

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Fernanda Laroza Paganelli**

**“Clonagem e expressão heteróloga dos genes responsáveis pela síntese de polihidroxibutirato em *Bradyrhizobium elkanii*”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Fernanda Laroza Paganelli e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular, na área de microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Wanderley Dias da Silveira

Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Campinas, 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

P14c

Paganelli, Fernanda Laroza  
Clonagem e expressão heteróloga dos genes responsáveis pela síntese de polihidroxibutirato em *Bradyrhizobium elkanii*. Fernanda Laroza Paganelli. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Wanderley Dias da Silveira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Poli-beta-hidroxibutirato. 3. Plástico biodegradável. 4. Rizóbio. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rodt/ib)

**Título em inglês:** Cloning and heterologous expression of genes responsible for synthesis of polyhydroxybutyrate in *Bradyrhizobium elkanii*.

**Palavras-chave em inglês:** *Escherichia coli*; Poly-beta-hydroxybutyrate; Biodegradable plastics; Rhizobium.

**Área de concentração:** Microbiologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Wanderley Dias da Silveira, Manoel Victor Franco Lemos, Marcelo Brocchi.

**Data da defesa:** 10/12/2009.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 10 de dezembro de 2009.

**BANCA EXAMINADORA**

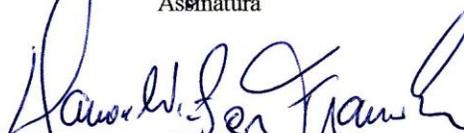
Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (Orientador(a))



---

Assinatura

Prof. Dr. Manoel Victor Franco Lemos



---

Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Brochhi



---

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Marcelo Palma Sircili

---

Assinatura

Prof(a). Dr(a) . Gerson Nakazato

---

Assinatura

*"O único homem que está isento de erros, é aquele que não arrisca acertar."*

*Albert Einstein*

**Aos meus pais,**

**Paulo Roberto Paganelli e Lethilde de Fátima Laroza Paganelli,**

**que são os grandes responsáveis pela realização desse sonho.**

**Obrigada por tudo; pelos ensinamentos, esforços, incentivo,**

**paciência, amor e pelo eterno apoio. Amo vocês.**

**Ao meu irmão,**

**Felipe Laroza Paganelli, eterno sonhador,**

**pelo amor, compreensão e por me ajudar a sempre sonhar mais alto.**

**DEDICO**

**Ao meu Marido,**

**Maurício Rocha Dimitrov, meu amigo e companheiro**

**em todos os momentos. Obrigada pelo amor, ajuda,**

**incentivo e compreensão. Você é muito especial. Amo você**

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, oportunidade, ensinamentos, confiança, apoio e amizade, que foram essenciais para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela orientação, oportunidade, amizade, incentivo, compreensão e confiança depositada.

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pela amizade, apoio, incentivo, imensa ajuda e ensinamentos, que levarei sempre comigo em minha vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez e à Profa. Dra. Luiziana Ferreira da Silva, pelo auxílio nas análises de cromatografia gasosa.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, em especial a: Cristiane Mobilon, Fernanda de Pace e Victor Maturana. Sem a amizade e ajuda de vocês a realização deste trabalho não seria possível.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas.

Às minhas eternas amigas que caminharam comigo desde a infância e participaram de toda essa trajetória: Viviane de Souza Morita, Cristina Alessi e Camila Sitta Laffranchi.

Ao Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/IB-UNICAMP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

## RESUMO

Polihidroxialcanoatos (PHAs) são polímeros de hidroxialcanoatos produzidos, e acumulados, intracelularmente, como fonte de carbono e/ou outros materiais energéticos, em vários microorganismos. Frequentemente, o acúmulo dos PHAs ocorrem em condições abaixo do limite nutricional de elementos como N, P, S, O ou Mg e excesso de carbono, podendo representar até 80% da massa seca total da célula. Mais de 300 diferentes microorganismos podem sintetizar e acumular PHAs. O polihidroxibutirato (PHB) é o mais conhecido dentre os polímeros bacterianos biodegradáveis denominados polihidroxialcanoatos. Por ter propriedades semelhantes ao polipropileno, o PHB pode ser usado na fabricação do plástico biodegradável. Além da busca por maior produção de tal polímero, pouco é conhecido sobre seu papel biológico, em especial nos rizóbios. Estudos revelaram que há variação na capacidade da produção e acúmulo de PHB nessas bactérias quando em simbiose, dependendo da espécie em questão e das condições de cultivo das mesmas, observando-se bactérias incapazes de acumular PHB quando bacterioides, como é o caso do *Rhizobium meliloti*, ou capazes de produzir e acumular PHB, nessas condições, como é o caso de *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*. Desta forma, este trabalho teve por objetivo a identificação dos genes responsáveis pela síntese de PHB em *Bradyrhizobium elkanii*, clonagem e expressão dos mesmos em *Escherichia coli*, uma vez que esta bactéria é bem conhecida como ferramenta molecular e se multiplica rapidamente, podendo atingir uma alta produção do polímero esperado, em um curto período de tempo. Além disso, objetivou-se, também, aumentar a produção de PHB em *B. elkanii* através de mutações aleatórias (através da inserção do transposon

TnphoA), já que esta é uma bactéria naturalmente produtora de PHB. Para isso, os genes *phbA*, *phbB* e *phbC* foram isolados através da técnica de PCR, amplificando-se os genes inteiros. Estes foram clonados em vetores de expressão tipo pET (NOVAGEN), sendo os genes *phbA* e *phbB* clonados em “operon” em um mesmo vetor e o gene *phbC* clonado separadamente. A expressão dos genes foi analisada, bem como sua capacidade de produzir PHB. Os mutantes de *B. elkanii* obtidos através da inserção do transposon TnphoA foram analisados com o uso do corante Sudan Black, procurando-se selecionar linhagens maiores produtoras de PHB. A produção dos mutantes selecionados foi, posteriormente, analisada por cromatografia gasosa.

Observou-se que a linhagem de *E. coli* com os três genes clonados teve a capacidade de produzir PHB, porém com baixa eficiência. Já os mutantes aleatórios de *B. elkanii* apresentaram diferentes acúmulos em relação ao selvagem, com destaque para o MUT33 que teve 72% da sua massa seca acumulada na forma de PHB, enquanto o selvagem acumulou 51% de PHB, nas mesmas condições.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polymers of hydroxyalkanoate acids, produced and accumulated intracellularly as a source of carbon and energy storage material, in prokaryotic cells. Often, the PHAs accumulation occurs in conditions when the carbon source is in excess but one or several other nutrients are limited, and may represent up to 80% of the cell dry weight. More than 300 different microorganisms can synthesize and accumulate PHAs. The polyhydroxybutyrate (PHB) is the most studied polymer among the bacterial biodegradable polymers (PHAs). By having properties similar to polypropylene, PHB can be used in the manufacture of biodegradable plastic. On the search for greater production of such polymer, little is known about its biological role, especially in the genus *Rhizobium*. Studies have shown that there is a variation in the PHB capacity production and accumulation when these bacteria are in symbiosis. Depending on the species and cultivation conditions it has been observed either incapacity of PHB production and accumulation, when Bacteroides, as *Rhizobium meliloti*; or capacity and accumulation of PHB under bacteroides fase, as *Rhizobium etli*, *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii*. Therefore, the present work aimed the identification, cloning and expression, in *Escherichia coli*, of responsible genes for PHB synthesis in *Bradyrhizobium elkanii*. Moreover, it was also expected to increase the production of PHB in *B. elkanii*, through random mutations (insertion of the TnphoA transposon), since *B. elkanii* is a good natural producer of PHB. For this, the entier *phbA*, *phbB* and *phbC* genes were isolated by PCR. Those genes were cloned in expression vectors such pET (NOVAGEN), where *phbA* and *phbB* genes were cloned in operon, in a single vector, whereas *phbC* gene was cloned

separately, in another vector. The expression of those genes was analyzed, as well as its ability to produce PHB. Mutants *B. elkanii*, obtained by insertion of the TnphoA transposon, were analyzed using the dye Sudan Black, in order to select different strains that might produce higher quantities of PHB. The production of PHB by mutants was then analyzed by gas chromatography.

It was observed that the *E. coli* with the three cloned genes had the ability to produce PHB, but with low efficiency. The *B. elkanii* random mutants show different accumulation compared to the wild, especially MUT33 that had 72% of its dry mass accumulated in the form of PHB, while the wild 51% of accumulated PHB under the same conditions.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>20</b>
2.1. Os polihidroxicanoatos (PHA).....	20
2.2. O polihidroxitirato (PHB).....	20
2.3. Vias de síntese e degradação do PHB.....	22
2.4. A biodegradação e as vantagens do uso do PHB.....	24
2.5. Os empecilhos do uso do PHB.....	26
2.6. O uso da engenharia genética para produção de PHB.....	26
2.7. Os rizóbios.....	28
2.8. Produção de PHB em rizóbios.....	29
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1. Expressão heteróloga dos genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> e <i>phbC</i> em <i>E. coli</i> .....	33
4.1.1. Linhagens bacterianas, plasmídios e cultivo.....	33
4.1.2. Meios de cultura utilizados.....	34

4.1.3. Extração de DNA genômico.....	34
4.1.4. Extração de DNA plasmidial.....	35
4.1.5. Construção de iniciadores para isolamento dos genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> e <i>phbC</i> .....	35
4.1.6. Purificação do produto da PCR.....	37
4.1.7. Clonagem dos produtos de PCR em pGEM-T easy (PROMEGA).....	37
4.1.8. Obtenção de vetor de expressão contendo a seqüência codificante dos genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> isolados de <i>B. elkanii</i> e <i>phbC</i> isolado de <i>B. japonicum</i> .....	37
4.1.9. Bactérias quimiocompetentes de <i>E. coli</i> e transformação.....	38
4.1.10. Transformação de células competentes por choque térmico, seleção e estoque de clones recombinantes.....	39
4.1.11. Seqüenciamento.....	40
4.1.12. Extração de RNA e confecção de cDNA.....	41
4.1.13. Teste de expressão.....	41
4.1.14. Extração de proteínas totais.....	42
4.1.15. Preparação da resina Ni-NTA Superflow (QIAGEN).....	42
4.1.16. Purificação do sobrenadante através de cromatografia de afinidade.....	42
4.1.17. Gel SDS-PAGE para verificação da expressão e purificação da proteína.....	43

4.2. Obtenção de mutantes aleatórios de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	44
4.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídios e cultivo.....	44
4.2.2. Meios de cultura utilizados.....	45
4.2.3. Teste de resistência a antibióticos (MIC – Concentração inibitória mínima).....	46
4.2.4. Produção de mutantes aleatórios pelo <i>transposon TnphoA</i> através de conjugação...	46
4.2.5. Triagem dos mutantes produtores de PHB.....	47
4.3. Dosagem de PHAs produzidos.....	47
4.4. Análise de PHAs produzidos.....	48
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
5.1. Expressão heteróloga dos genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> e <i>phbC</i> em <i>E. coli</i> .....	50
5.1.1. Projeto genoma <i>B. elkanii</i> .....	50
5.1.2. Extração de DNA genômico.....	50
5.1.3. Padronização das reações de PCRs.....	51
5.1.4. Clonagem do produto de PCR em vetor pGEM-T easy (PROMEGA).....	52
5.1.5. Digestão dos clones.....	54
5.1.6. Clonagem do <i>operon phbAB</i> e gene <i>phbC</i> em vetor de expressão pET28a (NOVAGEN).....	55
5.1.7. Construção clones <i>E. coliABC</i> .....	58

5.1.8. Confirmação dos clones.....	58
5.1.9. Seqüenciamento dos genes.....	59
5.1.10. Teste de expressão (RT-PCR).....	60
5.1.11. Teste de expressão (proteína).....	62
5.1.12. Purificação do sobrenadante através de cromatografia de afinidade.....	63
5.2. Obtenção de mutantes aleatórios de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> .....	65
5.2.1. Teste de resistência a antibióticos (MIC).....	65
5.2.2. Produção de mutantes aleatórios pelo <i>transposon TnphoA</i> através de conjugação...	65
5.2.3. Triagem dos mutantes produtores de PHB.....	66
5.3. Dosagem e análise de PHAs produzidos.....	67
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>

## INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados para a construção de <i>E. coli</i> recombinante.....	33
Tabela 2. Iniciadores utilizados para o isolamento dos genes <i>phbA</i> , <i>phbB</i> e <i>phbC</i> .....	36
Tabela 3. Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados para a produção de mutantes aleatórios de <i>B. elkanii</i> .....	44
Tabela 4. Análise da produção de PHAs nos clones de <i>E. coli</i> e nos mutantes de <i>B. elkanii</i> .....	68

## INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral dos PHAs.....	21
Figura 2. Perfil eletroforético de DNA genômico de <i>B. elkanii</i> e <i>B. japonicum</i> em gel de agarose 1%.....	51
Figura 3. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para o <i>operon phbAB</i> e o gene <i>phbC</i> em gel de agarose 1%.....	52
Figura 4. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pGEM-T easy <i>operon phbAB</i> em gel de agarose 1%.....	53

Figura 5. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pGEM-T easy <i>phbC</i> em gel de agarose 1%.....	53
Figura 6. Perfis eletroforéticos dos plasmídios digeridos referentes à construção em pGEM-T easy em gel de agarose 1%.....	54
Figura 7. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pETAB em gel de agarose 1%.....	56
Figura 8. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pETAMPC em gel de agarose 1%.....	57
Figura 9. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes aos clones <i>E. coliABC</i> em gel de agarose 1%.....	58
Figura 10. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para os clones <i>E. coliAB</i> , <i>E. coliC</i> e <i>E. coliABC</i> em gel de agarose 1%.....	59
Figura 11. Perfis eletroforéticos dos produtos de RT-PCR para os clones <i>E. coliAB</i> e <i>E. coliABC</i> em gel de agarose 1%.....	61
Figura 12. Gel SDS-PAGE a 12%. Extração das proteínas <i>phbA</i> e <i>phbB</i> segundo o teste de expressão.....	62
Figura 13. Gel SDS-PAGE a 12%. Extração das proteínas <i>phbC</i> segundo o teste de expressão.....	63
Figura 14. Gel SDS-PAGE a 12%. Purificação das proteínas Acetoacetil Kinase ( <i>phbA</i> ), acetoacetil reductase ( <i>phbB</i> ) e <i>phbC</i> sintase ( <i>phbC</i> ) em coluna de níquel.....	64
Figura 15. Mutantes de <i>B. elkanii</i> , testados para o acúmulo de PHB com Sudan Black....	67

## 1. INTRODUÇÃO

Os polímeros sintéticos (plásticos), atualmente, fazem parte do cotidiano da espécie humana, estando presente em, praticamente, todos os seus aspectos e que devido às suas características de degradação constituem-se um dos maiores desafios ambientais.

No ano de 2000, o Brasil produziu aproximadamente 23 mil toneladas de lixo/dia, sendo que, em média, 20% desse volume corresponde aos plásticos (COUTINHO et *al.*, 2004). Estima-se, ainda, que o consumo mundial de plástico chegue a 140 milhões de toneladas/ano, sendo necessários 150 milhões de toneladas de combustível fóssil para a sua produção (SURIYAMONGKOL et *al.*, 2007). Desta forma, torna-se essencial o desenvolvimento de alternativas que possam compatibilizar a praticidade do uso dos materiais plásticos e o desenvolvimento sustentável, permitindo o consumo e a conveniência, sem comprometer os recursos do planeta. Visto que o período para a degradação dos plásticos é 40-50 anos, podendo chegar até a 200 anos no caso dos polímeros sintéticos (BOHMERT et *al.*, 2002), somado ao montante de resíduos plásticos no lixo gerado, e a quantidade de combustível fóssil necessária para a sua produção, torna-se clara a urgência de adoção de alternativas ao uso destes materiais.

Uma das possíveis alternativas é a substituição dos polímeros de origem petroquímica pelos polihidroxicanoatos (PHAs). Os PHAs são poliésteres microbianos sintetizados e acumulados intracelularmente por diversas espécies bacterianas. Estes possuem importantes propriedades termoplásticas que permitem sua aplicação em diversas áreas, como fabricação de embalagens, garrafas, filmes, fibras, produtos de higiene, pinos e

suturas cirúrgicas, sistemas de liberação controlada de drogas e medicamentos, de inseticidas, entre outras. São insolúveis em água, enantioméricos puros, não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis (STEINBÜCHEL e EVERSLOH, 2003), sendo produzidos, assim, a partir de matéria prima renovável. No entanto, apesar das vantagens para o ambiente, a produção em larga escala dos plásticos biológicos é mais cara quando comparada à produção dos plásticos de origem petroquímica. Apesar disso, o Brasil por ser um dos maiores produtores de fontes de carbono renováveis, muitas das quais utilizadas como matéria prima para a produção de PHAs, apresenta grande potencial para a produção destes biopolímeros com um custo compatível (PRADELLA, 2006) quando comparado com o custo a partir dos combustíveis fósseis.

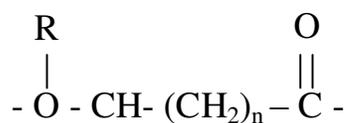
Assim, com o objetivo de se viabilizar, de maneira competitiva, a produção de PHAs, fazem-se necessárias pesquisas que identifiquem novos organismos produtores, novas vias metabólicas e desenvolvimentos de linhagens capazes de produzir de maneira econômica os referidos PHAs.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Os polihidroxicanoatos (PHA)**

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres microbianos sintetizados e acumulados intracelularmente em condições de estresse ambiental, e em altas concentrações de carbono (LENZ e MARCHESSAULT, 2005), sendo considerados como fonte de reserva energética para a bactéria.

Os PHAs são biopolímeros que possuem propriedades semelhantes aos termoplásticos. As propriedades físicas e mecânicas desses materiais dependem da composição monomérica, do peso molecular e de sua distribuição, sendo estas influenciadas, diretamente, pela variação do grupamento R e pela posição do grupo carbonila (n) (Figura 1) (FREITAS, 2007). O peso molecular do polímero depende do organismo que o produz e das condições de cultivo, podendo variar de  $6 \times 10^3$  até  $2 \times 10^5$  KDa (CARMINATTI *et al.*, 2006).



		Hidrogênio		Poli (3-hidroxiacetato)
		Metil		Poli (3-hidroxiacetato)
		Etil		Poli (3-hidroxiacetato)
		Propil		Poli (3-hidroxiacetato)
		Pentil		Poli (3-hidroxiacetato)
n = 1	→ R =	Nonil		Poli (3-hidroxiacetato)
		Propil- cloro		Poli (3-hidroxiacetato)
n = 2	→ R =	Hidrogênio	→	Poli (4-hidroxiacetato)
n = 3	→ R =	Hidrogênio	→	Poli (5-hidroxiacetato)

Figura 1. Estrutura geral dos PHAs

Os microrganismos produtores de PHAs podem ser classificados quanto à influência do substrato na produção do polímero e ao tipo de monômeros que podem incorporar (monômeros de cadeia curta ou longa). Quanto à influência do substrato, em alguns casos, os monômeros de PHA produzidos estão relacionados ao substrato fornecido ao meio de cultivo, como por exemplo, o uso de ácido propiônico para produção de poli-hidroxiacetato. Neste caso, a classificação empregada é de biossíntese de PHA a partir de substrato relacionado. Por outro lado, existem bactérias capazes de produzir unidades monoméricas diferentes de P3HB a partir de substratos simples como glicose e sacarose,

dispensando substratos mais específicos, sendo classificados como biossíntese de PHA a partir de substratos não relacionados (STEINBUCHER, 1996; HOLTWICK et al., 1997).

Quanto aos monômeros que podem ser incorporados, existe um grupo de bactéria que incorpora apenas monômeros de cadeia curta, chamados de HAScl, como é o caso de *Raustonia eutrophus*, e outro grupo que incorpora apenas monômeros de cadeia média, chamados de HAMcl, como é o caso de *Pseudomonas* (CARMINATTI, et al., 2006).

## **2.2. O Polihidroxibutarato (PHB)**

O polihidroxibutarato (PHB) é o polímero do grupo dos PHAs mais estudado, depois da sua descoberta no organismo *Bacillus megaterium* (LEMOIGNE, 1926). Essa molécula possui propriedades muito semelhantes aos polipropilenos, sendo utilizado industrialmente na produção de plástico biodegradável. O interesse sobre o PHB cresce cada vez mais pelas vantagens que apresenta sobre o plástico convencional, derivado do petróleo, e pelas exigências cada vez mais severas no controle de poluição, principalmente para os países desenvolvidos. Dentre as vantagens do uso do PHB destaca-se, principalmente, a biodegradação que o mesmo sofre na natureza. Na forma de plástico biodegradável este se decompõe em uma grande diversidade de ambientes, liberando apenas água e gás carbônico em ambientes aeróbios, sendo que em 60 semanas pode se alcançar 100% de degradação. Já em ambientes anaeróbios a degradação total se dá em seis semanas, porém produzindo além de água e gás carbônico, gás metano (CARMINATTI et al., 2006).

O uso do PHB está centrado na fabricação de produtos de rápido descarte, como barbeadores, embalagens de cosméticos, copos e talheres plásticos. Outra aplicação promissora do PHB é na área médica humana e veterinária, em cápsulas gelatinosas para a ingestão de medicamentos ou na forma de pinos, fios, suturas e enxertos ósseos, materiais estes que poderiam ser assimilados naturalmente pelo organismo (MORENO, 2003).

### **2.3. Vias de síntese e degradação do PHB**

A via metabólica pela qual o PHB é sintetizado consiste de três reações (MADISON e HUISMAN, 1999). A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil – CoA em uma de acetoacetil – CoA, reação catalisada pela enzima beta – cetoacil – CoA transferase (EC 2.3.1.9), codificada pelo gene *phbA*. A segunda reação é a redução da molécula de acetoacetil – CoA para (R) – 3 – hidroxibutiril - CoA, reação dependente de NADPH e catalisada pela enzima acetoacetil – CoA redutase (EC 1.1.1.36), codificada pelo gene *phbB*. Na terceira e última reação, os monômeros de (R) – 3 – hidroxibutiril .- CoA são polimerizados em poli (3-.hidroxibutirato) pela enzima P(3HB) sintase (EC 2.3.1), codificada pelo gene *phbC*.

Apesar dos genes responsáveis pela síntese de PHB codificarem, basicamente, as mesmas enzimas para a maioria dos organismos, a organização no genoma varia de acordo com a espécie do microrganismo. *Cupriatus necator*, *Burkholderia sp.* e *Alcaligenes latus* apresentam os três genes em operon, podendo variar apenas a ordem entre eles, mas estando juntos no cromossomo bacteriano, como por exemplo em *C. necator* onde os genes *phbA*, *phbB* e *phbC* estão organizados em um operon *phaCAB* (SCHUBERT et al., 1988;

SLATER et al., 1988; PEOPLES e SINSKEY, 1989). Já em bactérias como *Caulobacter crescentus*, *Rhizobium etli*, *Paracoccus denitrificans* e *Methylobacterium extorquens*, o gene *phbC*, responsável por codificar a enzima PHB sintase, não está localizado no mesmo operon que os genes *phbA* e *phbB*, os quais são coordenados por um único promotor (REHM, 2003).

Da mesma forma, a via de degradação do PHB também é catalisada por três enzimas. Primeiro, o PHB é quebrado em 3-hidroxi-butirato pela ação da enzima PHB depolimerase (EC3.1.1.75) codificada pelo gene *phbD*. Em seguida, a enzima 3-hidroxi-butirato desidrogenase (EC 1.1.1.30), codificada pelo gene *bdhA*, oxida o 3-hidroxi-butirato em acetoacetato. Por fim, o acetoacetato é convertido em acetil-CoA pelas enzimas acetoacetil-CoA transferase (EC 6.2.1.1) e beta – cetoacil – CoA tiolase (EC 6.2.1.1), sendo que esse será metabolizado pelo ciclo do ácido cítrico ou pelo ciclo do glicoxalato (SENIOR e DAVES, 1973).

#### **2.4. A biodegradação e as vantagens do uso do PHB**

A biodegradação consiste na degradação dos materiais poliméricos através da ação de organismos vivos. Segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* (ASTM-D-883), polímeros biodegradáveis são polímeros que podem ser degradados primariamente pela ação de microorganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural (RAGHAVAN, 1995). Em geral, derivam desse processo CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>,

componentes celulares microbianos e outros produtos. Neste sentido, vários polímeros têm sido estudados para aplicação em diversos processos.

O plástico convencional é largamente utilizado no mundo e no Brasil e, como em outros países, o seu descarte representa sério problema ambiental. Neste sentido, o plástico biodegradável é uma opção correta, pois pode ser destruído por microrganismos do próprio meio transformando-se totalmente em gás carbônico e água, sem a geração de resíduos tóxicos, ao contrário dos polímeros de origem petroquímica. Além disso, por se tratar de uma matéria-prima orgânica, o polímero pode ser utilizado também para a criação de produtos médicos, como material de sutura e pequenas próteses, pois diminuiria os riscos de rejeição pelo organismo humano (SANTOS, 2006). O polihidroxibutirato vai atender aos requisitos de uma área específica de mercado, pois muitas empresas reconhecem que ter um produto feito com plástico biodegradável é um diferencial importante. Atualmente, pode-se observar a aplicação de vários estudos com PHB. Uma indústria canavieira em Serrana está produzindo 60 toneladas do polímero por ano, sendo que quase a totalidade da produção destina-se à exportação. Outro ponto positivo do uso do PHB como plástico biodegradável, é que em estudo realizado por ROSA *et al.* (2002) verificou-se que, em relação a outros polímeros biodegradáveis, como poli-b-(hidroxibutirato-co-valerato) (PHB-V) e o poli-( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), o PHB é o que tem degradação mais rápida em solo compostado, o que é favorável à conservação ambiental.

## **2.5. Os empecilhos do uso do PHB**

Um dos maiores empecilhos para o uso comercial do PHB para a fabricação de plásticos biodegradáveis é seu alto custo de produção, que gira em torno de 2,5 dólares/quilo, enquanto, os polímeros convencionais custam em torno de 0,5 a 1,0 dólar/quilo (<http://www.ipt.br/institucional/imprensa/midia/?ID=260> acesso 30 de setembro de 2009). Desta maneira, uma das alternativas utilizadas são misturas poliméricas biodegradáveis (sintéticas ou não) que consistam numa mistura física de dois ou mais tipos de materiais poliméricos ou copolímeros que não são ligados por ligações covalentes (STEVENS, 1999). Nesse sentido, um dos produtos utilizados é o amido, que vem despertando interesse por ser um produto de fácil acesso e também por liberar CO<sub>2</sub> para a atmosfera quando incinerado (BAGLEY *et al.*, 1997; GOGOLEWSKI *et al.*, 1993).

## **2.6. O uso da engenharia genética para produção de PHB**

Para a redução do custo de produção do PHB, vários pesquisadores fizeram o uso de técnicas de biologia molecular, traçando diversas estratégias, como por exemplo, modificações na via metabólica do ciclo do ácido tricarboxílico, ou mesmo na própria via de síntese do PHB. Outra alternativa, foi o aumento na atividade das enzimas de biossíntese do PHB por amplificação do gene (PARK e LEE, 1996; KABIR e SHIMIZU, 2003; LEE *et al.*, 2003; TAGUCHI *et al.*, 2003).

Os genes envolvidos na síntese do PHB têm sido analisados extensivamente por técnicas bioquímicas e forneceram indícios sobre a regulação do processo (MADISON e HUISMAN, 1999). Foi investigada a participação dos genes *glnB*, *glnZ*, e *glnD* na regulação da biossíntese do PHB. Observou-se que os mutantes para estes genes produzem quantidades substancialmente mais elevadas de PHB do que as bactérias do tipo selvagem (SUN et al., 2002).

Por outro lado, clonagem do gene *phbC1* de *Pseudomonas sp* e *phbAB* de *Wautersia eutropha*, com diferentes promotores em *W. eutropha phb* negativa, mostraram que esta adquire a capacidade de produzir PHB, porém o tipo de promotor influenciou diretamente na quantidade de polímero produzido e a constituição deste, sendo que o promotor *Pphb* de *W. eutropha* apresentou as melhores porcentagens de PHB por massa seca de célula, segundo DELAMARRE e BATT (2006)

Outra estratégia utilizada pelos pesquisadores foi a clonagem dos genes responsáveis pela via de síntese do PHB em *Escherichia coli*, visto que esta é uma bactéria que não produz naturalmente PHB, mas é muito bem conhecida e utilizada como ferramenta genética, tornando-se fácil a sua manipulação genética e conseqüentemente a expressão de genes heterólogos (ALDOR e KEASLING, 2003). Além disso, *E. coli* se multiplica rapidamente, apresentando uma alta densidade celular, em um curto período de tempo e com uma fonte de carbono acessível, já que são capazes de metabolizar glicose (SHILOACH e FASS, 2005). Entretanto, alguns estudos realizados com *E. coli* recombinante, mostraram baixa eficiência no acúmulo de PHB tanto em escala laboratorial como em industrial (HUANG et al., 2006). Isto pode ser devido a *E. coli* não possuir toda a

maquinaria biossintética necessária para a produção de PHB, sobrecarregando a maquinaria da célula para tal produção.

## 2.7. Os rizóbios

O nitrogênio é considerado o elemento químico mais importante para a produtividade agrícola tropical. Sua forma mais abundante se encontra no estado gasoso ( $N_2$ ), constituindo cerca de 80% da atmosfera, porém não podendo, nesta forma, ser utilizado diretamente pelas plantas. Entretanto, bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, que apresentem características de associações simbióticas com leguminosas, podem fixar o nitrogênio ( $N_2$ ) diretamente da atmosfera reduzindo-o a amônia ( $NH_3$ ), que será assimilada em aminoácidos e proteínas pelas plantas hospedeiras. As associações melhor compreendidas incluem bactérias Gram-negativas da família *Rhizobiaceae* (ZAHN, 1999). Esta simbiose é responsável pela maior parte do fluxo global de nitrogênio atmosférico fixado nas formas de amônia, nitrato e compostos orgânicos.

As bactérias conhecidas, anteriormente, como sendo da família *Rhizobiaceae* estão, atualmente, segundo o Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (GARRITY et al., 2006) divididas em: *Rhizobiaceae* (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*), *Phyllobacteriaceae* (*Mesorhizobium*), *Bradyrhizobiaceae* (*Bradyrhizobium*) e *Hyphomicrobiaceae* (*Azorhizobium*).

A espécie *Bradyrhizobium elkanii* foi determinada por KUYKENDAL et al. (1992) e, assim como *Bradyrhizobium japonicum*, normalmente induz a formação de nódulos em espécies de plantas de soja (*Glycine*) e siratro (*Macroptilium atropurpureum*). As linhagens

brasileiras SEMIA 5019 (29W) e SEMIA 587 foram classificadas como pertencentes à espécie *B. elkanii* considerando-se a similaridade de seqüências 16S rDNA e a reatividade de anticorpos contra sorogrupos das linhagens internacionais, USDA76 e USDA 31 (RUMJANEK et al., 1993). Dessa forma, a linhagem SEMIA 587, que será utilizada neste estudo, perante a classificação atual, está incluída na nova família Bradyrhizobiaceae (GARRITY et al., 2006).

## **2.8. Produção de PHB em rizóbios**

Rizóbios como *Rhizobium leguminosarum* e *Rhizobium meliloti* são capazes de sintetizar uma série de polímeros que, além de serem utilizados como fonte de carbono pela bactéria, apresentam importante papel na indústria. Entre outras, essas bactérias sintetizam glicanas cíclicas (BREEDVELD et al., 1993) que podem ser usadas em produtos alimentícios e farmacêuticos (LINTON et al., 1991).

PAGANELLI (2007) demonstrou que a fonte de carbono fornecida no meio de cultivo está diretamente relacionada à produção de polihidroxibutirato. Quando sacarose é utilizada como fonte de carbono, o acúmulo de PHB em *R. hualtlense*, *Bradyrhizobium sp.* e *R. leguminosarium* é muito maior do que com a utilização de glicerol, o que foi confirmado após a análise da expressão do gene *phbC* por técnica de PCR em tempo real nesses organismos, sendo que a bactéria *R. hualtlense* apresentou a maior expressão de tal gene com respectivo acúmulo, em especial após 144h de cultivo.

A relação entre a produção de PHB em linhagens de rizóbio, em vida livre ou em simbiose, é específica para cada espécie dessas bactérias. *R. meliloti* é uma das espécies de

rizóbio que não acumula PHB quando em simbiose e, com isso, em mutantes que são incapazes de produzir PHB em vida livre, não há alterações na simbiose com alfafa. Já mutações feitas no gene *phbC* de *R. etli*, fazendo com que esse organismo não produza mais PHB, mostraram causar alterações em várias áreas do metabolismo desse organismo, como por exemplo o aumento dos níveis de excreção de ácidos orgânicos e acúmulo de glicogênio, aumento na concentração intracelular de nucleotídeos e aumento da fixação de nitrogênio, o que é justificável por esse organismo ter a capacidade de não produzir PHB quando em simbiose, já que há competição entre as duas vias (CEVALLOS et al., 1996).

Comprovada essa hipótese, em mutantes de *B. japonicum*, nos genes *nifD*, *nifK*, e *nifH*, há um aumento expressivo do acúmulo de PHB, o que mostra a competição entre essas duas vias, já que o *B. japonicum* também acumula PHB quando em simbiose.

Em bacteróides de *B. elkanii* foram encontrados por MARCONDES et al. (2008) expressão dos genes *phbC* e *glgA*, indicando a síntese e acúmulo das reservas de polihidroxibutirato (PHB) e glicogênio, respectivamente. O metabolismo do PHB por bacteróides pode ter papel regulatório na captura de carbono a agentes redutores a partir do ciclo TCA, sob condições microaeróbicas, impedindo a inibição enzimática pelo acúmulo de redutores e balanceando a quantidade de carbono metabolizado. O metabolismo do glicogênio pode ter papel semelhante ao do PHB, ocorrendo inclusive um fluxo de carbono entre os dois compostos. (LODWIG e POOLE, 2003).

Outros possíveis papéis do PHB em simbiose é a utilização deste como fonte de energia para a divisão celular durante a infecção na planta; proteção da enzima nitrogenase, fornecendo o poder redutor para manutenção da difusão de O<sub>2</sub> na ausência de fotossíntese;

na recuperação dos bacteróides na sua liberação na rizosfera, depois da senescência do nódulo e aumento do tempo de sobrevivência da bactéria tanto no solo como na rizosfera (MADISON e HUISMAN, 1999).

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo a identificação dos genes responsáveis pela síntese de PHB em *Bradyrhizobium elkanii*, clonagem e expressão dos mesmos em *Escherichia coli*, além do aumento a produção de PHB em *B. elkanii* através de mutações aleatórias. Para isso, os objetivos específicos foram propostos:

1. Identificação e isolamento dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC* em *B. elkanii*.
2. Produção de maneira estável uma linhagem recombinante de *E.coli* com dois vetores de expressão de mesmo grupo de incompatibilidade , contendo os três genes da via de síntese de PHB e com a capacidade de acumular este polímero.
3. Produção de mutantes aleatórios de *B. elkanii* através do transposon *TnphoA* que produzam mais PHB que a linhagem selvagem.
4. Comparação da produção de PHB na *E. coli* recombinante e nos mutantes de *B. elkanii*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Expressão heteróloga dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC* em *E. coli*

#### 4.1.1. Linhagens bacterianas, plasmídios e cultivo:

As linhagens bacterianas e vetores plasmidiais utilizados para clonagem e expressão dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC*, estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídios para construção de *E. coli* recombinante.

Linhagem		
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	Linhagem hospedeira do vetor pGEM-T-easy	
BL21de3	Linhagem hospedeira do vetor pET28a e pET28a-AMP	
<i>E. coli</i> AB	BL21 de3 com construção pET28a e <i>operon phbAB</i> de <i>B. elkanii</i>	Desenvolvida neste estudo
<i>E. coli</i> C	BL21 de3 com construção pET28aAMP e <i>gene phbC</i> de <i>B. japonicum</i>	Desenvolvida neste estudo
<i>E. coli</i> ABC	BL21 de3 com construção pET28a e <i>operon phbAB</i> de <i>B. elkanii</i> e construção pET28aAMP e <i>gene phbC</i> de <i>B. japonicum</i>	Desenvolvida neste estudo
Vetores		
pGEM-T- easy	Resistência à Ampicilina	Promega
pGEM-T AB	Vetor pGEM-T- easy e <i>operon phbAB</i> de <i>B. elkanii</i>	Desenvolvido neste estudo
pGEM-T C	Vetor pGEM-T- easy e <i>gene phbC</i> de <i>B. japonicum</i>	Desenvolvido neste estudo
pET28a	Resistência à Canamicina	Novagen
pET28aAB	Vetor pET28a e <i>operon phbAB</i> de <i>B. elkanii</i>	Desenvolvido neste estudo
pET28a AMP	Resistência à Ampicilina	Novagen modificado
pET28a AMPC	Vetor pET28aAMP e <i>gene phbC</i> de <i>B. japonicum</i>	Desenvolvido neste estudo

As linhagens de *E.coli* e seus mutantes foram cultivados em meio de cultura LB (Luria Bertani) a 37°C, durante 24h. Após este período foi retirada uma alíquota de 800 µL do cultivado, sendo essa adicionada em 200 µL de glicerol. Tal amostra foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente estocada a -80°C, sendo esse o estoque definitivo.

#### **4.1.2. Meios de cultura utilizados:**

Para o cultivo das linhagens de *E. coli* foram utilizados os seguintes meios de cultura:

**Meio LB “Luria-Bertani”:** Triptona (10 g/L); Extrato de Levedura (5 g/L), NaCl (10 g/L), pH 7,0. Ágar (10 g/L) foi utilizado para meios sólido. Este meio de cultura foi utilizado para manutenção das linhagens, transformações para obtenção dos mutantes e estoques definitivos.

**Meio LB “Luria-Bertani” modificado:** ao meio LB descrito acima foi acrescido 20g/L de glicose. Este meio de cultura foi utilizado para teste de acúmulo de PHB nestas bactérias.

#### **4.1.3. Extração de DNA genômico:**

Os DNAs genômicos totais de *B. elkanii* e *B. japonicum* foram extraídos segundo SAMBROOK e RUSSEL (2001). As células foram cultivadas em meio complexo TY durante 48h a 28°C, sob agitação a 140 rpm. A suspensão contendo bactérias foi centrifugada a 12000xg por 30 min, a 4° C e o sedimento lavado com solução salina (NaCl 0,85%) para remoção de polissacarídeos extracelulares e possíveis resíduos do meio de

cultivo. Em seguida, foram efetuados os processos de lise celular e degradação de RNA, através do tratamento com 500 µL de lisozima (5 mg/mL), 500 µL de solução SDS 20% e 15 µL de RNase (10 mg/mL). Para limpeza da fase aquosa, contendo o DNA, foram realizadas extrações com a mistura fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e clorofórmio-álcool isoamílico, no volume 1:1 da amostra. O DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol 95% (gelado) e, após sedimentação a 5860xg por 20 min, a 4°C, lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado). O DNA obtido foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 250 µL de água. Após a diluição do DNA genômico, o mesmo foi quantificado em espectrofotômetro e teve sua integridade avaliada em gel de agarose 1%. Estoques de DNA foram mantidos a -20°C.

#### **4.1.4. Extração de DNA plasmidial:**

As extrações plasmidiais de todas as construções realizadas foram feitas com o Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

#### **4.1.5. Construção de iniciadores para isolamento dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC*:**

A partir do conhecimento das seqüências dos genes *phbA* e *phbB* inteiras foi adotada a estratégia de construção de iniciadores que amplifiquem os dois genes inteiros, para a clonagem e expressão direta do produto de PCR. Como tais genes estão em “operon” no *B. elkanii*, optou-se por desenhar iniciadores que amplifiquem os dois genes juntos.

Quanto ao gene *phbC*, apesar de várias tentativas realizadas, não se obteve sua seqüência completa a partir de *B. elkanii*, apenas sua seqüência parcial. Comparando essa

seqüência parcial com a seqüência do gene *phbC* em *B. japonicum*, observou-se que essas são similares. Desde que, para construir iniciadores para amplificação do gene inteiro é necessário o início e término da seqüência, optou-se por desenhar os iniciadores utilizando a seqüência de *B. japonicum*, e conseqüentemente isolando-se o gene *phbC* deste organismo.

O desenho dos iniciadores para isolamento dos genes de interesse foi feito através do programa Gene Runner (versão 3.05), sendo que esses continham a seqüência inicial do gene *phbA* e a seqüência final do gene *phbB*, para amplificação do “operon”. No caso do gene *phbC*, os iniciadores continham a seqüência inicial e final desse gene de *B. japonicum*. Além disso, os iniciadores possuem sítios de restrição específicos para clonagem direcionada dos genes, para assim os genes serem clonados na direção correta no vetor de expressão. Para os genes *phbA* e *phbB* foram utilizados os sítios de restrição *NcoI* e *NdeI*, e para o gene *phbC* foram utilizados os sítios *XhoI* e *EcoRI*. Na tabela 3, podem ser observadas as seqüências dos iniciadores, bem como suas temperaturas de anelamento e tamanho do produto da amplificação.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para isolamento dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC*.

Iniciadores	Seqüência	Temperatura de Pareamento	Produto da amplificação
phbAB-F	AGTTGCGGTACCATGTCCATGTCAGACGAT	65°C	2300pb
phbAB-R	AGTTGCGCATGCTCAGGCGTGATACTGGCC	65°C	
phbC-F	AGTAGTGAATTCATGAGCGTCGTGAAGGTATTTCCA	60°C	1900pb
phbC-R	AGTAGTCTCGAGTTAGCTGTGGACGTAGTCTCCCGG	60°C	

#### **4.1.6. Purificação do produto da PCR:**

Os produtos das PCRs dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC* foram purificados, segundo protocolo do kit de purificação DNA Clean-up System da Promega.

#### **4.1.7. Clonagem dos produtos de PCR em pGEM-T easy (PROMEGA):**

O produto de PCR correspondente aos genes *phbA* e *phbB*, e o produto de PCR correspondendo ao gene *phbC* foram clonados no vetor comercial pGEM-T easy (PROMEGA). A clonagem foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **4.1.8. Obtenção de vetor de expressão contendo a seqüência codificante dos genes *phbA*, *phbB* isolados de *B. elkanii* e *phbC* isolado de *B. japonicum*:**

Para obtenção de um vetor de expressão que contenha os três genes responsáveis pela síntese de PHB foram utilizadas as construções feitas em pGEM-T easy (PROMEGA) contendo os genes *phbA* e *phbB*, já que esses estão em um mesmo *operon*, e a construção contendo apenas o gene *phbC*.

Os genes *phbA* e *phbB* foram digeridos com duas enzimas específicas que digerem adjacente a esses genes no vetor pGEM-T easy (PROMEGA), sendo as mesmas utilizadas para digestão do vetor de expressão pET28a (NOVAGEN). Dessa forma, a clonagem foi direcionada, possibilitando a expressão corretas desses genes.

Para o gene *phbC* foi realizada a clonagem em vetor pGEM-T easy (PROMEGA) e também a clonagem direta em vetor de expressão pET28aAMP. Optou-se por realizar a

clonagem do gene *phbC* neste vetor porque o objetivo foi o de inserir as duas construções na mesma bactéria, e para isto o sistema de seleção tem que ser diferente para que os dois vetores possam ser mantidos na mesma célula. Com isso, temos a seleção por Canamicina para o vetor pET28a (NOVAGEN) e seleção por Ampicilina para o vetor pET28aAMP.

As ligações dos insertos aos vetores de expressão foram feitas pela adição de uma unidade de DNA ligase (INVITROGEN), em tampão apropriado seguido por incubação a 16°C por 18 h aproximadamente (conforme instruções do fabricante).

#### **4.1.9. Bactérias quimiocompetentes de *E. coli* e transformação:**

Para transformação das construções dos genes em diferentes vetores foram feitas células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e *E. coli* BL21de3, segundo Sambrook e Russel (2001). Para isso uma colônia de cada linhagem foi inoculada em 4 mL de meio LB e incubada a 37°C por 12-18 horas. Em seguida, 500  $\mu$ L do cultivo bacteriano foram transferidos para 50 mL de meio LB para crescimento a 37°C até atingir a DO<sub>600</sub> = 0,6. Atingida a densidade ideal, o crescimento bacteriano foi transferido para tubos esterilizados previamente resfriados. Após a centrifugação durante 10 minutos a 4000 xg em uma temperatura de 4°C, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células com 10 mL de cloreto de cálcio (0,1 M). Esse processo de centrifugação e descarte foi realizado por mais duas vezes. Na terceira vez juntaram-se os conteúdos dos tubos em apenas um para realizar a última centrifugação. Depois de descartado o sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 600  $\mu$ l de cloreto de cálcio e esse volume foi dividido em alíquotas de

200  $\mu$ L. As células competentes foram, assim, deixadas no gelo e na geladeira por até 18 horas para então serem utilizadas.

#### **4.1.10. Transformação de células competentes por choque térmico, seleção e estoque de clones recombinantes:**

Em tubos (Falcon) de 15 mL, foram adicionados volumes 15 $\mu$ L dos produtos das reações de ligação de cada construção. A esses produtos de ligação foram acrescentados 200 $\mu$ L de uma suspensão de células competentes, *E. coli* DH5 $\alpha$ , para as construções com vetor pGEM-T-easy (PROMEGA) e *E. coli* BL21DE3, para construções com os vetores pET28a (NOVAGEN) e pET28aAMP(NOVAGEN modificado). A mistura foi mantida em gelo por 20 min. Em seguida, os tubos foram transferidos para banho a 42°C, sem agitação, por 90 segundos. Após esse período, os tubos foram, rapidamente, colocados em gelo onde foram mantidos por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 950 $\mu$ L de meio SOC à suspensão e a mesma incubada a 37°C, com agitação de 220 rpm, por 2h. As células (100  $\mu$ L/placa) foram então plaqueadas em 10 placas preparadas com meio LB sólido, acrescido com 50  $\mu$ g/mL de antibiótico ampicilina ou 30 $\mu$ g/mL Canamicina, 100  $\mu$ L/placa do indutor IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside - 100 Mm) e 100  $\mu$ L/placa do substrato X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside- 40 mg/mL em dimetil-formamida). As placas foram incubadas a 37°C por um período aproximado de 18h. Para transformações envolvendo o vetor pET28a e pET28aAMP não houve a necessidade do indutor, já que esses não possuem esse sistema de identificação. Após o período de

incubação, foram selecionadas as colônias de coloração branca, recombinantes. Os clones transformados foram repicados com palitos de madeira esterilizados para placas esterilizadas de poliestireno (96 “well assay plate”, 250 mL) contendo 125 µL de meio LB + 50 µg/mL de ampicilina ou 30µg/mL de Canamicina. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 37° C por 24h. Após esse período, foram adicionados 125 µL de solução de glicerol 20% (v:v) e as placas estocadas a -80°C.

#### **4.1.11. Seqüenciamento:**

O seqüenciamento dos produtos de PCRs, construções em pGEM-T easy e vetores de expressão com os genes *phbA*, *phbB* e *phbC*, foram realizados utilizando-se o “BigDye Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit” (APPLIED BIOSYSTEM) como agente fluorescente.

Após a reação de PCR de seqüenciamento, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento automático de DNA utilizando o aparelho ABI 3700 DNA Analyzer-Applied Biosystems. As seqüências obtidas foram analisadas pelo “Sequencing Analysis 3.4” e a montagem da seqüência, verificação da qualidade das bases dos eletroferograma e arquivos gerados no formato FASTA realizados pelo pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” (EWING et al.,1998; EWING e GREEN, 1998; GORDON et al. 1998). A seqüência FASTA gerada foi comparada com as seqüências já depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) para a identificação do gene em questão.

#### **4.1.12. Extração de RNA e confecção de cDNA:**

Para análise da expressão dos genes clonados, foi realizada a extração do RNA mensageiro total, utilizando e seguindo as instruções do Kit Qiagen RNAeasy mini, incluindo o reagente estabilizante de RNA RNAlprotect Bacteria Reagent (QIAGEN). Após a extração do RNA, foi realizada a confecção dos seus respectivos cDNAs de acordo com as instruções do kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (INVITROGEN). Em seguida, foram realizadas PCRs nas mesmas condições e com os mesmos iniciadores citados anteriormente (Tabela 2)

#### **4.1.13. Teste de expressão:**

Em primeiro lugar, as linhagens bacterianas BL21DE3 contendo os vetores (pET28a com o operon *phbAB* e o gene *phbC* e pET28a sem o inserto) foram inoculadas em 5 mL de meio LB (contendo 30 µg/mL do antibiótico Canamicina) a 37°C durante 18 horas. Em seguida, 1 mL daquela cultura foi transferido para 100 mL de meio LB, também acrescido de Canamicina (marca de resistência do vetor pET28a) e o meio incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm até que fosse atingida uma  $DO_{600} = 0,8$ . Ao ser atingida esta OD as células foram induzidas com IPTG (1mM) durante 4 horas sob agitação de 300 rpm à temperatura de 37°C e, em seguida, as células coletadas por centrifugação (4.000xg durante 15 minutos a 4°C).

#### **4.1.14. Extração de proteínas totais:**

No preparo do extrato celular, 50 mL das células obtidas por centrifugação foram ressuspendidas em 5 mL de PBS (Salina Tamponada com fosfato:140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.) e 200 µL de SDS 10% tampão e mantidas no gel. Em seguida, as células foram sonicadas por 15 segundos por 5 vezes. Após a sonicação, as células foram coletadas por centrifugação (14000 xg por 40 minutos a 4°C) e o sobrenadante estocado a 4°C. Ao precipitado foi adicionado 100 µL de PBS e este também estocado a 4°C.

#### **4.1.15. Preparação da resina Ni-NTA Superflow (QIAGEN):**

Para cada 10 mL de extrato celular, utilizou-se 1 mL de resina. Para prepará-la, foi feita uma série de 3 centrifugações (4000 xg por 1 minuto a 4°C) seguidas de ressuspensão em água destilada para a retirada do álcool em que é armazenada.

#### **4.1.16. Purificação do sobrenadante através de cromatografia de afinidade:**

As frações solúveis da extração da construção pETAB/ pETAMPC foram submetidas à cromatografia de afinidade em resina de níquel (Ni-NTA Superflow da Qiagen ) uma vez que o vetor de expressão utilizado (pET28a) insere uma cauda de histidina na porção N-terminal da proteína expressa. Essa fusão tem justamente a finalidade de facilitar o processo de purificação da proteína clonada. No processo de purificação, ao

sobrenadante (fração solúvel) adiciona-se 1 mL da resina previamente preparada sendo esta mistura deixada em gelo e sob agitação por, no mínimo, 1h. Em seguida, o conteúdo é aplicado na coluna de cromatografia (Bio-rad) e coleta-se, como primeira fração, as proteínas que não se ligam à resina de níquel. Após essa primeira etapa, adiciona-se à resina tampão de extração com diferentes concentrações de imidazol (5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM e 500 mM). Para cada concentração são coletadas duas frações de 5 mL cada.

#### **4.1.17. Gel SDS-PAGE para verificação da expressão e purificação da proteína:**

Para verificação da expressão um volume de 10 µL de cada amostra (solúveis obtidas a partir do sobrenadante e insolúveis obtidas a partir dos precipitados) obtidas a partir da extração de proteínas totais foi analisado através de eletroforese vertical em gel SDS-PAGE a 12% (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) submerso em tampão tris-glicina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Este procedimento também foi realizado para as frações obtidas no processo de purificação. Antes de serem aplicadas, as amostras foram fervidas por 5 minutos para desnaturar as proteínas e melhorar a visualização no gel.

A separação eletroforética se deu a 60V, durante 4h. Em seguida, o gel foi corado com solução corante Coomassie (0.25% Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético), durante 1h e posteriormente descorado com solução descorante (25% metanol, 5% ácido acético).

## 4.2. Obtenção de mutantes aleatórios de *Bradyrhizobium elkanii*

### 4.2.1. Linhagens bacterianas, plasmídios e cultivo:

Tabela 3. Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados para produção de mutantes aleatórios de *B. elkanii*.

<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
SEMIA 587	Linhagem selvagem de <i>B. elkanii</i>	FEPAGRO–Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, Porto Alegre, RS.
MUT 24	Mutante <i>TnphoA</i> SEMIA 587	Desenvolvida neste estudo
MUT 31	Mutante <i>TnphoA</i> SEMIA 587	Desenvolvida neste estudo
MUT 33	Mutante <i>TnphoA</i> SEMIA 587	Desenvolvida neste estudo
MUT 50	Mutante <i>TnphoA</i> SEMIA 587	Desenvolvida neste estudo
Vetores		
pRT733	Plasmídio que contém o <i>transposon TnphoA</i>	Manoil e Beckwith, 1985

A linhagem *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 foi utilizada como objeto deste estudo, já que uma biblioteca de fosmídio (BE587) e bibliotecas de plasmídio foram construídas no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, com o intuito de se sequenciar o genoma do *B. elkanii*.

A linhagem SEMIA587 selvagem, bem como seus respectivos mutantes, foram cultivados em meio de cultura TY (“Tryptone-Yeast Medium”) (BERINGER, 1974) a 29°C, com agitação de 140rpm, durante 48h. Após as 48h de crescimento foi retirada uma alíquota de 800 µL do cultivado, sendo essa adicionada em 200 µL de glicerol. Tal amostra

foi submetida ao congelamento em nitrogênio líquido e posteriormente estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , sendo este o estoque definitivo.

#### **4.2.2. Meios de cultura utilizados:**

Para o cultivo da linhagem *B. elkanii* e seus mutantes, foram utilizados os seguintes meio de cultura:

**TY “Tryptone-Yeast Medium”** (BERINGER, 1974): Triptona (5g/L); Extrato de levedura (3g/L);  $\text{CaCl}_2$  (0,87g/L), pH 7. Meio de cultura utilizado para manutenção das linhagens em placa, conjugação para obtenção dos mutantes e estoques definitivos.

**RDM modificado** (BISHOP, 1976):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,23g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,1g/L); Glutamato de sódio (1,1g/L); elementos traços (1,0mL/L), pH 6,8. Os elementos traços são constituídos por:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (145mg/L);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (125mg/L);  $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (70mg/L);  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (125mg/L) e nitrilotriacetato (7g/L). Ao meio RDM básico foi adicionado 30g/L de sacarose em substituição ao glicerol. Este meio de cultura foi utilizado para teste de acúmulo de PHB nestas bactérias.

**YMA “Yeast Mannitol Agar”** (VINCENT, 1970):  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,50g/L);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,20g/L); NaCl (0,10g/L); Manitol (10g/L); Extrato de levedura (0,40g/L); Vermelho Congo (5mL/L); Agar (10g/L), pH 6,8. Este meio de cultura foi utilizado para comprovação da pureza da cultura, uma vez que, o meio YMA contém o corante vermelho congo, o qual indica possíveis contaminações, já que as linhagens de interesse (*Rhizobium*) não absorvem o corante, formando colônias brancas, e a maioria das linhagens contaminantes absorvem o corante formando colônias vermelhas.

#### **4.2.3. Teste de resistência a antibióticos (MIC – Concentração Inibitória Mínima):**

Como o objetivo do trabalho era a produção de mutantes, fez-se necessário conhecer os antibióticos aos quais a SEMIA587 é resistente, para avaliar qual vetor poderia ser usado para a construção dos mutantes.

Para isso, foram testados os antibióticos Ampicilina, Canamicina, Tetraciclina, Estreptomicina, Ácido Nalidíxico e Clorofenicol; nas concentrações 0,5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 50µg/mL, 100µg/mL, 200µg/mL e 500µg/mL.

A linhagem em questão foi cultivada em meio líquido TY, a 140rpm, 28°C, durante 7 dias, nas diferentes concentrações de cada antibiótico, sendo analisado seu desenvolvido, ou não, neste período.

#### **4.2.4. Produção de mutantes aleatórios pelo *transposon TnphoA* através de conjugação:**

A mutagênese com o *transposon TnphoA* foi realizada como descrita por TAYLOR et al. (1989), com algumas adaptações para conjugação entre *E. coli* e *B. elkanii*. A linhagem bacteriana a ser mutagenizada (SEMIA587) foi crescida em meio TY por 72h a 28°C. Já a linhagem pRT733, a qual contém o transposon *TnphoA*, foi crescida em meio LB, incubadas a 37°C por 18 horas. A seguir, ambas foram conjugadas.

Os ensaios de conjugação foram realizados conforme descrito por AZEVEDO e da COSTA (1973). A seleção dos mutantes foi realizada em placas contendo meio TY com os antibióticos (Estreptomicina- 100µg/mL) ao qual a linhagem SEMIA587 era resistente mais Canamicina 100µg/mL (marca de resistência presente no transposon *TnphoA*). Todas as

colônias transconjugantes obtidas resistentes à Canamicina foram coletadas e estocadas em 20% de glicerol a -80°C.

#### **4.2.5. Triagem dos mutantes produtores de PHB:**

Como foram obtidos vários mutantes aleatórios de *B. elkanii*, necessitava-se de um método rápido para seleção dos mutantes que mais produzissem PHB. Para isso, foi utilizada a coloração do Sudan Black, já que este cora em azul escuro os grânulos de PHAs.

Dessa forma, os mutantes foram crescidos em placas de petri com meio RDM modificado (item 4.2.2.), durante 10 dias a 28°C. Após este período, as placas com as culturas dos mutantes foram embebidas em solução Sudan Back 0,03% (diluído em etanol 100%), durante 10 minutos e, em seguida, retirado o excesso de corante com etanol 70%.

Os mutantes que ficaram com a coloração azul mais escura foram selecionados para posteriores análises da produção de PHAs.

#### **4.3. Dosagem de PHAs produzidos:**

Para dosagem de PHB, tanto os clones de *E. coli* como os mutantes de *B. elkanii* foram testados. Os clones de *E. coli* foram cultivados em meio LB acrescidos de glicose, antibiótico correspondente a resistência do vetor e IPTG para indução da expressão, sendo que o cultivo se deu em 48h. Já os mutantes de *B. elkanii* foram cultivados em meio RDM modificado com Canamicina, durante 10 dias. Após o tempo de cultivo, as células foram centrifugadas a 4000xg, 20°C, durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet restante submetido à liofilização. Após esse processo, as células secas foram pesadas

e adicionado 5 mL de clorofórmio as mesmas, deixando-as agitando durante 24h. Após as 24h, o clorofórmio juntamente com o PHB extraído foi filtrado, e o filtrado recuperado em um novo tubo de ensaio. O clorofórmio foi evaporado e o produto que restou no tubo é o PHB, sendo este pesado e a relação feita com o peso seco da célula.

#### **4.4. Análise de PHAs produzidos:**

A quantidade e composição de PHAs produzidas pelas linhagens de *E.coli*, bem como pelos mutantes de *B. elkanii* foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres pela metodologia descrita por GOMEZ (1996). Cerca de 10 a 15 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-dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100°C, com agitação após os primeiros 30 minutos de propanólise. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos 4 mL de água destilada, agitando-se os mesmos, vigorosamente, por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) foi utilizada para análise. Um volume de 1µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra (“split” 1:20) em cromatógrafo gasoso HP6890 Series GC System equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metil-siloxane, comprimento 30m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25µm).

A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: hélio (0,8mL/ min); temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 300°C; sistema de detecção: ionização de chama (FID). Programa de temperaturas do forno: 100°C por 1 minuto,

elevação da temperatura até 185°C a 8°C/min e 185°C por 15 minutos. O ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida*, a partir de diferentes fontes de carbono ou P3HB e P3HB-*co*-3HV (ALDRICH), foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato), 3HV (3-Hidroxivalerato), 3HHx (3-Hidroxihexanoato), 3HHp (3-Hidroxiheptanoato), 3HO (3-Hidroxioctanoato), 3HN (3-Hidroxinonanoato), 3HD (3-Hidroxidecanoato) e 3HDD (3-Hidroxidodecanoato).

Todas as análises de PHAs foram realizadas com o auxílio do Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez, no Laboratório de Fisiologia de Microorganismos, departamento de Microbiologia, ICB, USP-SP.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Expressão heteróloga dos genes *phbA*, *phbB* e *phbC* em *E. coli*

#### 5.1.1. Projeto genoma *B. elkanii*:

O projeto genoma do *B. elkanii* está sendo realizado no LBMP (laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas), sendo que no início desta dissertação este não estava completo. Diante disso, um novo projeto foi gerado em novembro de 2008 e neste foram encontradas as seqüências completas dos genes *phbA* e *phbB*.

Dessa forma, para esses genes foi adotada a estratégia de construção de iniciadores que amplifiquem os dois genes inteiros, para a clonagem e expressão direta do produto de PCR, uma vez que essa metodologia é muito mais eficiente e rápida do que a busca na biblioteca de foscídios. Como tais genes estão em “operon”, optou-se por desenhar iniciadores que amplifiquem os dois genes juntos.

Quanto ao gene *phbC*, não se obteve sua seqüência completa, apenas parcial. Como vários testes foram feitos para tentar-se isolar este gene inteiro, mas nenhum com sucesso, optou-se por isolar o gene *phbC* de *B. japonicum*, uma vez que este organismo é muito próximo filogenicamente. Além disso, o alinhamento da seqüência parcial do gene *phbC* de *B. elkanii* com a seqüência de *B. japonicum* apresentou alto grau de similaridade  $1e^{-36}$ .

#### 5.1.2. Extração de DNA genômico:

O DNA genômico das linhagens *B. elkanii* e *B. japonicum* foram extraídos para otimização das PCRs e posterior isolamentos dos genes de interesse.

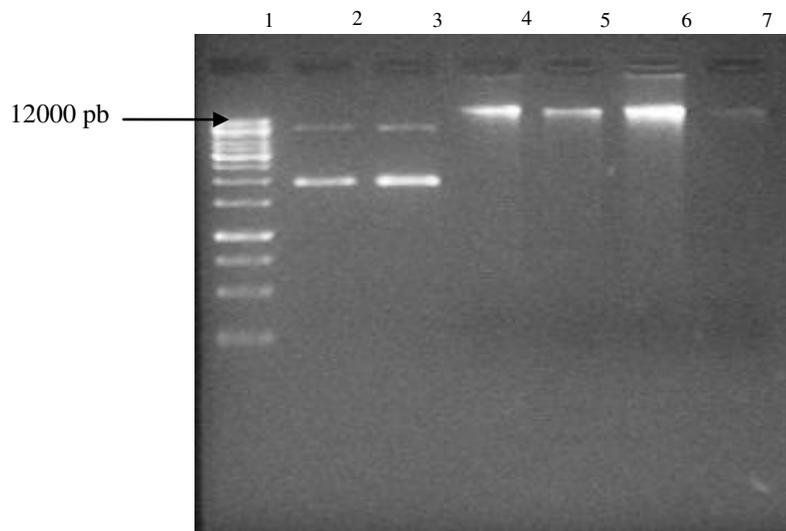


Figura 2. Perfil eletroforético de DNA genômico em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2 e 3. Padrão de concentração pGEM (APPLIED BIOSYSTEMS) 50 ng, 100 ng; 4 e 5. DNA genômico total *B. elkanii*; 6 e 7. DNA genômico *B. japonicum*.

### 5.1.3. Padronização das reações de PCRs:

A padronização das reações de PCR para os três genes foi realizada em termogradiante (COBBERT), determinando-se a temperatura de pareamento ideal para cada iniciador.

Após realização de diversos testes, foi padronizada as condições para os iniciadores dos genes *phbAB*, sendo essas: 1x de tampão; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 200mM de dNTP; 20pMol de cada iniciador; 100ng de DNA e 1U de TaqDNA polimerase(gotaq Promega), completando com água para um volume final de 20μL. Para os iniciadores do gene *phbC* foi utilizada as mesmas condições, apenas utilizando 10pMol de cada iniciador em de 20pMol.

Nestas condições, obteve-se uma banda única, a 2300pb, a qual corresponde a amplificação do *operon phbAB*, o que era o esperado para tal produto de PCR. Para o gene *phbC* foi também obtida uma banda única em 1800pb, como também era esperado para este gene.

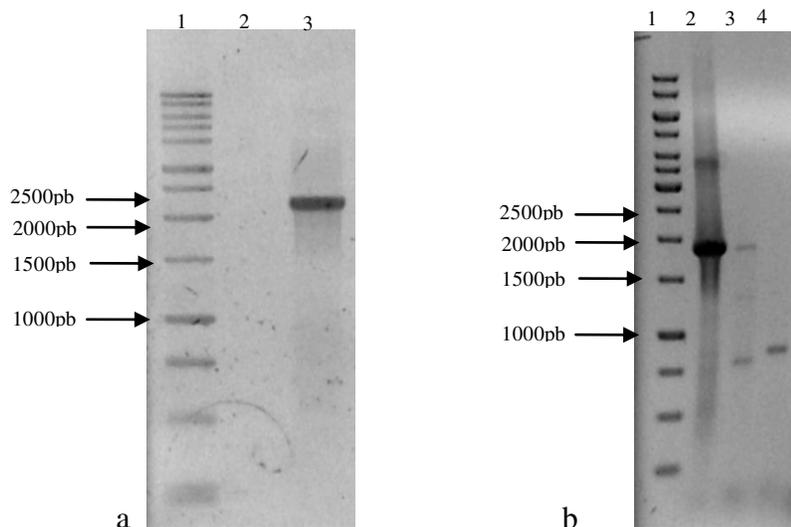


Figura 3. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para o *operon phbAB* e o gene *phbC* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo *operon phbAB*; 3. Controle positivo (DNA genômico *B. elkanii*) *operon phbAB*. b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle positivo (DNA genômico *B. japonicum*) gene *phbC* condição 1; 3. Controle positivo (DNA genômico *B. japonicum*) gene *phbC* condição 2; 4. Controle positivo (DNA genômico *B. elkanii*) gene *phbC*.

#### 5.1.4. Clonagem do produto de PCR em vetor pGEM-T easy (PROMEGA):

Os produtos de PCRs referentes ao *operon phbAB* e ao gene *phbC* de *B. japonicum* foram clonados em pGEM-T easy (PROMEGA). Tais construções foram transformadas em *E. coli* DH5 $\alpha$ , plaqueadas em meio LB, acrescido de Ampicilina (resistência do vetor), X-gal e IPTG (vetor possui sistema *LacZ* de seleção). Foram selecionados oito clones da construção *operon phbAB* (pGEM-T AB) e 5 clones das construções do gene *phbC*

(pGEM-T C). Tais clones foram submetidos à extração plasmidial para observação do seu padrão.

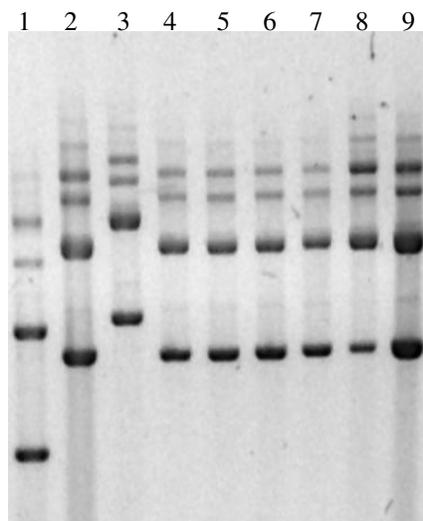


Figura 4. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pGEM-T easy *operon phbAB* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/ $\mu$ L). Canaletas: 1. pGEM-T easy fechado sem inserto (PROMEGA) ; 2-8. Clones 01 a 08 referentes à construção pGEM-T easy *operon phbAB*.

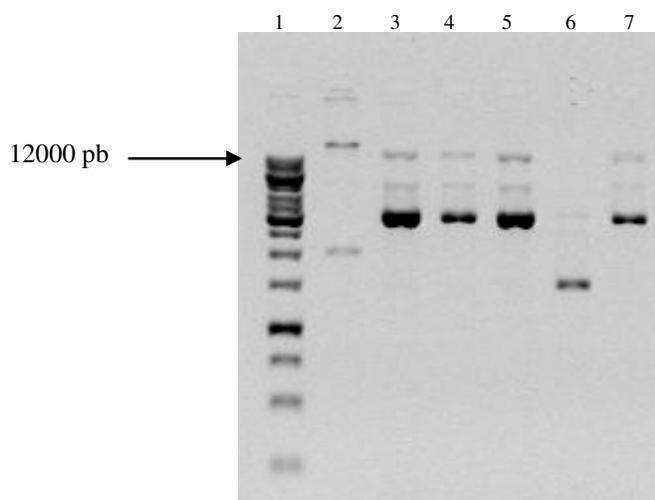


Figura 5. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pGEM-T easy *phbC* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/ $\mu$ L). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. pGEM-T easy fechado sem inserto (PROMEGA) ; 3-7. Clones 01 a 05 referentes à construção pGEM-T easy *phbC B. japonicum*.

### 5.1.5. Digestão dos clones:

Para confirmação da entrada dos insertos desejados, os clones foram submetidos à digestão com enzima de restrição *NotI* (INVITROGEN) para os clones pGEM-T AB e *EcoRI* para os clones pGEM-T C, as quais possuem dois sítios de corte no vetor pGEM-T aesy (PROMEGA) e não possuem sítios de corte nos fragmentos clonados. Após a confirmação da clonagem do fragmento desejado por digestão, foi feito o seqüenciamento dos clones para comprovação se os fragmentos correspondem aos genes em questão.

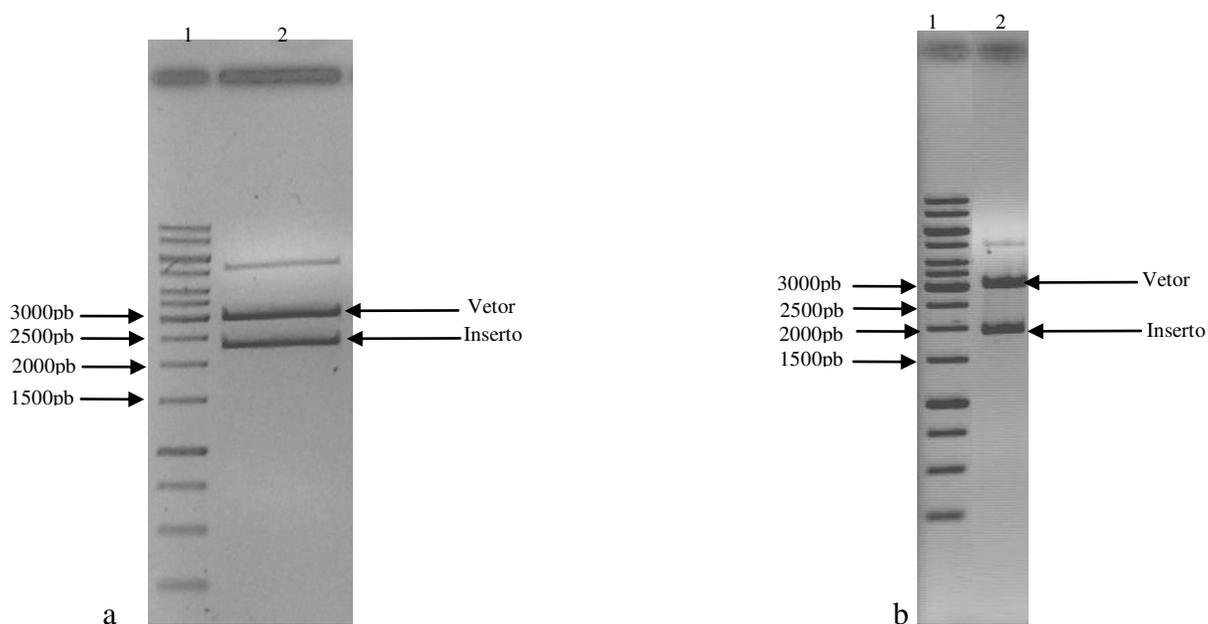


Figura 6. Perfis eletroforéticos dos plasmídios digeridos referentes à construção em pGEM-T easy em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Construção pGEM-T AB digerida com enzima de restrição *NotI*. b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Construção pGEM-T C digerida com enzima de restrição *EcoRI*.

Como pode ser observado na Figura 6, foi liberado um inserto a 2500pb na canaleta 2a e próximo a 2000pb na canaleta 2b, o que corresponde ao operon *phbAB* e ao gene *phbC*, respectivamente. O fragmento a 3000pb corresponde ao vetor aberto pGEM-T easy.

#### **5.1.6. Clonagem do operon *phbAB* e gene *phbC* em vetor de expressão pET28a (NOVAGEN):**

Após a confirmação de que os clones pGEM-T AB 01 e 07 foram clonados na direção correta, estes foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição NcoI e NdeI para liberação do fragmento desejado, e posterior ligação no vetor pEt28a, também foi digerido com as mesmas enzimas.

Para isso, após a digestão, o fragmento *phbAB* foi recortado do gel de agarose 0,8% e eluído com o kit QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN).

A ligação do fragmento purificado e o vetor pET28a digerido foi realizada, denominando-se essa construção pETAB. Posteriormente, esta construção foi transformada em *E. coli* BL21de3 quimiocompetentes, como descrito anteriormente. Desta construção foram coletados 96 clones (*E. coli*AB) sendo realizada a extração plasmidial de 24 clones, através do Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). O padrão dos clones coletados pode ser observado na figura 7.

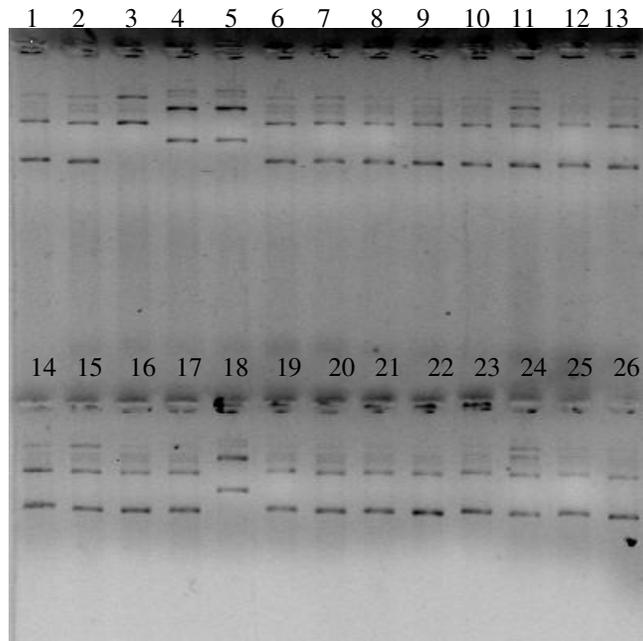


Figura 7. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pETAB em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Canaletas: 1 e 14. pET28a fechado sem inserto (NOVAGEN) ; 2-13, 15-26 Clones pETAB 01 a 12 e 13 a 24, respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 7, os clones pETAB 2, 3, 4 e 17 apresentam-se em uma altura diferente em relação ao vetor fechado, sendo esse um indicativo de ligação ao inserto de interesse. Para confirmação da ligação do inserto e se a clonagem havia ocorrido de maneira correta, tais clones foram submetidos à digestão e posteriormente ao sequenciamento, como descrito anteriormente.

Como o objetivo é a manutenção das duas construções na mesma bactéria, necessitava-se que os vetores possuísem resistências a antibióticos diferentes. Para isso, utilizou-se para construção do gene *phbC* o pET28a com gene de resistência à Ampicilina, construído e cedido por Marcelo Szymanski (Laboratório de Análise Genética e Molecular- Unicamp).

O gene *phbC*, por sua vez, foi clonado diretamente em vetor pETAMP pela digestão das enzimas EcoRI e XhoI, sendo denominada a construção pETAMPC. Esta foi transformada em *E. coli* B121de3 quimiocompetentes, como descrito anteriormente. Dessa construção foram coletados 9 clones (*E. coli*C) sendo realizada a extração plasmidial de 24 clones, através do Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). O padrão dos clones coletados pode ser observado na figura 8.

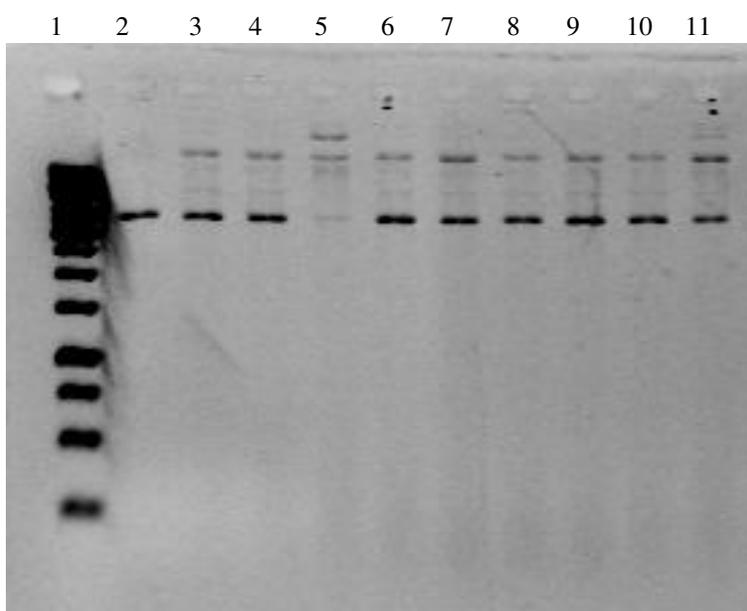


Figura 8. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes à construção pETAMPC em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. pETAMP fechado sem inserto (NOVAGEN modificado) ; 3-11. Clones 01 a 9 referentes à construção pETAMPC.

Como pode ser observado na Figura 8, apenas o clone pETAMPC 3 apresentou altura diferente em relação ao vetor fechado, sendo esse um indicativo de ligação ao inserto de interesse.

### 5.1.7. Construção clones *E. coliABC*:

Para produção de PHB em *E. coli*, fez-se necessário a presença dos três genes da via na mesma bactéria. Para isso, o clone *E. coliAB* foi tratado para se tornar quimiocompetente, e a construção pETAMPC foi transformada dentro desde. A seleção dos clones positivos foi feita pela seleção dos antibióticos Canamicina e Ampicilina, selecionando assim, os clones que possuíam os dois vetores. O padrão plasmidial dos novos clones (*E. coliABC*) pode ser observado na figura 9.

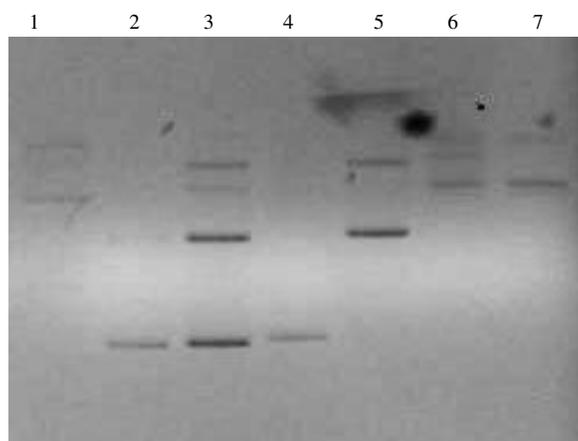


Figura 9. Perfis eletroforéticos dos plasmídios referentes aos clones *E. coliABC* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/m $\mu$ L). Canaletas: 1. Construção pETAB; 2 e 3. pET28a fechado sem inserto (NOVAGEN) ; 4. pETAMP fechado sem inserto (NOVAGEN modificado); 5. Construção pETAMPC; 6 e 7. Clones *E. coliABC* 1 e 2.

### 5.1.8. Confirmação dos clones:

Para confirmação da ligação do inserto, esses clones foram submetidos à PCR com os iniciadores específicos para cada gene (Figura 10).

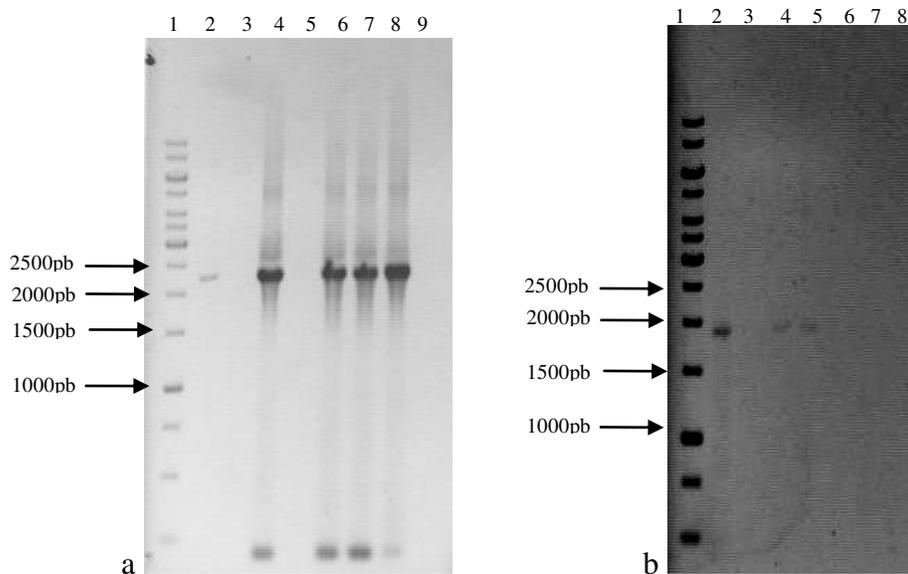


Figura 10. Perfis eletroforéticos dos produtos de PCRs para os clones *E. coliAB*, *E. coliC* e *E. coliABC* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL).a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle positivo (DNA genômico *B. elkani*); 3. Vetor pET28a sem inserto; 4. Clone *E. coliAB*; 5. Vetor pET28a sem inserto; 6-8. Clones 1-3 *E. coliABC*; 9. Controle negativo. b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle positivo (DNA genômico *B. japonicum*); 3. Vetor pETAMP sem inserto; 4. Clone *E. coliC*; 5-7. Clones 1-3 *E. coliABC*; 8. Controle negativo.

### 5.1.9. Seqüenciamento dos genes:

As construções no vetor pGEM-T easy e nos vetores pET28a e pETAMP foram seqüenciadas. Com o seqüenciamento, foi possível comprovar que produto de PCR liberado refere-se aos genes *phbA* e *phbB*, já que o seqüenciamento da região “forward” quando comparada com o banco de dados BLAST, apresentou 88% de similaridade com o gene *phbA* de *B. japonicum* e a região “reverse” apresentou similaridade de 86% com o gene *phbB* de *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. Este resultado foi encontrado para os clones 01 e 07. Já os demais clones apresentaram a construção invertida.

Para o gene *phbC*, a comparação do resultado do seqüenciamento com o banco de dados BLAST mostrou que esta seqüência era PHB sintase (*phbC*) de *B. japonicum*, com similaridade de 97%, o que é compatível com o que se espera confirmar desses genes, sendo que o sentido do gene também estava correto.

#### **5.1.10. Teste de expressão (RT-PCR):**

Após a clonagem dos genes em vetores de expressão, foi analisada a expressão desses genes. Uma das análises feitas foi através da extração do RNA mensageiro total e posterior PCR utilizando os cDNAs produzidos a partir deste RNA como base para a reação. Foi testada a expressão dos clones que continham apenas a construção pETAB (*E. coliAB*), a construção pETAMPC (*E. coliC*) e o clone que continha ambas as construções (*E. coliAB*) (Figura 11).

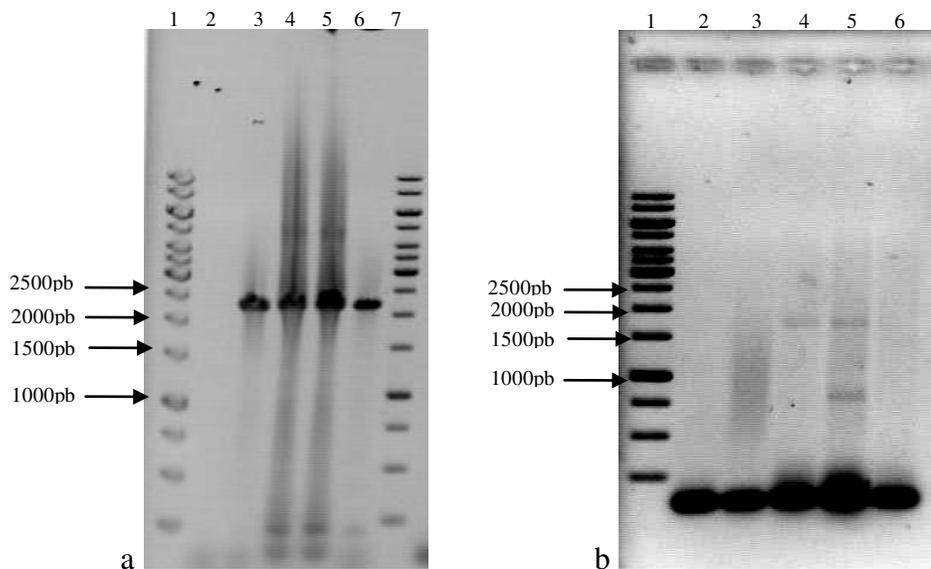


Figura 11. Perfis eletroforéticos dos produtos de RT-PCR para os clones *E. coliAB* e *E. coliABC* em gel de agarose 1% (p/v), contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). a) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo sem cDNA; 3. Controle positivo (DNA genômico *B. elkanii*); 4. Clone *E. coliAB*; 5. Clone *E. coliABC*; 6. BL21de3 sem vetor de expressão; 7. Padrão de tamanho molecular (1Kb DNA Ladder – FERMENTAS). b) Canaletas: 1. Padrão de tamanho molecular (1 Kb DNA Ladder – FERMENTAS); 2. Controle negativo; 3. pETAMP sem inserto; 4. Clone *E. coliC*; 5. Clone *E. coliABC*; 6. BL21DE3 sem vetor de expressão.

Como pode ser observado na Figura 11, houve amplificação de todos os clones testados, e, também, da linhagem BL21de3 sem nenhum gene. Isto pode ser devido a esta linhagem possuir os genes *phbA* e *phbB* muito similares às seqüências do *B. elkanii* clonadas, porém esses genes são utilizados em outras vias de síntese nesta bactérias e não para a produção de PHB. Devido a isto, a produção de PHB também foi analisada apenas com a inserção do gene *phbC*, para observar se é possível utilizar os genes selvagens da *E. coli* para produção de tal polímero, desviando as suas vias de origem. Entretanto, pode-se observar que a expressão dos genes inseridos é muito maior do que na linhagem selvagem, o que pode favorecer a produção do polímero.

### 5.1.11. Teste de expressão (proteína):

As construções pETAB e pETAMPC foram induzidas e extraídas, como descrito anteriormente. Para a visualização das proteínas totais expressas foi realizado gel SDS-PAGE (Figura 12).

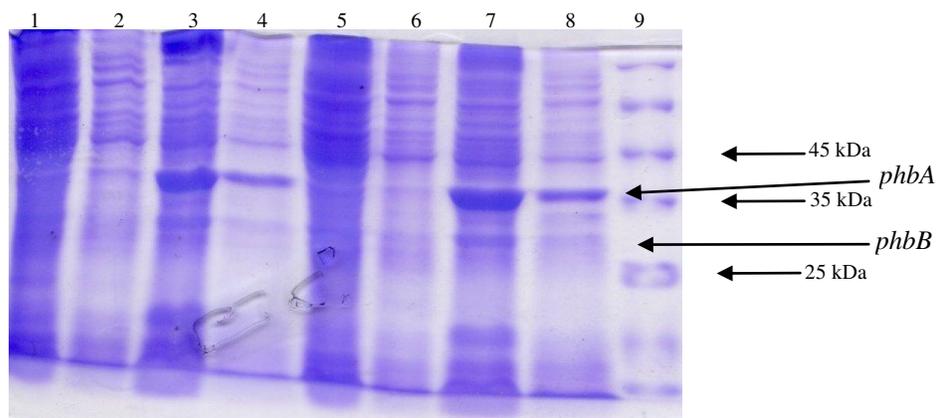


Figura 12. Gel SDS-PAGE a 12%. Extração das proteínas *phbA* e *phbB* segundo o teste de expressão. Canaletas: 1. Fração insolúvel vetor pET28a sem inserto induzido 4h; 2. Fração solúvel vetor pET28a sem inserto induzido 4h; 3. fração insolúvel pETAB induzido 2h; 4. Fração solúvel pETAB induzido 2h; 5. Fração pETAB insolúvel não-induzido. 6. Fração pETAB solúvel não-induzido; 7. Fração insolúvel pETAB induzido 4h; 8. Fração solúvel pETAB induzido 4h; 9. Padrão de peso molecular (FERMENTAS).

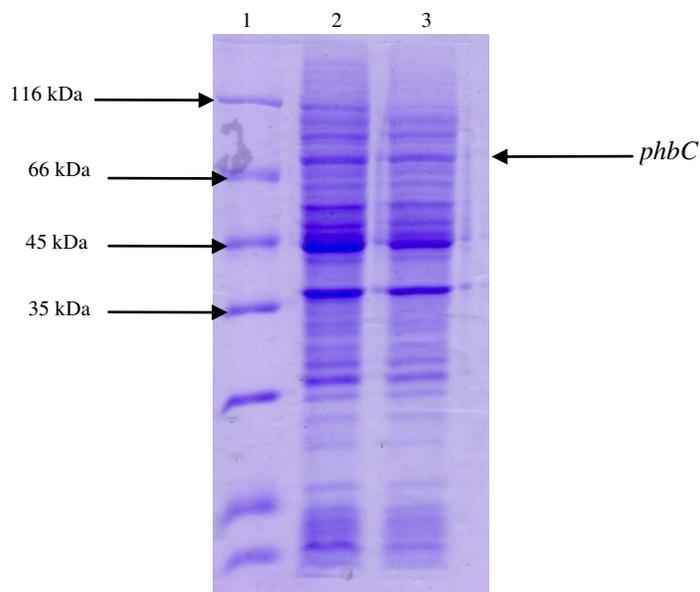


Figura 13. Gel SDS-PAGE a 12%. Extração das proteínas *phbC* segundo o teste de expressão. Canaletas: 1. Padrão de peso molecular (FERMENTAS); 2. Fração insolúvel pETAMPC induzido 4h; 3. Fração solúvel pETAMPC induzido 4h.

Através da análise de regressão linear, utilizando o padrão de peso molecular, observou-se que as bandas apontadas possuem os seguintes pesos moleculares: *phbA* – 41,39 kDa; *phbB* – 27,34 kDa e *phbC*- 67,24 kDa, sendo que os pesos esperados eram de 40,85 kDa; 25,37 kDa e 66kDa, respectivamente, o que mostra que tais bandas, provavelmente representam as proteínas desejadas.

#### 5.1.12. Purificação do sobrenadante através de cromatografia de afinidade:

Como descrito no material e métodos, a construção final pETAB/pETAMPC foi submetida a purificação em coluna de níquel para confirmação da expressão e se realmente as bandas apontadas na purificação de proteínas totais, representam as proteínas de interesse.

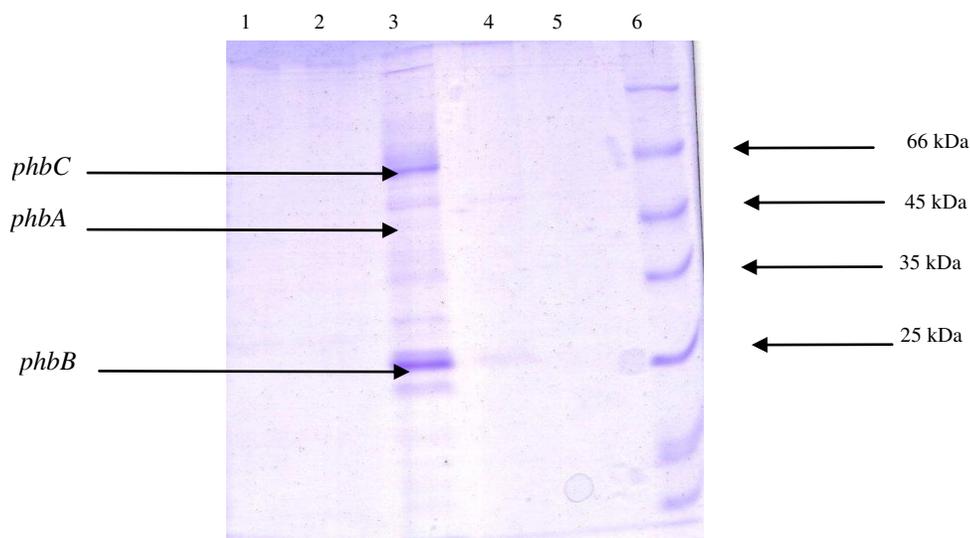


Figura 14. Gel SDS-PAGE a 12%. Purificação das proteínas Acetoacetil Kinase (*phbA*), acetoacetil reductase (*phbB*) e *phbC* sintase (*phbC*) em coluna de níquel. Canaletas: 1. Purificação do vetor pET28a com 100mM de imidazol; 2. Purificação do vetor pET28a com 200mM de imidazol; 3. Purificação da construção pETAB/pETAMPC com 100mM de imidazol; 4. Purificação da construção pETAB/pETAMPC com 200mM de imidazol; 5. Purificação da construção pETAB/pETAMPC com 500mM de imidazol; 6. Padrão de peso molecular (FERMENTAS).

Como pode ser observado na figura 14, a banda corresponde a proteína *phbA* foi a que teve a purificação menos eficaz. Isso pode ser devido os genes *phbA* e *phbB* estarem no mesmo vetor, sendo que provavelmente a calda de histidina esteja mais próxima ao gene *phbB*, por isso sua melhor purificação na coluna de níquel. Entretanto, pode-se observar 3 bandas aparentes na altura desejada para cada proteína de interesse, principalmente na purificação com 100mM de imidazol.

## **5.2. Obtenção de mutantes aleatórios de *Bradyrhizobium elkanii***

Seguindo o objetivo do trabalho de aumento da produção de PHB através de mutações, optou-se pela estratégia de obtenção de mutantes aleatórios através do transposon *TnphoA*, uma vez que se obtém vários mutantes através dessa técnica, podendo-se assim conseguir um que possua maior produção de PHB, atingindo o objetivo geral do trabalho, já que não são conhecidos vetores de expressão estáveis em *Bradyrhizobium*.

### **5.2.1. Teste de resistência a antibióticos (MIC):**

Para o teste de resistência a antibióticos, a linhagem SEMIA587 mostrou-se resistente a todas as concentrações testadas de Ampicilina, Ácido Nalidílico e Cloranfenicol. Para a Canamicina, esta linhagem só foi resistente à concentração de 0,5ug/mL. Já para a Tetraciclina e Estreptomicina essa apresentou resistência até a concentração de 50ug/mL, para a primeira, e até a concentração de 200ug/mL para a última. Com isso, observou-se que a mutação pelo transposon *TnphoA*, que possui um cassete de Canamicina seria possível, já que a bactéria em questão é sensível a este antibiótico, sendo possível a seleção dos mutantes que tiveram a inserção do transposon.

### **5.2.2. Produção de mutantes aleatórios pelo Transposon *TnphoA* através de conjugação:**

Para inserção do transposon na linhagem de *B. elkanii*, esta linhagem foi conjugada com a linhagem de *Escherichia coli* contendo o plasmídio pTR733, a qual possui o vetor com o transposon *TnphoA*, segundo o metodologia descrita. Após sete dias de cultivo em

BOD a 28°C, foram obtidas colônias isoladas de *B. elkanii*, sendo essas selecionadas por Estreptomicina 100µg/mL (resistência da bactéria selvagem) e Canamicina 100µg/mL (resistência do *TnphoA*).

Foram coletados 60 mutantes, sendo estes estocados em 20% de glicerol a -80°C para, posterior análise das demais características afetadas por esse. Os próximos passos visaram à análise das características dos mutantes selecionados, a fim de se encontrar os que possuíam a característica desejada (aumento da produção de PHB).

### **5.2.3. Triagem dos mutantes produtores de PHB:**

Os mutantes obtidos pela conjugação foram selecionados para maior produção de PHB através do uso do corante Sudan Black. Após o período de acúmulo (10 dias de cultivo), foram selecionados os mutantes 24 (MUT24), 31 (MUT31), 33 (MUT33) e 50 (MUT50), já que esses apresentaram-se mais corados que os demais mutantes e o *B. elkanii* selvagem (Figura 15).

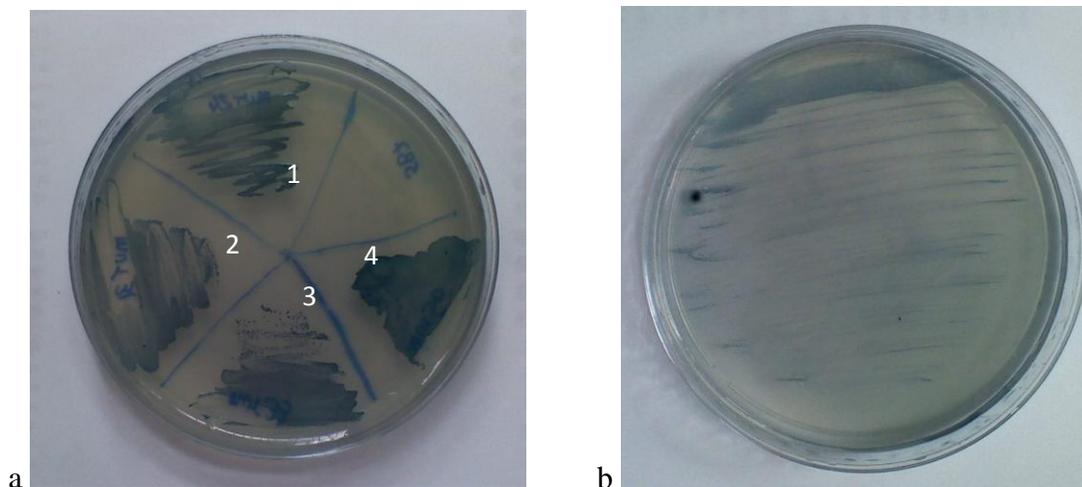


Figura 15. Mutantes de *B. elkanii*, testados para o acúmulo de PHB com Sudan Black. a) 1. MUT24; 2. MUT31; 3. MUT33; 4. MUT50. b) Linhagem selvagem SEMIA587.

### 5.3. Dosagem e análise de PHAs produzidos:

Como mencionado na metodologia, a análise da produção dos PHAs nos clones de *E. coli* recombinantes, bem como nos mutantes de *B. elkanii*, foi feita por cromatografia gasosa e extração de polímeros totais com clorofórmio. Os resultados da extração podem ser observados na tabela 4. Com a análise cromatográfica foi possível confirmar a presença de PHB como único tipo de PHA produzido por essas bactérias.

Tabela 4. Análise da produção de PHAs nos clones de *E. coli* e nos mutantes de *B. elkanii*.

<b>Amostra</b>	<b>mg de célula</b>	<b>% de PHB na célula</b>
<i>B. elkanii</i> selvagem	10,2	51
MUT24	7,9	54,8
MUT31	15,4	68,8
MUT33	15,5	72
MUT50	13,7	57
BL21de3	13,1	0
<i>E. coli</i> AB	11,4	0
<i>E. coli</i> C	12,7	0
<i>E. coli</i> ABC	14,7	2,2

Como pode ser observado, foi possível detectar uma produção de PHB muito baixa na construção de *E. coli*ABC, porém houve diferença do acúmulo de PHB nos mutantes de *B. elkanii*.

## 6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, duas abordagens diferentes foram adotadas para a melhoria da produção de PHB. Na primeira, optou-se pelo isolamento dos genes responsáveis pela via de síntese desse polímero e expressão em *E. coli*, bactéria muito utilizada como ferramenta molecular e que se multiplica rapidamente, sendo assim, uma ótima candidata para produção de PHB (SLATER et al., 1988). Esperava-se com isto, uma possível produção de PHB, já que essa bactéria não produz naturalmente este tipo de polímero, podendo favorecer sua produção devido ao aumento da massa celular produzida em um menor tempo de geração (LI et al., 2007) Na segunda abordagem, optou-se por produzir mutantes aleatórios regulatórios (para maior produção de PHB) de *B. elkanii*, uma vez que, essa bactéria já era conhecida como produtora natural de PHB (MARCONDES et al, 2008), estando presente no solo e não sendo uma bactéria patogênica, o que favorece sua utilização na produção do polímero (PAGANELLI et al., 2007). Porém sua maior desvantagem é seu tempo de multiplicação, já que o acúmulo se dá em aproximadamente 10 dias.

Seguindo a primeira abordagem, verificou-se que o isolamento dos genes completos, através da técnica de PCR, foi eficiente, já que essa é uma metodologia rápida e segura, pois os iniciadores foram desenhados de forma específica para tais seqüências. Outra etapa importante foi a clonagem direcionada dos genes, através do uso de duas enzimas de restrição específicas para cada gene, pois, dessa forma, a direção de entrada do gene no vetor é controlada, possibilitando que esse seja transcrito de forma correta (NOVAGEN). Com as clonagens prontas foi possível a manutenção dos três genes da via de síntese do PHB em uma mesma bactéria. Com isso, observou-se a necessidade da obtenção de dois

vetores de expressão com diferentes cassetes de seleção a antibióticos, pois caso isso não fosse feito, não seria possível manter as duas construções na mesma célula bacteriana, devido ao problema de grupos de incompatibilidade, isto é, a possível incapacidade de dois plasmídios de mesmo grupo de incompatibilidade em uma mesma célula bacteriana.

Com a análise por extração de polímeros totais com clorofórmio, observou-se que com a presença dos três genes na mesma bactéria foi possível detectar-se um pequeno acúmulo de PHB. Outros autores, como HUANG et al.(2006) também tiveram suas construções para produção de PHB em *E. coli* recombinante apresentando baixa eficiência no acúmulo tanto em escala laboratorial como em industrial. Este fato pode ser devido a vários motivos. O primeiro deles é que a *E. coli* não tem maquinaria e nem está adaptada a produzir o polímero, por isso, mesmo ela tendo os genes e carbono disponível, provavelmente, está ocorrendo desvio deste carbono para outras vias metabólicas e, conseqüentemente, não produção de PHB; além do que, para o acúmulo de PHB, faz-se necessário a adaptação da célula para armazenar tal polímero, como enzimas que formam os grânulos para acumular o polímero, como as phasinas (WEI et al., 2009). Além disso, a expressão dos três genes deve estar ocorrendo ao mesmo tempo, o que pode não ser favorável à produção do polímero, uma vez que o gene *phbC* é o último da via, e deveria estar expresso apenas quando os monômero de 3-Hidroxibutiril estivessem disponíveis. Com isso, ajustes na expressão desses genes seriam necessários para tentar-se obter um acúmulo favorável de PHB.

Com a segunda abordagem, verificou-se que é possível obter-se mutantes de *B. elkanii* através da conjugação com uma *E. coli* que tenha um plasmídio conjugativo com um transposon. Esta abordagem pode, portanto, ser útil para a obtenção de diferentes tipos de

mutantes, inclusive regulatórios, dependendo do objetivo do trabalho, fazendo-se necessário adequar a metodologia para seleção dos mutantes com as características desejadas (MULLER et al., 1995). Neste trabalho, procurou-se selecionar mutantes que possuísem produção aumentada de PHB através da coloração da colônia com Sudan Black. Apesar deste corante não apresentar sensibilidade para a detecção de pequenas alterações no acúmulo de PHB foi possível selecionar várias colônias que, à observação direta, possivelmente possuíam aumento de PHB. Entre estas possíveis colônias mutantes, quatro colônias apresentaram-se mais coradas, e as mesmas foram analisadas por cromatografia e extração de PHB com clorofórmio.

Nesta análise foi possível verificar que existia uma diferença na produção de PHB entre o *B. elkanii* selvagem e os mutantes. Observou-se que o melhor mutante obtido foi o MUT33 com aproximadamente 72% do seu peso seco acumulado em PHB, enquanto a linhagem selvagem acumulou 51% do seu peso seco em forma de polímero, nas mesmas condições, o que representa um aumento considerável na produção. Este aumento na produção de PHB deve-se, provavelmente, pelo transposon ter atingido um gene de uma via metabólica competitiva à via de síntese de PHB. Algumas vias já foram descritas como competitivas, como é o caso da via de síntese do EPS (TAVERNIER et al., 1997), que pode ser o caso. Entretanto, para confirmar a razão do aumento do acúmulo de PHB nesses mutantes serão necessários futuros estudos, analisando-se a região do genoma onde se encontra o transposon nestes organismos.

Com a comparação das duas abordagens, pode-se verificar que mesmo a *E. coli* sendo uma bactéria que se multiplica rapidamente e sendo molecularmente bem conhecida, a

produção de PHB nesta não é simples, já que naturalmente esta não está adaptada para isso. Já os rizóbios fazem essa produção naturalmente, o que favorece a modificação de vias competitivas para aumentar a produção de PHB, uma vez que ele já possui a maquinaria necessária para acumular este polímero. Com isso, a obtenção de mutantes que são melhores produtores é facilitada. Além disso, mesmo os rizóbios tendo que ser cultivados por um maior período para que o acúmulo possa ocorrer, esse tem a habilidade de produzir PHB a partir de sacarose, o que não ocorre com *E. coli*, que necessitou de glicose para os testes de acúmulo, o que implica em um maior custo da produção, já que a fonte de carbono é o principal elemento para se ter produção de PHB. Sendo assim, utilizar uma fonte de carbono renovável e mais viável, contribui para redução dos gastos de produção (CARMINATTI et al., 2006). Outro ponto importante são os gastos e o tempo necessários para se obter um mutante com maior acúmulo de PHB. A obtenção de mutantes aleatórios requereu um menor custo e um grande número de mutantes a serem analisados, enquanto a tentativa de expressão heteróloga dos genes requereu um maior custo para sua produção e um maior tempo para obtenção do recombinante com todos os genes, já que a metodologia precisou ser otimizada até conseguir-se isolar e expressar todos os genes na mesma bactéria.

## 7. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos foi possível concluir:

5. Produziu-se de maneira estável uma mesma linhagem recombinante bacteriana (*E.coli*) com dois vetores de expressão de mesmo grupo de incompatibilidade;
6. A linhagem de *E. coli* que possui os três genes relacionados à síntese de PHB clonados produziu o polímero PHB, mas não de forma otimizada; indicando que melhores condições de síntese e expressão devem pesquisadas em futuros trabalhos;
7. A mutação aleatória por transposon é uma ferramenta viável para obtenção de mutantes com as características desejadas, devendo-se adequar a metodologia de detecção ao objetivo proposto;
8. Mutantes de *B. elkanii* selecionados produzem diferentes quantidades de PHB em relação ao selvagem;
9. Mesmo com a diferença em número de células e tempo de desenvolvimento, *B. elkanii* selvagem e mutantes são melhores produtores de PHB que *E. coli* recombinante.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOR, I.S.; KEASLING, J.D. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p.475–483, 2003.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389-402, 1997.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. Exercícios práticos de Genética. **Cia. Editora Nacional e Editora Universidade de São Paulo**, p. 288, 1973.

BISHOP, P.E.; GUEVARA, J.G.; ENGELKE, J.A.; EVAN, J.H. Relation between glutamine synthetase and nitrogenase activities in the symbiotic association between *Rhizobium japonicum* and *Glycine max*. **Plant Physiology**, v. 57, p. 542-546, 1976.

BERINGER, J.E. R factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, v.84, p.188-198, 1974.

BOHMERT, K.; BALBO, I.; STEINBÜCHEL, A.; TISCHENDORF, G.; WILLMITZER, L. Constitutive Expression of the  $\beta$ -Ketothiolase Gene in Transgenic Plants: a Major

Obstacle for Obtaining Polyhydroxybutyrate-Producing Plants. **Plant Physiology**, v. 128, p.1282-1290, 2002.

BREEDVELD, M.W.; DIKEMA, C.; ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; ZEHNDER, A.J.B. Response of intracellular carbohydrates to a NaCl shock in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* TA-1 and *Rhizobium melioli* SU-47. **Journal Genetic Microbiology**, v.139, p. 3157-3163, 1993.

CARMINATTI, C.; MESSANE, F.E.; BRANDÃO, M.C.Z; PINHEIRO, V.R. Produção de polihidroxialcanoatos (PHAs). **Universidade Federal de Santa Catarina**, Centro Tecnológico, 2006.

CEVALLOS, M.A.; ENCARNACIÓN, S.; LEIJA, A.; MORA, Y.; MORA, J. Genetic and Physiological Characterization of a *Rhizobium etli* Mutant Strain Unable to Synthesize Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate. **Journal of Bacteriology**, v.178, p. 1646–1654, 1996.

COUTINHO, B. C.; MIRANDA, G. B.; SAMPAIO, G. R.; DE SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. A importância e as vantagens do polihidroxibutirato (plástico biodegradável). **Holos**, v. 20, p. 77–81, 2004.

DELAMARRE, S.C.; BATT, C.A. Comparative study of promoters for the production of polyhydroxyalkanoates in recombinant strains of *Wautersia eutropha*. **Applied and Molecular Biotechnology**, v. 71, p. 668-679, 2006.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FREITAS, T. P. S. Isolamento de um novo *Bacillus cereus* produtor de polihidroxialcanoato (PHA) e caracterização da PHA sintase e da PHA despolimerase. Trabalho para obtenção do título de Doutor pelo programa de pós- graduação em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT. **São Paulo**, 2007.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T. Bradyrhizobiaceae family novel. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p.1-6, 2006.

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

polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 45, p. 785-791, 1996.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, 195–202, 1998.

HUANG, T.Y.; DUAN, K.J.; HUANG, S.Y.; CHEN, C.W. Production of polyhydroxyalkanoates from inexpensive extruded rice bran and starch by *Haloferax mediterranei*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, p.701–706, 2006.

KABIR, M.M.; SHIMIZU, K. Fermentation characteristics and protein expression patterns in a recombinant *Escherichia coli* mutant lacking phosphoglucose isomerase for poly(3-hydroxybutyrate) production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 62, p. 244–255, 2003.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.501-505, 1992.

LEE, J.N.; SHIN, H.D.; LEE, Y.H. Metabolic engineering of pentose phosphate pathway in *Ralstonia eutropha* for enhanced biosynthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. **Biotechnology Program**, v. 19, p. 1444–1449, 2003.

LEIMOIGNE, M. Produits de deshydratation et de polymerization de l'acide boxybutyrique. **Bulletin de la Société de Chimie Biologique**, v.8, p. 770-7782, 1926.

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecule**, v.6, p.1–8, 2005.

LINTON, J. D.; ASH, S. G.; HUYBRECHTS, L. In D. Macmillan Byrom (ed.), Biomaterials. Novel materials from biological sources. **Microbial polysaccharides**, p. 217–261, 1991.

LODWIG, E.; POOLE, P. Metabolism of Rhizobium bacteroids. **Critical Reviews in Plant Science**, v.22, p.37-78, 2003.

MANOIL, C.; BECKWITH J. TnpA: a transposon probe for protein export signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.82, p.8129-8133, 1985.

MADISON, L.L.; HUISMAN, G.W. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.63, p. 21-53, 1999.

MARCONDES, J.; CANTÃO, M.E.; ALVES, L.M.C.; LEMOS, E.G.M. Transcriptional profile of *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA587 in symbiosis with soybean (*Glycine max* L. Merrill) analyzed by DNA microarray. In: Felix D. Dakota; Samson B. M. Chimphango; Alex J. Valentine; Claudine Elmerich; William E. Newton. (Org.). **Current Plant Science Biotechnology Agro Springer**, v. 42, p.299-300, 2008.

MORENO, A. Usina produz plástico da cana 100% biodegradável. **Jornal Cana**, p. 72-73, 2003.

MULLER, P.; AHRENS, K.; KELLER, T.; KLAUCKE A. A *TnphoA* insertion within the *Bradyrhizobium japonicum sipS* gene, homologous to prokaryotic signal peptidases, results in extensive changes in the expression of PBM-specific nodulins of infected soybean (*Glycine max*) cells. **Molecular Microbiology**, v. 18, 831-840, 1995.

PAGANELLI, F.L. Avaliação da produção de polihidroxialcanoatos em rizóbios. Trabalho para obtenção do título Bacharel em Ciências Biológicas. **Jaboticabal, São Paulo**, 2007.

PARK, J.S.; LEE, Y.H. Metabolic characteristics of isocitrate dehydrogenase leaky mutant of *Alcaligenes eutrophus* and its utilization for poly-b-hydroxybutyrate production. **Journal Fermentation Bioengineer**, v. 81, p.197–205, 1996.

PEOPLES, O.P.; SINSKEY. A.J. Poly-b-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16: characterization on the genes encoding B-ketothiolase and acetoacetyl-Coa reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PRADELLA, J. G. C. Biopolímeros e Intermediários Químicos. 2006. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06\\_biopolimeros.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf)>. Acesso em: 23 ago. 2009.

REHM, B.H.A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **The Biochemical Journal**, v.276, p. 15-33, 2003.

RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; BERKUM P.; TRIPLETT E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Brayrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4371-4373, 1993.

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

SCHUBERT, P.; STEINBUCHER, A.; SCHILEGEL, H.G. Cloning of *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-B-hydroxybutyrate acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 5837-5847, 1988.

SENIOR, P.J.; DAVES, E.A. The regulation of poly-B-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Journal of Biochemistry**, v. 134, p. 225-238, 1973.

SHILOACH, J., FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density: a historical perspective on method development. **Biotechnol Advances**, v. 23, p.345–357, 2005.

SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal Bacteriology**, v.170, 4431-4436, 1988.

SLATER, S.C.; VOIGE, W.H.; DENNIS, D.E.C. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcanigenes eutrophus* H16 poly-B-hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 4431-4438, 1988.

STENBÜCHER, A.; EVERSLOH, T. L. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, p. 81-96, 2003.

SUN, J.; DOMMELEN, A.V.; IMPE, J.V.; VANDERLEYDEN, J. Involvement of *glnB*, *glnZ*, and *glnD* Genes in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2985-988, 2002.

SURIYAMONGKOL, P.; WESELAKE, R.; NARINE, S.; MOLONEY, M.; SHAH, S. Biotechnological approaches for the production of polyhydroxyalkanoates in microorganisms and plants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 25, 148-175, 2007.

TAGUCHI, S.; NAKAMURA, H.; KICHISE, T.; TSUGE, T.; YAMATO, I.; DOI Y. Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase. **Journal Biochemist Engineer**, v. 16, p. 107–113, 2003.

TAVERNIER, P.; PORTAIS, J.C.; SAUCEDO, J.E.N.; COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; BARBOTIN, J.N. Exopolysaccharide and Poly-B-hydroxybutyrate coproduction two *Rhizobium meliloti* strains. **Applied and Environmental Microbiology**. v.63, p. 21-26, 1997.

TAYLOR, R.K.; MANOIL, C.; MEKALANOS, J.J. Broad-host-range vectors for delivery of *TnphoA*: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. **Journal Bacteriology**, v. 171, p.1870-1878, 1989.

WEI, X.X.; YUSHI, Z.; YUAN, M.Q.; CHEN, G.Q. Effect of anaerobic promoters on the microaerobic production of polyhydroxybutyrate (PHB) in recombinant *Escherichia coli*. **Applied genetics and molecular biotechnology**, v. 82, 703–712, 2009.

ZAHRAN H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology Molecular Biology Review**, v. 63, p.968-989, 1999.