EDSON YU SIN KIM

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE ENGENHARIA METABÓLICA EM *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 PARA AUMENTO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO

CURITIBA

2016

EDSON YU SIN KIM

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE ENGENHARIA METABÓLICA EM *Herbaspirillum seropedicae* Smr1 PARA AUMENTO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO

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

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

EDSON YU SIN KIM

APLICAÇÃO DE FERRAMENTAS DE ENGENHARIA METABÓLICA EM Herbaspirillum seropedicae SmR1 PARA AUMENTO NA PRODUÇÃO DE POLIHIDROXIBUTIRATO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no curso de Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Muller dos Santos - Orientador
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof. Dr. Wanderson Duarte da Rocha
Departamento de Bioquímica, UFPR

Prof.ª Dr.ª Ana Claudia Bonatto
Departamento de Genética, UFPR

Curitiba, 29 de setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço o Professor Marcelo Muller dos Santos pela orientação e paciência e por ter contribuído de forma imensa com minha formação cientifica.

Aos meus colegas do departamento de bioquímica e principalmente do núcleo de fixação de nitrogênio.

A meus companheiros de bancada do laboratório do Anexo pela paciência e por ter me ensinado tanto nesses dois anos de trabalho. Em especial agradeço a Tayná Falquievicz de Lima, Francisco Jose Teles Mota e ao pós-doutorando Marcelo Bueno Batista pelo companheirismo diário, e ao Luis Paulo Silveira Alves por compartilhar sua experiência.

A meus pais e irmã e a Érica de Oliveira Gomes pelo apoio emocional indispensável em minha vida.

A coordenação do programa de Pós-graduação em Bioquímica e aos demais professores do departamento de Bioquímica.

A CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS i

SUMÁRIO ii

LISTA DE FIGURAS vi

LISTA DE TABELAS viii

LISTA DE ABREVIATURAS ix

RESUMO x

ABSTRACT xi

1. INTRODUÇÃO 1

1.1. Polihidroxialcanoatos como alternativas aos plásticos de origem petroquímica 1

1.2 *Herbaspirillum seropedicae* e sua aplicação para a produção de PHB 3

1.3 Características do metabolismo de carboidratos em *H. seropedicae* SmR1 5

1.4 Polihidroxialcanoatos: Biossíntese, degradação e aplicações 9

1.4.1 Biossíntese e degradação 9

1.4.2 Aplicações 12

1.5 Engenharia metabólica 13

1.5.1 Definição e aplicações 13

1.5.2 Engenharia de cofator NADPH 14

1.5.2.1 A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase de *Escherichia coli* 17

1.5.2.2 A gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase de *Synechococcus elongatus* 18

1.5.2.3 Seleção de promotores para a expressão dos genes gnd e gap2 em *H. seropedicae* 20

2. OBJETIVOS 24

2.1 Objetivos gerais 24

2.2 Objetivos específicos 24
3. MATERIAIS E MÉTODOS 25
3.1 Bactérias e plasmídeos 25
3.2 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias 29
3.3 Antibióticos 30
3.4 Curvas de crescimento 31
3.5 Métodos de manipulação do DNA 31
3.5.1 Extração e purificação de DNA genômico 31
3.5.2 Purificação de DNA por adsorção em sílica 32
3.5.3 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) 33
3.5.4 Clonagem 33
3.5.5 Miniprep plasmidial 39
3.5.6 Sequenciamento de DNA 39
3.5.7 Clivagem de DNA com enzimas de restrição 39
3.5.8 Ligação de DNA ao vetor 40
3.5.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose 40
3.6 Transformação e preparo de células quimiocompetentes 40
3.7 Lise celular para ensaios de atividade 41
3.8 Conjugação bacteriana biparental 41
3.9 Dosagem de proteínas 42
3.10 Dosagem de açúcares redutores 42
3.11 Dosagem de PHB 42
3.11.1 Metanólise ácida e cromatografia gasosa 42
3.11.2 Citometria de fluxo com sonda fluorescente Vermelho Nilo 43
3.12 Dosagem de NADPH/$NADP^+$ 44

3.13 Medida de ROS 44
3.14 Ensaio de atividade enzimática 45
3.14.1 Atividade 6PGDH 45
3.15 Experimento de evolução induzida 45
3.16 Sequenciamento genômico de mutantes e análise de dados 45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47
4.1 Caracterização fenotípica das estirpes recombinantes de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 47
4.1.1 Curvas de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 47
4.1.1.1 Estirpes recombinantes portando o gene *gnd* de *E. coli* MG1655 47
4.1.1.2 Estirpes recombinantes portando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942 52
4.2 Determinação da atividade enzimática 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) 56
4.3 Perfil de expressão de fusões transcricionais com gene repórter GFP 57
4.3.1 Determinação da produção de PHB nas estirpes recombinantes expressando *gnd* ou *gap2* 59
4.3.1.1 *Screening* por citometria de fluxo 59
4.4 Experimento de evolução induzida 63
4.5 Sequenciamento do genoma da estirpe EK04 69
4.6 Avaliação de estresse oxidativo pela medida de espécies reativas de oxigênio (ROS) 72
4.7 Perfil da produção de PHB medido por metanólise e cromatografia gasosa ... 74
4.8 Dosagem da relação NADPH/$NADP^+$ 76
4.9 Utilização de promotor induzível para expressão de *gnd* 77

Fusão transcricional do promotor induzível com GFP 77

5. CONCLUSÕES 81

6. PERSPECTIVAS 82

7. REFERÊNCIAS 83

8. ANEXOS 93

8.1 Perfil de crescimento de estirpes recombinantes em malato ou diferentes concentrações de glucose, em baixo e alto amônio. 93

8.2 Tabela com todos polimorfismos em EK01 e EK04. 98

8.3 Tabela com polimorfismos em EK01 e EK04 que apresentam troca de amino ácido na CDS. 108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica de transmissão de *Herbaspirillum seropedicae*. 3
Figura 2 - Via central do metabolismo de glucose em H. seropedicae SmR1..... 8
Figura 3 – Modelo da via metabólica de síntese e degradação de PHB com conexão à via de beta oxidação de ácidos graxos. 10
Figura 4 - Reação catalisada pela 6PGDH. 17
Figura 5 - Reação catalisada por GAPDH de *Synechococcus* PCC 7942. 19
Figura 8 - Mapa de restrição do operon glnAntrBC com sítios de ligação de reguladores transcricionais em destaque (SCHWAB et al., 2007). 22
Figura 9 - Molécula de naringenina 23
Figura 8 - Esquema de clonagem das regiões promotoras de H. seropedicae SmR1 .. 35
Figura 9 - Esquema de clonagem do gene *gnd* de *E. coli* MG1655 36
Figura 10 - Subclonagem do gene *gnd* nos vetores derivados de pBBR1MCS-3 contendo as regiões promotoras de *H. seropedicae* SmR1. 37
Figura 11 - Esquema de clonagem das fusões transcricionais com gene reporter *gfp*. 38
Figura 12 - Taxa de crescimento exponencial das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1expressando o gene *gnd* de *E. coli* 49
Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli* em meio contendo malato. 50
Figura 14 - Perfil de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli*, em meio contendo glucose. 51
Figura 15 - Taxa de crescimento exponencial das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942. 53
Figura 16 - Perfil de crescimento de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942, cultivadas em meio contendo malato. 54
Figura 17 - Perfil de crescimento de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942, cultivadas em meio contendo glucose. 55

Figura 18 - Intensidade de fluorescência pela densidade óptica de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando fusões transcricionais com gene repórter *gfp*..... 58
Figura 19 – Determinação da produção de PHB por citometria de fluxo nas estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli.*..... 61
Figura 20 - Determinação da produção de PHB por citometria de fluxo nas estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *Synechococcus elongatus* PCC 7942. 62
Figura 21 – Crescimento da estirpe recombinante de *H. seropedicae* SmR1 expressando *gnd* de *E. coli* ao longo do experimento de evolução induzida..... 66
Figura 22 - Curva de crescimento do mutante EK04 e da estirpe parental *H. seropedicae* SmR1. 67
Figura 23 - Curva de produção de PHB da estirpe mutante EK04..... 68
Figura 24 - Modelo estrutural inferido para a proteína PykA (Δ I287,V288,N289) de *H. seropedicae* SmR1 sobreposta a estrutura da PykA selvagem. 71
Figura 25 – Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de citometria de fluxo em diferentes estirpes derivadas de *H. seropedicae* SmR1..... 73
Figura 26 - Razão NADPH/$NADP^+$ de estirpe mutante e selvagem expressando pEK16 e controle selvagem com vetor vazio. 76
Figura 27 - Perfil da intensidade de fluorescência pelo tempo e pela concentração de naringenina inicial no meio para estirpes expressando *gfp* com transcrição controlada por promotor sensível a naringenina. 78
Figura 28 - Perfil de crescimento da estirpe de *H. seropedicae* SmR1 contendo plasmídeo pEK14 em diferentes concentrações de naringenina. 79
Figura 29 - Perfil de produção de PHB da estirpe *H. seropedicae* SmR1 contendo o pEK14 tratada com diferentes concentrações de neringenina. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem das regiões promotoras utilizadas neste estudo 20
Tabela 2 - Estirpes de bactérias utilizadas neste estudo 25
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados neste estudo 25
Tabela 4 – Composição de meio LB 29
Tabela 5 - Composição do meio mínimo M9 29
Tabela 6 - Composição do meio NFb 30
Tabela 7 - Lista de antibióticos utilizados e respectivas concentrações de trabalho 31
Tabela 8 - Primers utilizados neste estudo 33
Tabela 9 - Atividade especifica 6PGDH das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando *gnd* de *E. coli*. 56
Tabela 10 - Número e tipo de variantes encontrados no sequenciamento. 69
Tabela 11 - Porcentagem de PHB por peso seco, produtividade, rendimento de biomassa e PHB por massa de substrato consumido de construções portando gene *gnd*. 74

LISTA DE ABREVIATURAS

6PGDH	-6-fosfogluconato desidrogenase
ADH	-Álcool desidrogenase
CoA	-Coenzima A
DMSO	-Dimetilsulfóxido
ED	-Entner-Doudoroff
EDTA	-Ácido etileno-diamino-tetracético
EMP	-Embden-Meyerhoff-Parnas
FID	-Detector por ionizacao a chama
GAPDH	-Gliceraldeído-3-Fosfato desidrogenase
GFP	-Proteína verde fluorescente
H2DCFDA	-2',7'-diclorodihidrofluoresceina
HB	-Hidroxibutirato
HV	-Hidroxivalerato
MNV	-*Multiple Nucleotide Variant*
PCR	-*Polymerase chain reaction*
PHA	-Polihidroxialcanoato
PHB	-Polihidroxibutirato
PSC	-Peso seco celular
ROS	-*Reactive Oxygen Species*
SD	-Shine-Dalgarno
SNV	-*Single Nucleotide Variant*
U.A.F	-Unidades arbitrárias de fluorescência

RESUMO

Herbaspirillum seropedicae é uma proteobacteria endofítica e fixadora de nitrogênio capaz de acumular polihidroxibutirato. O polihidroxibutirato é um poliéster produzido por diversos tipos de bactéria e é utilizado como reserva de carbono além de atuar na resposta ao estresse ambiental. Este polímero vem sendo utilizado como substituto a materiais plásticos derivados de petróleo, graças as suas características termoplásticas semelhantes às do polipropileno e polietileno e, também devido a sua alta biodegradabilidade. A biossíntese do polímero é altamente dependente da concentração do cofator NADPH. Este estudo visa avaliar estratégias para melhoria na produção de PHB por *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 através da aplicação de técnicas de engenharia metabólica. As estratégias testadas consistem na expressão de genes heterólogos *gnd* de *Escherichia coli* MG1655 e *gap2* de *Synechococcus elongatus* PCC 7942, sob controle de promotores endógenos, para modificar os fluxos do metabolismo central de carbono de *H. seropedicae* de forma a gerar mais cofator reduzido por molécula de substrato consumida. Os genes *gnd* e *gap2* codificam a 6-fosfogluconato desidrogenase e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase $NADP^+$-dependente, respectivamente. Ambas as enzimas geram NADPH como subproduto e não tem homólogos correspondentes no genoma de *H. seropedicae* SmR1. Observou-se que a expressão dos genes afeta de forma negativa o crescimento e pode provocar mutações, sendo tais fenótipos dependentes da atividade dos genes heterólogos e por consequência, da força da transcrição dos mesmos. Realizando experimento de evolução induzida com a estirpe expressando *gnd*, obteve-se um mutante com capacidade de crescimento superior a estirpe selvagem, que ainda mantem a atividade do gene e maior produtividade de PHB.

ABSTRACT

Herbaspirillum seropedicae is an endophytic betaproteobacteria capable to fix nitrogen and to accumulate polyhydroxybutyrate. Polyhydroxybutyrate is a kind of polyester produced by a variety of bacteria, serving as energy reserve and is involved in the environmental stress response of the bacteria. This polymer is used as substitute for oil-based plastics, due to its similar thermoplastic proprieties and fast biodegradability in the environment. The PHB biosynthesis is highly dependent on intracellular NADPH concentration. This study evaluated the expression of NADPH-generating enzyme as an strategy to increase PHB production in Herbaspirillum seropedicae SmR1 through metabolic engineering. Strategies applied in this study involve heterologous expression of gnd from Escherichia coli MG1655 and gap2 from Synechococcus elongatus PCC 7942, under control of endogenous promoter sequences in order to modify the carbon flux through the central carbon metabolism of H. seropedicae in order to generate extra NADPH molecules per substrate of molecule consumed. It was not identified any homologous to these genes in the genome of H. seropedicae SmR1 and we have observed that the expression of such genes severely depressed growth and stimulated the occurrence of mutation. These phenotypes are strongly correlated with heterologous gene activity, and as consequence, with the transcriptional strength of the promoters. By performing induced evolution experiments, we have obtained a mutant capable of superior growth relative to the parental strain, which still exhibits heterologus gene activity as well as increased productivity of PHB.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Polihidroxialcanoatos como alternativas aos plásticos de origem petroquímica

Plásticos são amplamente utilizados na indústria com as mais diferentes finalidades, desde a indústria automotiva até a indústria de insumos médicos. Esta vasta aplicação se dá pelo baixo custo de produção e pela facilidade que os polímeros plásticos podem ser moldados para assumirem diferentes formas e tamanhos. De forma geral, os materiais plásticos apresentam excepcional resistência química o que os tornam materiais de longa durabilidade. Porém, esta propriedade também faz com que os materiais plásticos se tornem um problema para o meio ambiente, já que são materiais difíceis de serem degradados de forma natural (GAO et al., 2011). Atualmente, quase toda a produção mundial de plásticos depende do petróleo, uma matéria-prima não renovável. Portanto, o modelo atual contribui para as mudanças ambientais provocadas pelo uso maciço de combustíveis fósseis, que elevam a concentração de CO_2 na atmosfera e de outros gases de efeito estufa com o consequente aumento da temperatura global (HATTI-KAUL et al., 2007). Associado a isso, a baixa biodegradabilidade de plásticos fabricados com derivados de petróleo (p. ex.: polietileno e poliestireno) e estimativas recentes de escassez de fontes de petróleo, tem gerado a necessidade de busca por novas tecnologias sustentáveis para a produção de materiais plásticos (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010). Atualmente, a mais promissora alternativa ecológica e economicamente sustentável para a substituição dos plásticos de origem petroquímica é a utilização de poliésteres de origem microbiana, tais como os polihidroxialcanoatos (PHA). Os PHA são poliésteres produzidos pela condensação enzimática de tioésteres de hidroxiacil-CoA (ANDERSON et al., 1990; MADISON; HUISMAN, 1999). Normalmente, bactérias podem produzir PHA por duas vias. A via mais difundida consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando acetoacetil-CoA, que por sua vez é reduzido a 3-hidroxibutiril-CoA e por fim polimerizado a polihidroxibutirato (PHB) (PEOPLES; SINSKEY, 1989). O acetil-CoA utilizado na biossíntese de PHB pode ser gerado pelo catabolismo de açúcares, aminoácidos e

ácidos orgânicos. Há ainda uma via alternativa, restrita a algumas bactérias, utilizada para a biossíntese de PHAs de cadeia média conhecidos também como *medium chain lengh* (PHA-mcl), contendo cadeias de 6 a 14 átomos de carbono. Esta via consiste na polimerização de hidroxiacil-CoAs gerados pela beta-oxidação de ácidos graxos ou pela via de biossíntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA (FERNÁNDEZ ESCAPA, 2012). Os PHA são produzidos em grande quantidade por algumas bactérias, estocados na forma de grânulos intracelulares, podendo ser facilmente extraídos e empregados na fabricação de embalagens plásticas com propriedades físico-químicas adequadas à comercialização. Os PHA atendem a três exigências que os credenciam como substitutos renováveis de baixo impacto ambiental para os plásticos petroquímicos: i) são produzidos por microrganismos a partir de fontes naturais renováveis, sendo assim não contribuem para o aumento de emissões de CO_2 no meio ambiente; ii) podem ser de fato degradados de forma natural, evitando problemas de impacto ambiental devido ao acúmulo prolongado de resíduos sólidos em solos e reservatórios de água; e iii) podem ser reciclados ou até mesmo degradados enzimaticamente para o aproveitamento dos seus monômeros, os ácidos (R)-3-hidroxialcanóicos, que tem alto valor agregado para processos de síntese orgânica já que são obtidos na forma enantiomericamente pura (TOKIWA; UGWU, 2007).

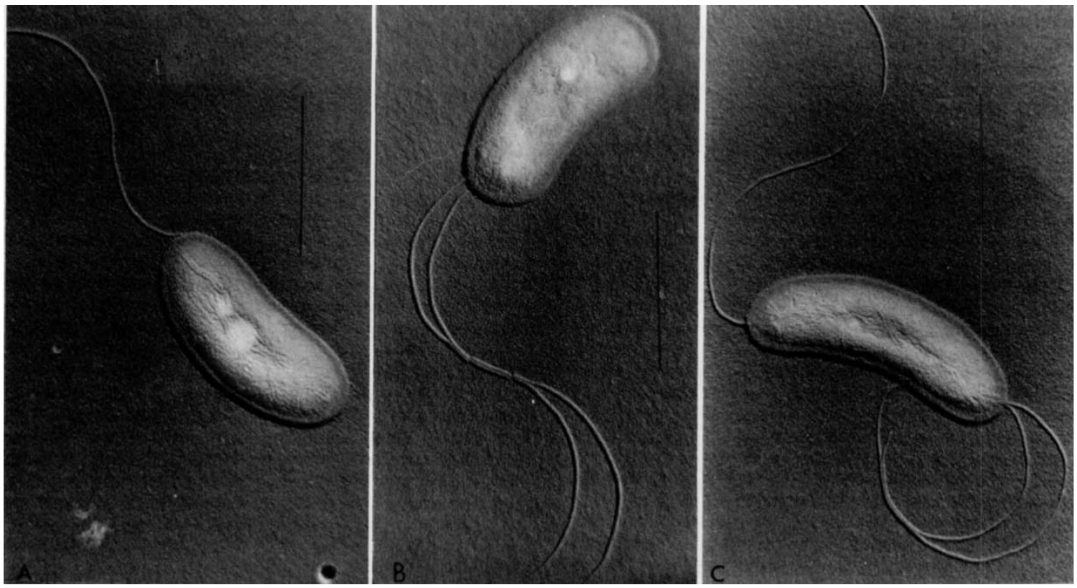
No entanto, apesar de suas vantagens os PHA ainda não exibem preço competitivo frente aos plásticos derivados da indústria petroquímica. Isto se deve ao fato de que o custo da produção industrial de PHA ainda é mais elevado do que a produção de plásticos da indústria petroquímica, levando a necessidade do desenvolvimento de alternativas para ampliar a sua produção microbiana de forma economicamente viável. Nesse sentido, uma das abordagens mais utilizadas atualmente no campo da biotecnologia é a modificação genética dos microrganismos produtores de PHA com o objetivo de aumentar o rendimento final do processo, através de um conjunto de técnicas conhecida como engenharia metabólica (MATSUMOTO; TAGUCHI, 2013; STEPHANOPOULOS; SINSKEY, 1993). Sendo assim, esta dissertação de mestrado estudou o impacto da modificação da via de catabolismo de glucose em *Herbaspirillum*

seropedicae SmR1 na produção de PHB, a fim de se compreender em maiores detalhes quais são as variáveis metabólicas que promovem a síntese deste polímero.

1.2 *Herbaspirillum seropedicae* e sua aplicação para a produção de PHB

Herbaspirillum seropedicae (Figura 1) é uma β–proteobactéria diazotrófica, comumente isolada de tecidos vegetais de diversos tipos de plantas, entre elas algumas de grande interesse econômico como o milho, trigo, sorgo, arroz e cana-de-açúcar (Monteiro et al., 2012). Além disso, *H. seropedicae* estabelece uma interação benéfica levando a promoção do crescimento vegetal como descrito anteriormente (Boddey et al., 1995; James, 2000; Elbeltagy et al., 2001; Gyaneshwar et al., 2002; James et al., 2002). *H. seropedicae* utiliza preferencialmente ácidos orgânicos como fonte de carbono tais como,malato, fumarato e piruvato, mas também é capaz de utilizar monossacarídeos, porém sem apresentar capacidade de fermentá-los (BALDANI et al., 1986).

Figura 1 - Micrografia eletrônica de transmissão de *Herbaspirillum seropedicae*.



FONTE:BALDANI et al., 1986

Além das características já citadas, *H. seropedicae* se destaca como microrganismo produtor de PHA, sendo que o principal PHA acumulado por esta bactéria é o poli-3-

hidroxibutirato (PHB) (Catalan et al., 2007; Kadowaki et al., 2011; Tirapelle et al., 2013; Alves et al., 2016). Catalan e colaboradores (2007) relataram a produção de PHB por *H. seropedicae* Z69 em diferentes fontes de carbono como glucose, xilose, manitol, galactose e ácido succínico. Os autores também relataram que a adição de ácido nonanóico ao meio de cultivo fez com que a bactéria produzisse um copolímero de PHB-PHV (polihidroxivalerato) com uma abundância relativa de 2:1. Resultados prévios do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio (NFIX) da UFPR mostram que a estirpe SmR1 de *H. seropedicae* também é capaz de acumular PHB utilizando diferentes fontes de carbono, tais como, glucose, xilose, galactose, frutose, ác. málico, ác. succínico, ác. lático e glicerol (SACOMBOIO, 2014).

O uso da bactéria *H.seropedicae* SmR1 como modelo experimental é vantajoso, já que o seu genoma já foi sequenciado e anotado (PEDROSA et al., 2011) e já há sistema de manipulação gênica estabelecido para essa bactéria. No genoma de *H. seropedicae* SmR1 13 genes potencialmente envolvidos na biossíntese e degradação de PHB foram identificados e anotados (KADOWAKI et al., 2011; TIRAPELLE et al., 2013) incluindo PHA sintases, PHA depolimerases e proteínas fasinas, a principal proteína associada ao grânulo de polihidroxibutirato (PHB), e um fator de transcrição PhaR capaz de se ligar a região promotora de diversos operons relacionados ao metabolismo de PHA.

As principais proteínas associadas ao granulo de PHB em *H. Seropedicae* SmR1 são as fasina (ALVES et al., 2016; KADOWAKI et al., 2011). Elas cobrem a maior parte da superfície do granulo e evitam a sua coalescência. Estas proteínas também influenciam na mobilização do polímero nativo (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013).

Alguns mutantes para genes potencialmente envolvidos no metabolismo de PHB em *H. seropedicae* SmR1 foram construídos, entre eles: mutantes defectivos na expressão das fasinas PhaP1 e PhaP2 (Δ*phaP1*, Δ*phaP2* e Δ*phaP1.2*), defectivos na expressão da principal PHA sintase PhaC1 (Δ*phaC1*), defectivos na expressão das PHA depolimerases PhaZ1 e PhaZ2 (Δ*phaZ1*, Δ*phaZ2* e Δ*phaZ1.2*) e defectivos na expressão do principal regulador transcricional PhaR (Δ*phaR*). A deleção do gene *phaC1* aboliu por completo o

acúmulo de grânulos de PHB em *H. seropedicae* (ALVES et al., 2016; TIRAPELLE et al., 2013). Nesse mutante há alta propagação de espécies reativas de oxigênio (ROS), afetando a expressão de genes controlados pelo regulador transcricional Fnr e diminuindo significativamente a fixação de nitrogênio (manuscrito em preparação). Acredita-se que o ambiente mais oxidativo seja decorrência da ausência do PHB e que afeta de forma generalizada metaloproteínas sensíveis a oxigênio e ROS. A deleção do gene *phaP1* reduziu em cerca de 50% o PHB acumulado, como no caso do mutante ∆*phaP1*, ou aboliu totalmente o acúmulo de PHB no duplo mutante ∆*phaP1.2* (ALVES et al., 2016). Já o mutante ∆*phaP2* apresentou um fenótipo similar a estirpe parental SmR1, quanto a produção de PHB e outras características. Para os mutantes ∆*phaP1* e ∆*phaP1.2*, também se observou uma drástica redução no crescimento em D-glucose, o que indica que a falta de produção e acúmulo de PHB pode afetar outras vias metabólicas e potencialmente o balanço redox da célula. A deleção dos genes *phaZ1* e *phaZ2* não afeta a síntese de PHB, entretanto o duplo mutante *phaZ1.2* é incapaz de mobilizar o PHB estocado quando submetido a condições de limitação nutricional ou a estresse como choque térmico a 45ºC (manuscrito em preparo). A deleção do gene *phaR* que codifica o repressor transcricional PhaR em *H. seropedicae* SmR1 (KADOWAKI et al., 2011) reduziu em cerca de 90% a quantidade de PHB acumulado. No momento, uma análise transcriptômica comparativa da estirpe selvagem e do mutante ∆*phaR* está em andamento em um projeto de Mestrado do NFIX, para identificar quais genes são regulados por PhaR e entender qual a sua função no controle do metabolismo de PHB. Apesar de se ter avançado na genética do metabolismo de PHB em *H. seropedicae* SmR1 nos últimos anos ainda se sabe pouco sobre os fatores que promovem a síntese de PHB nesta bactéria.

1.3 Características do metabolismo de carboidratos em *H. seropedicae* SmR1

Como mencionado anteriormente, as diferentes espécies de *Herbaspirillum* demonstram preferência por ácidos orgânicos como fontes de carbono. Entretanto, o valor de ácidos orgânicos como por exemplo, o ácido málico, succínico e pirúvico é

proibitivo para se desenvolver um processo de produção de PHB em larga escala. Como alternativa mais econômica geralmente se utilizam substratos de origem agroindustrial como carboidratos. Os monossacarídeos como por exemplo glucose, frutose, galactose e xilose são amplamente utilizados ou dissacarídeos como por exemplo lactose ou maltose.

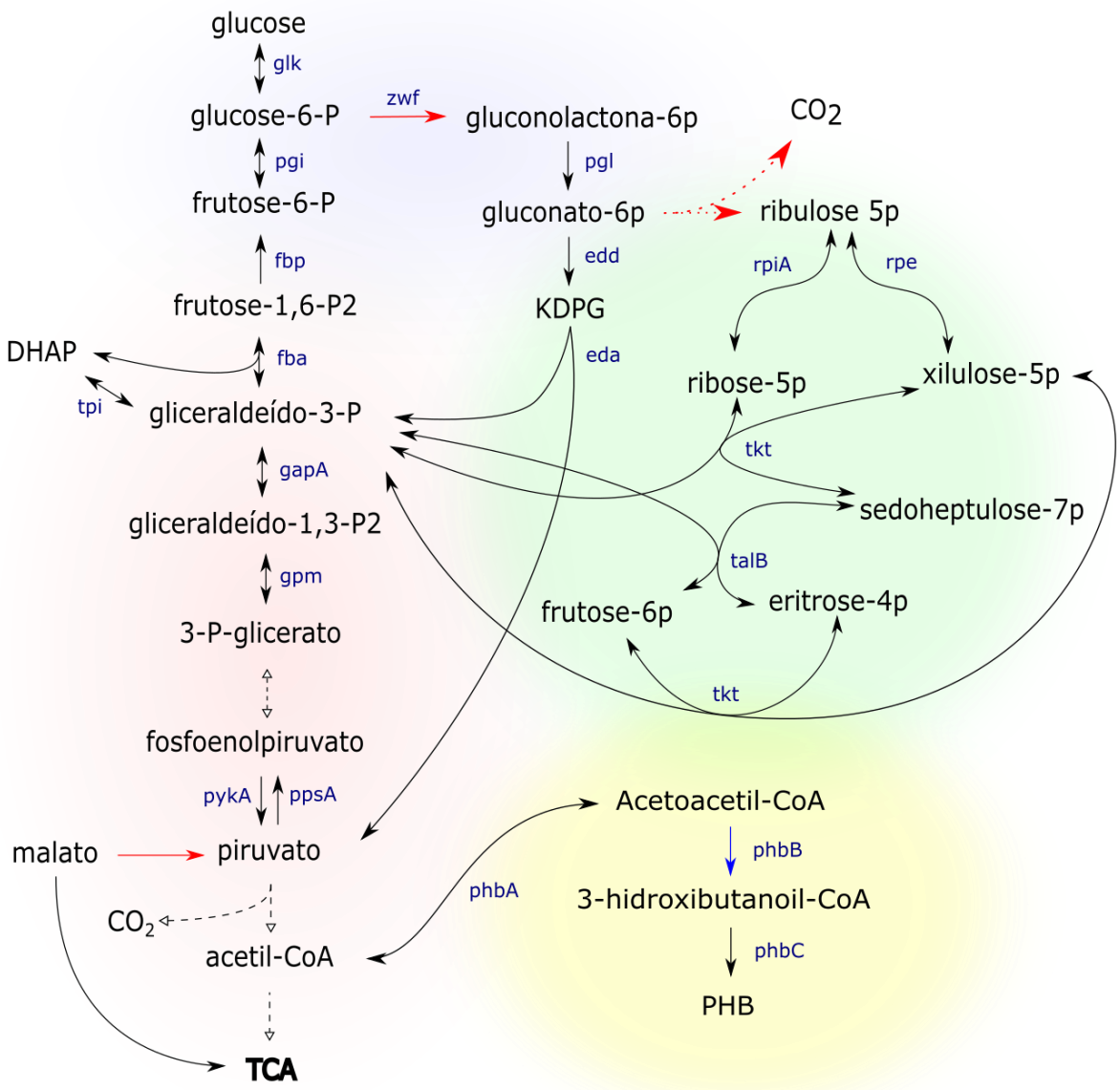
Sendo assim, é necessário conhecer o metabolismo de carboidratos em *H. seropedicae* para poder gerar estirpes com maior eficiência para processos biotecnológicos, entre eles a produção de PHB.

O sequenciamento genômico de *H. seropedicae* SmR1 revelou características únicas do seu metabolismo de carboidratos que incluem: i) a via Entner-Doudoroff (ED) completa, provavelmente a sua principal rota de catabolismo de carboidratos ii) a via Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) está interrompida, devido à ausência da enzima 6-fosfofrutoquinase (PFK-1, E.C. 2.7.1.11) e iii) o ramo oxidativo da via das pentose fosfatos está interrompido devido à ausência da enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (GND, EC 1.1.1.44). Estas características estão representadas na Figura 2.

A via das pentoses fosfato gera 2 moléculas de NADPH através das reações da glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e da 6-fosfogluconato desidrogenase (GND) por cada molécula de glucose metabolizada, enquanto a via ED gera apenas uma molécula de NADPH através da reação da G6PDH. Entretanto, a via ED produz um ATP e dois piruvatos a cada molécula de glucose metabolizada, enquanto a via PP gera pelo ramo oxidativo 1 ribulose-5-fosfato e pelo ramo não-oxidativo 1 gliceraldeído-3-fosfato e 1 frutose-6-fosfato que podem ser aproveitados pela via glicolítica. Entretanto, não há produção de energia diretamente na via PP e, portanto, essa via contribui principalmente para o anabolismo celular, gerando NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH fornece potencial redutor necessário para a síntese de vários componentes celulares e de produtos de alto interesse biotecnológico, por exemplo, polihidroxialcanoatos (Spaans et al., 2015). O fato de *H. seropedicae* não possuir um gene que codifica a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase motivou nossa estratégia, que baseou-se na transferência

do gene *gnd* de *E. coli* (Lim et al., 2002) para aumentar a geração de NADPH por molécula de glucose metabolizada. Alternativamente, também foi transferido o gene *gap2* de *Synechococcus elongatus* PCC7942 que expressa uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase $NADP^+$-dependente (Tamoi et al., 1996) também não presente em *H.seropedicae* SmR1.

Figura 2 - Via central do metabolismo de glucose em H. seropedicae SmR1.



Via central do metabolismo de glucose em *H. seropedicae*. Setas em vermelho indicam produção de NADPH no sentido oxidativo da via, seta em azul indica consumo de NADPH. Setas tracejadas indicam múltiplas reações, setas pontilhadas indicam ausência da reação. Em azul via ED, verde via das pentose-fosfato, vermelho a via EMP, e amarelo via de síntese de PHB.

1.4 Polihidroxialcanoatos: Biossíntese, degradação e aplicações

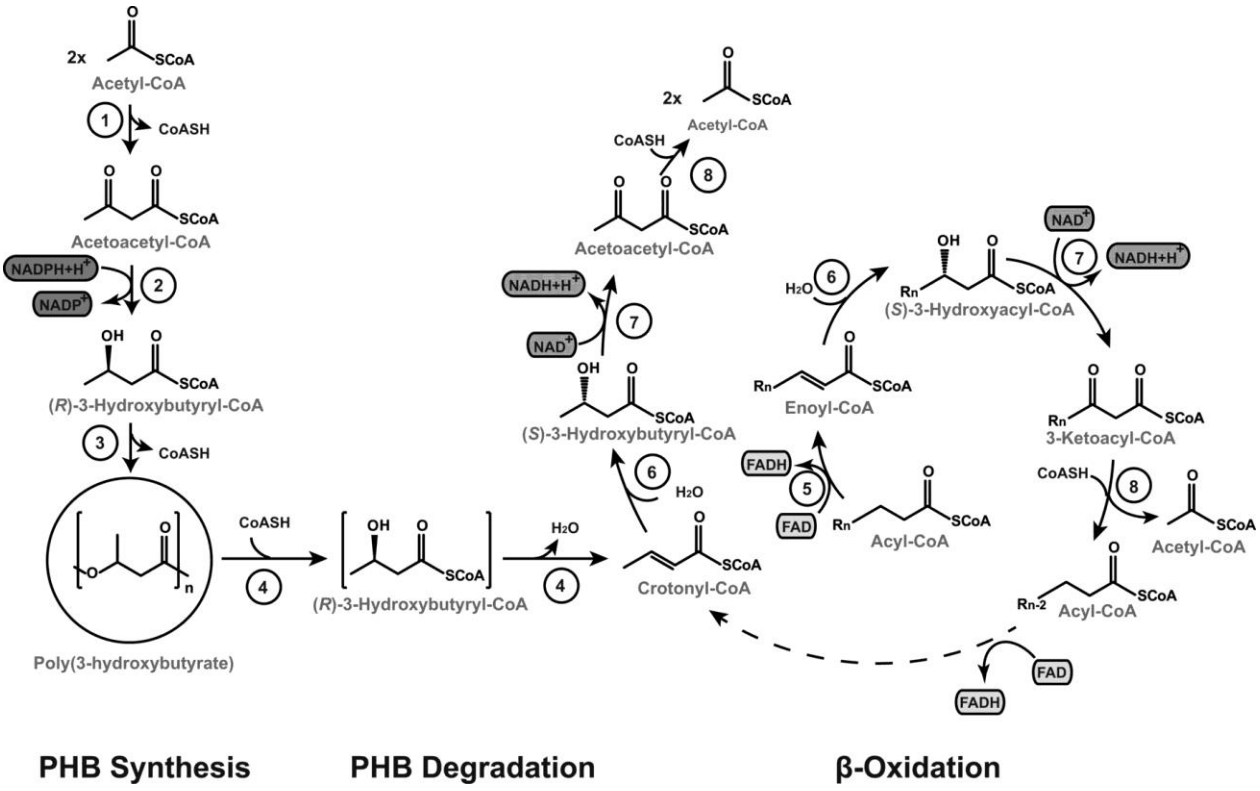
1.4.1 Biossíntese e degradação

Polihidroxialcanoatos são poliésteres sintetizados por diversos tipos de bactérias, acumulado na forma de grânulos no interior das células em condições nutricionais desfavoráveis e com concomitante excesso de fonte de carbono no meio de cultivo. Acredita-se que sua principal função seja como reserva de carbono e de equivalentes reduzidos (MADISON; HUISMAN, 1999).

A Figura 3 ilustra a via metabólica modelo para síntese do PHB, na qual duas moléculas de acetil-CoA sofrem condensação pela ação de enzima β-cetotiolase formando uma molécula de acetoacetil-CoA. Este produto é então reduzido a 3-hidroxibutiril-CoA por uma enzima NADPH dependente, sendo em seguida incorporado a cadeia do polímero pela PHA sintase, também denominada de PHA polimerase.

As características físico-químicas e mecânicas dos PHA dependem de sua composição monomérica. A estrutura do PHB é uma das mais compactas possíveis nesta classe de poliéster resultando em cadeias poliméricas em arranjo cristalino mais acentuado, resultando em rigidez e alto ponto de fusão (DOI, 1995). Monômeros mais estericamente impedidos, como o hidroxivalerato (HV), tornam o material mais elastomérico à medida que sua proporção aumenta no copolímero. A incorporação de monômeros com comprimento de cadeia maior (geralmente de 6 a 12 átomos de carbono) pode ser realizada através da manipulação da composição do meio de cultivo ou das vias metabólicas (OJUMU; YU; SOLOMON, 2004).

Figura 3 – Modelo da via metabólica de síntese e degradação de PHB com conexão à via de beta oxidação de ácidos graxos.



O maior gargalo da reação é a redução de acetoacetil-CoA à (R)-3-hidroxibutiril-CoA., sendo necessário uma molécula de NADPH. Na degradação, gera-se um equivalente reduzido NADH que segue para fosforilação oxidativa. A via completa da síntese degradação consiste em: condensação de duas moléculas de acetil-CoA por PhaA (1), redução por ação de PhaB (2) de forma NADPH dependente e polimerização mediada por PhaC1 (3) resultando no grânulo de PHB. A depolimerase PhaZ1 (4) degrada o polímero, gerando crotonil-CoA via (R)-3-hidroxibutiril-CoA. A via então segue para β-oxidação onde uma enoil-CoA hidratase (6) catalisa formação estéreo especifica de (S)-3-hidroxibutiril-CoA. Uma 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (7) forma acetoacetil-CoA de forma NAD+ dependente, e por fim uma 3-cetoacil-CoA tiolase (8) catalisa a clivagem de acetoacetil-CoA em duas moléculas de acetil-CoA. FONTE:(EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013)

No caminho inverso, a degradação do PHB acumulado acontece inicialmente através da ação de PHA depolimerases intracelulares que degradam o polímero nativo em seus monômeros, 3-hidroxibutirato (3HB), que são então oxidados de forma NAD^+ dependente (EGGERS; STEINBÜCHEL, 2013).

O granulo formado no interior da célula, também chamado de carbonossomo, é coberto por diversas proteínas funcionais, entre elas a PHA sintase, fasinas, proteínas regulatórias e PHA depolimerases. O grânulo tem natureza hidrofóbica mas graças as fasinas, não coalesce (JENDROSSEK, 2009). A presença das fasinas também ajuda a manter o caráter amorfo (ao invés de cristalino) do granulo no interior da célula, o que favorece a ação das PHA depolimerases.

1.4.2 Aplicações

A busca por opções sustentáveis para substituir materiais plásticos derivados de petróleo tem aumentado o interesse em biopolímeros. Neste contexto os PHAs têm sido alvo de grande atenção pois podem ser sintetizados a partir de uma ampla gama de resíduos agroindustriais (SOUZA et al., 1991), além de serem biodegradáveis (JENDROSSEK; HANDRICK, 2002; MADISON; HUISMAN, 1999). O BIOPOL® é um exemplo de copolímero de 3-HB e 3-HV, utilizado inicialmente em embalagens para xampu em 1990 (PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007). A empresa Metabolix, responsável pelo BIOPOL ®, produz hoje uma variedade de produtos à base de PHA, tanto como principal componente para moldagem em injeção, como aditivos para PVC e PLA com base em PHA, além de material para revestimento de papel (substituindo polietileno).

Por serem biocompatíveis (SHISHATSKAYA et al., 2008) e biodegradáveis além de possuírem propriedades mecânicas relativamente modeláveis, estes polímeros também vem sendo sugeridos como material para próteses e como suporte na engenharia de tecidos(ALI; JAMIL, 2016) assim como em micropartículas para liberação controlada de fármacos (SHISHATSKAYA et al., 2008).

Todos os monômeros da cadeia estão na configuração R sendo, portanto, enantiomericamente puros. Esta característica dos PHA permitiu a utilização do produto de hidrólise do polímero para síntese de compostos quirais na indústria química e farmacêutica (PHILIP; KESHAVARZ; ROY, 2007).

1.5 Engenharia metabólica

1.5.1 Definição e aplicações

A engenharia metabólica consiste no melhoramento direcionado da formação de algum produto de interesse, ou ainda de propriedades celulares, através da modificação de reações bioquímicas específicas, ou pela introdução de novas reações, utilizando técnicas de DNA recombinante (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998).

Um dos focos desta área é a visão integrada dos circuitos metabólicos, aliando conceitos da biologia de sistemas e aplicando uma perspectiva holística dos processos intracelulares. O melhoramento clássico de estirpes foca em mutagênese aleatória para seleção de variantes que exibam um fenótipo melhorado. Entretanto, a aplicação de uma técnica não-direcionada resulta em um grande número de mutações secundárias deletérias que não favorecem para se atingir o objetivo do melhoramento. A engenharia metabólica, apoiada na grande quantidade de informação genômica de diversos organismos, não foca apenas em reações individuais mais em como estas se relacionam e, como mudanças em pontos chave de determinada via metabólica podem afetar o comportamento celular (STEPHANOPOULOS, 1999).

Com o advento de técnicas de análise molecular de larga escala (genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica), a área vem ganhando cada vez mais relevância. Modelos em escala genômica tem sido utilizados em análises *in silico* para a procura de alvos e pontos chaves no metabolismo de microrganismos que quando alterados possam melhorar uma determinada característica (O'BRIEN; MONK; PALSSON, 2015).

Diversos empecilhos na realização de um bioprocesso foram contornados graças às técnicas de engenharia metabólica tais como, baixo rendimento de produto, substratos economicamente inviáveis e excesso de subproduto de fermentação. De forma geral, a engenharia metabólica resolve tais problemas em menos iterações que técnicas clássicas, portanto aceleram o desenvolvimento de novos bioprocessos

necessários para tornar as atuais práticas da indústria de insumos mais sustentáveis (RAAB; TYO; STEPHANOPOULOS, 2005).

Dentre os produtos com valor comercial que foram alvos de sucesso da engenharia metabólica encontram-se intermediários de síntese da indústria farmacêutica (PRIEFERT et al., 2004), isopreno (BENTLEY; ZURBRIGGEN; MELIS, 2014) etanol (OHTA et al., 1991), ácido lático (MARIS et al., 2004), licopeno (FARMER; LIAO, 2000), xilitol (CHIN; CIRINO, 2011), lisina (BECKER et al., 2007; TAKENO et al., 2016), 1,4-butanediol (ANDREOZZI et al., 2016) e outros biocombustíveis como álcoois superiores e hidrocarbonetos(CHEON et al., 2016), anticorpos monoclonais (LE FOURN et al., 2014) e biopolímeros, entre eles PHA (MADISON; HUISMAN, 1999; MATSUMOTO; TAGUCHI, 2013).

1.5.2 Engenharia de cofator NADPH

Os níveis intracelulares de cofator, em especial de cofatores redox, atuam de forma central na transferência de energia dentro da célula. Além de estarem envolvidos em uma ampla gama de reações bioquímicas estas moléculas também servem como sinais para regulação de expressão gênica e do ciclo celular (CHEN; LI; LIU, 2014). Em especial, cofatores NADPH afetam geração e defesa contra ROS além de atuarem em uma ampla gama de reações biosintéticas (SPAANS et al., 2015).

Estratégias para geração de NADPH podem ser divididas grosseiramente em associadas ao metabolismo central de carbono e não associadas. Estratégias associadas ao metabolismo central de carbono fazem uso de enzimas da via central que utilizam $NADP^+$ como cofator, como glucose-6-fosfato desidrogenase, 6-fosfogluconato desidrogenase, isocitrato desidrogenase, enzima málica, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase $NADP^+$ dependente e glucose desidrogenase $NADP^+$ dependente (SPAANS et al., 2015).

Como exemplo, Takeno e colaboradores utilizaram a enzima GapN, uma gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase encontrada em *Streptococcus mutans,* que tem

como característica o fato de ter maior afinidade por $NADP^+$ que ao NAD^+. Os autores substituíram a cópia selvagem de uma gliceraldeído-3-fosfato NAD^+ dependente de *Corynebacterium glutamicum* pelo gene *gapN* com o intuito de aumentar a concentração de NADPH e produzir maiores concentrações de L-lisina. A estratégia resultou em um mutante com maior produção de lisina, mas com crescimento retardado. O problema foi contornado expressando GapA nativa de forma induzível por *myo*-Inositol, promovendo uma fase de crescimento inicial, seguida de uma fase de produção em presença somente de GapN, uma vez que os níveis de indutor caem. Ao final uma melhora de 1,5 vezes na produção de lisina foi obtida (TAKENO et al., 2010).

A enzima G6PDH foi utilizada por Lee e colaboradores em 2007 para potencializar a biotransformação de ciclohexanona em ε-caprolactona utilizando *Escherichia coli* BL21 expressando genes heterólogos de ciclohexanona monooxigenase para biotransformação e G6PDH para regeneração de NADPH. A expressão da G6PDH de *E.coli* k12 é responsável por um aumento de 39% na concentração final de ε-caprolactona em relação a estirpe controle cultivada nas mesmas condições (LEE et al., 2007).

Em 2015 um estudo utilizou genes da via central de carbono de *Zymomonas mobilis* para inserir uma via Entner-Doudoroff para desviar o fluxo de carbono do metabolismo de glucose para a via das pentose-fosfato, além de estratégias de deleção e mutagênese, para aumentar a concentração de NADPH de forma controlável (através de indutores de transcrição) e otimização de nível de expressão através de mutagênese dirigida da sequência Shine-Dalgarno (NG et al., 2015). A estratégia obteve um aumento na concentração final de terpenóides, que tem produção dependente de NADPH, de 97%.

Transhidrogenases catalisam a transferência reversível de hidreto entre NADH e NADPH, existindo duas isoformas: solúveis independentes de energia e transmembrânicas translocadoras de próton (SPAANS et al., 2015). Em 2006, Sanchez e colaboradores utilizaram uma estirpe de *E.coli* GJT001 superexpressando a via de PHB

de *Ralstonia eutropha* H16 e *udhA* nativa, uma transhidrogenase solúvel, através de plasmídeos de alto número de cópias, para produção de PHB. A estratégia aumentou a concentração final de PHB de 3,52g/L para 6,42g/L em relação a estirpe controle sem a transhidrogenase, nas mesmas condições. Além disso, houve aumento de 49 a 66% na proporção de PHB por peso seco celular e concomitante aumento na proporção NADPH/$NADP^+$ de aproximadamente 100% (SÁNCHEZ et al., 2006). Em outro estudo, Reddy e colaboradoes em 2015, utilizaram estratégia similar a Takeno (TAKENO et al., 2010) e substituíram gene *gapA*, que codifica uma gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase clássica NAD^+ dependente por uma GapN não fosforilante, resultando em uma glicólise que não gera ATP a nível de substrato, obtendo uma estirpe com crescimento nulo utilizando somente glucose como fonte de carbono. Os autores, assim como Takeno, obtiveram um mutante capaz de crescer em glucose. Este possuía uma mutação pontual em uma enzima NADH desidrogenase que fez com que esta fosse capaz de oxidar NADPH. Para avaliar se o efeito de crescimento reduzido era causado pelo acúmulo de NADPH os autores superexpressaram *udhA* e observaram um aumento no crescimento em relação á estirpe ATP neutra sem a transhidrogenase, confirmando o papel do NADPH na diminuição do crescimento, além de evidenciar o potencial da transhidrogenase para a engenharia de cofator (REDDY; LINDNER; WENDISCH, 2015).

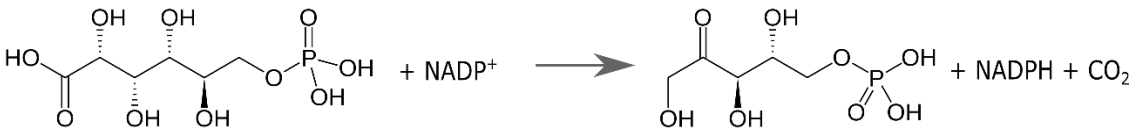
NAD^+ quinases são enzimas que catalisam a conversão de NAD^+ para $NADP^+$. É a única enzima que dá origem a $NADP^+$ *de novo* sendo portanto essencial para a disponibilidade tanto de NADPH como $NADP^+$ (SPAANS et al., 2015). A enzima foi utilizada em um contexto de engenharia metabólica por Li e colaboradores em 2009. O autor produziu estirpes de *E.coli* JM109 recombinantes expressando operon phaCAB para produção de PHB, além de NAD quinases utilizando um vetor de alto número de cópias e um de baixo número de cópias. A expressão de NAD^+ quinase provocou um aumento de 16-35% do peso seco comparado ao controle, além de um aumento de 3 a 6 vezes na concentração de NADP (LI et al., 2009). Em outro estudo, duas NADK de *Corynebacterium glutamicum* ssp. *lactofermentum* foram clonadas e superexpressas no próprio organismo de origem e a produção de isoleucina pela bactéria foi avaliada. As

duas enzimas possuíam atividades dissimilares. A enzima com mais atividade exibiu um aumento de 36% na concentração de NADP+ e 95% a mais de NADPH, resultando em um aumento de 37% na produção do aminoácido. A NADK com menor atividade deste estudo teve um aumento de 101% na concentração de $NADP^+$ e 42% na de NADPH, enquanto a produção de isoleucina aumentou em 24% nas estirpes expressando esta variante do gene. O autor por fim demonstra que o aumento na concentração de $NADP^+$ e NADPH pode potencializar a produção de produtos dependentes do cofator, sendo esse aumento passível de otimização através do ajuste na atividade e expressão da enzima (SHI et al., 2012).

1.5.2.1 A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase de *Escherichia coli*

A enzima 6-fosfogluconato desidrogenase é parte chave na via oxidativas das pentoses e tem como principal função a geração de NADPH e pentoses para biossíntese. Ela catalisa a oxidação de 6-fosfogluconato a ribulose-5-fosfato, produzindo um equivalente reduzido e liberando carbono na forma de CO_2 como mostra a Figura 4 (NASOFF; BAKER; JR, 1984). Codificada pelo gene *gnd* (locus tag **b2029 – *E. coli* MG1655**) a regulação de sua atividade na bactéria ocorre de forma pós-transcricional através de sequência complementar interna complementar à sequência Shine-Dalgarno (JINGHUA TSAI CHANG; GREEN; WOLF, 1995; NASOFF; BAKER; JR, 1984),e sua expressão tem correlação com a taxa de crescimento.

Figura 4 - Reação catalisada pela 6PGDH.



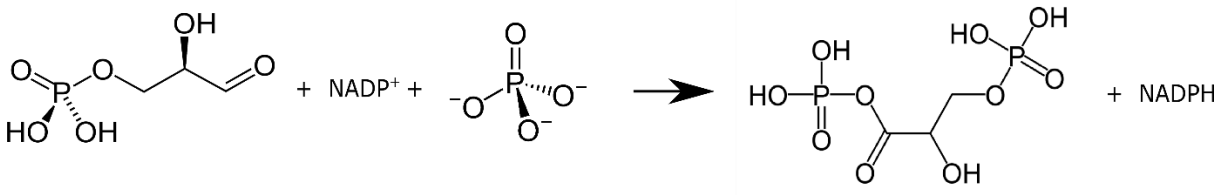
Estirpes de *E.coli* defectivas na expressão de *gnd* demonstram que o gene não é essencial para o seu crescimento em meio mínimo (ZHAO et al., 2004). O mutante *gnd* também não apresentou diminuição significativa na taxa de crescimento tanto em glucose como em piruvato. A mutação afeta o fluxo de carbono, desviando-o para o TCA quando utilizado meio com glucose, mas diminuindo o fluxo em meio com piruvato (para conservar carbono), além de inversão da direção na via PPP (gluconeogênese).

Em um contexto biotecnológico a 6PGDH encontra-se em destaque devido a sua relação com o metabolismo de carbono e de equivalentes reduzidos. Superexpressando *gnd* em *E.coli* DH5α, Lim e colaboradores dobraram a concentração intracelular de NADPH, que foi utilizado para melhora da produção de PHB em torno de 1.5 vezes, em relação ao peso seco, utilizando uma via heteróloga advinda de *Ralstonia eutropha* (LIM et al., 2002). A enzima foi superexpressa também em *Ralstonia eutropha* H16 (ATCC 17699) que possui metabolismo similar ao *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 (ausência de *pfk* e *gnd*). A enzima provocou diminuição do crescimento e da proporção de PHB em relação ao peso seco. A estratégia, no entanto, teve sucesso em aumentar a concentração de NADPH em três vezes (LEE; SHIN; LEE, 2003). No entanto a estratégia ocasionou uma concomitante diminuição nos níveis de acetil-CoA devido a um provável efeito retardante causado pelo excesso de NADPH nas reações de biossíntese, em especial desvio de 3-fosfoglicerato para síntese de serina, o que acaba limitando a quantidade de piruvato disponível (CANONACO et al., 2001).

1.5.2.2 A gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase de *Synechococcus elongatus*

Synechococcus elongatus é uma cianobactéria fotoautotrófica mesófila de água doce capaz de sobreviver em ambientes com recursos limitados (BILLIS et al., 2014). O *Synechococcus elongatus* PCC 7942 possui uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase $NADP^+$ dependente sendo a atividade da enzima seis vezes maior com $NADP^+$ do que com NAD^+ para reação de oxidação do gliceraldeido-3p (Figura 5). É uma proteína homotetramérica que atua na fixação de carbono em plantas e algas (TAMOI et al., 1996), podendo catalisar a reação no sentido glicolítico (KITATANI et al., 2006), sendo codificada pelo gene *gap2*.

Figura 5 - Reação catalisada por GAPDH de *Synechococcus* PCC 7942.



A GAPDH deste organismo não parece sofrer ativação em resposta a luz e parece não ser regulada por sistemas de ferredoxina-tioredoxina (KITATANI et al., 2006) o que o difere em relação aos homólogos de plantas e algas. Parte desta insensibilidade advém da ausência de resíduos de cisteínas que formam pontes disulfeto sensíveis a clivagem por parte de tioredoxinas reduzidas em presença de luz.

GAPDHs $NADP^+$ dependentes já utilizadas são normalmente não fosforilantes, catalizando a conversão de gliceraldeído-3-fosfato a 3-fosfoglicerato diretamente, contornando o passo de fosforilação a nível de substrato (REDDY; LINDNER; WENDISCH, 2015; TAKENO et al., 2010, 2016). Nestes casos a produção diminuída de ATP, em especial em condições anaeróbicas, reprime o crescimento das estirpes estudadas, sendo comum o isolamento de estirpes repressoras que tiveram sua capacidade de crescimento restituída. Tais estirpes continham a enzima ativa, mas possuíam alguma mutação que ou restauravam o balanço energético através de um complexo de transporte de elétrons capaz de oxidar NADPH na cadeia transportadora de elétrons (REDDY; LINDNER; WENDISCH, 2015), ou modificavam de forma mais generalizada os padrões de transcrição através de mutação em genes regulatórios (TAKENO et al., 2016), resultando em estirpes com características relevantes em um contexto biotecnológico.

1.5.2.3 Seleção de promotores para a expressão dos genes gnd e gap2 em *H. seropedicae*

O controle da expressão gênica é crucial para otimizar vias metabólicas e redes sintéticas de expressão. Além disso, o controle da dosagem gênica se faz muito importante, pois em alguns casos altas dosagens podem levar a efeitos tóxicos para o organismo (Kittleson et al., 2011). Levando isso em conta, utilizou-se sequências intergênicas de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 contendo promotores com diferentes níveis de força de transcrição e de controle para a expressão dos genes heterólogos (Tabela 1).

Tabela 1 – Origem das regiões promotoras utilizadas neste estudo

Gene	Locus	Descrição
pgi	Hsero_1099	Codifica a enzima fosfoglucoisomerase. Esse promotor provavelmente controla a expressão de um operon envolvendo outros genes que codificam enzimas do catabolismo de glucose.
phaC1	Hsero_2999	Codifica a enzima PHA sintase, enzima responsável pela polimerização do PHB.
glnA	Hsero_3127	Codifica a enzima glutamina sintetase. Promotor sensível a concentração de nitrogênio (SCHWAB et al., 2007).
phaP1	Hsero_1639	Codifica a proteína fasina, associada ao grânulo de PHB. Promotor sensível aos níveis de PHB intracelulares (ALVES et al., 2016).
fdeA	Hsero_1003	Codifica a enzima FdeA componente da via de degradação de flavonoide. Promotor induzido pela concentração de naringenina (MARIN et al., 2013).

1.5.2.3.1 Promotor Ppgi

A região promotora Ppgi encontra-se a montante de dois operons contendo genes para via ED/ gluconeogênese (*pgi, edd* e *zwf*) e via pentoses-fosfato (*talB*), além de gene codificante para fator de transcrição da família RpiR contendo domínio de ligação tanto para carboidrato quanto para DNA da família, homólogo a HexR. A seleção desse promotor baseou-se na sua provável expressão controlada pela disponibilidade de glucose no meio de cultivo.

1.5.2.3.2 Promotor PphaC1

O gene phaC1 codifica a enzima PhaC1 que é a responsável pela polimerização de 3-HB-CoA em PHB em *H. seropedicae* SmR1 (TIRAPELLE et al., 2013). Localiza-se ao lado de outros genes codificadores de proteínas envolvidas na síntese de PHB como o *phaB* e do regulador transcricional *phaR* e sua expressão provavelmente seja constitutiva (LAWRENCE et al., 2005).

1.5.2.3.3 Promotor PphaP1

O gene phaP1 codifica a principal fasina presente em *H. seropedicae* (ALVES et al., 2016). A expressão desta proteína é dependente da concentração de PHB intracelular (LAWRENCE et al., 2005). A sua transcrição é ativada durante acúmulo e decai a medida que o PHB é consumido, portanto o PphaP1 poderia aumentar a expressão dos genes heterólogos de acordo com a demanda por mais NADPH e síntese de PHB.

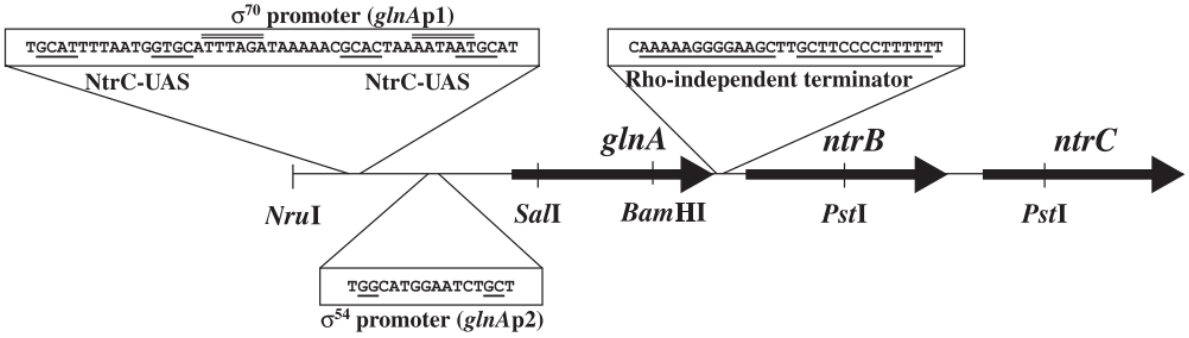
1.5.2.3.4 Promotor PglnA

PglnA é a região intergênica do operon *glnAntrBC* (SCHWAB et al., 2007), que codifica para a enzima glutamina sintetase, enzima chave na assimilação de amônio. Já *ntrB* e *ntrC* expressam um sistema de dois componentes que tem sua atividade regulada de acordo com os níveis de nitrogênio intracelulares (NINFA; JIANG, 2005).

O operon *glnAntrBC* de *H. seropedicae* SmR1 foi caracterizado previamente; mostrando que esse pode ser ativo através de um sítio de ligação para o fator sigma 70 (modo de expressão constitutiva) ou ser ativado em baixos níveis de nitrogênio no meio

por um segundo promotor dependente do fator sigma 54. A regulação dependente de nitrogênio é possível graças a ação do fator NtrC que inibe o sitio sigma 70 e ativa a transcrição via RNA polimerase ligada ao sigma54. Devido a região terminadora *Rho* independente entre *glnA* e *ntrBC* (**Figura 6**), a tradução dos genes do operon não é equivalente. A expressão através de diferentes promotores garante que em baixo nitrogênio maiores níveis de proteínas regulatórias serão produzidos. Para esse estudo optou-se por avaliar a expressão dos genes heterólogos a partir do P*glnA* já que a síntese de PHB é aumentada assim que a concentração de nitrogênio no meio diminui. Com isso a produção de NADPH aumentaria de acordo com a maior demanda para a síntese de PHB.

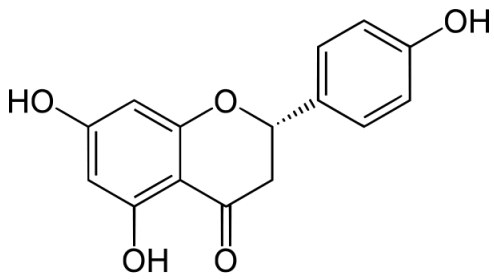
Figura 6 - Mapa de restrição do operon glnAntrBC com sítios de ligação de reguladores transcricionais em destaque (SCHWAB et al., 2007).



1.5.2.3.5 Promotor PfdeA

Flavonoides são compostos fenólicos produzidos por diversas plantas vasculares que possuem atividade antioxidante, sendo também capazes de quelar íons divalentes. A naringenina é um dos flavonóides largamente produzido por plantas (**Figura 7**). *H. seropedicae* possui um operon contendo um total de 10 genes que codificam proteínas envolvidas na degradação e utilização de naringenina (e possivelmente outros flavonoides) como fonte de carbono (MARIN et al., 2013). A região a montante do gene fdeA, primeiro gene do operon, é a região promotora controlada por fator de transcrição FdeR sensível a naringenina.

Figura 7 - Molécula de naringenina



Esta sequência promotora já foi utilizada como parte de um sistema biosensor para flavonóides em *E. coli* (SIEDLER et al., 2014). O autor demonstra que o ativador transcricional FdeR, codificado a montante do operon em *H. seropedicae* SmR1, consegue ativar a transcrição de um gene repórter de forma dependente da concentração, respondendo de forma linear a concentrações de até 100µM de naringenina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Utilizar uma estratégia de engenharia metabólica para modificar o metabolismo de carboidratos e melhorar a produção de PHB pela bactéria *H. seropedicae* SmR1.

2.2 Objetivos específicos

a) Construir plasmídeos recombinantes portando os genes *gnd* e *gap2* para expressão em *H. seropedicae*

b) Expressar o gene que codifica a enzima 6-fosfogluconato desidrogenase (E.C. 1.1.1.44) de *E. coli* em *H. seropedicae* SmR1 e avaliar a produção de PHB em diferentes condições de cultivo;

c) Expressar o gene *gap2*, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *S. elongatus* PCC7942 em *H. seropedicae* SmR1 e avaliar a produção de PHB em diferentes condições de cultivo;

d) Testar a eficiência de diferentes tipos de promotores no controle da expressão dos genes *gnd* e *gap2;*

   Determinar a eficiência da estratégia através da medida da relação $NADPH/NADP^+$ e $NADH/NAD^+$ nas diferentes estirpes recombinantes geradas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídeos

Na Tabela 2 estão descritas as estirpes de bactérias utilizadas nesse estudo.

Tabela 2 - Estirpes de bactérias utilizadas neste estudo

Estirpe	Características	Referência / Fonte
E.coli		
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-crBC) Φ80lacZ ΔM15 ΔlacX74 recA1 ara Δ139 Δ (ara- leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen Inc.
S17-1	SmR Tra+	(SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983)
MG1655	K-12 F^- λ^- *ilvG*$^-$ *rfb-50 rph-1*	(BLATTNER et al., 1997)
H.seropedicae		
SmR1	SmR, Nif+	(PEDROSA et al., 2011)

Os plasmídeos utilizados neste estudo estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados neste estudo

Plasmídeo	Características	Referência / Fonte
pBlueScript II KS(+)	Plasmídeo de alto número de cópias para clonagem, Amp^R	Agilent Technologies
BBa_I13504	pSB1C3 com CDS de GFP(mut3b)	iGEM
pBBR1MCS-3	Tet^R,OriT	(Kovach et al., 1995)

pEK01	pBluescript II KS contendo a região promotora do gene ***pgi*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK02	pBluescript II KS contendo a região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK03	pBluescript II KS contendo a região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK04	pBluescript II KS contendo a região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK05	pBluescript II KS contendo a região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK06	pBluescript II KS cotendo o gene ***gnd*** de *E. coli* clonado no sítio SmaI	Este trabalho
pEK07	pBBR1MCS-3 contendo a região promotora do gene ***pgi*** de *H. seropedicae* clonado entre os sítios XhoI e SpeI	Este trabalho
pEK08	pBBR1MCS-3 contendo a região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae* clonado entre os sítios XhoI e SpeI	Este trabalho
pEK09	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae* clonado entre os sítios XhoI e SpeI	Este trabalho
pEK10	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae* clonado entre os sítios XhoI e SpeI	Este trabalho
pEK11	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae* clonado entre os sítios XhoI e SpeI	Este trabalho
pEK12	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***pgi*** *de H. seropedicae* **(**pEK07**)** e gene ***gnd*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK13	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae* **(**pEK08**)** e gene ***gnd*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho

pEK14	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae* **(**pEK09**)** e gene ***gnd*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK15	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae* **(**pEK10**)** e gene ***gnd*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK16	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae* **(**pEK11**)** e gene ***gnd*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK17	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***pgi*** *de H. seropedicae* **(**pEK07**)** e gene ***gap2*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK18	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae* **(**pEK08**)** e gene ***gap2*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK19	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae* **(**pEK09**)** e gene ***gap2*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK20	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae* **(**pEK10**)** e gene ***gap2*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEK21	pBBR1MCS-3 contendo região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae* **(**pEK11**)** e gene ***gap2*** a jusante clonado entre os sítios NdeI e SacI	Este trabalho
pEKGFP01	pBlueScript II KS (+) contendo a região codificadora de **GFP** com RBS retirada do plasmídeo BBa_I13504	Este trabalho
pEK23	pBluescript II KS contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle	Este trabalho

	de região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae*	
pEK24	pBluescript II KS contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK25	pBluescript II KS contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK26	pBluescript II KS contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK27	pBBR1MCS-3 contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***glnA*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK28	pBBR1MCS-3 contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***fdeA*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK29	pBBR1MCS-3 contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***phaP1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho
pEK30	pBBR1MCS-3 contendo região codificadora e RBS de **GFP** sob controle de região promotora do gene ***phaC1*** de *H. seropedicae*	Este trabalho

3.2 Meios de cultura, condições de cultivo e estoque de bactérias

Para cultivo de *E. coli* TOP10 e S17-1 em meio líquido utilizou-se meio LB (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000), em incubadora rotativa (*shaker*) New Brunswick C25 a 160 rpm, 37°C. Para cultivo em meio sólido adicionou-se 15g/L de ágar ao meio LB. A composição do meio LB encontra-se na tabela a seguir.

Tabela 4 – Composição de meio LB

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH	7,0

Para cultivo da estirpe de *E. coli* MG1655 utilizou-se meio LB ou meio mínimo M9 (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000), que possui a composição descrita abaixo.

Tabela 5 - Composição do meio mínimo M9

$Na_2HPO_4.7H_2O$	12,8 g/L
KH_2PO_4	3g/L
NaCl	0,5 g/L
NH_4Cl	1 g/L
$MgSO_4$	2mM
$CaCl_2$	0,1mM
Glucose	0,4%
pH	7,0

Para cultivo de *Herbaspirillium seropedicae* SmR1 foi utilizado meio NFbHPN (PEDROSA; YATES, 1984), com 5g/L de malato ou 0,4% (p/v) de glucose. Este meio consiste em meio NFb (Tabela 6 - Composição do meio NFb) suplementado com 50 mL/L de solução de fosfatos (159,5 g/L de KH_2PO_4 e 17,8 g/L de K_2HPO_4) e de 20mL/L de NH_4Cl 1M. Os cultivos de *H. seropedicae* foram realizados com agitação orbital de 120 rpm a 30°C.

Tabela 6 - Composição do meio NFb

$MgSO_4.7H_2O$	2×10^{-1} g/L 1
NaCl	1×10^{-1} g/L
$CaCl_2$	2 x 10-^{2} g/L
Ácido nitrilo-triacético	$5,6 \times 10^{-2}$ g/L
Fe $SO_4.7H_2O$	2×10^{-2} g/L
Biotina	1×10^{-4} g/L
Na2MoO4.2H2O	2×10^{-3} g/L
MnSO4.H2O	$2,35 \times 10^{-3}$ g/L
H3BO3	$2,8 \times 10^{-3}$ g/L
CuSO4.5H2O	8×10^{-5} g/L
ZnSO4.7H2O	$2,4 \times 10^{-4}$ g/L
pH	6,8

3.3 Antibióticos

Os antibióticos foram utilizados nos meios de cultura para seleção de estirpes ou de estirpes recombinantes de acordo com as respectivas resistências. A Tabela 7 traz as concentrações finais dos antibióticos utilizados neste estudo.

Tabela 7 - Lista de antibióticos utilizados e respectivas concentrações de trabalho

Antibiótico	Concentração final (µg/mL)
Ácido Nalidíxico	5
Ampicilina	250
Estreptomicina	80
Tetraciclina	10

3.4 Curvas de crescimento

Para caracterização inicial das estirpes recombinantes (*H. seropedicae* SmR1 transformada com os plasmídeos expressando *gnd* ou *gap2*) determinou-se o perfil de crescimento em microplaca de 96 poços. Inoculou-se em cada poço 200µL de meio NFb HP (alto fosfato), com alto ou baixo nitrogênio e malato ou glucose como fonte de carbono, com 5 µL de pré-inoculo saturado. A placa com os inóculos foi a seguir incubada em *shaker* a 120 rpm e 30°C. O crescimento foi acompanhado através da medida de $D.O._{595}$ em leitor de microplaca ELx800 (BioTek Instruments, EUA).

As demais curvas de crescimento foram realizadas em frascos de 60 mL de capacidade contendo 10 mL de meio NFb HPN-glucose 0,4% e incubadas em *shaker* a 120 rpm e 30°C. Para medida da $D.O._{595}$, 200µL da cultura foram aliquotados em microplaca de 96 poços e analisados da mesma forma em leitor de microplaca.

3.5 Métodos de manipulação do DNA

3.5.1 Extração e purificação de DNA genômico

Para extração de DNA genômico de *E. coli* MG1655, cultivou-se a bactéria em LB *overnight* e 1mL da cultura saturada foi utilizado para extração com o kit comercial da

Promega (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) seguindo protocolo padrão indicado pelo fabricante.

A extração de DNA genômico de *H. seropedicae* foi realizada também com culturas saturadas, cultivadas em NFbHPN. As células foram coletadas por centrifugação (12.000 g, 1 min) e ressuspendidas em 0,5 mL de solução GET (50 mmol/L glicose, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8,0; 10 mmol/L EDTA pH 8,0). Às células adicionou-se 2 µL de uma solução de lisozima a 100 mg/mL, seguida de incubação a 37°C por uma hora. Em seguida adicionou-se SDS a uma concentração final de 1%, e incubação por 5 min a temperatura ambiente. Ao sistema foram adicionados 6 µL de Pronase a 20mg/mL. As células foram então incubadas a 37°C *overnight.* O sistema foi então extraído três vezes com solução fenol:clorofórmio (v:v, 1:1), e uma vez com solução de clorofórmio. O sobrenadante aquoso foi separado e a ele foi adicionado 1 volume de isopropanol para precipitação do DNA genômico. Por centrifugação o DNA genômico foi separado do sobrenadante, lavado com etanol 70% (v/v) e, após secagem em estufa, ressuspendido em 50 µL de água ultrapura estéril.

3.5.2 Purificação de DNA por adsorção em sílica

Fragmentos de PCR e restrições de vetores plasmidiais foram purificados, após separação por eletroforese em gel de agarose, através de ligação do DNA a partículas de sílica (*glass milk*) em solução contendo tioisocianato de guanidina.

As bandas identificadas no transiluminador foram cortadas do gel e ressuspendidas em 2 volumes de tioisocianato de guanidina 5M. O pH da suspensão é ajustado com auxílio de indicador azul de bromotimol e adição de tampão KacF (acetato de potássio 3M, ácido acético 2M) de forma a manter o pH abaixo de 6,0. Incubando a suspensão a 65°C por 5 min foi possível dissolver totalmente a agarose, ao qual é adicionada 5 µL de suspensão de 50% (p/v) de sílica em água ultrapura estéril. Após 5 minutos a temperatura ambiente, a sílica foi separada do sobrenadante por centrifugação e lavada com etanol 70%. Após seca a sílica foi ressuspendida em tampão de eluição (Tris HCl 10mM, pH 8,0) e analisada por eletroforese em gel de agarose.

3.5.3 Reação em cadeia da DNA polimerase (PCR)

Para reações de PCR utilizou-se um sistema de 20µL ao qual é adicionado 1-5 ng/mL de DNA template, 0,5 pmol/µL de cada *primer,* 0,2 mM de uma solução de dNTPs, 2 µL de tampão de reação X7 (20 mM Tris-HCl pH 8,8; 10 mM KCl; 6 mM $(NH_4)_2SO_4$; 2 mM MgSO4; 0,1 mg/ml BSA e 0,1% Triton X-100) e 0,2µL de solução de PfuX7 (NØRHOLM, 2010).

Tabela 8 - Primers utilizados neste estudo

Nome	Sequência (5`→3`)	Sitio de restrição
Fw_Ppgi_Hs	TATCTCGAGTGTCGGGTTCCTGTTAGCGT	XhoI
Rev_Ppgi_Hs	TATACTAGTCATATGGGTCTGGTGTCGGTTGGCGG	SpeI(BcuI); NdeI
Fw_PPhaC1_Hs	TATCTCGAGACGCCTTGCCCCTGCCTGCG	XhoI
Rev_PPhaC1_Hs	TATACTAGTCATATGCTGTGCCAGCCACGCGGATA	SpeI(BcuI); NdeI
Fw_PglnA_Hs	TATCTCGAGTGGTGCATTTAGATAAAAACGC	XhoI
Rev_PglnA_Hs	TATACTAGTCATATGGCGAATCTCCTAAAACGAGG	SpeI(BcuI); NdeI
Fw_PPhaP1_Hs	TATCTCGAGAACTGCCTTGATGCGGTGCG	XhoI
Rev_PPhaP1_Hs	TATACTAGTCATATGGTTGAAACATCCTTCTCTTT	SpeI(BcuI); NdeI
Fw_PfdeA_Hs	TATCTCGAGGGCGCTGGTCTCCGTTGTTG	XhoI
Rev_PfdeA_Hs	TATACTAGTCATATGGTCTGTCTCCTTGTCTCCTA	SpeI(BcuI); NdeI
Fw_gnd_Ec	GGAATTCCATATGTCCAAGCAACAGATCGG	NdeI
Rev_gnd_Ec	TTGGTTGAGCTCTTAATCCAGCCATTCGGTAT	SacI

3.5.4 Clonagem

A estratégia de clonagem utilizada baseou-se na utilização de vetor pBlueScript II KS(+) digerido com enzima de restrição SmaI, dando origem a um vetor linearizado *blunt*

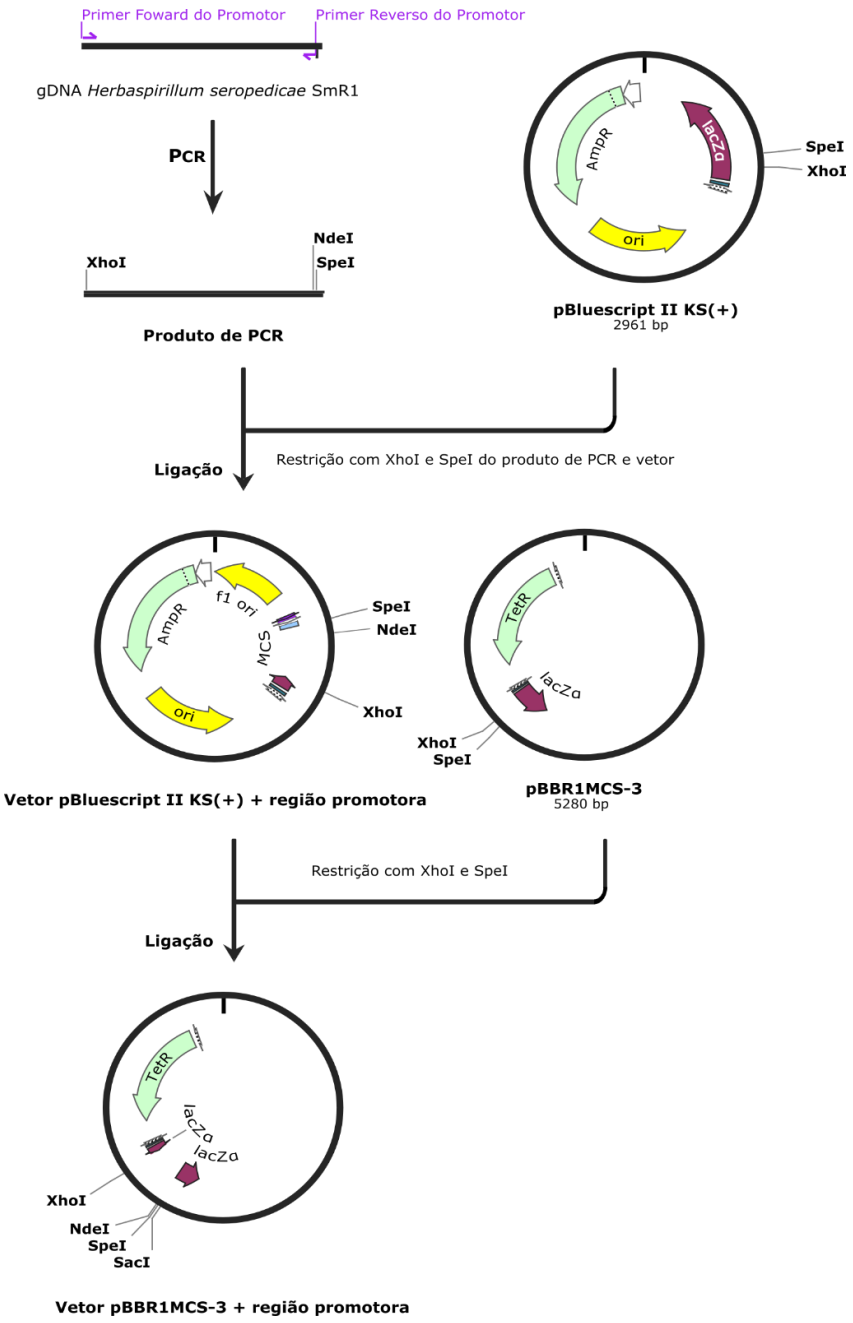
(MA; WANG; WANG, 2013). Fragmentos de PCR amplificados a partir do genoma de *H. seropedicae* SmR1 (no caso das regiões promotoras utilizadas) e de *E. coli* MG1655 foram ligados ao vetor linearizado e subclonados em vetor pBBR1MCS-3.

Para a subclonagem utilizou-se sítios de restrição, adicionados aos fragmentos através de amplificação com os primers especificados acima, XhoI e SpeI como mostra a Figura 8**Erro! Fonte de referência não encontrada.**. Os insertos liberados pela digestão são separados do *backbone* por eletroforese e ligados a vetor pBBR1MCS-3 digerido com as mesmas enzimas. De forma similar, o gene *gnd* de *E.coli* foi clonado em vetor *blunt* (Figura 9) e subclonado nos vetores pBBR1MCS-3 contendo as regiões promotoras utilizando enzimas NdeI (que tem sítio a montante do sítio para SpeI) e SacI como mostra a Figura 10.

O gene *gap2* de *Synechococcus elongatus* PCC 7942 foi sintetizado pela empresa GenScript já com os sítios de restrição NdeI e SacI e teve sua sequência otimizada para expressão em procariotos. O gene foi subclonado da mesma forma que o gene *gnd* em vetor pBBR1MCS-3.

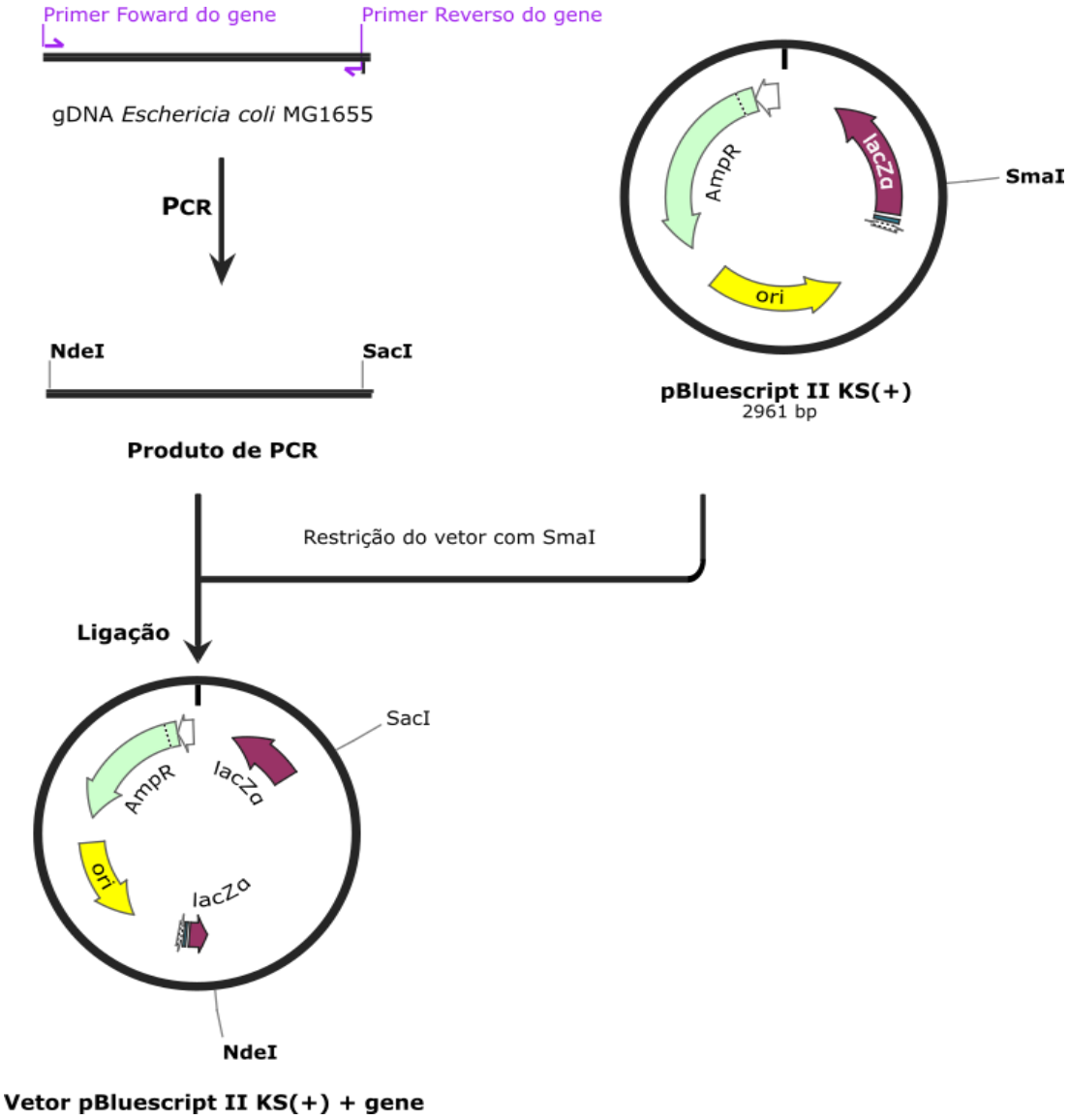
O gene repórter *gfp* foi clonado nos vetores contendo regiões promotoras tratados com SpeI e SacI. A sequência do gene foi extraída do plasmídeo BBa_I13504 utilizando as enzimas EcoRI e SpeI e clonado no pBlueScript-II KS entre os sítios EcoRI e XbaI. Essa clonagem foi possível porque as enzimas XbaI e SpeI são isoesquisômeros. Em seguida, o cassete contendo o gene *gfp* foi retirado com as enzimas XbaI e SacI e clonado nos plasmídeos derivados do pBBR1MCS-3 nos sítios SpeI e SacI. A estratégia encontra-se resumida na Figura 11.

Figura 8 - Esquema de clonagem das regiões promotoras de H. seropedicae SmR1



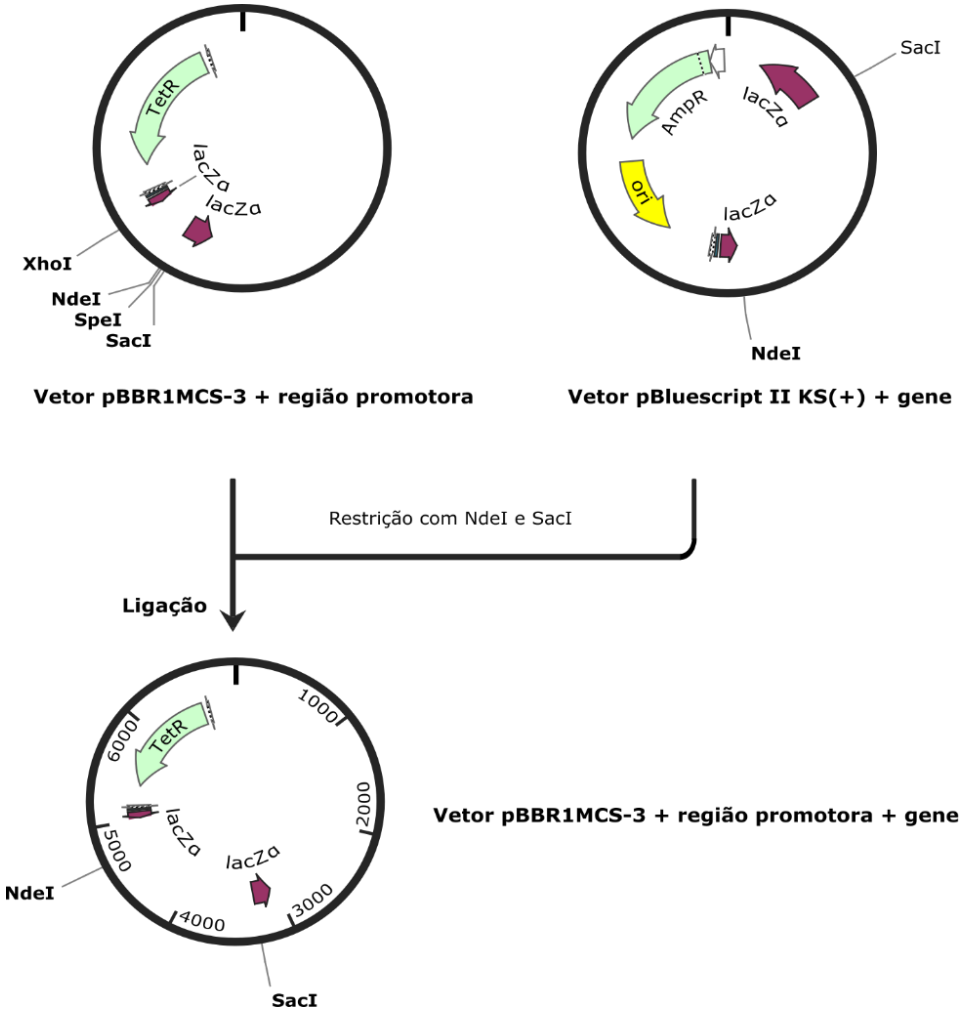
As regiões promotoras foram amplificadas a partir do genoma de *H.seropedicae* SmR1. Inseriu-se o produto de PCR no vetor pBluescript II KS(+). Em seguida as regiões promotoras foram subclonadas em vetor pBBR1MCS-3.

Figura 9 - Esquema de clonagem do gene *gnd* de *E. coli* MG1655



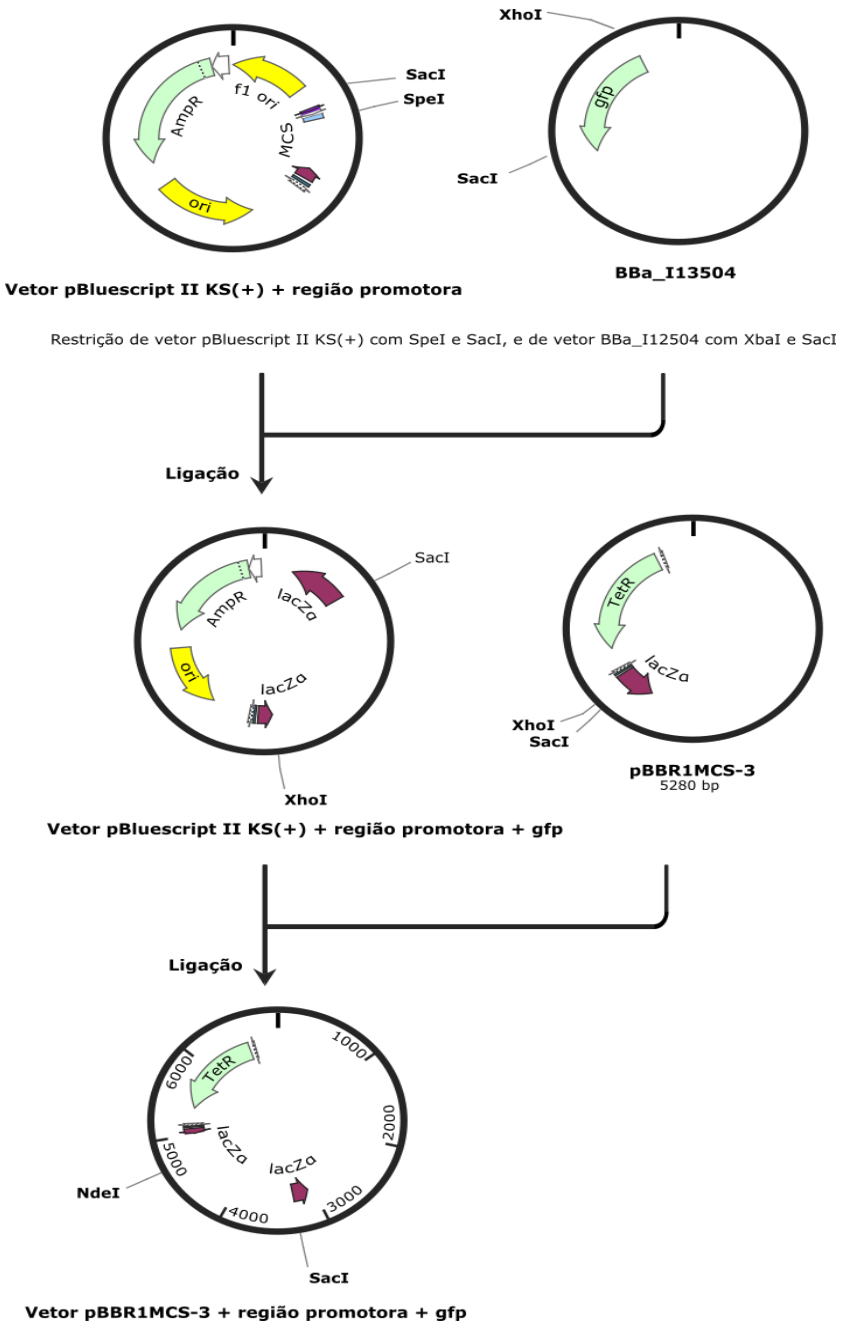
O gene *gnd* foi amplificado a partir do genoma de *E.coli* MG1655 e inserido em vetor pBluescript II KS(+) digerido com enzima SmaI, que gera um vetor com pontas *blunt*.

Figura 10 - Subclonagem do gene *gnd* nos vetores derivados de pBBR1MCS-3 contendo as regiões promotoras de *H. seropedicae* SmR1.



Os vetores pBBR1MCS-3 contendo as regiões promotoras clonadas foram digeridos com as enzimas NdeI e SacI, assim como o vetor pBluescript II KS(+) contendo a região codificadora do gene *gnd*. A região codificadora do gene foi então ligada aos vetores derivados do pBBR1MCS-3 a jusante da região promotora.

Figura 11 - Esquema de clonagem das fusões transcricionais com gene reporter *gfp*.



Plasmídeos pBluescript II KS(+) contendo regiões promotoras foram digeridos com SpeI e SacI. O plasmídeo BBa_I13504 foi digerido com enzimas XbaI e SacI. Como XbaI e SpeI são isosquizômeros, foi possível ligar a região codificadora de *gfp* ao vetor pBluescript II KS(+).

3.5.5 Miniprep plasmidial

Para extração de DNA plasmidial de *E. coli* TOP10 utilizou-se o método de miniprep por lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000) seguido de eletroforese em gel de agarose (SAMBROOK; RUSSEL, D, 2000).

3.5.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento dos fragmentos clonados foi realizado pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977), utilizando 1 µL de solução de dideoxinucleotideos marcados com fluoróforos (BigDye® Terminator v3.1) e 1 µL de tampão SaveMoney 10X. A cada reação adicionou-se 1 µL de primer *forward* ou reverso M13*,* a 5pmol/µL.

A amplificação foi feita em termociclador com os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 1 minuto a 96 °C, 35 ciclos com 15s a 96 °C, 15s a 50 °C e 4min a 60 °C. O produto da PCR foi precipitado com 3 volumes de etanol e um décimo em volume de uma solução de acetato de amônio 7,5 M. O produto precipitado é recuperado por centrifugação, lavado com etanol 70% e seco. Este é então utilizado para análise em sequenciador automático ABI-PRISM 1500 (Applied Biosystems).

3.5.7 Clivagem de DNA com enzimas de restrição

As reações de restrição foram realizadas com enzimas e tampões comerciais da Thermo Fisher Scientific (a não ser NdeI e tampão próprio da enzima, adquiridos da New England Biolabs). A quantidade de DNA, enzima e tampão, assim como condições e tempo de incubação foram as sugeridas pelos próprios fabricantes.

3.5.8 Ligação de DNA ao vetor

As reações de ligação consistiram em sistemas de 10 µL de volume, composto por 1 µL de tampão T4 DNA ligase 10X, 0,5 µL de enzima T4 DNA ligase e quantidades de vetor e inserto em proporção 1:5, e foram incubadas a 16 °C, overnight.

3.5.9 Eletroforese de DNA em gel de agarose

As eletroforeses para análise de DNA foram realizadas em cubas de eletroforese, em tampão TAE como descrito por SAMBROOK et al. (2000). O gel com DNA separado é incubado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL), seguido de visualização em transiluminador com luz ultravioleta a 312 nm com sistema de vídeo-imagem acoplado (UVP).

3.6 Transformação e preparo de células quimiocompetentes

Células quimiocompetentes de *E. coli* TOP10 e S17-1 foram preparadas seguindo o método utilizando cloreto de cálcio (CHAN et al., 2013). Centrifugou-se 50 mL de uma cultura em $D.O._{595nm}$ de 0,3 a 4000 rpm, 4°C por 10min. A cultura foi então ressuspendida em 25mL de uma solução 0,1 M de $CaCl_2$ gelada, e incubada em gelo por 1h. Centrifugou-se a suspensão novamente a 4000 rpm, 4 °C por 10 min, seguida de ressuspensão cuidadosa em 4mL de uma solução 0,1 M de $CaCl_2$ + 15% (v/v) de glicerol. Alíquotas de 100µL foram estocadas em freezer a -80°C até o uso.

O procedimento para transformação consistiu na adição de 2 µL de solução de DNA em concentração aproximada de 1 ng/µL às alíquotas de células quimiocompetentes. O DNA foi homogeneizado cuidadosamente na solução de células e o sistema foi incubado em gelo por 30min. As células então foram submetidas a choque térmico (90 s a 42 °C, 120 s no gelo), e recuperadas através de adição de 900 µL de LB

e incubação a 37 °C por 1 h. A suspensão celular é então esgotada em placas contendo meio LA e antibiótico correspondente à marca de resistência do plasmídeo transformado.

3.7 Lise celular para ensaios de atividade

Para lise celular, 10mL de cultura celular foram centrifugados em tubos tipo Falcon® de 50 mL por 10 min a 4 °C, 4000 rpm, e ressuspendidas em 1mL de meio NFbHPN. As células foram transferidas para tubo de vidro e submetidas a sonicação por 6 ciclos de pulsos com 10 segundos de duração e 10 segundos de intervalo entre os pulsos, com uma amplitude de 30%.

3.8 Conjugação bacteriana biparental

Para transferência de DNA plasmidial em *H.seropedicae* SmR1 utilizou-se estirpes de *E. coli* S17-1 quimiocompetentes previamente transformadas com plasmídeos contendo as fusões transcricionais. Colônias em meio sólido de *H. seropedicae* e *E. coli* são inoculadas em 3 mL de meio (NFb Malato HPN e LB, respectivamente) *overnight*. Em seguida 2,5 mL de meio NFb Malato HPN foram inoculados com a cultura de *H. seropedicae* e cultivadas até uma $D.O._{595}$ de 0,25. O mesmo foi feito para culturas de *E. coli* S.17-1. Em uma placa contendo meios LA/NFbHPN em uma proporção 1:3, foram depositadas, em forma de gotas, misturas de 100 µL/2 µL e 50 µL/5 µL de *H. seropedicae* e *E. coli*, respectivamente. As placas foram mantidas em fluxo laminar até que as gotas secassem completamente, sendo posteriormente incubadas *overnight* em estufa a 30 ºC.

A massa de bactérias foi transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e ressuspendida em meio NFbHPN. A suspensão de bactérias foi diluída de forma seriada até 1000 vezes, sendo que 200 µL de cada diluição foram espalhados sobre meio sólido NFbHPN contendo tetraciclina, estreptomicina e ácido nalidíxico.

3.9 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteína em amostras de lisado celular foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A solução corante contendo Coomassie Blue G-25 0 e metanol em meio acidificado com ácido fosfórico. À 30µL de amostra adicionou-se 170µL da solução corante e a absorbância resultante a 595 nm foi determinada utilizando leitor de microplacas. Utilizando uma curva padrão feita com albumina de soro bovino (BSA) comercial, determinou-se, em massa, a quantidade de proteína nas amostras.

3.10 Dosagem de açúcares redutores

Para dosagem de açúcar redutor utilizou-se uma solução de 0,5 M de Na_2CO_3 com 0,5 mg/mL de ferricianeto de potássio (KIDBY; DAVIDSON, 1973). A reação consiste em 40 µL de amostra e 300 µL da solução reagente, aquecidos a 80 ºC por 15 min. A solução do reagente perde a cor amarelada inicial de acordo com a quantidade de açúcar presente na amostra, sendo possível quantificar através de leitura da absorbância a 420 nm e comparação com curva de calibração feita com concentrações conhecidas de glucose.

3.11 Dosagem de PHB

3.11.1 Metanólise ácida e cromatografia gasosa

Determinou-se a quantidade de PHB através de cromatografia gasosa com detector por ionização de chama (FID) (BRAUNEGG et al., 1978) e modificado de acordo com Huijberts e colaboradores (HUIJBERTS et al., 1994). Foram coletados 10mL de cultura celular em tubo Falcon®. Após separar as células do meio por centrifugação, os *pellets* foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL com pesos determinados, congelados a -20 ºC e liofilizados. Após pesagem em balança analítica,

para determinação do peso seco celular, adicionou-se 2 mL de solução de metanólise (MetOH/H_2SO_4 15%, v/v), contendo 1 mg/mL ácido benzoico. Adicionou-se mais 2 mL de clorofórmio e o sistema foi aquecido a 100 ºC por 3,5 h em tubos de tampa rosqueada, resfriado a temperatura ambiente e a ele adicionou-se 1mL de água Milli-Q e agitado em vortex por 30s. As fases se separaram após um intervalo de 30 min, sendo a fase aquosa retirada e a fase orgânica seca com Na_2SO_4 sólido. Os ésteres foram então quantificados em cromatógrafo modelo VARIAN 450-GC (Varian Inc., Palo Alto, Califórnia, Estados Unidos) contendo coluna capilar CP-Sil-5CB (Varian Inc.) de 10 m x 0.25 mm. Argônio a 0,7mL/min foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida a 250 ºC, com rampa de temperatura na coluna iniciando em 50 ºC até uma temperatura final de 250ºC, com variação de 40ºC/min. A quantificação foi realizada com curva padrão feita com padrão PHB comercial (Sigma Aldrich-Co) realizada nas mesmas condições.

3.11.2 Citometria de fluxo com sonda fluorescente Vermelho Nilo

O *screening* das construções foi feito através de análise de citometria de fluxo com sonda Vermelho Nilo (ZURIANI et al., 2013) que tem o comprimento de fluorescência fortemente dependente da polaridade do meio em que se encontra, exibindo correlação linear com quantidade de PHB. Um volume de 100µL de cultura celular foi centrifugado, o *pellet* de células ressuspendido em tampão TBAC (tampão PBS com 0.1mM EDTA e 0.01% Tween 20)/EtOH 50% (v/v) e incubado a temperatura ambiente por 5min para permeabilização celular. A seguir foi adicionado às amostras 10 µL de uma solução de Vermelho Nilo a 1 mg/mL, em DMSO. Após 5 min de incubação à temperatura ambiente e no escuro, a amostra é centrifugada e as células ressuspendidas em TBAC e analisada em citômetro de fluxo BD ACCURI C5, que possui laser de 488 nm, utilizando filtro de 585/40 nm.

Os dados foram analisados utilizando software fornecido pelo fabricante. Os valores obtidos representam a mediana da população selecionada por *gating* FSC-H contra SSC-H.

3.12 Dosagem de NADPH/NADP$^+$

Para extração de cofatores NADPH/NADP$^+$ centrifugou-se 1 mL de cultura celular. As células foram ressuspendidas em 300 µL em solução 0,1 M NaOH (para NADP+) ou 0.1 M HCl (para NADPH), incubadas por 10min a 50 °C e a seguir neutralizadas com NaOH/HCl 0.1M adicionado gota a gota. As culturas são então centrifugadas e utilizadas para dosagem logo em seguida.

Para dosagem dos cofatores utilizou-se método enzimático de Gibon e Larher (GIBON; LARHER, 1997), com adição de gelatina 0,2% (p/v) na reação para evitar a precipitação da formazana, reduzindo o número de etapas necessárias.

Cada reação de 50 µL continha 4,2 mM de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*), 16,6 mM de PES (*phenazine ethanosulphate*) e substrato [20mM de G6P ou 5M de etanol] em tampão Tricina-NaOH 0,1 M pH 8,0, além de 45 µL de amostra. Após 5 min de incubação a 37 °C, um total de 5 µL de solução de enzima (G6PDH a 14U para dosagem de NADPH/NADP$^+$ e ADH a 100U para dosagem de NADH/NAD$^+$) foi adicionado ao sistema. A reação foi incubada a 37°C por 40min e a absorbância da formazana gerada foi logo em seguida determinada utilizando leitor de microplaca, em comprimento de 540nm. A quantidade de cofator é determinada utilizando curva padrão feita com cofatores comerciais (Sigma Aldrich-Co).

3.13 Medida de ROS

Para avaliar os níveis de ROS intracelulares foi utilizada a sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF-DA). Um total de 1mL de cultivo bacteriano foi centrifugado e ressuspendido em 300µL de tampão TBAC. Ao sistema foram adicionados 3µL de uma solução a 5mM de H_2DCF-DA. Após 30 min de incubação a 37ºC a amostra foi analisada em citômetro de fluxo BD ACCURI C5 utilizando filtro 510/15nm.

3.14 Ensaio de atividade enzimática

3.14.1 Atividade 6PGDH

A atividade da 6PGDH (6-fosfogluconato desidrogenase) foi determinada acompanhando a cinética de redução de tetrazólio a formazana em presença de fenazina methosulfato (MAYER; ARNOLD, 2002). Como controle positivo utilizou-se extrato celular de *E. coli* MG1655.

Um volume de 10mL de cultura celular foi centrifugado e ressuspendido em tampão Tris-HCl, 50mM, pH 8,0 contendo 0,13% gelatina. As células foram então lisadas por sonicação como descrito anteriormente, centrifugadas e o sobranadante separado e mantido em gelo até analise enzimática. Um total de 150 µL de solução reagente consistindo de 300 µM $NADP^+$, 300 µM 6PG, 300 µM MTT e 30 µM PES foi adicionado a 20µL de extrato celular e 30µL de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0. A reação foi acompanhada em espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu a 580 nm.

3.15 Experimento de evolução induzida

Colônias isoladas de *H.Seropedicae* contendo pEK16 (PphaC1-gnd) em placas de meio NFb Malato HPN sólido foram inoculadas em meio liquido NFb Glucose HPN. Assim que a cultura atingiu a fase estacionária, fez-se novo inoculo em meio fresco visando uma $D.O._{595nm}$ de 0,1. O procedimento repetiu-se até obtenção de cultura com taxa de crescimento próxima da estirpe selvagem.

3.16 Sequenciamento genômico de mutantes e análise de dados

O DNA genômico das estirpes mutantes EK01 e EK04 foi sequenciado em plataforma Illumina MiSeq2000 seguindo as recomendações do fabricante. Os *reads* resultantes foram mapeados contra a referência (PEDROSA et al., 2011) utilizando software CLCBio Genomics Workbench (v 7.0) da QIAGEN®.

Para detecção de polimorfismos utilizou-se ferramenta *Fixed Ploidy Variant Detection* do CLCBio, utilizando ploidia 1 e probabilidade de variante mínima de 90%. Parâmetros para filtragem utilizados foram um mínimo de 10 *reads* de cobertura, contagem mínima de 2 e frequência mínima de 10%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização fenotípica das estirpes recombinantes de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1

A caracterização fenotípica das estirpes recombinantes foi baseada na medida de crescimento e da produção de PHB. Desse ponto em diante, entende-se como estirpes recombinantes a estirpe chassi *H. seropedicae* SmR1 transformada com plasmídeos que expressam *gnd* ou *gap2*. As estirpes com maior potencial de acúmulo de PHB nessa triagem inicial foram selecionadas para estudos posteriores.

4.1.1 Curvas de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1

4.1.1.1 Estirpes recombinantes portando o gene *gnd* de *E. coli* MG1655

Ensaios de crescimento foram realizados para todas as construções em meios de cultivo contendo DL-malato ou D-glucose, em alto (20mM) e baixo (5mM) nível de nitrogênio, na forma de cloreto de amônio.

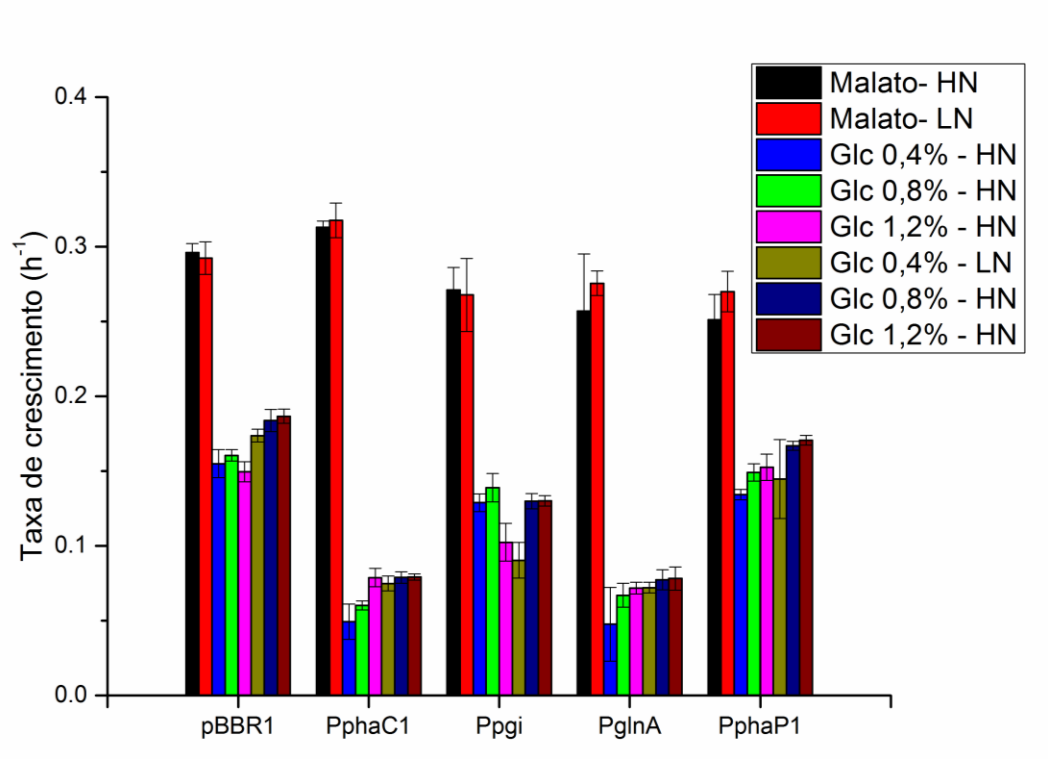
Para o crescimento em malato as taxas não foram significativamente diferentes entre as estirpes como mostra a **Figura 13**. De forma geral o crescimento é similar porém levemente diminuído, excetuando-se a construção pEK16 (P*phaC1-gnd*) que teve uma taxa de crescimento mais elevada que a estirpe controle. Isso deve-se ao fato do malato ser uma fonte de carbono gluconeogênica e que a gluconeogênese não deve ser afetada pela expressão da enzima 6PGDH devido à baixa disponibilidade de intermediários como a glucose-6-fosfato e 6-fosfogluconato, limitando sua atividade. A Figura 12 traz as todas as taxas de crescimento determinadas.

Já em meio com glucose (**Figura 14**), observou-se uma queda significativa na taxa de crescimento das estirpes expressando *gnd* em relação ao controle SmR1

(portando o plasmídeo pBBR1MCS-3). As estirpes portando pEK12 (P*pgi-gnd*) e pEK15 (P*phaP1-gnd*) demonstraram uma queda menos acentuada, já portando pEK16 (P*phaC1-gnd*) e pEK13 (P*glnA-gnd*) sofreram uma queda mais significativa na taxa de crescimento. A concentração crescente de glucose afeta levemente o crescimento de forma positiva para a estirpe selvagem e recombinantes, salvo a estirpe portando pEK12 (P*pgi-gnd*), possivelmente devido a modulação positiva da expressão de *gnd* pela concentração de glucose no meio.

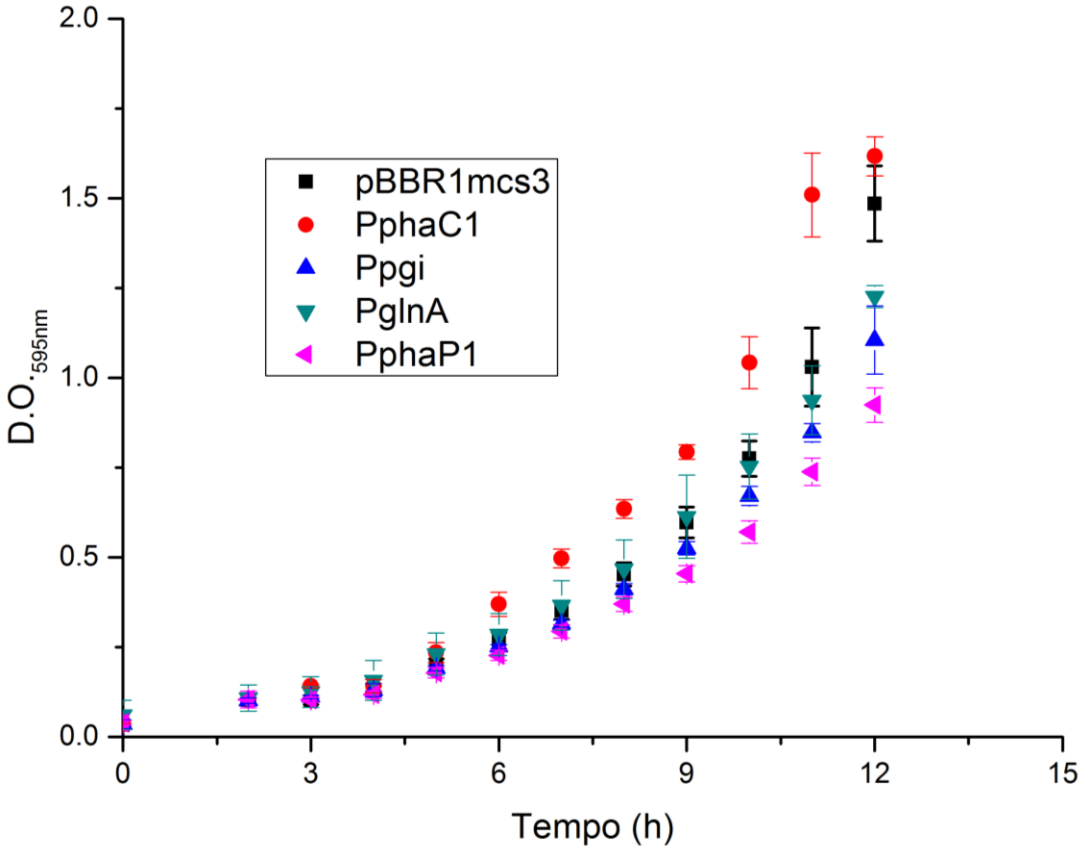
Em conclusão, quando a bactéria metaboliza exclusivamente glucose, a superexpressão do gene *gnd* pode levar a um maior fluxo de carbono pela via das pentoses fosfato que geraria alta concentração de NADPH, entretanto levaria a menor rendimento energético em ATP. Além disso, um alto fluxo pela via das pentoses fosfato pode levar a perda de 1 átomo de C na forma de CO_2 para cada molécula de glucose metabolizada, levando a uma redução na produção de biomassa. Quando a bactéria metaboliza exclusivamente malato, concluiu-se que os fluxos pelas vias de catabolismo de carboidratos (via PP e ED) estejam pouco ativos já que a superexpressão de *gnd* não causou uma perturbação significativa no crescimento.

Figura 12 - Taxa de crescimento exponencial das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1expressando o gene *gnd* de *E. coli*



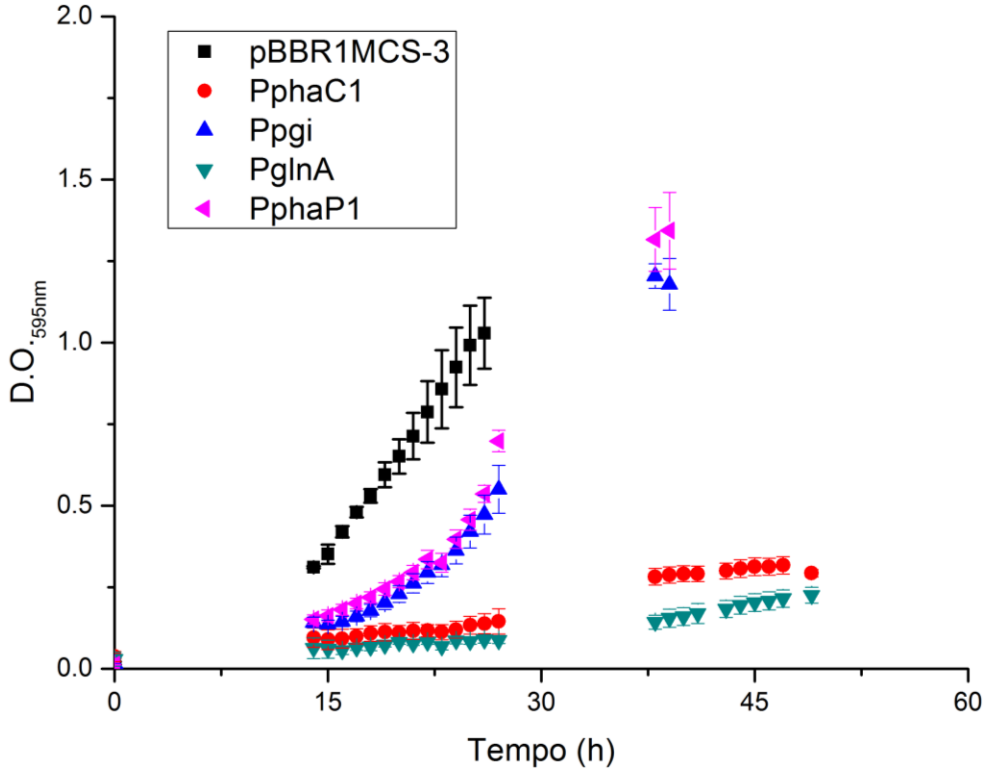
A taxa de crescimento em h^{-1} de cada estirpe expressando *gnd* foi determinada através do coeficiente linear dos dados do log da densidade óptica a 595 nm, em regime de crescimento exponencial. Cada estirpe foi avaliada em alto (20mM) e baixo (5mM) nível de amônio, além de diferentes concentrações de fontes de carbono: malato (0,5%, p/v) ou glucose (0,4%, 0,8% e 1,2%, p/v). A estirpe selvagem contendo o pBBR1 vazio foi utilizada como controle. A taxa de crescimento em malato é pouco afetada pela expressão do gene de *E. coli*, já em glucose todas as estirpes apresentaram uma redução na taxa de crescimento, em especial pEK16 (P*phaC1-gnd*) e pEK13(P*glnA-gnd*). Concentrações crescentes de glucose parecem afetar levemente a taxa de crescimento de forma positiva, exceto para pEK12, construção regulada pelo promotor P*pgi*.

Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli* em meio contendo malato.



O cultivo foi realizado em meio contendo malato (0,5%, p/v) como fonte de carbono e alto nível de nitrogênio (20mM de cloreto de amônio). A expressão do *gnd* afeta de forma pouco expressiva o crescimento em meio com uma fonte de carbono gluconeogênica.

Figura 14 - Perfil de crescimento das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli*, em meio contendo glucose.



O cultivo foi feito em meio contendo glucose como fonte de carbono (0,4%, p/v) e alto nível de nitrogênio (20mM de cloreto de amônio). A expressão do gene *gnd* afeta negativamente o crescimento de todas as estirpes recombinantes quando cultivadas em glucose. As estirpes pEK16 e pEK13 também tiveram o crescimento máximo severamente afetado.

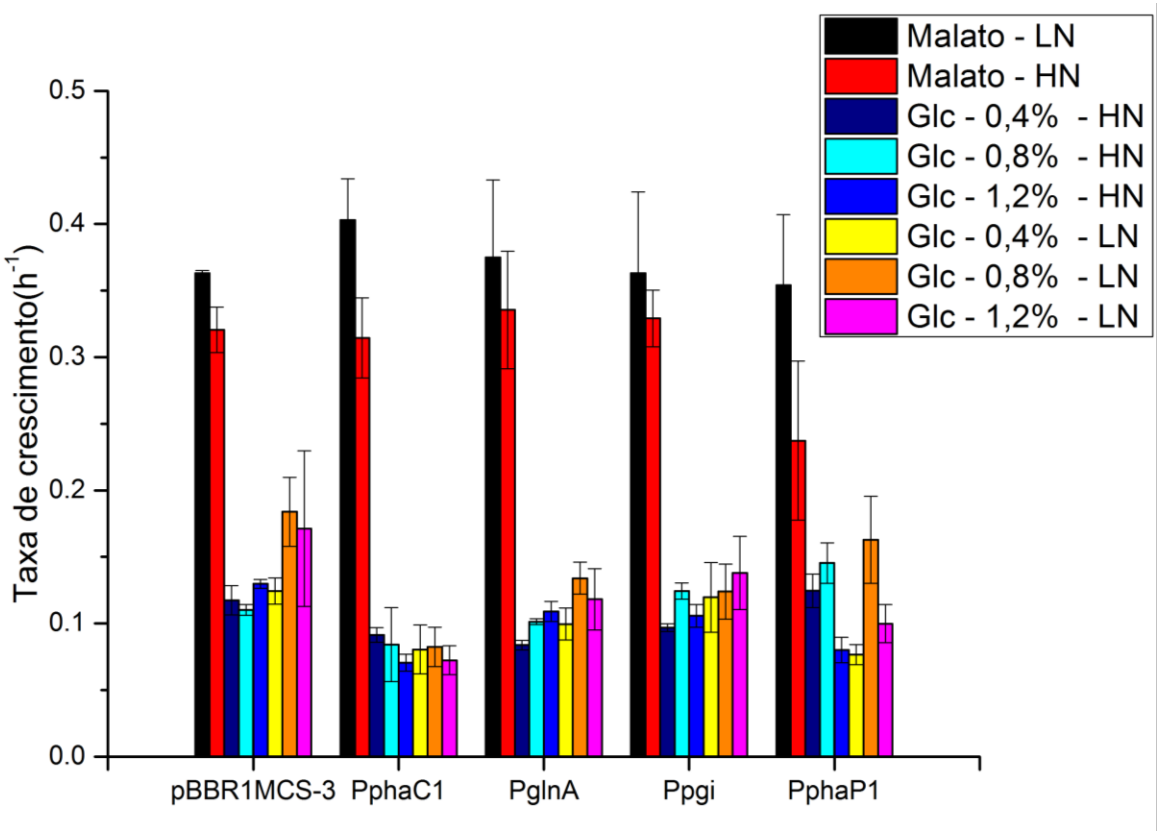
4.1.1.2 Estirpes recombinantes portando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942

A Figura 15 traz as taxas de crescimento em diferentes condições de cultivo para a estirpe SmR1 e estirpes recombinantes portando construções com o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942. Como observado anteriormente para estirpes expressando o *gnd* de *E. coli*, o efeito da expressão de *gap2* no crescimento foi insignificante para os cultivos em meio contendo malato, com exceção da estirpe portando a construção pEK20 (P*phaP1-gap2*).

O perfil de crescimento em malato e alto nitrogênio (Figura 16) mostra o efeito negativo da expressão de *gap2* a partir de pEK20, enquanto outras construções não afetaram o crescimento da bactéria. Possivelmente a alta expressão de uma gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase poderia forçar a reação no sentido catabólico e perturbar a gluconeogênse, quando a bactéria é cultivada em malato.

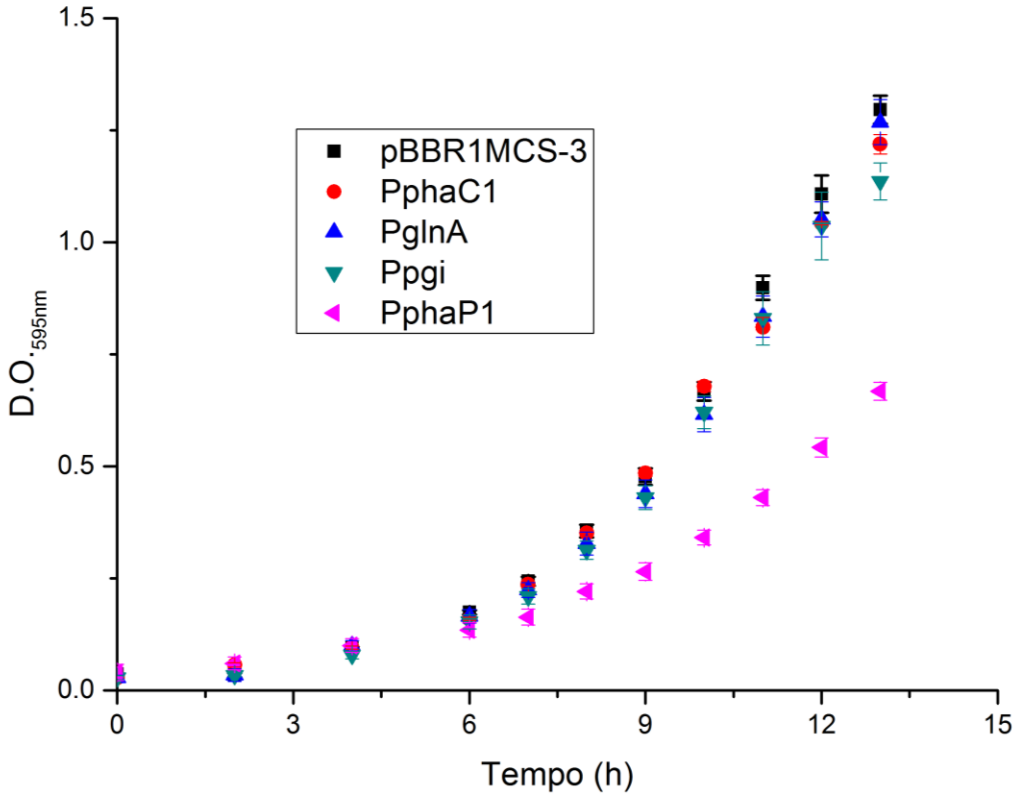
Em meio contendo glucose observou-se um perfil similar de crescimento entre a estirpe controle contendo somente o vetor vazio (pBBR1MCS-3) e as construções pEK17 e pEK18. Já para as estirpes pEK20 e pEK21 observou-se uma diminuição na taxa de crescimento como mostra a Figura 17**.**

Figura 15 - Taxa de crescimento exponencial das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942.



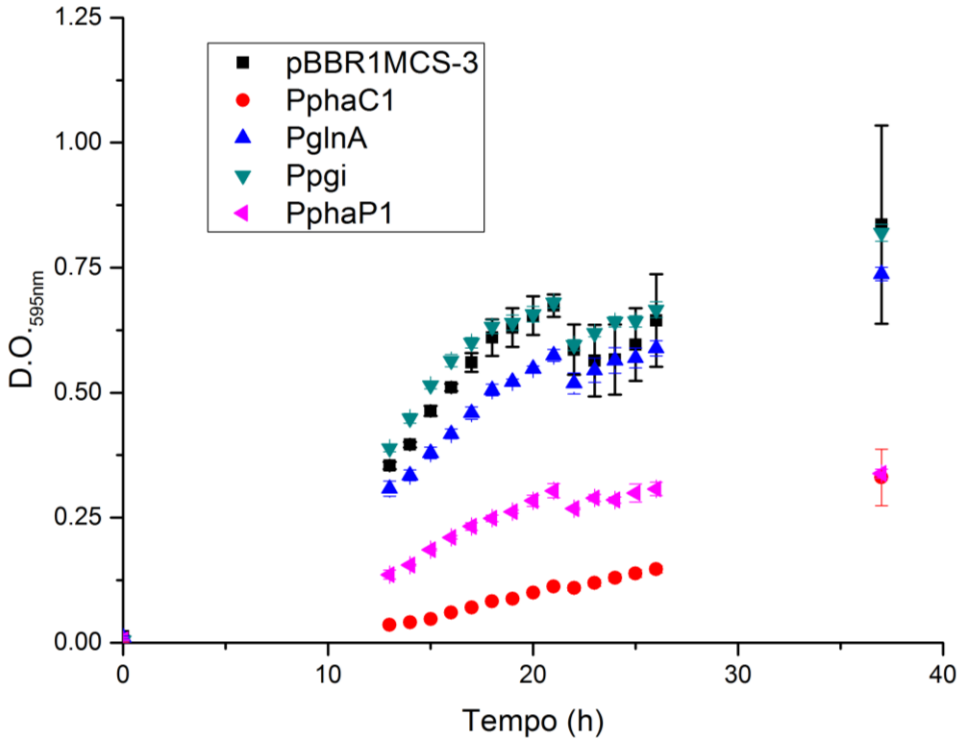
A taxa de crescimento em h^{-1} de cada estirpe expressando *gap2* foi determinada através do coeficiente linear dos dados do log da densidade óptica a 595 nm. Cada estirpe foi avaliada em alto (20mM) e baixo (5mM) nível de amônio, além de diferentes fontes de carbono: malato (0,5%, p/v) ou glucose em diferentes concentrações (0,4%, 0,8% e 1,2%, p/v). A estirpe selvagem contendo o vetor pBBR1MCS-3 vazio foi utilizada como controle.

Figura 16 - Perfil de crescimento de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942, cultivadas em meio contendo malato.



O cultivo foi realizado em meio contendo malato como fonte de carbono (0,5%, p/v) e alto nitrogênio (20mM de cloreto de amônio). O produto do gene *gap2* não afeta de forma significativa o crescimento das estirpes, salvo pEK20, construção P*phaP1-gap2*, que tem uma menor velocidade de crescimento.

Figura 17 - Perfil de crescimento de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *S. elongatus* PCC 7942, cultivadas em meio contendo glucose.



O cultivo foi feito em meio contendo glucose como fonte de carbono (0,4%, p/v) e alto nível de nitrogênio (20mM de cloreto de amônio). A expressão de *gap2* afetou de forma negativa o crescimento de das estirpes portando os plasmídeos pEK20 (P*phap1-gap2*) e pEK21 (P*phaC1-gap2*), quando cultivadas em glucose. As estirpes pEK20 e pEK21 também tiveram os seus crescimentos máximos severamente afetados.

4.2 Determinação da atividade enzimática 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH)

Para determinar se o impacto no crescimento das bactérias expressando *gnd* devia-se a maior atividade da enzima, extratos livres de células foram preparados de cada condição e a atividade 6PGDH determinada em um ensaio acoplado à formação de formazana. As medidas de atividade de 6PGDH das estirpes recombinantes encontram-se na Tabela 9**.**

Tabela 9 - Atividade especifica 6PGDH das estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando *gnd* de *E. coli*.

Construção	Promotor	U ($\mu mol.min^{-1}D.O._{595}^{-1}$)	$D.O._{595nm}$
pBBR1	-	166 ± 58	1,18
pEK12	Ppgi	163 ± 1	1,13
pEK13	PglnA	6215 ± 938	0,15
pEK15	PphaP1	97 ± 112	0,938
pEK16	PphaC1	1481 ± 269	0,53

Medidas de atividade realizadas em triplicata, utilizando 10mL de cultura. Valores de atividade foram normalizados pela densidade ótica.

Somente as estirpes pEK13 e pEK16 apresentaram atividade 6PGDH significativamente maior que a estirpe controle que não expressa a enzima. É possível sugerir que as estirpes pEK15 e pEK12 sofreram mutações que suprimiram a atividade 6PGDH ao serem inseridas em *H. seropedicae.* Esses dados mostram que a maior atividade 6PGDH está diretamente correlacionada com o impacto negativo no crescimento de *H. seropedicae* SmR1, conforme observado anteriormente (Figura 12 e Figura 14).

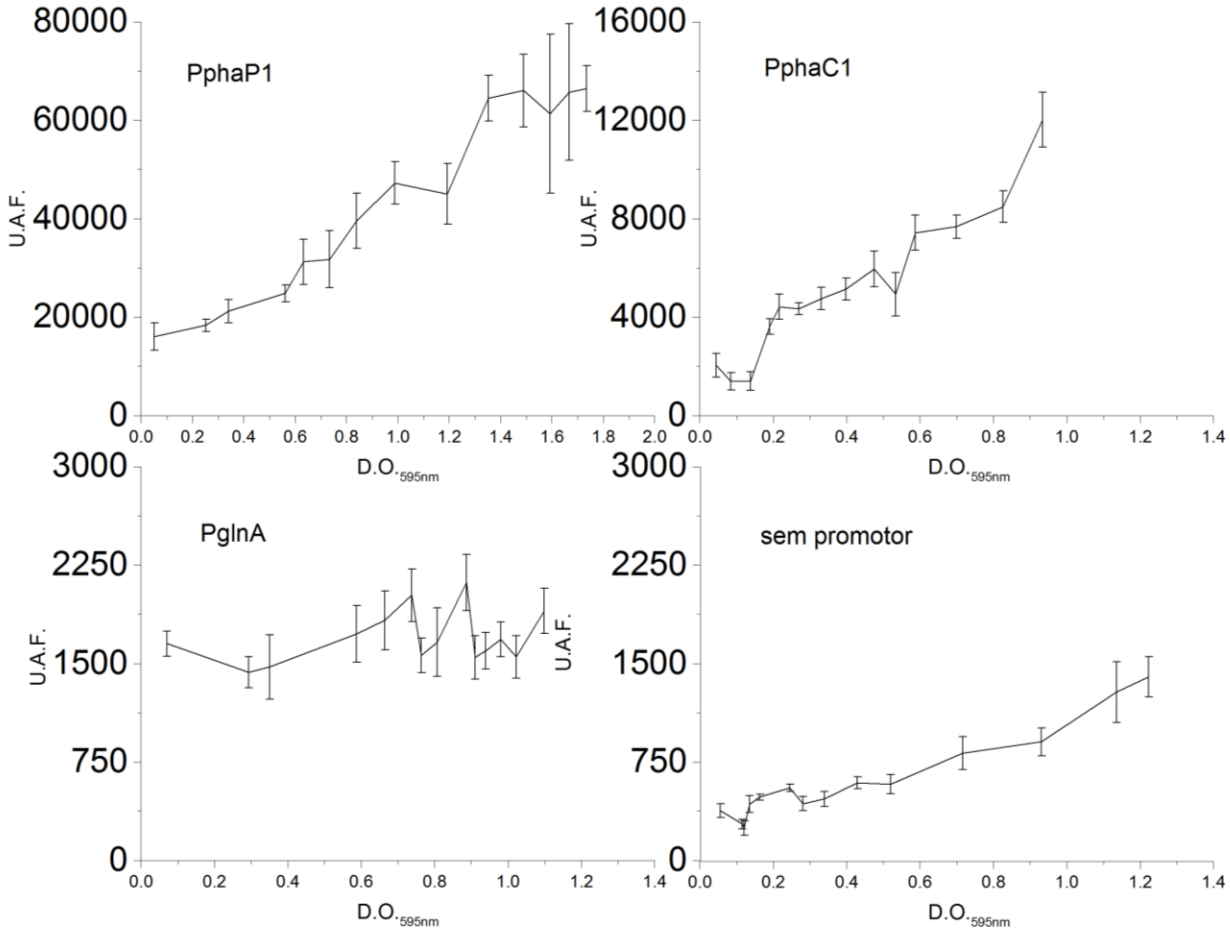
4.3 Perfil de expressão de fusões transcricionais com gene repórter GFP

Para investigar o perfil transcricional das regiões intergênicas utilizadas para controlar a expressão dos genes heterólogos construiu-se fusões transcricionais destas regiões com o gene repórter *gfp*. A Figura 19 traz o perfil de expressão do gene repórter em função da densidade óptica da cultura.

O promotor P*phaP1* é fortemente expresso desde baixos valores de $D.O._{595}$ em comparação aos outros promotores. Como em glucose a quantidade de PHB é maior, é possível que nas condições testadas, devido ao maior acúmulo de PHB, o promotor P*phaP1* seja fortemente ativado pela presença crescente de PHB. O mesmo perfil de ativação dependente do maior acúmulo de PHB já foi reportado em fusão transcricional com o gene repórter *lacZ* (Alves et al., 2016). O promotor P*glnA* em 20mM de amônio não sofreu ativação pelo fator $\boldsymbol{\sigma^{54}}$**,** apresentando transcrição estável durante todo o crescimento. Esses resultados estão de acordo com a caracterização prévia do promotor P*glnA* de *H. seropedicae* SmR1 (SCHWAB et al., 2007)**.** O promotor P*phaC1* tem expressão dependente da fase de crescimento da cultura como esperado e demonstrado para *Ralstonia eutropha* H16, uma bactéria modelo produtora de PHB (LAWRENCE et al., 2005). Inicialmente os níveis de transcrito são comparáveis a expressão pelo promotor $\boldsymbol{\sigma^{70}}$ apresentada para o P*glnA*, mas aumentam progressivamente.

Sugere-se que somente os promotores que possuem transcrição inicialmente baixa sejam capazes de gerar estirpes recombinantes não supressoras da atividade 6PGDH, já que as regiões promotoras P*phaC1* e P*glnA* foram as que exibiram alta atividade 6PGDH (**Tabela 9**), enquanto a construção pEK15 que expressa *gnd* através de promotor forte P*phaP1* não demonstrou atividade nem fenótipo de crescimento. A força transcricional do promotor P*phaP1* também pode explicar o efeito no crescimento em malato da estirpe recombinante expressando *gap2*, ou seja, alta expressão relativa de *gap2* pode retardar o crescimento em malato mesmo na presença da via gluconeogênica nativa intacta.

Figura 18 - Intensidade de fluorescência pela densidade óptica de estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando fusões transcricionais com gene repórter *gfp*



Intensidades de fluorescência para fusões transcricionais com promotor P*phaP1*, promotor P*phaC1*, promotor P*glnA* e nenhuma região intergênica a montante. O promotor P*phaP1* é o mais transcrito, aumentando linearmente com a densidade óptica até a saturação em D.O.$_{595nm}$ 1.4. Promotor P*phaC1* é o segundo mais transcrito, sendo cada vez mais ativo a medida que a densidade óptica aumenta Já P*glnA* em glucose e alto amônio tem valor praticamente estável. A construção controle sem promotor apresenta fluorescência basal que aumenta com a D.O.$_{595nm}$, chegando a níveis comparáveis ao promotor P*glnA* em altas D.O.s.

4.3.1 Determinação da produção de PHB nas estirpes recombinantes expressando *gnd* ou *gap2*

4.3.1.1 *Screening* por citometria de fluxo

Para determinar quais estirpes seriam mais interessantes para a continuação do trabalho, ou seja, que produziam uma quantidade maior de PHB, realizou-se uma triagem utilizando a sonda fluorescente vermelho Nilo e citometria de fluxo. Esta técnica é vantajosa em relação a técnica padrão de metanólise e cromatografia gasosa pois permite a determinação da quantidade de PHB intracelular com volumes reduzidos de cultivo (p. ex. 100 µL).

Observou-se que os níveis de PHB intracelular aumentaram em relação a estirpe controle portando o pBBR1MCS-3 na mesma D.O., particularmente para as estirpes que apresentaram menor taxa de crescimento. Os resultados estão resumidos nas figuras Figura 19 e Figura 20. Entretanto, esse efeito somente foi observado quando as estirpes foram cultivadas em meio contendo glucose como fonte de carbono, indicando que o fluxo catabólico da glucose pela via das pentoses-fosfato ou ED pode ter favorecido a geração de NADPH nas estirpes recombinantes.

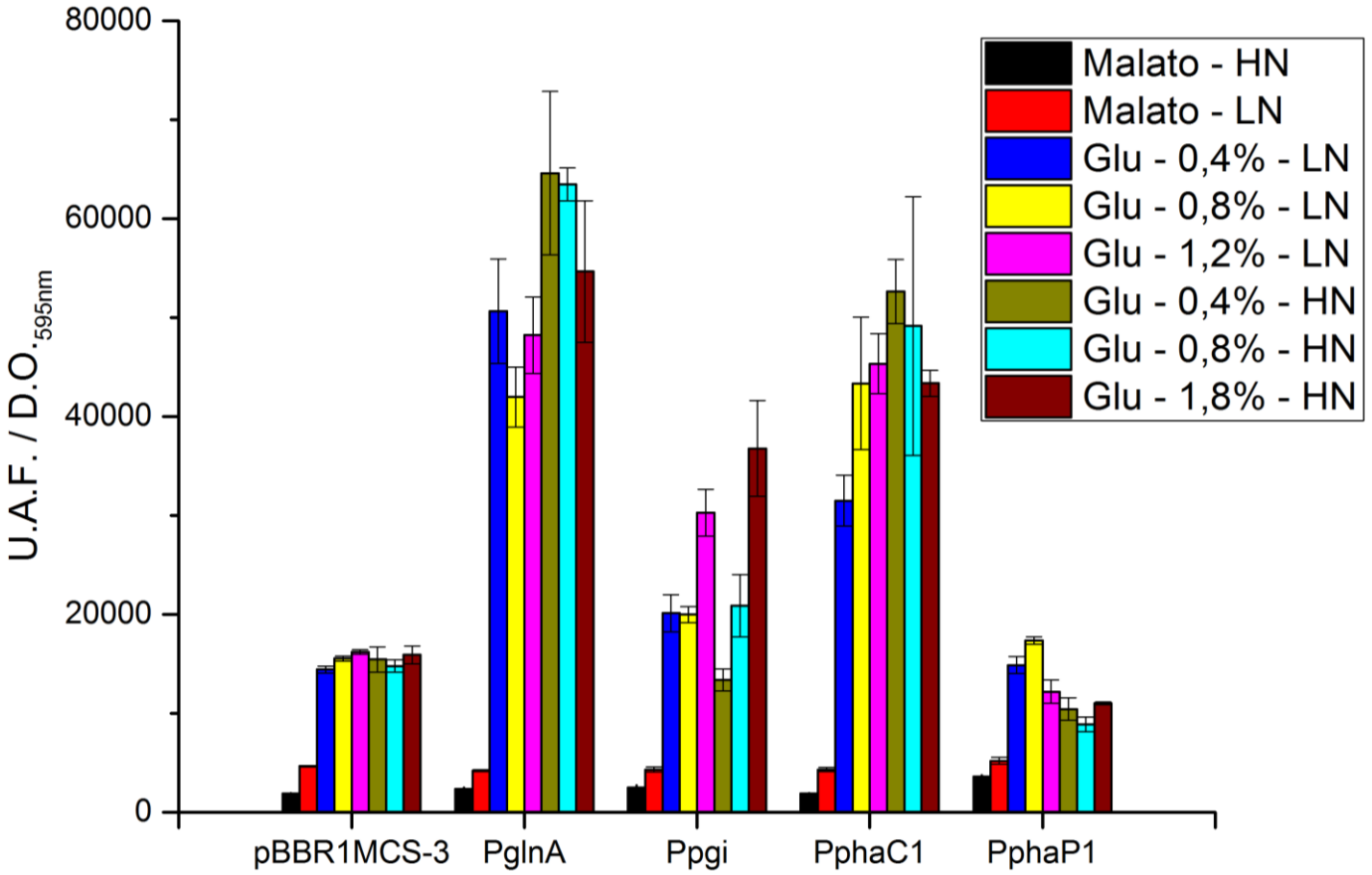
A superexpressão de genes que codificam enzimas que geram NADPH tem efeito na regulação das vias de biossíntese de diversos organismos (Spaans et al., 2015). Entretanto, em alguns casos foi relatado um impacto negativo no crescimento de *E. coli* e *Corynebacterium glutamicum* quando estratégias para aumentar a disponibilidade de NADPH foram aplicadas (Takeno et al., 2010; Auriol et al., 2011; Komati Reddy et al., 2015; Takeno et al., 2016). A dificuldade de crescimento deve-se principalmente pela alta razão [NADPH]/$NADP^+$] e pela baixa geração de energia na forma de ATP, já que o potencial redox do NADPH é menor que o de NADH, não sendo utilizado naturalmente pela cadeia transportadora de elétrons. Normalmente, bactérias utilizam duas transhidrogenases para manter a relação entre NADPH e NADH equilibradas (Sauer et al., 2004). As transhidrogenases catalisam a conversão de NADH para $NADP^+$ ou vice-

versa, existindo em dois tipos: (i) a transhidrogenase transmembrânica bombeadora de prótons denominada PntAB e (ii) a transhidrogenase independente de energia e citoplasmática denominada UdhA. Uma inspeção do genoma de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 utilizando as sequências de PntAB (locus tag b1602 e b1603) e UdhA (b3962) de *E. coli* MG1655 revelou a ausência de uma proteína homóloga a UdhA. Portanto, *H. seropedicae* SmR1 deve possuir uma capacidade limitada de controlar a relação NADPH/NADH e consequentemente seu estado oxidativo intracelular. Associando isso ao fato de que o metabolismo pelas vias ED e PP são intimamente relacionados pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, codificada pelo gene *zwf*) é possível que *H. seropedicae* possua vias com especificidade mista para NADPH e NADH (FUHRER; SAUER, 2009) uma vez que a transhidrogenase transmembrânica não parece contribuir de forma significativa para o rebalanço redox em bactérias com metabolismo similar ao de *H. seropedicae*.

De forma geral, *H. seropedicae* provavelmente utiliza a síntese de PHB como um escoadouro de elétrons na forma de NADPH, para equilibrar seu estado oxidativo. Sendo uma bactéria endofítica, em seu *habitat* natural há uma limitação constante nos níveis de oxigênio, levando ao aumento de equivalentes reduzidos na forma de NAD(P)H). Nessa condição, as enzimas do ciclo do ácido cítrico são reprimidas, levando a um acúmulo de acetil-CoA concomitante com altos níveis de cofator reduzido que impulsionam a síntese de PHB (TRAINER; CHARLES, 2006).

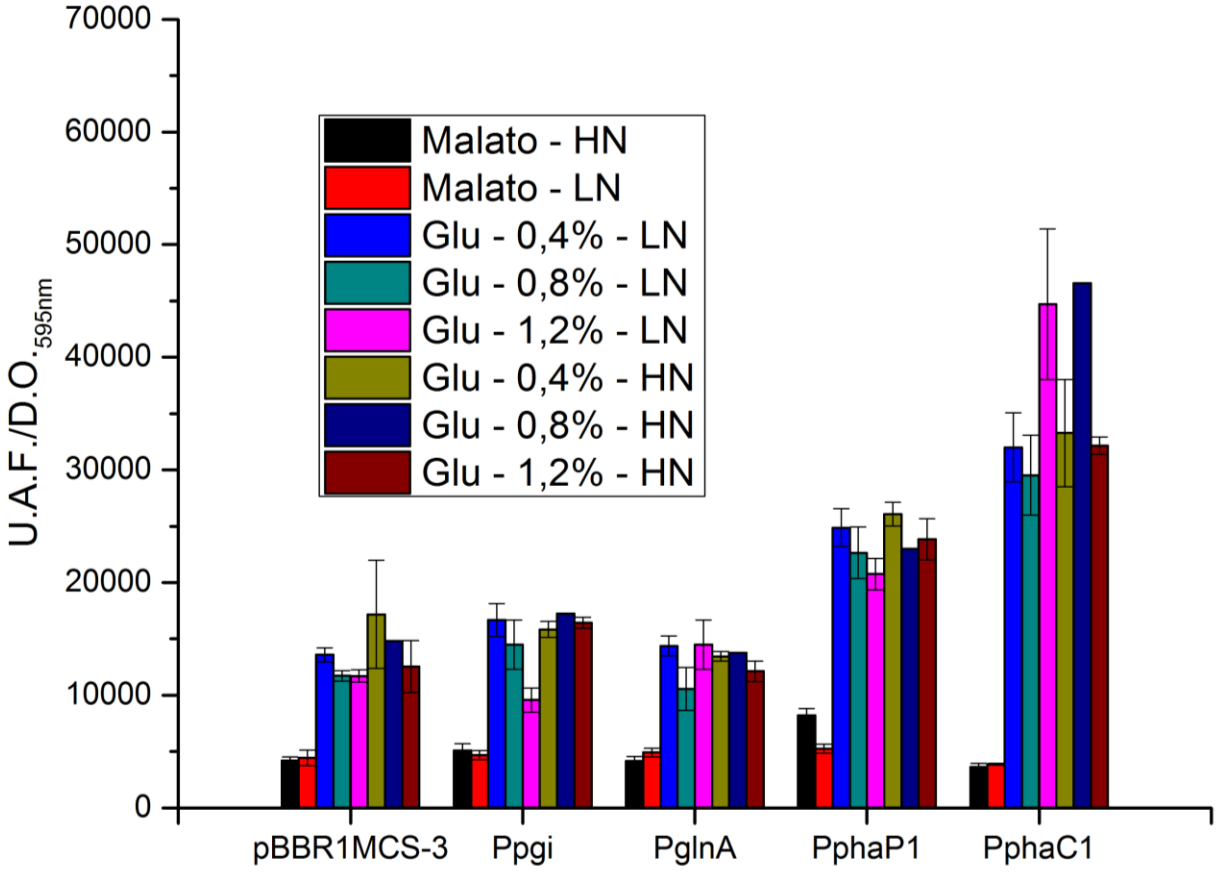
No caso das estirpes recombinantes, deve ocorrer um excesso de NADPH sem um aumento de acetil-CoA (como foi observado em *Ralstonia eutropha* (LEE; SHIN; LEE, 2003)), o que provavelmente favorece reações secundárias que também utilizam NADPH como cofator, por exemplo síntese de aminoácidos e *quenching* de espécies reativas de oxigênio, causando um desequilíbrio nos fluxos metabólicos que impede o crescimento normal da célula, apesar desta continuar acumulando PHB.

Figura 19 – Determinação da produção de PHB por citometria de fluxo nas estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gnd* de *E. coli.*



Os valores de fluorescência foram normalizados pela D.O.$_{595nm}$, já que os cultivos foram coletados em diferentes fases de crescimento. A expressão do gene heterólogo *gnd* ocasionou um acúmulo precoce de PHB na célula, perturbando o desenvolvimento celular e ocasionado uma parada no crescimento.

Figura 20 - Determinação da produção de PHB por citometria de fluxo nas estirpes recombinantes de *H. seropedicae* SmR1 expressando o gene *gap2* de *Synechococcus elongatus* PCC 7942.



Os valores de fluorescência foram normalizados pela D.O.$_{595nm}$, já que os cultivos foram coletados em diferentes fases de crescimento. A expressão do gene heterólogo *gap2* ocasionou um acúmulo precoce de PHB na célula, perturbando o desenvolvimento celular e ocasionado uma parada no crescimento.

4.4 Experimento de evolução induzida

Como forma de contornar os efeitos negativos da expressão do gene *gnd* na estirpe portando o pEK16 (P*phaC1-gnd*), realizou-se um procedimento de evolução induzida com o intuito de obter mutantes com capacidade aumentada de crescimento (Figura 21). Esse tipo de estratégia foi utilizada anteriormente (AURIOL et al., 2011; TAKENO et al., 2016) como solução para cenários similares, no qual o fluxo de carbono é desviado em grande parte para a via das pentoses fosfato, ocasionando desequilíbrio redox excessivo.

A estirpe portando o pEK16 (P*phaC1-gnd*), que apresentava severa limitação no crescimento foi transferida 4 vezes de forma consecutiva em meio NFb-glucose HPN. A Figura 22 mostra que logo da primeira transferência é possível observar uma rápida adaptação já que a cultura inicial passa a atingir altos valores de DO_{595} em um intervalo de tempo mais curto. Essa adaptação possivelmente deve-se a uma ou mais mutações que auxiliam a bactéria a se adaptar melhor a condição imposta. Para confirmar que as possíveis mutações não se encontravam no plasmídeo pEK16 (P*phaC1-gnd*), o mesmo foi extraído de uma colônia isolada da estirpe adaptada (denominada de EK04) e conjugado para *H. seropedicae* SmR1. Os transconjugantes obtidos apresentaram o mesmo fenótipo de baixo crescimento, o que demonstrou a integridade da construção e principalmente do gene *gnd*. A atividade 6PGDH foi medida na estirpe EK04 retornando valores similares à estirpe selvagem com pEK16 (EK04 = 1518.5 ± 158.9 U; EK01 = 1481.4 ± 286.6 U; U = 1µmol de Formazana.min^{-1}, $D.O._{595nm}^{-1}$).

Em *E. coli*, estudos anteriores com estirpes mutantes construídas especificamente para acúmulo excessivo de NADPH tinham dificuldades pare crescer em meio mínimo contendo glucose (AURIOL et al., 2011). Um mutante adaptado surgiu logo nas primeiras transferências, assim como ocorreu para *H. seropedicae*, e ocorreu pelo simples cultivo prolongado em condições de estresse, no caso o cultivo do mutante em glucose. Os autores deste trabalho localizaram mutações no gene que codifica a proteína NuoF (enzima do complexo I da cadeia respiratória), dando à estirpe mutante a capacidade de

oxidar NADPH pela cadeia transportadora de elétrons, restabelecer o equilíbrio redox e ainda produzir energia a partir de NADPH.

Como a atividade 6PGDH foi mantida no mutante de *H. seropedicae*, o crescimento em glucose aumentado pode ter sido ocasionado devido a uma mutação similar, que permite o organismo escoar o excesso de NADPH de forma equilibrada, permitindo a reconstituição da taxa de crescimento, ou ainda aumentar os níveis de Acetil-CoA que provavelmente encontram-se em menor nível como visto anteriormente.

As conjugações das estirpes recombinantes neste estudo só apresentaram colônias a partir de 4 dias, em contraste com os 2 dias necessários para conjugações que não afetam de forma significativa o crescimento, como para genes repórteres. Portanto, é possível que a transferência de *gnd* e *gap2 per se* forcem *H. seropedicae* a adaptar-se inicialmente. Dependendo do nível de expressão dos genes heterólogos essas mutações são suficientes para que a bactéria não tenha grande prejuízo no seu crescimento. Entretanto, se a expressão ainda é alta mesmo com essas mutações iniciais há um claro prejuízo que pode ser revertido com a aplicação da evolução induzida. Já se sabe que limitação nutricional em meio sólido ativa resposta de estresse mediada por RpoS, que por sua vez ativa DNA polimerases de baixa fidelidade, além da indução de mutações por estresse por outros mecanismos (FOSTER, 2007).

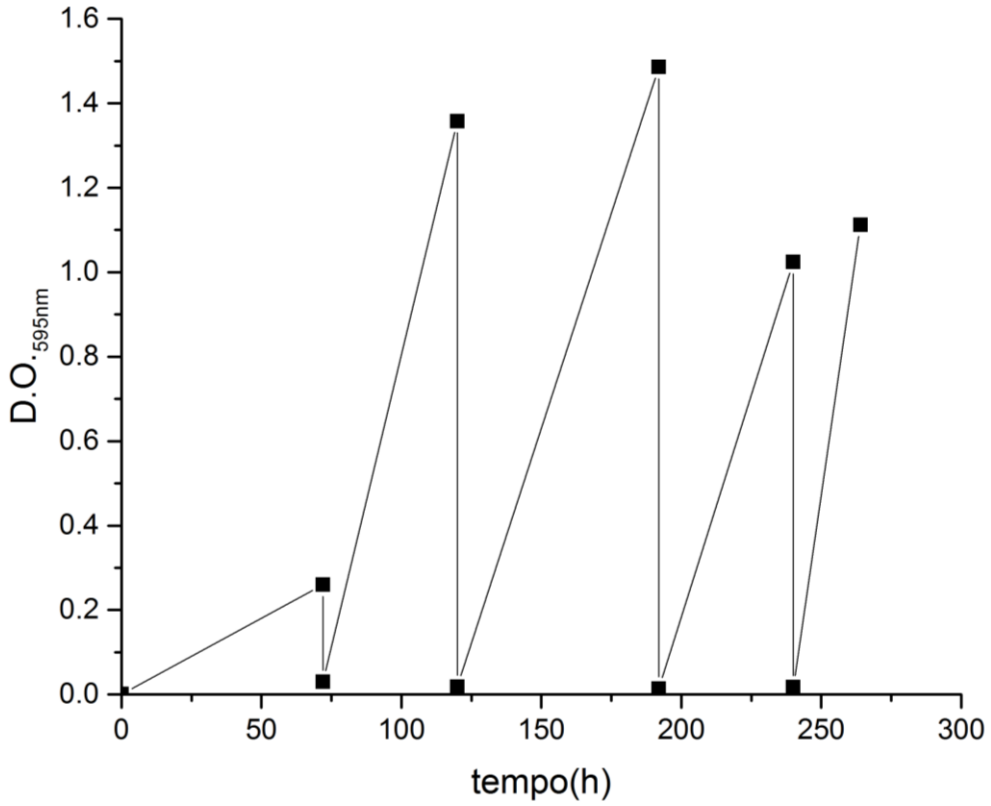
É possível, portanto que mesmo em malato a expressão do *gnd* seja um fator de estresse. Como a recuperação dos transconjugantes após conjugação das construções são feitas em meio sólido NFb-Malato, há a possibilidade de que as estirpes recombinantes já possuam mutações que restaurem este equilíbrio para um crescimento gluconeogênico. Surpreendentemente, a estirpe EK04 exibe uma taxa de crescimento superior à estirpe selvagem (Figura 22), sugerindo que a solução encontrada pela bactéria para restaurar o crescimento não é um simples reequilíbrio do estado oxidativo como observaram Auriol et. al., pois seria esperado simplesmente a restituição do crescimento aos níveis da estirpe selvagem. Observou-se ainda que em condições de

menor oferta de O_2 (cultivo em microplaca) o efeito foi ainda mais pronunciado (dados não incluídos).

O mutante, assim como as estirpes recombinantes testadas (**Tabela 11 e Figura 23**) acumula PHB mais cedo que a estirpe selvagem, atingindo a saturação ainda em baixo crescimento celular.

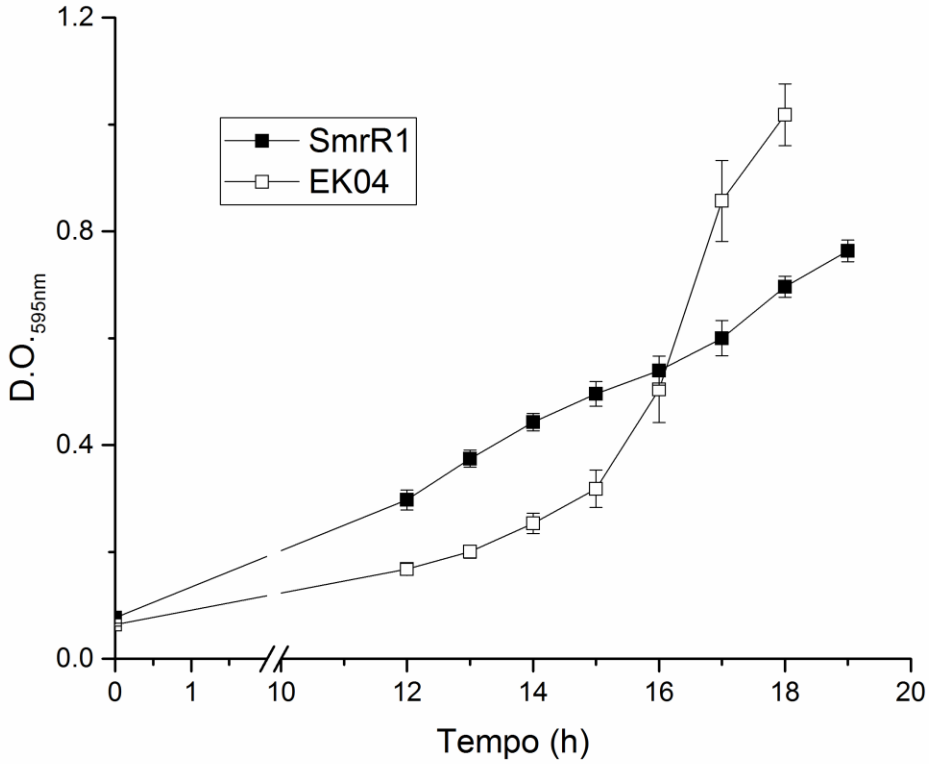
Outra característica peculiar observada no mutante foi que o tempo de adaptação das culturas partindo de um meio com malato para um meio com glucose foram drasticamente reduzidas.

Figura 21 – Crescimento da estirpe recombinante de *H. seropedicae* SmR1 expressando *gnd* de *E. coli* ao longo do experimento de evolução induzida



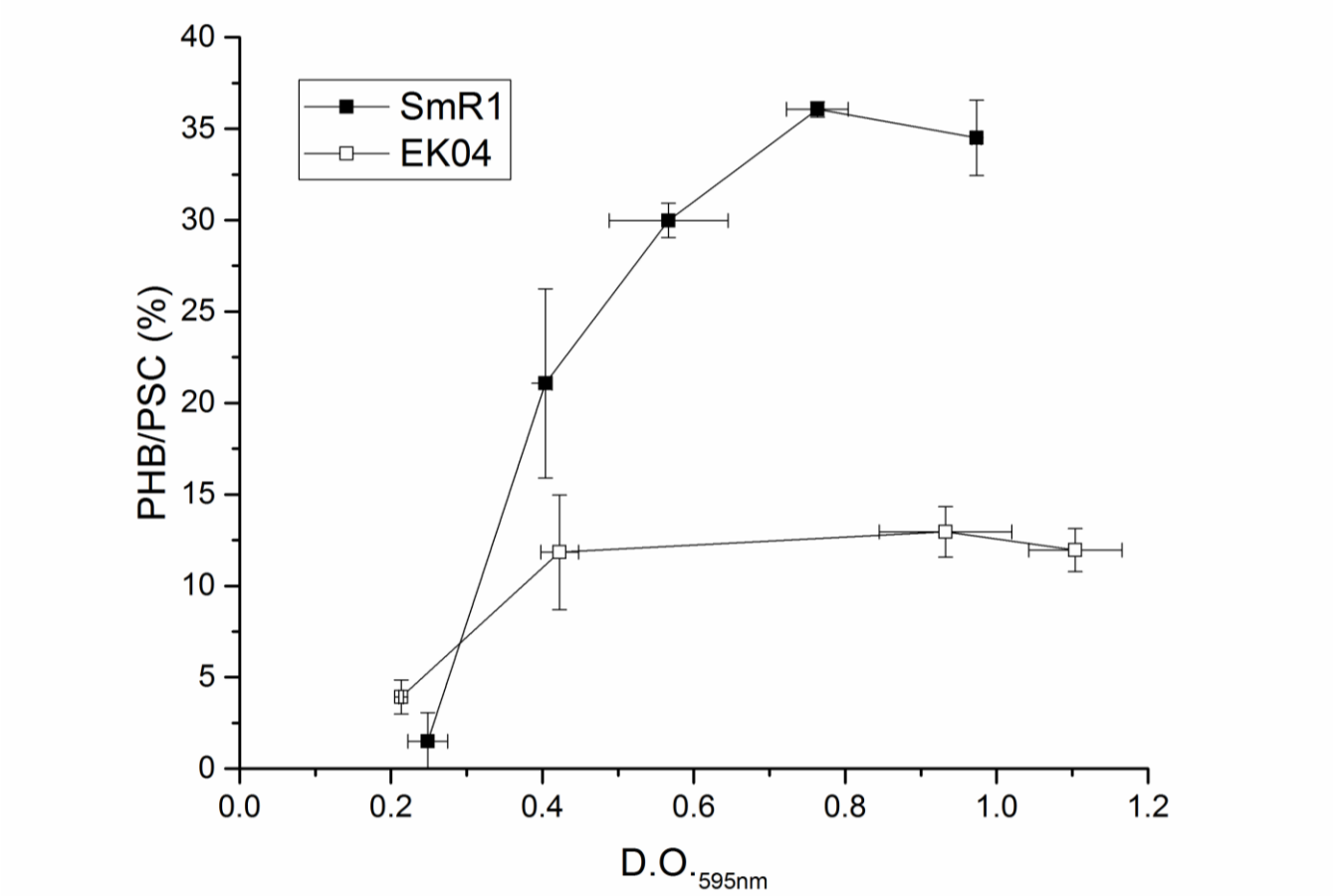
A partir de uma colônia em meio NFb-Malato sólido crescida em glucose por 24h, iniciou-se o experimento, sendo feito no total 4 transferências. Logo nas primeiras transferências a bactéria parece ser capaz de crescer até uma densidade similar a estirpe selvagem. Ao final do experimento a taxa de crescimento excede a da estirpe selvagem.

Figura 22 - Curva de crescimento do mutante EK04 e da estirpe parental *H. seropedicae* SmR1.



A estirpe mutante parece ter uma fase *lag* ligeiramente maior, mas apresenta uma taxa de crescimento superior a estirpe selvagem. O cultivo foi feito em frascos de 60mL contendo 10 mL de meio de cultivo agitados em *shaker* orbital a 120rpm, em temperatura de 30°C. O meio de cultivo consistiu em 10mL de NFb Glucose com 20mM de cloreto de amônio. A densidade ótica foi acompanhada pela medida em leitor de microplacas com volumes de 200 µL.

Figura 23 - Curva de produção de PHB da estirpe mutante EK04



A estirpe mutante exibe saturação em relação ao peso seco logo em D.O.$_{595nm}$ 0.4, já a estirpe selvagem atinge o máximo em D.O.$_{595nm}$ 0.8. Culturas foram cultivadas em frascos de 60mL contendo 10mL de NFb glucose, 20mM de cloreto de amônio, e foram incubadas em *shaker* orbital a 120rpm e 30°C. Após medida de densidade ótica em leitor de microplaca, as amostras são centrifugadas e liofilizadas. O peso seco das células (PSC) é determinado utilizando balança analítica e a quantidade de PHB determinada por cromatografia.

4.5 Sequenciamento do genoma da estirpe EK04

Para identificar as mutações ocorridas na estirpe EK04 e da estirpe não evoluída, chamada a partir de agora de EK01 (SmR1 transformado com pEK16) utilizou-se plataforma NGS Illumina MiSeq 2000. Os reads resultantes foram mapeados contra o genoma do SmR1 (PEDROSA et al., 2011) utilizando software CLCbio da QIAGEN®. Os polimorfismos foram identificados pelo mesmo software.

Tabela 10 - Número e tipo de variantes encontrados no sequenciamento.

	SNV	MNV	Deleção	Inserção	Total	Intergênicas
EK01 total	80	15	62	38	195	53
EK04 total	84	18	66	40	208	61
EK01 c/troca de a.a.	48	7	44	22	121	-
EK04 c/troca de a.a.	49	7	45	22	123	-

Polimorfismos de um nucleotídeo (SNV), múltiplos nucleotídeos (MNV), deleção e inserção, encontrados em EK01 e EK04. Também se encontram explicitados os polimorfismos não intergênicos que resultam em troca de aminoácido ou mudança de *frame* destas mesmas estirpes.

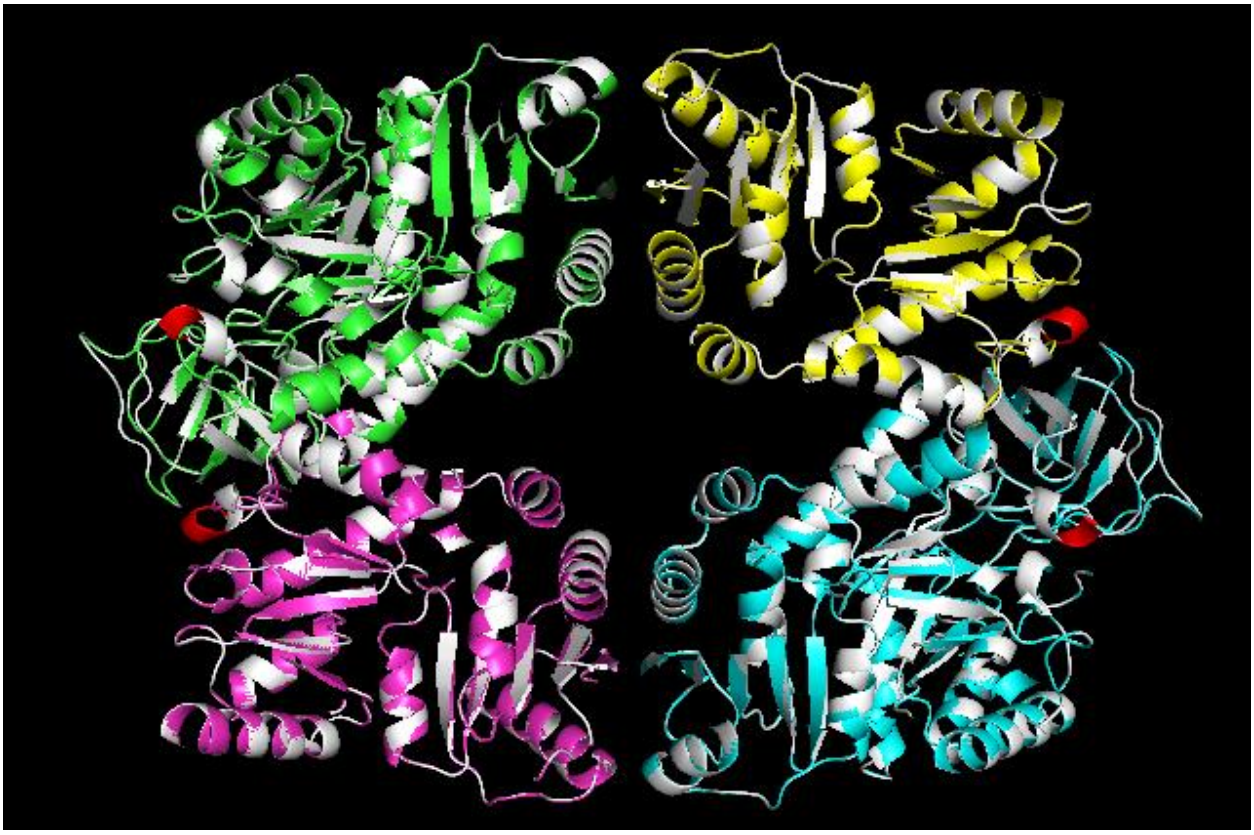
É notável a quantidade de mutações encontradas já na estirpe EK01, a maioria presentes também na estirpe EK04. Dentre os genes mutados encontram-se diversos fatores regulatórios, enzimas do metabolismo de lipídeos e carboidratos, permeases e diversos transportadores ABC, sistemas sensores de dois componentes (histidina quinase), proteínas ligadas a replicação, transcrição e reparo do DNA (DNA polimerase 3, RNA polimerase (*rpoC*), transposase, enzimas de reparo ao dano U.V.) além de genes relacionados a quimiotaxia (cheW e sensores transmembrana para quimiotaxia). Evidencia-se aqui uma resposta de estresse coordenada possivelmente por RpoS, fator de transcrição sigma induzido em situações de estresse, que por sua vez induz transcrição de polimerases do tipo IV além de proteínas que evitam sua degradação.(FOSTER, 2007).

A estirpe EK04 apresentou duas mutações exclusivas, uma delas em uma proteína hipotética conservada no gene Hsero_3185, um SNV G para A, que resulta na substituição de uma prolina por serina (Pro88Ser). A outra mutação ocorreu na região codificante do gene *pykA* que codifica a enzima piruvato quinase. Esta enzima teve ao todo 9 nucleotídeos deletados de sua sequência, resultando na subtração de 3 aminoácidos (isoleucina287, valina288 e aspargina289) que se situam entre a interface da estrutura oligomérica formada pela proteína.

É possível que a mutação em *pykA* diminua o fluxo de carbono pelo ciclo do ácido cítrico, provocando um acúmulo de intermediários glicolíticos, que são então desviados para reações de acúmulo de biomassa (lipídeos, polissacarídeos, aminoácidos e PHB). Gupta e colaboradores em 2010 observaram efeito parecido no tempo de geração de *E. coli* expressando uma piruvato quinase mutante na região dita ISCD (*inter-subunit contact domain*). Os autores argumentam que o fenômeno advém da perturbação da regulação alostérica por parte da molécula fosfoenolpiruvato, que estabiliza dímeros inativos da proteína em tetrâmeros com atividade (GUPTA et al., 2010). É possível que o efeito observado em EK04 tenha a mesma origem.

O produto de *pykA*, que tem 39% de identidade de sequência com a PKM2 (piruvato quinase humana) utilizada por Gupta *et. al*, teve sua possível estrutura 3D inferida utilizando a plataforma de modelagem estrutural SWISS-MODEL (**Figura 24**) (SCHWEDE et al., 2003) utilizando a estrutura de *pykA* de *Geobacillus stearothermophilus* (id 2e28.1) que possui 41,88% de identidade com a sequência da piruvato quinase de *H. seropedicae* SmR1. De fato, a mutação determinada por sequenciamento encontra-se em uma região de contato entre subunidades do tetrâmero, corroborando a hipótese de que esta deleção poderia permitir o crescimento da estirpe em glucose, na presença de 6PGDH, através de perturbação de regulação alostérica.

Figura 24 - Modelo estrutural inferido para a proteína PykA (Δ I287,V288,N289) de *H. seropedicae* SmR1 sobreposta a estrutura da PykA selvagem.



A estrutura 3D do modelo foi inferida utilizando plataforma SWISS-MODEL usando piruvato quinase A de *Geobacillus stearothermophilus* (id 2e28.1) como molde. Cada cadeia da estrutura mutante encontra-se colorida, com a estrutura selvagem (em branco) sobreposta. Em vermelho encontram-se os resíduos deletados no mutante. Visualização do modelo foi feita em software PyMol.

4.6 Avaliação de estresse oxidativo pela medida de espécies reativas de oxigênio (ROS)

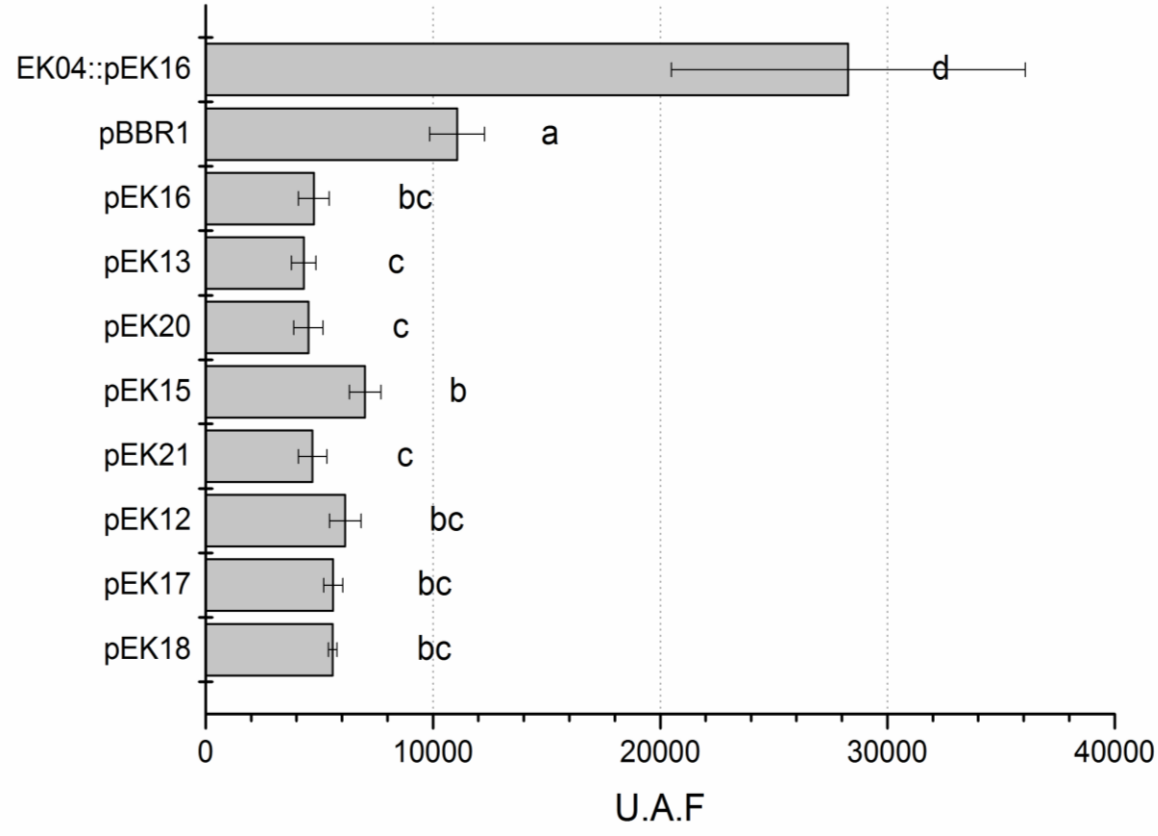
O NADPH pode ter um efeito ambíguo no estresse oxidativo. Por um lado ele mantém um ambiente reduzido na célula além de ser cofator para glutationa redutase (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Por outro lado, o excesso de NADPH em um ambiente incapaz de reestabelecer o balanço ideal pode sobrecarregar a cadeia respiratória e gerar espécies reativas de oxigênio pela transferência de elétrons ao O_2, formando peróxido e superóxido (NAKAMURA; BHATNAGAR; SADOSHIMA, 2012).

As estirpes recombinantes foram analisadas quanto a produção de espécies reativas de oxigênio. Em estudos anteriores (BADYAEV, 2005; REDDY; LINDNER; WENDISCH, 2015; TAKENO et al., 2016), foi demonstrado que gerar desbalanço no equilíbrio de cofatores oxidados e reduzidos (NADPH/$NADP^+$ por exemplo) favorece o aparecimento de mutantes que de alguma forma retornam o balanço de cofatores para um patamar mais favorável ao crescimento celular.

Para determinar se houve um desbalanço no estado oxidativo da celula realizou-se um ensaio para comparar os níveis de ROS entre as construções recombinantes e a estirpe selvagem. A Figura 25 mostra os resultados dos ensaios feitos com sonda DCF em culturas no final da fase exponencial. Note-se que as estirpes pEK13 e pEK16 alcançaram apenas o nível de DO_{595} igual a 0.251 e 0.634, respectivamente.

A estirpe mutante EK04 exibe níveis de ROS aumentados mesmo em relação ao mutante. Este é um provável efeito da mutação que restaura o crescimento da estirpe, demonstrando que o retardamento no crescimento das estirpes recombinantes não se deve ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio.

Figura 25 – Determinação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de citometria de fluxo em diferentes estirpes derivadas de *H. seropedicae* SmR1



As diferentes estirpes foram cultivadas até o início da fase estacionária e incubadas com sonda DCF por 1h a 37°C e analisadas em citômetro de fluxo utilizando canal FL1-H (533/30nm). Estirpes recombinantes apresentam níveis de ROS menores que a estirpe selvagem. Mutante EK04 exibe aumento nos níveis de ROS. Letras indicam médias estatisticamente equivalentes, determinadas por teste de Tukey, e $P<0.05$.

4.7 Perfil da produção de PHB medido por metanólise e cromatografia gasosa

Para obter valores quantitativos e validar os resultados obtidos pela seleção inicial foi realizada a determinação de PHB por cromatografia gasosa e medida de glucose consumida. Os resultados encontram-se resumidos na **Tabela 11.**

Tabela 11 - Porcentagem de PHB por peso seco, produtividade, rendimento de biomassa e PHB por massa de substrato consumido de construções portando gene *gnd*.

Estirpe/ Construção	PHB/PSC	(PHB) $mg.L^{-1}h^{-1}$	(PSC) $mg.L^{-1}h^{-1}$	(%) $Y_{X/S}$	(%) $Y_{P/S}$
EK04/pEK16	22% ± 1%	6.30 ± 0.59	28.84 ± 3.2	25.34 ± 1.29	5.54 ± 0.09
SmR1	35% ± 2%	5.23 ± 0.41	15.16 ± 0.6	15.07 ± 1.07	5.2 ± 0.44
SmR1/pEK21	32% ± 3%	3.14 ± 0.05	9.97 ± 0.94	11.48 ± 0.75	3.63 ± 0.17
SmR1/pEK16	17% ± 3%	0.19 ± 0.07	1.07 ± 0.36	1.43 ± 0.51	0.25 ± 0.11
SmR1/pEK20	26% ± 7%	1.37 ± 1.27	9.14 ± 2.29	11.33 ± 2	1.84 ± 1.78
SmR1/pEK13	17% ± 1%	1.07 ± 0.22	6.29 ± 164	8.52 ± 2.13	1.46 ± 0.32

Tabela apresentando valores de peso seco celular (PSC), produtividade de PHB (mg por litro hora), produtividade de biomassa (mg de PSC por litro hora), além de rendimento de biomassa $Y_{X/S}$ (massa de biomassa produzida por massa de glucose consumida) e rendimento de PHB $Y_{P/S}$ (massa de PHB produzida por massa de glucose consumida).

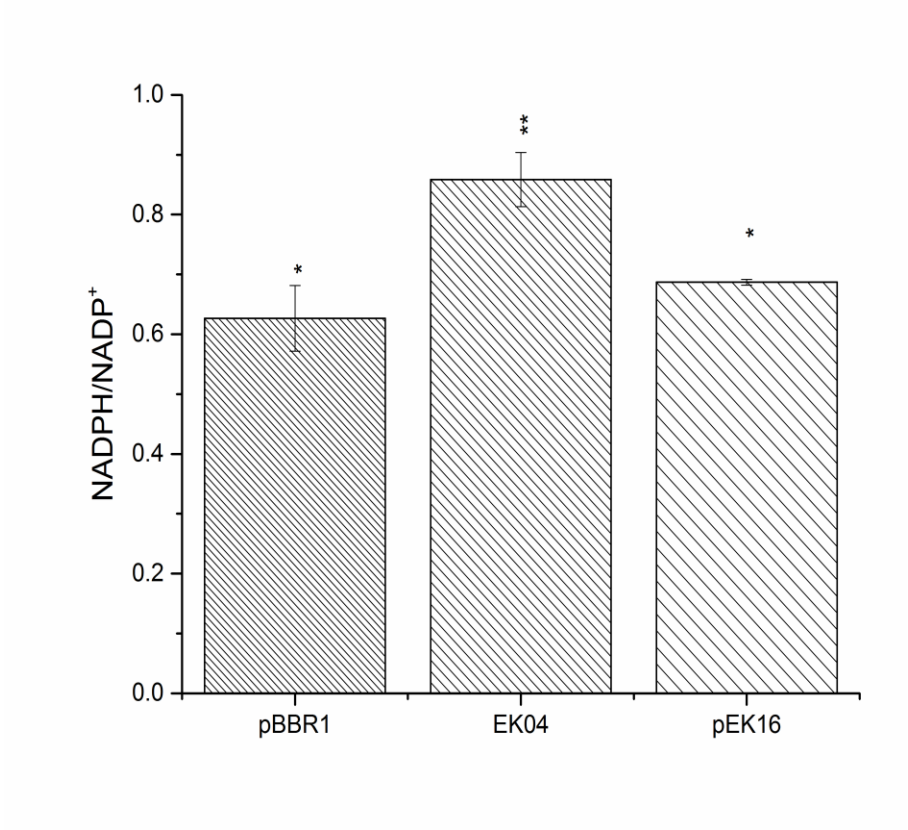
Apesar do percentual de PHB em relação ao peso seco total da cultura sofrer queda em todas as estirpes recombinantes, a estirpe mutante apresenta uma produtividade de PHB em torno de 20% maior, e uma produtividade de biomassa 90% maior em relação ao selvagem. É necessário ter-se em mente o fato de que as estirpes recombinantes atingem densidades óticas menores que a estirpe selvagem. Em densidades óticas similares a estirpe pEK16(P*phaC1-gnd*) ou seja, valores em torno de 0,2, a estipe selvagem ainda não iniciou o acúmulo de PHB.

É notável também o maior rendimento em biomassa em relação a massa de glicose consumida. Este resultado é inesperado visto que a atividade da enzima 6PGDH acaba liberando uma molécula de CO_2 a mais do que as vias nativas de *H. seropedicae*. Este aumento é ainda mais interessante pois ocorre sem perda no rendimento de produto por substrato consumido.

4.8 Dosagem da relação NADPH/NADP$^+$

Avaliou-se a razão entre o dinucleotídeo reduzido e oxidado de estirpes selvagem e mutante expressando pEK16 assim como estirpe selvagem contendo somente o vetor pBBR1MCS-3 vazio.

Figura 26 - Razão NADPH/NADP$^+$ de estirpe mutante e selvagem expressando pEK16 e controle selvagem com vetor vazio.



Os símbolos (*) indicam grupos com medias equivalentes por teste de Tukey, com p<0.05.

A estirpe selvagem tanto expressando pEK16 como somente com pBBR1MCS-3 mantem balanço oxidativo similar. A estirpe mutante EK04 exibe um aumento de aproximadamente 30%. Provavelmente o aumento no nível de ROS (Figura 25) da estirpe selvagem se deva a uma maior concentração de NADPH.

A estirpe selvagem pEK16, e muito provavelmente as demais estirpes recombinantes, mantem o balanço redox constante. É possível que a bactéria limite a entrada de carbono para evitar uma perturbação no equilíbrio redox. A estirpe mutante, que consome mais carbono, acaba acumulando mais equivalentes reduzidos.

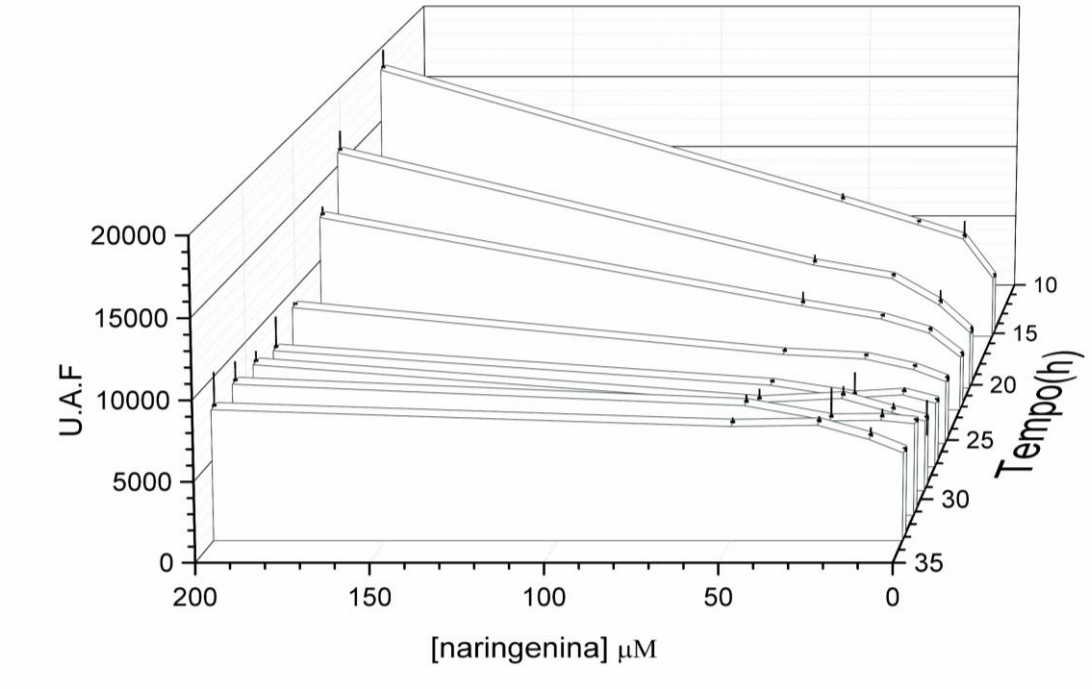
4.9 Utilização de promotor induzível para expressão de *gnd*

Fusão transcricional do promotor induzível com GFP

A utilização do promotor do operon *fde* de *H.seropedicae* é promissora e pode ser uma solução para a expressão de genes excessivamente tóxicos ou que prejudiquem o crescimento da bactéria em geral. Como mostra a Figura 27, a adição de naringenina no cultivo da estirpe de *H. seropedicae* portando a fusão P*fdeA*-*gfp* causa um aumento na fluorescência verde dependente da concentração de naringenina. Porém como o operon induzido é responsável pela degradação do indutor, a expressão do gene repórter em todas as concentrações iniciais de naringenina é reduzida a um nível basal após aproximadamente 24 h do inóculo.

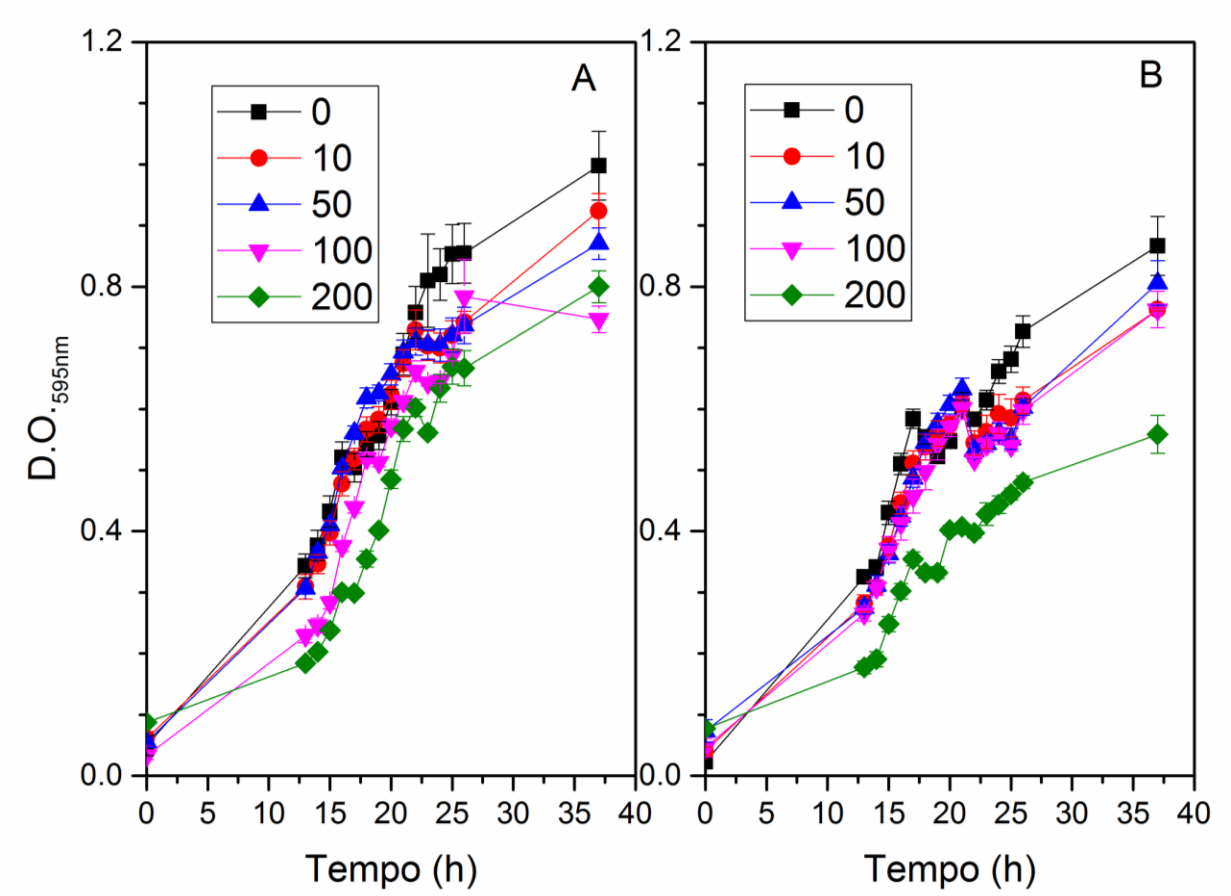
A indução afeta o fenótipo da estirpe portando o pEK14 (P*fdeA*-*gnd*), retardando o crescimento em 200 µM de naringenina, especialmente em baixo amônio (Figura 28). O perfil de produção de PHB sugere que provavelmente a maior indução do gene *gnd* por concentrações crescentes de naringenina favorece a síntese do polímero (Figura 29), confirmando a viabilidade da utilização do promotor P*fdeA* para indução da expressão de genes heterólogos.

Figura 27 - Perfil da intensidade de fluorescência pelo tempo e pela concentração de naringenina inicial no meio para estirpes expressando *gfp* com transcrição controlada por promotor sensível a naringenina.



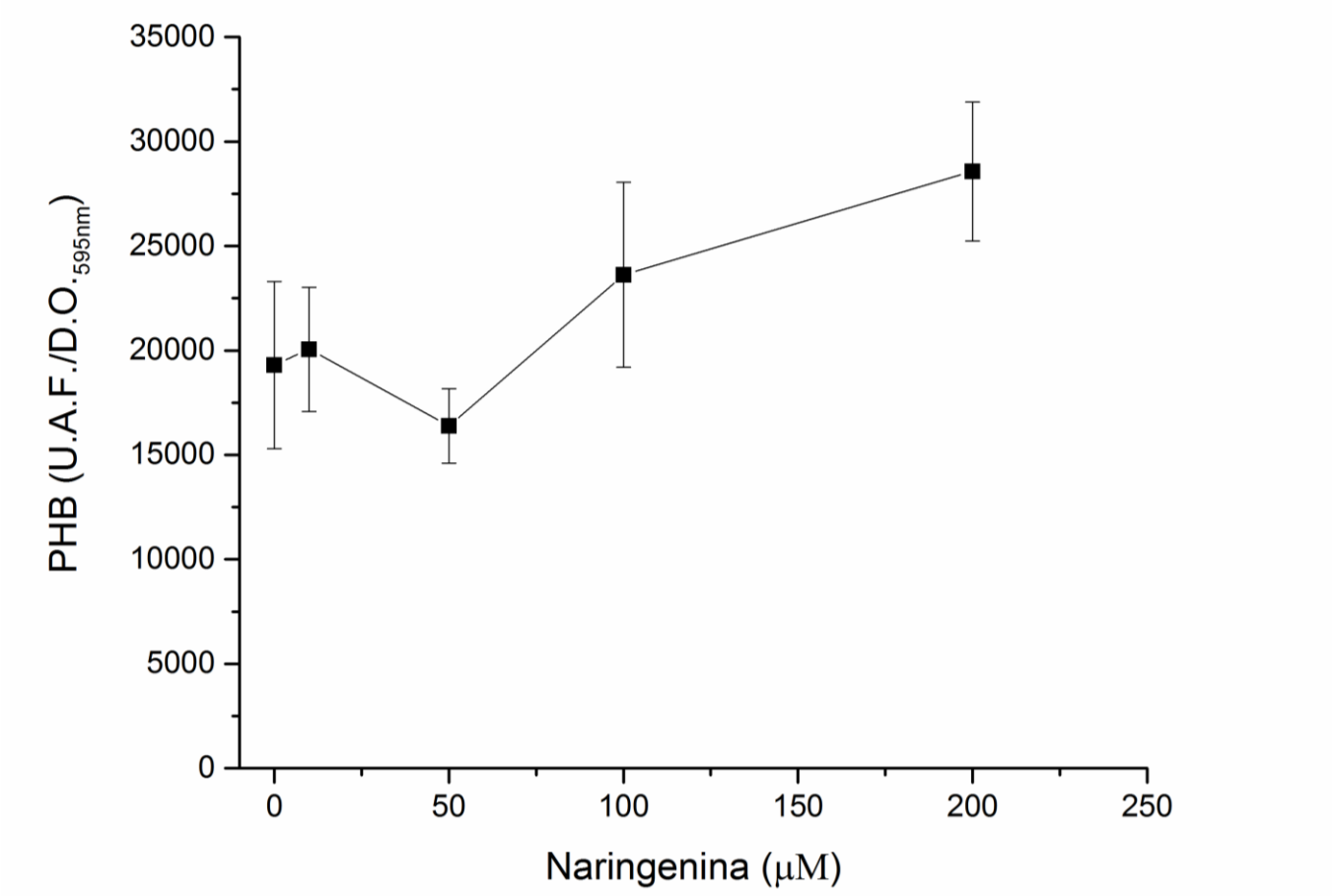
A construção é capaz de ativar a expressão do gene repórter, mas como ocorre simultaneamente a ativação do operon de degradação de flavonoides, o sinal cai até atingir uma expressão basal após aproximadamente 24h de cultivo. O cultivo foi realizado em frascos de 60mL contendo 10mL de NFbHP com glucose como fonte de carbono, 20mM de NH_4Cl, e concentrações crescentes de naringenina. O cultivo foi realizado em *shaker* orbital mantido a 30°C e 120rpm. As culturas foram então analisadas ao longo do tempo através de citometria de fluxo em canal FL1-H (533/30nm).

Figura 28 - Perfil de crescimento da estirpe de *H. seropedicae* SmR1 contendo plasmídeo pEK14 em diferentes concentrações de naringenina.



Fenótipo da expressão de *gnd* modulada por promotor P*fdeA* sensível a naringenina. A degradação do flavonoide desativa a expressão do gene no final do crescimento. O experimento foi realizado em microplaca de 96 poços contendo 200µL de meio NFb glucose, contendo 20mM (A) e 5mM (B) de cloreto de amônio, além de concentrações crescentes de naringenina. A placa foi incubada em *shaker* orbital mantido a 30 °C e a uma rotação de 120rpm. A densidade ótica foi acompanhada em intervalos regulares utilizando leitor de microplacas.

Figura 29 - Perfil de produção de PHB da estirpe *H. seropedicae* SmR1 contendo o pEK14 tratada com diferentes concentrações de neringenina.



Culturas de *H. seropedicae* SmR1, em microplaca de 96 poços, foram inoculadas e cultivadas em *shaker* orbital a 30°C e 120rpm, em meio NFb glucose contendo 5mM de cloreto de amônio, e concentrações crescentes de naringenina. As culturas foram então analisadas por citometria de fluxo utilizando corante vermelho Nilo.

5. CONCLUSÕES

a) A expressão de genes para aumento da concentração intracelular de cofator NADPH que afetam o metabolismo central de carbono pode afetar severamente o crescimento.
b) Tais estirpes acumulam PHB de forma precoce. Ocorre um desequilíbrio metabólico que impede o crescimento normal da cultura.
c) Em casos de estresse induzido, é possível realizar experimentos de evolução induzida para obtenção de mutantes que contornam o problema do baixo crescimento.
d) O perfil de expressão de genes do metabolismo central é um dos principais fatores que influenciam no sucesso da estratégia e, portanto, deve ser considerado cuidadosamente.

6. PERSPECTIVAS

a) Validação da mutação em *pykA* e estudo de outras características fisiológicas (fixação de nitrogênio, colonização de plantas).
b) Análise em biorreator de bancada para cultivo de alta densidade vai determinar como o *H. seropedicae* SmR1 se compara a outras estirpes em relação a produção de PHB.
c) Ensaios de análise de fluxo metabólico com carbono marcado para determinação de estratégias futuras (bloqueio de vias que competem com as vias do produto).
d) Determinação do tempo resposta de construção com promotor induzível
e) Ensaio de produção de PHB de estirpes contendo promotor induzível em duas fases; crescimento e produção de PHB com expressão de gene heterólogos induzida.

7. REFERÊNCIAS

AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. **Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choiceJournal of Chemical Technology and Biotechnology**John Wiley & Sons, Ltd., , 23 abr. 2010. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.2392>. Acesso em: 21 jun. 2016

ALI, I.; JAMIL, N. Polyhydroxyalkanoates: Current applications in the medical field. **Frontiers in Biology**, v. 11, n. 1, p. 19–27, 31 fev. 2016.

ALVES, L. P. S. et al. Backup Expression of the PhaP2 Phasin Compensates for phaP1 Deletion in Herbaspirillum seropedicae, Maintaining Fitness and PHB Accumulation. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 739, 2016.

ANDERSON, A. J. et al. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450–72, 1990.

ANDREOZZI, S. et al. Identification of metabolic engineering targets for the enhancement of 1,4-butanediol production in recombinant E. coli using large-scale kinetic models. **Metabolic Engineering**, v. 35, p. 148–159, 2016.

AURIOL, C. et al. Stress-induced evolution of Escherichia coli points to original concepts in respiratory cofactor selectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1278–1283, 25 jan. 2011.

BADYAEV, A. V. Stress-induced variation in evolution: from behavioural plasticity to genetic assimilation. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 272, n. 1566, p. 877–886, 2005.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of Herbaspirillum sropedicae gen. nov., sp. now., a root- associated nitrogen-fixing bacterium. **International journal of systematic bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1 jan. 1986.

BECKER, J. et al. Metabolic flux engineering of l-lysine production in Corynebacterium glutamicum-over expression and modification of G6P dehydrogenase. **Journal of**

Biotechnology, v. 132, n. 2, p. 99–109, 2007.

BENTLEY, F. K.; ZURBRIGGEN, A.; MELIS, A. Heterologous Expression of the Mevalonic Acid Pathway in Cyanobacteria Enhances Endogenous Carbon Partitioning to Isoprene. **Molecular Plant**, v. 7, n. 1, p. 71–86, 2014.

BILLIS, K. et al. Comparative Transcriptomics between Synechococcus PCC 7942 and Synechocystis PCC 6803 Provide Insights into Mechanisms of Stress Acclimation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109738, 23 out. 2014.

BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5331, p. 1453–62, 5 set. 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAUNEGG, G. et al. A Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Poly-b-hydroxybutyric Acid in Microbial Biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 29–37, 1978.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 2000.

CANONACO, F. et al. Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in Escherichia coli and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 204, n. 2, p. 247–252, nov. 2001.

CHAN, W.-T. et al. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of Escherichia coli. **Bioscience reports**, v. 33, n. 6, p. 931–937, 2013.

CHEN, X.; LI, S.; LIU, L. Engineering redox balance through cofactor systems. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 337–343, 2014.

CHEON, S. et al. Recent trends in metabolic engineering of microorganisms for the

production of advanced biofuels. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 35, p. 10–21, 2016.

CHIN, J. W.; CIRINO, P. C. Improved NADPH supply for xylitol production by engineered Escherichia coli with glycolytic mutations. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 2, p. 333–341, 2011.

EGGERS, J.; STEINBÜCHEL, A. Poly(3-hydroxybutyrate) degradation in Ralstonia eutropha H16 is mediated stereoselectively to (S)-3-hydroxybutyryl coenzyme a (CoA) via crotonyl-CoA. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 14, p. 3213–3223, jul. 2013.

FARMER, W. R.; LIAO, J. C. Improving lycopene production in Escherichia coli by engineering metabolic control. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 533–537, 2000.

FERNÁNDEZ ESCAPA, I.; FERNÁNDEZ ESCAPA, I. Estudio del metabolismo de polihidroxialcanoatos en Pseudomonas putida: implicaciones fisiológicas y aplicaciones en el desarrollo de bioplásticos funcionalizados. 2012.

FOSTER, P. L. Stress-induced mutagenesis in bacteria. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 5, p. 373–97, 2007.

FUHRER, T.; SAUER, U. Different biochemical mechanisms ensure network-wide balancing of reducing equivalents in microbial metabolism. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2112–21, abr. 2009.

GAO, X. et al. Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 6, p. 768–774, 2011.

GIBON, Y.; LARHER, F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium. **Analytical biochemistry**, v. 251, n. 2, p. 153–157, 1997.

GUPTA, V. et al. Dominant negative mutations affect oligomerization of human pyruvate kinase M2 isozyme and promote cellular growth and polyploidy. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 22, p. 16864–73, 28 maio 2010.

HATTI-KAUL, R. et al. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals – a cradle-to-grave perspective. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 119–124, 2007.

HUIJBERTS, G. N. M. et al. Gas-Chromatographic Analysis of Poly(3-Hydroxyalkanoates) in Bacteria. **Biotechnology Techniques**, v. 8, n. 3, p. 187–192, 1994.

JENDROSSEK, D. **Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes)Journal of Bacteriology**, 15 maio 2009. Disponível em: <http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.01723-08>. Acesso em: 21 jun. 2016

JENDROSSEK, D.; HANDRICK, R. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. **Annual review of microbiology**, v. 56, n. 1, p. 403–32, out. 2002.

JINGHUA TSAI CHANG; GREEN, C. B. R.; WOLF, R. E. Inhibition of translation initiation on Escherichia coli gnd mRNA by formation of a long-range secondary structure involving the ribosome binding site and the internal complementary sequence. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 22, p. 6560–6567, nov. 1995.

KADOWAKI, M. A. S. et al. Identification and characterization of PhbF: a DNA binding protein with regulatory role in the PHB metabolism of Herbaspirillum seropedicae SmR1. **BMC microbiology**, v. 11, n. 1, p. 230, 2011.

KIDBY, D. K.; DAVIDSON, D. J. A convenient ferricyanide estimation of reducing sugars in the nanomole range. **Analytical Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 321–325, set. 1973.

KITATANI, T. et al. Structure of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Synechococcus PCC7942 complexed with NADP. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 62, n. 4, p. 315–319, 1 abr. 2006.

LAWRENCE, A. G. et al. Transcriptional analysis of Ralstonia eutropha genes related to poly-(R)-3-hydroxybutyrate homeostasis during batch fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 5, p. 663–672, 28 set. 2005.

LE FOURN, V. et al. CHO cell engineering to prevent polypeptide aggregation and improve therapeutic protein secretion. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 91–102, 2014.

LEE, J.-N.; SHIN, H.-D.; LEE, Y.-H. Metabolic engineering of pentose phosphate pathway in Ralstoniaeutropha for enhanced biosynthesis of poly-beta-hydroxybutyrate. **Biotechnology progress**, v. 19, n. 5, p. 1444–1449, 2003.

LEE, W. H. et al. Enhanced production of ??-caprolactone by overexpression of NADPH-regenerating glucose 6-phosphate dehydrogenase in recombinant Escherichia coli harboring cyclohexanone monooxygenase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 329–338, 23 jul. 2007.

LI, Z.-J. et al. Overexpression of NAD kinase in recombinant Escherichia coli harboring the phbCAB operon improves poly(3-hydroxybutyrate) production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 939–47, jul. 2009.

LIM, S.-J. et al. Amplification of the NADPH-related genes zwf and gnd for the oddball biosynthesis of PHB in an E. coli transformant harboring a cloned phbCAB operon. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 93, n. 6, p. 543–549, 2002.

MA, J.; WANG, Y.; WANG, Y. A simple , fast and efficient method for cloning blunt DNA fragments. v. 12, n. 26, p. 4094–4097, 2013.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MARIN, A. M. et al. Naringenin degradation by the endophytic diazotroph Herbaspirillum seropedicae SmR1. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 1, p. 167–175, 2013.

MARIS, A. J. A. VAN et al. **Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: Implications for industrial fermentation processesMetabolic Engineering**, 2004.

MATSUMOTO, K.; TAGUCHI, S. Enzyme and metabolic engineering for the production of novel biopolymers: Crossover of biological and chemical processes. **Current Opinion**

in Biotechnology, v. 24, n. 6, p. 1054–1060, 2013.

MAYER, K. M.; ARNOLD, F. H. A colorimetric assay to quantify dehydrogenase activity in crude cell lysates. **Journal of biomolecular screening : the official journal of the Society for Biomolecular Screening**, v. 7, n. 2, p. 135–140, 2002.

NAKAMURA, M.; BHATNAGAR, A.; SADOSHIMA, J. **Overview of pyridine nucleotides review seriesCirculation Research**, 2012.

NASOFF, M. S.; BAKER, H. V; JR, R. E. W. DNA sequence of the Eschericia coli gene , gnd , for 6- phosphoglueonate dehydrogenase. v. 21, p. 253–264, 1984.

NG, C. Y. et al. Rational Design of a Synthetic Entner-Doudoroff Pathway for Improved and Controllable NADPH Regeneration. **Metabolic Engineering**, v. 29, p. 86–96, 2015.

NINFA, A. J.; JIANG, P. **PII signal transduction proteins: Sensors of ??-ketoglutarate that regulate nitrogen metabolismCurrent Opinion in Microbiology**, 2005.

NØRHOLM, M. H. H. A mutant Pfu DNA polymerase designed for advanced uracil-excision DNA engineering. **BMC biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 21, 2010.

O'BRIEN, E. J.; MONK, J. M.; PALSSON, B. O. Using Genome-scale Models to Predict Biological Capabilities. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 971–987, 2015.

OHTA, K. et al. Metabolic engineering of Klebsiella oxytoca M5A1 for ethanol production from xylose and glucose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2810–2815, 1991.

PEDROSA, F. O. et al. Genome of herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 5, 2011.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasilense by nifA and ntrC (glnG) type genes. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 55, n. 1, p. 95–101, jun. 1984.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly-??-hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in

Alcaligenes eutrophus H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 26, p. 15298–15303, 1989.

PHILIP, S.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. **Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable polymers with a range of applicationsJournal of Chemical Technology and Biotechnology**John Wiley & Sons, Ltd., , mar. 2007. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1667>. Acesso em: 21 jun. 2016

PRIEFERT, H. et al. Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygenase of Rhodococcus sp. I24. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 168–76, 2004.

RAAB, R. M.; TYO, K.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolic Engineering. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 100, p. 1–17, 2005.

REDDY, G. K.; LINDNER, S. N.; WENDISCH, V. F. Metabolic engineering of an ATP-neutral embden-meyerhof-parnas pathway in Corynebacterium glutamicum: Growth restoration by an adaptive point mutation in NADH dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 6, p. 1996–2005, 2015.

SACOMBOIO, E. N. M. **Estudo da promoção de polihidroxibutirato por Herbaspirillum seropedicae SmR1 e seu mutante ntrC em diferentes fontes de carbono e relações carbono/nitrogênio**. [s.l.] UFPR, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D, W. **Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory ManualCold Spring Harboc Laboratory Press**, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24532655>

SÁNCHEZ, A. M. et al. Effect of overexpression of a soluble pyridine nucleotide transhydrogenase (UdhA) on the production of poly(3-hydroxybutyrate) in Escherichia coli. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 2, p. 420–425, 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of**

America, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.

SCHWAB, S. et al. The glnAntrBC operon of Herbaspirillum seropedicae is transcribed by two oppositely regulated promoters upstream of glnA. **Canadian journal of microbiology**, v. 53, n. 1, p. 100–105, 2007.

SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 1 jul. 2003.

SHI, F. et al. Overexpression of NAD kinases improves the l-isoleucine biosynthesis in Corynebacterium glutamicum ssp. lactofermentum. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, n. 2, p. 73–80, 2012.

SHISHATSKAYA, E. I. et al. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 6, p. 2493–2502, 6 jun. 2008.

SIEDLER, S. et al. Novel biosensors based on flavonoid-responsive transcriptional regulators introduced into Escherichia coli. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 2–8, 2014.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A Broad Host Range Mobilization System for *In Vivo* Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

SOUZA, E. M. et al. Sequence and structural organization of a nifA-like gene and part of a nifB-like gene of Herbaspirillum seropedicae strain Z78. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 7, p. 1511–1522, 1 jul. 1991.

SPAANS, S. K. et al. NADPH-generating systems in bacteria and archaea. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 742, 2015.

STEPHANOPOULOS, G. Metabolic fluxes and metabolic engineering. **Metabolic engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–11, jan. 1999.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering:**

Principles and Methodologies. [s.l: s.n.]. v. 54

STEPHANOPOULOS, G.; SINSKEY, A. J. **Metabolic engineering - methodologies and future prospectsTrends in Biotechnology**, 1993.

TAKENO, S. et al. Engineering of corynebacterium glutamicum with an NADPH-generating glycolytic pathway for L-lysine production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7154–7160, 2010.

TAKENO, S. et al. L-Lysine production independent of the oxidative pentose phosphate pathway by Corynebacterium glutamicum with the Streptococcus mutans gapN gene. **Metabolic Engineering**, v. 37, p. 1–10, 2016.

TAMOI, M. et al. Enzymic and molecular characterization of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Synechococcus PCC 7942: resistance of the enzyme to hydrogen peroxide. **The Biochemical journal**, v. 316 (Pt 2, p. 685–690, 1996.

TIRAPELLE, E. F. et al. Identification of Proteins Associated with Polyhydroxybutyrate Granules from Herbaspirillum seropedicae SmR1 - Old Partners, New Players. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75066, 25 set. 2013.

TOKIWA, Y.; UGWU, C. U. **Biotechnological production of (R)-3-hydroxybutyric acid monomerJournal of Biotechnology**, 2007.

TRAINER, M. A.; CHARLES, T. C. The role of PHB metabolism in the symbiosis of rhizobia with legumes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 4, p. 377–386, 16 jul. 2006.

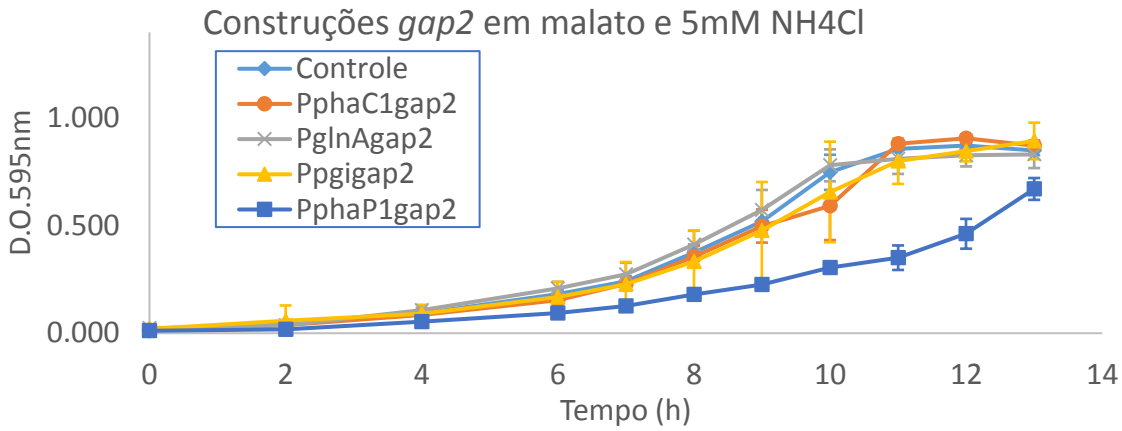
ZHAO, J. et al. Global metabolic response of Escherichia coli to gnd or zwf gene-knockout, based on 13C-labeling experiments and the measurement of enzyme activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 91–98, 2004.

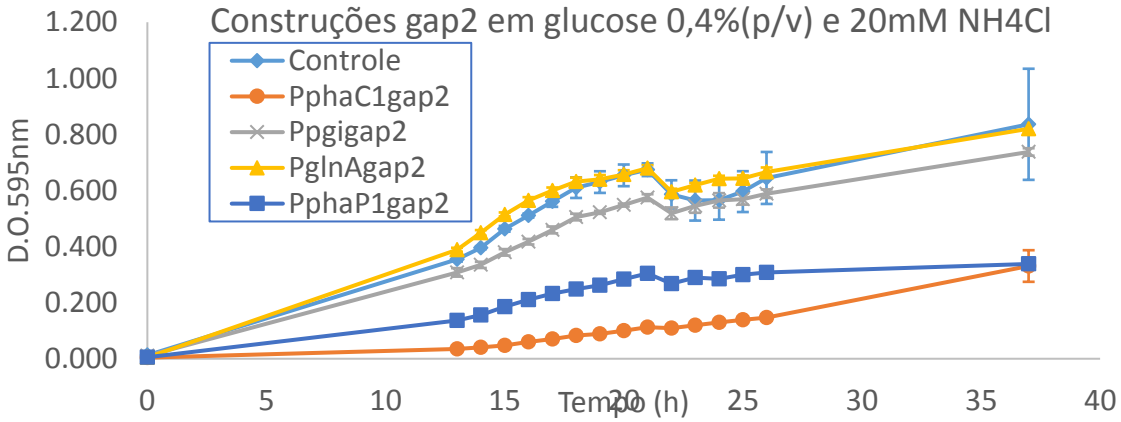
ZURIANI, R. et al. A high throughput Nile red fluorescence method for rapid quantification of intracellular bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnology and Bioprocess**

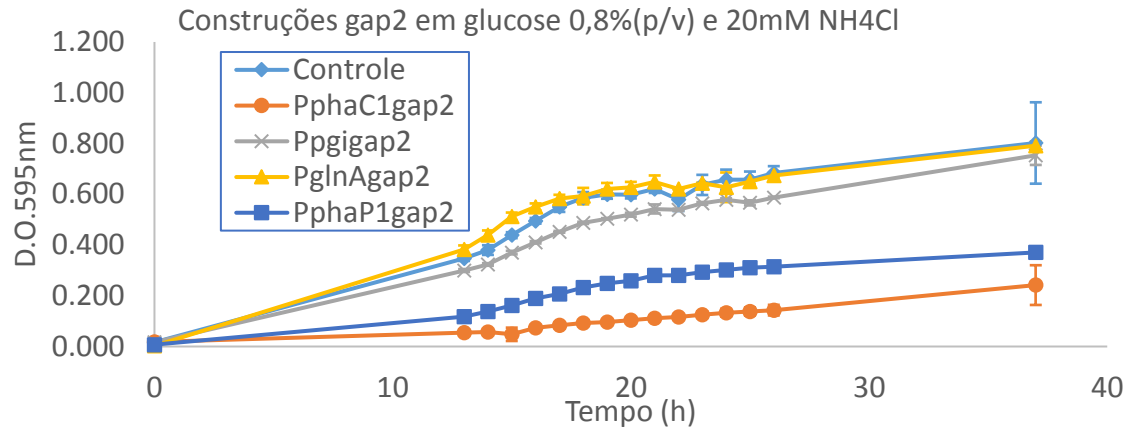
Engineering, v. 18, n. 3, p. 472–478, 29 jun. 2013.

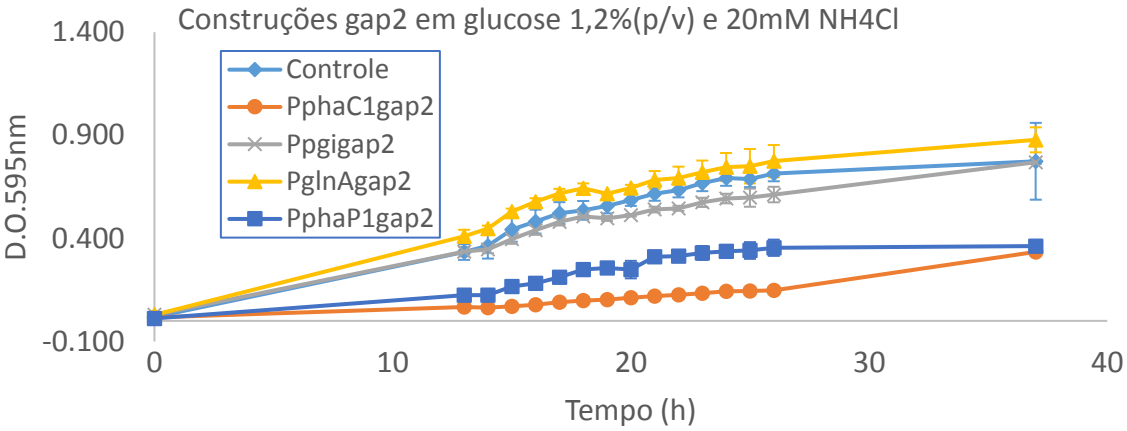
8. ANEXOS

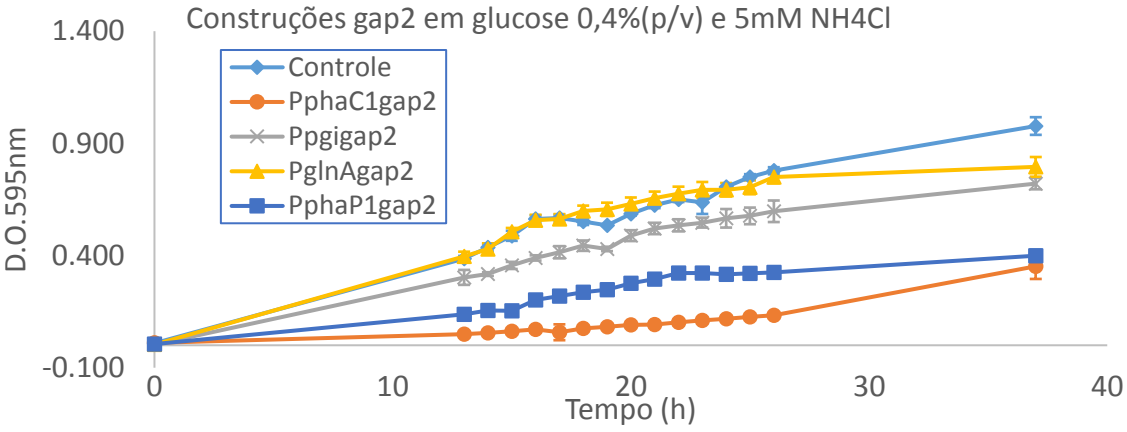
8.1 Perfil de crescimento de estirpes recombinantes em malato ou diferentes concentrações de glucose, em baixo e alto amônio.

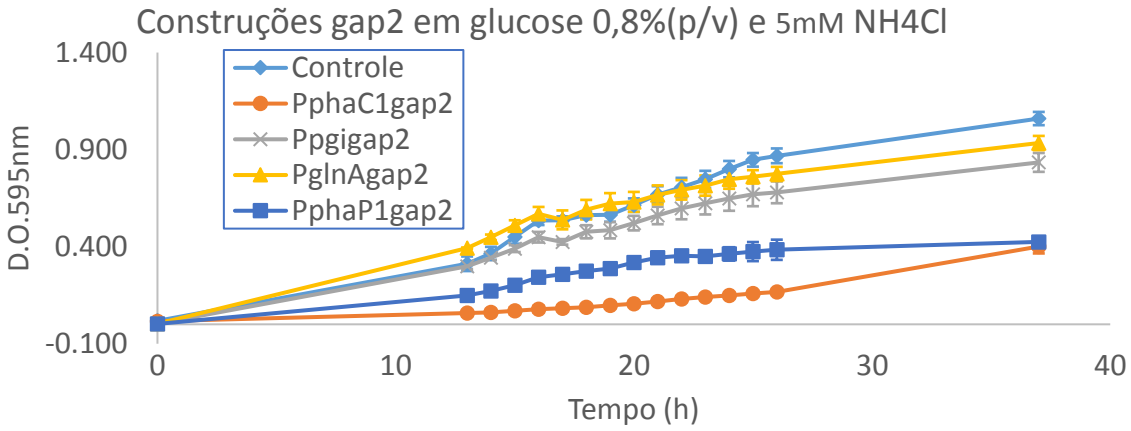


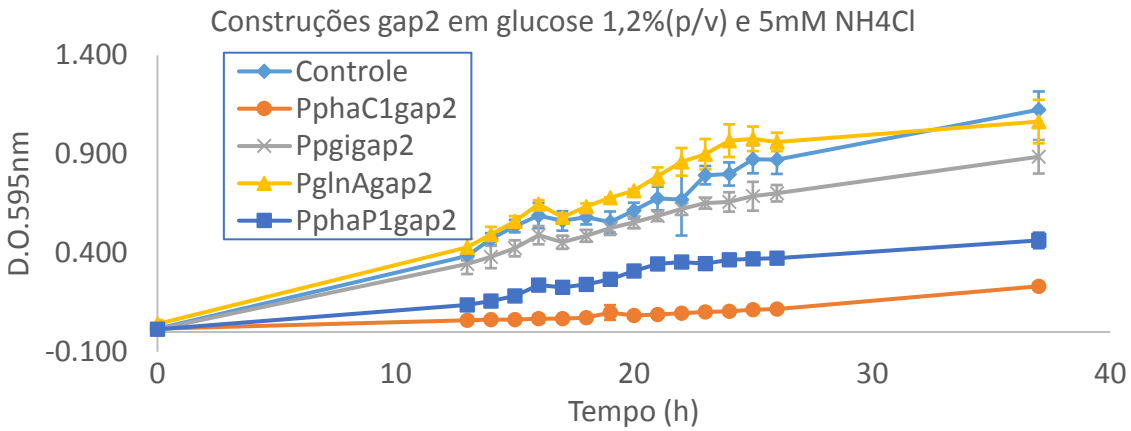


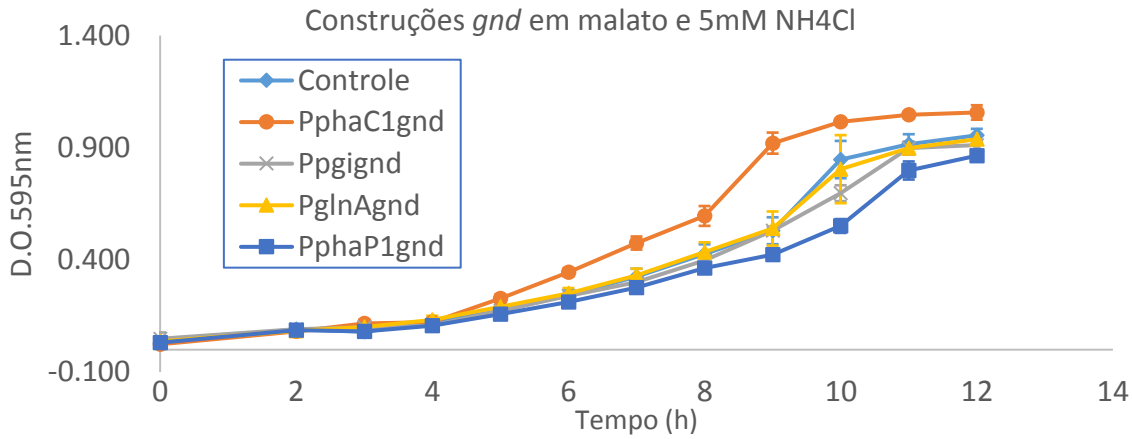

Construções gap2 em glucose 0,8%(p/v) e 20mM NH4Cl
D.O.595nm
1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
0
10
20
30
40
Tempo (h)
Controle
PphaC1gap2
Ppgigap2
PglnAgap2
PphaP1gap2

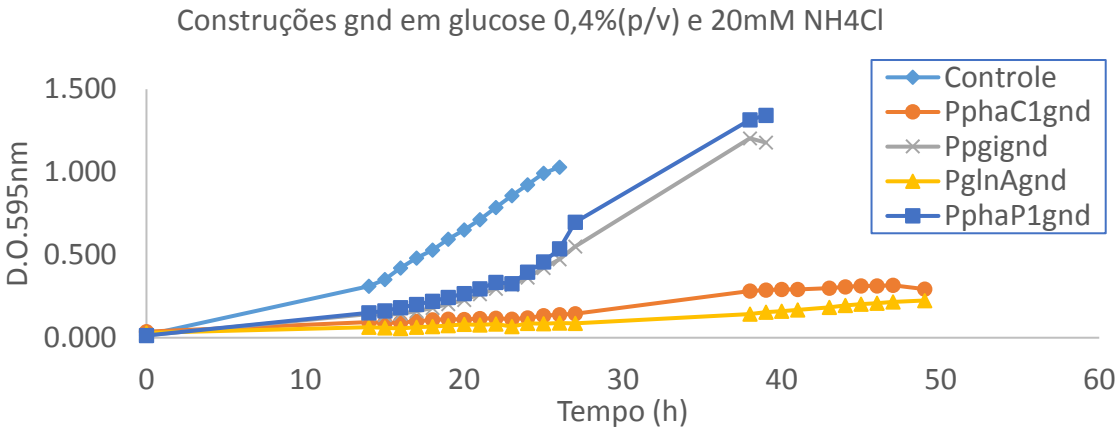

Construções gap2 em glucose 1,2%(p/v) e 20mM NH4Cl
D.O.595nm
1.400
0.900
0.400
-0.100
0
10
20
30
40
Tempo (h)
Controle
PphaC1gap2
Ppgigap2
PglnAgap2
PphaP1gap2

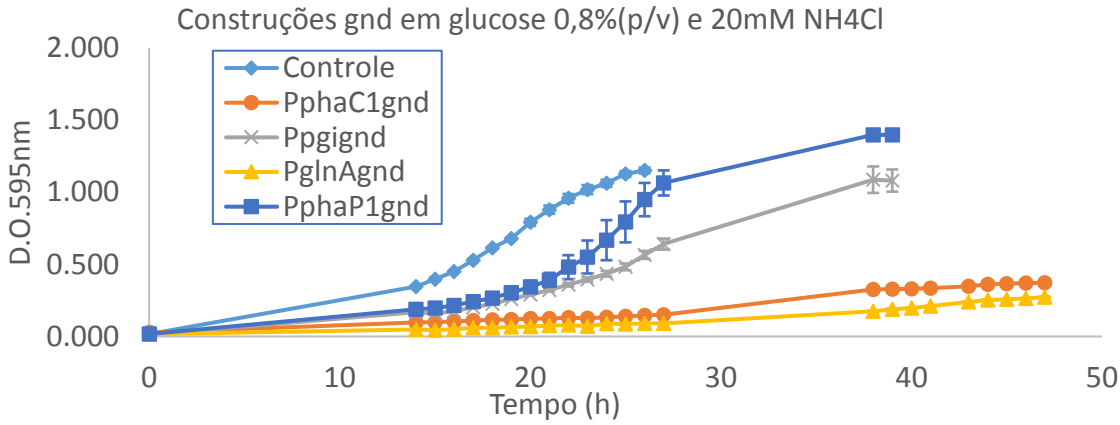

Construções gap2 em glucose 0,4%(p/v) e 5mM NH4Cl
D.O.595nm
1.400
0.900
0.400
-0.100
0
10
20
30
40
Tempo (h)
Controle
PphaC1gap2
Ppgigap2
PglnAgap2
PphaP1gap2

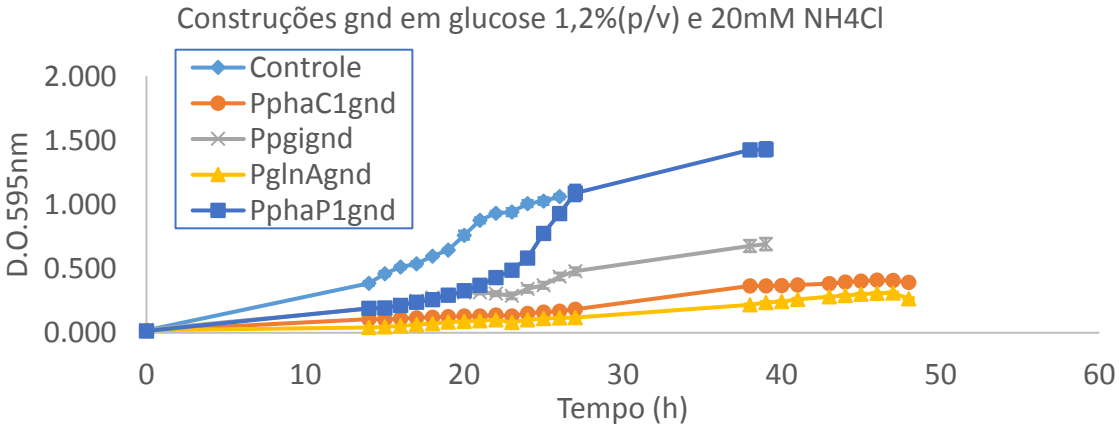

Construções gap2 em glucose 0,8%(p/v) e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
Controle
PphaC1gap2
Ppgigap2
PglnAgap2
PphaP1gap2
0
10
20
30
40
Tempo (h)

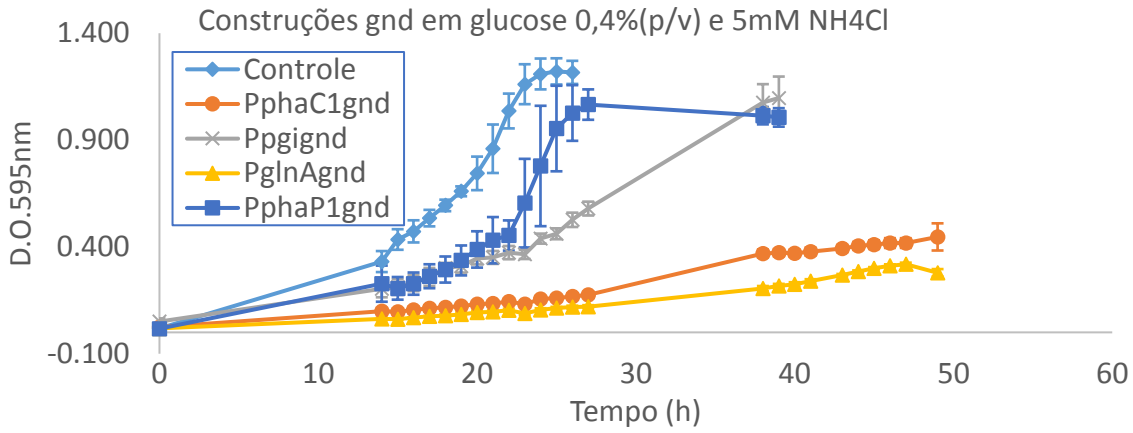

Construções gap2 em glucose 1,2%(p/v) e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
Controle
PphaC1gap2
Ppgigap2
PglnAgap2
PphaP1gap2
0
10
20
30
40
Tempo (h)

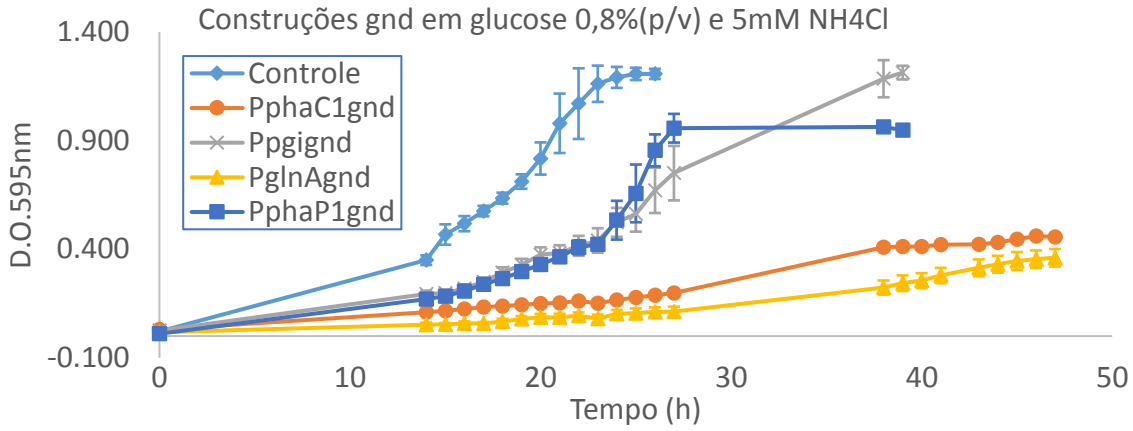

Construções gnd em malato e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd
0
2
4
6
8
10
12
14
Tempo (h)

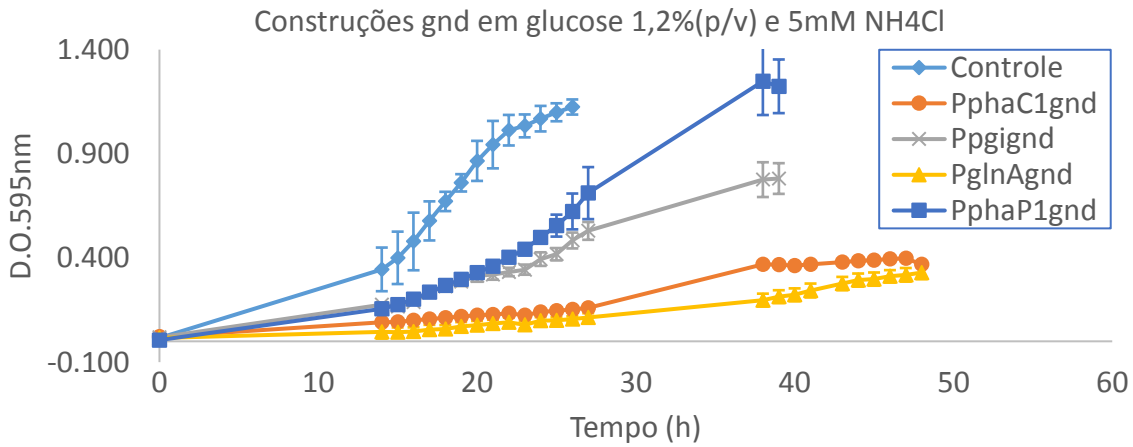

Construções gnd em glucose 0,4%(p/v) e 20mM NH4Cl
D.O.595nm
1.500
1.000
0.500
0.000
0
10
20
30
40
50
60
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd


Construções gnd em glucose 0,8%(p/v) e 20mM NH4Cl
D.O.595nm
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
10
20
30
40
50
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd


Construções gnd em glucose 1,2%(p/v) e 20mM NH4Cl
D.O.595nm
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
0
10
20
30
40
50
60
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd


Construções gnd em glucose 0,4%(p/v) e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
0
10
20
30
40
50
60
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd


Construções gnd em glucose 0,8%(p/v) e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
0
10
20
30
40
50
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd


Construções gnd em glucose 1,2%(p/v) e 5mM NH4Cl
1.400
0.900
0.400
-0.100
D.O.595nm
0
10
20
30
40
50
60
Tempo (h)
Controle
PphaC1gnd
Ppgignd
PglnAgnd
PphaP1gnd

8.2 Tabela com todos polimorfismos em EK01 e EK04.

Polimorfismos em EK04					Polimorfismos em EK01				
Região	Tipo	SmR1	EK04	Gene	Região	Tipo	SmR1	EK01	Gene
92021	Del	C	-	Hsero_0078	92021	Del	C	-	Hsero_0078
109752^109753	Ins	-	T	ampG	109752^109753	Ins	-	T	ampG
122436	SNV	A	T	rpoC	122436	SNV	A	T	rpoC
132198	SNV	A	G	tufB	132198	SNV	A	G	tufB
315792	SNV	T	A		315792	SNV	T	A	
405270^405271	Ins	-	G		405270^405271	Ins	-	G	
418041	SNV	G	C	Hsero_0382	418041	SNV	G	C	Hsero_0382
418072	SNV	C	A	Hsero_0382	418072	SNV	C	A	Hsero_0382
425068	Del	T	-	accB	425068	Del	T	-	accB
425073	SNV	T	G	accB	425073	SNV	T	G	accB
425083	Del	C	-	accB	425083	Del	C	-	accB
425085	Del	C	-	accB	425085	Del	C	-	accB
519324^519325	Ins	-	A		519324^519325	Ins	-	A	
581461..581462	Del	CT	-	Hsero_0532	581461..581462	Del	CT	-	Hsero_0532
581461..581462	MNV	CT	CT	Hsero_0532	581461..581462	MNV	CT	CT	Hsero_0532
581466	SNV	G	C	Hsero_0532	581466	SNV	G	C	Hsero_0532
581468	SNV	A	T	Hsero_0532	581468	SNV	A	T	Hsero_0532
581469^581470	Ins	-	G	Hsero_0532	581469^581470	Ins	-	G	Hsero_0532

581473^581474	Ins	-	G	Hsero_0532	581473^581474	Ins	-	G	Hsero_0532
581476..581477	MNV	CG	TC	Hsero_0532	581476..581477	MNV	CG	TC	Hsero_0532
581479	SNV	T	C	Hsero_0532	581479	SNV	T	C	Hsero_0532
581481	SNV	C	A	Hsero_0532	581481	SNV	C	A	Hsero_0532
581483	SNV	C	G	Hsero_0532	581483	SNV	C	G	Hsero_0532
615115	SNV	A	G	adhC	615115	SNV	A	G	adhC
677877	Del	C	-		677877	Del	C	-	
709557..709562	Del	CCAGGC	-	Hsero_0645	709557..709562	Del	CCAGGC	-	Hsero_0645
709557..709562	MNV	CCAGGC	CCAGGC	Hsero_0645	709557..709562	MNV	CCAGGC	CCAGGC	Hsero_0645
735457..735465	Del	CGTCAATGC	-	pykA	858751^858752	Ins	-	C	
735457..735465	MNV	CGTCAATGC	CGTCAATGC	pykA	858790	Del	A	-	
858751^858752	Ins	-	C		941766	SNV	C	T	Hsero_0854
858790	Del	A	-		1043996	Del	C	-	
941766	SNV	C	T	Hsero_0854	1044021	Del	G	-	
1043996	Del	C	-		1055901	SNV	A	G	Hsero_0962
1044021	Del	G	-		1057055	SNV	A	T	Hsero_0963
1055901	SNV	A	G	Hsero_0962	1213559	SNV	T	C	Hsero_1088
1057055	SNV	A	T	Hsero_0963	1213565	SNV	T	G	Hsero_1088
1213565	SNV	T	G	Hsero_1088	1449671^1449672	Ins	-	T	Hsero_1278

1449671^1449672	Ins	-	T	Hsero_1278	1561064^1561065	Ins	-	TGGCGT	Hsero_1365
1561064^1561065	Ins	-	TGGCGT	Hsero_1365	1561064^1561065	Ins	-	-	Hsero_1365
1561064^1561065	Ins	-	-	Hsero_1365	1652050	Del	G	-	Hsero_1438
1652050	Del	G	-	Hsero_1438	1652097	SNV	G	C	Hsero_1438
1652097	SNV	G	C	Hsero_1438	1690235^1690236	Ins	-	A	
1652179	SNV	T	C		1697136..1697137	MNV	GC	CT	Hsero_1474
1652202^1652203	Ins	-	C		1714795^1714796	Ins	-	T	Hsero_1492
1690235^1690236	Ins	-	A		1819734	Del	T	-	acpA
1697136..1697137	MNV	GC	CT	Hsero_1474	1850126	Del	C	-	Hsero_1628
1714795^1714796	Ins	-	T	Hsero_1492	2032243	Del	T	-	
1819734	Del	T	-	acpA	2059747	SNV	C	A	Hsero_1822
1850126	Del	C	-	Hsero_1628	2138095	SNV	C	A	rne
2032243	Del	T	-		2151115	SNV	G	C	nadE
2059747	SNV	C	A	Hsero_1822	2200277^2200278	Ins	-	T	
2109941	SNV	T	G	phrB	2467891	SNV	T	G	lpxB
2138095	SNV	C	A	rne	2467893	SNV	G	C	lpxB
2151115	SNV	G	C	nadE	2467909	SNV	T	G	lpxB
2200277^2200278	Ins	-	T		2473466	Del	C	-	ppsA
2201374	Del	G	-		2513433^2513434	Ins	-	T	Hsero_2230
2201376	SNV	T	A		2547996^2547997	Ins	-	G	dnaE

2201392..2201393	MNV	TT	CC		2548003	SNV	C	G	dnaE
2201392..2201393	MNV	TT	TT		2637568	SNV	A	G	tauC
2201397	SNV	T	C		2651569..2651570	MNV	GA	AG	Hsero_2343
2201410	SNV	T	C		2654855^2654856	Ins	-	A	Hsero_2343
2467891	SNV	T	G	lpxB	2654899	Del	G	-	Hsero_2343
2467893	SNV	G	C	lpxB	2661035^2661036	Ins	-	G	Hsero_2343
2467909	SNV	T	G	lpxB	2661191	Del	A	-	Hsero_2343
2473466	Del	C	-	ppsA	2662562^2662563	Ins	-	A	Hsero_2343
2513433^2513434	Ins	-	T	Hsero_2230	2662595	Del	G	-	Hsero_2343
2547996^2547997	Ins	-	G	dnaE	2662640	SNV	C	G	Hsero_2343
2548003	SNV	C	G	dnaE	2663616	SNV	G	T	Hsero_2343
2637568	SNV	A	G	tauC	2663634	SNV	G	T	Hsero_2343
2651569..2651570	MNV	GA	AG	Hsero_2343	2663637	SNV	G	T	Hsero_2343
2654855^2654856	Ins	-	A	Hsero_2343	2666862	SNV	G	T	Hsero_2343
2654899	Del	G	-	Hsero_2343	2666900	Del	A	-	Hsero_2343
2661035^2661036	Ins	-	G	Hsero_2343	2668609	Del	C	-	Hsero_2343
2661191	Del	A	-	Hsero_2343	2668635	Del	G	-	Hsero_2343
2662562^2662563	Ins	-	A	Hsero_2343	2668659	SNV	G	T	Hsero_2343

2662595	Del	G	-	Hsero_2343	2668702	Del	G	-	Hsero_2343
2662640	SNV	C	G	Hsero_2343	2675041^2675042	Ins	-	G	Hsero_2343
2663616	SNV	G	T	Hsero_2343	2675120	Del	C	-	Hsero_2343
2663634	SNV	G	T	Hsero_2343	2925767..2925769	Del	CAG	-	Hsero_2566
2663637	SNV	G	T	Hsero_2343	2925784	SNV	G	A	Hsero_2566
2666862	SNV	G	T	Hsero_2343	2929316	SNV	G	A	crp
2666900	Del	A	-	Hsero_2343	2952434	SNV	G	A	Hsero_2587
2668609	Del	C	-	Hsero_2343	2952610	SNV	G	A	Hsero_2587
2668635	Del	G	-	Hsero_2343	3014251^3014252	Ins	-	T	fyuA
2668659	SNV	G	T	Hsero_2343	3066612..3066632	Del	GGCGGCGCACCAGGCCTGCCA	-	Hsero_2687
2668702	Del	G	-	Hsero_2343	3267047	Del	A	-	Hsero_2877
2675041^2675042	Ins	-	G	Hsero_2343	3305844	Del	C	-	tnpA
2675120	Del	C	-	Hsero_2343	3306144	Del	G	-	tnpA
2925767..2925769	Del	CAG	-	Hsero_2566	3326269	Del	G	-	Hsero_2926
2925784	SNV	G	A	Hsero_2566	3334273	Del	G	-	Hsero_2935
2929316	SNV	G	A	crp	3334282^3334283	Ins	-	C	Hsero_2935
2952434	SNV	G	A	Hsero_2587	3334775..3334776	MNV	GA	AT	
2952610	SNV	G	A	Hsero_2587	3334775..3334776	MNV	GA	GA	

3014251^3014252	Ins	-	T	fyuA	3334796..3334797	MNV	AT	CA	
3066620..3066632	Del	ACCAGGCCTGCCA	-	Hsero_2687	3334796..3334797	MNV	AT	AT	
3267047	Del	A	-	Hsero_2877	3334801..3334802	MNV	GT	AG	
3305844	Del	C	-	tnpA	3334801..3334802	MNV	GT	GT	
3306144	Del	G	-	tnpA	3334811	Del	A	-	
3326269	Del	G	-	Hsero_2926	3334813^3334814	Ins	-	A	
3334273	Del	G	-	Hsero_2935	3334815^3334816	Ins	-	C	
3334282^3334283	Ins	-	C	Hsero_2935	3389192^3389193	Ins	-	T	Hsero_2975
3334775..3334776	MNV	GA	AT		3393409	SNV	A	C	acnA
3334775..3334776	MNV	GA	GA		3403106	Del	T	-	
3334796..3334797	MNV	AT	CA		3417042	SNV	G	C	Hsero_3000
3334796..3334797	MNV	AT	AT		3417111	Del	T	-	Hsero_3000
3334801..3334802	MNV	GT	AG		3417114^3417115	Ins	-	C	Hsero_3000
3334801..3334802	MNV	GT	GT		3417138	SNV	T	G	Hsero_3000
3334805	Del	G	-		3417147	SNV	G	C	Hsero_3000
3334811	Del	A	-		3417154	SNV	T	G	Hsero_3000
3334813^3334814	Ins	-	A		3417159	SNV	G	C	Hsero_3000
3334815^3334816	Ins	-	C		3423879	Del	G	-	

3389192^3389193	Ins	-	T	Hsero_2975	3426555	Del	G	-	Hsero_3009
3393409	SNV	A	C	acnA	3432882	SNV	C	A	Hsero_3015
3403106	Del	T	-		3433002	SNV	C	G	
3417042	SNV	G	C	Hsero_3000	3437869	Del	G	-	cheW
3417111	Del	T	-	Hsero_3000	3437900	Del	G	-	cheW
3417114^3417115	Ins	-	C	Hsero_3000	3437931	Del	A	-	cheW
3417138	SNV	T	G	Hsero_3000	3437936	Del	A	-	cheW
3417147	SNV	G	C	Hsero_3000	3437942	SNV	T	C	cheW
3417154	SNV	T	G	Hsero_3000	3437947	Del	C	-	cheW
3417159	SNV	G	C	Hsero_3000	3485071	SNV	T	C	Hsero_3042
3423879	Del	G	-		3485096	SNV	A	G	Hsero_3042
3426555	Del	G	-	Hsero_3009	3485123	SNV	C	T	Hsero_3042
3432882	SNV	C	A	Hsero_3015	3485127	SNV	A	G	Hsero_3042
3433002	SNV	C	G		3492678	Del	C	-	Hsero_3043
3437869	Del	G	-	cheW	3492739^3492740	Ins	-	G	Hsero_3043
3437900	Del	G	-	cheW	3523213^3523214	Ins	-	TG	mmsA
3437931	Del	A	-	cheW	3550491	Del	C	-	cheA
3437936	Del	A	-	cheW	3550494^3550495	Ins	-	C	cheA
3437942	SNV	T	C	cheW	3596513	SNV	T	C	Hsero_3139
3437947	Del	C	-	cheW	3671264^3671265	Ins	-	C	
3485096	SNV	A	G	Hsero_3042	3744731^3744732	Ins	-	T	

3485108	SNV	G	A	Hsero_3042	3979963^3979964	Ins	-	A	
3485123	SNV	C	T	Hsero_3042	4043645^4043646	Ins	-	A	
3485127	SNV	A	G	Hsero_3042	4065178^4065179	Ins	-	T	
3492678	Del	C	-	Hsero_3043	4084579	Del	T	-	Hsero_3561
3492739^3492740	Ins	-	G	Hsero_3043	4084583	SNV	T	C	Hsero_3561
3523213^3523214	Ins	-	TG	mmsA	4084584^4084585	Ins	-	C	Hsero_3561
3550491	Del	C	-	cheA	4084591	SNV	T	G	Hsero_3561
3550494^3550495	Ins	-	C	cheA	4084595..4084596	MNV	TG	GC	Hsero_3561
3596513	SNV	T	C	Hsero_3139	4084602	SNV	A	C	Hsero_3561
3644195	SNV	G	A	Hsero_3185	4084610..4084611	MNV	CT	GC	Hsero_3561
3671264^3671265	Ins	-	C		4084613	SNV	T	G	Hsero_3561
3744731^3744732	Ins	-	T		4100019	SNV	T	G	wrbA
3979963^3979964	Ins	-	A		4108586..4108587	MNV	TG	GC	glk
4043645^4043646	Ins	-	A		4161989	Del	G	-	sbcB
4065178^4065179	Ins	-	T		4162965	Del	C	-	Hsero_3631
4084579	Del	T	-	Hsero_3561	4163112	SNV	C	G	
4084583	SNV	T	C	Hsero_3561	4163412	Del	C	-	
4084584^4084585	Ins	-	C	Hsero_3561	4167988	Del	G	-	Hsero_3635
4084591	SNV	T	G	Hsero_3561	4174519	SNV	C	G	narG

4084595..4084596	MNV	TG	GC	Hsero_3561	4199293	SNV	G	A	
4084602	SNV	A	C	Hsero_3561	4199302	SNV	T	G	
4084610..4084611	MNV	CT	GC	Hsero_3561	4199314	SNV	A	G	
4084613	SNV	T	G	Hsero_3561	4199323	SNV	C	T	
4100019	SNV	T	G	wrbA	4214476	Del	T	-	dnaX
4108586..4108587	MNV	TG	GC	glk	4214496	Del	T	-	dnaX
4136551	Del	A	-		4277189^4277190	Ins	-	T	
4161989	Del	G	-	sbcB	4333587	SNV	G	A	Hsero_3780
4162965	Del	C	-	Hsero_3631	4448444	SNV	C	T	
4163112	SNV	C	G		4576241	Del	A	-	
4163412	Del	C	-		4576276	Del	T	-	
4167988	Del	G	-	Hsero_3635	4612053..4612067	Del	CCCCAGACGAAGCCC	-	Hsero_4022
4174519	SNV	C	G	narG	4677829	Del	C	-	Hsero_4085
4199293	SNV	G	A		4677879	SNV	G	T	Hsero_4085
4199302	SNV	T	G		4677885	SNV	G	T	Hsero_4085
4199314	SNV	A	G		4769996	Del	T	-	
4199323	SNV	C	T		4770000	Del	C	-	
4199327^4199328	Ins	-	T		4770010	Del	C	-	
4214476	Del	T	-	dnaX	4770022	Del	C	-	
4214496	Del	T	-	dnaX	4770071	SNV	C	G	
4277189^4277190	Ins	-	T		4770092	Del	A	-	
4333587	SNV	G	A	Hsero_3780	4770095	Del	T	-	

4448444	SNV	C	T		4770109	Del	A	-	
4576241	Del	A	-		4770112	SNV	G	T	
4576276	Del	T	-		4770115	SNV	C	G	
4612053..4612067	Del	CCCCAGACGAAGCCC	-	Hsero_4022	4886044	SNV	A	C	minC
4677829	Del	C	-	Hsero_4085	4886056	SNV	G	C	minC
4677879	SNV	G	T	Hsero_4085	4896704^4896705	Ins	-	T	
4677885	SNV	G	T	Hsero_4085	5097148^5097149	Ins	-	T	
4769996	Del	T	-		5191022	SNV	G	A	
4770000	Del	C	-		5315718	SNV	G	C	araJ
4770010	Del	C	-		5315724	SNV	T	G	araJ
4770022	Del	C	-		5315739	SNV	G	C	araJ
4770071	SNV	C	G		5315742	SNV	G	C	araJ
4770092	Del	A	-		5315746^5315747	Ins	-	C	araJ
4770095	Del	T	-		5315757	Del	A	-	araJ
4770109	Del	A	-		5315778	SNV	A	C	araJ
4770112	SNV	G	T		5315827	SNV	T	G	araJ
4770115	SNV	C	G		5315848	SNV	T	G	araJ
4886044	SNV	A	C	minC	5315861..5315862	MNV	TA	GG	araJ
4886056	SNV	G	C	minC	5319172	Del	G	-	Hsero_4635
4896704^4896705	Ins	-	T		5326325^5326326	Ins	-	G	Hsero_4643
5097148^5097149	Ins	-	T		5433790	SNV	T	C	
5191022	SNV	G	A		5433827	SNV	T	C	
5315718	SNV	G	C	araJ					
5315724	SNV	T	G	araJ					

5315739	SNV	G	C	araJ					
5315742	SNV	G	C	araJ					
5315746^ 5315747	Ins	-	C	araJ					
5315757	Del	A	-	araJ					
5315778	SNV	A	C	araJ					
5315827	SNV	T	G	araJ					
5315848	SNV	T	G	araJ					
5315861.. 5315862	MNV	TA	GG	araJ					
5319172	Del	G	-	Hsero_4635					
5326325^ 5326326	Ins	-	G	Hsero_4643					
5433827	SNV	T	C						

8.3 Tabela com polimorfismos em EK01 e EK04 que apresentam troca de amino ácido na CDS.

Polimorfismos com troca de AA em EK01						Polimorfismos com troca de AA em EK04					
Região	Tipo	SmR1	EK01	Troca de AA	Gene	Região	Tipo	SmR1	EK04	Troca de AA	Gene
92021	Del	C	-	ADJ61608.1:p.Glu476fs	Hsero_0078	92021	Del	C	-	ADJ61608.1:p.Glu476fs	
1097752^109753	Ins	-	T	ADJ61623.1:p.Asn386fs	ampG	1097752^109753	Ins	-	T	ADJ61623.1:p.Asn386fs	ampG
122436	SNV	A	T	ADJ61632.1:p.Thr798Ser	rpoC	122436	SNV	A	T	ADJ61632.1:p.Thr798Ser	rpoC
418041	SNV	G	C	ADJ61907.1:p.Gly127Ala	Hsero_0382	418041	SNV	G	C	ADJ61907.1:p.Gly127Ala	

425068	Del	T	-	ADJ61914.1:p.Leu63fs	accB	425068	Del	T	-	ADJ61914.1:p.Leu63fs	accB
425073	SNV	T	G	ADJ61914.1:p.Thr62Pro	accB	425073	SNV	T	G	ADJ61914.1:p.Thr62Pro	accB
425083	Del	C	-	ADJ61914.1:p.Ala58fs	accB	425083	Del	C	-	ADJ61914.1:p.Ala58fs	accB
425085	Del	C	-	ADJ61914.1:p.Ala58fs	accB	425085	Del	C	-	ADJ61914.1:p.Ala58fs	accB
581461..581462	Del	CT	-	ADJ62051.1:p.Asp81fs	Hsero_0532	581461..581462	Del	CT	-	ADJ62051.1:p.Asp81fs	
581466	SNV	G	C	ADJ62051.1:p.Gly83Ala	Hsero_0532	581466	SNV	G	C	ADJ62051.1:p.Gly83Ala	
581468	SNV	A	T	ADJ62051.1:p.Thr84Ser	Hsero_0532	581468	SNV	A	T	ADJ62051.1:p.Thr84Ser	
581469^581470	Ins	-	G	ADJ62051.1:p.Thr84fs	Hsero_0532	581469^581470	Ins	-	G	ADJ62051.1:p.Thr84fs	
581473^581474	Ins	-	G	ADJ62051.1:p.Gly86fs	Hsero_0532	581473^581474	Ins	-	G	ADJ62051.1:p.Gly86fs	
581476..581477	MNV	CG	TC	ADJ62051.1:p.Gly86_Asp87delinsGlyHis	Hsero_0532	581476..581477	MNV	CG	TC	ADJ62051.1:p.Gly86_Asp87delinsGlyHis	
581481	SNV	C	A	ADJ62051.1:p.Ala88Asp	Hsero_0532	581481	SNV	C	A	ADJ62051.1:p.Ala88Asp	
581483	SNV	C	G	ADJ62051.1:p.Arg89Gly	Hsero_0532	581483	SNV	C	G	ADJ62051.1:p.Arg89Gly	

615115	SNV	A	G	ADJ62077.1:p.Thr251Ala	adhC	615115	SNV	A	G	ADJ62077.1:p.Thr251Ala	adhC
709557..709562	Del	CCAGGC	-	ADJ62164.1:p.Gly340_Ala342delinsAla	Hsero_0645	709557..709562	Del	CCAGGC	-	ADJ62164.1:p.Gly340_Ala342delinsAla	
						735457..735465	Del	CGTCAATGC	-	ADJ62190.1:p.Ile287_Ala290delinsIle	pykA
1055901	SNV	A	G	ADJ62479.1:p.Thr160Ala	Hsero_0962	1055901	SNV	A	G	ADJ62479.1:p.Thr160Ala	
1057055	SNV	A	T	ADJ62480.1:p.Lys3*	Hsero_0963	1057055	SNV	A	T	ADJ62480.1:p.Lys3*	
1213565	SNV	T	G	ADJ62605.1:p.Lys6365Asn	Hsero_1088	1213565	SNV	T	G	ADJ62605.1:p.Lys6365Asn	
1449671^1449672	Ins	-	T	ADJ62794.1:p.Asp98fs	Hsero_1278	1449671^1449672	Ins	-	T	ADJ62794.1:p.Asp98fs	
1561064^1561065	Ins	-	TGCGT	ADJ62881.1:p.Ser323delinsAsnAlaSer	Hsero_1365	1561064^1561065	Ins	-	TGCGT	ADJ62881.1:p.Ser323delinsAsnAlaSer	
1652050	Del	G	-	ADJ62954.1:p.Ala353fs	Hsero_1438	1652050	Del	G	-	ADJ62954.1:p.Ala353fs	
1652097	SNV	G	C	ADJ62954.1:p.Gly369Ala	Hsero_1438	1652097	SNV	G	C	ADJ62954.1:p.Gly369Ala	
1697136..1697137	MNV	GC	CT	ADJ62989.1:p.Ala225Leu	Hsero_1474	1697136..1697137	MNV	GC	CT	ADJ62989.1:p.Ala225Leu	

1714795^1714796	Ins	-	T	ADJ63007.1:p.Thr112fs	Hsero_1492	1714795^1714796	Ins	-	T	ADJ63007.1:p.Thr112fs	
1819734	Del	T	-	ADJ63100.1:p.Ser18fs	acpA	1819734	Del	T	-	ADJ63100.1:p.Ser18fs	acpA
1850126	Del	C	-	ADJ63141.1:p.Pro2fs	Hsero_1628	1850126	Del	C	-	ADJ63141.1:p.Pro2fs	
2059747	SNV	C	A	ADJ63332.1:p.Glu70*	Hsero_1822	2059747	SNV	C	A	ADJ63332.1:p.Glu70*	
						2109941	SNV	T	G	ADJ63370.1:p.His303Pro	phrB
2138095	SNV	C	A	ADJ63394.1:p.Glu829*	rne	2138095	SNV	C	A	ADJ63394.1:p.Glu829*	rne
2467891	SNV	T	G	ADJ63690.1:p.Ile236Met	lpxB	2467891	SNV	T	G	ADJ63690.1:p.Ile236Met	lpxB
2467893	SNV	G	C	ADJ63690.1:p.Gly237Ala	lpxB	2467893	SNV	G	C	ADJ63690.1:p.Gly237Ala	lpxB
2467909	SNV	T	G	ADJ63690.1:p.Ile242Met	lpxB	2467909	SNV	T	G	ADJ63690.1:p.Ile242Met	lpxB
2473466	Del	C	-	ADJ63694.1:p.Ala640fs	ppsA	2473466	Del	C	-	ADJ63694.1:p.Ala640fs	ppsA
2513433^2513434	Ins	-	T	ADJ63729.1:p.Thr32fs	Hsero_2230	2513433^2513434	Ins	-	T	ADJ63729.1:p.Thr32fs	
2547996^2547997	Ins	-	G	ADJ63757.1:p.Cys882fs	dnaE	2547996^2547997	Ins	-	G	ADJ63757.1:p.Cys882fs	dnaE

2651569..2651570	MNV	GA	AG	ADJ63842.1:p.Arg76Gln	Hsero_2343	2651569..2651570	MNV	GA	AG	ADJ63842.1:p.Arg76Gln	
2654855^2654856	Ins	-	A	ADJ63842.1:p.Thr1172fs	Hsero_2343	2654855^2654856	Ins	-	A	ADJ63842.1:p.Thr1172fs	
265499	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Trp1186fs	Hsero_2343	265499	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Trp1186fs	
2661035^2661036	Ins	-	G	ADJ63842.1:p.Ala3232fs	Hsero_2343	2661035^2661036	Ins	-	G	ADJ63842.1:p.Ala3232fs	
266191	Del	A	-	ADJ63842.1:p.Thr3283fs	Hsero_2343	266191	Del	A	-	ADJ63842.1:p.Thr3283fs	
2662562^2662563	Ins	-	A	ADJ63842.1:p.Met3741fs	Hsero_2343	2662562^2662563	Ins	-	A	ADJ63842.1:p.Met3741fs	
266295	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Ala3751fs	Hsero_2343	266295	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Ala3751fs	
2663616	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly4092*	Hsero_2343	2663616	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly4092*	
2663634	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Glu4098*	Hsero_2343	2663634	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Glu4098*	
2663637	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly4099*	Hsero_2343	2663637	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly4099*	
2666862	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly5174*	Hsero_2343	2666862	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly5174*	

2666900	Del	A	-	ADJ63842.1:p.Ser5186fs	Hsero_2343	2666900	Del	A	-	ADJ63842.1:p.Ser5186fs	
2668609	Del	C	-	ADJ63842.1:p.Ala5756fs	Hsero_2343	2668609	Del	C	-	ADJ63842.1:p.Ala5756fs	
2668635	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Gly5765fs	Hsero_2343	2668635	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Gly5765fs	
2668659	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly5773*	Hsero_2343	2668659	SNV	G	T	ADJ63842.1:p.Gly5773*	
2668702	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Trp5787fs	Hsero_2343	2668702	Del	G	-	ADJ63842.1:p.Trp5787fs	
2675041^2675042	Ins	-	G	ADJ63842.1:p.Ala7900fs	Hsero_2343	2675041^2675042	Ins	-	G	ADJ63842.1:p.Ala7900fs	
2675120	Del	C	-	ADJ63842.1:p.Arg7926fs	Hsero_2343	2675120	Del	C	-	ADJ63842.1:p.Arg7926fs	
2925767..2925769	Del	CAG	-	ADJ64065.1:p.Leu214del	Hsero_2566	2925767..2925769	Del	CAG	-	ADJ64065.1:p.Leu214del	
2925784	SNV	G	A	ADJ64065.1:p.Pro209Ser	Hsero_2566	2925784	SNV	G	A	ADJ64065.1:p.Pro209Ser	
2929316	SNV	G	A	ADJ64067.1:p.Glu200Lys	crp	2929316	SNV	G	A	ADJ64067.1:p.Glu200Lys	crp
2952434	SNV	G	A	ADJ64083.1:p.Trp1142*	Hsero_2587	2952434	SNV	G	A	ADJ64083.1:p.Trp1142*	

2952610	SNV	G	A	ADJ64083.1:p.Trp1201*	Hsero_2587	2952610	SNV	G	A	ADJ64083.1:p.Trp1201*	
3014251^3014252	Ins	-	T	ADJ64135.1:p.Met1?	fyuA	3014251^3014252	Ins	-	T	ADJ64135.1:p.Met1?	fyuA
3066612..3066632	Del	GGCGGCGCACCAGGCCTGCCA	-	ADJ64183.1:p.Leu108_Gln115delinsLeu	Hsero_2687	3066620..3066632	Del	ACCAGGCCTGCCA	-	ADJ64183.1:p.His111fs	
3267047	Del	A	-	ADJ64369.1:p.Phe96fs	Hsero_2877	3267047	Del	A	-	ADJ64369.1:p.Phe96fs	
3305844	Del	C	-	ADJ64400.1:p.Val164fs	tnpA	3305844	Del	C	-	ADJ64400.1:p.Val164fs	tnpA
3306144	Del	G	-	ADJ64400.1:p.Gln64fs	tnpA	3306144	Del	G	-	ADJ64400.1:p.Gln64fs	tnpA
3326269	Del	G	-	ADJ64415.1:p.Gly122fs	Hsero_2926	3326269	Del	G	-	ADJ64415.1:p.Gly122fs	
3334273	Del	G	-	ADJ64424.1:p.Leu106fs	Hsero_2935	3334273	Del	G	-	ADJ64424.1:p.Leu106fs	
3334282^3334283	Ins	-	C	ADJ64424.1:p.Ala110fs	Hsero_2935	3334282^3334283	Ins	-	C	ADJ64424.1:p.Ala110fs	
3389192^3389193	Ins	-	T	ADJ64463.1:p.Leu58fs	Hsero_2975	3389192^3389193	Ins	-	T	ADJ64463.1:p.Leu58fs	
3417042	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro55Ala	Hsero_3000	3417042	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro55Ala	
3417111	Del	T	-	ADJ64488.1:p.Ile32fs	Hsero_	3417111	Del	T	-	ADJ64488.1:p.Ile32fs	

					3000						
3417114^3417115	Ins	-	C	ADJ64488.1:p.Ser31fs	Hsero_3000	3417114^3417115	Ins	-	C	ADJ64488.1:p.Ser31fs	
3417138	SNV	T	G	ADJ64488.1:p.Met23Leu	Hsero_3000	3417138	SNV	T	G	ADJ64488.1:p.Met23Leu	
3417147	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro20Ala	Hsero_3000	3417147	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro20Ala	
3417159	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro16Ala	Hsero_3000	3417159	SNV	G	C	ADJ64488.1:p.Pro16Ala	
3426555	Del	G	-	ADJ64497.1:p.Pro221fs	Hsero_3009	3426555	Del	G	-	ADJ64497.1:p.Pro221fs	
3432882	SNV	C	A	ADJ64503.1:p.Leu34Phe	Hsero_3015	3432882	SNV	C	A	ADJ64503.1:p.Leu34Phe	
3437869	Del	G	-	ADJ64507.1:p.Pro59fs	cheW	3437869	Del	G	-	ADJ64507.1:p.Pro59fs	cheW
3437900	Del	G	-	ADJ64507.1:p.Pro49fs	cheW	3437900	Del	G	-	ADJ64507.1:p.Pro49fs	cheW
3437931	Del	A	-	ADJ64507.1:p.Ser39fs	cheW	3437931	Del	A	-	ADJ64507.1:p.Ser39fs	cheW
3437936	Del	A	-	ADJ64507.1:p.Phe37fs	cheW	3437936	Del	A	-	ADJ64507.1:p.Phe37fs	cheW

3437942	SNV	T	C	ADJ64507.1:p.Asn35Ser	cheW	3437942	SNV	T	C	ADJ64507.1:p.Asn35Ser	cheW
3437947	Del	C	-	ADJ64507.1:p.Gly33fs	cheW	3437947	Del	C	-	ADJ64507.1:p.Gly33fs	cheW
3485071	SNV	T	C	ADJ64530.1:p.Ser606Gly	Hsero_3042	3485127	SNV	A	G	ADJ64530.1:p.Val587Ala	
3485127	SNV	A	G	ADJ64530.1:p.Val587Ala	Hsero_3042	3492678	Del	C	-	ADJ64531.1:p.Val1336fs	
3492678	Del	C	-	ADJ64531.1:p.Val1336fs	Hsero_3043	3492739^3492740	Ins	-	G	ADJ64531.1:p.Pro1315fs	
3492739^3492740	Ins	-	G	ADJ64531.1:p.Pro1315fs	Hsero_3043	3523213^3523214	Ins	-	TG	ADJ64555.1:p.Gly494fs	mmsA
3523213^3523214	Ins	-	TG	ADJ64555.1:p.Gly494fs	mmsA	3550491	Del	C	-	ADJ64580.1:p.Ala153fs	cheA
3550491	Del	C	-	ADJ64580.1:p.Ala153fs	cheA	3550494^3550495	Ins	-	C	ADJ64580.1:p.Ser154fs	cheA
3550494^3550495	Ins	-	C	ADJ64580.1:p.Ser154fs	cheA	3596513	SNV	T	C	ADJ64623.1:p.Thr262Ala	
3596513	SNV	T	C	ADJ64623.1:p.Thr262Ala	Hsero_3139	3644195	SNV	G	A	ADJ64667.1:p.Pro88Ser	
4084579	Del	T	-	ADJ65040.1:p.Ala213fs	Hsero_3561	4084579	Del	T	-	ADJ65040.1:p.Ala213fs	

4084583	SNV	T	C	ADJ65040.1:p.Cys215Arg	Hsero_3561	4084583	SNV	T	C	ADJ65040.1:p.Cys215Arg	
4084584^4084585	Ins	-	C	ADJ65040.1:p.Cys215fs	Hsero_3561	4084584^4084585	Ins	-	C	ADJ65040.1:p.Cys215fs	
4084591	SNV	T	G	ADJ65040.1:p.Asn217Lys	Hsero_3561	4084591	SNV	T	G	ADJ65040.1:p.Asn217Lys	
4084595..4084596	MNV	TG	GC	ADJ65040.1:p.Cys219Ala	Hsero_3561	4084595..4084596	MNV	TG	GC	ADJ65040.1:p.Cys219Ala	
4084602	SNV	A	C	ADJ65040.1:p.Asn221Thr	Hsero_3561	4084602	SNV	A	C	ADJ65040.1:p.Asn221Thr	
4084610..4084611	MNV	CT	GC	ADJ65040.1:p.Leu224Ala	Hsero_3561	4084610..4084611	MNV	CT	GC	ADJ65040.1:p.Leu224Ala	
4084613	SNV	T	G	ADJ65040.1:p.Ser225Ala	Hsero_3561	4084613	SNV	T	G	ADJ65040.1:p.Ser225Ala	
4100019	SNV	T	G	ADJ65052.1:p.His84Pro	wrbA	4100019	SNV	T	G	ADJ65052.1:p.His84Pro	wrbA
4108586..4108587	MNV	TG	GC	ADJ65059.1:p.Val274Gly	glk	4108586..4108587	MNV	TG	GC	ADJ65059.1:p.Val274Gly	glk
4161989	Del	G	-	ADJ65107.1:p.Ala428fs	sbcB	4161989	Del	G	-	ADJ65107.1:p.Ala428fs	sbcB
4162965	Del	C	-	ADJ65109.1:p.Gly44fs	Hsero_3631	4162965	Del	C	-	ADJ65109.1:p.Gly44fs	
4167988	Del	G	-	ADJ65113.1:p.Ser233fs	Hsero_	4167988	Del	G	-	ADJ65113.1:p.Ser233fs	

					3635						
4174519	SNV	C	G	ADJ65118.1:p.Ala826Gly	narG	4174519	SNV	C	G	ADJ65118.1:p.Ala826Gly	narG
4214476	Del	T	-	ADJ65159.1:p.His569fs	dnaX	4214476	Del	T	-	ADJ65159.1:p.His569fs	dnaX
4214496	Del	T	-	ADJ65159.1:p.Ala562fs	dnaX	4214496	Del	T	-	ADJ65159.1:p.Ala562fs	dnaX
4333587	SNV	G	A	ADJ65258.1:p.Gln428*	Hsero_3780	4333587	SNV	G	A	ADJ65258.1:p.Gln428*	
4612053..4612067	Del	CCCCAGACGAAGCCC	-	ADJ65493.1:p.Gly142_Gly147delinsGly	Hsero_4022	4612053..4612067	Del	CCCCAGACGAAGCCC	-	ADJ65493.1:p.Gly142_Gly147delinsGly	
4677829	Del	C	-	ADJ65555.1:p.Thr253fs	Hsero_4085	4677829	Del	C	-	ADJ65555.1:p.Thr253fs	
4677879	SNV	G	T	ADJ65555.1:p.Gly270*	Hsero_4085	4677879	SNV	G	T	ADJ65555.1:p.Gly270*	
4677885	SNV	G	T	ADJ65555.1:p.Gly272*	Hsero_4085	4677885	SNV	G	T	ADJ65555.1:p.Gly272*	
4886044	SNV	A	C	ADJ65739.1:p.Asp134Ala	minC	4886044	SNV	A	C	ADJ65739.1:p.Asp134Ala	minC
4886056	SNV	G	C	ADJ65739.1:p.Gly138Ala	minC	4886056	SNV	G	C	ADJ65739.1:p.Gly138Ala	minC
5315746^5315747	Ins	-	C	ADJ66099.1:p.Thr158fs	araJ	5315746^5315747	Ins	-	C	ADJ66099.1:p.Thr158fs	araJ
5315757	Del	A	-	ADJ66099.1:p.Ser161fs	araJ	5315757	Del	A	-	ADJ66099.1:p.Ser161fs	araJ

5315827	SNV	T	G	ADJ66099.1:p.Ser185Ala	araJ	5315827	SNV	T	G	ADJ66099.1:p.Ser185Ala	araJ
5315848	SNV	T	G	ADJ66099.1:p.Leu192Val	araJ	5315848	SNV	T	G	ADJ66099.1:p.Leu192Val	araJ
53158 61..53 15862	MNV	TA	GG	ADJ66099.1:p.Leu196Trp	araJ	53158 61..53 15862	MNV	TA	GG	ADJ66099.1:p.Leu196Trp	araJ
5319172	Del	G	-	ADJ66101.1:p.Leu66fs	Hsero_4635	5319172	Del	G	-	ADJ66101.1:p.Leu66fs	
53263 25^53 26326	Ins	-	G	ADJ66109.1:p.Gly73fs	Hsero_4643	53263 25^53 26326	Ins	-	G	ADJ66109.1:p.Gly73fs	