindro é separado em um cilindro interno que representa o citoplasma e uma fração externa que representa o envelope celular.

2. O envelope celular tem uma espessura constante e é tratado como uma substância homogênea de densidade constante.

3. O citoplasma é composto por duas substâncias homogênias: o PHA e os componentes internos, com densidades constantes.

A Figura 6 representa essa visão da célula que foi considerada para elaborar o modelo.



Figura 6 – Representação gráfica de como é descrita a célula pelo modelo matemático. A célula é descrita como um cilindro de comprimento λ e raio r, dividido em um cilindro interno, que representa o citoplasma, e uma fração externa de espessura θ , que representa o envelope celular.

Assim, foi possível definir os seguintes componentes do modelo:

λ	: comprimento celular
λ_i	: comprimento celular na célula com o formato original
V_t	: volume celular total
V_m	: volume do envelope celular
V_i	: volume interno
V_{ci}	: volume dos componentes celulares internos
V_{pha}	: volume do PHA
M_t	: massa celular total
M_m	: massa do envelope celular
M_{ci}	: massa dos componentes celulares internos
θ	: espessura do envelope celular
$%V_{ci}$: porcentagem de volume dos componentes celulares internos do volume interno
$\% M_{pha}$: porcentagem da massa de PHA na massa total
$\% M_{pha,i}$: porcentagem da massa de PHA na massa total, na célula com o formato
	original
$ ho_m$: densidade do envelope celular
$ ho_{pha}$: densidade do PHA

 ρ_{ci} : densidade dos componentes internos

Esses componentes estão relacionados entre si como descrito nas equações a seguir:

$$V_t = \pi r^2 \lambda$$
$$V_i = \pi (r - \theta)^2 \cdot (\lambda - 2\theta)$$
$$V_m = V_t - V_i$$
$$M_m = V_m \rho_m$$
$$\% V_{ci} = \frac{V_{ci}}{V_i} \cdot 100$$
$$V_{ci} = \frac{\% V_{ci} V_i}{100}$$
$$M_{ci} = V_{ci} \rho_{ci}$$
$$V_{pha} = V_i - V_{ci}$$
$$M_{pha} = V_{pha} \rho_{pha}$$
$$\% M_{pha} = \frac{M_{pha}}{M_t} \cdot 100$$

Foram usados os seguintes valores:

$ ho_m$:	$1,2 \text{ g/cm}^3$
$ ho_{pha}$:	$1{,}05~{\rm g/cm^3}$
ρ_{ci}	:	$1{,}1~{\rm g/cm^3}$
θ	:	$0{,}03~\mu\mathrm{m}$
λ_i	:	$1{,}5~\mu\mathrm{m}$
r	:	$0,4~\mu m$
$\%M_{pha,i}$:	70%

Esses valores foram escolhidos da seguinte forma: O valor da densidade do PHA ρ_{pha} foi reportado anteriormente para PHA_{mcl} (KOLLER; NIEBELSCHÜTZ; BRAUNEGG, 2013; PREUSTING et al., 1993), e a espessura do envelope θ se encontra em (MADIGAN et al., 2015). Os valores de densidade do envelope e citoplasma foram estimados baseando-se na densidade de céluas de *E.coli* de 1,2 g/cm³ (GODIN et al., 2007), e na densidade de proteínas, que varia de 1,35 g/cm³ a 1,45 g/cm³ para um grande número de proteínas de 20-160 kDa (FISCHER; POLIKARPOV; CRAIEVICH, 2009). Com esses valores de referência, a densidade do envelope celular ρ_m foi estimada em 1,2 g/cm³ e a densidade dos componentes citoplasmáticos ρ_{ci} foi estimada em 1,1 g/cm³. O comprimento celular λ_i , o raio r e a porcentagem de PHA na MSC $\% M_{pha,i}$ da cepa selvagem foram determinados experimentalmente.

A porcentagem de PHA na MSC $\% M_{pha}$ com o comprimento da bactéria selvagem (1,5 µm) é de aproximadamente 70% no fim do ensaio de acúmulo. Com comprimentos celulares maiores, pode haver um espaço maior disponível para armazenar o polímero. O quanto espaço a mais haverá depende do espaço que os componentes internos irão ocupar na célula maior. Foram propostas duas hipóteses extremas: (a) que os componentes internos aumentam proporcionalmente aos aumentos de volume citoplasmático, ou seja, que eles ocupam a mesma porcentagem de volume interno da célula independentemente do tamanho dela e (b) que os componentes internos não aumentem, ou seja, que ocupem o mesmo volume que eles ocupam na célula original. Essas hipóteses, chamadas Hipótese A e Hipoótese B, respectivamente, podem ser expressadas da seguinte forma:

 $HipóteseA : \%V_{ci} = const.$ $HipóteseB : V_{ci} = const.$

Avaliou-se desta forma o efeito no acúmulo de PHA em decorrência do aumento do comprimento celular (Figura 7). Assim, o modelo prevê que a capacidade de acúmulo de PHA poderia atingir até pouco mais de 80% MSC, considerando que não há aumento do volume dos outros componentes intracelulares ou menos de 55% da MSC se os outros componentes intracelulares também aumentassem proporcionalmente ao volume citoplasmático. Nas duas hipóteses, fixando V_{ci} ou $\% V_{ci}$, os teores de PHA se aproximam a um valor máximo, e dobrando duas a três vezes o comprimento é quando ocorre o maior aumento no teor de PHA.



Figura 7 – Efeito do aumento do comprimento celular no teor de PHA, calculado a partir do modelo matemático. A porcentagem de massa de PHA na massa total da célula $(\% M_{pha})$ foi calculada para comprimentos celulares crescentes, partindo de uma célula de *Pseudomonas* sp. LFM046.

Na Hipótese A, onde fixamos $%V_{ci}$, a porcentagem de volume de PHA no citoplasma também é constante. Assim, dentro do citoplasma tudo aumenta na mesma proporção com o aumento do comprimento celular. O aumento na porcentagem de massa de PHA com relação à massa total se deve, portanto, à massa do envelope celular. Com espessura constante, a maior parte do envelope aumenta com o aumento do comprimento. Nas bases do cilindro, porém, que seriam os polos da célula, o volume do envelope não aumenta com o aumento do comprimento. Por isso, a porcentagem em massa que os dois extremos do envelope representam com relação à massa celular total vai diminuindo quando o comprimento celular aumenta, e isso resulta no aumento de teor de PHA (Figura 8).

Na Hipótese B, na qual V_{ci} recebe um valor fixo, o aumento no teor do PHA é muito mais pronunciado, já que o volume interno aumenta com o comprimento e os componentes internos não aumentam, deixando cada vez mais espaço para o PHA. A porcentagem em massa desses componentes internos cada vez se aproxima mais a zero, da mesma forma que a parte constante do envelope comentada acima. (Figura 9).

As duas hipóteses extremas foram formuladas no desconhecimento do comportamento do sistema na realidade. Espera-se que o comportamento real se encontre em algum ponto entre esses dois extremos, pois a célula alongada nem deve ter proporções de conteúdos intracelulares idênticas à célula de tamanho original, como na Hipótese A,



Figura 8 – Correlação entre a porcentagem de PHA e a porcentagem de PCE na massa celular total. A PCE é a parte do envelope que, no modelo, não aumenta com o aumento do comprimento celular. Na Hipótese B, onde os componentes internos aumentam proporcionalmente ao volume citoplasmático, a PCE é essencial para que haja um aumento na porcentagem de PHA.



Figura 9 – Correlação entre a porcentagem de PHA e a porcentagem de CI na massa celular total. A porcentagem em massa dos componentes internos diminui com o aumento de comprimento celular quando o volume deles é mantido constante, na Hipótese B.

nem deve preencher todo o espaço intraceluar adicional com PHA, deixando de sintetizar o resto de conteúdo citoplasmático, como DNA, RNA e proteína, como postulado pela Hipótese B.

Nos trabalhos do grupo do professor Guo-Quian Chen, introduzidos no item 1.4, quando o comprimento celular foi aumentado por meio de técnicas de biologia molecular, foram reportados aumentos de teor acumulado de PHA de até o dobro quando comparado com o controle. De 12% da MSC aumentou para 27% da MSC usando *E. coli* BL21DE3 contendo o plasmídeo pet28asulA para expressão do inibidor da divisão *sulA* e p15apCAB para a síntese de polihidroxibutirato o (WANG et al., 2014). Em outro trabalho foi inibida a expressão do gene *ftsZ* usando a técnica CRISPRi em *E. coli* JM109 com o plasmídeo pHHR68 para a produção de polihidroxibutirato. Dessa forma o teor de PHB acumulado foi de 61%, enquanto sem a inibição de *ftsZ* o teor foi de 44% da MSC (ELHADI et al., 2016).

O modelo apresentado prevê no máximo um acúmulo que se aproxima a 85%na porcentagem de acúmulo com os parâmetros usados, que pretedem se aproximar a Pseudomonas sp. LFM046 produzindo PHA_{mcl}. Modificando o valor da densidade do PHA, a porcentagem de PHA inicial e as dimensões iniciais da célula, obtemos resultados diferentes. Usando como valor de ρ_{pha} 1,2 g cm⁻³, para PHA_{scl}, que tem uma maior densidade do que o PHA_{mcl} (KOLLER; NIEBELSCHÜTZ; BRAUNEGG, 2013), os valores de teor de PHA calculados aumentam levemente. Usando ainda dimensões mais comuns de E. coli (2x0,5) µm, também obtemos um aumento nos valores calculados. Com essas duas modificações o valor máximo se aproxima a 90%. Interessantemente, quando são considerados teores de PHA menores no início (na célula de dimensões originais) são obtidos aumentos maiores no teor de PHA. O valor máximo, porém, não muda. Assim, se a porcentagem de PHA inicial é 12%, a curva se aproxima a 85% ou 90% da mesma forma que começando com 70%, por causa do limite teórico estabelecido pelo modelo. Nos trabalhos apresentados acima, os comprimentos celulares chegaram perto de 10 µm. Com esse comprimento, aplicando a Hipótese B e os parâmetros de E. coli mencionados, começando com 12% de PHA na MSC, o modelo prevê um acúmulo de perto de 70% de PHA na MSC. Usando a Hipótese B, chegaria em menos de 13%. Por tanto, podemos dizer que os resultados de Chen e colaboradores estão dentro dos resultados previstos pelo modelo, entre as duas hipóteses extremas.

3.2 Efeito da expressão de *sulA* na morfologia e acúmulo de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM046

Com o objetivo de obter células alongadas de *Pseudomonas* sp. LFM046 e avaliar o efeito do aumento no comprimento no acúmulo de PHA, foi utilizado o plasmídeo pJN105 para expressar o inibidor da divisão celular *sulA*. Em primeiro lugar, o uso deste plasmídeo na cepa estudada foi caracterizado.

3.2.1 Caracterização do sistema de expressão controlada pJN105 em *Pseudomonas* sp. LFM046

Para avaliar o sistema de expressão controlada constituido pelo plasmídeo pJN105 em *Pseudomonas* sp. LFM046, foi utilizado o gene repórter gfp, codificador da proteína fluorescente verde (GFP). Este gene foi inserido no plasmídeo, precedido de uma sequência de ligação ao ribossomo procedente de *Pseudomonas putida* e sob controle do promotor presente no mesmo, P_{BAD}, induzível por L-arabinose. Esta construção foi introduzida em *Pseudomonas* sp. LFM046, criando a linhagem recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*gfp*, que foi semeada em meios sólidos com e sem L-arabinose (Figura 10).



Figura 10 – Semeadura de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*gfp* com e sem adição de L-arabinose. A cepa selvagem (WT) e a recombinante (*gfp*) foram semeadas em placas de petri com meio LB sem e com L-arabinose (ara) 20 mM. Na presença do indutor a cepa recombinante apresentou uma coloração diferente.

Observando as semeaduras de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105gfp expostas a luz visível, pode-se verificar uma diferença na coloração das colônias, a qual adquire um tom verde na presença de L-arabinose.

A expressão de proteína fluorescente verde foi avaliada em cultivos em microplaca com adição de diferentes concentrações de L-arabinose (Figura 11).

Na Figura 11, podemos ver que sem a presença de L-arabinose no cultivo da linhagem *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*gfp* não se detectou fluorescência, enquanto nos cultivos com L-arabinose a fluorescência foi aumentando ao longo do cultivo e após 6h chegou em 100000 uaf e 50000 uaf com 20 mM e 200 mM de L-arabinose, respectivamente. Observamos também que a densidade óptica (DO) dos cultivos sem L-arabinose e com 20 mM de L-arabinose teve um comportamento semelhante ao longo do cultivo. Com 200 mM de L-arabinose, porém, a DO do cultivo ficou por mais tempo no valor inicial e quando começou a aumentar foi em um ritmo menor quando comparada com a dos outros cultivos. No terceiro gráfico, que combina os dois anteriores vemos que a fluorescência relativa à DO foi maior com 200 mM do que com 20 mM, e sem L-arabinose continuou perto de 0.



Figura 11 – Densidade óptica e fluorescência de cultivos de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105gfp com diferentes concentrações de L-arabinose. Os cultivos de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105gfp foram conduzidos em microplaca usando meio mineral com L-arabinose nas concentrações 0 mM, 20 mM e 200 mM. A fluorescência relativa, no gráfico inferior, representa a relação entre os valores de fluorescência (gráfico superior) e densidade óptica (meio) ao longo do cultivo.

Esse resultado nos permite concluir que o sistema de expressão pJN105 não apresenta vazamento em *Pseudomonas* sp. LFM046. Também indica que com concentrações maiores a expressão da proteína de interesse pode ser maior, embora concentrações muito altas do indutor possam atrapalhar o crescimento.

Assim, foi estabelecido o uso do plasmídeo e do indutor L-arabinose na concentração 20 mM para os próximos experimentos.

3.2.2 Expressão de *sulA* inibe a divisão celular em *Pseudomonas* sp. LFM046 gerando células filamentosas com comprimentos controláveis

A proteína inibidora da divisão celular SulA foi expressa em *Pseudomonas* sp. LFM046 para avaliar em primeiro lugar o efeito que pode causar na morfologia celular. Espera-se que a expressão dela provoque um aumento no comprimento em células que estão em fase de crescimento. O gene *sulA* foi clonado do próprio genoma e inserido no plasmídeo pJN105 após o promotor induzível por L-arabinose P_{BAD} e precedido de uma sequência de ligação ao ribossomo (RBS) de *P. putida*, da mesma forma que o gene repórter anteriormente.

Experimentos preliminares foram realizados com *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA*, para testar o efeito de inibição da divisão celular, como semeadura em placa de petri, em meio com e sem L-arabinose (Figura 12) e cultivos com e sem adicão do indutor, seguidos de observação da morfologia celular no microscópio (Figura 13). Com esses testes, a inibição da divisão e consequente aumento do comprimento celular da nova linhagem na presença de L-arabinose foram confirmados, assim como o não vazamento do sistema de expressão usado.



Figura 12 – Semeadura de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com e sem adição de L-arabinose. A cepa selvagem (WT) e a recombinante (*sulA*) foram semeadas em placas de petri com meio LB sem e com L-arabinose (ara) 20 mM. Na presença do indutor não se detectou crescimento da cepa recombinante.

Para explorar o potencial de alongamento de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA*, foram conduzidos cultivos com adição de L-arabinose em tempos diferentes. Como controles foram usados cultivos da linhagem recombinante sem adição de L-arabinose assim como da linhagem selvagem. A densidade óptica dos cultivos foi registrada por 10h, para acompanhar o perfil de crescimento e saber em qual fase de crescimento estava sendo induzida a inibição da divisão celular (Figura 14). Após 10h e 48h de cultivo, foram tiradas amostras para analisar a morfologia celular. Às 10h, a fase exponencial de crescimento já tinha acabado e foi o último tempo de adição de L-arabinose. Com 48h, no meio de cultivo definido para acúmulo de PHA, espera-se que as bactérias da cepa selvagem tenham produzido perto de 50% da MSC de PHA. Estas amostras foram coradas com o corante fluorescente de PHA Nile Red e observadas em microscópio de fluorescência, para poder avaliar a morfologia



Figura 13 – Morfologia de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com e sem adição de L-arabinose. A cepa recombinante (*sulA*) foi cultivada com e sem L-arabinose (ara) 20 mM por 48h. As imagens foram tomadas em contraste de fase. A barra de escala é de 10 µm.

das bactérias nos cultivos com diferentes tempos de adição de L-arabinose, e ao mesmo tempo, avaliar a presença do polímero (Figura 15). A partir de fotomicrografias foram medidos os comprimentos e os diâmetros celulares, os quais estão resumidos na Figura 16 e Figura 17, respectivamente.

Espera-se que, dentro da fase de crescimento exponencial, quanto antes seja adicionado o indutor, as células atinjam comprimentos maiores, pois haverá uma maior quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento delas. Se a expressão de *sulA* não tivesse nenhum efeito na velocidade de crescimento das células, na fase exponencial de crescimento, elas poderiam dobrar o comprimento a cada período equivalente ao tempo de geração da linhagem.

Efectivamente, nos cultivos com diferentes tempos de adição de L-arabinose foram observadas células de comprimentos diferentes, como pode-se observar na Figura 15. Como esperado, os comprimentos foram maiores quando a adição de L-arabinose ocorreu com menos tempo de cultivo. Quando a L-arabinose foi adicionada após 3h de cultivo, as bactérias atingiram comprimentos celulares maiores que 50 μ m. Nos cultivos em que o tempo de adição foi 5h, 7h e 10h, os comprimentos celulares médios foram de ao redor de 11 μ m, 7 μ m e 4 μ m, respectivamente, sendo que a bactéria selvagem e a linhagem recombinante sem presença de L-arabinose tiveram um comprimento médio de 1,5 μ m. Assim, nos diferentes cultivos as células dobraram o comprimento perto de três, duas e uma vez, quando o tempo de indução foi às 5h, 7h e 10 h de cultivo, respectivamente.



Figura 14 – Densidade óptica de cultivos de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com adição de L-arabinose em diferentes tempos de cultivo. Os valores de absorbância representam o valor médio e desvio padrão de triplicatas biológicas. O gráfico superior mostra os mesmos valores em escala logarítmica. A línea de tendência marcada nos gráficos se ajusta aos pontos da fase exponencial de crescimento, com a equação $0,018e^{0,6521}$ e $R^2 = 0,99$. As setas indicam os tempos em que foi adicionada L-arabinose nos diferentes cultivos.

com precisão, mas podemos dizer que se encontravam na ordem de grandeza compatível como tendo dobrado cinco ou seis vezes o comprimento.

Na fase exponencial de crescimento, a velocidade específica de crescimento μ foi de 0,65 h⁻¹ (Figura 14). Sendo assim, o tempo de geração, dado por $\frac{ln(2)}{\mu}$, foi de 1,06h. Considerando que a fase exponencial de crescimento durou 6h, quando a L-arabinose foi adicionada às 3h e 5h, as células ficaram por 3h e 1h sem se dividir na fase exponencial, podendo dobrar o comprimento perto de três vezes e uma vez, respectivamente. Porém, elas dobraram perto de cinco e três vezes, respectivamente. Quando a L-arabinose foi adicionada às 7h e 10h de cultivo, após o fim da fase exponencial de crescimento, as células dobraram duas e uma vez o comprimento, respectivamente. Provávelmente existe uma fase de transição entre a fase de crescimento exponencial e a estacionária, onde ocorrem mais duas gerações. Assim podem ser explicados os comprimentos celulares atingidos neste experimento.



Figura 15 – Imagens de microscopia de cultivos de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com adição de L-arabinose em diferentes tempos de cultivo. As amostras foram retiradas após 72h de cultivo em meio para acúmulo de PHA com adição de L-arabinose (ara) 20 mM após 3h, 5h, 7h e 10h de cultivo ou sem adição, como indicado na figura. As amostras foram coradas com o corante de PHA Nile Red e analisadas em microscópio de fluorescência. Barra de escala de 2 µm.

Na Figura 16, observamos que com adição de L-arabinose, os comprimentos celulares apresentaram uma grande variação. Quanto antes foi adicionado o indutor, mais compridas foram as células, e a variação de comprimento entre as células do mesmo cultivo também foi maior. Pensando que as células dobraram o tamanho em cada período equivalente ao tempo de geração, se no tempo de adição de L-arabinose uma célula se encontrava no começo do ciclo celular e outra no fim, no final a primeira terá um comprimento perto de 2x maior que a segunda. Assim, quanto maiores os comprimentos celulares, maior a variação.



Figura 16 – Comprimentos de células de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA com adição de L-arabinose em diferentes tempos de cultivo. Os comprimentos foram medidos a partir de amostras que foram retiradas após 72h de cultivo em meio para acúmulo de PHA. Como controles foram usadas a cepa selvagem (WT) e a recombinante (S) sem adição de L-arabinose (ara). Nos outros cultivos houve adição de L-arabinose 20 mM após 5h, 7h e 10h de cultivo, como indicado na figura. As barras representam a média com o desvio padrão da medida de mais de 500 células de campos diferentes de cada amostra. A medida foi realizada usando o programa imageJ/microbeJ.



Figura 17 – Diâmetros de células de *Pseudomonas* sp. LFM046 e *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com e sem acúmulo de PHA. Os diâmetros celulares foram medidos a partir de amostras que foram retiradas após 10h e 72h de cultivo em meio para acúmulo de PHA. Nos cultivos com a cepa recombinante (s) houve adição de L-arabinose 20 mM após 5h (s5)e 10h (s10) de cultivo. As barras representam a média com o desvio padrão da medida de mais de 500 células de campos diferentes de cada amostra. A medida foi realizada usando o programa imageJ/microbeJ.

Na Figura 17, pode ser observado que as células dos cultivos da cepa selvagem, tiveram um aumento no diâmetro de perto de 300 nm às 72h de cultivo, quando comparado com o diâmetro às 10h de cltivo. O aumento foi de $(0, 42\pm0, 05)$ µm para $(0, 69\pm0, 05)$ µm. Nos cultivos com adição de L-arabinose, nos quais as células apresentaram morfologia filamentosa, os diâmetros no fim do cultivo não apresentaram aumento, ficaram em torno de 0, 4 µm. Nos cultivos da cepa recombinante sem adição de L-arabinose, o diâmetro no fim do cultivo foi de $(0, 63\pm0, 04)$ µm, o diâmetro às 10h do cultivo não foi medido.

Podemos afirmar, com os resultados apresentados, que a expressão de *sulA* inibiu a divisão celular, como esperado, provocando o crescimento filamentoso das células e que o

2

comprimento celular depende do tempo em que é adicionado o indutor. Também comprovamos que houve produção do polímero, distribuido ao longo das células, independentemente do comprimento celular. Contudo, observamos uma diferença não esperada no diâmetro das células, que no fim do ensaio de acúmulo não apresentou um aumento nas células filamentosas. Assim, o comprimento celular com que as bactérias entram na fase estacionária de crescimento, em que ocorre o maior acúmulo de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM046, pode ser controlado graças ao sistema pJN105*sulA*. Porém, não temos controle sobre o diâmetro das células.

3.2.3 Efeito da expressão de *sulA* no acúmulo de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM046 em ensaio em frasco agitado

Foram conduzidos ensaios de acúmulo de PHA com a linhagem recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* para avaliar o impacto da mudança morfológica no teor de PHA acumulado. A linhagem foi cultivada em meio mineral por 72h com adição de L-arabinose após 3h, 5h, 7h ou 9h de cultivo. Como controles foram usadas a linhagem recombinante sem adição de L-arabinose e a linhagem selvagem. No fim do ensaio, o PHA foi quantificado, foi analisada a morfologia celular e foi medida a concentração de glicose. Os parâmetros de acúmulo de PHA determinados neste ensaio se encontram na Tabela 1 e Figura 18.

Tabela 1 – Parâmetros de produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 e *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* determinados em ensaio em frasco agitado.

Cultivo	%PHA	$\rm X~[gL^{-1}]$	$\rm PHA~[gL^{-1}]$	$X_R[\mathrm{g}\mathrm{L}^{-1}]$
Pseudomonas sp. LFM046	$71,4{\pm}6,5$	$4,83{\pm}0,14$	$3,51{\pm}0,32$	$1,40{\pm}0,17$
Pseudomonas sp. LFM046sulA	$66,7{\pm}8,4$	$4,\!27{\pm}0,\!11$	$2,85{\pm}0,28$	$1,\!43{\pm}0,\!11$
<i>Pseudomonas</i> sp. LFM046 <i>sulA</i> ara t_1	$74,\!4{\pm}5,\!9$	$4,\!10{\pm}0,\!05$	$3,05{\pm}0,16$	$1,04{\pm}0,12$
Pseudomonas sp. LFM046 $sulA$ ara t ₂	$69,1{\pm}5,2$	$4,05{\pm}0,12$	$2,\!80{\pm}0,\!08$	$1,25{\pm}0,41$
Pseudomonas sp. LFM046 $sulA$ ara t ₃	$69,6{\pm}6,1$	$4,\!13{\pm}0,\!10$	$2,88{\pm}0,11$	$1,26{\pm}0,49$
Pseudomonas sp. LFM046 $sulA$ ara t ₄	$65,9{\pm}6,2$	$4,\!09{\pm}0,\!06$	$2,\!68{\pm}0,\!08$	$1,\!41{\pm}0,\!13$

Os cultivos de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA e Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA foram conduzidos em frasco agitado por 72h. Foi adicionada L-arabinose (ara) na concentração 20 mM às 3h (t₁), 5h (t₂), 7h (t₃) e 9h (t₄) de cultivo. As massas secas celulares (MSC) foram pesadas após liofilização do cultivo. A partir do cultivo liofilizado foi medida a quantidade de PHA por meio de cromatografia gasosa, após reação de propanólise. A biomassa residual X_R é a diferença entre os valores de MSC e de PHA. Os valores representam médias e desvio padrão de triplicatas biológicas.

Na Tabela 1 vemos que a linhagem recombinante apresentou uma MSC menor, perto de 4 g/L com e sem adição de L-arabinose, enquanto a MSC da linhagem selvagem chegou em 4,5 g/L. A porcentagem de PHA na MSC, porém, foi muito próxima em todos os cultivos (Tabela 1, Figura 18). A concentração de glicose ao final do experimento foi muito próxima a 0 em todos os cultivos, indicando que não sobrou fonte de carbono em nenhum dos cultivos. Sendo assim, não podemos descartar que a produção de PHA poderia ser maior com uma maior disponibilidade de glicose.



Figura 18 – PHA e biomassa residual de *Pseudomonas* sp. LFM046 e *Pseudomo-nas* sp. LFM046:pJN105*sulA* após cultivo em frasco agitado. Os cultivos de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* e *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* foram conduzidos em frasco agitado por 72h. As massas secas celulares (MSC) foram pesadas após liofilização do cultivo. A partir do cultivo liofilizado foi medida a quantidade de PHA por meio de cromatografia gasosa, após reação de propanólise. A biomassa residual X_R , cinza escuro é a diferença entre os valores de MSC e de PHA, cinza claro. As barras representam médias e desvio padrão de triplicatas biológicas.

3.2.4 Efeito da expressão de *sulA* no acúmulo de PHA em *Pseudomonas* sp. LFM046 em ensaio de batelada alimentada

Foram conduzidos ensaios de de batelada alimentada para avaliar o acúmulo de PHA em meio mineral com glicose como fonte de carbono, acompanhando-se a concentração de glicose no cultivo e mantendo-a entre 5 g L⁻¹ e 20 g L⁻¹ através de alimentações. Assim, a fonte de carbono não seria o fator limitante da síntese de PHA. Foram conduzidos dois cultivos em paralelo da linhagem recombinante *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA*. Em um dos biorreatores foi adicionada L-arabinose após 5h de cultivo, enquanto o segundo, sem adição, foi usado como controle. Ao longo dos cultivos foram retiradas amostras periodicamente para determinar a MSC e o PHA. Também foi analisada a morfologia após 72h de cultivo. Os parâmetros de acúmulo de PHA determinados neste ensaio se encontram na Tabela 2 e Figura 19. As imagens de microscopia do mesmo se encontram na Figura 20.

Como pode ser observado na Figura 20, as células de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* apresentaram um aumento no comprimento com adição de arabinose, quando comparado com o cultivo controle. Nos dois cultivos foi detectada a presença de grânulos de PHA por

Cultivo	tempo de cultivo	%PHA	${\rm X}~[{\rm gL^{-1}}]$	$\rm PHA~[gL^{-1}]$	$X_R[\mathrm{g}\mathrm{L}^{-1}]$
Pseudomonas sp. LFM046sulA	48h	$66,5{\pm}5,0$	$8,\!59{\pm}0,\!05$	$5,71{\pm}0,18$	$2,88{\pm}0,23$
Pseudomonas sp. LFM046 $sulA$	72h	$76,3{\pm}8,1$	$8,41{\pm}0,04$	$5,94{\pm}0,37$	$2,\!47{\pm}0,\!33$
Pseudomonas sp. LFM046 $sulA$ ara	48h	$76,6{\pm}0,3$	$6,\!31{\pm}0,\!01$	$4,83{\pm}0,01$	$1,\!48{\pm}0,\!01$
Pseudomonas sp. LFM046sulA ara	72h	$84,2{\pm}1,0$	$6,14{\pm}0,04$	$5,\!17{\pm}0,\!01$	$0,97{\pm}0,04$

Tabela 2 – Parâmetros de produção de PHA por *Pseudomonas* sp. LFM046 e *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA*determinados em ensaio de batelada alimentada.

Os cultivos em batelada alimentada de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* e *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* foram conduzidos por 72h. Foi adicionada L-arabinose (ara) na concentração 20 mM às 5h de cultivo. As massas secas celulares (MSC) foram pesadas após liofilização do cultivo. A partir do cultivo liofilizado foi medida a quantidade de PHA por meio de cromatografia gasosa, após reação de propanólise. A biomassa residual X_R é a diferença entre os valores de MSC e de PHA. Os valores representam médias e desvio padrão de duplicatas analíticas.



Figura 19 – Massa seca celular e teor de PHA de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA após cultivo de batelada alimentada. Os cultivos em batelada alimentada de Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA e Pseudomonas sp. LFM046:pJN105sulA foram conduzidos por 72h. Foi adicionada L-arabinose (ara) na concentração 20 mM às 5h de cultivo. As massas secas celulares (MSC) foram pesadas após liofilização do cultivo. A partir do cultivo liofilizado foi medida a quantidade de PHA por meio de cromatografia gasosa, após reação de propanólise. Os valores representam médias e desvio padrão de duplicatas analíticas.

microscopia de fluorescência. Na Tabela 2 podemos ver que o teor de PHA determinado para *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* foi maior com adição de L-arabinose, ou seja com a morfologia alterada, tanto às 48h quanto às 72h de cultivo. Porém, a concentração de PHA foi maior no cultivo controle, assim como a biomassa total. Os valores foram determinados a partir de duplicatas analíticas, por isso não é possível afirmar que a diferença entre esses valores seja significativa. Analisando a Figura 19, podemos ver que o teor de PHA determinado foi semelhante nas duas condições até 20h de cultivo aproximadamente,



Figura 20 – Imagens de microscopia de cultivos de *Pseudomonas* sp. LFM046:pJN105*sulA* com e sem adição de L-arabinose em biorreator. As amostras foram retiradas após 72h de cultivo em meio mineral com adição de L-arabinose (ara) 20 mM após 5h de cultivo ou sem adição, como indicado na figura. As amostras foram coradas com o corante de PHA Nile Red e analisadas em microscópio de fluorescência. Barra de escala de 3 µm.

nesse ponto as duas curvas se separam e vemos uma diferença entre elas, atingindo-se valores maiores com adição de L-arabinose. A diferença entre as curvas manteve-se até 48h de cultivo e na amostra final, às 72h de cultivo. Nas curvas de concentração de biomassa total no tempo de cultivo, a relação entre as duas condições está invertida, conforme os valores resumidos na tabela, discutidos acima. Podemos afirmar que nas duas condições, com e sem indução, o perfil de produção de biomassa total e de acúmulo de PHA foram diferentes, atingindo teores de PHA maiores com a morfologia alterada.

4 Discussão

A alteração da morfologia celular tem sido proposta como possível abordagem para melhorar a produção bacteriana de PHA e de compostos acumulados intracelularmente no geral (JIANG; CHEN, 2016). Esta estratégia tem sido testada para a produção de PHB por *E. coli* e bactérias do gênero *Halomonas* (WU; CHEN; CHEN, 2016; TAN et al., 2014). Este trabalho explorou o aumento do comprimento celular em *Pseudomonas* sp. LFM046. Diferentemente dos trabalhos anteriores, o tipo de PHA produzido é PHA_{mcl}, enquanto nos trabalhos anteriores testaram a produção de PHA_{scl}.

Modificando a morfologia celular pretende-se criar mais espaço disponível dentro da célula para o acúmulo de polímero. Quanto espaço ficará disponível é o que pretende ser estimado com ajuda do modelo matemático proposto neste trabalho. Ele descreve o efeito do aumento no comprimento celular na capacidade de acúmulo de PHA. Segundo o modelo, a variação na capacidade de acúmulo depende da variação nos componentes citoplasmáticos que não são PHA, os componentes internos (CI), com a variação de comprimento. Se os CI aumentam proporcionalmente ao aumento do volume citoplasmático, a capacidade de produção de PHA aumenta muito pouco (Hipótese A). Se os CI não aumentam com o aumento do comprimento, o aumento na capacidade de acúmulo de PHA é considerável (Hipótese B). Espera-se que o comportamento da célula, quando o comprimento é alterado, se encontre em um ponto intermediario entre os dois extremos. Contudo, este modelo apresenta limitações. Ele simplifica a célula bacteriana como sendo um cilindro rígido, quando na realidade ela tem um formato de um bastão arredondado, e não é rígida. Nos ensaios realizados neste trabalho observamos a mudança de diâmetro das células ao longo do cultivo e confirmamos que elas são mais largas no fim do cultivo quando comparado com células no final da fase exponencial, indicando que o citoesqueleto (espiral MreB) e envelope celular cedem à pressão exercida pelos grânulos acumulados no citoplasma. Interessantemente, as células filamentosas, independentemente do comprimento, ficaram com o mesmo diâmetro. A plasticidade da estrutura celular também foi observada experimentalmente nas células filamentosas, que curvaram-se e enrolaram-se, como mostram as microfotografias (Figura 13).

Além das simplificações espaciais, o modelo tem limitações conceituais. O modelo descreve apenas o espaço disponível na célula e a quantidade de PHA que poderia caber nesse espaço. Não prevê as interações que podem acontecer entre os componentes celulares. Quanto menos CI, mais PHA, sem levar em consideração que os CI são necessários para a produção de PHA. Existem várias formas de inibir a divisão celular e consequentemente aumentar o comprimento celular, uma delas é a inibição da síntese de DNA, a qual contribui para manter uma menor quantidade de CI. Com uma só cópia do cromossomo em uma

célula filamentosa, não só terá menos DNA ocupando espaço, mas a síntese de RNAs e proteínas será reduzida quando comparada com uma célula filamentosa com múltiplos cromossomos. Enquanto no modelo isso levaria a uma maior capacidade de acúmulo, uma menor quantidade e pior distribuição de enzimas ao longo da célula filamentosa poderia afetar a produção de PHA. Além de que um único cromossomo em uma célula filamentosa poderia não favorecer a produção de PHA pela disponibilidade de enzimas limitada e localizada, há a questão da distribuição espacial dos grânulos no citoplasma, já que os grânulos de PHA são associados ao DNA por meio de phasinas, como foi reportado em P. putida e R. eutropha (WAHL et al., 2012; GALÁN et al., 2011). Pensando nisso, seria interessante que o DNA se encontre espalhado por toda a célula para uma melhor distribuição deles.

A mudança de morfologia de *Pseudomonas* sp. LFM046 através da superexpressão de sulA permitiu controlar o comprimento celular. Embora nos ensaios em frascos agitados o teor de PHA não foi alterado pela alteração do comprimento celular, quando a fonte de carbono foi mantida em excesso através de adições de glicose no ensaio em biorreator, foi determinado um teor de PHA aumentado com expressão de sulA. No estudo anterior, em que foi superexpresso o gene sulA em E. coli (WANG et al., 2014), o teor de polímero reportado foi 27% e 12% da MSC com expressão de sulA e no controle, respectivamente. Este resultado foi obtido com E. coli BL21DE3 com pet28asulA e p15apCAB, para a síntese de polihidroxibutirato (WANG et al., 2014). Em este trabalho, no esaio de batelada alimentada, para Pseudomonas sp. LFM046sulA foram determinados teores de 84% e 70% com e sem indução da expressão de sulA, respectivamente. Estes resultados são compatíveis com as previsões do modelo, pois ele prevê uma capacidade de acúmulo que aumenta com o aumento do do comprimento. No modelo, a capacidade de acúmulo se aproxima em um valor máximo, o qual depende da hipótese considerada, e também é afetado pela densidade do polímero, sendo maior a densidade de PHB do que a densidade PHA_{mcl} . Contudo, o valor máximo não é afetado pelo teor de PHA nas dimensões originais, que corresponde ao controle dos experimentos. Então, com um teor de PHA menor no controle, o aumento do teor com o aumento do comprimento pode ser maior, quando comparado com uma cepa que já acumula um teor mais elevado nas dimensões originais. Para *Pseudomonas* sp. LFM046, o modelo prevê um acúmulo máximo de perto de 84% considerando a Hipótese B. Comparando as previsões do modelo com os resultados experimentais, podemos concluir que o conteúdo citoplasmático diferente de PHA, aqui chamado CI, não aumentou proporcionalmente ao aumento do comprimento. Como discutido acima, o tipo de modificação que levou ao aumento no comprimento pode influenciar a relação de volume de CI e de PHA. Quando o comprimento é aumentado por inibição da divisão celular via sulA, os resultados indicam que no fim do cultivo o PHA ocupa uma porção de espaço maior no citoplasma do que nas dimensões originais.

A regulação da síntese e consumo de PHA não está completamente elucidada, mas

já foram reportados vários mecanismos em produtoras de PHB e PHA_{mcl}, que incluem reguladores transcricionais codificados por genes do agrupamento pha assim como sistemas de regulação de transcrição global da célula, como fatores σ , e também sistemas de regulação pós-transcricional (LÓPEZ et al., 2015; RYAN et al., 2013). Contudo, sabemos que o número, tamanho e distribuiçã espacial dos granulos de PHA é controlado por phasinas tanto em P. putida quanto em C. necator (GALÁN et al., 2011; WAHL et al., 2012; WIECZOREK et al., 1995). Em C. necator foi reportado que, em cultivo em meio definido, o número de granulos não aumentou depois de 24h de cultivo, embora o teor de PHA ainda aumentasse 20% até 80h de cultivo. Esse resultado também apoia a visão de que a iniciação de granulos novos e o tamanho final dos granulos são eventos controlados, cuja regulação também não é elucidada, mas sabemos que as phasinas estão envolvidas. Em contraste, E. coli não possue regulação específica de produção de PHA, já que não é uma produtora natural, e nem possue phasinas. Interessantemente, há estudos anteriores onde a morfologia de E. coli é modificada ao contrário, diminuindo o comprimento celular e aumentos no teor de PHA acumulado também foram reportados. Nesse caso, tratava-se de E.coli XL1Blue, na qual havia sido observado um aumento espontaneo no comprimento quando genes heterologos eram expressos. Quando essa filamentação foi suprimida superexpressando ftsZ, foi reportado um aumento no teor de PHB em determinadas condições (LEE, 1994; CHOI; LEE, 1999).

Para testar o efeito de mudança morfológica em *Pseudomonas* sp. LFM046, foi usado o plasmídio pJN105, desenhado para a expressão de genes sob controle do promotor P_{BAD} em bactérias não entéricas (NEWMAN; FUQUA, 1999). Este plasmídio permitiu controlar a expressão de genes de forma precisa, sem vazamento, em *Pseudomonas* sp. LFM046, como demonstrado com a expressão de *gfp* e *sulA*. Anteriormente, a construção de um sistema de expressão de genes controlado havia sido estudada em *Pseudomonas* sp. LFM461, a cepa mutante deficiente na produção de PHA. Uma série de plasmídios chamados pCC foram desenvolvidos e testados sucessivamente nessa cepa. Os problemas encontrados foram em primeiro lugar, que o plasmídeo pCC1 era modificado por um evento de recombinação homóloga em Pseudomonas sp. LFM461, enquanto em E. coli MG1655 isso não acontecia. Em segundo lugar, a expressão dos genes alvo com e sem adição do indutor IPTG era a mesma. Isso levou à conclusão de que o sistema de regulação *lac* não é o adequado para *Pseudomonas* sp. LFM046 e cepas derivadas (CESPEDES, 2016). O estabelecimento do plasmídio pJN105 como ferramenta de expressão controlada de genes em uma das cepas modelo do grupo possibilita a realização de outros trabalhos que contribuam à caracterização dela e ao estudo da produção de PHAs.

Em conclusão, este trabalho estabeleceu um sistema de expressão controlada de genes para *Pseudomonas* sp. LFM046, comprovou que o comprimento celular desta cepa pode ser aumentado através da superexpressão do gene endógeno *sulA* e que o aumento no comprimento celular permite um acúmulo de PHA maior. Porfim, este aumento na

capacidade de acúmulo de PHA pode ser explicado pelo modelo matemático apresentado, considerando a Hipótese B, ou seja, que o PHA ocupa uma porcentagem do volume citoplasmático maior com o comprimento celular aumentado, quando comparado com o a porcentagem do volume ocupada nas dimensões originais da célula.

Referências

ADAMS, D. W.; ERRINGTON, J. Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature reviews. Microbiology*, Nature Publishing Group, v. 7, n. 9, p. 642–53, sep 2009. ISSN 1740-1534. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680248>. Citado na página 15.

Al Bahry, S.; SIVAKUMAR, N.; AL-KHAMBASHI, M. Effect of nalidixic acid on the morphology and protein expression of *Pseudomonas aeruginosa*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, Hainan Medical College, v. 5, n. 4, p. 265–269, 2012. ISSN 19957645. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60037-6. Citado na página 14.

AYUB, N. D. et al. The polyhydroxyalkanoate genes of a stress resistant Antarctic *Pseudomonas* are situated within a genomic island. *Plasmid*, v. 58, n. 3, p. 240–248, 2007. ISSN 0147619X. Citado na página 10.

AZIZ, R. K. et al. The RAST Server : Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC genomics*, v. 15, p. 1–15, 2008. Citado na página 13.

BAILEY, M. W. et al. Evidence for Divisome Localization Mechanisms Independent of the Min System and SlmA in *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2014. ISSN 15537404. Citado na página 16.

BERTANI, G. Studies on Lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli. J Bacteriol*, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951. ISSN 0021-9193. Citado na página 23.

BLAAUWEN, T. D. Prokaryotic cell division : flexible and diverse. *Current Opinion in Microbiology*, Elsevier Ltd, v. 16, n. 6, p. 738–744, 2013. ISSN 1369-5274. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.09.002>. Citado na página 16.

BRESAN, S.; JENDROSSEK, D. New Insights into PhaM-PhaC-Mediated Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1128/AEM>. Citado na página 12.

BRESAN, S. et al. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*, v. 6, n. May, p. 26612, 2016. ISSN 2045-2322. Disponível em: http://www.nature.com/articles/srep26612. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 11.

BRIGHAM; SINSKEY. Applications of Polyhydroxyalkanoates in the Medical Industry. International Journal of Biotechnology for Wellness Industries, p. 53–60, 2012. ISSN 1617253855. Citado na página 12.

CARDINALI-REZENDE, J. et al. Draft Genome Sequence of *Pseudomonas* sp . Strain LFM046 , a Producer of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate. *Genome Announcements*, v. 3, n. 4, p. 45–46, 2015. Citado na página 13. CESPEDES, L. G. Controle da composição do copolímero P3HB-co-3HHx por indução gradativa da expressão dos genes phaA e phaB em Pseudomonas sp. LFM461. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2016. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 46.

CHEN, G.-Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society reviews*, v. 38, n. 8, p. 2434–2446, 2009. ISSN 0306-0012. Citado na página 9.

CHEN, G.-Q.; HAJNAL, I. The 'PHAome'. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 10, p. 559–564, 2015. ISSN 01677799. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779915001584. Citado na página 8.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, v. 26, n. 33, p. 6565–6578, 2005. ISSN 01429612. Citado na página 9.

CHEN, Y.; MILAM, S. L.; ERICKSON, H. P. SulA inhibits assembly of FtsZ by simple sequestration mechanism. *Biochemistry*, v. 51, n. 14, p. 3100–3109, 2012. Citado na página 17.

CHOI, J.-i.; LEE, S. Y. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) [P(3HB)] with High P(3HB) Content by Recombinant *Escherichia coli* Harboring the Alcaligenes latus P(3HB) Biosynthesis Genes and the E. coliftsZ Gene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 9, n. 6, p. 722–725, 1999. ISSN 10177825. Citado na página 46.

De Eugenio, L. I. et al. The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the pha genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environmental Microbiology*, v. 12, n. 6, p. 1591–1603, 2010. ISSN 14622912. Citado na página 12.

DINIZ, S. C. et al. High-Cell-Density Cultivation of *Pseudomonas putida* IPT 046 and Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate Production From Sugarcane Carbohydrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 119, p. 51–69, 2004. Citado na página 13.

DOI, Y.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, v. 28, n. 14, p. 4822–4828, 1995. Disponível em: https://doi.org/10.1021/ma00118a007>. Citado na página 10.

DUCRET, A.; QUARDOKUS, E. M.; BRUN, Y. V. Microbej, a tool for high throughput bacterial cell detection and quantitative analysis. *Nature Microbiology*, Macmillan Publishers Limited SN -, v. 1, p. 16077 EP -, 06 2016. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.77 Citado na página 26.

EGAN, A. J. F.; VOLLMER, W. The physiology of bacterial cell division. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1277, p. 8–28, jan 2013. ISSN 1749-6632. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23215820. Citado 3 vezes nas páginas 15, 16 e 17.

ELHADI, D. et al. CRISPRi engineering E. coli for morphology diversification. *Metabolic Engineering*, 2016. ISSN 10967184. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 32.

ERICKSON, H. P. FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *trends in CELL BIOLOGY*, v. 7, p. 362–367, 1997. Citado na página 15.

FISCHER, H.; POLIKARPOV, I.; CRAIEVICH, A. F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Science*, v. 13, n. 10, p. 2825–2828, 2009. ISSN 09618368. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1110/ps.04688204>. Citado na página 29.

FUKUI, T. et al. Characterization of 13 kDa granule-associated protein in Aeromonas caviae and biosynthesis of polyhydroxyalkanoates with altered molar composition by recombinant bacteria. *Biomacromolecules*, v. 2, n. 1, p. 148–153, 2001. ISSN 15257797. Citado na página 10.

GALÁN, B. et al. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, v. 79, n. 2, p. 402–418, 2011. ISSN 0950382X. Citado 3 vezes nas páginas 12, 45 e 46.

GHOSAL, D. et al. MinCD cell division proteins form alternating copolymeric cytomotive filaments. *Nature Communications*, v. 5, n. 5341, p. 1–11, 2014. Citado na página 16.

GODIN, M. et al. Measuring the mass, density, and size of particles and cells using a suspended microchannel resonator. *Applied Physics Letters*, v. 91, n. 12, p. 17–19, 2007. ISSN 00036951. Citado na página 29.

GOMES, R. d. S. Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica. 100 p. Tese (Doutorado), 2009. Citado na página 20.

GOMEZ, J. G. C. Isolamento e caracterização de bactérias produtoras de polihidroxialcanoatos. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 1994. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 20.

GOMEZ, J. G. C. Produção por Pseudomonas sp de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos: Avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2000. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 20.

HOFFMANN, N.; REHM, B. H. A. Regulation of polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 237, n. 1, p. 1–7, 2004. ISSN 03781097. Citado na página 12.

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. Annual Reviews on Microbiology, v. 5, n. 6, p. 403–432, 2002. ISSN 10769757. Citado na página 8.

JENDROSSEK, D.; PFEIFFER, D. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly (3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 8, p. 2357–2373, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 8, 11 e 12.

JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, a.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, n. 5-6, p. 451–463, dec 1996. ISSN 0175-7598. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s002530050844>. Citado na página 8.

JIANG, X. et al. Engineering the bacterial Shapes for enhanced inclusion Bodies accumulation. *Metabolic Engineering*, Elsevier, v. 29, p. 227–237, apr 2015. ISSN 10967176. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717615000439. Citado na página 18.

JIANG, X. R.; CHEN, G. Q. Morphology engineering of bacteria for bio-production. 2016. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 44.

JIANG, X.-r.; CHEN, G.-q. Controlling cell volume for e ffi cient PHB production by Halomonas. *Metabolic Engineering*, Elsevier Inc., v. 44, n. September, p. 30–37, 2017. ISSN 1096-7176. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.09.004>. Citado na página 20.

JUENGERT, J. R. et al. Absence of ppGpp Leads to Increased Mobilization of Intermediately Accumulated Poly(3-Hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. v. 83, n. 13, p. 1–16, 2017. Citado na página 12.

KIM, D. Y. et al. Biosynthesis, Modification, and Biodegradation of Bacterial Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology*, v. 45, n. MAY, p. 87–97, 2007. Citado na página 9.

KOLLER, M.; NIEBELSCHÜTZ, H.; BRAUNEGG, G. Strategies for recovery and purification of poly[(R)-3-hydroxyalkanoates] (PHA) biopolyesters from surrounding biomass. *Engineering in Life Sciences*, v. 13, n. 6, p. 549–562, 2013. ISSN 16180240. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 32.

KONING, G. J. M. de; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(hydroxyalkanoates) from Pseudomonads Part 1: Solubilization. *Bioprocess Engineering*, v. 17, n. 1, p. 7, 1997. ISSN 0178515X. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s004490050345. Citado na página 14.

La Rosa, R. et al. The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environmental Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 278–290, 2014. ISSN 14622912. Citado na página 12.

LEE, S. Y. Supression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. *Biotechnology Letters*, v. 16, n. 12, p. 1247–1252, 1994. Citado na página 46.

LI, M. Z.; ELLEDGE, S. J. SLIC: A Method for Sequence- and Ligation- Independent Cloning. *Methods in molecular biology*, v. 852, p. 51–59, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-564-0. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.

LÓPEZ, N. I. et al. Polyhydroxyalkanoates: Much more than biodegradable plastics. *Advances in Applied Microbiology*, v. 93, p. 73–106, 2015. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216415000313. Citado 3 vezes nas páginas 8, 9 e 46.

MADIGAN, M. T. et al. *Brock Biology of Microorganisms*. [S.l.]: 14th Edition. Pearson, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 17 e 29.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of Poly (3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 9.

MÄNNIK, J. et al. Robustness and accuracy of cell division in *Escherichia coli* in diverse cell shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Academy of Sciences, v. 109, n. 18, p. 6957–6962, 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: http://www.pnas.org/content/109/18/6957. Citado 2 vezes nas páginas 16 e 17.

MATAVULJ, M.; SAD, N.; MOLITORIS, H. P. Biodegradation of polyhydroxyalkanoatebased plastic (BIOPOL) under different environmental conditions. *Regensburgische Botanische Gesellschaft*, v. 61, p. 735–749, 2000. Citado na página 8.

MINGORANCE, J. et al. Strong FtsZ is with the force: mechanisms to constrict bacteria. *Trends in microbiology*, v. 18, n. 8, p. 348–56, aug 2010. ISSN 1878-4380. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20598544>. Citado na página 15.

MONAHAN, L. G. et al. Division site positioning in bacteria : one size does not fit all. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, n. February, p. 1–7, 2014. Citado na página 17.

MRAVEC, F. et al. Accumulation of PHA granules in Cupriavidus necator as seen by confocal fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, n. April, 2016. Citado na página 13.

NATALE, P.; PAZOS, M.; VICENTE, M. Minireview The *Escherichia coli* divisome : born to divide. v. 15, p. 3169–3182, 2013. Citado na página 17.

NEWMAN, J. R.; FUQUA, C. Broad-host-range expression vectors that carry the -arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the araC regulator. *Gene*, v. 227, p. 197–203, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 46.

OBRUCA, S. et al. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) helps bacterial cells to survive freezing. *PLoS ONE*, v. 11, n. 6, p. 1–16, 2016. ISSN 19326203. Citado na página 8.

OLIVEIRA, E. R. Construção de mutantes de Pseudomonas abrigando diferentes PHA sintases em seu genoma, para produção de 3HB- co -3HA MCL. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2016. Citado na página 21.

OVERBEEK, R. et al. The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. v. 33, n. 17, p. 5691–5702, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 13 e 26.

PÖTTER, M. et al. Regulation of phasin expression and polyhydroxylkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, v. 148, n. 8, p. 2413–2426, 2002. ISSN 13500872. Citado na página 12.

PREUSTING, H. et al. Formation of polyester blends by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*: Different poly(3-hydroxyalkanoates) are stored in separate granules. *Journal of Environmental Polymer Degradation*, v. 1, p. 11–21, 1993. Citado na página 29.

PRIETO, A. et al. A holistic view of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida. Environmental Microbiology*, p. n/a–n/a, 2015. ISSN 14622912. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/1462-2920.12760>. Citado 5 vezes nas páginas 8, 10, 11, 12 e 13.

PRIETO, M. A. et al. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes. *Journal of Bacteriology*, 1999. ISSN 00219193. Citado na página 12.

QUEIROZ, S. R. D. S. Estudo do Metabolismo de Ácidos Graxos em Pseudomonas putida Visando à Modulação da Composição Monomérica de Elastômero Biodegradável. 98 p. Tese (Doutorado), 2007. Citado na página 20.

RAIGER-IUSTMAN, L. J.; RUIZ, J. A. The alternative sigma factor, RpoS, affects polyhydroxyalkanoate metabolism in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 284, n. 2, p. 218–224, 2008. ISSN 03781097. Citado na página 12.

RAMSAY, B. A. et al. Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids. Applied and Environmental Microbiology, v. 56, n. 7, p. 2093–2098, 1990. ISSN 00992240. Citado na página 23.

REHM, B. H. A. Polyester synthases : natural catalysts for plastics. *Biochemistry Journal*, v. 376, p. 15–33, 2003. Citado na página 10.

REINECKE, F.; STEINBÜCHEL, A. <i>ralstonia eutropha</i> strain h16 as model organism for pha metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 16, n. 1-2, p. 91–108, 2009. Disponível em: https://www.karger.com/DOI/10.1159/000142897. Citado na página 12.

REUSCH, R. N. The role of short-chain conjugated poly-(R)-3-hydroxybutyrate (cPHB) in protein folding. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 6, p. 10727–10748, 2013. ISSN 14220067. Citado na página 9.

RONCALLO, J. C. S. Avaliação da expressão de genes da via de Weimberg sobre o catabolismo de xilose na linhagem produtora de PHA_{MCL} Pseudomonas sp. LFM046. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2017. Citado na página 20.

RUIZ, J. A. et al. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 225–230, 2001. Citado na página 12.

RYAN, W. J. et al. Gacs-dependent regulation of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Pseudomonas putida* ca-3. *Applied and Environmental Microbiology*, American Society for Microbiology Journals, v. 79, n. 6, p. 1795–1802, 2013. ISSN 0099-2240. Disponível em: https://aem.asm.org/content/79/6/1795>. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 46.

SÁNCHEZ, R. J. et al. Medium-chain-length polyhydroxyalkanoic acids (PHAmcl) produced by *Pseudomonas putida* IPT 046 from renewable sources. *European Polymer Journal*, v. 39, n. 7, p. 1385–1394, jul 2003. ISSN 00143057. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014305703000193. Citado na página 13.

SCHINDELIN, J. et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved. SN -, v. 9, p. 676 EP -, 06 2012. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2019>. Citado na página 26.

SHRIVASTAV, A.; KIM, H.-Y.; KIM, Y.-R. Advances in the Applications of Polyhydroxyalkanoate Nanoparticles for Novel Drug Delivery System. *BioMed Research International*, v. 2013, n. 12, p. 1–12, 2013. ISSN 2314-6133. Disponível em: ">http://dx.doi.org/10.1155/2013/581684http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/581684http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/>">http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/581684/.

SILVA-QUEIROZ, S. R. et al. PHA(MCL) biosynthesis systems in *Pseudomonas* aeruginosa and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of biotechnology*, v. 143, n. 2, p. 111–8, aug 2009. ISSN 1873-4863. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19540884>. Citado na página 13.

STEINBÜCHEL, A. et al. Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. v. 41, n. 13, p. 94–105, 1995. Disponível em: <www.nrcresearchpress.com>. Citado na página 11.

STEINBÜCHEL, A.; LÜTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, n. 2, p. 81–96, nov 2003. ISSN 1369703X. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000366>. Citado na página 8.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, dec 2000. ISSN 00796700. Disponível em: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007967000000356>. Citado 3 vezes nas páginas 8, 10 e 11.

SUN, Z. et al. Fermentation process development for the production of medium-chain-length poly-3-hyroxyalkanoates. 2007. Citado na página 9.

TAN, D. et al. Engineering Halomonas TD01 for the low-cost production of polyhydroxyalkanoates. *Metabolic Engineering*, 2014. ISSN 10967184. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 44.

TEATHER, R. M.; COLLINS, J. F.; DONACHIE, W. D. Quantal behavior of a diffusible factor which initiates septum formation at potential division sites in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology Journals, v. 118, n. 2, p. 407–413, 1974. ISSN 0021-9193. Disponível em: https://jb.asm.org/content/118/2/407. Citado na página 16.

TIMM, a.; STEINBÜCHEL, a. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *European journal of biochemistry / FEBS*, v. 209, p. 15–30, 1992. ISSN 0014-2956. Citado na página 12.

WAHL, A. et al. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha. BMC microbiology*, v. 12, n. 1, p. 262, 2012. ISSN 1471-2180. Disponível em: ">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}tool=pmcentrez{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3556143{&}rendertype=ab>"">http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerendertype=ab</articlerendertype=ab>"""">http://www.pubmedcent

WANG, Y. et al. Engineering *Escherichia coli* for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic engineering*, Elsevier, v. 25, p. 183–93, sep 2014. ISSN 1096-7184. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25088357>. Citado 4 vezes nas páginas 14, 17, 32 e 45.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in alcaligenes eutrophus. *Journal of Bacteriology*, American Society for Microbiology Journals, v. 177, n. 9, p. 2425–2435, 1995. ISSN 0021-9193. Disponível em: https://jb.asm.org/content/177/9/2425. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 46.

WU, F. et al. Multi-color imaging of the bacterial nucleoid and division proteins with. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1–15, 2015. Citado na página 16.

WU, H.; CHEN, J.; CHEN, G. Q. Engineering the growth pattern and cell morphology for enhanced PHB production by *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology, Applied Microbiology and Biotechnology, p. 1–10, 2016. ISSN 14320614. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7715-1. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 44.

WU, H. et al. Enhanced production of polyhydroxybutyrate by multiple dividing E. coli. *Microb Cell Fact*, v. 15, 2016. Citado na página 18.

YORK, G. M.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. The *Ralstonia eutropha* PhaR Protein Couples Synthesis of the PhaP Phasin to the Presence of Polyhydroxybutyrate in Cells and Promotes Polyhydroxybutyrate Production. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 1, p. 59–66, 2002. Citado na página 12.

ZHANG, X.-C. et al. Engineering Cell Wall Synthesis Mechanism for Enhanced PHB Accumulation in E. coli. *Metabolic Engineering*, 2017. ISSN 10967176. Citado na página 19.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 1, p. 5–21, 2001. ISSN 0169409X. Citado na página 9.

Anexos

ANEXO A – Sequências de DNA usadas no trabalho

>RBS: 14 bp no FW primer

aggaggaaaaacat

>105G fw

 $cccgtttttttgggctagcg {\bf aggaggaaaaacat} ATGAGTAAAGGAGAAGAAC$

>105G rv

tggatcccccgggctgcaggCTATTTGTATAGTTCATCC

>105S fw

 $ctagcgaattcctgcagccc {\bf aggaggaaaaacat} ATGCAGTTCCCGCAGTCTC$

>105S rv

ctagaactagtggatcccccTCAGCCAGCAGAATGTTC

 $>\!\!sulA$ Pseudomonas sp. LFM046: 474 bp

>*gfp*: 717 bp

ATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAG ATGGTGATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTCAGTGGAGAGGGGTGAAGGTGATGC AACATACGGAAAACTTACCCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAAACTACCTGTTC CATGGCCAACACTTGTCACTACTTTGACTTATGGTGTTCAATGCTTTTCAAGATAC CCAGATCATATGAAACGGCATGACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATG TACAGGAAAGAACTATATTTTTTCAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGA AGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGAT TTTAAAGAAGATGGAAACATTCTTGGACACAAATTGGAATACAACTATAACTCAC ACAATGTATACATCATGGCAGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAA AATTAGACACAACATTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAA AATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCAC ACAATCTGCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAAGAGAGACCAACTATACCTTCT ${\bf AGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAATAG}$