



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EUCLIDES NENGA MANUEL SACOMBOIO

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Herbaspirillum seropedicae*
SmR1 E MUTANTE *ntrC* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E RELAÇÕES
CARBONO/NITROGÊNIO

CURITIBA

2014

EUCLIDES NENGA MANUEL SACOMBOIO

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR *Herbaspirillum seropedicae*
SmR1 E SEU MUTANTE *ntnC* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E RELAÇÕES
CARBONO/NITROGÊNIO

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica) pelo Programa de Pós-graduação em Ciências (Bioquímica) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos.

CURITIBA

2014



TERMO DE APROVAÇÃO

EUCLIDES NENGA MANUEL SACOMBOIO

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO POR
Herbaspirillum seropedicae SmR1 E SEU MUTANTE *ntnC* EM
DIFERENTES FONTES DE CARBONO E RELAÇÕES
CARBONO/NITROGÊNIO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica), no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela banca examinadora formada pelos avaliadores:

**Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos (Orientador)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR**

**Dr. Joseph Albert Medeiros Evaristo
Departamento de Genética
UFPR**

**Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
UFPR**

Curitiba, 25 de Agosto de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar saúde, força de vontade, coragem e guiar meus passos em todas as caminhadas e fazer com que todos os meus planos se tornem realidades concretizadas.

A toda minha família em geral, irmãos, irmãs, tios, tias, primos e primas e a minha, em especial a minha estimada mãe Adelina Mafumbo e o meu padrasto Carlos Ferreira por me incentivarem e orientarem em todas as vezes que me senti sozinho e longe de casa e por estarem sempre comigo embora em outro continente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Müller dos Santos, pela orientação neste trabalho, pelos ensinamentos, pela dedicação, pela paciência e pela confiança depositada mesmo sabendo que seria um percurso difícil para mim já que este era um assunto no qual eu tinha pouco ou quase nenhum conhecimento.

A coordenação de pós-graduação em especial aos professores Miguel e Silvia e nossa estimada secretaria Irene, por toda a atenção e o carinho prestado durante estes dois anos de curso, e também os professores do grupo de fixação biológica de nitrogênio e professores do curso.

A minha namorada Elaine Dias e todos os amigos e colegas do laboratório 275, 279, 272 e anexo, em particular ao Luís e ao Cícero que me ajudaram e orientaram em como realizar alguns experimentos, pelos momentos compartilhados e pela amizade durante esses dois anos. Estes agradecimentos também se estendem aos colegas do grupo de carboidratos que sempre estiveram disponíveis para ajudar quando necessitasse de alguma coisa, em especial o Arquimedes que me ajudou com a realização das análises de fonte de carbono por ressonância magnética nuclear.

Aos técnicos de laboratório, dona Roseli Prado, Valter e Alex, pela disponibilidade, paciência e ajuda em todos os momentos que necessitei.

A todos os meus amigos do Brasil e de Angola que sempre dão aquele incentivo, elogiam e torcem para que tudo possa dar certo.

Aos amigos da turma de mestrado de 2012, incluindo os colegas do doutorado que fizeram algumas aulas com essa turma.

A Universidade Agostinho Neto em geral e em particular ao Instituto Superior de Ciências de Saúde por me ter dispensando para formação acadêmica.

Ao INCT, ao INABGE e ao CNPq pela bolsa de estudos durante os dois anos de mestrado.

EPIGRAFE

**A SABEDORIA É SABER O QUE SE DEVE
FAZER; A VIRTUDE É FAZÊ-LO. POIS
NINGUÉM É TÃO GRANDE QUE NÃO POSSA
APRENDER, NEM TÃO PEQUENO QUE NÃO
POSSA ENSINAR. PORQUE AQUELE QUE
PARECE SÁBIO ENTRE OS TOLOS, PARECE
TOLO ENTRE OS SÁBIOS.**

DAVID STARR JORDAN

**EDUCADOR, ESCRITOR E NATURALISTA
NORTE-AMERICANO (1851-1931)**

SUMÁRIO

LISTA DAS FIGURAS _____	IV
LISTA DAS TABELAS _____	VIII
ABREVIATURAS _____	IX
RESUMO _____	XII
ABSTRACT _____	XIII
1.INTRODUÇÃO _____	14
2.IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA _____	16
2.1 VIA DE BIOSÍNTESE DE POLIHIDROXIBUTIRATO _____	17
2.2 EFEITO DA FONTE DE CARBONO NA BIOSÍNTESE DE PHB _____	18
2.3 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITOGÊNIO NA BIOSÍNTESE DE PHB _____	20
3 JUSTIFICATIVA _____	23
4 OBJETIVOS _____	24
4.1 OBJETIVO GERAL _____	24
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS _____	24
5 METODOLOGIA _____	25
5.1 MICRORGANISMOS, MEIOS DE CULTURA, ANTIBIÓTICOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO _____	25
5.2 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEO _____	25
5.3 ANTIBIÓTICOS _____	27
6. MANIPULAÇÃO DE DNA _____	27
6.1 MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEO POR LÍSE ALCALINA _____	27
6.2 ELETROFORESE _____	27
6.3 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA _____	28
6.3.1 TRANSFORMAÇÃO DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES _____	28
6.3.2 TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO EM <i>E. Coli</i> _____	28

6.3.3 TRANSFERÊNCIA DE DNA PLASMIDIAL POR CONJUGAÇÃO BACTERIANA BIPARENTAL	29
6.4 COMPLEMENTAÇÃO DO MUTANTE <i>ntnC</i> DE <i>Herbaspirillum seropedicae</i> SmR1	29
7. METÓDO ANALÍTICO	29
7.1 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA BACTERIANA	29
7.2 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CRESCIMENTO BACTERIANA	30
7.3. QUANTIFICAÇÃO DE PHB POR CROMATOGRAFIA GASOSA	30
7.4 MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE AÇÚCARES REDUTORES PELO MÉTODO DO 3,5-DINITROSALICILATO	30
7.5 MÉTODO DE QUANTIFICAÇÃO DE AMÔNIO(MÉTODO DO INDOFENOL)	31
7.6 CONTAGEM DE BACTÉRIAS TOTAIS(UFC/ML)	32
6 RESULTADOS	33
7 DISCUSSÃO	72
8 CONCLUSÕES	78
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SÍNTESE DE POLIHIDOXIBUTIRATO (Madidon e Dawes, 1990)---	17
FIGURA 2. ELECTROMICROGRAFIA DE TRANSMISSÃO DE <i>H. SEROPEDICE</i> SMR1 (KADOWAKI, 2012)-----	19
FIGURA 3. ENSAIO DINITROSALICILATO (KOK, 2011)-----	31
FIGURA 4. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE GLUCOSE E NITOGÊNIO-	35
FIGURA 5. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE FRUTOSE E NITOGÊNIO-	38
FIGURA 6. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE GALACTOSE E NITOGÊNIO-----	42
FIGURA 7. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE XILOSE E NITOGÊNIO--	46
FIGURA 8. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE NITOGÊNIO EM LACTATO-----	51
FIGURA 9 PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE NITOGÊNIO EM MALATO-----	53
FIGURA 10. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE NITOGÊNIO EM SUCCINATO-----	56
FIGURA 11. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE NITOGÊNIO EM CITRATO-----	59
FIGURA 12. PRODUÇÃO DE PHB E CONSUMO DE NITOGÊNIO EM GLICEROL -----	62

FIGURA 13. PERFIL DE PH DURANTE O CRESCIMENTO DE *Herbaspirillum seropedicae* EM ÁCIDOS CARBOXÍLICOS E MONOSSACARÍDEOS----- 65

FIGURA 14. EFEITO DA COMPLEMENTAÇÃO *ntrC* NA PRODUÇÃO DE PHB EM MALATO E GLUCOSE----- 68

FIGURA 15. EFEITO DA COMPLEMENTAÇÃO *ntrC* NO CRESCIMENTO EM NFB-NITRATO----- 71

TABELA 1. ESTIRPES BACTERIANAS E PLASMÍDEOS QUE FORAM UTILIZADOS NO ESTUDO-----	25
TABELA 2. ANTBIÓTICOS UTILIZADOS NO ESTUDO-----	27
TABELA 3. CURVA DE CALIBRAÇÃO UTILIZADA PARA QUANTIFICAR CLORETO DE AMÔNIO NO MEIO-----	32
TABELA 4. COMPARAÇÃO DE PRODUÇÃO DE PHB ENTRE A ESTIRPE SELVAGEM SMR1 E MUTANTE <i>NTRC</i> DE <i>H. SEROPEDICAE</i>-----	64
TABELA 4. BIOMASSA DAS CULTURAS BACTERIANAS-----	66
TABELA 5. CONTAGEM DE BACTÉRIAS TOTAIS (UFC/mL)-----	70

LISTA DAS ABREVIATURAS

C/N = carbono/nitrogênio

°C = graus Celsius

D.O. = densidade óptica

DNA = ácido desoxirribonucleico

GC = cromatografia gasosa

g/L = grama por litro

h = hora

Kg = kilograma

LA = Luria - Agar

LB = Luria - Bertani

mL = mililitro

mg = miligrama

mmol/L = milimol por litro

mM = milimolar

nM = nanomolar

ONPG = o-nitrofenil- β -D-galactosídeo

PHA = polihidroxicanoato

PHB = polihidroxibutirato

PSC = peso seco da célula

rpm = rotações por minuto

μ L = microlitro

RESUMO

Estudos com a finalidade de produzir bioplásticos, como polihidroxialcanoatos (PHA), têm crescido nas últimas décadas por ser uma alternativa sustentável para a produção de plásticos biodegradáveis e, portanto, uma alternativa ambientalmente viável para a substituição dos processos petroquímicos utilizados massivamente nos dias de hoje. *Herbaspirillum seropedicae* tem um grande potencial biotecnológico quanto à produção de PHA, sendo que essa capacidade já foi reportada sob diferentes condições de cultivo. O objetivo principal do presente estudo foi avaliar a produção de PHB na estirpe parental *H. seropedicae* SmR1 e no seu mutante *ntrC*, defeitivo na expressão de NtrC, um importante regulador do metabolismo de nitrogênio em diversas bactérias. A estratégia desenhada nos permitiu avaliar a produção em alta e baixa relação carbono/nitrogênio (C/N) utilizando NH₄Cl como fonte de nitrogênio e monossacarídeos ou ácidos carboxílicos como fontes de carbono. Entre os ácidos carboxílicos avaliados, o citrato se mostrou o mais promissor, já que a produção de polihidroxibutirato atingida foi de 47,1% de PHB/psc para *H. seropedicae* SmR1 e 76% de PHB/psc para o mutante *ntrC*. Entre os monossacarídeos testados, a D-frutose se destacou como a melhor fonte de carbono deste grupo, atingindo produções de 30,5% e 65,8% de PHB para SmR1 e o mutante *ntrC*, respectivamente. Interessantemente, a fonte de carbono em que *H. seropedicae* teve o melhor desempenho quanto a produção de PHB foi o glicerol. As produções de PHB atingidas foram de 74,4% e 78% para *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC*, respectivamente. De modo geral, observou-se que independente da fonte de carbono utilizada, as maiores produções de PHB foram obtidas quando as concentrações de amônio no meio eram menores que 5mM/L, o que indica que altas relações C/N favorecem a síntese de PHB em *H. seropedicae*. O mutante *ntrC* demonstrou em todas as condições avaliadas produzir entre 20 a 100% mais PHB do que a estirpe parental SmR1. A complementação do mutante *ntrC* com uma cópia íntegra do gene *ntrC* de *H. seropedicae* SmR1 reverteu sua maior produção de PHB, retornando aos níveis da estirpe SmR1. Este resultado indica que a proteína NtrC está regulando o processo de síntese de PHB em *H. seropedicae*. As principais conclusões deste trabalho são: (i) a produção de PHB depende da natureza da fonte de carbono e provavelmente da sua via de metabolização e da produção de metabólitos como acetil-CoA e equivalentes reduzidos (NADPH e NADH); (ii), o mutante *ntrC* em todas as condições testadas apresentou maior produção de PHB, indicando que a ausência de NtrC pode afetar o balanço metabólico em *H. seropedicae* favorecendo a produção de PHA.

Palavras-chaves: *Herbaspirillum seropedicae*, Polihidroxibutirato (PHB), razão carbono/nitrogênio, sistema NTR, *ntrC*.

ABSTRACT

Studies aiming to produce bioplastics such as polyhydroxyalkanoates (PHA) has grown in recent decades to be a sustainable alternative for production of biodegradable plastics is therefore an environmentally feasible alternative to the substitution of petrochemical processes use in massively days today. *Herbaspirillum seropedicae* has great biotechnological potential for the production of PHA, and this ability has been reported under different culture conditions. The main objective of this study was to evaluate the production of PHB in the parental strain *H. seropedicae* SmR1 and its *ntrC* mutant, defective in the expression of NtrC, an important regulator of nitrogen metabolism in various bacteria. The strategy allowed us to evaluate the production in high and low carbon/nitrogen (C/N) using NH₄Cl as a nitrogen source and monosaccharides or carboxylic acids as carbon sources compared. Among the tested monosaccharides, D-fructose emerged as the best source of carbon this group, reaching yields of 30.5% and 65.8% PHB for SMR1 and *ntrC*, respectively. Interestingly, the carbon source that seropedicae H. had the best performance as PHB production was glycerol. The PHB production was achieved of 74.4% and 78% for H. seropedicae SMR1 and mutant *ntrC*, respectively. In general, it was observed that independent of the carbon source used, the highest production of PHB were obtained when the concentration of ammonia in the medium were lower than 5mM / L, indicating that high C/N ratios favoring the synthesis of PHB H. seropedicae. The *ntrC* mutant demonstrated in all conditions evaluated to produce between 20 and 100% higher than PHB SMR1 parental strain. The complementation of mutant *ntrC* integrates with a copy of the *ntrC* gene of *H. seropedicae* SmR1 reversed its largest production of PHB, returning to levels of strain SmR1. The complementation of mutant *ntrC* integrates with the copy of the *ntrC* gene of *H. seropedicae* SmR1 reversed its largest production of PHB, returning to levels of strain SmR1. This result indicates that indeed the NtrC protein is regulating the process of synthesis of PHB in *H. seropedicae*. The main conclusions are: (i) the production of PHB depends on the nature of the carbon source and probably its route of metabolism and the production of metabolites such as acetyl-CoA and reduced equivalentes (NADPH and NADH); (ii) the *ntrC* mutant under all conditions tested showed higher production of PHB, indicating that the absence of NtrC can affect the metabolic balance in *H. seropedicae* favoring the production of PHA.

Key words: *Herbaspirillum seropedicae*, Polihidroxitirato (PHB), carbon/nitrogen ratio, NTR system, *ntrC*.

1 INTRODUÇÃO

Os plásticos são amplamente utilizados na obtenção de diversos produtos industriais, desde peças automotivas até insumos médicos. Os plásticos mais comuns são aqueles derivados da indústria petroquímica, como os polietilenos, polivinílicos e poliestirenos. Todos podem ser facilmente moldados em estruturas de diversas formas e tamanhos, incluindo fibras e filmes finos. A ampla utilização de materiais plásticos deve-se ao baixo custo de produção, e sua extraordinária resistência química e térmica. Porém, estas propriedades fazem com que os materiais plásticos tornem-se um problema ambiental, já que na ampla maioria das vezes são materiais recalcitrantes e de difícil degradação por microrganismos do ambiente (REDDY *ET al.*, 2003). Estima-se que mais de 100 milhões de toneladas de plásticos petroquímicos são produzidos a cada ano, sendo que o consumo per capita nos Estados Unidos da América é de 80 kg, nos países da Europa 60 kg e 2 kg na Índia (KALIA, RAIZADA & SONAKYA *et al.*, 2000). Dos 75 bilhões de quilos de plásticos produzidos a cada ano 40% é descartado em aterros e centenas de milhares de toneladas de plásticos são descartadas em ambientes marinhos a cada ano e se acumulam em regiões oceânicas. Uma opção para a redução de resíduos plásticos é a incineração, entretanto este processo é caro e perigoso, visto que, produtos químicos nocivos, como cloreto de hidrogênio e cianeto de hidrogênio são liberados durante esse processo de incineração (JOHNSTONE, 1990; ATLAS, 1993). Considerando que o tempo para decomposição de polímeros sintéticos varia de 50 a 500 anos é interessante buscar novas alternativas na tecnologia de obtenção de biopolímeros com menor tempo de degradação.

Uma alternativa ao método de produção atual baseia-se na produção de materiais plásticos através de matrizes biológicas, como microrganismos e plantas. Estes materiais são denominados de bioplásticos (REHM, 2010). As vantagens na produção e utilização de bioplásticos residem em dois principais fatores: (i) menor tempo de degradação dos materiais no solo, entre 6 a 12 meses (BOHMERT *et al.*, 2002) e, (ii) produção a partir de insumos renováveis (KESHAVARZ & ROY., 2010). Os polihidroxialcanoatos (PHA) são os bioplásticos com grande potencial para substituir os plásticos convencionais da indústria petroquímica, já que são produzidos a partir de insumos renováveis como carboidratos e óleos vegetais e, são rapidamente degradados no solo em comparação a plásticos convencionais. Estes polímeros são produzidos por microrganismos, especialmente bactérias, como uma forma de estoque de carbono e de potencial redutor para a célula (MADISON & HUISMAN, 1999). Os PHA são estocados intracelularmente na forma de grânulos e podem representar uma fração importante do peso seco da cultura (até 60% em alguns casos). O PHA mais comum, produzido por procariotos é o polihidróxibutirato (PHB) (UCHINO *et al.*, 2007), que é um poliéster formado pela esterificação de vários monômeros de ácido 3-hidroxibutírico, um termoplástico, que mantém suas

propriedades estruturais até mesmo em altas temperaturas (ao redor de 170°C), sendo esta uma característica atrativa e muito similar aos plásticos derivados da indústria petroquímica, tal como o polipropileno que é largamente utilizado (REDDY *et al.*, 2003).

A produção de PHA tem sido incentivada nos Estados Unidos, Japão e Europa, já que passa a ser uma alternativa viável para a produção de plásticos biodegradáveis. Em 1990, foi lançado na Alemanha uma linha de produção industrial de garrafas biodegradáveis de shampoo, usando um polímero resultado da mistura de PHB e PHV (poli-3-hidroxivalerato) produzido por *P. oleovorans*. Embora o custo de produção de PHA ainda seja menos vantajoso em comparação ao processo químico de obtenção de plásticos, hoje se incentiva estudos de PHA, com propriedades diferentes, produzido a partir de uma única fonte de carbono de baixo custo (ANDERSON & DAWES, 1990). Uma possível estratégia para diminuição do custo de produção é utilizar insumos de baixo custo como resíduos agroindústrias e/ou modificar geneticamente os microrganismos produtores de PHB para torná-los mais eficientes. Para elaborar uma estratégia eficiente para a produção é necessário compreender como ocorre a biossíntese de PHB na bactéria e como este processo é regulado.

Algumas bactérias são capazes de acumular PHA como estoque de carbono e de energia, resultante do excesso da metabolização de fontes de carbono e limitação de outros nutrientes, tais como nitrogênio, fosfato, ferro, enxofre, potássio, magnésio ou oxigênio. Quando o fornecimento do nutriente limitante é restaurado, o PHA pode ser despolimerizado e subsequentemente metabolizado para gerar energia (SCHLEGEL *et al.*, 1961; MERRICK E DOUDOROFF, 1964; FOSTER *et al.*, 1994).

Atualmente, no Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio da UFPR encontram-se em andamento projetos que visam caracterizar a regulação dos genes envolvidos na biossíntese e na degradação de PHB em *H. seropedicae* SmR1, bem como a caracterização funcional de proteínas estruturais e de enzimas associadas aos grânulos de PHB. Porém, ainda não havia sido executado um estudo com objetivo de avaliar o potencial de produção de PHB por *H. seropedicae* em diferentes fontes de carbono. Um processo eficiente para a obtenção de PHB bacteriano deve ser o menos custoso possível, portanto o processo deve utilizar como fontes de carbono substratos de baixo custo.

Sendo assim, a proposta deste trabalho de mestrado foi avaliar a produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 em diferentes fontes de carbono, tais como monossacarídeos, ácidos orgânicos e glicerol e em diferentes relações C/N (carbono/nitrogênio). Além disso, também se avaliou a capacidade produtiva da estirpe mutante no gene *ntrC* que apresentou maior produção de PHB em resultados preliminares.

2. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Herbaspirillum seropedicae, é uma bactéria fixadora de nitrogênio endofítica gram-negativa, da classe β -Proteobacteria, capaz de colonizar raízes, caules e folhas de plantas de interesse econômico (BALDANI *et al.*, 1992; OLIVARES *et al.*, 1996; JAMES & OLIVARES, 1998; MAGALHÃES CRUZ *et al.*, 2001). Estudos indicam que *Herbaspirillum seropedicae* pode contribuir para o crescimento vegetal de diversos cultivares. Inoculação de arroz com *H. seropedicae* promoveu um aumento no conteúdo de nitrogênio em grãos e no aumento do crescimento da raiz (BALDANI *et al.*, 2000; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003). Em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas, inoculação com *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* induziram um aumento no total de matéria seca quando comparado a plantas não inoculadas e um maior aumento quando comparado a outros diazotrofos. A biomassa e o conteúdo de nitrogênio foliar também foram maior em plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com *Herbaspirillum* sp. e *Gluconoacetobacter diazotrophicus* com ou sem adubação com nitrogênio quando comparadas a plantas adubadas, mas sem inoculação (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Entre as espécies de *Herbaspirillum* descritas, a genética da fixação biológica de nitrogênio é mais bem estudada em *H. seropedicae*. Vários genes envolvidos na fixação de nitrogênio e no metabolismo global de nitrogênio deste organismo foram identificados e caracterizados. Uma grande vantagem dos estudos moleculares de *H. seropedicae* foi alcançada com o sequenciamento genômico desta bactéria, permitindo a caracterização de um grande número de genes e das proteínas por eles codificadas.

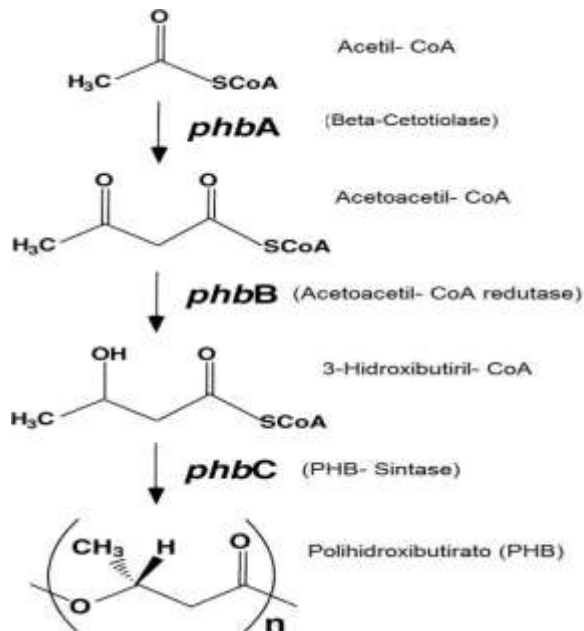
A bactéria *H. seropedicae* também mostra um grande potencial biotecnológico quanto à produção de PHB. Essa capacidade já foi reportada sob diversas condições de crescimento. Resultados anteriores mostraram que *H. seropedicae* Z69 produziu PHB a 36% do peso seco da cultura com glucose a 50 mmol/L como fonte de carbono e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20 mmol/L como fonte de nitrogênio. Também foi observado que adicionando ácido nonanóico à cultura, a bactéria foi capaz de produzir um copolímero de PHB com PHV (polihidroxivalerato; ácido valérico contém 5 carbonos) em uma proporção de 2:1 (CATALÁN *et al.*, 2007). Devido a vantagens físico-químicas como a facilidade para o processamento industrial, a produção do copolímero é vantajosa frente ao homopolímero (PHB).

2.1 Via de biossíntese de PHB em bactérias

Muitas bactérias biossintetizam PHB a partir de acetil-CoA através de uma via de três passos apresentadas na figura 1 como: 1) condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA através da ação de uma tiolase (PhbA); 2) redução de acetoacetil-CoA a R-(-)-3-hidróxi-butiril-CoA pela enzima acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente (PhbB) e 3) polimerização de R-(-)-3-hidróxi-butiril-CoA pela enzima PHB sintase (PhbC) (STEINBÜCHEL, 2001). Portanto, a biossíntese de PHB é um processo regulado tanto pela disponibilidade de acetil-CoA quanto pela disponibilidade de equivalentes reduzidos na forma de NADPH.

Via de síntese de PHB

Figura 1. Síntese de Polihidroxibutirato



(MADISON E DAWES, 1990)

O polihidroxibutirato é um componente formado sob determinadas circunstâncias como uma resposta a condições sub-ótimas para o crescimento, multiplicação, abastecimento, ou outras condições desequilibrada de nutrientes ou desvios de níveis ótimos de fatores fisiológicos (BABEL, ACKERMANN, BREUER, 2001), na maioria dos casos, eles são produzidos e acumulados em condições de estresse, por limitação de compostos como nitrogênio, fósforo, oxigênio ou carbono e também em condições de excesso de nutrientes (DAWES, 1990; SHANG, JIANG E CHANG, 2003), mas quando o fornecimento do nutriente limitante é restaurado, o PHA pode ser despolimerizado e subsequentemente metabolizado como fonte de carbono e energia (FOSTER et al, 1994; MERRICK E DOUDOROFF, 1964).

2.2 Efeito da fonte de carbono na biossíntese de PHB

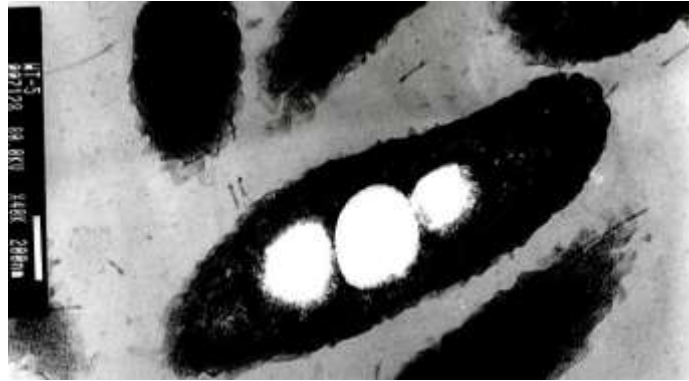
A síntese de PHB é diretamente acoplada ao funcionamento do metabolismo central de carbono na bactéria, já que altos níveis de acetil-CoA podem levar ao aumento da produção de PHB. Além disso, o controle da taxa respiratória e do balanço $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ são igualmente importantes para regular a síntese de PHB, sendo que NADPH é essencial para a conversão de acetoacetil-CoA para 3-hidroxiacetil-CoA. Portanto, a fonte de carbono a ser metabolizada pela bactéria tem um papel preponderante na geração de fluxos metabólicos que possam favorecer a biossíntese deste polímero.

Vários trabalhos na literatura reportam a produção de PHB a partir de mono e dissacarídeos, entre estes os mais utilizados são: glucose, frutose, galactose, xilose, sacarose e lactose. Ácidos graxos e óleos vegetais também têm sido utilizados para produção de PHB além de outros polímeros de cadeia média tais como PHH (polihidroxihexanoato) e PHO (polihidroxi octanoato) (LU *et al.*, 2010)

Em *H. seropedicae* SmR1 a via glicolítica é interrompida já que não há fosfofutoquinase-1 (PFK-1) no seu genoma. Portanto, acredita-se que a metabolização de glucose, frutose, galactose e manose ocorra através das vias Entner-Doudoroff e das pentoses fosfato. Através da via Entner-Doudoroff, 1 mol de D-glucose-6-fosfato é convertido a 1 mol de D-glucono-1,5-lactona-6-fosfato, como subproduto da reação é gerado 1 mol de NADPH (PEEKHAUS & CONWAY, 1998). Portanto, a metabolização de monossacarídeos através da via Entner-Doudoroff pode contribuir para a biossíntese de PHB gerando o cofator necessário para a conversão de acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA. Os produtos finais da via Entner-Doudoroff para cada mol de D-glucose metabolizado são: 1 mol de D-gliceraldeído-3-fosfato e 1 mol de piruvato. O D-gliceraldeído-3-fosfato participa da via de pagamento da glicólise, levando a formação de acetil-CoA pela atividade da piruvato desidrogenase. Com isto o substrato inicial da via de biossíntese de PHB é produzido. Entretanto, para que uma parte do acetil-CoA produzido seja destinado à síntese de PHB faz-se necessário que a entrada deste metabólito no ciclo do ácido cítrico seja diminuída.

Resultados obtidos no nosso laboratório com a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* mostraram que a bactéria é capaz de produzir até 25% de PHB do peso seco da cultura, quando cultivada com malato e uma análise da composição do polímero por cromatografia gasosa mostrou que este é formado exclusivamente por ácido 3-hidroxiacetil-CoA (KADOWAKI *et al.*, 2011). Entretanto, antes da realização deste trabalho não se tinha dados sobre o desempenho no acúmulo de PHB desta estirpe frente a outras fontes de carbono.

Figura 2. Electromicrografia de transmissão de *H. seropedice* SmR1



(KADOWAKI, 2012)

Uma via alternativa a Entner-Doudoroff é a via das Pentoses Fosfato. Neste caso, o intermediário 6-fosfogluconato é convertido através de uma descarboxilação oxidativa a ribulose-5-fosfato (PEEKHAUS & CONWAY, 1998). Essa reação é catalisada pela 6-fosfogluconato desidrogenase e gera como subproduto 1 mol de NADPH por cada mol de 6-fosfogluconato metabolizado. Portanto, a via das pentoses fosfato pode ser ainda mais vantajosa para produção de PHB pela geração de NADPH, já que 2 mols de NADPH são gerados por mol de glucose metabolizado (TYO *et al.*, 2010).

Duas enzimas do ciclo do ácido cítrico são normalmente reguladas: (i) citrato sintase, enzima que condensa acetil-CoA a oxaloacetato, produzindo citrato e CoA-SH e, (ii) isocitrato desidrogenase, enzima que converte isocitrato a alfa-cetogluturato produzindo 1 molécula de NADPH. Estas duas enzimas podem ter suas atividades controladas de acordo com o nível de alguns metabólitos. A citrato sintase é severamente inibida por altas concentrações de NADH, entretanto este efeito pode ser revertido com o aumento de AMP. Já a isocitrato desidrogenase é inibida por NADPH, NADH e ATP. Portanto, em condições em que há a produção de altos níveis de equivalentes reduzidos (NADH e NADPH) e a taxa respiratória não é suficiente para consumi-los, a atividade do ciclo do ácido cítrico tende a ser menor. Com menor fluxo de entrada de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico e grande disponibilidade de equivalentes reduzidos, a biossíntese de PHB pode ocorrer. Sendo assim, entende-se que a biossíntese de PHB é um processo que colabora tanto para a bactéria obter reservas de carbono, como também para controlar os níveis de NAD(P)H/NAD(P)⁺ em condições onde não haja intensa respiração celular, como por exemplo em condições microaerófilas durante a fixação de N₂.

A produção de PHB utilizando intermediários do ciclo do ácido cítrico já foi relatada anteriormente. Por exemplo, em *Rhizobium* sp. strain CC 1192 foi mostrado que a bactéria assimila [¹⁴C]malato e transfere o esqueleto carbônico do malato para a formação de PHB

(CHOHAN & COPELAND, 1998). Em *Azospirillum brasilense* Sp7, também foi observada a produção de PHB quando esta bactéria foi cultivada em meio mínimo contendo como única fonte de carbono o malato (SUN *et al.*, 2000). Além do ácido málico, o ácido cítrico, succínico e alfacetoglutárico já foram utilizados como fonte de carbono para a produção de PHB (SONG *et al.*, 2011). No caso de *H. seropedicae* estirpes Z67, Z68 e Z78 foi observada a produção de PHB quando o ác. succínico foi utilizado como única fonte de carbono no meio de cultivo (CATALAN *et al.*, 2007). Entretanto os autores reportaram apenas a presença de PHB nas bactérias que foram cultivadas com ác. succínico e não realizaram a sua quantificação, tampouco o perfil de produção. Resultados obtidos no nosso laboratório com *H. seropedicae* estirpe SmR1 mostraram que a bactéria produz cerca de 18% de PHB por peso seco da cultura (PHB/psc) com 37 mM de ácido málico e 20 mM de NH₄Cl no meio de cultivo. A quantidade máxima de PHB atingida aumenta para 25% de PHB/psc se a concentração de NH₄Cl é diminuída para 5 mM, mostrando que além do tipo e da concentração da fonte de carbono a relação de carbono e nitrogênio no meio interferem na produção de PHB (SUN *et al.*, 2002).

2.3 Efeito da concentração de nitrogênio na biossíntese de PHB

A limitação em nitrogênio no meio de cultivo normalmente é utilizada como um indutor da produção de PHB em bactérias (MADISON & HUISMAN, 1999). Porém, as bases para tal efeito ainda não foram totalmente elucidadas. Uma hipótese recorrente na literatura é que em baixos níveis de nitrogênio haveria um maior fluxo de carbono a ser convertido em acetil-CoA, portanto maior disponibilidade de intermediário para se iniciar a biossíntese de PHB (MADISON & HUISMAN, 1999). Com o intuito de verificar o efeito dos genes do sistema NTR na produção de PHB, a produção do polímero foi avaliada em vários mutantes deste sistema em *Azospirillum brasilense* (SUN *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2002).

O sistema NTR regula o metabolismo de nitrogênio em resposta a fonte predominante de nitrogênio e a necessidade da célula. O amônio (NH₄⁺) é a fonte preferida de nitrogênio para a maioria das bactérias. Quando o amônio está disponível no ambiente, esses organismos normalmente captam este íon através de um sistema de transporte específico, inibindo e/ou reprimindo vias para a utilização de diferentes fontes de nitrogênio (MERRICK & EDWARDS, 1995). Em *H. seropedicae*, assim como várias outras proteobactérias, o sistema NTR é composto pela enzima uridililtransferase (GlnD) (codificada pelo gene *glnD*), as proteínas transdutoras de sinal da família PII, GlnB e GlnK (codificadas pelos genes *glnB* e *glnK*, respectivamente), a permease de amônia AmtB (codificada pelo gene *amtB*), a glutamina sintetase (GS) (codificada

pelo gene *glnA*), a adenililtransferase (GlnE) (codificada pelo gene *glnE*), e o sistema de dois componentes NtrB-NtrC (codificado pelos genes *ntrB* e *ntrC*, respectivamente).

As proteínas GlnB e GlnK são modificadas covalentemente pela enzima bifuncional GlnD que apresenta as atividades de UMP transferase e de remoção de UMP. A atividade de GlnD é regulada pelos níveis de glutamina, tornando-a um sensor intracelular dos níveis de nitrogênio. Normalmente, quando há baixa disponibilidade de nitrogênio na cultura, também há baixa concentração de glutamina intracelular, o que ativa GlnD no sentido da uridililação de PII. Já quando a concentração intracelular de glutamina é elevada, ou seja, quando há grande quantidade de nitrogênio disponível no meio de cultura, isto favorece a remoção de UMP da proteína PII pela GlnD. Dependendo do estado de uridililação, as proteínas PII podem interagir com o transportador de amônio de alta afinidade (AmtB), com GlnE o regulador da atividade da glutamina-sintetase (GS) e com a quinase sensora NtrB, responsável pela fosforilação e ativação do fator de transcrição NtrC. Estas interações resultam no controle da assimilação de nitrogênio ao nível de absorção de substrato (JAVELLE, EMMANUELE & MERRICK, 2005), na assimilação de amônio (pela regulação da atividade da GS) (ARCONDEGUY *et al.*, 2001) e na expressão de genes envolvidos com o metabolismo nitrogenado (ativação do fator de transcrição NtrC) (PIOSZAK *et al.*, 2000). As interações de PII com seus receptores também são afetadas por 2-oxoglutarato, de tal modo que os níveis elevados deste sinal de carbono são antagonistas à glutamina, o sinal intracelular de nitrogênio (NINFA & JIANG, 2005; JIANG *et al.*, 1998).

O sistema Ntr de *H. seropedicae* SmR1 tem sido extensivamente estudado pelo grupo de Fixação Biológica de Nitrogênio do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, através de manipulação gênica e estudos dos fenótipos das estirpes mutantes (CHUBATSU *et al.*, 2012). Vários dos fenótipos estudados estão relacionados com a assimilação e/ou fixação de nitrogênio, portanto até o momento não foi investigado se os mutantes de *H. seropedicae* no sistema Ntr apresentam fenótipos quanto ao metabolismo de carbono.

Uma alta concentração de NH_4^+ (20 mmol/L) praticamente eliminou a biossíntese de PHB em *H. seropedicae* Z69. No final da fase exponencial de crescimento, quando a concentração de NH_4^+ diminui para cerca de 5 mmol/L, ocorreu um aumento da produção de PHB (CATALÁN *et al.*, 2007). Esta é uma característica frequentemente observada na produção de PHA por bactérias, porém a razão do efeito da disponibilidade de nitrogênio fixado ainda não é clara. Sun *et al.* (2000) mostraram que mutantes dos genes *ntrB* e *ntrC* em *Azospirillum brasilense* Sp7 produziram PHB mesmo na presença de concentrações relativamente altas de amônio (10 mmol/L), o que não ocorreu com a estirpe selvagem. Os genes *ntrB* e *ntrC* codificam para uma histidina quinase e para um regulador transcricional, respectivamente (MERRICK & EDWARDS, 1995).

O sistema NtrB-NtrC é um sistema de dois componentes que tem como função o sensoriamento dos níveis de nitrogênio na célula. Em baixos níveis de nitrogênio, NtrB catalisa a fosforilação de NtrC e conseqüentemente sua ativação. NtrC fosforilada é responsável por ativar a transcrição de vários genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em bactérias. No entanto, até o momento nenhum gene que esteja envolvido na biossíntese de PHB foi relacionado com o sistema NtrB-NtrC. Os resultados de Sun et al. (2000) sugerem que o sistema NtrB-NtrC esteja diretamente ligado com a produção de PHB em *A. brasilense* Sp7, também observaram que os mutantes *glnB* e *glnZ* (codificam para proteínas da família PII) de *A. brasilense* Sp7 não produziram PHB durante a fase exponencial em baixa relação C/N, tendo o mesmo perfil de produção que o tipo selvagem. No entanto, o mutante *glnD* que não expressa a uridilil transferase responsável por regular a atividade das proteínas PII produziu PHB desde o início do cultivo mesmo em alta concentração de amônio, o que mostra que a produção de PHB neste mutante é desacoplada do nível de nitrogênio na célula.

3. JUSTIFICATIVA

A produção de PHB a partir de microrganismos é uma alternativa sustentável para a produção de insumos plásticos. No entanto, a competitividade deste processo com a produção de plásticos de origem petroquímica ainda é limitada, já que o custo de produção de plásticos a partir de derivados de petróleo é mais baixo. Para tornar a produção de PHB por via bacteriana mais competitiva é importante desenvolver estratégias de processo tais como: (a) utilização de insumos de baixo custo, por exemplo, monossacarídeos, ácidos orgânicos e glicerol (b) utilizar microrganismos modificados geneticamente com maior capacidade de síntese de PHB. Neste estudo, foram aplicadas as duas estratégias utilizando a bactéria *H. seropedicae* SmR1 e a estirpe mutante no gene *ntrC* que apresentou maior produção de PHB em condições ainda não otimizadas. Este trabalho de mestrado é um esforço inicial para contribuir com informações que possam levar futuramente ao desenvolvimento de estirpes bacterianas e processos mais eficientes para obtenção de PHA para a produção de plásticos por via microbiana.

Resultados preliminares em *H. seropedicae* SmR1 e mutantes *ntrC* e *glnB* sugerem o mesmo comportamento observado por Sun et al. (2000, 2002) em *A. brasilense*. O mutante *ntrC* produziu 30% de PHB/peso seco de células (psc) tanto em 20 quanto em 5 mM de NH_4Cl utilizando 37 mM de malato como fonte de carbono, enquanto a estirpe selvagem aumentou de 15% para 25% de PHB/psc quando a concentração de NH_4Cl foi reduzida de 20 para 5 mM. Já o mutante *glnB* atingiu 8% de PHB/psc com 20 mM de NH_4Cl e 17% de PHB/psc com 5 mM de NH_4Cl . Este resultado mostrou que a ausência da proteína PII levou a uma diminuição de 32% na quantidade máxima de PHB acumulada por *H. seropedicae* SmR1.

Como abordagem alternativa será avaliada também a produção de PHB em *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* em alta e baixa relação de C/N utilizando NH_4Cl como fonte de nitrogênio. Com esses dados será possível definir se o fator mais importante para a produção de PHB é a relação C/N.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de PHB na bactéria *H. seropedicae* SmR1 e na estirpe mutante *ntrC* em diferentes fontes de carbono e relações carbono/nitrogênio.

4.2 Objetivos específicos

- 1 – Determinar a taxa de crescimento de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* em meio de cultivo contendo diferentes fontes de carbono.
- 2 – Determinar a taxa de crescimento de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* em meios contendo diferentes relações de carbono e nitrogênio (C/N).
- 3 – Determinar a produção de PHB de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* por cromatografia gasosa em diferentes composições de meio de cultivo.
- 4 – Complementar geneticamente o mutante *ntrC* de *H. seropedicae* SmR1 e observar o efeito na produção de PHB.

5. METODOLOGIA

5.1 Microrganismos, Meios de cultura, Antibióticos e Condições de Cultivo.

5.1.1 Microrganismos e Plasmídeos

Tabela 1. Estirpes bacterias e plasmídeos que foram utilizados no estudo

Bactérias	Características Relevantes	Referência/ Fonte
<u><i>H. seropedicae</i></u>		
SmR1	Estirpe parental, SmR, Nif+	SOUZA <i>et al.</i> , 1995.
NtrC	Estirpe com mutação no gene ntrC.	PERSUHN <i>et al.</i> , 2000
<u><i>E. coli</i></u>		
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-crBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ lacX74 <i>recA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> .	Invitrogen Inc.
S17.1	SmR Tra+	SIMON <i>et al.</i> , 1983.
<u>Plasmídeos</u>		
pLAFR3.18	CmR, TcR, vetor de ampla faixa hospedeira com sítio de policlonagem do vetor pTZ18R.	MACHADO <i>et al.</i> , 1996
pKRT2	Fragmento de 23 kb de <i>H. seropedicae</i> . contendo o operon <i>glnAntrBntrC</i> .	TEIXEIRA <i>et al.</i> , 2000.

5.2 Meios e Condições de cultivo

Durante todo o trabalho foi utilizada a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe selvagem SmR1 e seu mutante *ntrC* (PERSUHN *et al.*, 2000). A bactéria foi normalmente inoculada e reinoculada duas vezes, cultivada em meio NFB-HP contendo por litro os seguintes componentes: MgSO₄. 7H₂O, 0,2 g; NaCl, 0,1 g; CaCl₂.2H₂O, 20 mg; ácido nitrilo-triacético, 56 mg; FeSO₄.7H₂O, 20 mg; biotina, 0,1 mg, solução de microelementos, 10 mL e água destilada para 1 L(modificado de PEDROSA & YATES, 1984). As fontes de carbono foram calculadas e ajustadas para terem proporções aproximadas no número de átomos de carbono inicial para cada meio em específico. Os ácidos carboxílicos foram calculados nas seguintes proporções: malato de sódio, 5,0 g (37,5mM), ácido succínico 5,0 g 37,5mM), ácido cítrico 4,0 g (25mM), ácido láctico 8,0g (50mM) e os monossacarídeos nas seguintes proporções: glucose 4.0 g (25mM), galactose 4.0 g (25mM), xilose 5,0 g (30mM), frutose 4,0 g (25mM), ou seja, para todas as fontes de carbono o número de mol é multiplicando pelo número molar utilizado neste estudo. A solução de microelementos contém por litro os seguintes componentes: Na₂Mo₄.2H₂O, 1 g;

MnSO₄.H₂O, 1,175 g; H₃BO₃, 1,4 g; CuSO₄.5H₂O, 0,04 g; ZnSO₄.7H₂O, 0,12 g e água destilada para 1 L. O pH do meio foi ajustado para 6,5 e o mesmo foi autoclavado por 20 minutos, 120°C a 1 atm. A concentração da fonte de carbono foi calculada para manter uma relação de massa de C/N igual a 7,5 (alto nitrogênio) ou 30 (baixo nitrogênio). A relação carbono nitrogênio foi calculada de acordo com a concentração apenas de carbono e de nitrogênio no meio, conforme descrito pela equação 1:

$$\text{Relação } C/N = \frac{[(nC \times C)/MMFC] \times (C_{g/L})_C}{[(nN \times N)/MMFN] \times (C_{g/L})_N} \quad \text{eq. (1)}$$

Onde:

nC = número de átomos de carbono na fonte de carbono utilizada;

C = peso atômico do átomo de carbono;

MMFC = massa molar da fonte de carbono utilizada;

C_{g/L(C)} = concentração da fonte de carbono utilizada em g/L;

nN = número de átomos de nitrogênio na fonte de nitrogênio utilizada;

N = peso atômico do átomo de nitrogênio;

MMFN = massa molar da fonte de nitrogênio utilizada;

C_{g/L(N)} = concentração da fonte de nitrogênio utilizada em g/L;

Relações de C/N maiores que 30 ou menores que 7,5 foram utilizadas ao longo de todo estudo, dependendo da tendência observada durante os experimentos. No momento de uso a fonte de carbono foi misturada à fonte de nitrogênio, mistura de fosfato, e completado com NFB-HP, antibiótico específico e inoculo contendo a bactéria (previamente crescido até uma densidade óptica próxima a 1 em D.O.₆₀₀) até um volume de 100 mL e posteriormente distribuído em 10 frascos de 50 mL contendo 10 mL. No período estudado a fonte principal utilizada foi o cloreto de amônio. A fonte de nitrogênio foi adicionada de acordo com a relação C/N desejada. Para cada litro de meio de cultivo, foram adicionados 50 mL de uma mistura de fosfatos (159,4g/L de KH₂PO₄ e 17,8g/L de K₂HPO₄). Para o preparo dos meios sólidos foi adicionado agar bacteriológico para concentração final de 15 g/L. Os cultivos líquidos para determinação da taxa de crescimento e produção de PHB foram realizados em frascos de penicilina (60 mL de capacidade) com 10 mL de meio sob agitação em incubadores orbitais a 30°C e 120 rpm, enquanto os cultivos em placas de agar foram incubados em estufa microbiológica a 30°C. As estirpes de *Escherichia coli* foram cultivadas em meio LB (SAMBROOK et al., 1989) sob agitação (130 rpm) a 37 °C ou em estufa a 37 °C em meio LA. O meio LB possui a seguinte composição: Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,0. O meio LA é composto de meio LB mais 15 g/L de ágar.

5.3 Antibióticos

Tabela 2. Antibióticos utilizados no estudo

Antibiótico	Abreviatura	Concentração Final	Organismo
Ampicilina	Amp	250 µg/mL	<i>E. coli</i>
Canamicina	Km	100 µg/mL 500 µg/mL	<i>E. coli</i> <i>H.seropedicae</i>
Cloranfenicol	Cm	30 µg/mL 100 µg/mL	<i>E. coli</i> <i>H. seropedicae</i>
Estreptomicina	Sm	80µg/mL 80µg/mL	<i>E. coli</i> <i>H. seropedicae</i>
Tetraciclina	Tc	10µg/mL 10µg/mL	<i>E. coli</i> <i>H. seropedicae</i>

6. Manipulação de DNA

6.1. Minipreparação de plasmídeo por lise alcalina

A extração dos plasmídeos das células de *E. coli* foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Os plasmídeos purificados for analisados por eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK et al., 1989).

6.2. Eletroforese de DNA

Eletroforeses de DNA foram realizadas em gel de agarose em cuba horizontal como descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). O gel foi obtido a partir de 0,8mg do agarose dissolvido em 100ml de TBS e aquecido em forno de micronda até ser dissolvido completamente, posteriormente foi aplicado em sistema vertical seguindo as recomendações do fabricante das cubas de eletroforese (sistema *MiniProtean*, Biorad), as corridas foram realizadas a 160 volts, em tampão de corrida 1X por 1 hora e meia, nos poços foram aplicados 1µL do vector misturado a 5mL do tampão de corrida, em outro posso foi colocado 3 µL do marcador de 1 kb e corrido em 1:30 minutos em 70 volts, após esse período o gel foi tratado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e o perfil eletroforético foi registrado utilizando transluminador de luz ultravioleta com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

6.3 Transformação Bacteriana

6.3.1. Transformação de células eletrocompetentes

Para o cultivo celular de *E.coli* (S17.3) com a finalidade de preparar células eletrocompetentes, se utilizou o meio SOB (Gibco-BRL-Invitrogen) que possui a seguinte composição: Triptona 10 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; KCl 0,186 g/L; pH 7,0.

O processo de transformação por eletroporação foi feito associando 1µL da solução contendo o plasmídeo purificado a 60µL de células etrocompetentes e essa mistura foi colocada em uma câmara de eletroproração e submetida a choque elétrico segundo o protocolo do laboratório, as células de *E. coli* foram recuperadas em 1mL meio de meio LB e colocadas em estufa a 37°C por 1 hora, posteriormente essa células foram plaquadas em meio SOC (Gibco-BRL-Invitrogen), que possui a seguinte composição: Triptona 20 g/L; Extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,06 g/L; KCl 0,019 g/L; MgCl₂ 0,094 g/L; MgSO₄ 0,12 g/L; Glucose 0,36 g/L. As células de *E. coli* foram estocadas a -20 °C em glicerol 50%.

6.3.2. Transformação por choque térmico em *E. coli*

O preparo das células de *E. coli* (S17.3) competentes ao choque térmico foi realizada segundo CHUNG et al. (1989). Uma cultura bem crescidas (saturada) de *E. coli* foi reinoculada em 10 mL de meio LB na proporção de 1:100. A cultura foi mantida sob agitação (160 rpm) a 30 °C até atingir D₆₀₀ entre 0,3 a 0,4. A cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 1 minuto a 4 °C e o pellet celular foi ressuspendido em 1 mL da solução TSS filtrada e gelada. Esta solução possui a seguinte composição: PEG 8000 10% (m/v); DMSO 5% (v/v); MgSO₄ 0,12 g/L em LB pH 6,5. A solução de células foi separada em alíquotas de 100 µL, misturada à solução de plasmídeo (5 ng - 0,5 µg/µL).

A transformação foi realizada incubando-se a mistura por 30 minutos em gelo, 45 segundos a 42 °C em banho-maria e 2 minutos em gelo. Após o choque térmico, as células foram recuperadas em 0,9 mL de meio LB em estufa por 60 minutos a 37 °C. Em seguida, 200 µL da suspensão de bactérias transformadas foram semeados em meio LA (contendo os antibióticos necessários para a seleção dos clones) e incubados a 37 °C durante um período de 16 horas.

6.3.3. Transferência de DNA plasmidial por conjugação bacteriana biparental

O plasmídeo contendo o operon (*glAntrBntrC*) foi transformado em *E. coli* S17.1. As estirpes selvagem SmR1 e mutante (*ntrC*) de *H. seropedicae* (receptora) e *E. coli* (doadora) foram cultivadas por 16 horas em meio NFbHPN e LB, respectivamente, a partir de culturas saturadas. Em seguida, 1 mL das culturas de *H. seropedicae* SmR1 e *ntrC* foram centrifugadas a

2.000 xg por 30 segundos e o *pellet* celular foi ressuspendido em 100 µL de meio NFbHPN. Esta suspensão de células foi misturada com 50 µL da cultura de *E. coli* S17.1 contendo o plasmídeo (pKRT2) desejado e depositado em forma de gota em meio NFbHPN-ágar na proporção de 1:3, na ausência de antibióticos e incubados a 30 °C por 12h. A massa celular foi raspada da placa e ressuspendida em 1 mL de meio NFbHPN sendo em seguida submetida às diluições de 1:100 e 1:1000. As diluições foram plaqueadas em meio NFbHPN contendo os antibióticos adequados e as placas foram incubadas a 30 °C.

6.4. Complementação do Mutante *ntnC* de *H. seropedicae* SmR1

Para verificar o efeito da complementação da mutação no gene *ntnC* na produção de PHB, o plasmídeo pKRT2 originado da inserção do operon *glnAntrBntnC* de *H. seropedicae* SmR1 no vetor pLAFR3.18 foi transformado no mutante *ntnC* utilizando a estirpe *E. coli* S17-1 (SIMON *et al.*, 1983). O mutante complementado foi avaliado quanto a sua capacidade de produzir PHB em diferentes meios de cultivo e com diferentes relações de C/N.

O plasmídeo pLAFR3.18 foi transferido na estirpe SmR1 e *ntnC* como controle negativo. A seleção dos plasmídeos recombinantes foi em meio LA contendo X-gal (30µg/mL) e os antibióticos Tc (10 µg/mL) e Cm (30 µg/mL).

7. Método Analítico

7.1. Quantificação da Biomassa Bacteriana

Para determinar a quantidade de biomassa produzida durante os cultivos, 10 mL do meio de cultivo contendo as bactérias foram transferidos para tubos tipo Falcon de 15mL e centrifugados a 5000 rpm a 4°C durante 20 min. Parte do sobrenadante foi transferido para microtubos de 1,5ml e congelados a -20°C para análise de amônio e carbono. Os precipitados de células foram lavados com água ultrapura e transferidos para microtubo de 2mL previamente pesados e posteriormente centrifugados a 12.000 x g durante 5min, o sobrenadante descartado, o precipitado congelado em nitrogênio líquido e liofilizado por 16 h. O valor de biomassa de cada amostra foi determinado a partir da pesagem dos precipitados de liofilizados, plotados contra os valores de D.O.₆₀₀ (densidade óptica a 600 nm) para obtenção de uma curva padrão. A porcentagem de PHB produzida foi expressa em relação à quantidade de biomassa seca da amostra.

7.2. Determinação da Taxa de Crescimento Bacteriana

A taxa de crescimento foi determinada pela medida de densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro ($D.O_{600}$) durante as diferentes fases de crescimento e pelo tempo de crescimento específico para cada fonte de carbono. A taxa de crescimento é expressa como DO_{600}/t (h)

7.3. Quantificação de PHB por Cromatografia Gasosa

Durante os cultivos, a quantidade de PHB nas amostras foi determinada por cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (FID) baseado no método de Braunegg *et al.* (1978) com modificações sugeridas por Huijberts *et al.* (1994). O precipitado de células liofilizado (de 1,5 a 15 mg) foi pesado e transferido para um tubo Pyrex[®] com tampa, para ser metanolizado com 2 mL de uma solução de metanol e H_2SO_4 a 15% (v/v), 2 mL de clorofórmio e 2 μ L de ácido benzóico como padrão interno. A mistura foi incubada a 100°C durante 3,5 horas para assegurar que todo o material fosse esterificado. Após o tempo de reação, os tubos foram resfriados em banho de gelo e os ésteres extraídos com 1 mL de H_2O ultrapura. Após separação das fases, a fase superior foi removida e descartada e a fase inferior que contém os ésteres metílicos de ácido 3-hidróxibutírico foi seca com Na_2SO_4 sólido. Os ésteres foram quantificados em um cromatográfico a gás, modelo VARIAN 450-GC (Varian Inc., Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos). A coluna capilar CP-Sil-5CB (Varian Inc.) de 10 m x 0,25 mm foi utilizada. Como gás de arraste foi utilizado argônio em um fluxo de 0,7 mL/min. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C, com rampa de temperatura na coluna iniciando em 50°C, subindo até 250°C a 40°C/min. A quantificação foi realizada utilizando uma curva padrão feita com padrão autêntico de PHB bacteriano (Sigma Aldrich-Co), realizada em cromatográfico a gás utilizando detector de ionização por chama (FID).

7.4. Método de determinação da atividade de açúcares redutores pelo método do 3,5-dinitrosalicilato

O teste do 3,5-dinitrosalicilato (DNS) (MILLER, 1959; WOOD e BHAT, 1988) permite a detecção de açúcares redutores em uma amostra. O método (figura 2) baseia-se na oxidação do açúcar redutor e redução em meio alcalino do 3,5-dinitrosalicilato (de coloração amarela). O produto formado é estável, possui coloração alaranjada e apresenta máxima absorção no comprimento de onda de 535-540 nm.

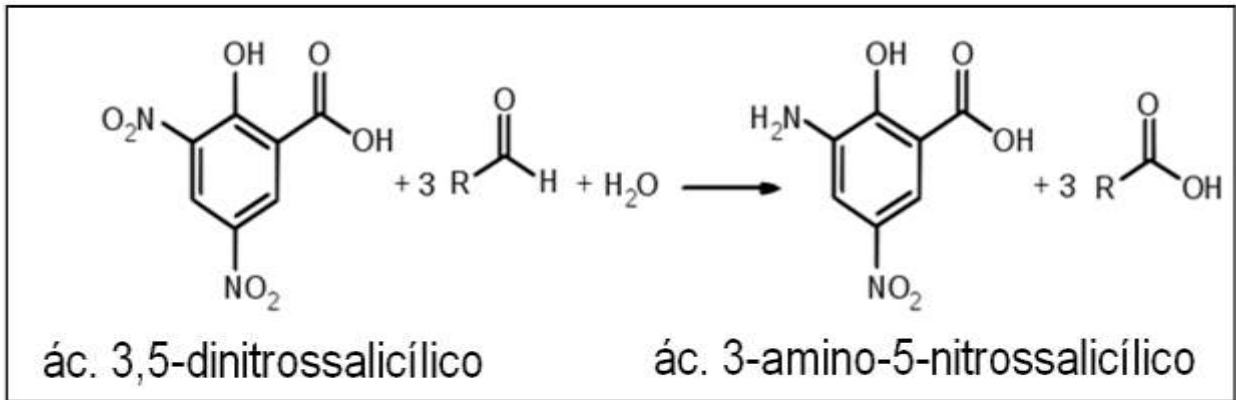


Figura : Ensaio de dinitrossalicilato

Para quantificar carbono no meio foi necessário realizar uma curva padrão de cada monossacarídeo de acordo com a concentração inicial no meio de cultivo utilizando glucose, frutose, galactose e xilose, diluídos em meio NFB-HP sem carbono, o resultado do método foi expresso em açúcares redutores equivalentes.

O teste de quantificação de carbono foi realizado em 10 a 200 μL de meio de cultura para corrigir os erros valores de absorvâncias dependendo da concentração final de carbono e adicionou-se 100 μL do reativo DNS (1 g do ácido 3,5-dinitrosalicílico, 22,3 g de tartarato de potássio e sódio e 1,6 g de NaOH em 100 mL de água destilada), posteriormente se realizou a homogeneização e a mistura foi mantida por 5 minutos a 100°C. Depois de resfriado em banho de gelo, foi acrescentado água destilada às amostras para completar 1mL e lidas a 540 nm. Depois de descontado as absorvâncias do substrato com o ponto 0 (DNS e água destilada), a concentração de açúcares redutores equivalentes foi obtida pela projeção sobre curva padrão, construída empregando-se glucose frutose, galactose ou xilose.

7.5. Método de quantificação de Amônio (Método do Indofenol)

Para quantificar amônio foi realizada a preparação de duas soluções de 500 mL (I e II)

Solução I: Foram dissolvidos 25 g Fenol em 250 ml de água milli-Q, aquecida a 50°C para dissolver bem o fenol (em capela). Em outro recipiente fora dissolvidos 0,125 g de nitroprussiato de Na^+ em 100 mL de H_2O deonizada (milli-Q). As duas soluções foram misturadas e o volume completado para 500ml.

Solução II: Foram dissolvidos 12,5 g de NaOH em 250 mL de água e nessa solução foi adicionado 22 ml de hipoclorito 12% e completado para 500 mL.

Posteriormente foi realizado uma curva padrão partindo da solução de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de NH_4Cl conforme a tabela abaixo:

Tabela 3. Curva de calibração utilizada para quantificar cloreto de amônio

<i>Concentração de NH₄Cl em cada tubo</i>	<i>Volume que devo pipetar de NH₄Cl (100 µg/mL)</i>	<i>Volume de Solução I</i>	<i>Volume de Solução II</i>	<i>H₂O</i>
0 (branco)	-	100 µL	100 µL	800 µL
1	10 µL	100 µL	100 µL	790 µL
2	20 µL	100 µL	100 µL	780 µL
3	30 µL	100 µL	100 µL	770 µL
4	40 µL	100 µL	100 µL	760 µL
5	50 µL	100 µL	100 µL	750 µL

As misturas foram realizadas adicionando primeiro a água, NH₄Cl e por último as soluções I e II e incubadas a 50°C por 5 minutos, depois de ocorrer às reações realizou-se a leitura de absorbância a 620 nm. Posteriormente estes valores foram calculados de acordo com a solução padrão contendo 20mM e ou 5mM de amônio em meio NFB-HP sem carbono.

7.6. Contagem de bactérias totais (UFC/mL)

Para a contagem das bactérias totais foram coletados 100µL de cultura crescidas em malato, glucose ou glicerol em diferentes densidades ópticas (0,6, e 1,2,) para bactérias *ntrC* (pKTR2), *ntrC*, SmR1 (pKTR2) e SmR1, essas amostras foram sofrendo diluições seriadas em proporção de 1/10 até 7 vezes, posteriormente para cada diluição foi plaqueada 3 vezes em forma de gotas de 10 µL e numerados na placa contendo meio NFbHPN das fontes anteriormente descritas e antibióticos específicos. Após 48 e 72 horas de incubação na estufa a 30°C, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias de bactéria por mililitro (UFC/mL) para cada uma das amostras.

8 RESULTADOS

Com os resultados obtidos neste trabalho, pôde-se definir a importância da relação C/N na produção de PHB em *H. seropedicae*, bem como definir se a natureza das fontes de carbono e nitrogênio influencia a produção deste polímero. Além disso, a análise da produção de PHB no mutante *ntrC* de *H. seropedicae* deverá corroborar dados já relatados para *Azospirillum brasilense* Sp7 e abrir novas frentes de estudo quanto ao envolvimento do sistema Ntr no metabolismo de carbono, nitrogênio e produção de PHB.

8.1. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando monossacarídeos como única fonte de carbono.

Monossacarídeos são carboidratos não polimerizados, que possuem em geral entre três e sete átomos de carbono. Esse termo inclui aldoses, cetoses, e vários derivados, por oxidação, desoxigenação, introdução de outros grupos substituintes, alquilação ou acilação das hidroxilas e ramificações. Para o presente estudo foram utilizados os seguintes monossacarídeos nas seguintes concentrações: glucose 25mM, frutose 25mM, galactose 25mM e xilose 30mM, cujos resultados são apresentados abaixo.

Ao cultivarmos *H. seropedicae* SmR1 em 25mM de D-glucose usando 20mM de NH_4Cl , a quantidade inicial de PHB foi de 10,5 % de PHB/peso seco de células (psc) nas primeiras 10 horas de crescimento, tendo restado no meio 8,56 mM de D-glucose e 10,4 mM de amônio. A maior produção de PHB nessa condição foi de 30,13 % de PHB/psc, atingida quando a cultura completou 20 horas de crescimento, já em fase estacionária de crescimento quando a cultura atingiu uma densidade ótica a 595 nm de 1,3. Neste período, o consumo total de glucose foi de 23,8mM e a concentração final de NH_4^+ no meio era de cerca de 5 mM. Quando a concentração inicial de NH_4Cl foi reduzida para 5mM, no mesmo microrganismo, com 10 horas de cultivo, a produção de PHB foi de 18,20%/psc. Nesse período a concentração de glucose presente no meio era de 5,7 mM e de amônio era de 0,3 mM. Após 18 horas de crescimento, a produção de PHB atingiu 40,35%/psc, em uma densidade ótica de 2,3 onde a biomassa total de células foi de 4,9mg. Depois desse período, o polímero começou a ser metabolizado, quando restaram no meio cerca de 1,30 mM de glucose e 0,0062 de NH_4Cl (Figura 4. A,C,E).

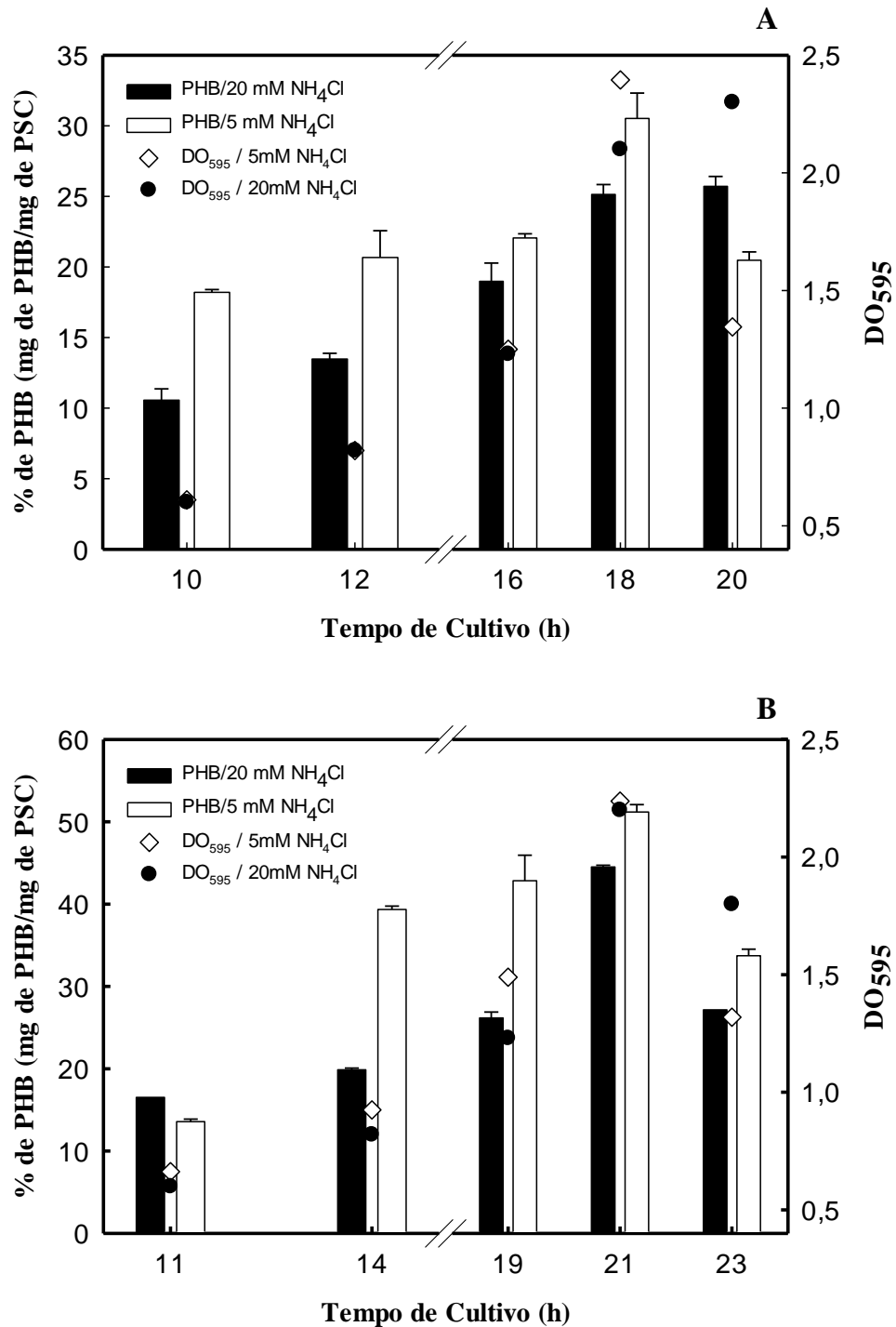
O mutante *ntrC* de *H. seropedicae* quando cultivado em 25mM de D-glucose com 20mM de NH_4Cl , produziu em 11 horas 16,53% de PHB/psc, restando no meio apenas 3,9 mM de glucose e 15,1 mM de amônio. A máxima produção foi de 44,51% de PHB/psc em 21 horas de cultivo, quando a cultura atingiu uma densidade ótica a 595 nm de 2,2. Depois desse período

iniciou-se a fase de metabolização do polímero, já que em 23 horas de crescimento a concentração final de glucose era de apenas 0,15 mM e de cloreto de amônio de 3,30 mM. A presença de nitrogênio juntamente com a escassez de carbono no meio, pode ter induzido a mobilização do PHB estocado. Quando a concentração inicial de NH_4Cl foi reduzida para 5 mM, o mutante *ntrC* produziu 13,53% de PHB/psc nas primeiras 11 horas de cultivo, após consumir 22 mM de glucose e 4,5mM de amônio. Essa produção chegou a 51,10% de PHB/psc quando a cultura atingiu 21 horas de cultivo. Após 2 horas, esse percentual de PHB caiu para cerca de 31,45% , sendo que nesse período a concentração final de glucose era apenas de 0,07 mM e de NH_4Cl era de 0,03 mM (figura 4. B,D,F). Esta observação reforça a evidência de que baixas concentrações de esqueletos carbônicos no meio de cultivo forçam a mobilização do PHB estocado.

Quando a estirpe SmR1 foi cultivada em 25 mM de D-frutose como única fonte de carbono, em meio contendo 20mM de NH_4Cl , em 11 horas de crescimento a produção de PHB foi de 10,57% do peso seco de cultura. Nesse período a concentração de D-frutose no meio era de 4,5 mM e de amônio era de 10,6 mM. A maior produção de PHB foi de 27,71% do peso seco de células cultivadas, detectada com 22 horas de crescimento. Nesse período a concentração final de D-frutose foi de 1,79 mM e de NH_4Cl era cerca de 6,16mM. Quando se reduziu a concentração inicial de NH_4Cl para 5 mM, com 11 horas de cultivo a produção de PHB foi de 18,20%. As concentrações de D-frutose no meio era de 6,1mM e de amônio era de 0,2 mM. Essa produção para a mesma estirpe bacteriana chegou a 30,53% de PHB/psc com 20 horas de cultivo. Posteriormente, se iniciou a fase de declínio no crescimento, sendo que em 22 horas de crescimento a concentração final de frutose era de 1,79 mM e de cloreto de amônio era de 0,91 mM (Figura 5. A, C, E).

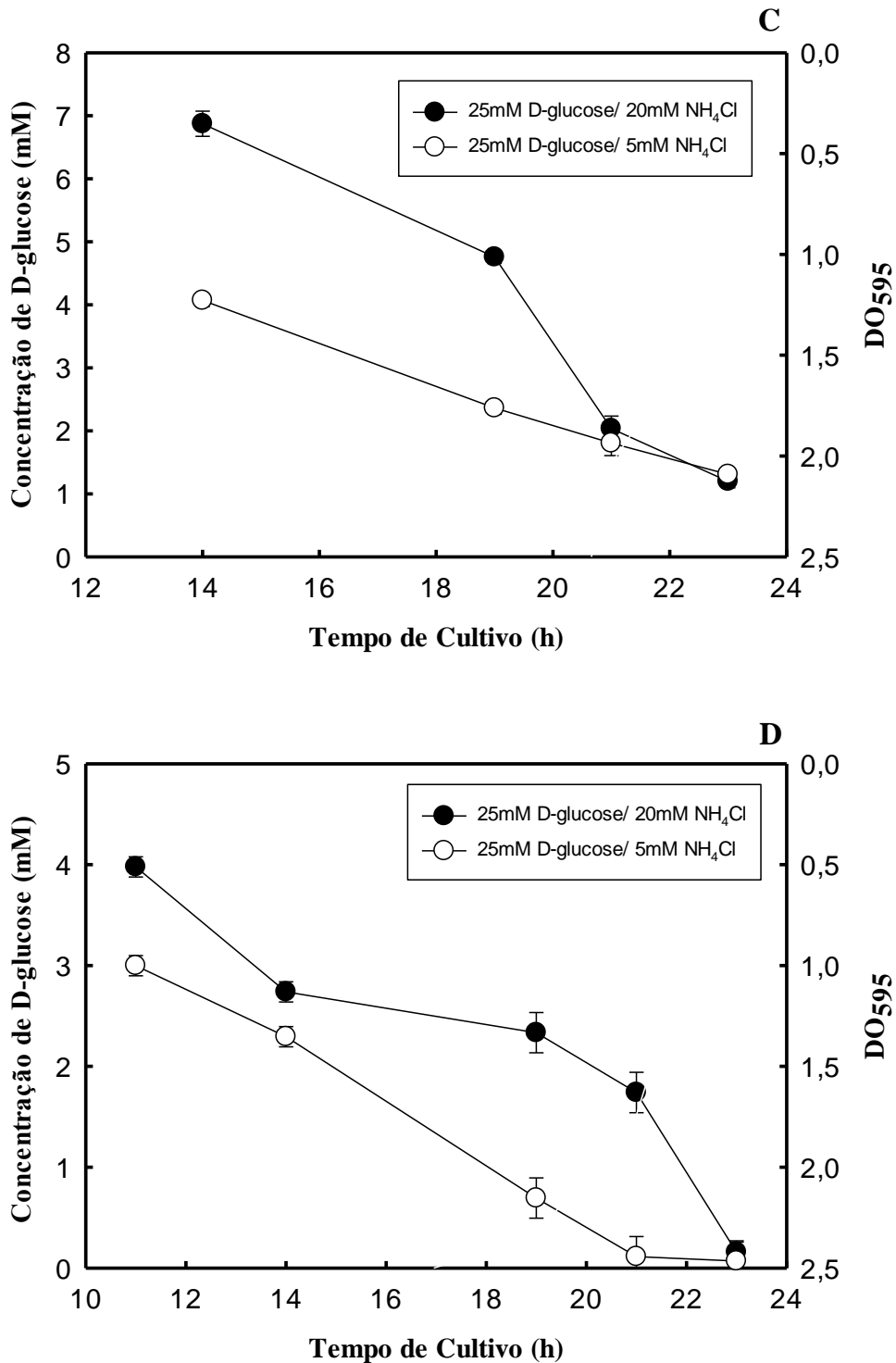
Para o mutante *ntrC* cultivado na mesma concentração de D-frutose e 20mM de NH_4Cl , a produção de PHB nas primeiras 11 horas foi de 4,29% do peso seco de células. Neste período a concentração presente de D-frutose no meio era de 2,8 mM e de amônio era de 9,1 mM. A produção alcançou 52,34% do peso seco de células com 21 horas de cultivo, quando a concentração final de D-frutose era de 0,98 mM e de NH_4Cl de 6,16 mM. A redução da concentração de cloreto de amônio para 5mM, elevou a produção de PHB nessa estirpe bacteriana, sendo que nas primeiras 11 horas a produção registrada foi de 5,09% do peso seco de células. A produção aumentou para 65,85% do peso seco de células com 19 horas de cultivo e que 2 horas depois, esse percentual caiu para cerca de 43,12% devido a metabolização do polímero (Figura 5. B, D e F).

Figura 4. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-glucose e amônio.



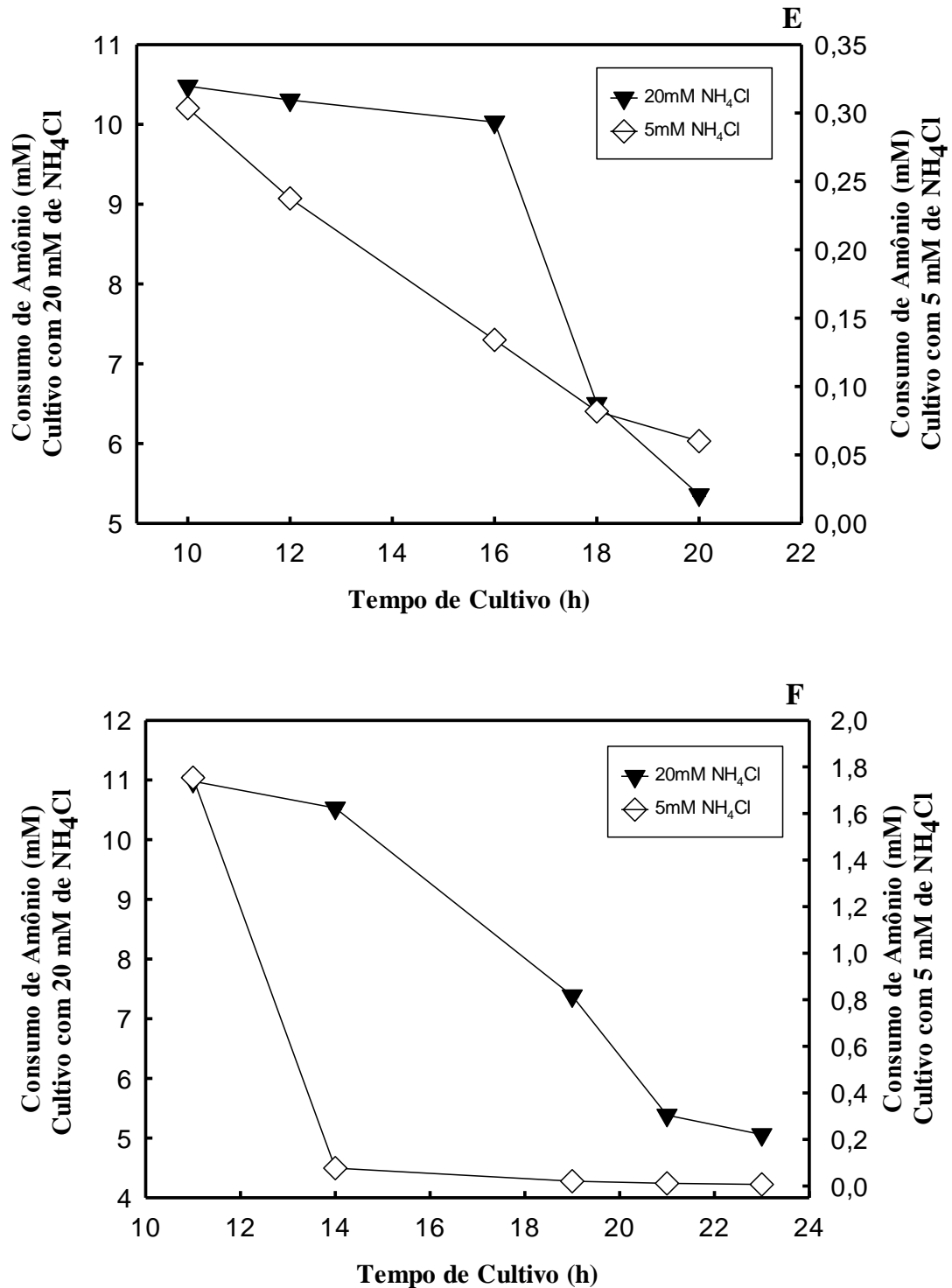
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A, C e E) e mutante *ntrC* (gráficos B, D e F) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-glucose (25mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 4. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-glucose e amônio.



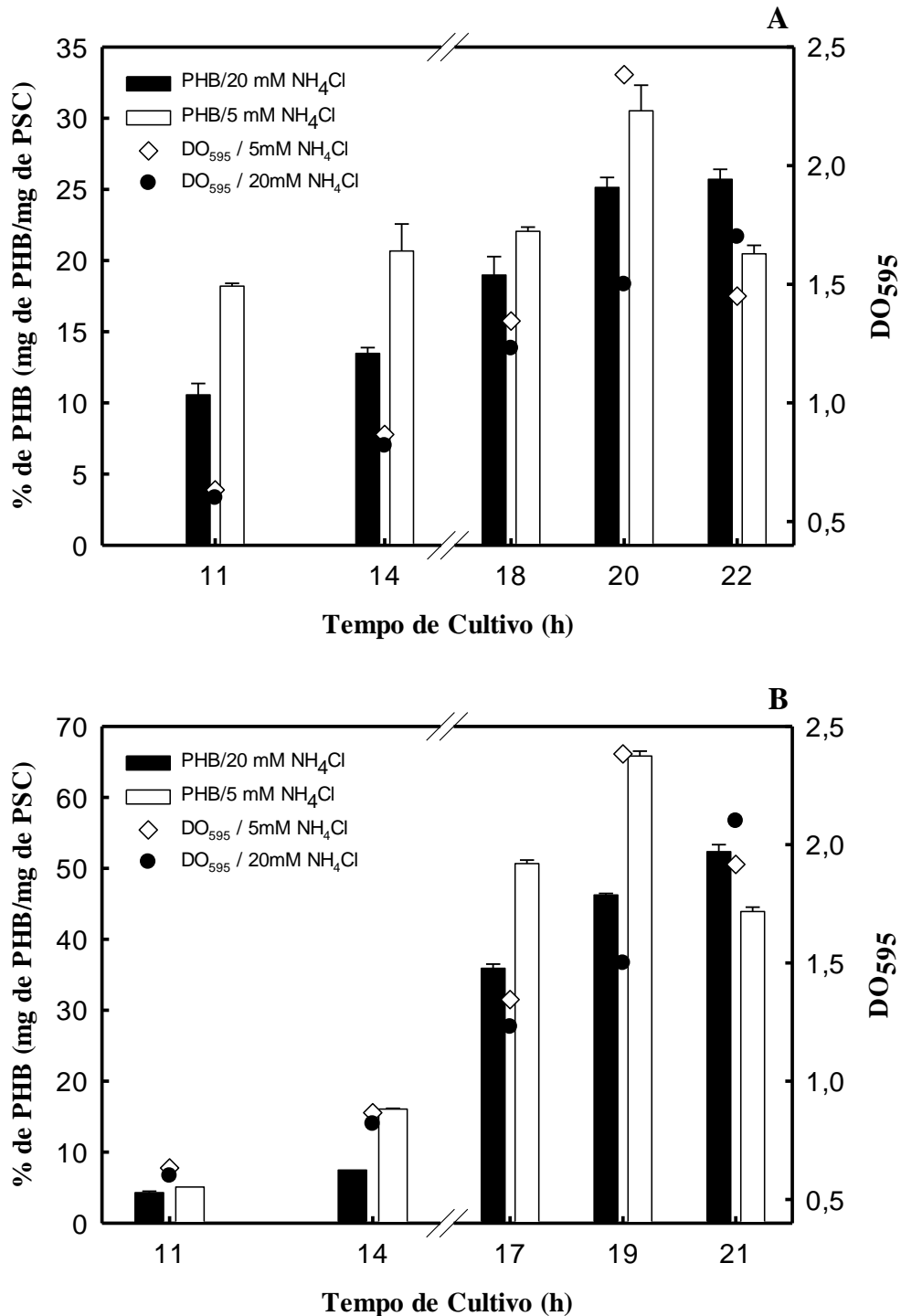
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de açúcares redutores pelo método de DNS. A concentração de glucose no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de glucose diluída em meio NFB.

Figura 4. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-glucose e amônio.



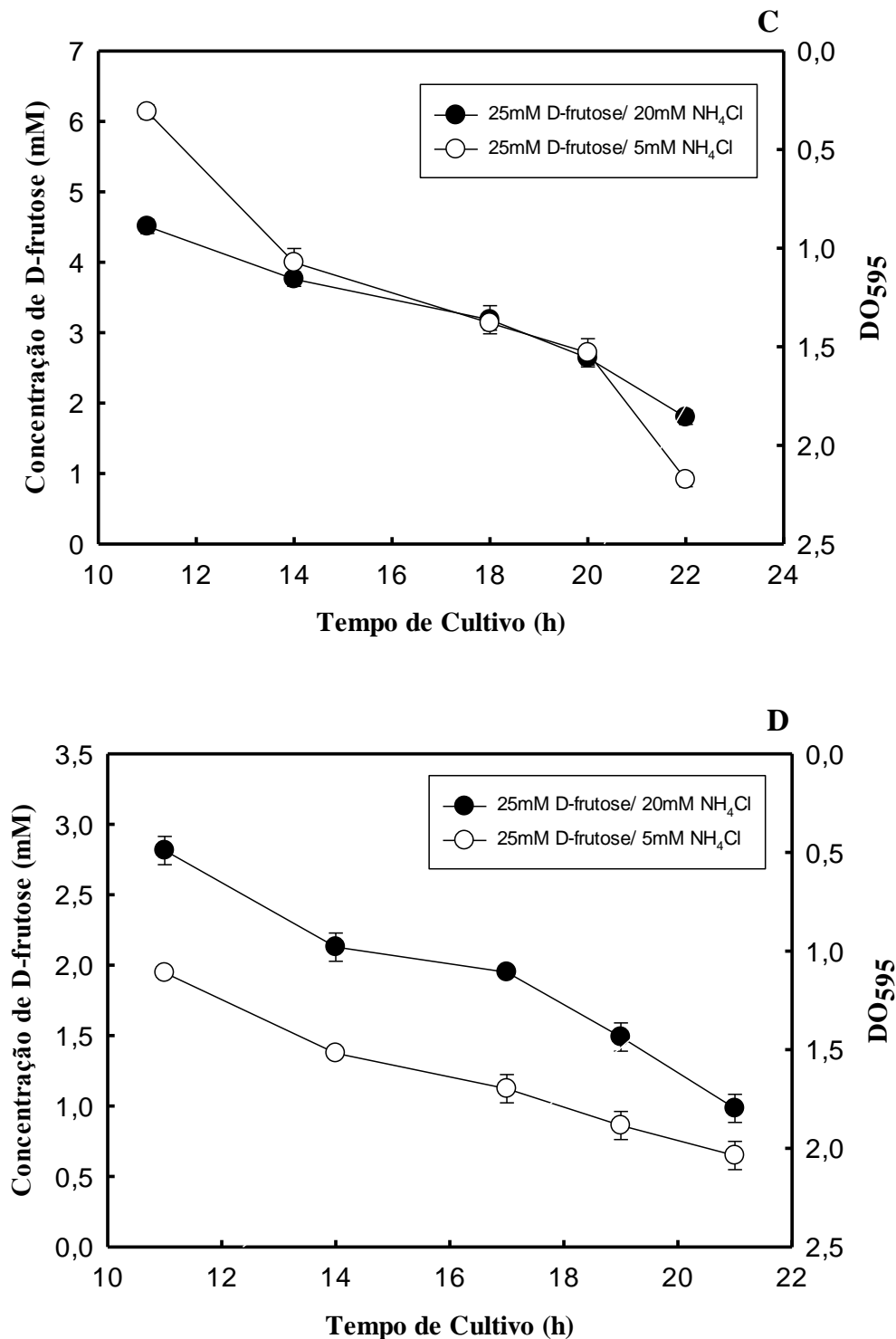
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos E) e mutante *ntrC* (gráficos F) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

Figura 5. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-frutose e amônio.



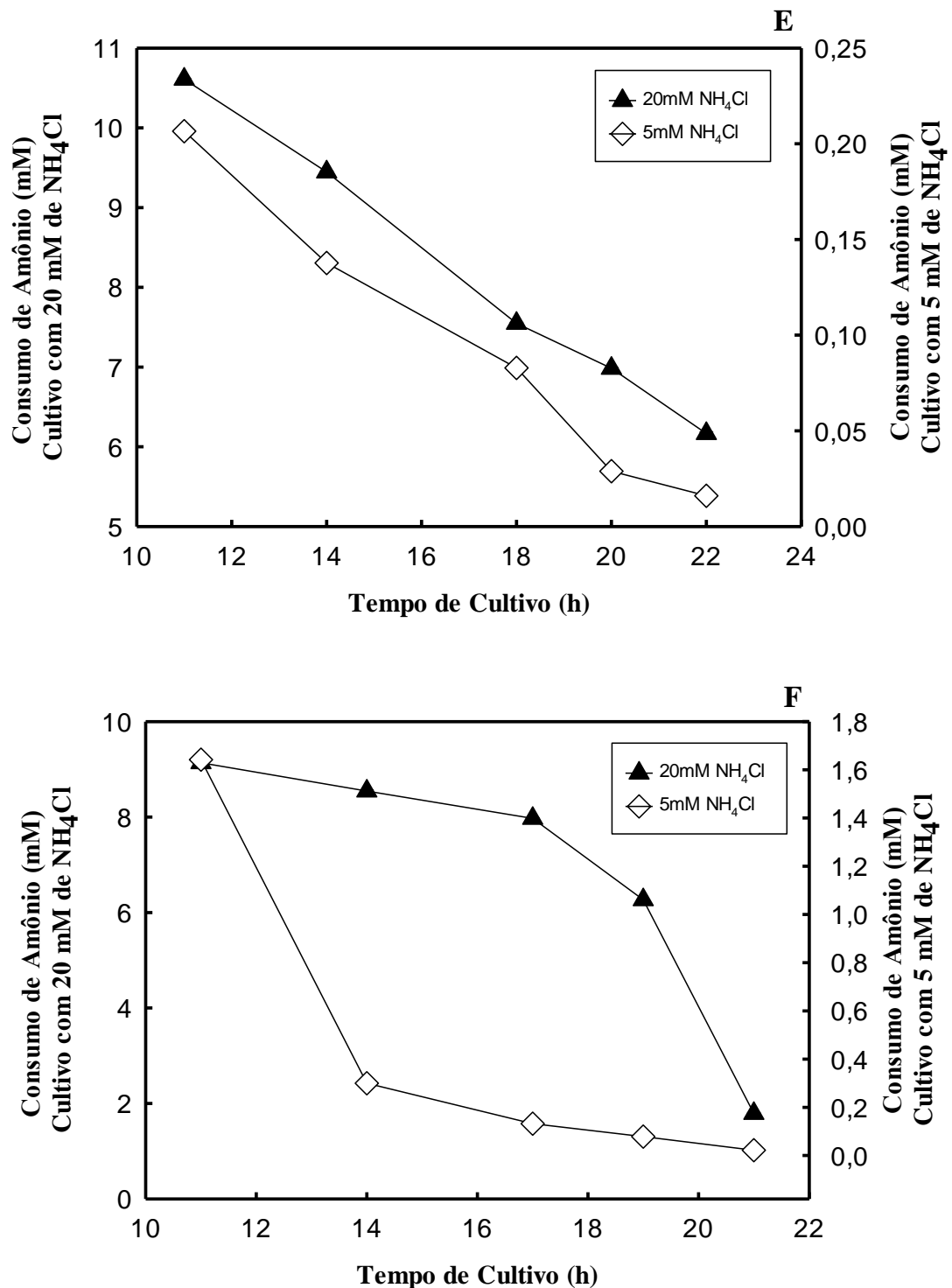
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A, C e E) e mutante *ntrC* (gráficos B, D e F) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-frutose (25mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 5. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-frutose e amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de açúcares redutores pelo método de DNS. A concentração de frutose no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de frutose diluída em meio NFB.

Figura 5. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-frutose e amônio.

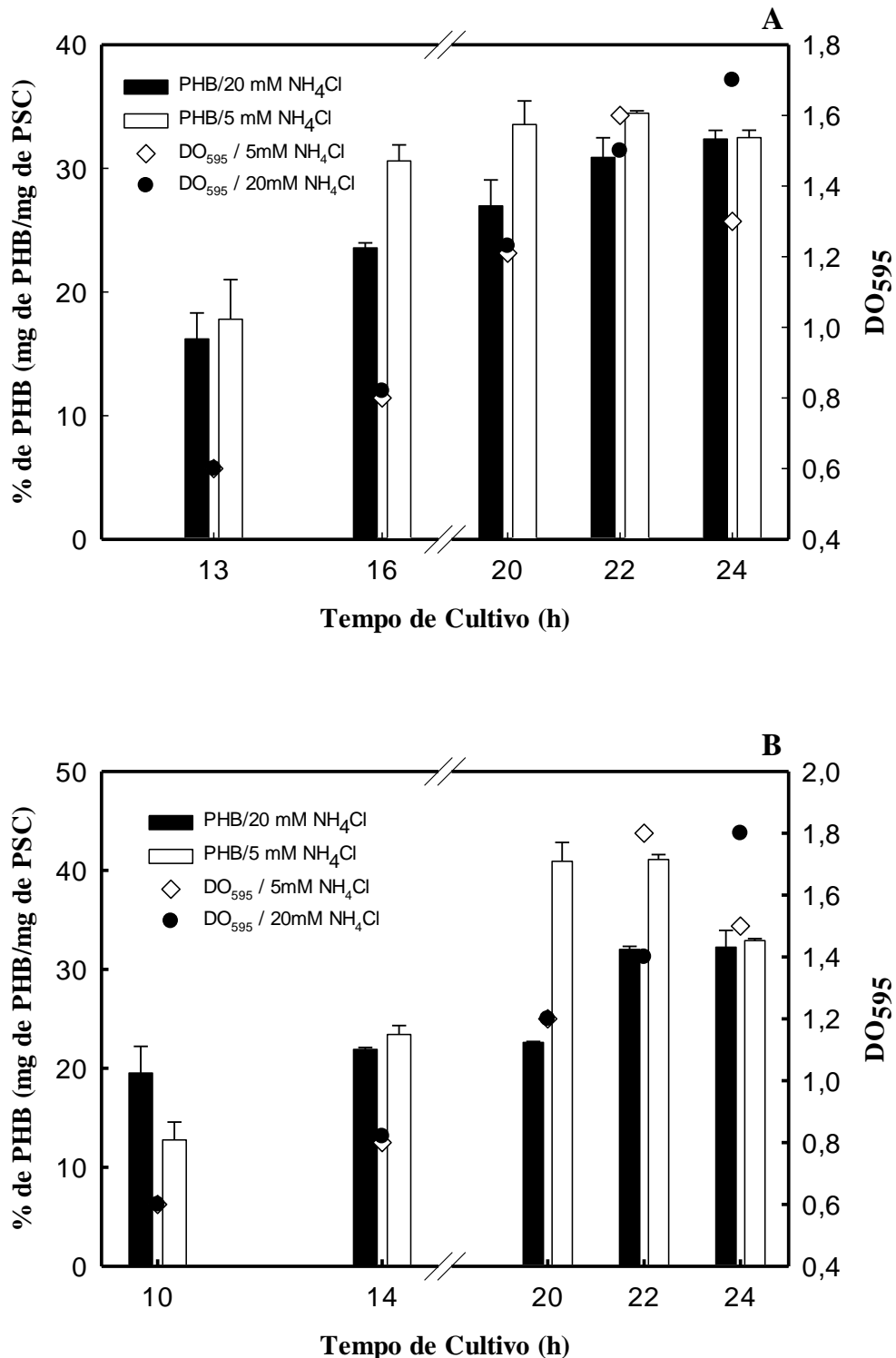


As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos E) e mutante *ntrC* (gráficos F) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

Quando se utilizou 25mM de D-galactose como única fonte de carbono, com concentração inicial de 20mM de NH_4Cl , SmR1 em 13 horas de crescimento produziu 16,20% de PHB/psc, restando no meio 4,5mM de D-galactose e 10,8 mM de amônio. Esse valor chegou a 32,64% de PHB/psc em 24 horas de crescimento. Neste ponto, a concentração final de D-galactose no meio era de 0,96 mM e de NH_4Cl de 4,9mM. Ao reduzir a concentração inicial de NH_4Cl para 5mM, a produção de PHB na estirpe SmR1 nas primeiras 13 horas foi de 17,80% do peso seco de células, sendo que nesse período a concentração de D-galactose no meio era de 4,5mM e de NH_4Cl era de 2,4 mM. Esse percentual de PHB chegou a 34,46% em 22 horas de cultivo. Após esse período, começou a se observar um decréscimo no PHB acumulado, provavelmente devido à escassez de carbono no meio, já que nesse ponto dos 25 mM inicial apenas 1 mM de D-galactose ainda restava no meio. A concentração final de NH_4Cl era de 4,93 mM (Figura 6. A, C e E).

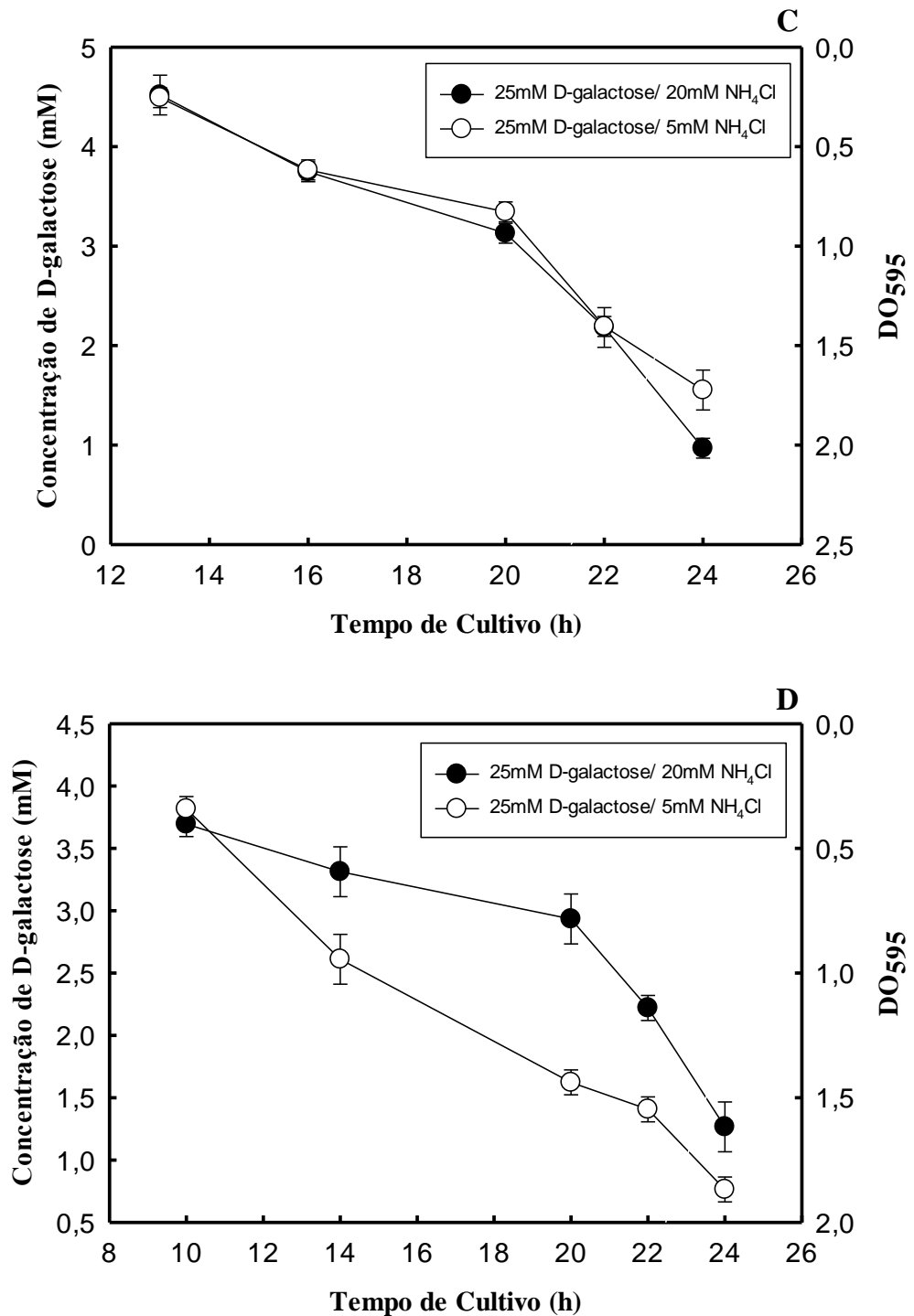
Para a estirpe *ntrC* cultivada em 25mM de D-galactose contendo 20mM de cloreto de amônio, a produção de PHB em 10 horas de crescimento foi de 19,52% do peso seco de células. As concentrações de D-galactose no meio era de 3,7 mM e de cloreto de amônio era 8,6 mM. A porcentagem de PHB acumulado chegou a 35,48% do peso seco de células em 24 horas de crescimento, num período em que a concentração final de D-galactose foi de 1,26 mM e de NH_4Cl foi de 5,8mM. Quando a concentração inicial de cloreto de amônio foi reduzida para 5mM na concentração inicial, a produção de PHB em 10 horas foi de 12,77% do peso seco de células, sendo que a concentração de D-galactose no meio era de 3,8 mM e de amônio 4,1 mM. Essa produção alcançou 41,71% do peso seco de células cultivadas em 20 horas de crescimento, sendo que posteriormente ocorreu a redução do polímero para cerca de 32,90%. A concentração final de D-galactose nesse período foi de 0,76 mM e de NH_4Cl foi 0,013mM (Figura 6. B, D e F).

Figura 6. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-galactose e amônio.



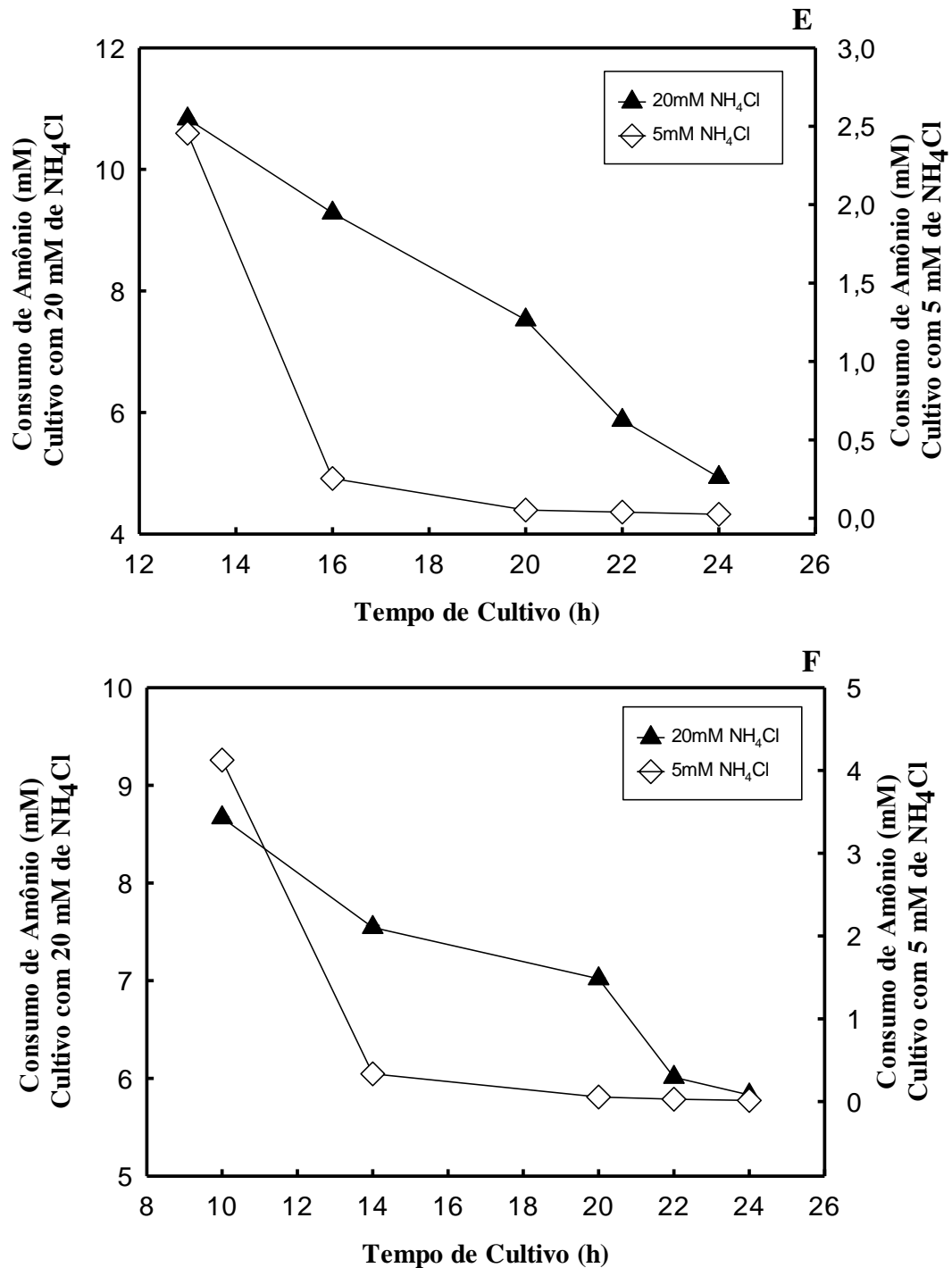
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A, C e E) e mutante *ntrC* (gráficos B, D e F) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-galactose (25mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 6. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-galactose e amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de açúcares redutores pelo método de DNS. A concentração de D-galactose no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de D-galactose diluída em meio NFB.

Figura 6. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-galactose e amônio.

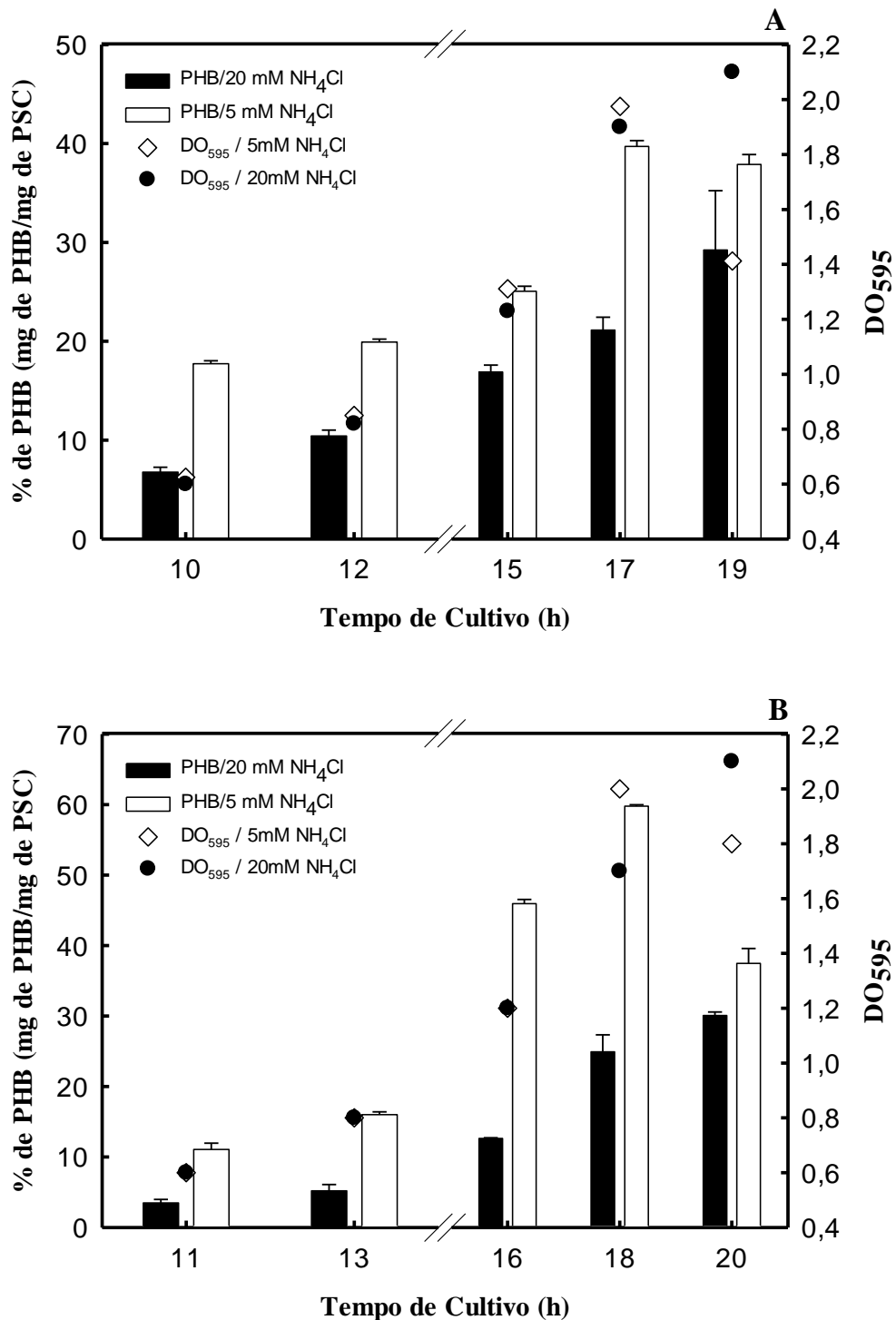


As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos E) e mutante *ntrC* (gráficos F) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

A xilose como única fonte de carbono foi usada na concentração de 30mM, quando a concentração inicial de amônio foi 20mM, a estirpe selvagem de *H. Seropedicae* SmR1, em 10 horas produziu 6,7% de PHB do peso seco de 4,2mg, em um período em que a concentração de xilose no meio era de 4,5mM e de amônio era 10,7mM, a produção chegou a 29,30% de PHB em relação a biomassa de 6,1mg, crescidas em 19 horas em densidade ótica de 2,1, nesse período o consumo de glucose foi a cerca de 22,5mM e o de NH_4Cl foi a cerca de 13,2mM. A redução da concentração inicial de cloreto de amônio para 5mM, melhorou a produção de PHB nessa estirpe bacteriana que nas primeiras 10 horas foi de 17,73% do peso seco de 2,5mg de biomassa, em um período em que a concentração de xilose no meio era 8,6mM e as concentrações de amônio era 0,3mM, para chegar a produção de 39,70% do peso seco de 7mg de células crescidas em 17 horas em densidade ótica de 1,8 e posterior fase de metabolização do polímero, 2 horas depois desse resultado, a concentração final de xilose era em cerca de 2,53mM e de NH_4Cl era aproximado a 0,017mM (figura 7. A,C,E).

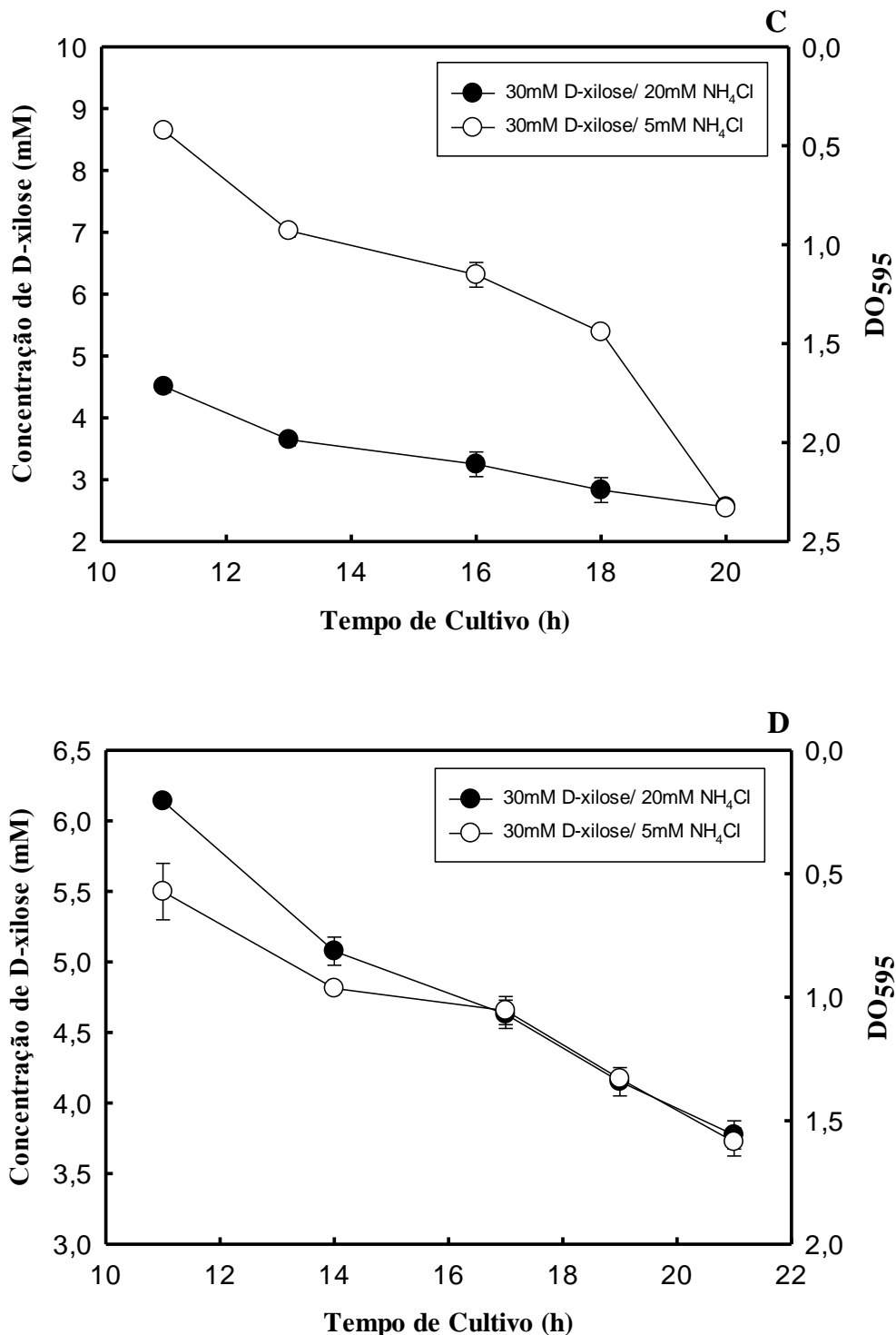
Para *ntrC* em 30mM da mesma fonte de carbono, cultivada com 20mM de cloreto de amônio, a produção de PHB em 11 horas foi de 3,49% o peso seco de 2,5 de biomassa, em um período em que a concentração de glucose no meio era de 6,1mM e de amônio era de 8,5mM, esse resultado chegou a 30,12% do peso seco de 7mg de células que atingiram densidade ótica de 2,1 em 20 horas de crescimento, nesse período a concentração final de xilose era aproximado a 3,77mM e de NH_4Cl em cerca de 4,77mM. A redução da concentração de cloreto de amônio para 5mM, fez com que essa estirpe bacteriana produzisse nas primeiras 11 horas 11,06% de PHB do peso seco de 3,2mg, em concentração de xilose no meio de 5,4mM e de amônio 0,4mM, esse valor alcançou 59,70% de PHB do peso seco de 4,3mg de células em densidade ótica de 2,0, crescidas em 18 horas, entrando em fase metabolização de PHB e declínio de crescimento, ao atingir as 20 horas de crescimento a concentração total de xilose restando no meio foi cerca de 3,72mM e de NH_4Cl em cerca de 0,020mM(figura 7. B,D,F).

Figura 7. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-xilose e amônio.



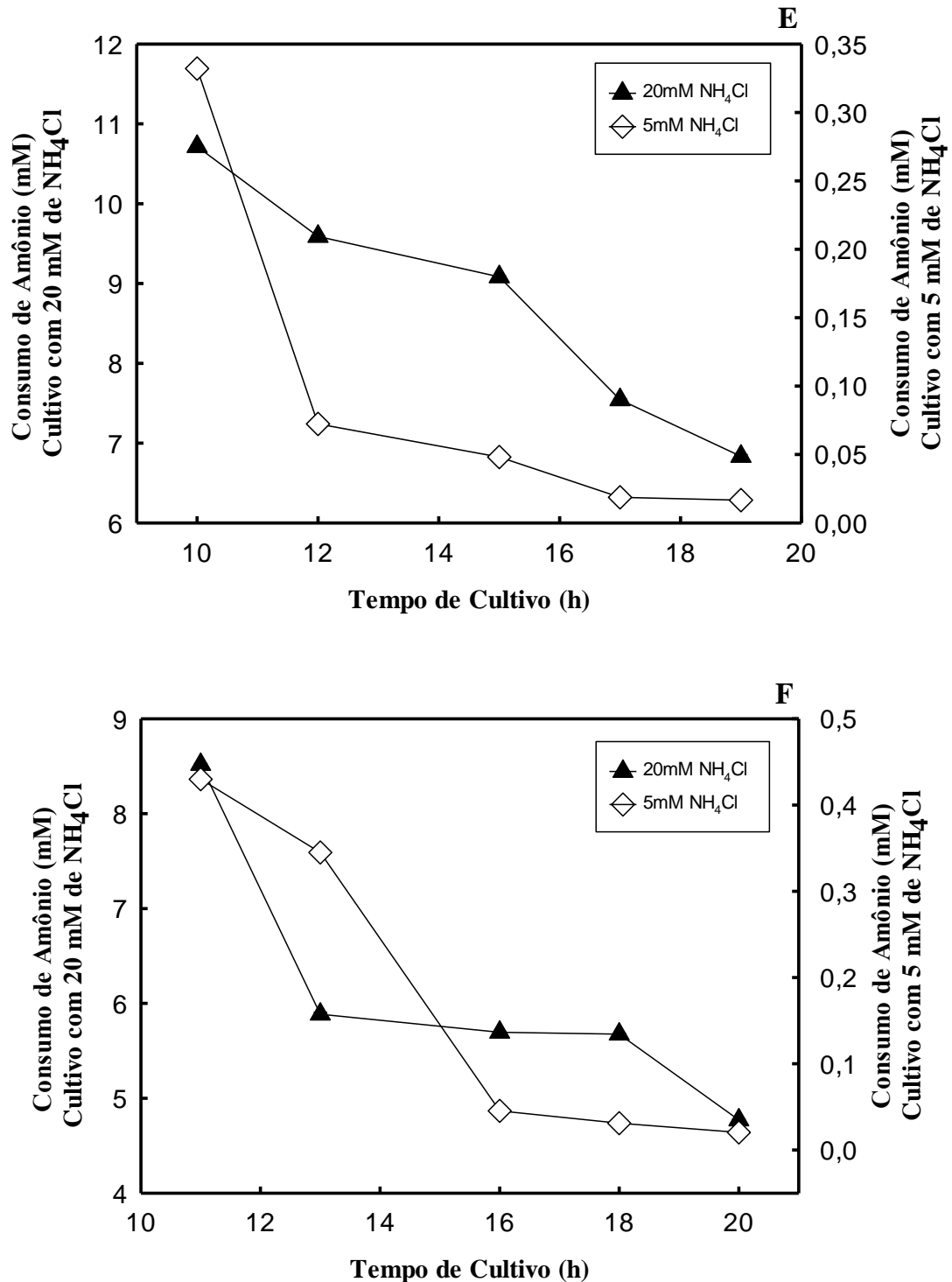
As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A, C e E) e mutante *ntrC* (gráficos B, D e F) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-xilose (30mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 7. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-xilose e amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise de açúcares redutores pelo método de DNS. A concentração de D-xilose no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de D-xilose diluída em meio NFB.

Figura 7. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* e perfis de consumo de D-xilose e amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos E) e mutante *ntrC* (gráficos F) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

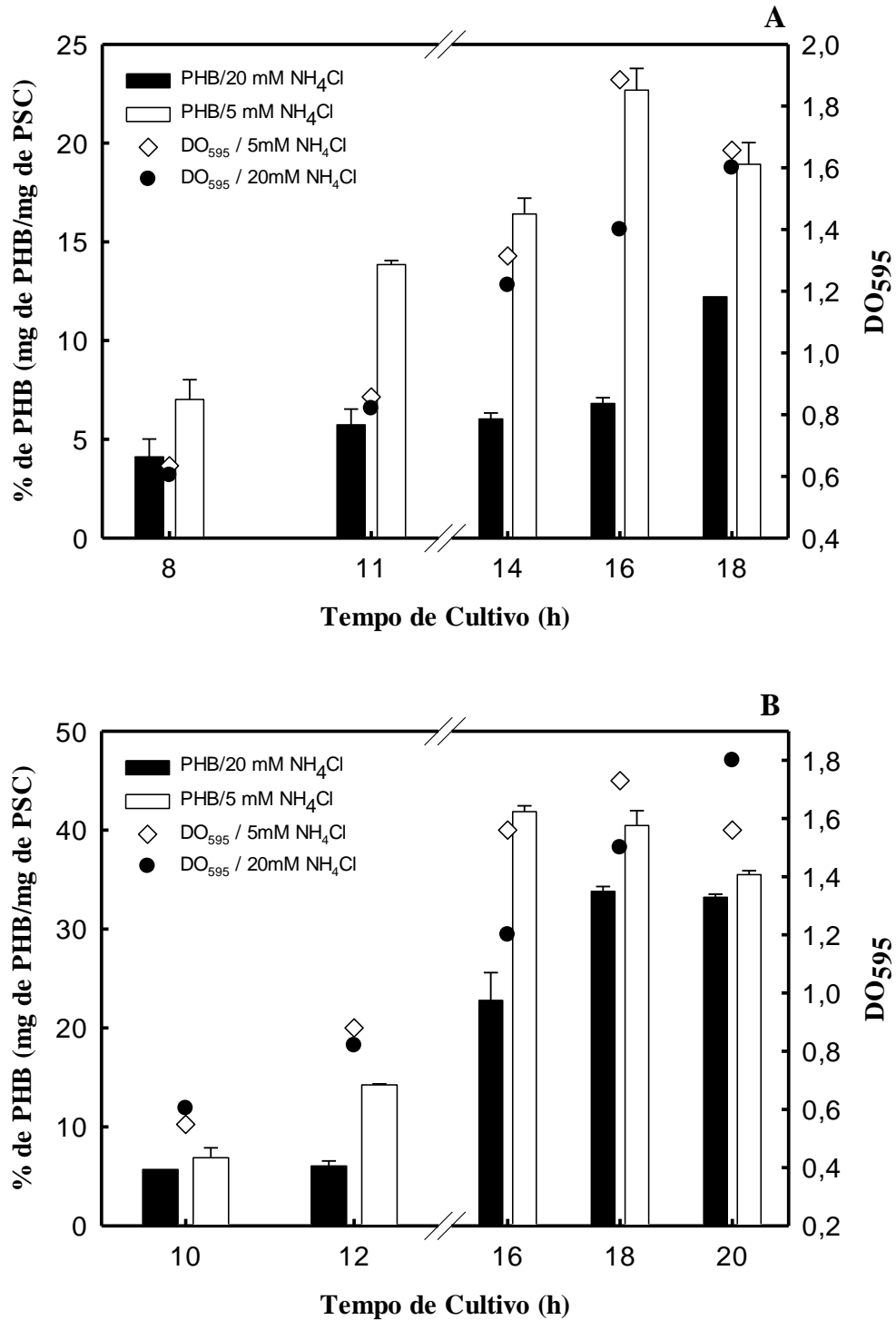
8.2. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando ácidos carboxílicos como única fonte de carbono.

Para o presente estudo foram utilizados os seguintes ácidos carboxílicos e suas concentrações: ácido láctico 50 mM, ácido málico 37,5 mM, ácido succínico 37,5 mM e ácido cítrico 25mM.

Quando DL-lactato foi utilizado a 50mM como única fonte de carbono, contendo 20mM de cloreto de amônio no meio, a estirpe SmR1 produziu com 8 horas de crescimento 4,1% de PHB do peso seco de células. Nesse momento, havia sido consumido 9,7 mM dos 20 mM de cloreto de amônio inicial. A máxima produção chegou apenas a 12,22% de PHB/psc em 18 horas de crescimento. Nesse ponto do crescimento, o consumo de NH_4Cl foi de cerca de 13,79 mM e a concentração final no sobrenadante ficou em cerca de 6,21 mM. Em baixa concentração de cloreto de amônio inicial (5mM), a estirpe SmR1 produziu nas primeiras 8 horas de crescimento 7,02% de PHB/psc. Nesse momento, a concentração de amônio no meio era de apenas 0,35mM. A produção chegou a 22,68% de PHB/psc, sendo que após esse período o PHB começou a ser metabolizado pela bactéria. Com 18 horas de cultivo a concentração de PHB caiu para 18,93% e a concentração final de NH_4Cl era de apenas 0,017 mM (Figura 8 A e C).

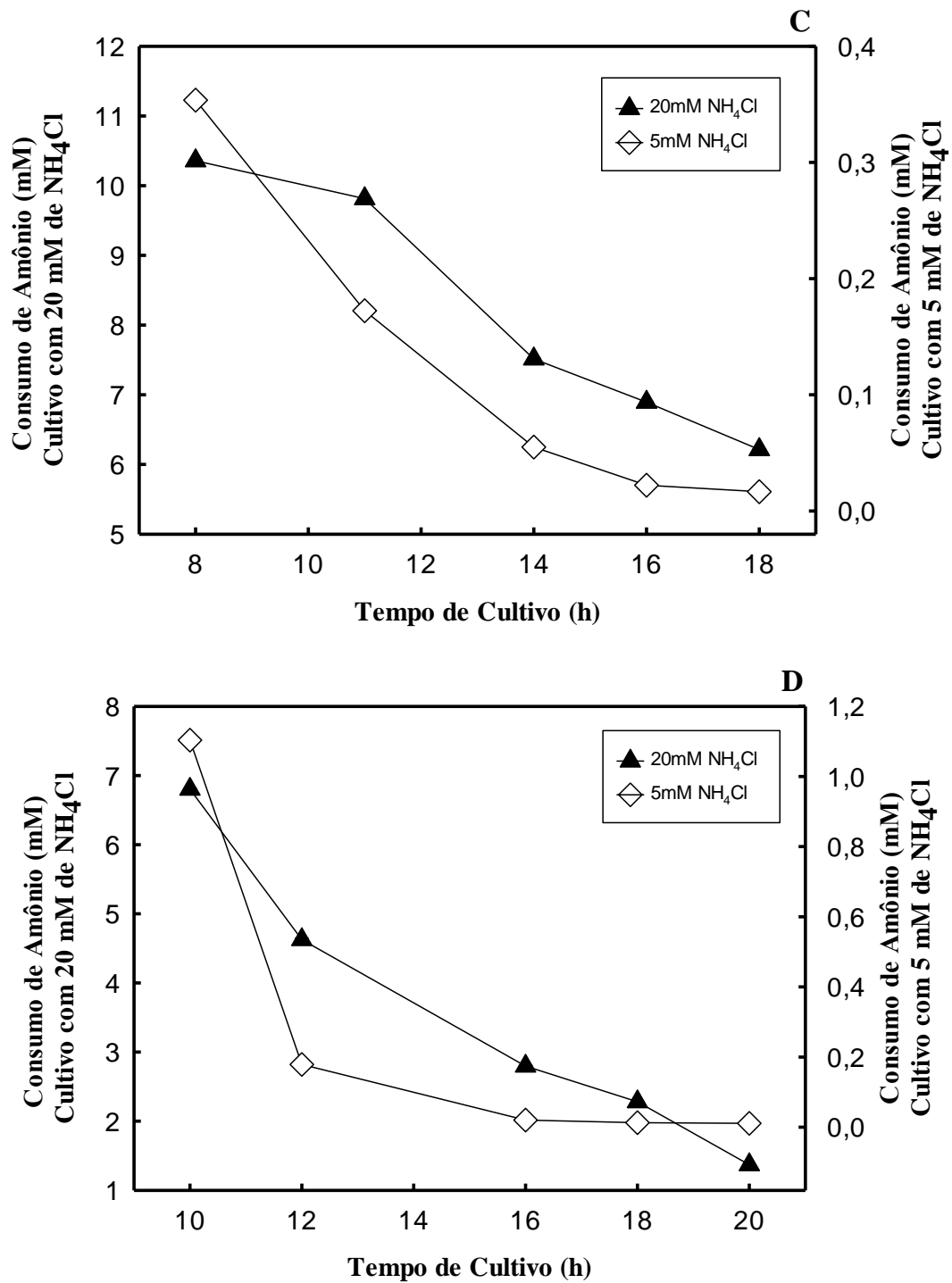
Para o mutante *ntrC* cultivado em 50mM de lactato contendo 20mM de cloreto de amônio, a produção de PHB em 10 horas de crescimento foi de 5,69% do peso seco de células e, o consumo de amônio até esse ponto era de 13,4 mM. Após atingir a DO_{595} de 1,8 com 20 h de crescimento, a produção de PHB chegou a 33,80%/psc, quando a concentração de NH_4Cl no sobrenadante era de 1,37mM. Ao reduzir-se a concentração inicial de cloreto de amônio de 20 para 5 mM, o mutante *ntrC* produziu em 10 horas de crescimento 6,88% de PHB por peso seco de células. Nesse ponto, o consumo de amônio foi de 1,1mM. A produção de PHB chegou a 40,47% do peso seco de células em 16 horas de crescimento. Com 20 horas de crescimento o percentual de PHB nessa estirpe bacteriana caiu para cerca de 35,50%, e nesse período a concentração final de amônio detectada no sobrenadante foi de apenas 0,011 mM (Figura 8 B e D).

Figura 8. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando DL-lactato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A e C) e mutante *ntnC* (gráficos B e D) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-lactato (50 mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 8. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando DL-lactato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.

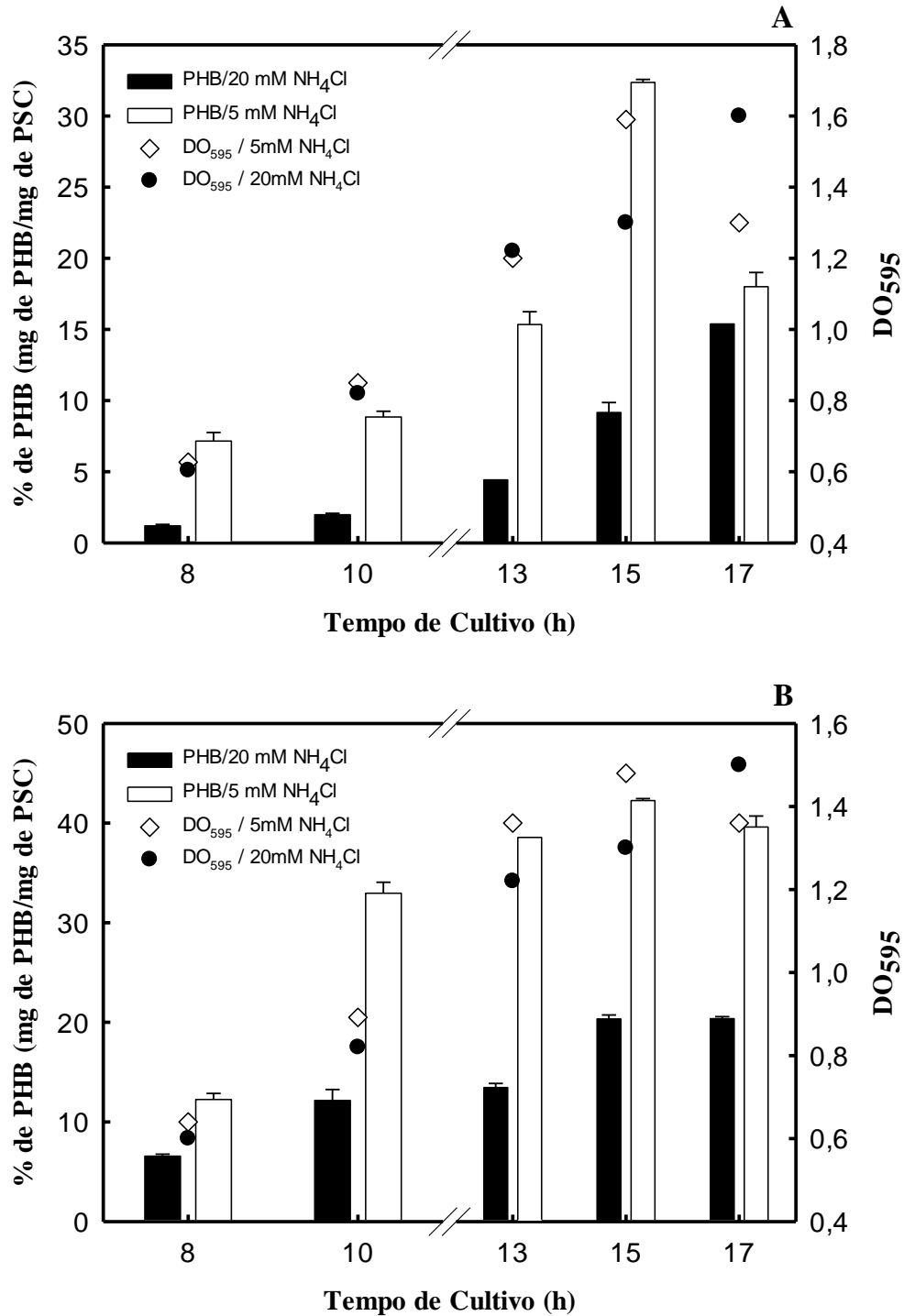


As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

Quando DL-malato foi utilizado como única fonte de carbono na concentração inicial de 37,5 mM no meio e, 20 mM de cloreto de amônio, a estirpe SmR1 produziu 1,2% de PHB do peso seco de células nas primeiras 8 horas de cultivo. Neste ponto do cultivo, a concentração de amônio no meio era de 8,5 mM. Com 17 h de cultivo, a produção de PHB nessa condição chegou a 15,39% do peso seco de células, sendo que nesse período o consumo de NH_4Cl foi de aproximadamente 18,16 mM, restando no meio cerca de 1,84 mM. A redução da concentração de cloreto de amônio inicial para 5 mM fez com que a estirpe SmR1 produzisse nas primeiras 8 horas de crescimento 7,16% de PHB do peso seco de células, sendo que nesse ponto havia sido consumido quase todo o amônio disponível, sobrando no meio apenas 0,11 mM. Essa condição permitiu que em 15 horas de crescimento, a produção de PHB chegasse a 32,36% do peso seco de células. Em 17 horas de cultivo, esse percentual teve uma redução para 18,01% de PHB, nesse período a concentração final de NH_4Cl foi de cerca de 0,09 mM (Figura 9 A e C).

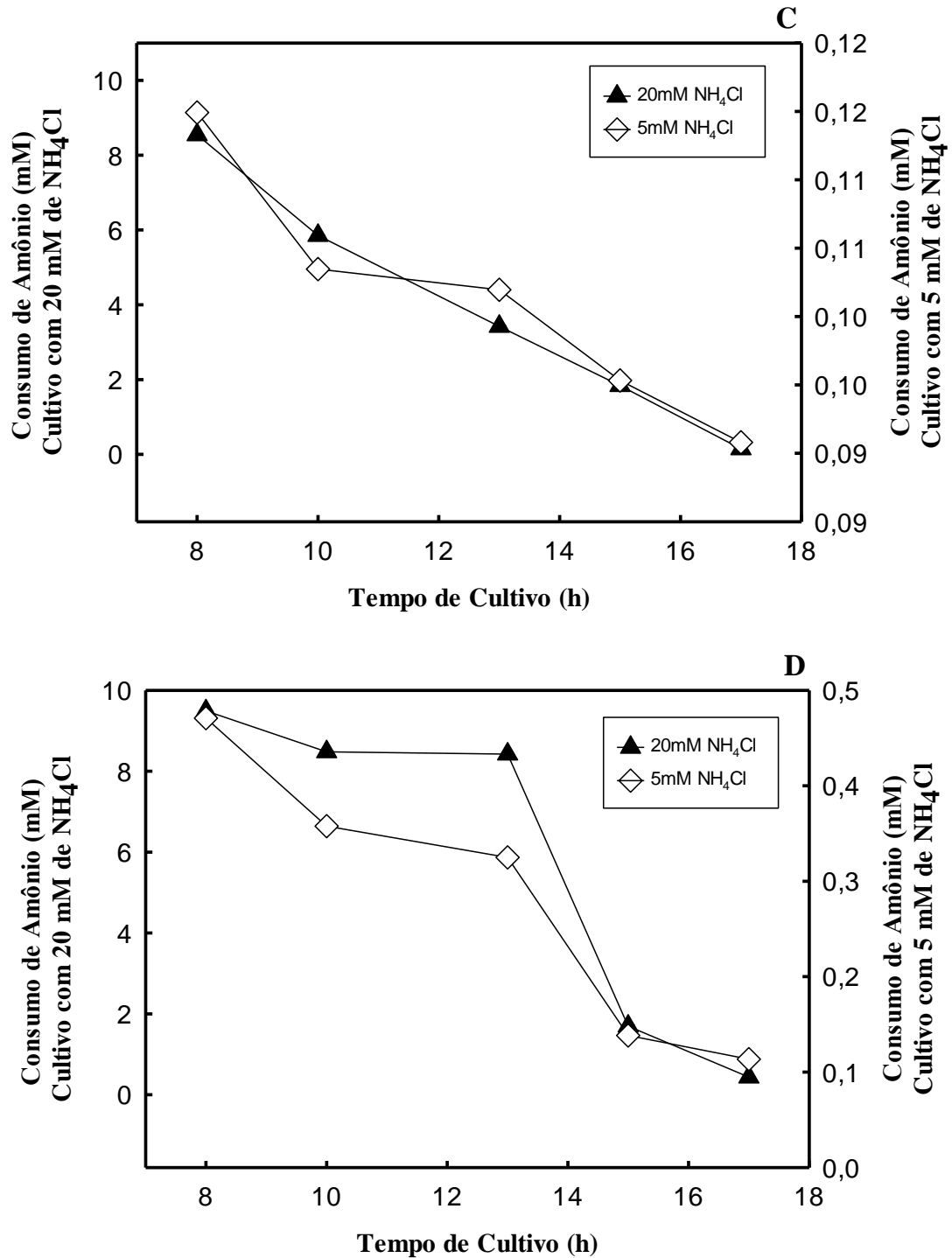
Quando a mesma concentração de DL-malato foi usada para o cultivo do mutante *ntrC*, com concentração inicial de cloreto de amônio a 20mM, a produção de PHB em 8 horas iniciais de crescimento foi de 6,57% do peso seco de células. A concentração de amônio neste momento era de 9,5mM. A produção do polímero chegou a 20,76% do peso seco de células em 17 horas. Nesse período a concentração final de NH_4Cl foi a cerca de 0,47 mM. Ao reduzirmos a concentração inicial de cloreto de amônio para 5 mM, o mutante *ntrC* produziu 12,26% de PHB por peso seco de células em 8 horas de crescimento. Essa produção chegou a 42,26% de PHB pelo peso seco de células, após esse período começou a fase de metabolização de polímero que caiu para 39,61%, no período de 17 horas de cultivo. Nessa fase a concentração final de NH_4Cl era de 0,11mM (Figura 9 B e D).

Figura 9. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando DL-malato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A e C) e mutante *ntrC* (gráficos B e D) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-malato (37,5 mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 9. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando DL-malato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.

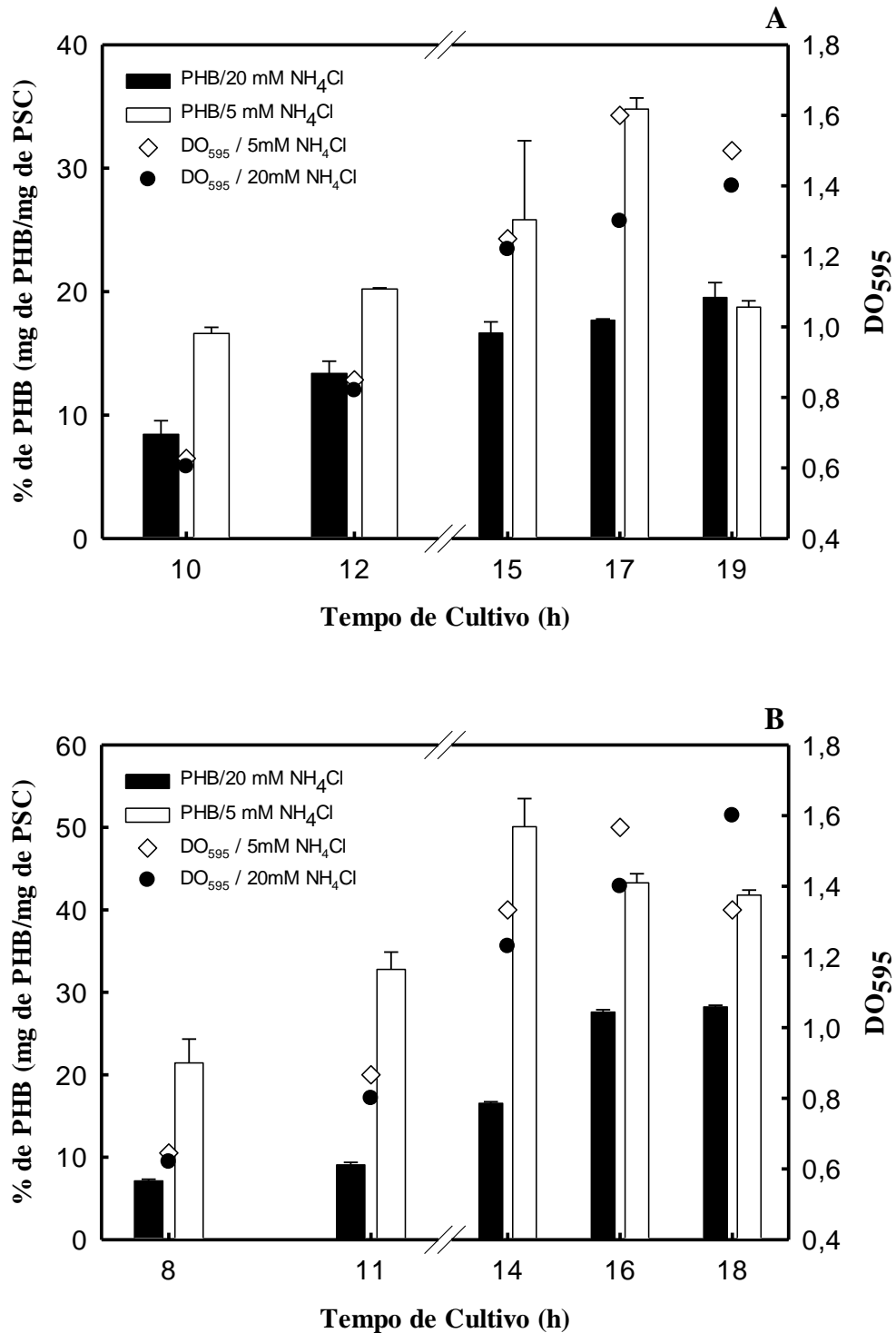


As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntrC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

Na concentração de 37,5mM de succinato como única fonte de carbono em 20mM de NH_4Cl , a produção de PHB para a estirpe SmR1, nas primeiras 11 horas de crescimento, foi de 8,44% do peso seco de células. Com 19 horas de crescimento a produção chegou a 19,53% de PHB por peso seco de células, quando a concentração final de cloreto de amônio foi de 2,4 mM. A redução da concentração inicial de cloreto de amônio para 5 mM na mesma fonte de carbono, levou a produção de 16,61% de PHB por peso seco de células com 11 horas de crescimento, após ter restado apenas 0,2 mM de cloreto de amônio no meio. Essa produção foi ampliada para 34,79% do peso seco de células em 17 horas de crescimento, esse percentual de PHB caiu para 18,75%, sendo que a concentração final de NH_4Cl era de 0,006 mM (Figura 10 A e C).

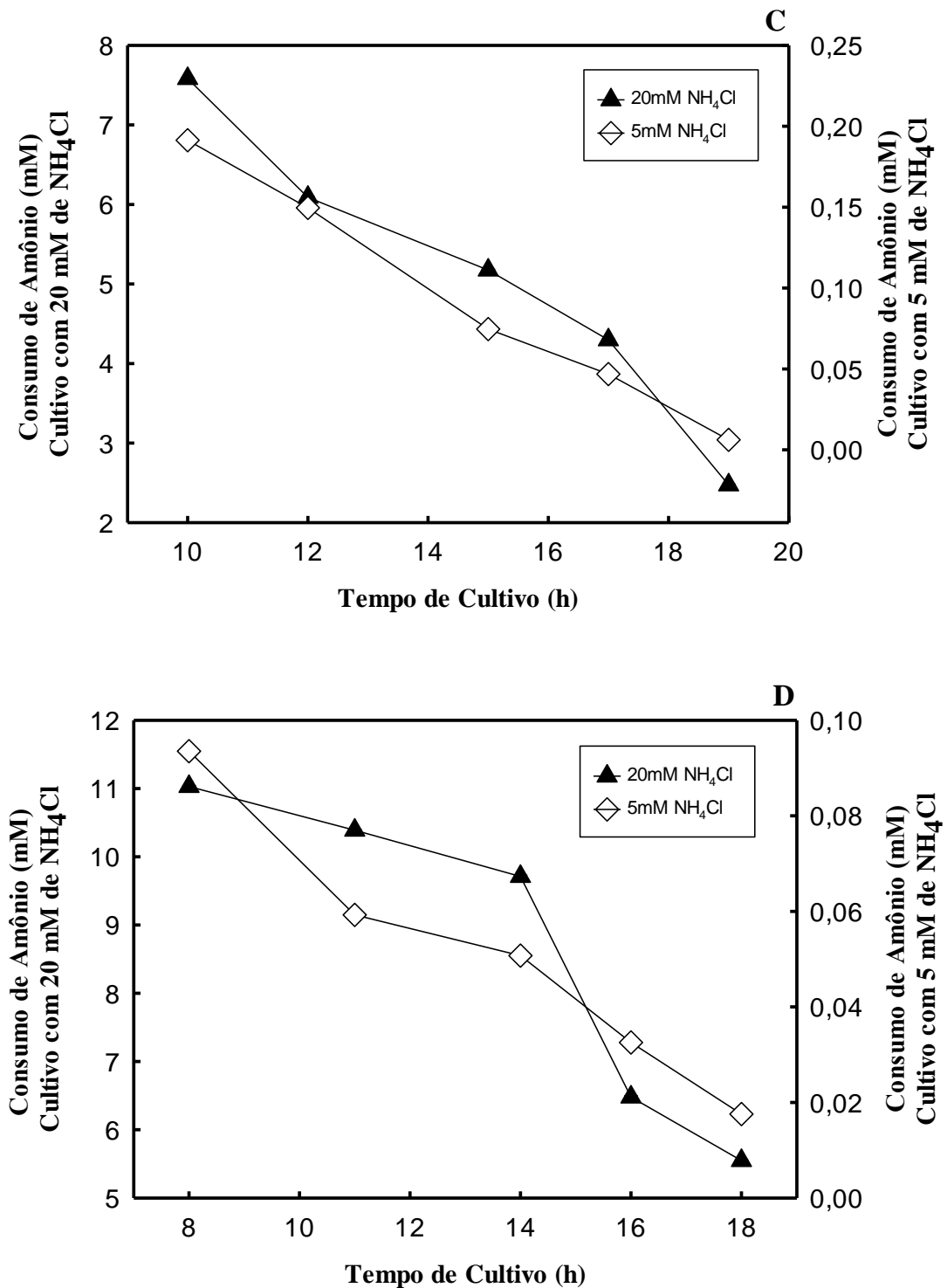
Ao se cultivar o mutante *ntrC* em succinato a 37,5mM e concentração inicial de 20mM de amônio, a produção de PHB nas primeiras 8 horas foi de 7,12% por peso seco de células. A concentração de amônio no meio ainda era de 11 mM. Essa produção chegou a 28,23% do peso seco de células em 18 horas, quando a concentração final de NH_4Cl era de 5,5 mM. Quando a concentração inicial de cloreto de amônio foi reduzida para 5 mM, a produção de PHB em 8 horas de crescimento foi de 21,43% do peso seco de células, após ter restado apenas 0,09 mM de amônio no meio. Com 14 horas de crescimento, a produção foi ampliada para 50,09% do peso seco de células. Depois desse ponto observou-se a fase de queda de PHB, sendo que após 4 horas de cultivo, o percentual de PHB caiu para 41,79% e a concentração final de NH_4Cl chegou a 0,018mM (Figura 10 B e D).

Figura 10. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* utilizando succinato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A e C) e mutante *ntrC* (gráficos B e D) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-succinato (37,5 mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 10. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando succinato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.

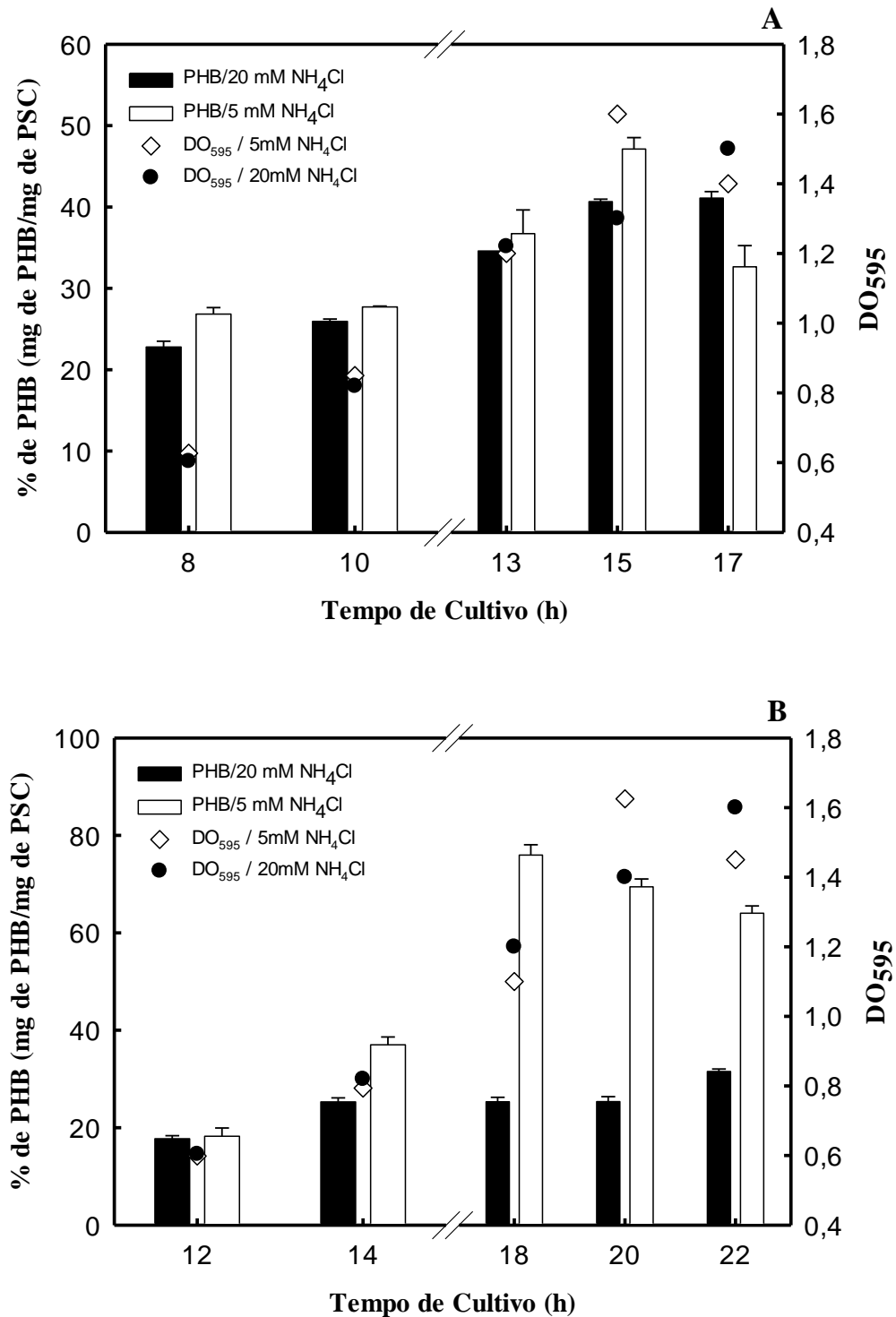


As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntnC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

Quando se utilizou 25mM de citrato como única fonte de carbono com 20mM de cloreto de amônio, a estirpe SmR1 produziu 22,79% de PHB por peso seco de células nas primeiras 12 horas de crescimento. Neste ponto do cultivo a concentração de amônio presente no meio era de 9,1 mM. Com 17 h de crescimento, a produção de chegou a 41,09% de PHB/psc, sendo a concentração de NH_4Cl no meio cerca de 4,85 mM. Ao se reduzir, a concentração de inicial de NH_4Cl para 5 mM, nas primeiras 12 horas a produção de PHB em SmR1 foi de 26,83% do peso seco de células, restando no meio apenas 0,5 mM de amônio. Essa produção chegou a 47,12% do peso seco de células em 15 horas de crescimento. Após 2 horas de cultivo, esse percentual de PHB chegou a 32%. A concentração final de NH_4Cl no meio era de 0,006 mM (Figura 11 A e C).

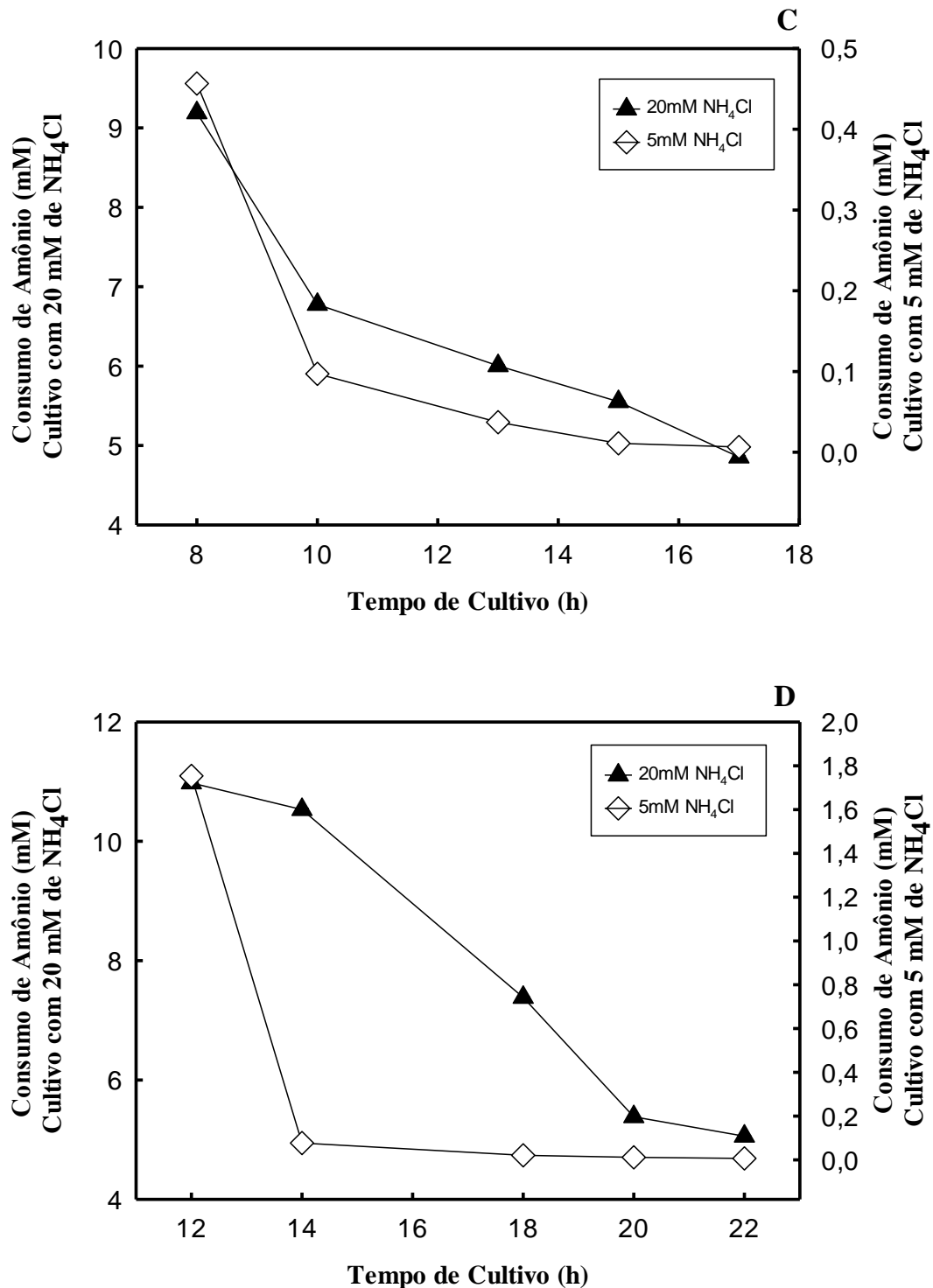
Ao se cultivar o mutante *ntrC* na mesma fonte de carbono com 20mM de cloreto de amônio, nas primeiras 12 horas a produção de PHB foi de 17,75% do peso seco de células. Neste período a concentração de amônio presente no meio foi de 10,1mM. Essa produção chegou a 31,54% do peso de células em 22 horas de cultivo, onde a concentração final de NH_4Cl era de 4,85 mM. Ao se reduzir a concentração de cloreto de amônio para 5mM, o mutante *ntrC* em 12 horas de cultivo produziu 18,24% de PHB por peso seco de células, após restar no meio a concentração de 1,7mM de amônio. Essa produção chegou a 75,98% de PHB do peso seco de células em 18 horas de crescimento. Com 20 h de cultivo, o percentual de PHB caiu para 64,45% e, com 22 h de cultivo para 64,02%. Com 22 horas de crescimento a concentração final de NH_4Cl no meio era de 0,007 mM (Figura 11 B e D).

Figura 11. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando citrato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A e C) e mutante *ntnC* (gráficos B e D) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-citrato (25 mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 11. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando citrato como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntnC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

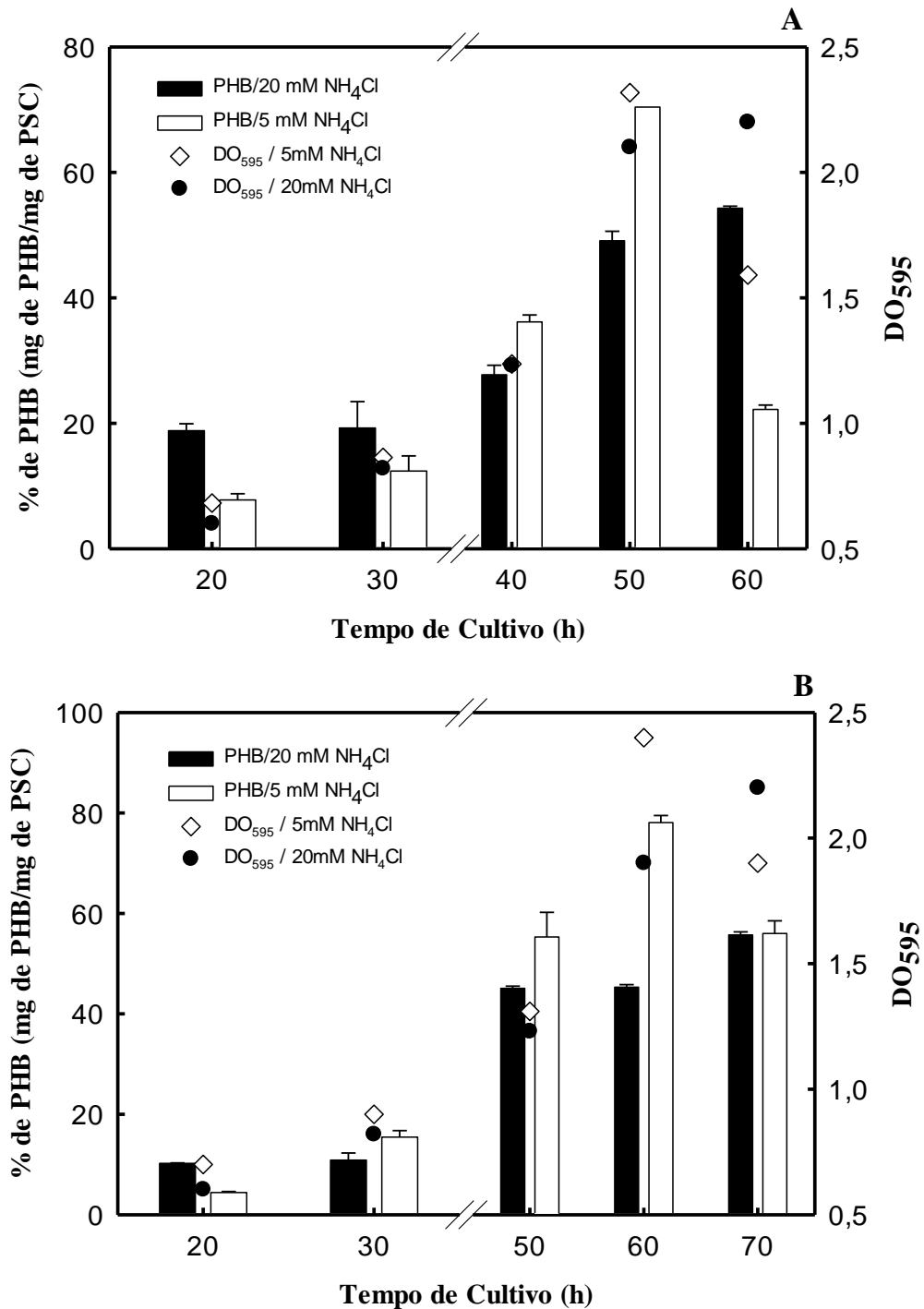
8.3. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando glicerol como única fonte de carbono.

Glicerol é um composto orgânico pertencente à função álcool, sendo um composto líquido à temperatura ambiente, higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado. O glicerol pode ser encontrado em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal em sua forma combinada, é reconhecido como seguro para o consumo humano, podendo ser utilizado em diversos produtos alimentícios para os mais diversos propósitos (COLLINS, 2005). Além disso, o glicerol é subproduto da síntese de biodiesel, portanto surge como um possível resíduo de baixo custo para a utilização na produção microbiana de PHB.

Em concentração de 50 mM de glicerol 20 mM de cloreto de amônio, a estirpe SmR1 produziu em 20 horas de crescimento apenas 18,83% de PHB por peso seco de células. Nesse ponto a concentração de amônio presente no meio foi de 2,5 mM. Com 60 horas de crescimento, a produção foi melhorada para 54,30%, sendo a concentração final de NH_4Cl de 0,19 mM. A redução da concentração inicial de cloreto de amônio para 5mM, levou a produção de PHB de 7,77% do peso seco de células em 20 horas de crescimento com o consumo de 2,5 mM de amônio. Essa produção foi ampliada para 74,41% do peso seco de células em 50 horas de crescimento. Nessa fase de crescimento, a concentração de cloreto de amônio presente no meio era de 0,03 mM. Após mais 10 horas de crescimento, o percentual de PHB caiu para 22,20%, nesse período a concentração final de NH_4Cl era de cerca de 0,020 mM (Figura 12 A e C).

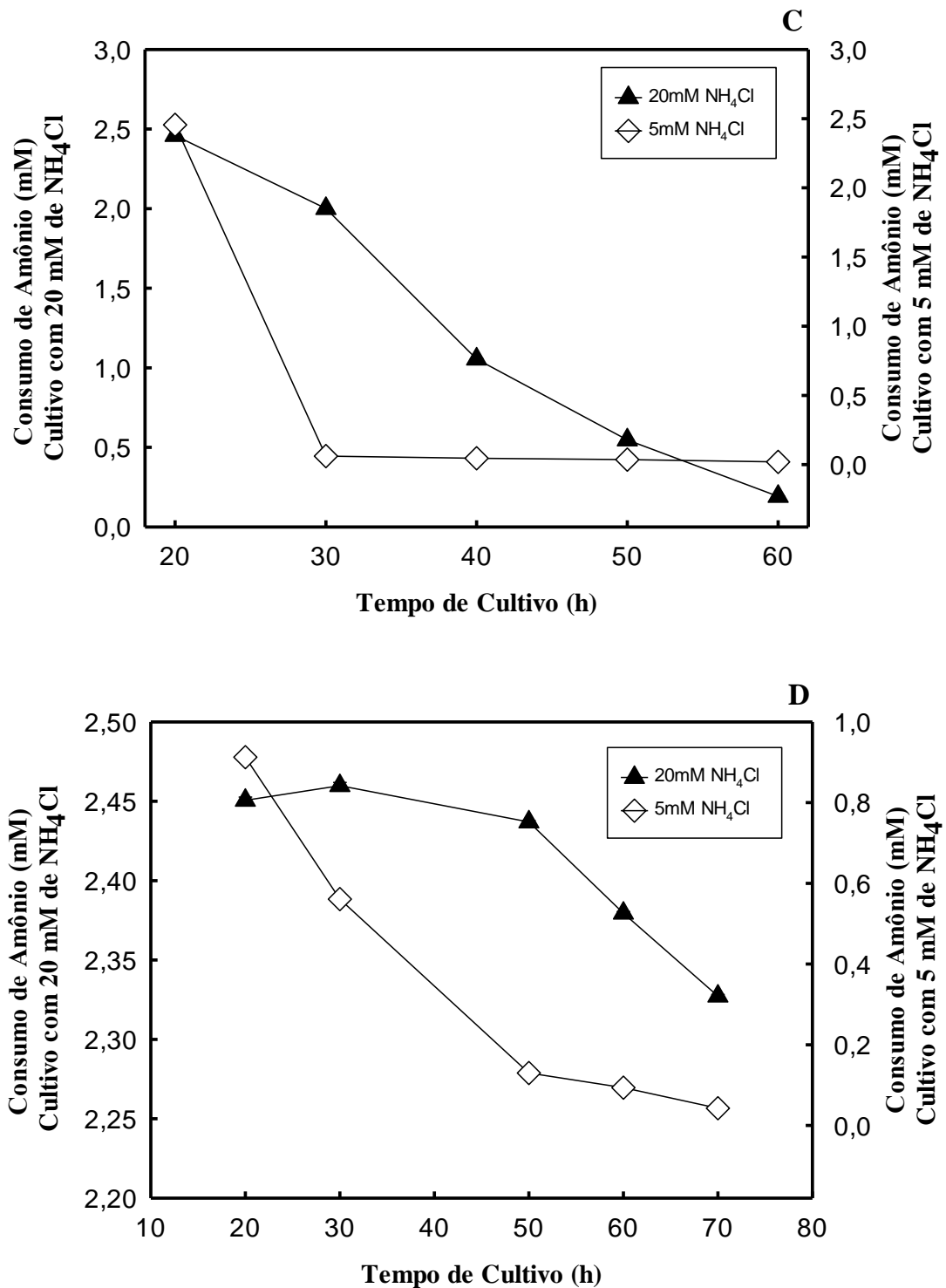
Em 50 mM de glicerol contendo 20 mM de cloreto de amônio, a estirpe *ntnC* produziu nas primeiras 20 horas, 10,23% de PHB por peso seco de células, quando a concentração de amônio no meio era de 2,5mM. Essa produção chegou a 55,71% de PHB por peso seco de células em 70 horas de cultivo. Nesse ponto, a concentração final de cloreto de amônio no sobrenadante de meio de cultivo era de 2,3mM. Quando a concentração de cloreto de amônio inicial foi reduzida para 5 mM, com 20 horas de crescimento a produção de PHB foi de 4,42% do peso seco de células, sendo que a concentração de amônio presente no meio era de 0,9 mM. Essa produção chegou a 78,09% do peso seco de células com 60 horas de crescimento. Após 10 horas de cultivo, essa porcentagem de PHB caiu drasticamente para 22,20%. Nesse período a concentração final de NH_4Cl foi de 0,045 mM (Figura 12 B e D).

Figura 12. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando glicerol como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos A e C) e mutante *ntnC* (gráficos B e D) foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-glicerol (50 mM) com 20 ou 5 mM de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 12. Produção de PHB por *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntnC* utilizando glicerol como fonte de carbono e perfil do consumo de amônio.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 (gráficos C) e mutante *ntnC* (gráficos D) foram centrifugadas e 1,5 mL do sobrenadante foi coletado e congelado para posterior análise da concentração de amônio pelo método do Indofenol. A concentração de amônio no meio foi calculada de acordo com uma curva de calibração construída com uma solução padrão de NH₄Cl diluída em meio NFB.

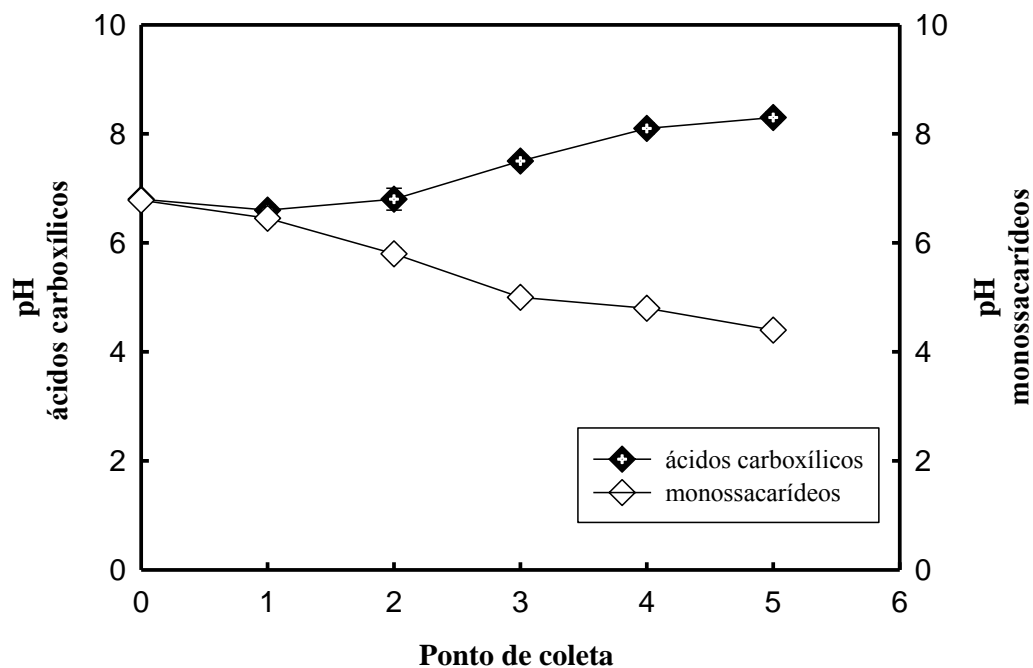
Após a realização de todos os experimentos, verificamos que a maior produção de PHB tanto para a estirpe selvagem de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 quanto para o seu mutante no gene *ntrC*, variou de acordo com o tipo de fonte de carbono usado mesmo com a variação na relação carbono/nitrogênio, ou seja, nem sempre a maior produção de PHB ocorreu quando o mutante *ntrC* foi cultivado, já que não foram estabelecidas condições específicas para definir qual o melhor tempo ou densidade ótica para se avaliar a maior produção do polímero em cada uma das estirpes, e por esse motivo decidimos apresentar uma tabela comparativa entre os valores de produção de PHB em *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 e seu mutante *ntrC* cultivados em todas as fontes de de carbono utilizadas nesse estudo.

Tabela 4. Tabela comparativa de produção de PHB entre a estirpe Selvagem SmR1 e mutante *ntrC* de *H. seropedicae*

Meio de Cultivo	% de PHB (mg de PHB/mg de Peso Seco das células)			
	Baixa relação C/N (7,5)		Baixa relação C/N (30)	
	SmR1	<i>ntrC</i>	SmR1	<i>ntrC</i>
Glucose	30,1	44,5	40,4	51,1
Frutose	27,7	52,4	30,5	65,9
Galactose	32,6	35,5	34,7	41,7
Xilose	29,3	30,1	39,7	59,7
Malato	15,4	20,8	32,4	42,3
Lactato	12,2	33,8	22,7	40,5
Citrato	41,1	31,5	47,1	75,9
Succinato	19,5	28,2	34,8	50,1
Glicerol	54,3	55,7	74,4	78,1

Ao se cultivar a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1 e seu mutante *ntrC* em ácidos carboxílicos (lactato, malato, succinato ou citrato) ou monossacarídeos (glucose, galactose, frutose ou xilose), percebeu-se que ambas mantinham o mesmo perfil de pH no meio, mas que esse perfil era diferente dependendo se a fonte de carbono tratava-se de um ácido carboxílico ou de um monossacarídeo. Ao se utilizar ácidos carboxílicos como fonte de carbono, o pH inicial era de 6,8, sendo que os valores de pH aumentaram gradativamente, atingindo 8,3 em 20 horas de crescimento tanto em SmR1 quanto em *ntrC*. Quando as fontes de carbono usadas para o crescimento foram os monossacarídeos, o pH inicial também foi 6,8, entretanto os valores de pH no meio diminuíram ao longo do crescimento, atingindo o valor de 4,4 em um período de 20 horas. Provavelmente, a acidificação do meio no caso da utilização de monossacarídeos deva-se a produção de ácidos como subprodutos do metabolismo bacteriano.

Figura 13. Perfil de pH durante o crescimento de *H. seropedicae* SmR1 em ácidos carboxílicos e monossacarídeos.



Os valores de pH são médias obtidas para os cultivos da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* nos diferentes ácidos carboxílicos e nos diferentes monossacarídeos. Os pontos de coleta foram variáveis de acordo com o tempo que cada cultura levou para atingir o valor de DO_{595} estipulado inicialmente

Pode-se observar na tabela abaixo, que o peso seco de cada cultivo bacteriano variou de acordo com a fonte de carbono utilizada e a concentração inicial de cloreto de amônio no meio. Entretanto, durante a análise dos resultados percebeu-se que nem sempre os maiores valores de produção de PHB estiveram relacionados com o maior peso em biomassa, e que esses valores de biomassa também poderiam estar relacionados com o número de células bacterianas em cada período ou estar relacionados com o peso do grânulo de PHB dentro de cada célula.

Tabela 5. Biomassa das culturas bacterianas

Meio	Biomassa (mg/10mL)			
	SmR1(5 mM)	SmR1(20 mM)	<i>ntrC</i> (5 mM)	<i>ntrC</i> (20 mM)
Glucose	2,0±5,2	3,1±6,5	2,5±8,0	3,6±7,1
Frutose	3,8±6,3	2,5±5,5	2,0±9,0	2,0±11,7
Galactose	2,9±6,0	4,0±7,3	2,4±6,0	2,8±5,5
Xilose	4,2±7,0	3,4±6,3	2,7±5,3	2,0±7,6
Malato	1,4±7,8	3,4±6,3	3,6±7,2	2,0±6,5
Lactato	2,0±6,0	2,9±4,1	2,0±6,0	2,5±6,3
Citrato	2,6±4,5	2,9±9,9	2,0±6,0	3,0±8,2
Succinato	2,9±6,3	4,0±11,0	3,9±7,1	2,0±11,0
Glicerol	3,2±11,8	2,5±11,9	2,5±6,0	2,0±7,0

8.4. Perfil de produção de PHB após complementação do mutante *ntrC*

Foi notável que a estirpe mutante *ntrC* de *H. seropedicae* produziu mais PHB que a estirpe selvagem SmR1 em todas as condições testadas. Devido a este fato, testou-se se a complementação da mutação em *ntrC* reverteria esse efeito. Como controle foi utilizado o plasmídeo pLAFR3.18 sem inserto. Para testar a complementação utilizou-se o mesmo plasmídeo com o inserto contendo os genes *glnAntrBntrC* (plasmídeo pKRT2). Os dados apresentados na Figura 17 mostram o perfil de produção de PHB nas estirpes SmR1 e *ntrC* contendo o pLAFR3.18 (SmR1.pLAFR3 e *ntrC*.pLAFR3) e nas estirpes SmR1 e *ntrC* contendo pKRT2 (SmR1.pKRT2 e *ntrC*.pKRT2). Ambas as estirpes foram cultivadas em DL-malato e glucose, pois são fontes de carbono em que a maior produção de PHB pelo mutante *ntrC* foi facilmente notada

Ao usarmos 37,5mM de malato como única fonte de carbono, contendo 5mM de amônio, em 18 horas de crescimento SmR1.pLAFR3, SmR1.pKRT2 apresentaram o mesmo perfil de produção de PHB que SmR1 (27,80% de PHB por peso seco de células), sendo que *ntrC*.pLAFR3 apresentou o mesmo perfil de produção de PHB que *ntrC* (cerca de 37,81% de

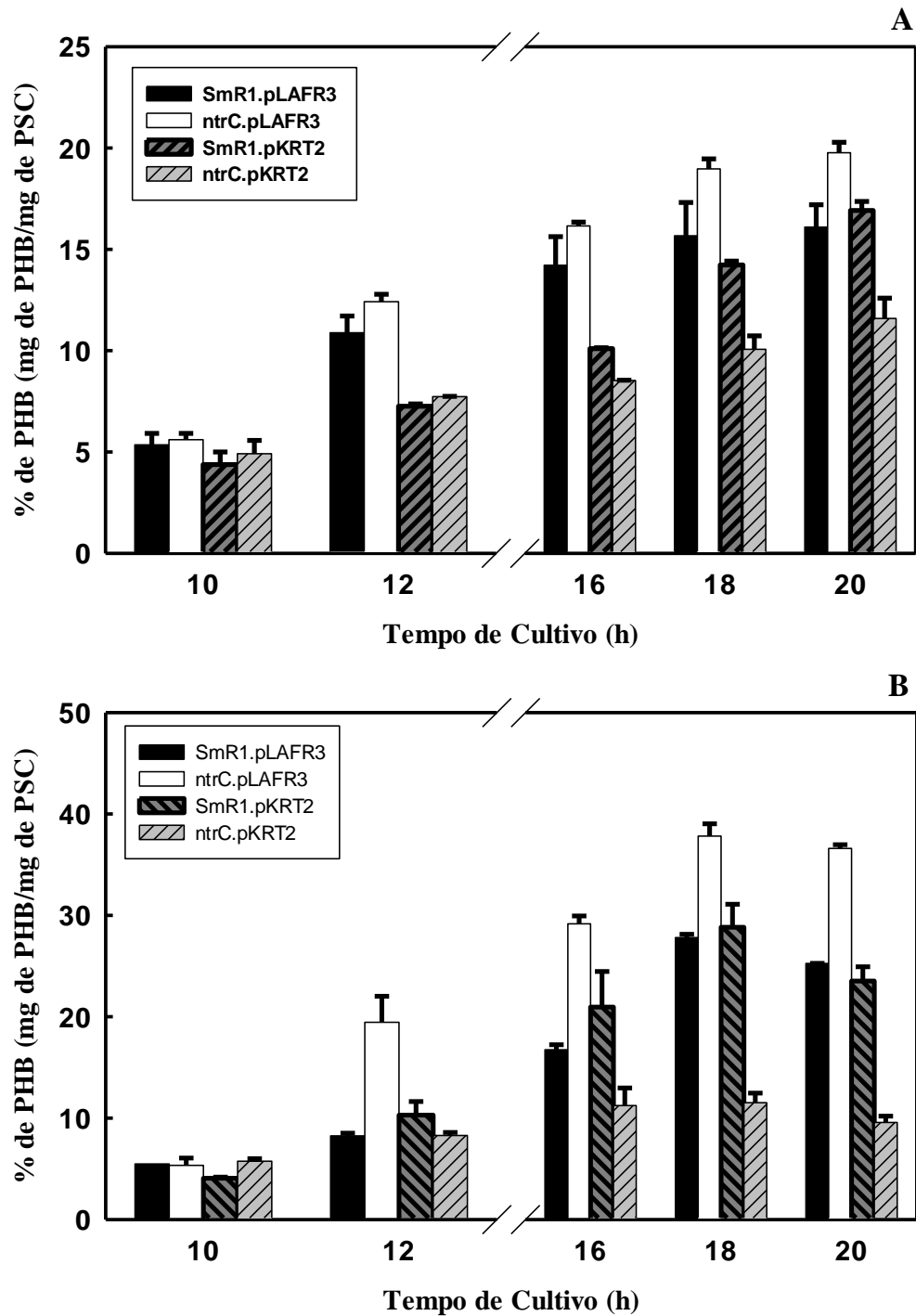
PHB por peso seco de células). Este resultado demonstra que nem a inserção do plasmídeo vazio e nem a inserção do plasmídeo contendo o operon apresentaram efeito significativo na produção de PHB. Entretanto, a inserção do operon no mutante *ntrC* complementou o fenótipo do mutante quanto a produção de PHB, visto que a produção de PHB em *ntrC.pKRT2* ficou em torno de 11,51% do peso seco de células. Este perfil se manteve em todas as fases de crescimento analisadas, sendo que em 20 horas de crescimento o polímero passou a ser metabolizado em todas as estirpes bacterianas testadas (Figura 14 B).

A complementação também foi avaliada na concentração de cloreto de amônio de 20mM na mesma fonte de carbono. Conforme os experimentos anteriores o perfil de produção de PHB para cada estirpe testada foi: SmR1.pLAFR3 produziu 16,10% de PHB/psc, SmR1.pKRT2 produziu 16,91 % de PHB/psc, *ntrC.pLAFR3* produziu 19,76% de PHB/psc e *ntrC.pKRT2* produziu 11,59% de PHB/psc. Essas estirpes bacterianas estavam ainda em fase exponencial de crescimento depois de 20 horas e mantiveram esse perfil de produção de PHB em todas as fases observadas (Figura 14 A).

Para avaliar se estes resultados não se davam somente quando se utilizou malato como fonte de carbono, decidimos testar essas duas condições em 25mM de glucose. Quando a concentração de cloreto de amônio inicial foi de 20mM, em 20 horas de crescimento os resultados foram: SmR1.pLAFR3 produziu 43,71% de PHB/psc, SmR1.pKRT2 produziu 33,81% de PHB/psc, *ntrC.pLAFR3* produziu 56,44% de PHB/psc e *ntrC.pKRT2* produziu cerca de 31,02% de PHB/psc. O perfil de produção de PHB foi semelhante em todas as etapas avaliadas e com 22 horas de crescimento todas as estirpes bacterianas começaram a metabolizar o polímero (Figura 14 D).

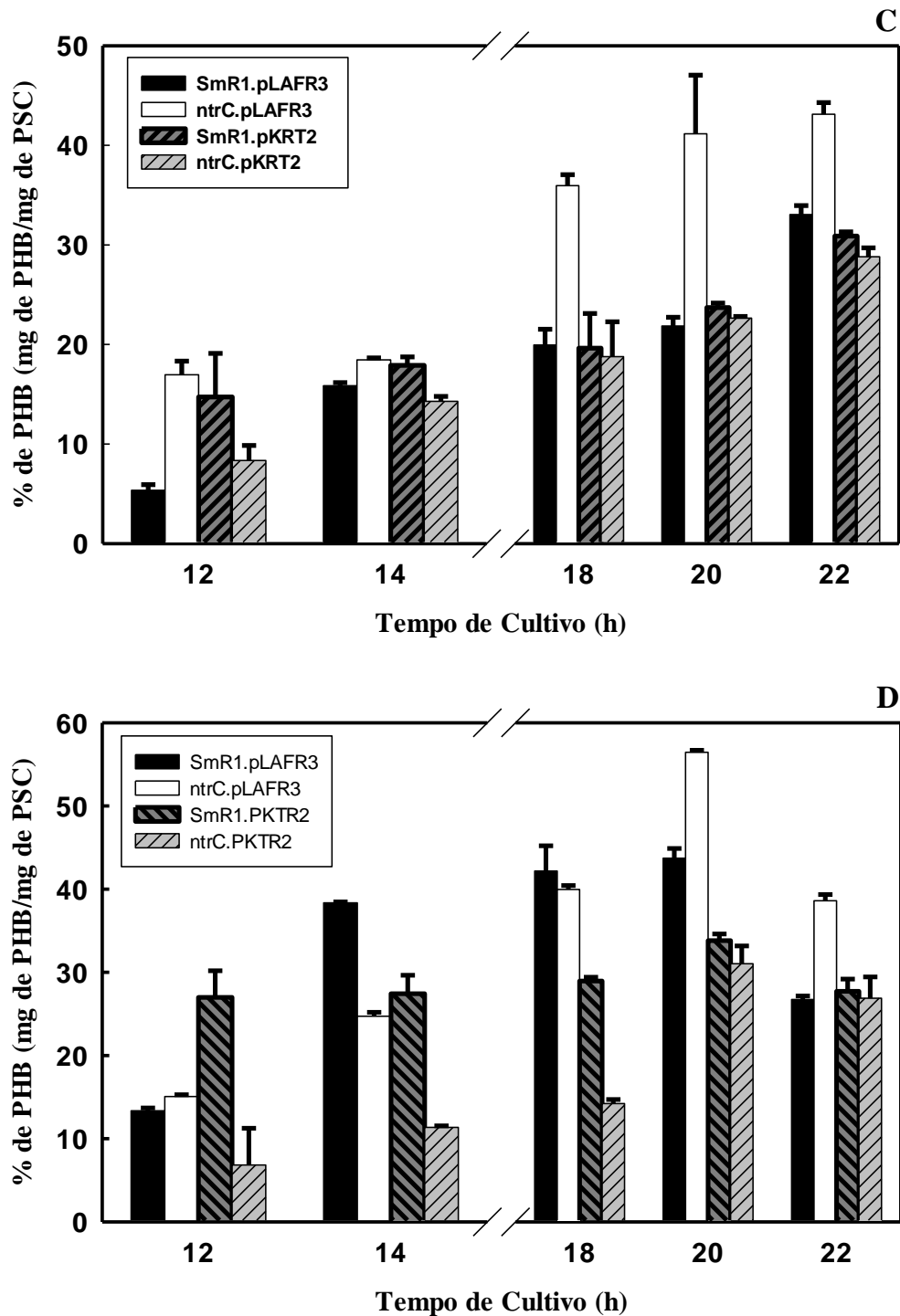
Ao se aumentar a concentração inicial de cloreto de amônio para 20mM na mesma fonte de carbono, em 22 horas de crescimento todas as estirpes ainda se mantinham em fase exponencial, sendo que as produções de PHB foram as seguintes: SmR1.pLAFR3 produziu 33,04% de PHB/psc, SmR1.pKRT2 produziu 30,88% de PHB/psc, *ntrC.pLAFR3* produziu 43,11% de PHB/psc e *ntrC.pKRT2* produziu 28,80% de PHB/psc (Figura 14 C).

Figura 14. Efeito da complementação do mutante *ntrC* na produção de PHB em malato e glucose.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-malato (37,5 mM) com 20 mM (gráfico A) ou 5 mM (gráfico B) de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

Figura 14. Efeito da complementação do mutante *ntrC* na produção de PHB em malato e glucose.



As culturas de *H. seropedicae* SmR1 e mutante *ntrC* foram cultivadas em duplicata a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB-glucose (25 mM) com 20 mM (gráfico C) ou 5 mM (gráfico D) de cloreto de amônio (concentração inicial). Em diferentes intervalos de tempo, 10 mL de cada cultura foram centrifugados, sendo o precipitado de bactérias congelado e liofilizado para posterior determinação da porcentagem de PHB por cromatografia gasosa.

A tabela abaixo demonstra que o número de unidades formadoras de colônia na estirpe selvagem de *H. seropedicae* difere do número de unidades formadoras de colônias no mutante *ntrC*. Entretanto, após a complementação, o número de células formadoras de colônias de *ntrC.pKRT2* é muito mais próximo ao número de unidades formadoras de colônias em SmR1, embora difere de SmR1.pKTR2 que manteve o mesmo perfil de produção de PHB, é muito mais diferente ainda em relação ao mutante *ntrC* em quase todas as fontes de carbono testadas, esse resultado pode ser um indicativo de que a complementação não só apresenta efeito na produção de PHB, mas também no número de células formadoras de colônia.

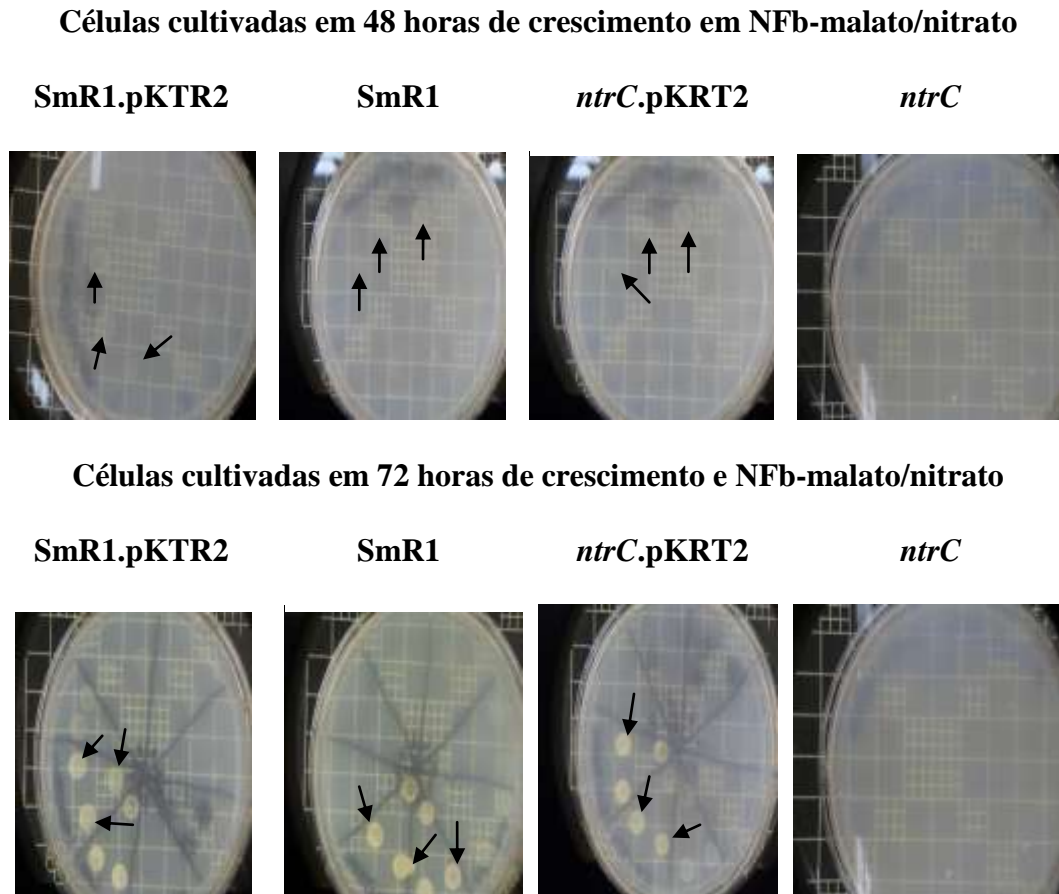
Tabela 6. Contagem de bactérias totais (UFC/mL)

Fontes de carbono	Malato (UFC/mL)			
	5mM de NH ₄ Cl		20mM de NH ₄ Cl	
Densidade ótica	0,6	1,2	0,6	1,2
SmR1	2.5.10 ¹⁰	1.8.10 ¹⁰	8.4.10 ¹⁰	1.1.10 ¹⁰
NtrC	3.2.10 ¹⁰	3.8.10 ⁹	1.2.10 ¹⁰	1.9.10 ¹¹
SmR1.pKRT2	2.2.10 ⁹	1.8.10 ¹⁰	3.10 ⁹	9.10 ⁹
ntrC.pKRT2	1.6.10 ¹⁰	1.5.10 ¹⁰	8.1.10 ¹⁰	1.2.10 ¹⁰
	Glucose (UFC/mL)			
SmR1	1.5.10 ¹⁰	1.1.10 ¹⁰	2.3.10 ¹⁰	2.1.10 ¹⁰
NtrC	1.1.10 ¹⁰	1.5.10 ¹⁰	5.10 ⁹	6.5.10 ¹⁰
SmR1.pKRT2	3.10 ⁹	8.7.10 ¹⁰	6.8.10 ¹⁰	2.5.10 ¹⁰
ntrC.pKRT2	1.5.10 ⁹	1.3.10 ¹⁰	2.5.10 ¹⁰	2.3.10 ¹⁰
	Glicerol (UFC/mL)			
SmR1	1.2.10 ¹⁰	6.6.10 ¹⁰	2.3.10 ¹⁰	7.9.10 ¹⁰
NtrC	5.10 ⁹	4.2.10 ¹⁰	7.10 ⁹	7.6.10 ¹⁰
SmR1.pKRT2	3.4.10 ¹⁰	1.3.10 ¹¹	6.8.10 ¹⁰	9.8.10 ¹⁰
ntrC.pKRT2	1.6.10 ¹⁰	5.6.10 ¹⁰	2.7.10 ¹⁰	8.7.10 ¹⁰

Para avaliarmos se a complementação observada deve-se de fato pela expressão de *ntrC*, as estirpes SmR1, SmR1.pKRT2, *ntrC* e *ntrC.pKRT2*, foram cultivadas em meio NFB-malato 37,5mM com 50 mM de nitrato de sódio. A Figura 15 mostra o perfil de crescimento das estirpes testadas. Após 48 horas de crescimento, verificou-se que as estirpes SmR1, SmR1.pKRT2 e *ntrC.pKRT2* foram capazes de crescer no meio com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Entretanto, não se verificou o crescimento da estirpe *ntrC* não complementada.

Até 72 horas de crescimento, todas as outras estirpes demonstraram um crescimento eficaz utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio, exceto *ntrC* que não cresceu nessa fonte.

Figura 15. Efeito da complementação de *ntrC* no crescimento em NFb-malato com nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.



As culturas foram cultivadas a 30° C e 120 rpm de agitação orbital em meio NFB malato 37,5 mM líquido com alta concentração de fosfatos e cloreto de amônio. Após atingirem a densidade ótica a 595 nm igual a 1, de cada cultura 100µL de meio foram diluídos para 1 ml com em 900 µl de NFB sem fonte de carbono. Posteriormente, 10µL foram retirados dessa amostra e rediluídos seriadamente para a proporção de 1/10 em 6 tubos sequenciais. Em seguida, 10µl de cada amostra foi cultivada em meio NFB-malato contendo 50 mM de nitrato de sódio. Após 48 e 72 horas foi avaliado o perfil de crescimento.

7 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo demonstraram que em *H. seropedicae*, quando cultivados em D-glucose a maior porcentagem de PHB para SmR1 foi aproximadamente 40,35%/psc e para *ntnC* foi próximo a 51,10%/psc. Quando a D-galactose foi usada como fonte de carbono, a estirpe selvagem produziu 34,46% de PHB/psc e a estirpe mutante *ntnC* produziu 41,71% de PHB/psc. O fato destas duas fontes de carbono levarem a produção de PHB muito próximas, nos leva a concluir que possivelmente a D-glucose e a D-galactose possam ser metabolizada da mesma forma. Esses resultados de produção de PHB se assemelham ao estudo de Catalán e colaboradores (2007). Em *H. seropedicae* Z67 usando 20 mM de sulfato de amônio, embora estes autores tenham usado duas vezes mais glucose que no presente estudo (50 mM de glucose), a produção de PHB foi de 36% em relação ao peso seco de células, em 63 horas de crescimento. Isto indica que mais importante do que as concentrações de carbono e nitrogênio disponíveis no meio, é a relação entre elas que dita a condição favorável ou não para o acúmulo de PHB em *H. seropedicae*.

Ao avaliarmos o consumo de D-glucose e D-galactose, verificamos que a produções dos valores de PHB supracitados, ocorreram quando estas estirpes bacterianas já haviam consumido cerca de 23mM dos 25mM de D-glucose e D-galactose inicialmente disponível (Figura 4 e 6. C e D). Esse perfil nos permitiu perceber que embora não ocorra a atividade da fosfofrutoquinase, em *H. seropedicae*, esse aspecto não impede que a via glicolítica ou parte dela seja utilizada. Acredita-se que esse processo ocorre de forma semelhante ao verificado por Chavarría e colaboradores (2012), que deduziram que em *P. putida*, a glucose pode ser transformada em 6P-gluconato e 2-ceto-6-fosfogluconato, que em seguida seguem a via Entner-Doudoroff (ED) ou via das pentoses fosfato. Nesse estudo, verificaram que a maior parte (~96%) da glucose foi metabolizada através da via do ED para piruvato, 4 % do açúcar foi canalizada para os percussores de via das pentoses fosfato e não foram detectados quaisquer sinais de atividade glicolítica por falta da atividade fosfofrutoquinase nesse microrganismo.

A produção de PHB em *H. seropedicae* nesse estudo, quando cultivadas em D-frutose apresentou um perfil diferente dos resultados obtidos em D-glucose e D-galactose, já que foi nesse monossacarídeo onde se verificou a maior produção de PHB (Figura 5 A, B, C e D). A estirpe selvagem SmR1 nessa fonte de carbono produziu cerca de 30,53% de PHB/psc, após ter consumido cerca de 22,3mM dos 25mM de D-frutose inicialmente disponível. A estirpe mutante *ntnC* produziu aproximadamente 65,78% de PHB/psc, após ter consumido 24,1mM da

concentração inicial. Esses resultados são diferentes dos resultados obtidos por Mahmoudi e colaboradores (2010), ao colocarem *Hydrogenophaga pseudoflava* em lotes de fermentação crescendo em 48 horas, usando D-glucose como fonte de carbono, verificaram que esse microrganismo produzia 2,65g de PHB/L, mas em D-frutose nas mesmas condições a produção do polímero foi em torno de 1,6 g de PHB/L. Esses resultados demonstraram também que a D-frutose pode ser mais eficaz como fonte de carbono para produção de PHB em *H. seropedicae*.

A D-xilose foi à única pentose usada neste estudo para se avaliar a produção de PHB (Figura 7 A, B,C e D). Por apresentar cinco átomos de carbono e como se manteve a proporção do número de átomos de carbono, a concentração inicial de D-xilose no meio foi de 30mM. Verificou-se que a máxima produção de PHB na estirpe SmR1 foi de 39,88% do peso seco de células, após ter consumido uma concentração aproximada de 24,7mM de D-xilose. A produção de PHB para *ntnC* foi de 59,77% do peso seco de células, nesse período o consumo de xilose foi de 25,9 mM. Esses resultados se assemelham aos obtidos por Liu e colaboradores (2013), que em *Burkholderia sebácea*, verificaram que quando D-xilose e ácido levulínico eram fornecidos como fonte de carbono a produção de PHB foi de 42%. Além disso, nessas condições *B. sebácea* produziu 56% de PHV (polihidroxivalerato). Uma análise de ressonância magnética nuclear de ¹H, realizada em nosso estudo revelou que o polímero produzido por *H. seropedicae* era constituído exclusivamente por polihidroxibutirato. Ainda, os nossos resultados de produção de PHB diferem dos resultados obtidos por Le Meur e colaboradores (2012), que em *P. putida* KT2440 cultivada em D-xilose onde encontraram o acúmulo máximo de PHA de 12,1% após cerca de 20 h de cultivo. No estudo de Belal (2013), a produção de PHB para *Rhizobium etli* E1 e *Pseudomonas stutzeri* E114 em D-xilose foi de 22,2% e 28,6% do peso seco de células, respectivamente. Acredita-se que em *H. seropedicae* a maior parte da xilose seja metabolizada pela via das pentoses fosfato, embora, a via de Entner Doudoroff também possa ser utilizada, já que existem nesse microrganismo enzimas capazes de realizar tais funções. Apesar das diferenças já citadas referentes ao metabolismo de monossacarídeos, concordamos com Chavarría e colaboradores (2012), que relatam que todas essas fontes convergem para a produção de fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato, tendo como funções gerar não apenas os metabolitos de precursores biossintéticos, como também, NADPH para biossíntese de vários componentes, entre eles PHB, assim como gerar potências redutores para obtenção de energia e para lidar com estresses ambientais e endógenos como o é o caso do estresse oxidativo.

Um dos ácidos carboxílicos usados como fonte de carbono, nesse estudo foi o lactato (Figura 8 A e B), em concentrações de 50mM, cuja produção de PHB não foi muito favorável para a estirpe selvagem de *H. seropedicae* SmR1, já que nessa fonte de carbono produziu-se no

Maximo 22,68% de PHB com 16 horas de crescimento. Esse resultado foi superado pelo mutante *ntrC* que nas mesmas condições produziu 40,47% de PHB no mesmo tempo de crescimento. No estudo de Belal (2013) ao cultivar *R. etli* E1 em lactato, verificou uma produção de PHB de 23,7% do peso seco de células. Ao cultivar *P. stutzeri* E114 a produção foi de 40% de PHB em relação ao peso seco de células.

O malato é um ácido carboxílico frequentemente usado como fonte de carbono para crescimento de *H. seropedicae* em nosso laboratório. Em nosso estudo, o malato foi usado na concentração de 37,5mM (Figura 9 A e B) e a produção máxima de PHB nessa fonte de carbono para a SmR1 foi de 32,36%, e para *ntrC* foi de 42,26% do peso seco de células, ambas as estirpes crescidas em 15 horas. Esses resultados se assemelham ao estudo de Sangkharak e Prasertsan (2008), usando uma cepa bacterianas de *Rhodobacter sphaeroides* ES16 (selvagem) e dois mutantes N20 e U7, cultivadas em meio glutamato-malato com 30g/l de NaCl. Após 48 horas de crescimento, os autores obtiveram para *R. sphaeroides* N20 uma produção de 53,9% de PHB, seguido por *R. sphaeroides* U7 que produziu 42,0% de PHB e a estirpe selvagem de *R. sphaeroides* ES16 produziu apenas 19,5 % da biomassa total.

O succinato foi uma das fontes de carbono, dos ácidos carboxílicos que mais facilmente foi metabolizada pelas estirpes bacterianas usadas (Figura 10 A e B), já que em 14 horas de crescimento, *ntrC* chegou a produzir 50,09% de PHB. Nessa fonte de carbono, a estirpe SmR1 em 17 horas de crescimento produziu 34,79% de PHB nas mesmas condições de cultivo. Esses resultados diferem do estudo de Korotkova e colaboradores (2002), que ao cultivarem *M. extorquens* selvagem AM1 em succinato, verificaram que este microrganismo produziu de 17% a 20% de PHB do peso seco de células.

O citrato foi o ácido carboxílico que promoveu a maior produção de PHB nesse estudo (Figura 11 A e B). Ao ser empregado na concentração de 25 mM, permitiu que o mutante *ntrC* chegasse a produzir até 75,98% de PHB da biomassa seca total, em 18 horas de crescimento. Nas mesmas condições, SmR1 produziu até 47,12% de PHB em 15 horas de crescimento. Embora tendo usado apenas citrato como única fonte de carbono no meio, nossos resultados diferem dos resultados obtidos por Wang e colaboradores (2007) para *Bacillus thuringiensis*, onde verificaram que ao adicionar citrato no meio contendo glucose, após 6 e 12 h de crescimento, começou a aumentar gradualmente a produção de turingiensina atingindo um valor máximo no fim do cultivo de 39,5% para 41%, enquanto a produção de PHB foi significativamente reduzida de 45% para 31%. Este resultado os levou a sugerir que a adição de citrato diminuiria a atividade

da piruvato quinase (PK), reduzindo o fluxo da via glicolítica, a produção de piruvato e do conteúdo de PHB.

Por último decidimos testar a produção de PHB em ácidos graxos, entretanto não foi possível devido ao fato de que em quase todas as fontes testadas esperávamos ter o mesmo número de átomos de carbono e, devido a insolubilidade destes compostos não seria possível controlar exatamente a quantidade de ácidos graxos capazes de serem assimilados pela bactéria. Decidiu-se então testar apenas o glicerol que é um composto orgânico de fácil obtenção, baixo custo e solúvel em água na concentração de 50 mM (Figura 12 A e B). Além do fato de que em alguns estudos esse composto já havia sido testado e apresentou resultados relevantes quanto a produção do polímero. Quando testado, o glicerol se revelou a melhor fonte de carbono para produção de PHB em *H. seropedicae*. Tanto a estirpe selvagem SmR1 que chegou a produzir 74,41% do peso seco de células, quanto o mutante *ntrC* que produziu 78,09% do peso seco de células. Um dos problemas observados para a produção de PHB utilizando glicerol foi o tempo de crescimento, já que a estirpe SmR1 levou cerca de 50 horas para atingir tal produção e, o mutante *ntrC* levou cerca de 60 horas para atingir esses valores de PHB. Nossos resultados foram semelhantes aos resultados do estudo de ZHU e colaboradores (2010), que verificaram em *B. sebácea* o rendimento de biomassa seca foi de 5,8 g/L, e que 81,9% dessa biomassa era PHB.

O perfil de pH nos meios de cultivo testados variou de acordo com a fonte de carbono utilizada (Figura 13). Em ácidos carboxílicos, o pH inicial de 6,8 aumentou para 8,3 com 20 horas de crescimento para todos os ácidos empregados. Esse perfil foi semelhante quando o glicerol foi usado como fonte de carbono. Entretanto, quando a fonte de carbono foi trocada para monossacarídeos o perfil de pH passou do valor inicial de 6,8 para 4,4, em 20 horas de crescimento. A queda no pH foi registrada tanto para SmR1 quanto para *ntrC*, em todos os açúcares testados. Sangkharak e Prasertsan (2008) usando uma cepa selvagem e duas cepas bacterianas mutantes de *Rhodobacter sphaeroides*, em glutamato-malato, verificaram que os valores de pH passaram de 7,00 para 8,25 com 60 horas de cultivo. Li e Fang (2008) verificaram um perfil semelhante para *Rubrivivax gelatinosus* que apresentou uma variação de pH inicial de 7,1 para 7,14 em lactato e de 7,2 para 7,7 em malato, mas quando usaram glucose como fonte de carbono o pH diminuiu de 7,1 para 5,4.

Durante a realização dos experimentos, percebeu-se que a maior produção de PHB em todas as fontes de carbono ocorreu quando a concentração inicial de cloreto de amônio era de 5mM e, normalmente, a maior produção do polímero se dava quando as concentrações de cloreto de amônio meio eram extremamente baixas (Figuras de 4 a 7 E e F e de 8 a 12 C e D). Estes

resultados corroboram com Liu e colaboradores (2013) que verificaram que a medida que se aumentava a relação carbono/nitrogênio com decréscimo de cloreto de amônio 20 para 10 mM, se aumentava a síntese de PHA de 18 % para 64,2 % do peso seco de células, levando-os a descobrir que baixas concentrações de amônio são vantajosas para a síntese PHB. Acreditamos também que a forma como a fonte de carbono é metabolizada pode ter influência na forma como o cloreto de amônio é consumido. Durante a pesquisa verificamos que quando a concentração inicial de cloreto de amônio fora de 20 mM, a maior produção de PHB tanto na estirpe *ntrC* quanto na estirpe SmR1 ocorria quando as concentrações de amônio no meio estavam abaixo de 5mM, ou seja, quando esses microrganismo já tinham consumido cerca de 75% da concentração inicial de cloreto de amônio, independentemente do tempo de crescimento. Esses dados já haviam sido relatados por Catalán e colaboradores (2007) que verificaram que quantidades significativas de PHB não se acumularam até que a bactéria entrasse na fase estacionária de crescimento, sendo que após 63 h de crescimento, dos 50 mM de glucose inicial, a glucose já não podia mais ser detectada no meio. Entretanto, da concentração inicial de 20 mM de sulfato de amônio, a concentração restante era de 4,5 mM. Para Sun e colaboradores (2000), os mutantes *ntrA* (*rpoN*), *ntrBC*, e *ntrC* de *A. brasilense* Sp7 foram cultivados em meio contendo malato em diferentes relações iniciais de C/N. Em baixa relação C/N (equivalente a 6,84), a estirpe selvagem Sp7 e o mutante *rpoN* de *A. brasilense* não produziram PHB, entretanto os mutantes *ntrBC* e *ntrC* produziram 30 e 20% de PHB por peso seco de biomassa, respectivamente. Estes resultados demonstram que a mutação em *ntrC* desacopla a produção de PHB dos níveis de nitrogênio no meio (SUN et al., 2000). Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram que o gene *ntrC* quando mutado em *H. seropedicae* levou a um perfil de produção de PHB semelhante ao observado para o mutante *ntrC* em *A. brasilense*.

Um aspecto interessante no presente estudo foi que o maior peso seco de células não representou a maior produção de PHB, maior densidade ótica ou maior tempo de crescimento, esse dado sugere que o peso seco de células pode estar relacionado com o numero de células crescidas ou tamanho dos grânulos em cada célula presente no meio, mas essas células podem estar vivas viáveis para o crescimento caso reinoculadas ou mortas mantendo intacto o polímero após roptura da membrana plasmática, o estudo realizado por Belal (2013) em *Rhizobium elti* E1 cultivada em extrato de manitol, percebeu que em 24, 48 e 72 horas de crescimento, a biomassa desse microrganismo era 2,9 g/L, 4,9g/L e 4,5g/L respectivamente, mas a produção de PHB era de 5,7%, 69,4% e 48% nas mesmas condições e tempo de crescimento. Quando a bactéria cultivada foi *Pseudomonas stutzeri* E114, os valores de biomassa foram de 3g/L, 5,3g/L e 4,4g/L e de PHB foram de 53,2%, 69,8 e 47,7%, respectivamente, esses dados também sugeriram que a

biomassa não está diretamente relacionado com a produção de PHB, mas sim a fase de crescimento do microrganismo, nestes dois estudos percebeu-se que havia um efeito do PHB do meio que a medida que subia de 6 para valores próximos a 8, o polímero de PHB começava a ser metabolizado e o percentual caiu de 64% para 33,3% e de 65,5% para 35,7% para cada uma das estirpes respectivamente.

Durante todos os experimentos desse estudo, a produção de PHB no mutante *ntrC* de *H. seropedicae* foi superior a estirpe selvagem SmR1, independentemente da condição e da fonte de carbono utilizada. De modo geral, a estirpe *ntrC* produziu quantidades de PHB de 20% a 100% superiores a estirpe selvagem. O mutante *ntrC* de *A. brasilense* se mostrou eficaz para a produção do polímero. SUN e colaboradores (2000) verificaram que em *A. brasilense* Sp7, cultivado em meio contendo 10 g de malato e 1,35 g de NH₄Cl por litro, nas primeiras horas de crescimento a estirpe selvagem não produziu PHB, mas o mutante *ntrC* já tinha iniciado o acúmulo de PHB. A produção de PHB nesses mutantes ainda continuou ativa mesmo na fase estacionária de crescimento, chegando a 40 e 22 % de PHB nos mutantes *ntrBC* e *ntrC*, respectivamente. Este resultado indica que direta ou indiretamente os genes *ntrB* e *ntrC* estão envolvidos com a produção de PHB em *A. brasilense*. Este trabalho de Mestrado corrobora os dados obtidos por Sun e colaboradores (2000) em outro modelo experimental (*H. seropedicae*), reforçando que de fato o produto dos genes *ntrBC* estão envolvidos com o metabolismo de PHB.

Para verificarmos se a reversão da mutação no gene *ntrC* poderia também reverter a maior produção de PHB no mutante *ntrC* de *H. seropedicae*, decidiu-se realizar a complementação desse mutante inserindo o plasmídeo pKRT2 (que expressa o operon *glnAntrBntrC*). Como controle inserimos o plasmídeo pLAFR3.18 nas estirpes selvagem SmR1 e no mutante *ntrC* para verificar se a presença do plasmídeo na célula provocaria algum efeito na produção de PHB. Como os resultados da Figura 14 A, B, C e D apontaram, a expressão do operon *glnAntrBntrC* no mutante *ntrC* foi capaz de reduzir a produção de PHB no mutante, mostrando que a presença de NtrC inibe o acúmulo do polímero. Este efeito pôde ser observado em duas condições distintas, tanto no meio NFb-malato, quanto no meio NFb-glucose, mostrando que o efeito independe do tipo de fonte de carbono metabolizada.

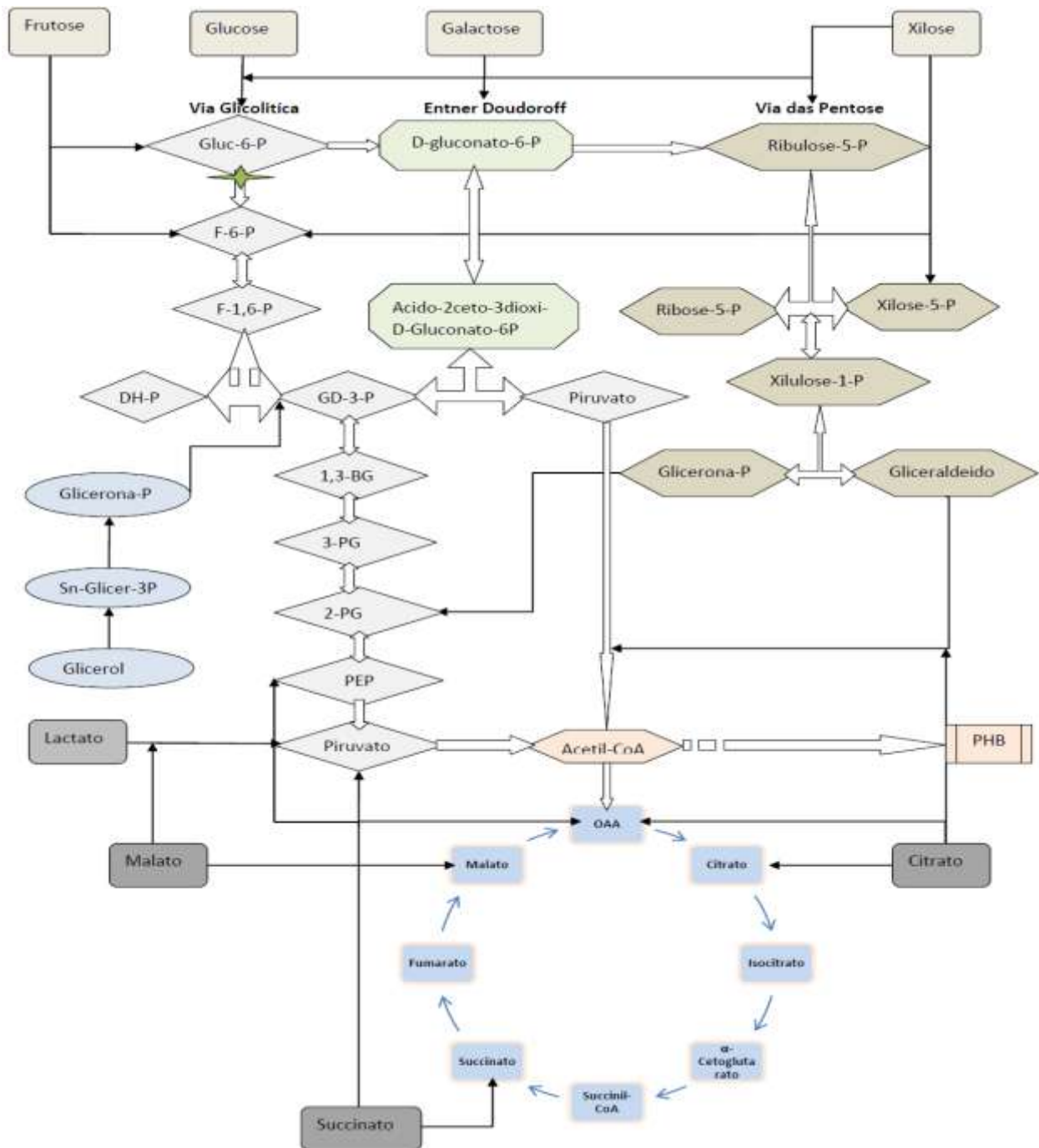
8 CONCLUSÕES

Após a realização do estudo concluímos que a produção de PHB em *Herbaspirillum seropedicae* é maior quando usamos como única fonte de carbono um monossacarídeo do que ácidos carboxílicos. A única exceção foi o citrato que demonstrou ser uma fonte de carbono eficaz para a produção desse polímero, depois do glicerol que apresentou ser a melhor fonte de carbono para a síntese de PHB, mas apresenta a desvantagem de levar muito tempo para ser metabolizado. Independentemente de todos os fatos descritos, a maior produção certamente ocorre pela forma como a fonte de carbono é metabolizada e o seu rendimento em acetil-CoA, seu rendimento energético e de cofatores que favorecem a produção de PHB.

As baixas concentrações de amônio favorecem a produção de PHB, principalmente em condições e períodos em que as concentrações de amônio se encontram abaixo de valores detectáveis no meio, ou o consumo de amônio já tenha atingido 75% da concentração inicial de amônio inicial. Este acontecimento talvez esteja relacionado com fato de que em baixas concentrações de amônio a célula diminui o seu crescimento e prioriza o armazenamento de fontes energéticas.

A mutação no gene *ntrC* favorece a síntese de PHB, embora que em alguns dos resultados apresentados neste trabalho, houvesse a percepção que a estirpe selvagem de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 produziu concentrações próximas ou semelhantes ao seu mutante *ntrC*. Quando essas estirpes foram verificadas por períodos de crescimentos específicos e densidade ótica, em casos comparativos, o mutante *ntrC* resultou produzir até duas vezes mais PHB do que a estirpe selvagem. Uma das possibilidades que justificaria tal fenótipo é a baixa atividade biossintética da glutamina síntese, o que favoreceria a disponibilidade de α -cetoglutarato no ciclo de Krebs. O fenótipo de maior produção de PHB pelo mutante *ntrC* de *Herbaspirillum seropedicae* é revertido quando este é complementado com uma cópia selvagem do operon *glnAntrBntrC*. A complementação reverte também sua dificuldade de crescer em NFB-malato contendo nitrato de sódio como única fonte de nitrogênio.

HIPÓTESE PARA BIODISSÍNTESE DE PHB EM NOSSO ESTUDO



A hipótese acima foi produzida a partir de dados e esquemas descritos no KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) e outras rotas metabólicas já descritas, se qualquer um dos monossacarídeos usados nesse estudo (D-glucose, D-galactose, D-frutose e D-xilose) for metabolizada na via de Entner Doudoroff, para cada molécula consumida a produção total de equivalentes redutores é de 1NADPH, 1NADH e 2ATP e duas moléculas de piruvato com consumo de 1ATP. Se a D-frutose for metabolizada diretamente na via glicolítica, ou seja,

Embden-Mayerhof a produção de equivalentes reduzidos é de 1NADPH, 2NADH, 4ATP e duas moléculas de piruvato com consumo de 1ATP, o mesmo acontece se a D-xilose for convertida em D-frutose, que é possível via metabólica da D-xilose descrita no genoma de *H. seropedicae*. Em caso de uma das hexoses utilizadas no estudo (D-glucose, D-galactose e D-frutose) for metabolizadas na via das pentoses a produção de equivalentes reduzidos é de 2NADPH, 2NADH, 4ATP e duas moléculas de piruvato com consumo de 1ATP. Cada molécula de piruvato pode ser convertida em acetil-CoA, com a produção de 1NADH. Ao entrar no ciclo de Krebs, cada molécula acetil-CoA a produção de equivalentes reduzidos é de 3NADH, 1FADH e 1GTP e para cada molécula dos monossacarídeos usados nesse estudo, a produção desses equivalentes reduzidos é duas vezes mais.

Para os monossacarídeos usados no presente estudo, ao serem metabolizados por uma via anfibólica normal, se uma molécula de ácido láctico for consumido para a formação de uma molécula de acetil-CoA, haverá formação de 2NADH. Se uma molécula de malato for metabolizado para a formação de acetil-CoA a produção de equivalentes redutores é de 1NADPH e 1NADH. Caso uma molécula de succinato sofrer metabolização forma o acetato produz 2NADH e o acetato é convertido em duas moléculas de acetil-CoA com a produção de 1ATP. O citrato ao ser usado como fonte de carbono forma uma molécula de acetil-CoA e um oxaloacetato que forma fosfoenolpiruvato (PEP) que leva a produção de 1ATP e 1NADH até ser convertido em acetil-CoA, o citrato também pode participar da biossíntese de ácidos graxos que posteriormente são metabolizados na β -oxidação. Cada molécula de acetil-CoA produzido pelas fontes supracitadas, ao entrarem no ciclo de Krebs formam 3NADH, 1FADH e 1GTP. Esses compostos podem também simplesmente entrar para ao ciclo de Krebs pela via anaplorótica, nesse caso uma molécula de malato formará o oxaloacetato que depois de associado ao acetil-CoA pode formar 3NADH, 1FADH e 1GTP, se o composto for succinato formará 1FADH e 1NADH, até ser convertido a oxaloacetato que se associará ao acetil-CoA para formar Citrato iniciando o ciclo com a produção de 3NADH, 1FADH e 1GTP, caso a fonte for citrato haverá formação de 3NADH, 1FADH e 1GTP, que posteriormente será convertido em oxaloacetato, que associado ao acetil-CoA recomeça o ciclo com formação de 3NADH, 1FADH e 1GTP.

A metabolização do glicerol pode ocorrer através da sua conversão em gliceraldeído-3P com a produção de 1NADH, o gliceraldeído-3P até ser convertido a piruvato produz 1NADH e 2ATP, que posteriormente ao ser convertido a acetil-CoA produz 1NADH. A metabolização do acetil-CoA no ciclo de Krebs permite a produz 3NADH, 1FADH e 1GTP. O glicerol pode também participar na produção de glicerofosfolípidos, glicerolípidos ou ácidos graxos no interior

da célula que posteriormente quando metabolizado pela via de β -oxidação permite a formação de vários equivalentes redutores como FADH e NADH e acetil-CoA.

Todos os aspectos supracitados sugerem formação de acetil-CoA e equivalentes reduzidos que são essências em *Herbaspirillum Seropedicae* na formação PHB, esse fato é importante porque muitos desses redutores ao serem formados em grandes quantidades podem induzir ao bloqueio do ciclo de Krebs, como é o caso de ATP e NADH que inibe a citrato sintase, NADPH, NADH e ATP inibem a ação da isocitrato desidrogenase, estes aspectos induzem o acúmulo de acetil-CoA e NADPH fora do ciclo de Krebs e permite sua capitalização para a produção de PHB.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, A. J; DAWES, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. v. 54, p. 450–472.
- ARCONDEGUY T, JACK R, MERRICK M. 2001. P (II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol Reviews*.65:80-105.
- ATLAS, R.M. 1993. Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. third ed., pp. 39–43.
- BABEL, W., ACKERMANN J. U., BREUER, U. 2001. Physiology, Regulation, and Limits of the Synthesis of Poly(3HB). *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Breuer Vol. 71. Managing Editor: Th. Scheper © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- BALDANI, V. L. D. ; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol Fert Soils* 30: 485–491.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. 1992. Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis*. 13: 65-73.
- BARBOSA, LUIZ CLÁUDIO DE ALMEIDA. Introdução à química orgânica. São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- BELAL, E. B. 2013. Production of Poly-β-Hydroxybutyric Acid (PHB) by *Rhizobium elti* and *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Biological Sciences*. 5(6): 273-284. ISSN: 2041-076X, e-ISSN: 2041-0778.
- BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O. C.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, v. 174, p. 195-209.
- BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. 1978. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-β-hydroxybutyric acid in bacterial biomass. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 6: 29–37.
- BOHMERT, KAREN; BALBO, ILSE; STEINBUCHER, ALEXANDER; TISCHENDORF, GILBERT AND WILLMITZER, LOTHAR. 2002. Constitutive expression of the β-ketothiolase gene in transgenic plants. A major obstacle for obtaining polyhydroxybutyrate-producing plants. *Plant Physiology*. vol. 128, no. 4, p. 1282-1290.

- CATALÁN, A. I., F. FERREIRA, P. R. GILL, S. BATISTA. 2007. Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the lacZlacY genes. *Enzyme Microb Tech.* 40:1352-1357.
- LIU, CHANGLI. WANG, HAIBIAO. XING, WENHUI. WEI, LI. 2013. Composition diversity and nutrition conditions for accumulation of polyhydroxyalkanoate (PHA) in a bacterial community from activated sludge. *Appl Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s00253-013-5165-6.
- CHAVARRÍA M., KLEIJN, R.J., SAUER U. 2012. Regulatory Tasks of the Phosphoenolpyruvate-Phosphotransferase System of *Pseudomonas putida* in Central Carbon Metabolism. *mBio.* 3(2): doi:10.1128/mBio.00028-12.
- CHOHAN, S. N., L. COPELAND. 1998. Acetoacetyl coenzyme A reductase and polyhydroxybutyrate synthesis in rhizobium (*Cicer*) sp. Strain CC 1192. *Appl Environ Microbiol.* 64:2859-2863.
- CHUBATSU L.S., MONTEIRO R.A., SOUZA, E.M., OLIVEIRA, M.A.S., YATES, M.G., WASSEM, R., BONATTO, A.C., HUERGO, L.F., STEFFENS, M.B.R., RIGO, L.U., PEDROSA, F.O. 2012. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil.* 356: 197-207.
- CHUNG YJ, CHA HJ, YEO JS, YOO YJ. 1997. Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation. *J Ferment Bioeng*, 83:492-495.
- COLLINS, PETER M. *Dictionary of carbohydrates.* CRC Press, 2005, 1282 p. (ISBN 0849338298), p. 584-986.
- DAWES E. 1990. *Novel Biodegradable Microbial Polymers.* Kluwer Academic Publishers.
- Da SILVA L. G., MIGUENS F. C., OLIVARES F. L. 2003. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic Interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Brazilian Journal of Microbiology.* 34 (Suppl.1):69-71 ISSN 1517-8382.
- De KONING, G.J.M., WITHOLT, B., 1997. A process for the recovery of poly (3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 1. Solubilization. *Bioprocess Eng.* 17, 7–13.
- DOI, Y. 1995. Microbial synthesis, physical properties, and biodegradability of polyhydroxyalkanoates. *Macromol. Symp.* 98:585–599.

- FOSTER, L.J.R., LENZ, R.W., FULLER, R.C. 1994. Quantitative determination of intracellular depolymerase activity in *Pseudomonas oleovorans* inclusions containing poly-3-hydroxyalkanoates with long alkyl substituents. *FEMS Microbiol. Lett.* 118, 279–282.
- HATTI-KAUL, R., U. TORNVALL, L. GUSTAFSSON, P. BORJESSON. 2007. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals--a cradle-to-grave perspective. *Trends Biotechnol.* 25:119-124.
- HUIJBERTS, G. N. M., VAN DER WAL, H., WILKINSON, C.; EGGINK, G. 1994. Gas-chromatographic analysis of poly(3-hydroxyalkanoates) in bacteria. *Biotechnology Techniques.* 8: 187-192.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Recommendations on organic & biochemical nomenclature, symbols & terminology etc. Londres: IUPAC, 2005. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/>>. Acesso em: 30 Abril. 214.
- JAMES, E. K., P. GYANESHWAR, P. N. MATHAN, W. L. BARRAQUIO, P. M. REDDY, P. P. IANNETTA, F. L. OLIVARES; J. K. LADHA. 2002. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interact.* v. 15, p. 894–906.
- JAMES, E. K., OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* v.17, p.77-119, 1998.
- JAVELLE, A. EMMANUELE S., THORNTON, J. MERRICK, M. 2004. Ammonium Sensing in *Escherichia coli*. Role of the ammonium transporter AmtB and AmtB-GlnK complex formation. *J. Biol. Chem.* v. 279, p. 8530-8538.
- JIANG, P. PELISKA J.A. NINFA A.J. 1998. The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: Role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylation state. *Biochemistry.* 37: 12802–12810.
- JOHNSTONE, B. 1990. A throw away answer. *Far Eastern Econ. Rev.* 147 (6), 62–63.
- KALIA, V.C., RAIZADA, N., SONAKYA, V. 2000. *Bioplastics. Jornal Sciences. Ind. Res.* 59, 433–445.
- KADOWAKI, M. A. S; MULLER-SANTOS, M; REGO, F. G. M; SOUZA, E. S; YATES, M. G; MONTEIRO, R. A; PEDROSA, F. O; CHUBATSU, L. S; STEFFENS, M. B. R. 2011.

- Identification and characterization of PhbF: A DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1. **BMC Microbiology**. v. 11, p. 1-9.
- KESHAVARZ, T., I. ROY. 2010. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Curr Opin Microbiol**. 13:321-326.
- KUCHTA, K.; CHI, L.; FUCHS, H.; PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. 2007. Studies on the Influence of Phasins on Accumulation and Degradation of PHB and Nanostructure of PHB Granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Biomacromolecules**. v. 8, p. 657-662.
- LEHNINGER, A. Bioquímica. São Paulo: Edgar Blucher, 1976, p. 487.
- LEE, S. Y. Bacterial Polyhydroxyalkanoates. 1996. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 49, p. 1-14a.
- LEE, S.Y., 1996. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoates production in bacteria. **TIBTECH**. 14, 431–438b.
- LE MEUR, S. ZINN Z. EGLI T. THÖNY-MEYER, L. REN, Q. 2012. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by sequential feeding of xylose and octanoic acid in engineered *Pseudomonas putida* KT2440. **BMC Biotechnology**. doi:10.1186/1472-6750-12-53.
- LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. 1992. Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. **FEMS Microbiological Letters**. v. 99, p. 227–232.
- LU, X.-Y, WU, Q., ZHANG, W.-J., ZHANG, G. & CHEN, G.-Q. 2004. **Biotechnol. Prog.** 20, 1332–1336.
- MACHADO, H.B., YATES, M.G., FUNAYAMA, L.U., RIGO, L.U., STEFFENS, M.B.R., SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O. 1995. The ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* are part of a nifR3-like-ntrB-ntrC operon and are negatively regulated. **Can. J. Microbiol.** 41, 674-684.
- MAEHARA, A.; DOI, Y.; NISHIYAMA, T.; TAKAGI, Y.; UEDA, S.; NAKANO, H.; YAMANE, T. 2001. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans* phaP expression in vitro. **FEMS Microbiology Letters**. v. 200, p. 9-15.
- MADISON, L. L., G. W. HUISMAN. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiol Mol Biol Rev.** 63:21-53.

- MAGALHÃES CRUZ, L. et al. 2001. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Ananas comosus (L.) Merrill*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 5, p. 2375-9.
- MAHMOUDI M., SHARIFZADEH BAEI M., NAJAFPOUR G.D., TABANDEH F., EISAZADEH H. 2010. Kinetic model for polyhydroxybutyrate (PHB) production by *Hydrogenophaga pseudoflava* and verification of growth conditions. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(21), pp. 3151-3157. ISSN 1684-5315.
- MATSUMOTO, K.; MATSUSAKI, H.; TAGUCHI, K.; SEKI, M.; DOI, Y. 2002. Isolation and characterization of polyhydroxyalkanoates inclusions and their associated proteins in *Pseudomonas sp* 61-3. *Biomacromolecules* v. 3, p. 787-792.
- MERRICK, J.M., DOUDOROFF, M. 1964. Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system. *J. Bacteriol.* 88, 60-71.
- MERRICK, M. J. EDWARDS, R. A. 1995. Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiological Reviews*. v. 59, p. 604-622.
- MILLER J. H. 1972. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- KOROTKOVA, N. CHISTOSERDOVA, L. LIDSTROM, M.E. 2002. Poly-Hydroxybutyrate Biosynthesis in the Facultative Methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1: Identification and Mutation of *gap11*, *gap20*, and *phaR*. *Journal of Bacteriology*. DOI: 10.1128/JBA.184.22.6174-6181.2002. p. 6174-6181.
- NINFA, A.J. JIANG, P. 2005. PII signal transduction proteins: sensors of alpha-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol.* 8:168-173.
- OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of gramineae. *Biol. Fertil. Soils*. v. 21, p. 197-200.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, JI. 2002. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*. v. 242, p. 205-215.

- PEDROSA, F. O.; MONTEIRO, R. A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.; AYUB, R. A.; COLAUTO, N. B.; FERNANDEZ, M. A.; FUNGARO, M. H.; GRISARD, E. C.; HUNGRIA, M.; et al. 2011. : Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genetics*. v. 7, p. 1-10.
- PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. 1984. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr* (*gln*) type gene products. *FEMS Microbiology Letters*. 23: 95-101.
- PEEKHAUS, N., T. CONWAY. 1998. What's for dinner?: Entner-Doudoroff metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriolog* 180:3495-3502.
- PERSUHN, D. C.; SOUZA, E. M.; STEFFENS, M. B. R.; PEDROSA, F. O.; YATES, M. G.; RIGO, L. U. 2000. The transcriptional activator NtrC controls the expression and activity of glutamine synthetase in *Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS Microbiology Letters*. 192: 217-221.
- PIOSZAK, A. A., P. JIANG, A. J. NINFA. 2000. The *Escherichia coli* PII signal transduction protein regulates the activities of the two-component system transmitter protein NRII by direct interaction with the kinase domain of the transmitter module. *Biochemistry*. 39:13450-13461.
- PÖTTER, M.; MULLER, H.; REINECKE, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDERICH, B.; STEINBÜCHEL, A. 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*. v. 150, p. 2301-2311.
- PÖTTER, M.; STEINBÜCHEL, A. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: Impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) Synthesis and Degradation. *Biomacromolecules*. v. 6, p. 552-560.
- REDDY, C. S., R. GHAI, RASHMI, V. C. KALIA. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol*. 87:137-146.
- REHM, B. H. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol*. 8:578-592.
- RONCATO-MACCARI, L. D. B.; RAMOS, H. J. O.; PEDROSA, F. O.; ALQUINI, Y.; CHUBATSU, L. S.; YATES, M. G.; RIGO, L. U.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. *FEMS Microbiology Ecology*. v. 45, p. 39-47.

- LI, RU YING. FANG, HERBERT H.P. 2008. Hydrogen production characteristics of photoheterotrophic *Rubrivivax gelatinosus* L31. *International journal of hydrogen energy*. 33 974 – 980
- SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C.; SAITO, T. 2001. Cloning of an intracellular poly[D (-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *J Bacteriol*; 183: 94–100.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SANGKHARAK, K. AND PRASERTSAN, P. 2008. Nutrient optimization for production of polyhydroxybutyrate from halotolerant photosynthetic bacteria cultivated under aerobic-dark condition. *Electronic Journal of Biotechnology*. ISSN: 0717-3458.
- SCHLEGEL, H.G., GOTTSCHALK, G., VON BARTHA, R. 1961. Formation and utilization of poly-beta-hydroxybutyric acid by Knallgas bacteria (*Hydrogenomonas*). *Nature*. 191, 463-465.
- SHANG L, JIANGM, CHANG HN. 2003. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in fed-batch culture of *Ralstonia eutropha* with phosphate limitation under different glucose concentrations. *Biotechnol Lett*. 25:1415-1419.
- SIMON, R.; PRIEFFER, U.; PUHLER, A. 1983. A broad host range mobilization system for in vitro genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *BioTechnology*. v. 1, p. 784-791.
- SONG, H., J. Y. XIN, Y. X. ZHANG, W. B. KONG, C. G. XIA. 2011. Poly-3-hydroxybutyrate production from methanol by *Methylosinus trichosporium* IMV3011 in the non-sterilized fed-batch fermentation. *Afr J Microbiol Res*. 5:5022-5029.
- SOUZA, E.M., PEDROSA, F.O., RIGO, L.U., MACHADO, H.B. AND YATES, .G. 2000. Expression of the *nifA* gene of *Herbaspirillum seropedicae*: role of the NtrC and NifA binding sites and the 324/312 promoter. *Microbiology*. 146, 1407-1418.
- STEINBUCHER, A., S. HEIN. 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 71:81-123.
- STUBBE, J.; TIAN, J. 2003. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of the PHA synthase. *Natural Product Reports*. v. 20, p. 445–457.

SUN, J., PENG, X., IMPE J. V., VANDERLEYDEN, J. 2000. The ntrB and ntrC Genes Are Involved in the Regulation of Poly-3-Hydroxybutyrate Biosynthesis by Ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 66, No. 1. p. 113–117.

SUN, J., A. VAN DOMMELEN, J. VAN IMPE, J. VANDERLEYDEN. 2002. Involvement of glnB, glnZ, and glnD genes in the regulation of poly-3-hydroxybutyrate biosynthesis by ammonia in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Appl Environ Microbiol.* 68:985-988.

SUN Z, RAMSAY JA, GUAY M, RAMSAY B. 2007. Increasing the yield of MCL-PHA from nonanoic acid by co-feeding glucose during the PHA accumulation stage in two-stage fed-batch fermentations of *Pseudomonas putida* KT2440. *J Biotechnol.* 132:280-282.

TOMBOLINI, R., S. POVOLO, A. BUSON, A. SQUARTINI, AND M. P. NUTI. 1995. Polyhydroxybutyrate (PHB) biosynthetic genes in *Rhizobium meliloti* 41. *Microbiology* 141:2553–2559.

TYO, K. E., C. R. FISCHER, F. SIMEON, G. STEPHANOPOULOS. 2010. Analysis of polyhydroxybutyrate flux limitations by systematic genetic and metabolic perturbations. *Metab Eng.* 2:187-195.

WANG, C., M. SALDANHA, X. SHENG, K. J. SHELSWELL, K. T. WALSH, B. W. S. SOBRAL, AND T. C. CHARLES. 2007. Roles of poly-3-hydroxybutyrate (PHB) and glycogen in symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* with *Medicago* sp. *Microbiology.* 153:388–398.

WOOD, T.M. AND K.M. BHAT. 1988. Methods of measuring cellulase activities. *Method Enzymol.* 160: 87-112.

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

U.S. Food and Drug Administration. FDA Advises Manufacturers to Test Glycerin for Possible Contamination. Available in: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/default.htm>. Accessed on April 28, 2014.

ZHI WANG, SHOUWEN CHEN, MING SUN, ZINIU YU. 2007. A fundamental dual regulatory role of citrate on the biosyntheses of thuringiensin and poly-b-hydroxybutyrate in

Bacillus thuringiensis YBT-032. *National Engineering Research Center for Microbial Biotechnology Letters* - Vol. 29 - Issue 5. pp. 779-784.

ZHU, C., NOMURA,C.T., PERROTTA, J.A., STIPANOVICJAMES NAKAS, A.J. P. 2010. Production and Characterization of Poly-3-hydroxybutyrate From Biodiesel-Glycerol by *Burkholderia cepacia* ATCC 17759. *Biotechnol. Prog.*, Vol. 26, No. 2. DOI 10.1002/btpr.355.