

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Kellen Zanfonato

**PRODUÇÃO DE POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) POR
LINHAGENS DE *Escherichia coli* DH5 α E JM101
RECOMBINANTES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Gláucia M. F. Aragão.

Coorientadores: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell e Prof.^a Dr.^a Regina Vasconcellos Antônio.

Florianópolis
2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha mãe Nilva e minha
querida irmã Arlete. Juntas vocês
são o meu coração.

“E decidi: vou viajar. Porque não morri, porque é verão, porque é tarde demais e eu quero ver, rever, transver, milver tudo que não vi e ainda mais do que já vi, como um danado, quero ver feito Pessoa, que também morreu sem encontrar. Maldito e solitário, decidi ousado: vou viajar”

Caio Fernando Abreu

AGRADECIMENTOS

Minha família merece poucas palavras, mas as que me são mais caras, simplesmente obrigada por vocês existirem e por todo amor incondicional de sempre; por estarem presentes, mesmo quando ausentes.

À Profe Gláucia, minha orientadora, pela paciência e inestimável apoio durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela oportunidade. A você, todo o meu carinho e gratidão!

Ao Professor Willibaldo por sua ajuda nos momentos mais difíceis, por acreditar no futuro deste trabalho e contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Prof. Regina pela oportunidade e auxílio nos primeiros passos do desenvolvimento desse trabalho.

Jaci, Kelin e Mélo por tudo o que eu sei, pelos exemplos de conduta, responsabilidade e auxílio nas tomadas de decisões, pelo continuado estímulo e a valiosa parceria.

Lauren e Willian muito obrigada pela disponibilidade, amizade e por todas as horas de companhia e ajuda ao longo desse trabalho.

Karina, Raquel, Fran, Léo e Cléo muito obrigada pela paciência e disponibilidade sempre que dúvidas ou imprevistos apareceram.

Luna, por tornar o meu dia a dia mais prazeroso, e por ter me incentivado e insistido que no final tudo daria certo.

Às melhores amigas do mundo que alguém poderia ter, vocês foram a válvula de escape ao longo desses anos, cada uma de vocês têm um lugar muito especial no meu coração: Manila G., Greice, Manila C., Eliane, Ketlyn e Cris.

Ao Rafael, que por vezes deve ter detestado a mim e a este trabalho, pois ele sacrificou muitos momentos que poderíamos ter desfrutado juntos, mas sempre incentivou, apoiou e, sempre me cobrou para que eu concluísse mais esta etapa de nossas vidas que vamos construindo juntos.

Às “Glaucetes” Ana Paula, Morgana, Andréia e Letícia obrigada pelas conversas, conselhos, risadas e principalmente pela tão agradável companhia dentro e fora do laboratório.

Aos demais colegas do ENGEPIO, com carinho especial à Denise e ao querido e atencioso Sr. Zé.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Os Poli-hidroxicanoatos (PHAs) são uma família de polímeros biodegradáveis que muitos micro-organismos são capazes de sintetizar, sendo os mesmos considerados uma alternativa futura aos plásticos convencionais. O Poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)) é o PHA mais estudado. Técnicas de engenharia genética vem sendo desenvolvidas em *Escherichia coli*, um micro-organismo naturalmente não produtor de PHAs, para se estabelecerem processos de produção microbiana através das técnicas de DNA recombinante. Porém, antes de se submeterem determinadas linhagens a essas técnicas, é necessário que estas estejam bem caracterizadas. Desta forma, estudaram-se linhagens de *E. coli*, JM101 e DH5 α , com os genes para a biossíntese de P(3HB) de *Cupriavidus necator*, utilizando glicose como fonte de carbono. Para a linhagem DH5 α as velocidades específicas máximas de crescimento foram de 0,79 h⁻¹, para a cepa selvagem, e 0,21 h⁻¹ para a recombinante. Os fatores de conversão de substrato em células foram de 0,32 e 0,20 (g.g⁻¹), os fatores de conversão de oxigênio em células foram de 3,94 e 1,65 (g.g⁻¹) e as velocidades específicas de consumo de oxigênio para manutenção celular foram 52,59 e 25,72 (g.g⁻¹.h⁻¹) para *E.coli* DH5 α selvagem e recombinante, respectivamente. Os níveis de acúmulo de P(3HB) em *E. coli* DH5 α alcançaram valores em torno de 56 %, com produtividade máxima de 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹. Para a linhagem JM101 as velocidades específicas máximas de crescimento foram de 0,91 h⁻¹ para a cepa selvagem e 0,72 h⁻¹ para a recombinante. *E. coli* JM101 apresentou duas fases distintas de consumo de açúcares redutores. Assim, os fatores de conversão de substrato em células observados na primeira fase foram de 7,55 e 1,32 (g.g⁻¹) e na segunda fase foram de 0,069 e 0,072 (g.g⁻¹), os fatores de conversão de oxigênio em células foram de 2,95 e 2,85 (g.g⁻¹) e as velocidades específicas de consumo de oxigênio para manutenção celular foram 55,23 e 58,89 (g.g⁻¹.h⁻¹) para *E.coli* JM101 selvagem e recombinante, respectivamente. Os níveis de acúmulo de P(3HB) em *E. coli* JM101 alcançaram valores em torno de 34 %, com produtividade máxima de 0,10 g.L⁻¹.h⁻¹. Com a análise conjunta dos dados experimentais é possível concluir que a inserção do plasmídeo pBHR68 em *E. coli* JM101 e DH5 α afetou o desempenho celular, visto a diferença dos parâmetros cinéticos de crescimento e de respiração microbiana das cepas antes e depois da transformação.

Palavras-chave: Poli(3-hidroxi-butirato), *Escherichia coli*, parâmetros cinéticos.

ABSTRACT

Polyhydroxyalcanoates (PHAs) are a family of biodegradable polymers synthesized for several bacteria. These polymers are considered a future alternative for conventional plastics. Poly(3-hydroxybutyrate) is the most widely studied PHA. Techniques of genetic engineering has been developed in *Escherichia coli*, a naturally non-producing PHAs microorganism, to establish processes of microbial production of P(3HB) through the techniques of recombinant RNA. However, before submitting *E. coli* strains to these techniques, it is necessary to investigate the strains and culture strategies. The present work examines two different strains of *E. coli*, JM101 and DH5 α , a control strain and a P(3HB)-synthesizing strain, with the genes for biosynthesis of P(3HB) from *C. necator*, using glucose as a carbon source. The strain *E. coli* DH5 α had a maximum specific growth rate of 0.79 h⁻¹ for the control strain, and 0.21 h⁻¹ for the recombinant strain, the carbon yield were 0.32 and 0.20 (g.g⁻¹), the oxygen yield were 3.94 and 1.65 (g.g⁻¹) and the oxygen consumption for maintenance were 52.59 e 25.72 (g.g⁻¹.h⁻¹), for the control strain and the recombinant strain, respectively. The P(3HB) accumulation in *E. coli* DH5 α reached values around 56 %, with productivity of 0.23 g.L⁻¹.h⁻¹. For the strain *E. coli* JM101 the maximum speed of growth were 0.91 h⁻¹ for the control strain and 0.72 h⁻¹ for the recombinant. *E. coli* grows in two distinct phases, the carbon yield in the first phase were 7.55 and 1.32 (g.g⁻¹) and in the second phase were 0.069 and 0.072 (g.g⁻¹), the yield factors of oxygen in cells were 2.95 e 2.85 (g.g⁻¹) and the oxygen consumption for maintenance were 55.23 and 58.89 (g.g⁻¹.h⁻¹) for the control strain and the P(3HB)-synthesizing strain, respectively. The P(3HB) accumulation in *E. coli* JM101 reached values around 34 %, with productivity of 0,10 g.L⁻¹.h⁻¹. With this information it is possible to conclude that the insertion of the plasmid pBHR68 in *E. coli* JM101 and DH5 α affected the metabolic. This fact was confirmed by the difference in growth parameters and microbial respiration of the strains before and after the transformation.

Keywords: Poli(3-hydroxybutyrate); *Escherichia coli*; kinetic parameters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura geral dos PHAs (LEE, 1996).....	30
Figura 2.2 Ilustração esquemática da biossíntese de PHB em <i>Cupriavidus necator</i> , destacam-se as enzimas envolvidas e a organização dos respectivos genes no operon. A letra “P” indica a localização do promotor do operon.....	32
Figura 2.3 Esquema simplificado da via metabólica de produção de P(3HB) em <i>C. necator</i> a partir de glicose (Adaptado de MADISON e HUISMAN, 1999).....	33
Figura 3.1 Plasmídeo pBHR68, contendo os genes <i>Amp^r</i> e <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>C. necator</i> (ANTONIO, STEINBUCHER, REIN, 2000).....	41
Figura 3.2 Representação esquemática dos meios de cultivo utilizados nos testes para definição do meio de cultivo; onde LB+MR representam meios comumente utilizados com <i>E. coli</i> recombinante e NB+MM representam os comumente utilizados com <i>C. necator</i> , para a produção de P(3HB).....	44
Figura 3.3 Representação das condições de cultivo para a escolha do meio de cultivo complexo.	45
Figura 3.4 Representação das condições de cultivo para a escolha do meio de cultivo quimicamente definido.	46
Figura 3.5 Representação das condições de cultivo para a escolha do tempo de preparo do inóculo.	47
Figura 3.6 Representação das condições de cultivo para ensaios em biorreator com linhagens de <i>E. coli</i> JM101 e DH5 α , selvagens e recombinantes.	48
Figura 3.7 Ilustração do Método Dinâmico utilizado para determinar QO ₂ . C ₀ e C ₀₁ representam respectivamente, a concentração de oxigênio dissolvido antes e após cessar a aeração.....	53

Figura 4.1 Perfil de migração de fragmentos do plasmídeo pBHR68 após eletroforese em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio.....	55
Figura 4.2 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> JM101 selvagem em meio NB em incubador rotativo.	56
Figura 4.3 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> JM101 selvagem em meio MM em incubador rotativo.	57
Figura 4.4 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> JM101 selvagem em meio LB em incubador rotativo.	58
Figura 4.5 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> DH5 α selvagem em meio LB em incubador rotativo.	58
Figura 4.6 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> JM101 selvagem em meio MR em incubador rotativo.	59
Figura 4.7 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> DH5 α selvagem em meio MR em incubador rotativo.	59
Figura 4.8 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> JM101 selvagem (\blacktriangle) e recombinante (\diamond) em incubador rotativo.	61
Figura 4.9 Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> DH5 α selvagem (\blacktriangle) e recombinante (\diamond), em incubador rotativo.	62
Figura 4.10 Evolução de biomassa total (X_t (\bullet)) e substrato residual (S (\blacksquare)) para <i>E. coli</i> JM101 selvagem em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software <i>Lissage</i>	63
Figura 4.11 Evolução da biomassa total (X_t (\bullet)), biomassa residual (X_r (—)), P(3HB) (P (\blacktriangle)) e substrato residual (S (\blacksquare)) para <i>E. coli</i> JM101 recombinante em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software <i>Lissage</i>	64
Figura 4.12 Representação logarítmica da biomassa total (X_t) de <i>E. coli</i> JM101 selvagem (\bullet) e biomassa residual (X_r) de <i>E. coli</i> JM101 recombinante (Δ) em biorreator.	65

- Figura 4.13** Evolução da biomassa total (X_t (●)) e consumo de substrato (S (■)) para *E. coli* DH5 α selvagem em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*. 66
- Figura 4.14** Evolução da biomassa total (X_t (●)), biomassa residual (X_r (—)), P(3HB) (P (▲)) e consumo de substrato (S (■)) para *E. coli* DH5 α recombinante em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*. 67
- Figura 4.15** Representação logarítmica da biomassa total (X_t) de *E. coli* DH5 α selvagem (●) e biomassa residual (X_r) de *E. coli* DH5 α recombinante (Δ) em biorreator. 68
- Figura 4.16** Relação entre a concentração de biomassa e substrato para a determinação do fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de *E. coli* JM101 selvagem (a) e recombinante (b). 69
- Figura 4.17** Relação entre a concentração de biomassa e substrato para a determinação do fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de *E. coli* DH5 α selvagem (a) e recombinante (b). 70
- Figura 4.18** Velocidades específicas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem (●) e recombinante (\square) dos ensaios em biorreator. 71
- Figura 4.19** Velocidades específicas de crescimento de *E. coli* DH5 α selvagem ($::$) e recombinante (\blacktriangle) dos ensaios em biorreator. 71
- Figura 4.20** Perfil da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) *E. coli* JM101 selvagem (●) e recombinante (\square). 73
- Figura 4.21** Perfil da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) *E. coli* DH5 α selvagem (●) e recombinante (\square). 74
- Figura 4.22** Relação entre a velocidade específica de respiração (QO₂) e a velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) de *E. coli* JM101 selvagem (\square) e recombinante ($::$). 75
- Figura 4.23** Relação entre a velocidade específica de respiração (QO₂) e a velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) de *E. coli* DH5 α selvagem (\square) e recombinante (\circ). 76

Figura A1 Curva típica padrão para determinação da concentração de açúcares redutores totais..... 96

Figura A2 Curva típica padrão para determinação da concentração de P(3HB). 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Resumo de resultados apresentados por diferentes autores para a produção de P(3HB) utilizando *Escherichia coli* recombinante. 38

Tabela 4.1 Parâmetros cinéticos de *E. coli* JM101 e DH5 α , selvagens e recombinantes obtidos neste trabalho e de *C. necator* (IENCZAK, 2011). 77

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PHAs	Poli-hidroxiálcanoatos
P(3HB)	Poli(3-hidroxi-butirato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxi-butirato- <i>co</i> -3-hidroxi-valerato)
3HV	3-hidroxi-valerato
PHA _{SCL}	Poli-hidroxiálcanoatos de cadeia curta
PHA _{MCL}	Poli-hidroxiálcanoatos de cadeia média
PP	Polipropileno
DNA	Ácido desoxinucleico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
<i>Amp</i> ^r	Gene que confere resistência à ampicilina
IPTG	Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo
<i>phaCAB</i>	Operon contendo os genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i>
<i>phaA</i>	Gene codificando para β-cetotiolase
<i>phaB</i>	Gene codificando para NAD(P)H-dependente acetoacetyl-CoA-redutase
<i>phaC</i>	Gene codificando para β-cetotiolase
pBHR68	Plasmídeo contendo os genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>Cupriavidus necator</i>
CoASH	Coenzima A
NB	Nutrient Broth
LB	Luria Bertani
MM	Meio mineral de <i>C. necator</i>

OD	Oxigênio dissolvido
MR	Meio mineral de <i>E. coli</i>
t	Tempo
ART	Açúcares redutores totais
Abs	Absorbância
DNS	Dinitrosalicílico

LISTA DE SÍMBOLOS

P	Produto
S	Substrato
μ	Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})
Pr	Produtividade de P(3HB) ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
QO ₂ X	Velocidade de respiração celular ($\text{mg}_{\text{O}_2}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
QO ₂	Velocidade específica de respiração ($\text{mg}_{\text{O}_2}.\text{g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
C	Concentração de oxigênio ($\text{g}_{\text{O}_2}.\text{L}^{-1}$)
C _s	Concentração de saturação de O ₂ dissolvido no líquido ($\text{g}_{\text{O}_2}.\text{L}^{-1}$)
m _O	Velocidade específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular ($\text{g}_{\text{O}_2}.\text{g}_{\text{cel}}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
Y _{X/O}	Fator de conversão de oxigênio para células ($\text{g}_{\text{cel}}.\text{g}_{\text{O}_2}^{-1}$)
Y _{P(3BH)/S}	Fator de conversão de carbono em P(3HB) ($\text{g}.\text{g}^{-1}$)
X _t	Biomassa total ($\text{g}.\text{L}^{-1}$)
X _r	Biomassa residual ($\text{g}.\text{L}^{-1}$ e/ou g)
rpm	Rotações por minuto
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVOS	27
1.1.1 Objetivo Geral	27
1.1.2 Objetivos Específicos	27
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS	29
2.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)	30
2.3 PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA BIOCINTÉSE E DEGRADAÇÃO DE P(3HB)	31
2.3.1 Enzimas da Via Metabólica de Produção de P(3HB) (β -cetotilase (PhaA), acetoacetil-CoA redutase (PhaB) e PHA sintase (PhaC))	32
2.3.2 Enzimas Envolvidas na Regulação da Produção de P(3HB) (PHA despolimerase (PhaZ) e PHAsinas (PhaP))	34
2.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAs	35
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> Recombinante	36
2.5 INDUTORES	38
2.6 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEO	41
3.2 OBTENÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> RECOMBINANTE	41
3.2.1 Preparação das Células para a Transformação	42
3.2.2 Transformação e Seleção dos Transformantes	42
3.2.3 Seleção de Colônias para Confirmação do DNA Plasmidial	42
3.2.4 Extração do DNA Plasmidial para Confirmação da Transformação	43
3.3 MEIOS DE CULTIVO	43
3.3.1 Obtenção de <i>Escherichia coli</i> Recombinante	43

3.3.2 Cultivos em Agitador Orbital para a Definição do Meio de Cultivo	43
3.3.3 Cultivos em Agitador Orbital e Biorreator	44
3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO	45
3.4.1 Cultivos em Agitador Orbital para a Definição do Meio de Cultivo	45
3.4.2 Cultivos em Agitador Orbital para Definição do Tempo de Incubação do Inóculo	46
3.4.2 Cultivos em Biorreator	47
3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	48
3.5.1 Amostragem	48
3.5.2 Determinação da Concentração da Biomassa.....	48
3.5.3 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais ...	49
3.5.4 Determinação da Concentração de P(3HB).....	49
3.5.5 Determinação do Oxigênio Dissolvido	50
3.6 TRATAMENTO DOS DADOS.....	50
3.6.1 Ajuste dos Dados.....	50
3.6.2 Análise Cinética	50
3.6.3 Produtividade de P(3HB)	51
3.6.4 Fatores de Conversão	52
3.6.5 Consumo de Oxigênio.....	52
3.6.6 Velocidade Específica de Consumo de Oxigênio para a Manutenção Celular e Fator de Conversão de Oxigênio em Células	53
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> JM101 E DH5 α	55
4.2 ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS	56
4.2.1 Definição do meio de cultivo	56
4.2.2 Definição do tempo de incubação	60
4.3 ENSAIOS EM BIORREATOR.....	62

5 CONCLUSÕES.....	80
6 TRABALHOS FUTUROS.....	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
APÊNDICE.....	96

1 INTRODUÇÃO

Os materiais plásticos de origem petroquímica vem ganhando espaço em novas aplicações e também como substitutos a outros materiais e atualmente eles são indispensáveis para a realização de diversas tarefas do cotidiano das pessoas. Contudo, a durabilidade do plástico de origem petroquímica, ao mesmo tempo em que o torna um produto atraente para o mercado, é o que também o faz indesejável, devido ao crescente acúmulo de materiais plásticos no meio ambiente.

Uma das saídas encontradas por muitos países para resolver o problema ambiental causado pelo uso em larga escala destes plásticos tem sido o desenvolvimento de plásticos biodegradáveis (REDDY, GHAI, KALIA, 2003). Os biopolímeros chamam a atenção pela sua versatilidade e, principalmente, pela similaridade às propriedades encontradas nos polímeros comerciais. Dentre os diferentes biopolímeros em estudo para esta finalidade, destacam-se os poliésteres de origem bacteriana, denominados Poli-hidroxialcanoatos (PHAs). O PHA mais estudado e mais comum entre as bactérias é o homopolímero Poli(3-hidroxi butirato) (P(3HB)).

Desde a descoberta do P(3HB) em *Bacillus megaterium* por Maurice Lemoigne em 1926, mais de 150 tipos de monômeros já foram descobertos (STEINBUCHER e VALENTIN, 1995). Esta grande variedade de monômeros apresenta diversas propriedades e desta forma, os PHAs foram classificados em três tipos: termoplásticos, elastômeros e co-polímeros.

A composição dos monômeros dos PHAs depende muito da capacidade metabólica do micro-organismo utilizado e da especificidade pelo substrato da enzima PHA sintase que, subsequentemente determina as propriedades físico-químicas do PHA formado (LEE, 1996; REHM, 2003). Isto significa dizer que, a produção de PHAs via microbiana pode ser otimizada através de técnicas de engenharia metabólica, e pode ser finalmente maximizada com o melhoramento dos processos fermentativos (JUNG, LEE, TAM, 2010).

Embora os micro-organismos naturalmente produtores tenham a capacidade de acumular quantidades significativas desses biopolímeros, frequentemente eles têm velocidade específica de crescimento relativamente baixa, baixas temperaturas ótimas de crescimento, e possuem também vias de degradação de PHAs, características essas que se apresentam como desvantagens dos processos de obtenção (MADISON e HUISMAN, 1999).

A engenharia genética cresceu muito nos últimos anos, tendo como objetivo prático viabilizar a síntese de produtos complexos (ALBERTS, 2005). Dentre os micro-organismos mais estudados pela engenharia genética, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* é um dos sistemas mais utilizados, devido à sua habilidade de crescer rapidamente, atingir altas concentrações celulares, assimilar diversos substratos e devido à riqueza de informações a respeito do seu metabolismo (LIRIA, 1995; CHOIN, KEUM, LEE, 2006).

A expressão de proteína recombinante em *E. coli* é considerado um processo atípico à célula e acaba causando problemas à hospedeira. Portanto, a escolha cuidadosa dos vetores, dos hospedeiros e das condições de crescimento é considerada essencial para a obtenção de elevados níveis de expressão neste micro-organismo (THE QIA EXPRESSIONIST, 2003).

Como *E. coli* não possui a capacidade de sintetizar ou degradar PHAs, a disponibilidade de genes, já clonados, envolvidos na biossíntese de PHAs facilita a construção de *E. coli* recombinante para este fim (FONSECA, 2003). *E. coli* recombinante apresenta as vantagens de poder acumular mais de 80 % de sua massa celular seca em PHAs; poder assimilar várias fontes de carbono, tais como sacarose e xilose; não possuir enzimas despolimerases intracelulares que possam vir a degradar o PHA acumulado e produz PHA associado ao crescimento celular, além de necessitar de menor controle de processo, por não exigir limitação nutricional para induzir a produção do biopolímero (FIDLER e DENNIS, 1992; STEINBUCHEL e FUCHTENBUSCH, 1998; MADISON e HUISMAN, 1999).

Diversos trabalhos com produção heteróloga de P(3HB) utilizando as linhagens JM101 e DH5 α de *E. coli* já foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos do Departamento de Bioquímica, sob orientação da Prof^a Regina Vasconcellos Antônio (FONSECA, 2003; ARAÚJO, 2005; BRESSAN, 2007). Entretanto, esses estudos foram realizados em pequena escala e os parâmetros cinéticos de crescimento e respiração microbiana não foram anteriormente obtidos.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, sob a orientação dos Professores Gláucia Maria Falcão Aragão e Willibaldo Schmidell que vem desenvolvendo processos para obtenção de P(3HB) a partir de *C. necator*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Nesse contexto, esta dissertação de mestrado representou uma interface entre os dois laboratórios e teve como objetivo principal estudar a produção de P(3HB) pelas linhagens JM101 e DH5 α de *Escherichia coli* recombinante em biorreator.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Obter *E. coli* recombinantes, a partir de cepas selvagens de *E. coli* nas linhagens JM101 e DH5 α , de forma a permitir a produção de P(3HB) nestas bactérias;
- Verificar o efeito causado pela inserção do vetor recombinante, através da comparação dos parâmetros cinéticos de crescimento e respiração microbiana, das cepas selvagens e recombinantes nas linhagens JM101 e DH5 α de *E. coli*;
- Comparar a produção de P(3HB) entre *E. coli* JM101 recombinante e *E. coli* DH5 α recombinante.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS

Os plásticos possuem inúmeras aplicações na indústria, podendo variar da automotiva à médica, pois sua estrutura permite que eles sejam quimicamente manipulados para a obtenção de uma ampla gama de produtos. Polietileno, cloreto de polivinil e poliestireno são comumente utilizados como matéria-prima de diferentes produtos (REDDY, GHAI, KALIA, 2003).

Devido ao fato de algumas aplicações dos materiais plásticos de origem petroquímica, como por exemplo, nas embalagens, serem de descartabilidade muito rápida, associado à grande dificuldade de degradação e alta durabilidade desses materiais, eles acabaram se tornando uma grande preocupação ambiental (SCHMIDELL e VITORATTO, 1992).

O desenvolvimento tecnológico tem permitido identificar novos materiais que possuem propriedades termoplásticas e características de desempenho semelhantes às dos plásticos petroquímicos, e que são degradados pela ação de micro-organismos no meio ambiente. Dentre estes materiais que reúnem características de termoplaticidade e biodegradabilidade destacam-se os poli-hidroxicanoatos (PHAs) (SQUIO e ARAGÃO, 2004).

Os PHAs são polímeros biodegradáveis que são produzidos por inúmeros micro-organismos como forma de reserva de energia. Esses polímeros são conhecidos por sua biocompatibilidade, ou seja, não há geração de substâncias tóxicas durante a sua biodegradação. Essa propriedade, que é raramente encontrada nos materiais poliméricos de origem petroquímica permite que os PHAs sejam amplamente aplicados (ZINN, WITHOLT, EGLI, 2001). Suas propriedades permitem que sejam utilizados como substitutos aos plásticos de origem petroquímica em algumas aplicações (SILVA et al., 2007).

Os PHAs têm potencial atrativo como substitutos aos plásticos sintéticos, entretanto, seu alto custo de produção ainda os torna pouco competitivos comercialmente. Esta desvantagem tem estimulado o desenvolvimento de tecnologias rentáveis para a produção de PHAs, incluindo estratégias de cultivo e linhagens produtoras mais eficientes (PRADELLA et al, 2012).

Segundo RAMSAY (1994), os PHAs podem ser classificados em dois grupos: 1. Os polímeros constituídos de unidades monoméricas de

5 carbonos ou menos, são denominados de cadeia lateral curta (PHA_{SSC}); 2. Os polímeros com unidades monoméricas com mais de 6 carbonos são os de cadeia lateral média ou cadeia lateral longa (PHA_{MSC}). Os PHA_{SSC} possuem características próximas às dos termoplásticos, enquanto que os PHA_{MSC} aproximam-se às de termofixos (TIM e STEINBUCHER, 1990).

A estrutura química da unidade monomérica do PHA está apresentada na Figura 2.1. O tipo de radical **R** e o valor de **n** dão origem às diferentes unidades monoméricas que constituem os polímeros e os co-polímeros. O radical **R** pode variar de um único átomo de H, até tridecil (C₁₃), podendo conter insaturações, grupos aromáticos ou, ainda, ligações a elementos como flúor, cloro e cromo. Os 3-hidroxiálcanoatos são os monômeros mais encontrados, porém 4, 5 e 6-hidroxiálcanoatos também têm sido incorporados (MADISON e HUISMAN, 1999).

$\left[\text{—O—CH—(CH}_2\text{)}_n\text{—C—} \right]_{100-3000}$ <div style="display: flex; justify-content: center; align-items: center; gap: 20px;"> <div style="text-align: center;"> </div> <div style="text-align: center;">R</div> <div style="text-align: center;"> O</div> </div>		
n=1	R= hidrogênio R= metil R= etil R= propil R= pentil R= nonil	Poli (3-hidroxi propionato) Poli (3-hidroxi butirato) Poli (3-hidroxi valerato) Poli (3-hidroxi hexanoato) Poli (3-hidroxi octanoato) Poli (3-hidroxi dodecanoato)
n=2	R= hidrogênio R= metil	Poli (4-hidroxi butirato) Poli (4-hidroxi valerato)
n=3	R= hidrogênio R= metil	Poli (5-hidroxi valerato) Poli (5-hidroxi hexanoato)
n=4	R= hexil	Poli (6-hidroxi dodecanoato)

Figura 2. 1 Estrutura geral dos PHAs (LEE, 1996).

2.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO)

O mais amplamente estudado membro da família dos PHAs, o P(3HB), é formado de unidades monoméricas de 3-hidroxi butirato e é um dos polímeros obtidos com maior facilidade nos sistemas de produção (SUDESH, ABE, DOI, 2000). O P(3HB) é um termoplástico altamente cristalino com temperatura de fusão em torno de 180 °C. Suas propriedades físicas são frequentemente comparadas às do polipropileno (PP) (DOI, 1990; STEINBUCHER, 1991; DE KONING, 1995).

O P(3HB) destaca-se em função de sua rápida degradação, sob diferentes condições ambientais, a dióxido de carbono e água pelos micro-organismos do meio ambiente, sendo facilmente degradado no

solo (GROTHER, MOO-YOUNG, CHISTI, 1999). Relatos demonstraram claramente que este polímero pode ser degradado sob diferentes condições ambientais como, por exemplo, aerobiose e anaerobiose (TOKIWA et al., 1992; NISHIDA e TOKIWA, 1993).

O P(3HB) pode ser produzido a partir de fontes renováveis de carbono, ácidos graxos e óleos vegetais. A produção de P(3HB) por micro-organismos pode ser realizada de duas formas: em uma só etapa, na qual a síntese de P(3HB) ocorre associada à multiplicação celular; ou em duas etapas, das quais a primeira tem por objetivo a multiplicação celular e a segunda o acúmulo de quantidades expressivas deste polímero (DOI, 1990).

A bactéria *Cupriavidus necator*, antes denominada como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VANDAMME e COENYE, 2004), é a mais estudada na área de produção de PHAs, pela sua capacidade de sintetizar e acumular altos teores de P(3HB) (ANDERSON e DAWES, 1990). Quando cultivada sob condições limitantes de crescimento, com a falta de um ou mais nutrientes essenciais e excesso da fonte de carbono, pode acumular grandes quantidades de P(3HB), chegando a 80 % de sua biomassa seca (DAWES, 1973; DOI et al., 1990).

Embora o PHA mais bem estudado seja o P(3HB), existem mais de 140 possíveis monômeros constituintes (STEINBUCHEL e VALENTIN, 1995) que são tradicionalmente classificados conforme o comprimento da cadeia.

2.3 PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA BIOSSÍNTESE E DEGRADAÇÃO DE P(3HB)

Os mecanismos da biossíntese de PHAs em várias bactérias vem sendo estudados tanto em relação às vias metabólicas como às análises moleculares dos genes envolvidos. A síntese de PHAs depende de três fatores principais: das vias metabólicas presentes nas bactérias produtoras, do tipo da PHA sintase bacteriana (enzima que catalisa a incorporação de monômeros à cadeia) e da fonte de carbono fornecida.

Entre as enzimas mais estudadas estão as envolvidas na biossíntese de P(3HB) por *C. necator* a partir de glicose. A primeira reação consiste na condensação de duas moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA, catalisada pela β -cetotilase (codificada pelo gene *phaA*). A segunda reação é uma redução da acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, catalisada pela acetoacetil-CoA redutase (codificada pelo gene *phaB*). A última reação é a polimerização dos monômeros de

hidroxibutiril-CoA, catalisada pela PHA sintase (codificada pelo gene *phaC*) (MADISON e HUISMAN,1999). A reação de síntese encontra-se esquematizada na Figura 2.2.

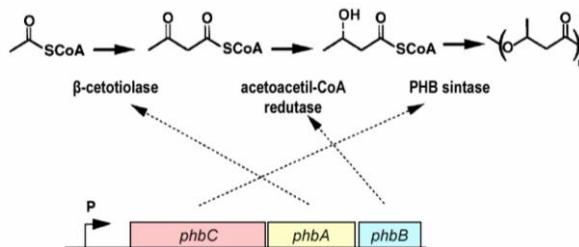


Figura 2. 2 Ilustração esquemática da biossíntese de PHB em *Cupriavidus necator*, destacam-se as enzimas envolvidas e a organização dos respectivos genes no operon. A letra “P” indica a localização do promotor do operon

Uma vez realizada a clonagem do operon de biossíntese de P(3HB) de *C. necator*, aproximadamente 20 anos atrás, mais de 50 genes estruturais de PHA sintase e outros genes relatados para biossíntese de PHAs de diversas bactérias tem sido clonados. O estudo desses genes, bem como das proteínas estruturais e reguladoras, é de fundamental importância para se estabelecerem as vias de biossíntese de PHAs em organismos naturalmente não produtores, mas considerados mais adequados para a produção comercial desses polímeros (STEINBUCHER e HEIN, 2001).

Os genes fundamentais *phaA* e *phaB*, que codificam as enzimas β-cetotilase e acetoacil-CoA redutase, respectivamente, como citado anteriormente estão envolvidos na formação de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia lateral curta. Para que seja possível reproduzir esta via metabólica em *E. coli*, estes dois genes juntamente com o *phaC*, que codifica a PHA sintase, têm de ser funcionalmente expressos na célula hospedeira (LI, ZHANG, QI, 2007).

2.3.1 Enzimas da Via Metabólica de Produção de P(3HB) (β-cetotilase (PhaA), acetoacil-CoA redutase (PhaB) e PHA sintase (PhaC))

Independente do substrato utilizado, a síntese de PHAs depende da formação de acetil-CoA, um intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e o ciclo de Krebs (STEINBUCHER e LUTKE-EVERSLOH, 2003).

A descrição das etapas envolvidas na biossíntese de P(3HB) a partir de glicose em *C. necator* encontra-se enquematizada na Figura 2.3.

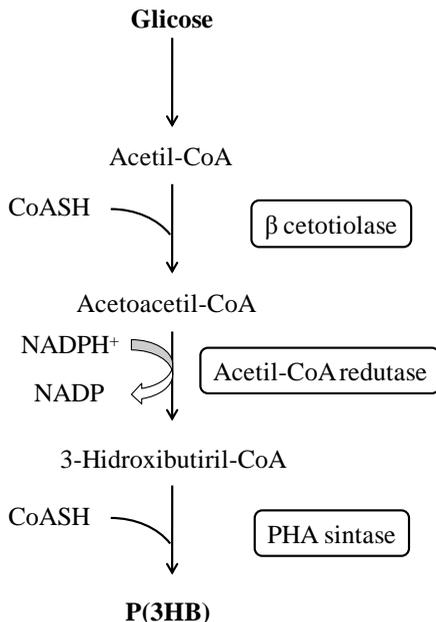


Figura 2. 3 Esquema simplificado da via metabólica de produção de P(3HB) em *C. necator* a partir de glicose (Adaptado de MADISON e HUISMAN, 1999).

A enzima β -cetotiolase catalisa a primeira reação na rota de biossíntese do P(3HB). Essas enzimas foram classificadas em dois grupos com base na especificidade com os substratos. O primeiro grupo se caracteriza por ter uma ampla especificidade (C_4 a C_{16}) e tem como principal função a degradação de ácidos graxos. A segunda é considerada biossintética e tem uma faixa mais estreita de especificidade (C_3 a C_5). A β -cetotiolase exerce papel fundamental na biossíntese de P(3HB), limitando-se à produção de acetoacetil-CoA (HAYWOOD et al., 1988).

A enzima acetoacetil-CoA redutase catalisa a segunda reação, convertendo o acetoacetil-CoA em 3-hidroxi-butil-CoA (MADISON e HUISMAN, 1999). Detectaram-se duas enzimas acetoacetil-CoA redutases em *C. necator*, uma NADPH-dependente e outra NADH-

dependente. Ambas foram estudadas quanto à atividade na reação de oxidação, e foi demonstrado que a enzima NADPH-dependente catalisa a oxidação de D(-)-3-hidroxiacil-CoA de cadeia com 4 a 6 átomos de carbono (STEINBUCHEL, 1996; SLATER et al., 1997).

As PHA sintases são as enzimas chave para a biossíntese de PHAs. A especificidade por substrato das PHA sintases é relativamente baixa. Elas apresentam um grande espectro de especificidade de substrato, e assim uma grande variedade de monômeros podem ser polimerizados. Por outro lado, a estereoespecificidade das PHA sintases é rigorosa: o átomo de carbono hidroxilo deve ter a configuração R (STEINBUCHEL e HEIN, 2001).

Essa enzima pode ser isolada na forma solúvel, quando não se tem acúmulo de PHA, e em forma insolúvel quando há acúmulo de polímero (HAYWOOD, ANDERSON, DAWES, 1989). Na fase de acúmulo de PHA, a PHA sintase juntamente com outras proteínas atuam na interface entre a superfície dos grânulos de PHA e o citoplasma celular (STEINBUCHEL et al., 1995).

Os genes fundamentais *phaA* e *phaB*, que codificam as enzimas β -cetotilase e acetoacetyl-CoA redutase, respectivamente, como citado anteriormente estão envolvidos na formação de 3-hidroxiacil-CoA de cadeia lateral curta. Para que seja possível reproduzir esta via metabólica em *E. coli*, estes dois genes juntamente com o *phaC*, que codifica a PHA sintase, têm de ser funcionalmente expressos na célula hospedeira (LI, ZHANG, QI, 2007).

2.3.2 Enzimas Envolvidas na Regulação da Produção de P(3HB) (PHA despolimerase (PhaZ) e PHAsinas (PhaP))

Além dos genes que catalisam a biossíntese do polímero, os micro-organismos produtores naturais de PHAs possuem outros genes para proteínas envolvidas na formação dos grânulos e/ou com funções de regulação (ALMEIDA et al., 2007).

Uma vez que os PHAs são inclusões de armazenamento de carbono, os micro-organismos que acumulam este polímero apresentam um mecanismo de despolimerização intracelular para sua utilização. Em contraste às amplamente estudadas despolimerases extracelulares de PHAs, as despolimerases intracelulares tem sido menos investigadas, embora elas desempenhem um papel fundamental no metabolismo global de PHAs. Bactérias podem possuir essas enzimas intra e/ou extracelulares. As extracelulares são as responsáveis pela degradação dos PHAs cristalinos liberados no ambiente (SUDESH, ABE, DOI,

2000). Já as intracelulares estão envolvidas na reutilização interna do PHA formado (STUBBE et al., 2005).

A enzima PHA despolimerase (codificada pelo gene *phaZ*) catalisa a degradação do P(3HB) em *C. necator*. A primeira sequência de nucleotídeos de uma PHA despolimerase intracelular de *C. necator* foi publicada em 2001 e esta enzima foi designada PhaZ1. Este foi um marco atingido apenas após a avaliação de uma biblioteca genômica de *C. necator* em *E. coli*, conseguindo identificar um fragmento de DNA que codificava uma enzima capaz de degradar grânulos de P(3HB) formados (SAEGUSA et al., 2001). Recentemente, quatro outras PHA despolimerases intracelulares foram identificadas nesse micro-organismo por YORK et al. (2003) (PhaZ2 e PhaZ3), SCHWARTZ et al. (2003) (PhaZ4) e POTTER et al. (PhaZ5) (2004).

As PHAsinas são enzimas que influenciam o tamanho dos grânulos intracelulares de PHAs (IENCZAK e ARAGÃO, 2011). Elas são proteínas sintetizadas em grandes quantidades na fase de acúmulo de polímero, podendo representar 5 % da proteína total e a quantidade de PHAsinas dá estabilidade aos grânulos de P(3HB) e previne a coalescência entre os mesmos (WIECZOREK et al., 1995).

As PHAsinas são idealizadas como proteínas não catalíticas, com um parte hidrofóbica, que se associa ao grânulo, e uma parte hidrofílica, que fica exposta ao citoplasma da célula e cuja função é a estabilização do grânulo, evitando sua coalescência com outros grânulos. Resultados experimentais mostraram que a presença de PHAsinas tem grande influência sobre a taxa de polimerização, aumentando-a de 60 % a 90 %. Além disso, a síntese de PHAsinas é fortemente regulada, a ponto dos genes responsáveis por sua produção estarem agrupados junto dos genes de síntese dos PHAs (JURASEK e MARCHESSAULT, 2002).

2.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE PHAs

A partir dos estudos com produção de PHAs a partir de fontes renováveis de carbono, esses polímeros passaram a ser considerados como principal alternativa aos plásticos convencionais. Em função disso, tornou-se cada vez mais adequado o conhecimento de novas estratégias de produção com qualidade superior e menor custo (ALDOR e KEASLING, 2003).

A seleção do micro-organismo tem grande influência nos custos de produção dos PHAs (ANDERSON e DAWES, 1990). É desejável que as cepas utilizadas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHAs elevadas, que possam utilizar substratos de baixo

custo, que apresentem porcentagem elevada de polímero em relação à massa total seca e, finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA elevado (RAMSAY, 1994). A redução nos custos de produção através da otimização das condições de cultivo e do uso de substratos de baixo custo, bem como pela obtenção de organismos mais eficientes, constitui um aspecto imprescindível para viabilizar a utilização dos PHAs em muitas aplicações.

Os produtores nativos de PHAs mais amplamente empregados em bioprocessos de produção incluem: *C. necator*, *Alcaligenes latus* e *Burkholderia sacchari* para a síntese de P(3HB) e P(3HB-co-3HV), *Aeromonas hydrophila* e *A. caviae* para obtenção do copolímero P(3HB-co-3HHx) e espécies de *Pseudomonas* para síntese de diferentes PHAs de cadeia média.

Com base na dependência da limitação de nutrientes para a produção de biopolímeros, essas bactérias podem ser classificadas em dois grupos. O primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes para a produção e o segundo grupo acumula PHAs já na fase de crescimento. Dentre as citadas pertencem ao segundo grupo somente *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante (LEE, 1996).

C. necator tem sido o micro-organismo mais estudado e utilizado para a produção de P(3HB) pois cresce facilmente, pode acumular elevados níveis de P(3HB) (mais de 80 % de sua massa celular seca) em meios de cultura simples e sua fisiologia e bioquímica quanto à síntese desse biopolímero são bem compreendidas (JUNG, PARK, LEE, 2000). Porém essa bactéria apresenta algumas desvantagens quanto à dificuldade de controle do processo, como por exemplo, a necessidade de limitação nutricional para que se dê início ao processo de acúmulo de P(3HB), a presença da enzima PhaZ que pode degradar o polímero uma vez formado (os grânulos de PHAs, além de fonte de carbono, podem servir como fonte de NADH e posteriormente ATP, através da utilização da reação da transidrogenase) e também à sua moderada velocidade específica máxima de crescimento.

2.4.1 *Escherichia coli* Recombinante

A disponibilidade de um grande número de genes biossintéticos de PHAs facilita a construção de organismos recombinantes para a produção de P(3HB). Embora *C. necator* ainda seja o produtor mais utilizado, esta bactéria têm certas limitações que restringem sua utilização para a produção comercial de P(3HB), além de não ser bem

caracterizado geneticamente, o que não favorece sua manipulação adicional para melhoras em seu desempenho (FONSECA, 2003).

A complexidade do processo para a obtenção de uma proteína heteróloga, envolve a escolha de um compartimento celular para a expressão da proteína. Em *E. coli* o produto recombinante é frequentemente armazenado no citoplasma.

Bactérias como *E. coli* são incapazes de sintetizar ou degradar PHAs. No entanto, *E. coli* cresce rapidamente, é geneticamente bem caracterizada e fácil de romper. O crescimento rápido permite um grande acúmulo de polímero e a fácil lise das células diminui os custos de purificação dos grânulos de PHAs (STEINBUCHER e SCHLEGEL, 1991; WANG e BAKKEN, 1998; MADISON e HUISMAN, 1999).

E. coli foi o primeiro micro-organismo a ser utilizado como célula hospedeira de genes heterólogos e, apesar da variedade de organismos e sistemas de expressão conhecidos para a produção de proteínas recombinantes, *E. coli* ainda é largamente utilizada (SWARTZ, 2001). O vasto conhecimento da fisiologia, bioquímica e genética dessa bactéria, faz desse micro-organismo um anfitrião perfeito para expressão heteróloga (MADISON e HUISMAN, 1999).

Classicamente, a produção de P(3HB) em *E. coli* recombinante tem sido obtida através da introdução do operon *phaCAB* de *C. necator*, resultando no acúmulo de grandes quantidades de P(3HB) (80 %) quando em condições de cultivo ideais (MADISON e HUISMAN, 1999; SLATR, GALLAHER, DENNIS, 1992).

E. coli recombinante é considerado um excelente produtor comercial de PHAs devido à possibilidade de utilizar uma ampla gama de fontes de carbono de baixo custo como, por exemplo, sacarose, xilose e lactose (LEE, 1997). A ausência de *PhaZ* em *E. coli*, visto que não é um micro-organismo naturalmente produtor, pode ser um dos fatores que explica a síntese de biopolímeros com peso molecular mais elevado nestes organismos (SUDESH, ABE, DOI, 2000).

A Tabela 2.1 apresenta um resumo dos resultados de conteúdo de P(3HB) (%P(3HB)), concentração de biomassa total (X_t (g.L⁻¹)), tipo da fonte de carbono e estratégia de cultivo, apresentados por diferentes autores para a produção de P(3HB) empregando *E. coli* recombinante.

Tabela 2. 1 Resumo de resultados apresentados por diferentes autores para a produção de P(3HB) utilizando *Escherichia coli* recombinante.

Cepa Recombinante	Fonte de Carbono	Tipo de Cultivo	X_t (g.L⁻¹)	% P(3HB)	Ref.
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Glicose	Batelada Alim.	11	73	KIM et al. (1992)
<i>E. coli</i> GCSC 6576	Soro de leite	Batelada Alim.	87	80	WONG e LEE (1998)
<i>E. coli</i> JM109	Glicerol	Batelada	8	60	MAHISHI e RAWAL (2002)
<i>E. coli</i> DH5 α	Glicose	Batelada	3	50	CARLSO et al. (2005)
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Glicose	Batelada Alim.	201	80	KAHAR et al. (2005)
<i>E. coli</i> JM 109	Glicose	Batelada	7,8	55	AGUS et al. (2006)

Um dos desafios de se produzir P(3HB) em organismos recombinantes é a expressão estável e constante dos genes durante o cultivo. A produção de P(3HB) por organismos recombinantes é frequentemente retardada pela perda de plasmídeo da maioria da população bacteriana (LEE, MERMELSTEIN, PAPOUTSAKIS, 1993). Tais problemas da estabilidade podem ser atribuídos à carga metabólica exercida pela necessidade de replicar o plasmídeo e sintetizar P(3HB), que desvia acetil-CoA a P(3HB) melhor que à biomassa (MADISON e HUISMAN, 1999).

2.5 INDUTORES

A expressão de genes inseridos em linhagens nativas de *E. coli*, por vezes, necessita de indução, a qual é realizada por compostos como o Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo (IPTG), um análogo à lactose.

O IPTG é um forte indutor químico utilizado largamente em pesquisa na indução de promotores (PANDA et al., 1999) e representa, atualmente, uma das moléculas indutoras mais utilizadas nos mais diversos sistemas de expressão heteróloga. Sua atuação baseia-se na ligação da estrutura do repressor *lac* ao indutor, que se sobrepõe na estrutura do repressor *lac*, ligada ao DNA.

2.6 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

Em bioprocessos que envolvem o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, o oxigênio apresenta-se como um elemento essencial ao suprimento de energia para o metabolismo celular. Está envolvido no processo de reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise, no ciclo de Krebs e no processo de produção de energia “química”, transformando moléculas de ADP em ATP. Estas por sua vez, participam necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência das células e fundamental para o crescimento da biomassa (SCHMIDELL, 2001).

Um problema peculiar relacionado ao oxigênio em bioprocessos é sua baixa solubilidade quando comparado aos outros nutrientes. Concentrações de oxigênio dissolvido em torno de 10 mg.L^{-1} , comuns nos meios de cultivo, chegam a ser 1 000 a 10 000 vezes menores que as concentrações de outros componentes do meio, como a glicose (BAILEY e OLLIS, 1986).

O processo de transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, no caso de cultivos de bactérias ou fungos filamentosos, enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos mais viscosos à medida que o cultivo evolui. Além disto, a disponibilidade de oxigênio deve ser suficiente para suprir as necessidades do micro-organismo considerando o aumento da concentração celular e o aumento da velocidade específica de respiração celular.

A concentração de oxigênio dissolvido pode afetar fortemente o desempenho dos cultivos e sua limitação tem efeitos negativos no crescimento celular. No entanto, informações sobre a transferência de oxigênio e respiração microbiana em bioprocessos utilizando proteínas recombinantes em *E. coli* para a produção de PHAs são escassas, bem como, não há trabalhos que reportem o estudo dos parâmetros cinéticos respiratórios em biorreator na produção de P(3HB) por *E. coli* recombinante.

Há relatos da produção de outras biomoléculas utilizando *E. coli* recombinante; RYAN, PARULEKAR, STARK (1989) relataram os efeitos da transferência de oxigênio para a produção de β -lactamase em meio LB; GRAY et al. (1992) estudaram o efeito de flutuações na concentração de oxigênio dissolvido na produção de β -galactosidase e ÇALIK et al. (2004) investigaram os efeitos da transferência de oxigênio na biossíntese de liase.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS E PLASMÍDEO

O micro-organismo utilizado no presente trabalho pertence à espécie bacteriana *Escherichia coli*, linhagens JM101 e DH5 α . As duas linhagens diferem entre si em relação aos níveis de expressão do repressor *lac*. *E. coli* DH5 α possui expressão constitutiva do repressor normal, enquanto que *E. coli* JM101 possui expressão aumentada do repressor, neste caso, a utilização de IPTG é necessária.

O plasmídeo utilizado foi o pBHR68 (SPIEKERMANN et al., 1999), o qual possui as seguintes características relevantes para este estudo: contém o gene de resistência à ampicilina (*Amp^r*) e os genes de biossíntese de P(3HB) de *Cupriavidus necator* (*phaA*, *phaB* e *phaC*), esboçado na Figura 3.1.

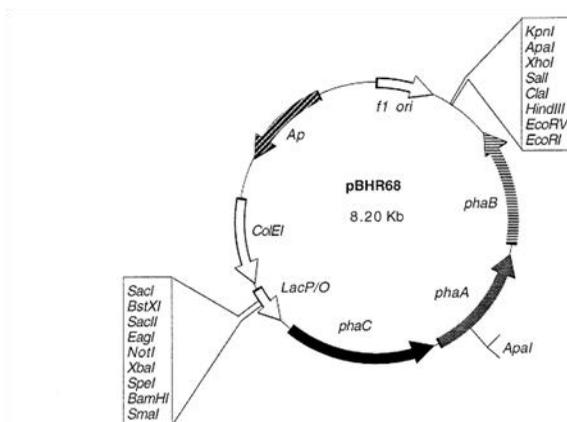


Figura 3. 1 Plasmídeo pBHR68, contendo os genes *Amp^r* e *phaA*, *phaB* e *phaC* de *C. necator* (ANTONIO, STEINBUCHER, REIN, 2000).

3.2 OBTENÇÃO DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE

Para obtenção das cepas recombinantes, as linhagens selvagens de *E. coli*, JM101 e DH5 α , foram submetidas à preparação de células para transformação, transformação e seleção. Essas etapas estão descritas nos itens a seguir.

3.2.1 Preparação das Células para a Transformação

O procedimento empregado para preparação das células competentes para a transformação está baseado no método descrito por HANAHAN (1983). Uma colônia isolada de *E. coli* em placa de Petri foi transferida para um frasco de 125 mL contendo 25 mL de meio LB (Luria Bertani), com a seguinte composição: 10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5 g.L⁻¹ de NaCl, com adição de 15 g.L⁻¹ de ágar no caso do meio sólido (BERTANI,1951) e incubada em agitador orbital por aproximadamente 18 horas, a 37 °C e 150 rpm. Em seguida, transferiu-se 125 µL deste caldo para outros 25 mL de meio. Este, por sua vez, foi novamente incubado sob as mesmas condições anteriores por 3 horas. Coletou-se 1,5 mL deste caldo em microtubo plástico e centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de uma solução de CaCl₂ 0,1 M gelado e repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições. O precipitado foi ressuspenso com 0,1 mL de CaCl₂ 0,1 M gelado.

3.2.2 Transformação e Seleção dos Transformantes

A transformação das células foi realizada pelo método descrito em SAMBROOK et al. (1989). A 200 µL da suspensão de células competentes, preparadas conforme item anterior, adicionou-se 2 µL da solução de DNA plasmidial (5 a 10 µM). O recipiente contendo células e plasmídeo foi deixado em banho de gelo por 30 min e, em seguida, em banho a exatamente 42 °C por 45 segundos, seguido de resfriamento em banho de gelo por mais 5 min. Adicionou-se 800 µL de meio LB pré-aquecido e incubou-se a 37 °C e 150 rpm, por uma hora, e em seguida, centrifugou-se a 4000 rpm por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de meio LB e alíquotas de 50 µL dessa solução foram transferidas e espalhadas em placas de Petri contendo meio ágar LB, adicionado de ampicilina (100 mg.L⁻¹) a fim de selecionar as colônias transformantes, visto que o plasmídeo utilizado contém o gene de resistência ao antibiótico. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

3.2.3 Seleção de Colônias para Confirmação do DNA Plasmidial

Coletou-se das placas uma única colônia recombinante, com auxílio de um palito de madeira estéril, e incubou-se em frascos de 125 mL contendo 25 mL de meio adicionado de ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a 37°C e 150 rpm, por aproximadamente 18 horas em agitador orbital. A etapa posterior consistiu na extração do DNA plasmidial e posterior análise do mesmo em eletroforese em gel de agarose 1 % corado com brometo de etídio.

3.2.4 Extração do DNA Plasmidial para Confirmação da Transformação

Para o isolamento do DNA plasmidial foi utilizado um “kit” comercial para extração da marca Mobio. Uma alíquota de 2 mL foi coletada do caldo cultivado contendo as transformantes (cultivado como descrito no item 3.2.3). A biomassa foi obtida pela centrifugação a 10000 rpm durante 10 min e ressuspensa em soluções tampões adequados a fim de romperem-se as células, eliminar o DNA genômico e obter-se o DNA plasmidial. Este último foi ressuspensão em 50 μL de tampão TE (solução integrante do kit) e armazenado a -20°C .

3.3 MEIOS DE CULTIVO

3.3.1 Obtenção de *Escherichia coli* Recombinante

O meio utilizado na preparação das células competentes à transformação, na transformação das cepas e na estocagem de *E. coli* selvagem e recombinante foi o meio LB.

3.3.2 Cultivos em Agitador Orbital para a Definição do Meio de Cultivo

Para a definição do meio de cultivo que foi posteriormente utilizado nos ensaios, testaram-se quatro meios, 2 deles complexos e 2 quimicamente definidos.

Os meios complexos testados foram o NB (Nutrient Broth), contendo peptona de carne ($5,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e extrato de carne ($3,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e o LB.

Os meios quimicamente definidos testados foram os meios minerais:

- MM com a seguinte composição (em $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): glicose 30, KH_2PO_4 4,39, citrato de amônio e ferro III 0,06, $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,5, uréia 2, ácido nitrilotriacético 0,19 e elementos traço 1 mL.L⁻¹. A solução de elementos traço tem a seguinte composição (em g.L⁻¹) H₃BO₃ 0,3, CoCl₂.6H₂O 0,2, ZnSO₄.7H₂O 0,1, MnCl₂.4H₂O 0,03, Na₂MoO₄.2H₂O 0,03, NiCl₂.6H₂O 0,02 e CuSO₄.5H₂O 0,01.

- MR com a seguinte composição (em g.L⁻¹): glicose 15, KH₂PO₄ 20, ácido cítrico 0,80, (NH₄)₂HPO₄ 4,0, MgSO₄.7H₂O 0,8, e elementos traço 0,50 mL.L⁻¹. Em cultivos com a linhagem JM101 de *E. coli* tiamina (0,15 mg.L⁻¹) foi adicionada ao meio. A solução de elementos traço tem em sua composição (em g.L⁻¹) de HCl 5 M: FeSO₄.7H₂O 10, CaCl₂ 2, ZnSO₄.7H₂O 2,2, MnSO₄.4H₂O 0,50, (NH₄)₆MoO₂₄.4H₂O 0,10 e NaBuO₇.10H₂O 0,02.

Com o objetivo de ilustrar os meios de cultivos utilizados nos testes abordados nesse item, a Figura 3.2 foi construída.

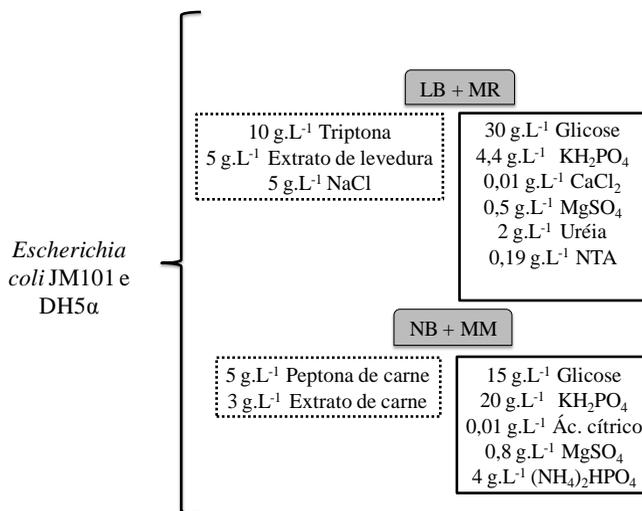


Figura 3. 2 Representação esquemática dos meios de cultivo utilizados nos testes para definição do meio de cultivo; onde LB+MR representam meios comumente utilizados com *E. coli* recombinante e NB+MM representam os comumente utilizados com *C. necator*, para a produção de P(3HB).

3.3.3 Cultivos em Agitador Orbital e Biorreator

O meio utilizado nos cultivos em frascos agitados (para estudo do tempo de incubação do inóculo), no inóculo do biorreator e nas bateladas em biorreator foi o LB. Nos ensaios em agitador orbital e biorreator, glicose (20 g.L⁻¹) foi adicionada.

3.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO

3.4.1 Cultivos em Agitador Orbital para a Definição do Meio de Cultivo

Como o presente trabalho esteve inserido em um grupo de pesquisa com produção e purificação de P(3HB) a partir de *C. necator*, nos primeiros testes realizados em incubador rotativo, a bactéria *E. coli* JM101 selvagem foi cultivada em meios de cultivo geralmente utilizados com *C. necator*, sendo eles: o NB que é utilizado como pré-inóculo e MM que é utilizado como inóculo e também como meio de cultivo final para produção de P(3HB) (SQUIO, 2003; FIORESE, 2008; DALCANTON, 2006).

Primeiramente estudou-se o comportamento das linhagens de *E. coli* em meios de cultivo complexos (NB e LB). Esta etapa consistiu basicamente no recolhimento de uma colônia isolada em placa de Petri da linhagem desejada de *E. coli* e inoculação desta em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio (NB ou LB), por aproximadamente 18 horas em agitador orbital, a 37 °C e 150 rpm. Esta cultura, foi então, transferida a uma concentração de 10 % (v/v) para 100 mL de meio em frascos de 250 mL (Figura 3.3).

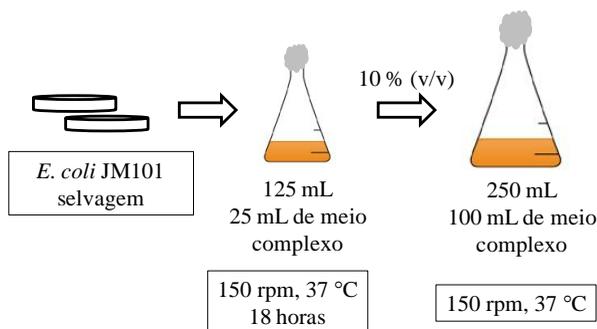


Figura 3. 3 Representação das condições de cultivo para a escolha do meio de cultivo complexo.

Para a realização dos ensaios em meios de cultivo quimicamente definidos (MM e MR), partiu-se de uma colônia isolada em placa de Petri da linhagem desejada de *E. coli*, inoculou-se 25 mL de meio (NB ou LB) em frascos erlenmeyer de 125 mL e estes permaneceram em agitador orbital por aproximadamente 18 horas, a 37 °C e 150 rpm. Esta

cultura, foi então, transferida com concentração de 10 % (v/v) para 150 mL de meio complexo (NB ou LB) contidos em frascos de 500 mL que permaneceram incubados durante 3 horas, sob as mesmas condições, e em seguida foram utilizados como inóculo (10 % v/v) a 400 mL dos meios quimicamente definidos contidos em frascos erlenmeyer aletados de 1000 mL (Figura 3.4).

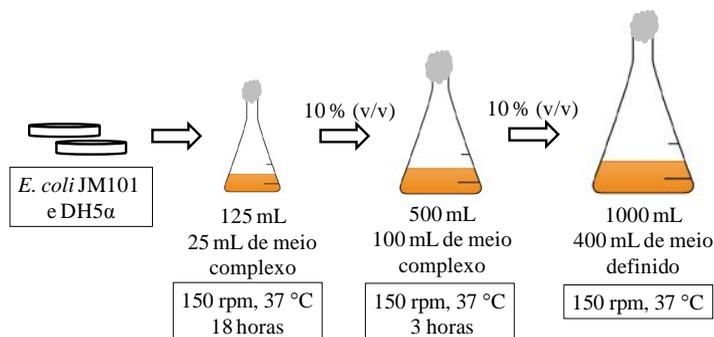


Figura 3. 4 Representação das condições de cultivo para a escolha do meio de cultivo quimicamente definido.

3.4.2 Cultivos em Agitador Orbital para Definição do Tempo de Incubação do Inóculo

Nesta etapa do estudo, os ensaios foram realizados para avaliação das curvas de crescimento de *E. coli*, nas linhagens JM101 e DH5α e, com isso, foi estabelecido o tempo de incubação dos inóculos para posterior utilização no biorreator.

No preparo do pré-inóculo, transferiu-se uma colônia isolada de *E. coli* de uma placa de Petri, contendo a linhagem desejada, para um frasco erlenmeyer de 125 mL, contendo 40 mL de meio LB. Este foi incubado a 37 °C sob 150 rpm, durante aproximadamente 18 horas.

Na etapa seguinte, recolheu-se uma concentração definida da etapa anterior (10 % v/v) e esta foi transferida para frascos erlenmeyer aletados, com capacidade de 1000 mL, contendo 400 mL de meio LB e glicose (20 g.L⁻¹), suplementados com ampicilina quando necessário, e cultivados em incubador rotativo sob agitação de 150 rpm e temperatura de 37 °C (Figura 3.5).

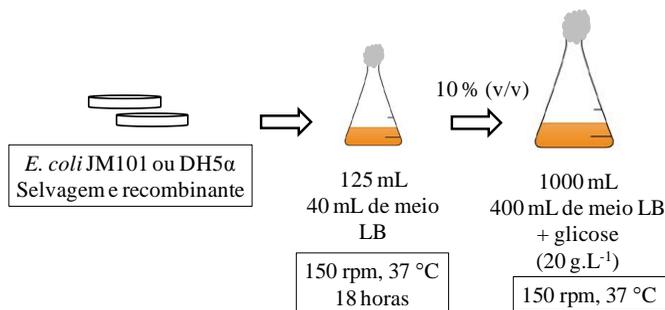


Figura 3. 5 Representação das condições de cultivo para a escolha do tempo de preparo do inóculo.

3.4.2 Cultivos em Biorreator

O pré-inóculo foi preparado partindo-se de uma colônia isolada *E. coli*, nas linhagens JM101 e DH5α (selvagem e recombinante), em frasco erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio (com adição de 100 µg/mL de ampicilina para as culturas transformantes) e cultivado sob 37 °C a 150 rpm durante 18 horas. Em seguida, essa cultura foi transferida para erlenmeyer de 1000 mL, contendo 400 mL de meio LB, e cultivada sob as mesmas condições por 3 horas, cultura esta que foi utilizada como inóculo do biorreator.

Após o preparo do inóculo, como descrito anteriormente, o mesmo foi transferido para um biorreator (BIOFLO III, New Brunswick Scientific) de 5 L, com volume útil de 4 L, contendo meio LB e glicose (20 g.L⁻¹) com adição de antibiótico (100 µg.mL⁻¹), se necessário. A temperatura foi mantida em 37 °C e o pH em 6,5 com adição de soluções de NaOH 2,5 mol.L⁻¹ ou HCl 2,7 mol.L⁻¹, com condições iniciais de agitação e aeração de 450 rpm e 0,3 vvm, respectivamente (Figura 3.6). As condições de agitação e aeração foram monitoradas e controladas para que a concentração de oxigênio dissolvido no meio não fosse inferior a 40 %, em relação à saturação com ar atmosférico.

Nos ensaios com *E. coli* JM101 recombinante, IPTG foi adicionado ao meio na concentração final de 1 mM.

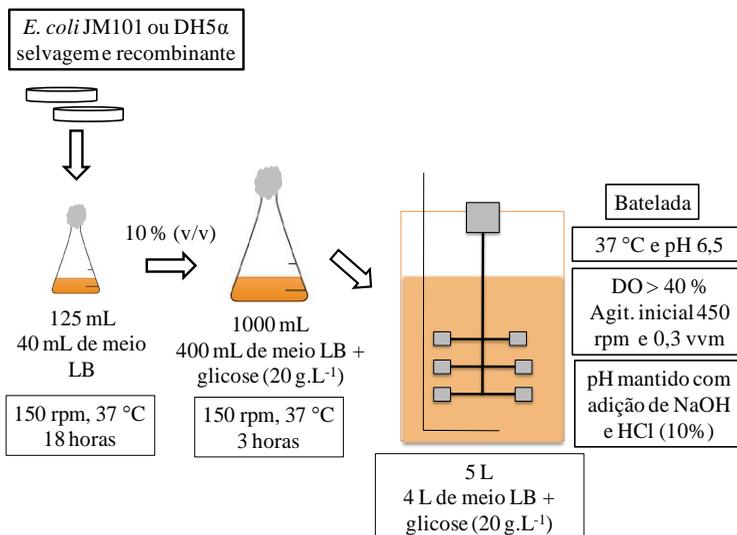


Figura 3. 6 Representação das condições de cultivo para ensaios em biorreator com linhagens de *E. coli* JM101 e DH5α, selvagens e recombinantes.

3.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.5.1 Amostragem

Em todos os ensaios realizados em incubador orbital, amostras foram retiradas a cada hora para a determinação do crescimento celular, com leitura da absorbância (600 nm) em espectrofotômetro (modelo 1105, marca Bel).

Nos ensaios em biorreator, amostras foram retiradas para o acompanhamento da biomassa por espectrofotometria e determinação da concentração celular por gravimetria; 2 mL foram coletados em microtubos de plástico e centrifugados a 14000 rpm por 3 min, sendo congelados sobrenadantes e precipitados. O sobrenadante foi posteriormente utilizado para a análise do consumo de substrato e o precipitado para análise de polímeros (experimentos com linhagens recombinantes) e análise de proteínas totais.

3.5.2 Determinação da Concentração da Biomassa

A biomassa foi determinada por espectrometria através de leitura da absorbância a 600 nm durante os cultivos. Efetuou-se também análise gravimétrica em amostras de 10 mL coletadas do biorreator, filtradas à vácuo em membranas de 0,22 µm, previamente taradas. A biomassa retida nas membranas foi seca a 80 °C por 24 horas e posteriormente pesada.

3.5.3 Determinação da Concentração de Açúcares Redutores Totais

A dosagem de açúcares redutores totais foi determinada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). Um volume de 500 µL de amostra, previamente diluído, adicionado de 1000 µL de reativo DNS foi colocado em tubos *Folin Wu* e estes deixados a 100 °C durante 5 min. Após o aquecimento, fez-se o resfriamento em banho de gelo e adicionou-se água destilada até completar o menisco do tubo. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm. A curva padrão expressa a concentração de glicose (g.L⁻¹) versus absorbância em uma escala compreendida entre 0,20 e 3,0 g.L⁻¹ de glicose. Um exemplo de curva padrão é apresentado no Apêndice A1.

3.5.4 Determinação da Concentração de P(3HB)

O P(3HB) foi dosado por cromatografia gasosa através da metodologia de metanólise ácida baseada em BRAUNEGG et al. (1978), com as modificações propostas por BRANDL et al. (1988).

Para a metanólise ácida, após o descongelamento, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado (H₂SO₄ 15 %), contendo ácido benzóico 0,40 g.L⁻¹ como padrão interno, e a mistura foi então aquecida a 100 °C durante 2,3 h. Após resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 s. A fase orgânica foi retirada com auxílio de pipeta *Pasteur* e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa.

A curva padrão foi feita utilizando-se o Poli(3-hidroxibutirato) (Sigma) como padrão externo, com massa variando entre 0,001 e 0,03 g. Os padrões sofreram o mesmo processo de metanólise que as amostras. Um exemplo de curva padrão encontra-se no Apêndice A3.

A determinação quantitativa de P(3HB) foi realizada através de cromatografia gasosa, utilizando cromatógrafo gasoso (modelo CG2014, da marca Shimadzu). O cromatógrafo foi equipado com uma coluna

empacotada Restek Rtx-Stabilwax Silcoport W 110/120. As amostras metanolizadas foram injetadas (1 μL) no equipamento utilizando nitrogênio como gás de arraste. As condições de operação utilizadas foram: fluxo do gás de arraste a 20 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do injetor de 250 $^{\circ}\text{C}$, temperatura da coluna de 80 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura do detector de 270 $^{\circ}\text{C}$.

3.5.5 Determinação do Oxigênio Dissolvido

A concentração do oxigênio dissolvido no meio de cultivo foi medida continuamente através de um eletrodo polarográfico (Metller-Toledo, Germany). Os dados gerados foram armazenados com o auxílio de um *software* (AQFermentador) para posterior análise dos dados obtidos.

3.6 TRATAMENTO DOS DADOS

3.6.1 Ajuste dos Dados

Os dados experimentais obtidos foram ajustados pelos *software* Lissage e *Microsoft Office Excel* 2007.

3.6.2 Análise Cinética

A análise cinética dos resultados obtidos foi realizada através dos ajustes das curvas de biomassa total (X_t), biomassa residual (X_r), substrato (S), P(3HB) (P) e velocidade específica de respiração (QO_2) *versus* o tempo, pelos *software* citados no item anterior.

Como o acúmulo de P(3HB) é intracelular, as velocidades específicas de crescimento celular das linhagens recombinantes e de produção de P(3HB) foram calculadas em relação à biomassa residual (X_r), obtida pela diferença entre a quantidade de biomassa total (X_t) e a quantidade de P(3HB) ($X_r = X_t - \text{P}(3\text{HB})$). Para *E. coli* selvagem, X_r é igual à X_t , uma vez que o biopolímero não é produzido.

Os dados de transferência de oxigênio armazenados no *software* de aquisição de dados do biorreator posteriormente foram tratados por meio do *software Microsoft Office Excel* 2007.

3.6.2.1 Velocidades específicas

Para uma boa avaliação de um processo é necessário avaliar certas variáveis, como por exemplo, a velocidade específica de crescimento (μ).

A partir dos perfis de concentração celular é possível determinar, em cada instante, as velocidades instantâneas de crescimento microbiano (dX_r/dt). Dividindo-se as velocidades instantâneas pela concentração celular no instante t , a velocidade específica, para processo em batelada é obtida e representada pela Equação 3.1.

$$\text{---} \text{---} \quad (3.1)$$

As velocidades específicas máximas de crescimento foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo, de acordo com a equação:

$$(3.2)$$

onde X_r é a biomassa residual ($g.L^{-1}$); X_{r0} a biomassa residual inicial ($g.L^{-1}$); $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1}) e t o tempo (h).

3.6.3 Produtividade de P(3HB)

A produtividade global (Equação 3.3) é calculada pela diferença entre a concentração de P(3HB) em um instante de tempo t ao longo do cultivo e a concentração inicial de P(3HB) dividida pelo intervalo de tempo correspondente.

$$\text{-----} \quad (3.3)$$

onde P_r é a produtividade média de P(3HB) ($g.L^{-1}.h^{-1}$); $P(3HB)_t$ a concentração de P(3HB) no instante de tempo t ($g.L^{-1}$) e $P(3HB)_{t_0}$ a concentração de P(3HB) no tempo t_0 inicial ($g.L^{-1}$).

3.6.4 Fatores de Conversão

Os fatores de conversão de substrato em célula e substrato em P(3HB) foram calculados por meio do coeficiente angular da reta obtida relacionando-se a concentração celular ou a concentração de P(3HB) (g.L^{-1}) em função da concentração de substrato (g.L^{-1}) observadas ao longo do tempo.

3.6.5 Consumo de Oxigênio

A determinação da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) foi realizada com emprego do método dinâmico (TAGUCHI e HUMPHREY, 1966; citado por SCHMIDELL, 2001). Por este método, em determinado instante do cultivo, interrompe-se a aeração. A concentração de oxigênio dissolvido (OD), no instante inicial começa a diminuir e o sinal do sensor é registrado continuamente. Em seguida, retoma-se a aeração nas condições anteriores e registra-se o aumento da concentração de OD até atingir novamente o valor inicial (Figura 3.7). Nesse espaço de tempo pode-se supor que não ocorra o aumento de X_r e que QO_2 se mantenha constante.

Para o trecho sem aeração, resulta a Equação 3.4.

$$\text{—} \quad (3.4)$$

Com a consideração anterior de que QO_2 é constante (tomando-se um determinado t), a Equação 3.6 pode ser integrada resultando na Equação 3.5.

$$C = C_0 - \text{QO}_2 \cdot X_r(t - t_0) \quad (3.5)$$

A Equação 3.5 prevê uma variação linear com o tempo no trecho sem aeração. Assim, é possível obter o valor de QO_2 através do coeficiente angular $\text{QO}_2 \cdot X_r$ e do valor de X_r obtido com a análise gravimétrica durante o cultivo.

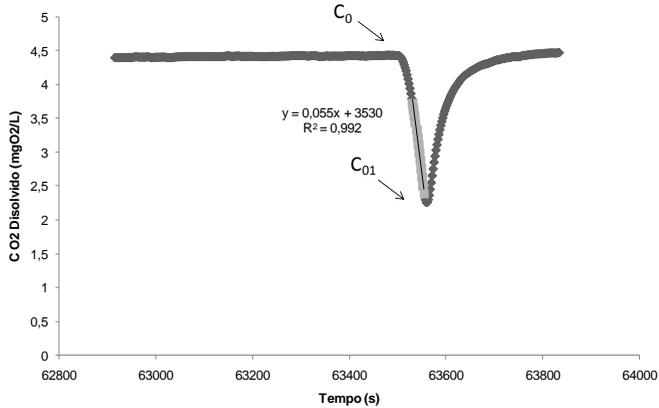


Figura 3. 7 Ilustração do Método Dinâmico utilizado para determinar QO₂. C₀ e C₀₁ representam respectivamente, a concentração de oxigênio dissolvido antes e após cessar a aeração.

3.6.6 Velocidade Específica de Consumo de Oxigênio para a Manutenção Celular e Fator de Conversão de Oxigênio em Células

Segundo SCHMIDELL (2001) existe uma relação entre velocidade específica de respiração (QO₂) e velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}). Normalmente admite-se a existência de uma relação linear, conforme sugerido por PIRT (1975), assim:

$$\text{—} \quad (3.6)$$

onde m_o representa a específica de consumo de oxigênio para a manutenção celular ($g_{O_2} \cdot g_{cel}^{-1} \cdot h^{-1}$) e Y_{O} o fator de conversão de oxigênio em células ($g_{cel} \cdot g_{O_2}^{-1}$).

A velocidade específica de respiração para manutenção celular (m_o) significa o consumo de oxigênio para manter as células viáveis. Plotando-se os dados de QO₂ em função de μ_{Xr} , é possível obter os valores de m_o e $Y_{X/O}$ por meio do coeficiente linear e do coeficiente angular da reta de ajuste obtida, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONFIRMAÇÃO DA TRANSFORMAÇÃO DE *Escherichia coli* JM101 E DH5 α

O plasmídeo pBHR68, além do gene *Amp^r*, que confere resistência à ampicilina, possui também o operon completo para a biossíntese de P(3HB) de *C. necator*. Deste modo foi possível, com a utilização da metodologia apresentada no item 3.2, a realização das transformações de *E. coli* nas linhagens: JM101 e DH5 α , para obtenção das respectivas cepas recombinantes, bem como a produção heteróloga de P(3HB).

Na Figura 4.1 observa-se a confirmação da presença do plasmídeo através das bandas do plasmídeo pBHR68 (8,2 kb) frente às bandas do padrão (100 bp), determinado por eletroforese em gel de agarose 1,0 %.



Figura 4. 1 Perfil de migração de fragmentos do plasmídeo pBHR68 após eletroforese em gel de agarose 1,0 % corado com brometo de etídio.

4.2 ENSAIOS EM FRASCOS AGITADOS

Os experimentos em frascos agitados tiveram por objetivo a comparação do crescimento das cepas selvagens e recombinantes de *E. coli* JM101 e DH5 α em diferentes meios de cultivo, bem como a definição das condições de inoculação para os posteriores ensaios em biorreator.

4.2.1 Definição do meio de cultivo

Os resultados obtidos nesse item foram úteis para avaliar o crescimento das linhagens de *E. coli* abordadas nessa dissertação, bem como para definir as condições de cultivo que foram utilizadas nos experimentos seguintes.

Como o presente trabalho está inserido em um grupo de pesquisa com produção e purificação de P(3HB) a partir de *C. necator*, nos primeiros testes realizados em incubador rotativo, a cepa selvagem de *E. coli* linhagem JM101 foi cultivada nos meios de cultivo comumente utilizados em *C. necator*, sendo eles: NB (caldo nutriente) que é utilizado como pré-cultivo e MM (composição descrita no item 3.3.2) que é utilizado como inóculo e também como meio de cultivo final para produção de P(3HB).

A curva de crescimento (medido em unidade de absorbância) da cepa selvagem de *E. coli* JM101 em meio NB é apresentada na Figura 4.2 (a). Na Figura 4.2 (b) está a representação logarítmica da absorbância com o tempo de cultivo, que resulta em uma reta na fase exponencial de crescimento, cujo coeficiente angular é a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$).

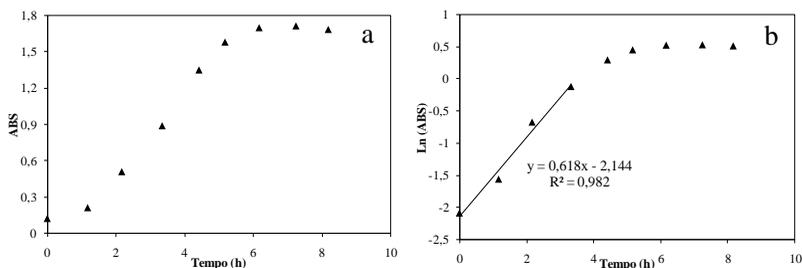


Figura 4. 2 Curvas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem em meio NB em incubador rotativo.

Como pode ser observado na Figura 4.2 (b), *E. coli* JM101 selvagem cresceu com elevada velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$): $0,62 \text{ h}^{-1}$. Tendo em vista que a utilização de meios de cultivo complexos, como é o caso do NB, que permitem o rápido crescimento da biomassa, o valor encontrado para $\mu_{\text{máx}}$ foi considerado um dado coerente (SEZONOV, PETIT, D'ARI, 2007).

Com o resultado obtido no meio NB, visto que o objetivo destes testes foi escolher um meio de cultivo que possibilitasse o crescimento celular a elevadas velocidades, optou-se pela continuidade dos ensaios utilizando os meios de cultivo comumente empregados em *C. necator*.

A curva de crescimento (medido em unidade de absorbância) da linhagem selvagem de *E. coli* JM101 em meio MM é apresentada na Figura 4.3 (a) e na Figura 4.3 (b) está a representação logarítmica da absorbância com o tempo de cultivo.

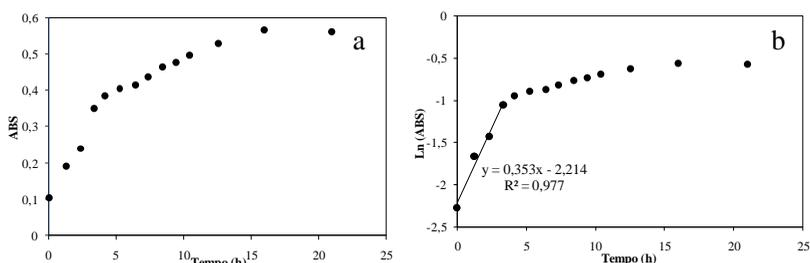


Figura 4.3 Curvas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem em meio MM em incubador rotativo.

Conforme pode ser visto na Figura 4.3, *E. coli* JM101 (selvagem) apresentou um expressivo decaimento no valor de $\mu_{\text{máx}}$ e consequentemente na concentração celular (considerando-se a existência de uma relação linear entre a medida de absorbância e a concentração celular) em meio MM, quando comparado ao meio NB. A expressiva diminuição no valor de $\mu_{\text{máx}}$ indica que o meio MM não mostrou-se o mais adequado para ser utilizado na continuidade dos ensaios. Assim, novos ensaios foram realizados em meios de cultivo comumente utilizados em trabalhos com *E. coli* recombinante.

A seguir são apresentadas as curvas de crescimento das cepas selvagens de *E. coli* JM101 e DH5 α em meio LB, respectivamente. LB é um meio rico e amplamente utilizado em estudos com bactérias, pois permite rápido crescimento celular e bons rendimentos para muitas espécies (SEZONOV, PETIT, D'ARI, 2007).

As curvas de crescimento (medido em unidade de absorbância) são apresentadas nas Figuras 4.4 (a) e 4.5 (a). Nas Figuras 4.4 (b) e 4.5 (b) estão as representações logarítmicas da absorbância com o tempo de cultivo.

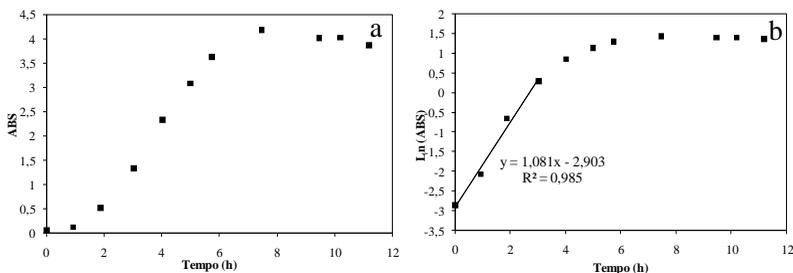


Figura 4. 4 Curvas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem em meio LB em incubador rotativo.

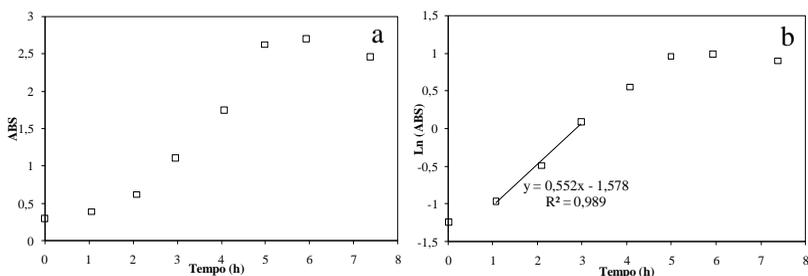


Figura 4. 5 Curvas de crescimento de *E. coli* DH5 α selvagem em meio LB em incubador rotativo.

Comparando-se os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ observados para *E. coli* JM101 (selvagem) em meio NB (Figura 4.2 (b)) e meio LB (Figura 4.4 (b)), nota-se que a mudança do meio de cultivo acarretou um incremento no valor de $\mu_{m\acute{a}x}$, de $0,62 \text{ h}^{-1}$ para o ensaio em meio NB, para $1,08 \text{ h}^{-1}$ no ensaio com LB.

Assim como a cepa de *E. coli* JM101, a *E. coli* DH5 α (selvagem) também apresentou valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ elevado, de $0,55 \text{ h}^{-1}$, comparando-se ao valor encontrado no trabalho desenvolvido por CARLSON, WLASCHIN, SRIENC (2005), que foi de $0,42 \text{ h}^{-1}$ para essa mesma linhagem de *E. coli* em meio LB.

Visando a manutenção das elevadas velocidades de crescimento das cepas de *E. coli* JM101 e DH5 α e também para confirmar o bom desempenho quanto ao crescimento celular em meios de cultivo

frequentemente utilizados em ensaios com *E. coli* recombinante, foram realizados cultivos com as cepas de *E. coli* JM101 e DH5 α em meio MR (composição descrita no item 3.3.2).

A seguir estão apresentadas as curvas de crescimento das cepas selvagens de *E. coli* JM101 e DH5 α em meio MR, respectivamente. As curvas de crescimento (medido em unidade de absorbância) de *E. coli* JM101 e DH5 α são apresentadas nas Figuras 4.6 (a) e 4.7 (a). Nas Figuras 4.6 (b) e 4.7 (b) estão as representações logarítmicas da absorbância com o tempo de cultivo.

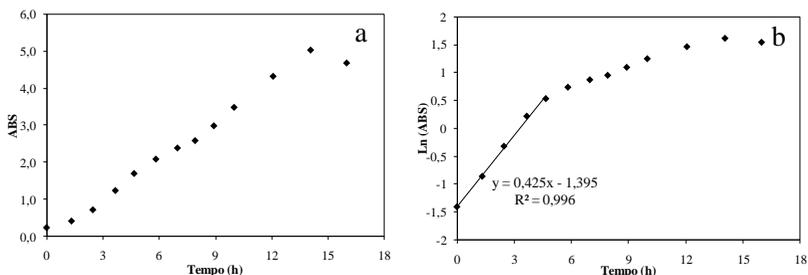


Figura 4. 6 Curvas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem em meio MR em incubador rotativo.

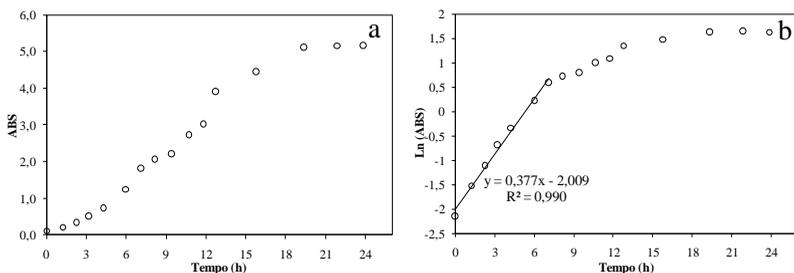


Figura 4. 7 Curvas de crescimento de *E. coli* DH5 α selvagem em meio MR em incubador rotativo.

Assim como foi verificado um decréscimo no valor de $\mu_{\text{máx}}$ para *E. coli* JM101, quando passou-se de meio NB para MM, na mudança de LB para MR um decréscimo no valor de $\mu_{\text{máx}}$ de mais de 50 % foi observado. Enquanto que o valor de $\mu_{\text{máx}}$ para *E. coli* JM101 em meio LB foi de $1,08 \text{ h}^{-1}$, em meio MR o $\mu_{\text{máx}}$ para *E. coli* JM101 selvagem foi de $0,42 \text{ h}^{-1}$.

Diferentemente do que foi observado anteriormente em MM (Figura 4.4 (b)), *E. coli* JM101 atingiu claramente a fase estacionária de

crescimento após aproximadamente 12 horas de incubação em MR (Figura 4.6 (b)) indicando que como esperado, em se tratando de meios de cultivo quimicamente definidos, MR mostrou-se mais adequado que MM para cultivos com *E. coli*.

Analisando os resultados dos ensaios com *E. coli* DH5 α em LB e MR (Figuras 4.5 e 4.7), o decréscimo foi menos expressivo que o observado na cepa JM101 (Figuras 4.4 e 4.6). No caso da linhagem DH5 α , enquanto o valor de $\mu_{\text{máx}}$ em meio LB foi de 0,55 h⁻¹, em meio MR foi de 0,37 h⁻¹.

RUSLI et al. (2009) ao estudarem a formação de xilanase intracelular em *E. coli* DH5 α recombinante, em frascos agitados, verificaram maiores velocidades específicas de crescimento em meio LB, onde o $\mu_{\text{máx}}$ atingiu 0,59 h⁻¹, enquanto que em meio quimicamente definido atingiu 0,49 h⁻¹. Os dados cinéticos obtidos no presente trabalho estão próximos aos encontrados por estes autores.

Como observado por RUSLI et al. (2009), os meios complexos proporcionaram velocidades específicas de crescimento maiores que as apresentadas em meios quimicamente definidos devido à presença de triptona que supre as bactérias com aminoácidos, enquanto o extrato de levedura supre a demanda por nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos.

Frente aos resultados expostos e considerando que um dos objetivos desse trabalho foi realizar o levantamento dos parâmetros cinéticos de crescimento e respiração microbiana das linhagens selvagens e recombinantes JM101 e DH5 α de *E. coli*, e tomando-se como base o parâmetro $\mu_{\text{máx}}$ e o bom desempenho celular observado em meio LB, optou-se pela realização dos experimentos seguintes utilizando esse meio de cultivo. Além disso, LB é um meio de cultivo muito utilizado em cultivos com *E. coli* para a expressão de proteínas recombinantes para produção, por exemplo, de enzimas (NAMDEV et al., 1993), hormônios (ROSSI, 2001) ou PHAs (BRESSAN, 2007).

Após a definição do meio de cultivo, seguiram-se os testes em frascos agitados para a definição do tempo de incubação do inóculo.

4.2.2 Definição do tempo de incubação

Com o objetivo de definir o tempo de incubação para inocular o biorreator, realizou-se o estudo da cinética de crescimento de *E. coli*, linhagens DH5 α e JM101, antes e após a inserção do plasmídeo pBHR68.

As curvas de crescimento (medido em unidade de absorvância) da linhagem *E. coli* JM101, selvagem e recombinante em meio LB, são apresentadas na Figura 4.8 (a). Na Figura 4.8 (b) estão as representações logarítmicas da absorvância com o tempo de cultivo.

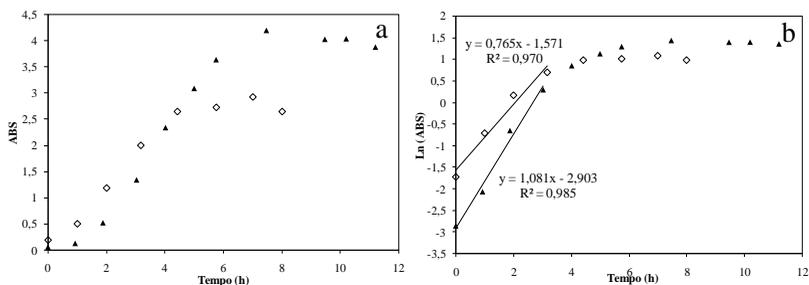


Figura 4.8 Curvas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem (▲) e recombinante (◇) em incubador rotativo.

Neste ensaio, *E. coli* JM101/pBHR68 atingiu velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,77 \text{ h}^{-1}$, valor este inferior ao de $1,08 \text{ h}^{-1}$ apresentado pela respectiva selvagem, como verificado anteriormente na Figura 4.4.

Cabe ressaltar que apenas com a leitura da absorvância não foi possível diferenciar biomassa total e biomassa residual, ou seja, nas medidas das absorvâncias para os testes em frascos agitados com as linhagens recombinantes somaram-se biomassa residual e P(3HB). Mesmo assim, *E. coli* sem a inserção do plasmídeo apresentou medidas máximas de absorvância, em torno de 4,5, enquanto que as mesmas medidas para *E. coli*/pBHR68 permaneceram próximas a 3,0, indicando que a cepa selvagem atingiu maior concentração celular.

Apesar da diferença nos valores de $\mu_{\text{máx}}$, as cepas não apresentaram fase de adaptação ao meio de cultivo utilizado e mantiveram-se em velocidade específica de crescimento constante e máxima durante aproximadamente 3 horas de incubação.

As curvas de crescimento da linhagem *E. coli* DH5 α selvagem e recombinante são apresentadas na Figura 4.9 (a). Na Figura 4.9 (b), estão mostradas as representações logarítmicas da absorvância com o tempo de cultivo.

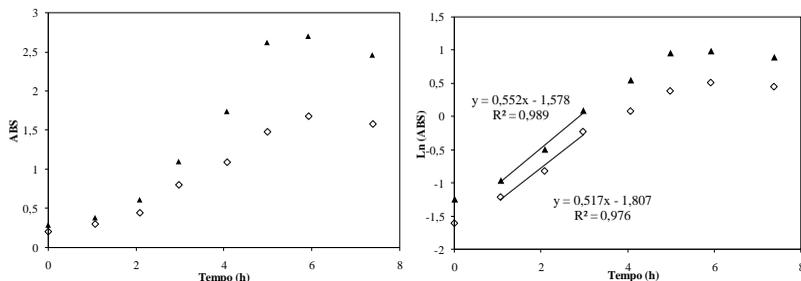


Figura 4.9 Curvas de crescimento de *E. coli* DH5 α selvagem (▲) e recombinante (◇), em incubador rotativo.

As cepas da linhagem DH5 α apresentaram uma ligeira fase de adaptação ao meio de cultivo, permaneceram em fase exponencial por aproximadamente 3 horas e entraram claramente na fase estacionária de crescimento após o mesmo tempo de incubação, de aproximadamente 5 horas. Neste caso, a diferença nos valores de $\mu_{\text{máx}}$ foi menor do que a observada na JM101, sendo que a cepa recombinante apresentou velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) de $0,52 \text{ h}^{-1}$, ligeiramente inferior que a encontrada para a respectiva selvagem de $0,55 \text{ h}^{-1}$. Assim como foi observado na linhagem JM101, *E. coli* DH5 α sem modificação genética alcançou maior concentração celular (ABS = 2,5) que o sistema *E. coli* DH5 α /pBHR68 (ABS = 1,5) para o mesmo intervalo de tempo.

A partir desses resultados, ficou estabelecido que o tempo de incubação de 3 horas para o preparo do inóculo do biorreator, em frascos agitados a 150 rpm e $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para as duas linhagens de *E. coli* (ancorando o plasmídeo pBHR68 ou não) para que as células estivessem em fase exponencial de crescimento, facilitando sua adaptação ao meio.

4.3 ENSAIOS EM BIORREATOR

No conjunto de ensaios realizado em biorreator, buscou-se estudar o comportamento cinético das linhagens de *E. coli* selvagens e recombinantes abordadas nesse trabalho, em termos de crescimento celular, consumo de substrato e consumo de oxigênio. Além da análise cinética, esse conjunto de ensaios teve como finalidade verificar o potencial de produção de P(3HB) por *E. coli* JM101 e DH5 α recombinantes e observar em quais parâmetros cinéticos a inserção do plasmídeo pBHR68 exerceu maior influência.

Nas Figuras 4.10 e 4.11 são apresentados os dados de concentração de biomassa total (X_t) e substrato residual (açúcares redutores totais) (S) ao longo do tempo, para as cepas de *E. coli* JM101 selvagem, além da biomassa residual (X_r), P(3HB) e substrato residual (S) para a cepa recombinante, respectivamente.

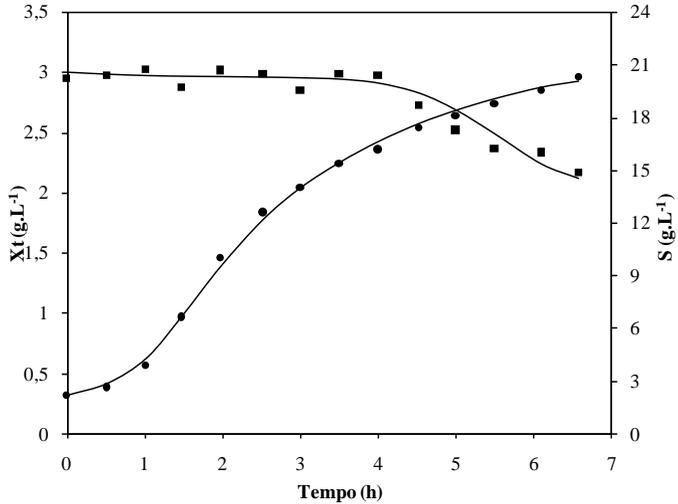


Figura 4. 10 Evolução de biomassa total (X_t (●)) e substrato residual (S (■)) para *E. coli* JM101 selvagem em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*.

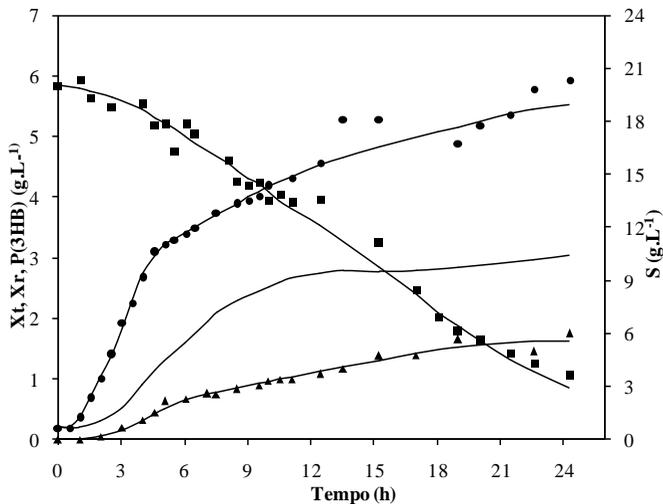


Figura 4. 11 Evolução da biomassa total (X_t (●)), biomassa residual (X_r (◻)), P(3HB) (P (▲)) e substrato residual (S (■)) para *E. coli* JM101 recombinante em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*.

Para facilitar a discussão desses resultados, as representações logarítmicas das concentrações de X_t e X_r com o tempo de cultivo foram construídas e são apresentadas na Figura 4.12.

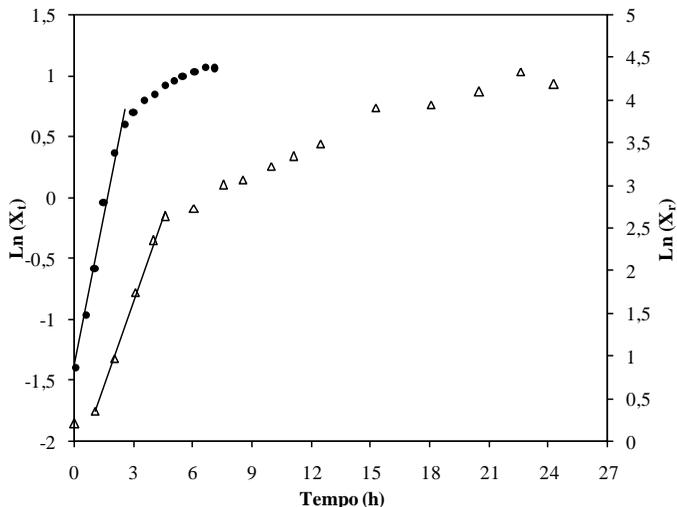


Figura 4. 12 Representação logarítmica da biomassa total (X_t) de *E. coli* JM101 selvagem (●) e biomassa residual (X_r) de *E. coli* JM101 recombinante (Δ) em biorreator.

Como pode ser observado na Figura 4.12, a cepa selvagem de *E. coli* JM101 não apresentou fase de adaptação ao meio de cultivo e permaneceu em fase exponencial de crescimento por aproximadamente 3 horas, enquanto a respectiva recombinante apresentou ligeira fase de adaptação, porém permaneceu nesta fase por mais ou menos 5 horas. Apesar de a cepa selvagem ter apresentado velocidade específica máxima de crescimento maior em ambos os casos houve uma forte desaceleração da velocidade de crescimento, após a fase estacionária (Figura 4.12). *E. coli* JM101 alcançou a fase estacionária de crescimento em apenas 6 horas de cultivo, ao passo que a cepa recombinante de *E. coli* JM101 demorou aproximadamente 15 horas de cultivo para atingir esse patamar.

Ao analisar comparativamente as Figuras 4.11 e 4.12, a representação logarítmica confirma o comportamento observado na linha referente à X_r , ou seja, depois da 8ª hora de cultivo não foi verificado um aumento expressivo da concentração celular, pois a partir desse instante a fonte de carbono pode ter sido consumida preferencialmente para o acúmulo de P(3HB).

O acúmulo de biopolímero ao final do cultivo com *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68 foi de 34 %, com produtividade máxima de $0,10 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A porcentagem de acúmulo de P(3HB)

encontrada está próxima à encontrada no trabalho desenvolvido por BRESSAN (2007) que utilizou *E. coli* JM101 com o plasmídeo pRLC2, derivado do plasmídeo pBHR69, que contém o gene *phaC* de *Chromobacterium violaceum* e os genes *phaA* e *phaB* de *C. necator*. Esse autor também utilizou LB como meio de cultivo e obteve um percentual de acúmulo de 29,6 % de P(3HB).

Cabe ressaltar que a linhagem JM101 de *E. coli* depende de indução. Neste trabalho esta foi realizada através de adição de IPTG para ativar a expressão dos genes clonados e, conseqüentemente, produzir P(3HB). Relatos de diversos autores mostraram que estratégias de indução, e o conhecimento das condições fisiológicas do micro-organismo no instante da indução, otimizaram a produção de proteína recombinante em *E. coli* (LIRIA, 1995; CASTILLO, 1997; VAZ, 2008).

As evoluções das concentrações de biomassa total (X_t) e de substrato (S) ao longo do cultivo de DH5 α selvagem são apresentadas na Figura 4.13.

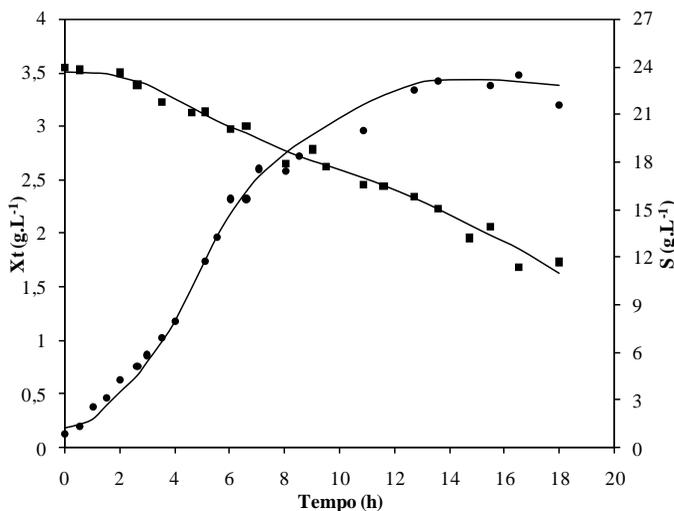


Figura 4.13 Evolução da biomassa total (X_t (●)) e consumo de substrato (S (■)) para *E. coli* DH5 α selvagem em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*.

Na Figura 4.14, estão apresentados os dados de concentração de biomassa total, biomassa residual (X_r), P(3HB) (P) e substrato (S), ao longo do tempo, para *E. coli* DH5 α contendo o plasmídeo pBHR68.

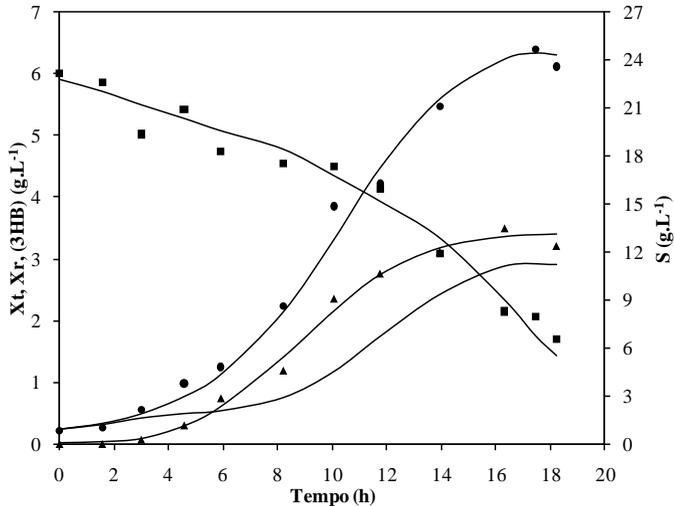


Figura 4.14 Evolução da biomassa total (X_t (●)), biomassa residual (X_r (■)), P(3HB) (P (▲)) e consumo de substrato (S (■)) para *E. coli* DH5 α recombinante em biorreator. A linha contínua representa os ajustes feitos pelo software *Lissage*.

O acúmulo de polímero ao final do cultivo com *E. coli* DH5 α recombinante foi de 56 %, com produtividade máxima de 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹. CARLSON, WLASCHIN, SRIENC, (2005) avaliaram a produção de P(3HB) em *E. coli* DH5 α com inserção do plasmídeo pPT500 que, assim como o pBHR68, contém os genes nativos de biossíntese de P(3HB) de *C. necator*. Nesse estudo, uma série de cultivos foi conduzida em biorreator, utilizando meio LB adicionado de glicose (40 g.L⁻¹) em anaerobiose. Apesar da diferença no que diz respeito ao fornecimento de oxigênio às células, o percentual de acúmulo de biopolímero foi de 50 %, valor similar ao encontrado no presente estudo.

Para facilitar a discussão desses resultados, foram construídas as representações logarítmicas das concentrações de X_t e X_r , com o tempo de cultivo e são apresentadas na Figura 4.15.

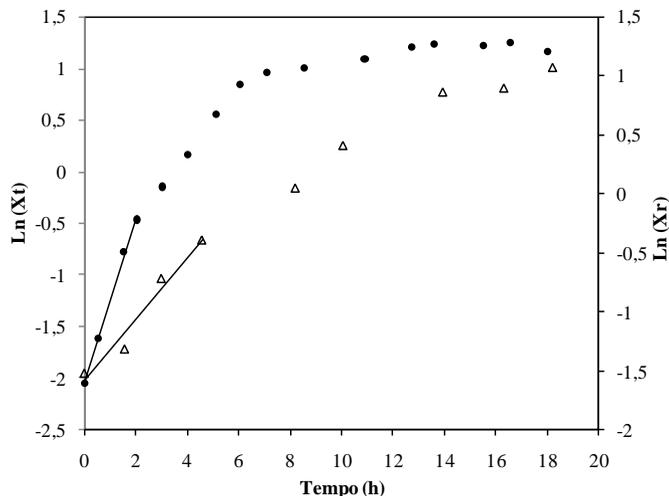


Figura 4. 15 Representação logarítmica da biomassa total (X_t) de *E. coli* DH5a selvagem (\bullet) e biomassa residual (X_r) de *E. coli* DH5a recombinante (Δ) em biorreator.

A partir da Figura 4.15, nota-se que as duas cepas de *E. coli* DH5a não apresentaram fase de adaptação e que, apesar da evidente diferença na inclinação da reta cujo coeficiente angular representa a velocidade específica máxima de crescimento, tanto a cepa selvagem (X_t) como a recombinante (X_r) alcançaram a fase estacionária de crescimento com mais ou menos 12 horas e, ao final das 18 horas de cultivo, ambas alcançaram a mesma concentração celular.

Ao analisar a Figura 4.14 nota-se que o acúmulo de P(3HB) apresentou notável aumento em torno de 4 horas de cultivo, instante que coincide com o instante que *E. coli* DH5a recombinante estava deixando a fase exponencial de crescimento (Figura 4.15). Segundo WANG e LEE (1997) o cultivo em batelada com *E. coli* recombinante pode ser dividido em duas fases: (i) uma fase de crescimento ativa, na qual o conteúdo de P(3HB) é mantido relativamente constante a um baixo nível e (ii) uma fase ativa de síntese de P(3HB), na qual P(3HB) é ativamente acumulado com concomitante aumento do conteúdo de P(3HB) e decréscimo da velocidade específica máxima de crescimento.

O acúmulo de P(3HB) observado nos ensaios das Figuras 4.11 e 4.14 são comparáveis com a maioria das cepas testadas em crescimento em batelada. Entretanto, incrementos na produção de P(3HB) através da escolha mais bem sucedida da cepa de trabalho e através do

desenvolvimento de novas estratégias de cultivo, como por exemplo, aquelas que utilizam altas concentrações celulares, levam a consideráveis aumentos na produção de P(3HB) em micro-organismos geneticamente modificados (LEE e CHANG, 1995).

As diferenças nos metabolismos de *E. coli* JM101 e DH5 α , selvagens ou recombinantes, podem ser melhor discutidas examinando-se os fatores de conversão de substrato em célula e substrato em produto.

Conforme mencionado no item 3.7.4 (pág. 29), caso as condições de um dado cultivo passam a permanecer constantes, o que permite imaginar que o fator de conversão de substrato em células deve ser constante ao longo do tempo, plotando-se a concentração da biomassa em função da concentração de substrato, deve-se obter uma relação linear, cujo coeficiente angular é o fator de conversão de substrato em células. Assim, as representações dos fatores de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) para as linhagens JM101 e DH5 α são mostrados nas Figuras 4.16 e 4.17.

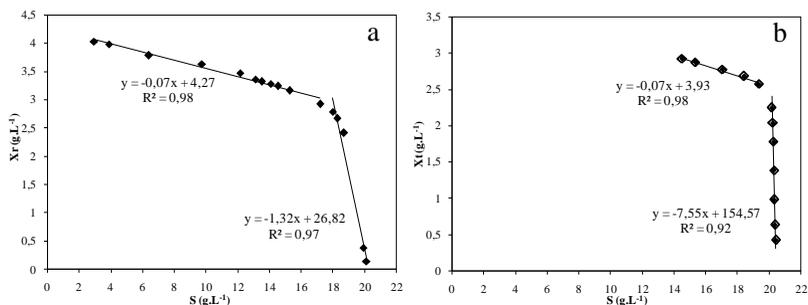


Figura 4. 16 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para a determinação do fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de *E. coli* JM101 selvagem (a) e recombinante (b).

Na Figura 4.16 nota-se a evidente presença de duas fases distintas de consumo do substrato: uma onde o consumo praticamente não existiu (ou foi muito baixo) e outra de consumo mais pronunciado.

O consumo de açúcares redutores observado na *E. coli* JM101 selvagem (Figura 4.16 (a)) foi de aproximadamente 11 g.L⁻¹, menor que o observado para a cepa recombinante (Figura 4.16 (b)). Como é possível observar, nas horas iniciais do cultivo com *E. coli* JM101 selvagem o consumo dessa fonte de carbono foi muito baixo, ou seja, houve produção de biomassa sem o consumo de açúcares redutores. Em seguida, o consumo de substrato foi levemente mais acentuado, porém

não observou-se considerável aumento da concentração da biomassa nesta fase de consumo de substrato, resultando assim em um fator de conversão de substrato em célula para o primeiro trecho de $7,55 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ e $Y_{X/S}$ de $0,07 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ para o segundo trecho.

No caso da cepa recombinante de *E. coli* JM101 (Figura 4.17 (b)), um comportamento semelhante foi observado inicialmente ($Y_{X/S}$ de $1,32 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$) e o consumo de açúcares redutores observado em seguida resultou em um fator de conversão similar ao encontrado na selvagem, de $0,07 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$. Da mesma forma, neste cultivo foi possível calcular o fator de conversão de substrato em biopolímero ($Y_{P(3HB)/S}$) que foi de $0,080 \text{ g}_{P(3HB)}/\text{g}_{\text{glicose}}$.

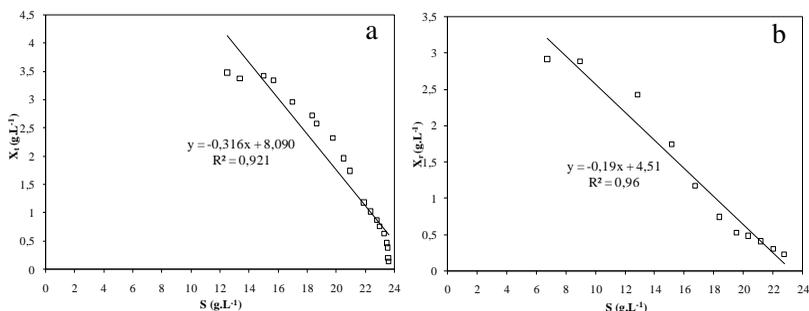


Figura 4. 17 Relação entre a concentração de biomassa e substrato para a determinação do fator de conversão de substrato em célula ($Y_{X/S}$) de *E. coli* DH5α selvagem (a) e recombinante (b).

Diferentemente do comportamento observado nos cultivos com a linhagem JM101, nos cultivos com *E. coli* DH5α foi possível estabelecer uma relação linear entre os dados experimentais de concentração celular e concentração de açúcares redutores totais. O $Y_{X/S}$ da cepa *E. coli* DH5α selvagem foi de $0,32 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$ e o da cepa ancorando o plasmídeo pBHR68 foi de $0,20 \text{ g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$. Da mesma forma, calculou-se o fator de conversão de substrato em P(3HB) ($Y_{P(3HB)/S}$) resultando em $0,25 \text{ g}_{P(3HB)}/\text{g}_{\text{glicose}}$.

A fim de facilitar a comparação entre os cultivos realizados, as evoluções das velocidades específicas de crescimento ao longo dos tempos de cultivos foram agrupadas segundo as linhagens de *E. coli* estudadas. Na Figura 4.18 são apresentados os dados de *E. coli* JM101 e na Figura 4.19 são apresentados os dados de *E. coli* DH5α. É importante ressaltar que, para a construção das Figuras 4.18 e 4.19 considerou-se

que durante a fase exponencial de crescimento μ_X tem seu valor máximo e constante.

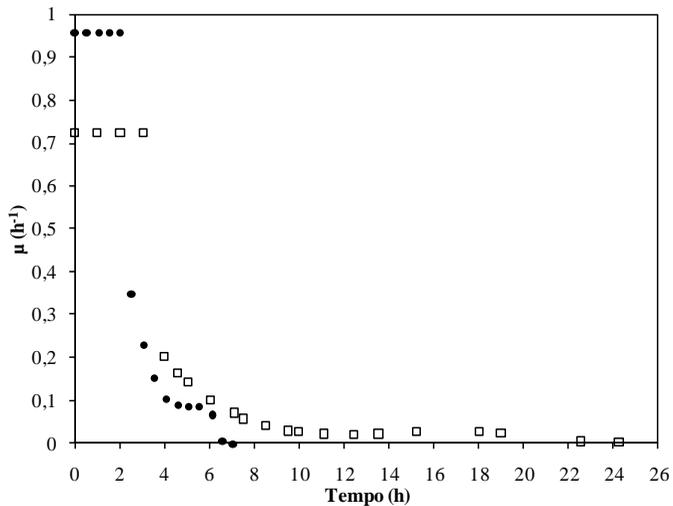


Figura 4. 18 Velocidades específicas de crescimento de *E. coli* JM101 selvagem (●) e recombinante (□) dos ensaios em biorreator.

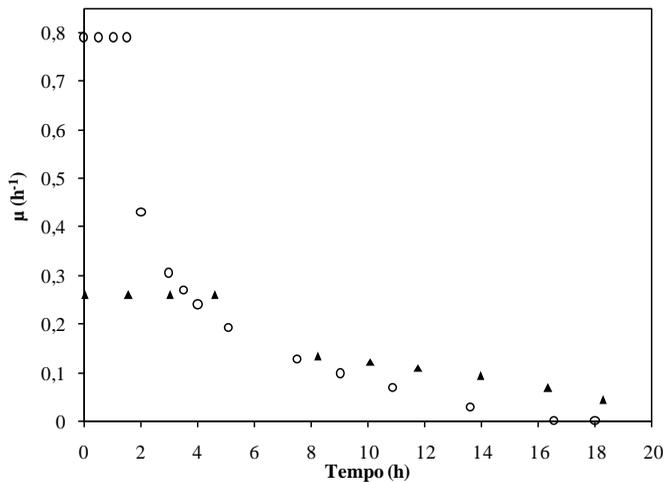


Figura 4. 19 Velocidades específicas de crescimento de *E. coli* DH5a selvagem (○) e recombinante (▲) dos ensaios em biorreator.

Observando-se a Figura 4.18, verifica-se que a cepa JM101 recombinante apresentou, na fase exponencial de crescimento, um $\mu_{\text{máx}}$ ($0,72 \text{ h}^{-1}$) menor que o da selvagem ($0,91 \text{ h}^{-1}$). O mesmo comportamento foi verificado nos valores de $\mu_{\text{máx}}$ da cepa DH5 α (Figura 4.19). Neste caso a diferença foi ainda maior. Enquanto que *E. coli* DH5 α selvagem apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,79 \text{ h}^{-1}$, a recombinante apresentou $\mu_{\text{máx}}$ de $0,27 \text{ h}^{-1}$.

Ao analisar os resultados relativos às velocidades específicas de crescimento (μ_x), verificou-se nas linhagens JM101e DH5 α um decréscimo nos valores desse parâmetro cinético de crescimento com a inserção do plasmídeo pBHR68. A redução desses valores é um forte indicativo que o micro-organismo estudado tem seu desempenho de crescimento celular afetado com a inserção do vetor recombinante.

Segundo AYUB (2000), as células recombinantes são metabolicamente sobrecarregadas, quando comparadas às células selvagens, e explica que o nível de expressão gênica influencia esse notável diferencial na velocidade de crescimento específico das células recombinantes e não recombinantes.

A partir dos cultivos apresentados, pode-se dizer que elevada velocidade específica máxima de crescimento nem sempre está diretamente ligada à maiores acúmulos de P(3HB). Isto significa dizer que uma moderada velocidade específica de crescimento parece estar associada a maiores fatores de conversão de substrato em células e de substrato em produto em meio LB adicionado de glicose como fonte de carbono. Desta forma, cultivos que apresentaram velocidades de crescimento celular menores, podem se mostrar mais interessantes do ponto de vista de produção de P(3HB) nas condições estudadas.

Tendo em vista o metabolismo aeróbio da *E. coli*, é importante que a concentração de O_2 dissolvido seja mantida acima de 20 % (em relação à concentração de saturação) com simultâneo controle de μ_x . Esses parâmetros são considerados formas de controle de processo que objetivam a formação e expressão de proteína recombinante em *E. coli* (GOMBERT, 1996; GOMBERT e KILIKIAN, 1997).

O consumo de oxigênio foi estudado durante os cultivos de *E. coli* para estimar os parâmetros respiratórios deste micro-organismo, nas linhagens JM101 e DH5 α , recombinantes ou não, sob as condições de cultivo utilizadas para os ensaios em biorreator. Dentre as grandezas relacionadas ao consumo de oxigênio estão a velocidade específica de respiração (QO_2), velocidade específica de consumo de oxigênio para manutenção celular (m_o) e fator de conversão de oxigênio em célula ($Y_{X/O}$).

Na Figura 4.20 são apresentados os dados de velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) ao longo do tempo, para as cepas de *E. coli* JM101 selvagem e recombinante. Na Figura 4.21 são apresentados os dados de velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) ao longo do tempo para as cepas de *E. coli* DH5 α selvagem e recombinante.

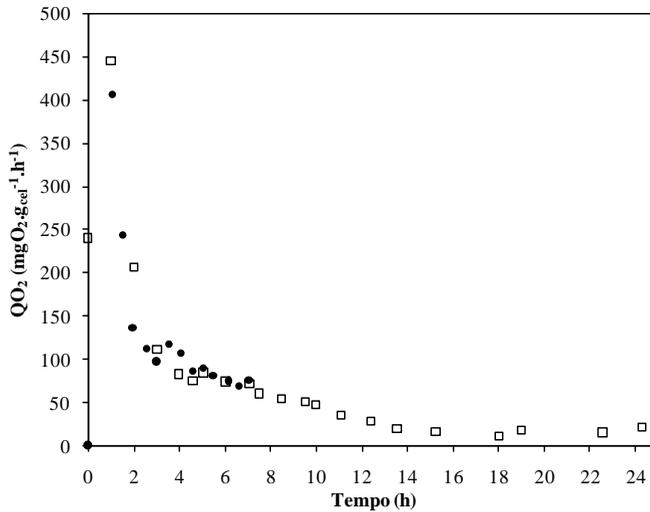


Figura 4. 20 Perfil da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO_2) *E. coli* JM101 selvagem (•) e recombinante (□).

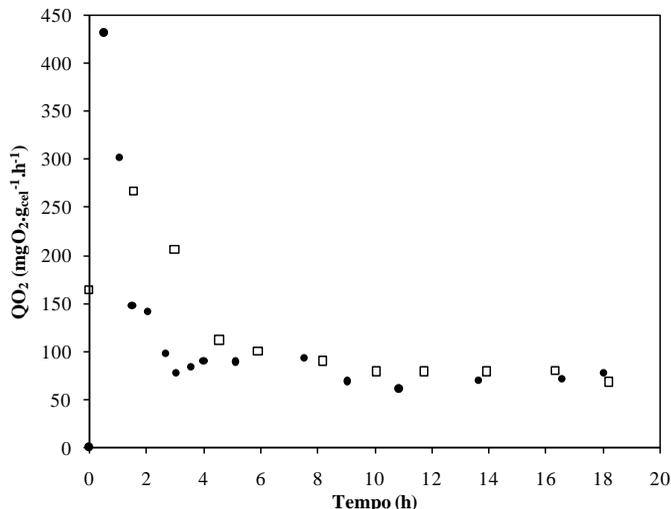


Figura 4. 21 Perfil da velocidade específica de consumo de oxigênio (QO₂) *E. coli* DH5α selvagem (●) e recombinante (□).

Ao avaliar as Figuras 4.20 e 4.21 em conjunto com as Figuras 4.18 e 4.19, percebe-se que o QO₂ mostrou relação com o crescimento celular, uma vez que em ambos os experimentos o decaimento da curva de consumo de oxigênio foi mais acentuado na fase inicial dos cultivos, onde a velocidade específica de crescimento celular era constante e máxima. Posteriormente, quando esta passou a apresentar desaceleração do crescimento, o QO₂ passou a apresentar um comportamento praticamente constante.

A velocidade específica de consumo de oxigênio parece não ter sido fortemente afetada pela recombinação das células na linhagem JM101. Uma vez que, apesar da diferença nos tempos de cultivo, *E. coli* JM101 selvagem e recombinante apresentaram perfis semelhantes. Por outro lado, uma diminuição mais acentuada nos valores de QO₂ foi observada na linhagem DH5α. Enquanto *E. coli* DH5α selvagem apresentou valores próximos a 430 mgO₂.g_{cel}⁻¹.h⁻¹, *E. coli* DH5α recombinante não ultrapassou 300 mgO₂.g_{cel}⁻¹.h⁻¹.

Segundo SCHMIDELL (2001), além da concentração de O₂ dissolvido, as demais condições de cultivo também interferem na velocidade específica de respiração. Portanto, células que cresçam em altas velocidades, como é o caso da *E. coli*, têm de apresentar elevadas velocidades de respiração. A partir dessa observação, espera-se uma relação linear entre a velocidade específica de respiração e a velocidade

específica de crescimento, segundo a equação proposta por PIRT (1975).

Com o objetivo de verificar se a relação linear proposta por PIRT (1975) foi observada nas linhagens de *E. coli* abordadas nesse estudo, bem como para estimar os demais parâmetros cinéticos respiratórios, as Figuras 4.22 e 4.23 foram construídas, relacionando-se as velocidades específicas de crescimento com as velocidades específicas de respiração celular.

Como verificado anteriormente, na fase exponencial de crescimento os valores de QO_2 encontrados foram elevados e com isso foi difícil realizar a estimativa dos valores desses parâmetros durante essa fase. Desta forma, utilizou-se nesta fase de crescimento o valor médio dos QO_2 encontrados (para valores de $\mu_{m\acute{a}x}$), e assim foi possível a construção das Figuras 4.22 e 4.23.

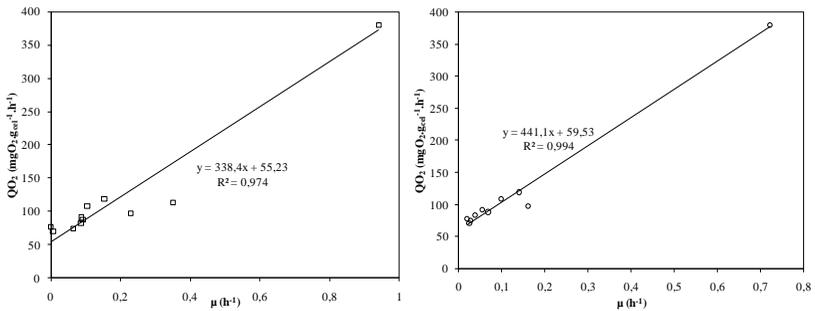


Figura 4. 22 Relação entre a velocidade específica de respiração (QO_2) e a velocidade específica de crescimento (μ_{xT}) de *E. coli* JM101 selvagem (\square) e recombinante (\circ).

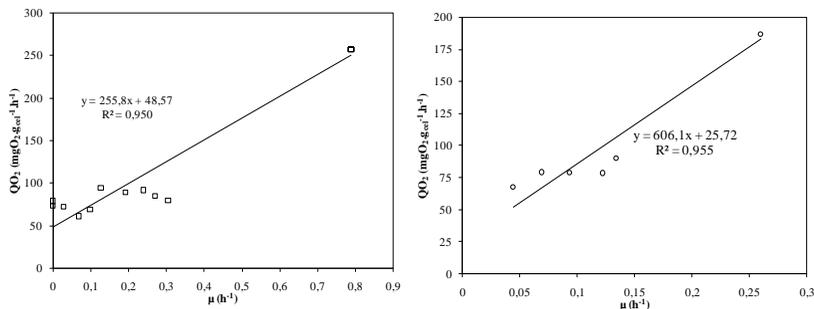


Figura 4. 23 Relação entre a velocidade específica de respiração (QO₂) e a velocidade específica de crescimento (μ_{Xr}) de *E. coli* DH5 α selvagem (\square) e recombinante (\circ).

Os coeficientes para manutenção celular obtidos para *E. coli* JM101 foram de 55,23 e 58,89 mgO₂·g_{cel}⁻¹·h⁻¹, para a cepas selvagem e recombinante, respectivamente. E os coeficientes para manutenção celular obtidos para *E. coli* DH5 α foram de 52,59 e 25,72 mgO₂·g_{cel}⁻¹·h⁻¹, para a cepas selvagem e recombinante, respectivamente.

Ao analisar os valores encontrados para m_0 , nota-se que valores muito próximos foram encontrados para as cepas selvagens de *E. coli* nas duas linhagens, o que não aconteceu com as cepas recombinantes. O m_0 da cepa JM101 recombinante foi praticamente o dobro do encontrado para a DH5 α recombinante.

O mesmo comportamento foi observado para os fatores de conversão de oxigênio em células ($Y_{X/O}$). Em *E. coli* JM101 os valores encontrados foram de 2,95 e 2,85 g_{cel}·gO₂⁻¹, para as cepas selvagem e recombinante, respectivamente. E os fatores de conversão de oxigênio em células ($Y_{X/O}$) em *E. coli* DH5 α foram de 3,94 e 1,65 g_{cel}·gO₂⁻¹, para a cepas selvagem e recombinante, respectivamente.

Como esperado, o comportamento observado mostra que, na fase em que o crescimento celular é maior, a demanda de oxigênio aumentou ao longo do tempo, uma vez que a concentração celular também estava aumentando, sendo usado apenas em pequena parte do oxigênio para a manutenção celular. Em seguida, como o crescimento microbiano reduziu-se de forma acentuada, a demanda de oxigênio também sofreu um decréscimo, sendo que a maior parte desta demanda é utilizada para a manutenção das células já presentes no meio.

Ao longo deste trabalho foram verificadas diferenças entre as linhagens de *E. coli* JM101 e DH5 α quanto aos valores dos parâmetros cinéticos abordados, tanto antes como após a manipulação genética.

Para facilitar a visualização e discussão dos resultados obtidos, a Tabela 4.1 foi construída. Adicionou-se à Tabela ainda, os valores para os mesmos parâmetros cinéticos abordados do produtor natural de P(3HB), *C. necator* em cultivo utilizando glicose como fonte de carbono em meio quimicamente definido.

Tabela 4.1 Parâmetros cinéticos de *E. coli* JM101 e DH5 α , selvagens e recombinantes obtidos neste trabalho e de *C. necator* (IENCZAK, 2011).

Cepa	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P(3HB)/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{X/O}$ (g _{cel} .gO ₂ ⁻¹)	m_0 (mgO ₂ .g _{cel} ⁻¹ .h ⁻¹)
<i>E. coli</i> JM101	0,91	7,55/0,069	-	2,95	55,23
<i>E. coli</i> JM101 + pBHR68	0,72	1,32/0,072	0,080	2,85	58,89
<i>E. coli</i> DH5 α	0,79	0,32	-	3,94	52,59
<i>E. coli</i> DH5 α + pBHR68	0,27	0,20	0,25	1,65	25,72
<i>C.</i> <i>necator</i>	0,35	0,62	0,40	3,38	22,84

Nota-se que, em relação à velocidade específica de crescimento, a linhagem DH5 α sofreu uma maior redução do que a JM101, quando o plasmídeo pBHR68 foi inserido nas células, e que o $\mu_{\text{máx}}$ da *E. coli* JM101/pBHR68 foi praticamente o dobro do encontrado para DH5 α /pBHR68, porém o $\mu_{\text{máx}}$ dessa última mostrou-se o mais próximo do encontrado por (IENCZAK, 2011) para *C. necator*.

Os valores dos fatores de conversão de substrato em células e substrato em produto ($Y_{X/S}$ e $Y_{X/P}$) também foram muito distintos entre as linhagens estudadas. Tomando-se esse parâmetro cinético como base, a linhagem DH5 α recombinante mostrou-se mais interessante para a produção heteróloga de P(3HB), mesmo apresentando $Y_{X/S}$ bem inferior quando comparado à *C. necator*. Adicionalmente vale lembrar que os valores dos parâmetros cinéticos de *C. necator* apresentados na Tabela

4.1 não foram obtidos sob mesmas condições de cultivo, o que por vezes pode dificultar sua comparação.

Os coeficientes para manutenção celular (m_O) obtidos para *E. coli* DH5 α foram bem distintos entre si, diferença menos expressiva foi observada para *E. coli* JM10. Analisando esse parâmetro cinético, nota-se comportamento parecido com o observado na velocidade específica máxima de crescimento, ou seja, *E. coli* DH5 α /pBHR68 apresentou valor mais próximo ao observado no produtor nativo de P(3HB), *C. necator*, de 22,84 $\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Os valores encontrados para os dois parâmetros cinéticos referentes à respiração microbiana de *E. coli* DH5 α /pBHR68 calculados neste trabalho estão de acordo com os dados encontrados na literatura. ÇALIK (2004) investigou os efeitos da transferência de oxigênio na síntese da enzima benzaldeído liase em *Escherichia coli* recombinante e obteve $Y_{X/O}$ de 1,9 $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{O}_2}^{-1}$ e m_O de 77 $\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. FARIAS et al. (2008) ao estudarem a transferência de oxigênio em cultivo com o *C. necator* na produção de P(3HB), encontrou valores de 1,9 $\text{g}_{\text{cel}} \cdot \text{g}_{\text{O}_2}^{-1}$ e 59,1 $\text{mg}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ para $Y_{X/O}$ e m_O , respectivamente.

5 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

Foi possível a obtenção de cepas recombinantes de *E. coli* JM101 e DH5 α , utilizando como vetor de clonagem o plasmídeo pBHR68.

Com a análise conjunta dos dados experimentais é possível concluir que a inserção do plasmídeo pBHR68 em *E. coli* JM101 e DH5 α afetou o desempenho celular, visto a diferença dos parâmetros cinéticos de crescimento e de respiração microbiana das cepas antes e depois da transformação.

Os resultados observados sugerem que *E. coli* DH5 α recombinante é mais adequado para produção de P(3HB) em meio LB que *E. coli* JM101 recombinante, devido ao maior percentual de acúmulo (56 %) e maior produtividade em polímero (0,23 g.L⁻¹.h⁻¹).

6 TRABALHOS FUTUROS

Estudos mais aprofundados com *E. coli* JM101 recombinante podem levar a melhores resultados através do estabelecimento de condições de cultivo que permitam a manutenção da fase exponencial de crescimento por mais tempo, tendo em vista a sua alta velocidade específica máxima de crescimento.

Cabe destacar também que essa linhagem tem a expressão dos genes recombinantes sob regulação de um promotor (*lac*), permitindo o estudo de diferentes estratégias e controle da indução como, por exemplo, o instante adequado da indução ou a utilização de diferentes indutores como, por exemplo, a lactose, que possam vir a permitir o aumento da produtividade de P(3HB).

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed. 2005.

AGUS, J.; KAHAR, P.; ABE, H.; DOI, Y.; TSUGE, T. Molecular weight characterization of poly(R)-3-hydroxybutyrate synthesized by genetically engineered strains of *Escherichia coli*. **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 91, p. 1138 – 1146. 2006.

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

ALMEIDA, A.; NIKEL, P. I.; GIORDANO, A. M.; PETTINARI, M. J. Effects of granule-associated protein phap on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 7912 – 7916. 2007.

ANTÔNIO, R. V.; STEINBUCHER, A.; REHM, B. H. A. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, p. 111-117. 2000.

ARAÚJO, D. G. **Produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Escherichia coli* recombinante a partir de glicose e ácido propiônico**. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2005.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450 – 472. 1990.

AYUB, M. A. Z. Aspectos do uso de micro-organismos recombinantes em tecnologia de bioprocesso. In: Micro-organismos recombinantes em biotecnologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, p. 1-16. 2000.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. Biochemical engineering fundamentals. McGraw Hill: New York, 2nd ed. 1986.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 62, p. 293 - 300. 1951.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R.C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(beta-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 1977 – 1982. 1988.

BRAUNEGG, G.; SONNLEITNER, B.; LAFFERTY, R. M. A rapid gas chromatographic method for the determination of poly-beta-hydroxybutyric acid in microbial biomass. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.6, p. 29 - 37. 1978.

BRESSAN, C. R. **Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de *Chromobacterium violaceum***. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2007.

ÇALIK, P.; YILGÖR, P.; AYHAN, P.; DEMIR, A. S. Oxygen transfer effects on recombinant benzaldehydelyase production. **Chemical Engineering Science**, v. 59, p. 5075 – 5083. 2004.

CARLSON, R.; WLASCHIN, A.; SRIENC, F. Kinetic studies and biochemical pathway analysis of anaerobic poly-(r)-3-hydroxybutyric acid synthesis in *Escherichia coli*. **Applied and env. Microbiology**, v. 71, p. 713 – 720. 2005.

CASTILLO, I. D. S. **Cultivo de *Escherichia coli* recombinante: desenvolvimento de estratégia para o crescimento e indução a síntese de troponina**. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 1997.

CHOIN, H. J.; KEUM, K.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 876 – 885. 2006.

DALCANTON, F. **Produção, extração e caracterização de poli(3-hidroxi-*butirato*) por *Ralstonia eutropha* em diferentes substratos.** Dissertação de mestrado (Engenharia de Alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2006.

DAWES, E. A. The role and regulation of poly-beta-hydroxybutyrate as reserve material in microorganisms. In: International Symposium on Macromolecules. Rio de Janeiro 1997. **Elsevier Scientific Publishing.** p. 433 – 450. 1973.

DE KONING, G. Physical properties of bacterial poly (R-3-hydroxyalcanoates) **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 303 – 309. 1995.

DOI, Y. **Microbial Polyesters.** United States: Wiley – VCH. 1990.

DOI, Y.; SEGAWA, A.; KAWAGUCHI, Y.; KUNIOKA, M. Cyclic nature of Poly(3-hydroxyalkanoate) metabolism in *Alcaligenes eutrophus* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 67. p. 165 – 170. 1990.

FACHINI, E.R. **Síntese de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori* NRRL 3112 em cultivo submerso: Influência das condições de transferência de oxigênio e da velocidade de respiração.** Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 1988.

FARIAS, D.; IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F.; SCHMIDELL, W. Estimativa da concentração celular através dos dados de velocidade específica de respiração de *Cupriavidus necator* na produção de Poli(3-hidroxi-*butirato*). In: **XVII Congresso Brasileiro De Engenharia Química**, 2008, Recife – PE. Anais do XVII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2008.

FIDLER, S.; DENNIS, D. Poly-hydroxyalcanoate production in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol.**, v. 103, p. 231 – 236. 1992.

FIORESE, M. L. **Estratégias de cultivo, recuperação e caracterização de poli(3-hidroxi-*butirato*) por *Ralstonia eutropha*.** Tese de Doutorado (Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2008.

FONSECA, G. G. **Produção de poli-hidroxicanoatos por *Escherichia coli* recombinante.** Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2003.

GOMBERT, A. K. **Produção de troponina C em *Escherichia coli*: estudo da indução por lactose e obtenção de alta concentração celular.** Dissertação de Mestrado (Engenharia Química), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 1996.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. A simple way of achieving high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 14, p. 1 – 8. 1997.

GRAY, M. R.; NAMDEV, P. K.; IRWIN, N.; THOMPSON, B. G. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *Escherichia coli* fermentation. **Biotech. and Bioeng.**, v. 41, p. 666 – 670. 1993.

GROTHER, E.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(β -hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.25, p. 132 – 141. 1999.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557 – 580. 1983.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; CHU, L.; DAWES, E. A. Characterization of two 3-ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.52, p.91 – 96. 1988.

HAYWOOD, G.W.; ANDERSON, A.J.; DAWES, E.A. The importance of PHB synthase substrate specificity in poly-hydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microb. Letters**, v. 57, p. 1 – 6. 1989.

IENCZAK, J. L. **Estratégia de Cultivo em Alta Concentração Celular para a Produção de Poli(3-Hidroxibutirato) em Substratos com Moderada Concentração da Fonte de Carbono.** Tese de Doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis/SC. 2011.

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

JUNG, Y. K.; LEE, S. Y.; TAM, T. T. Towards Systems Metabolic Engineering of PHA Producers. In: *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. **Microbiology Monographs**, v. 14, p. 63 – 79. 2010.

JUNG, Y. M.; PARK, J. S.; LEE, Y. H. Metabolic engineering of *Alcaligenes eutrophus* through the transformation of cloned *phbCAB* genes for the investigation of the regulatory mechanism of polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 26, p. 201–208. 2000.

JURASEK, L.; MARCHESSAULT, R. H. The role of phasins in the morphogenesis of poly(3-hydroxybutyrate) granules. **Biomacromolecules**, v. 26, p. 201 – 208. 2002.

KAHAR, P.; AGUS, J.; KIKKAWA, Y.; TAGUCHI, K.; DOI, Y.; TSUGE, T. Effective production of ultra high molecular weight poly(R)-3-hydroxybutyrate in recombinant *Escherichia coli*. **Polym. Degrad. Stabil.**, v. 87, p.161 – 169. 2005.

KIM, B. S., LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biorechnol. Lett.**, v. 14, p. 811 – 816. 1992.

LEE S. Y. *E. coli* moves into the plastic age. **Nat Biotechnol**, v.15, p.17 – 18. 1997.

LEE, S. Y. Plastic bacterial progress and prospects for poly hydroxyalkanoate production in bacteria. **Elsevier Science**, v. 14. 1996.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*: genetic and fermentation studies. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 207 – 215. 1995.

- LEE, S. Y.; MERMELSTEIN, L. D.; PAPOUTSAKIS, E. T. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.108, p. 319 – 324. 1993.
- LI, R.; ZHANG, H.; QI, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. **Bioresource Technology**, v.98, p. 2313–2320. 2007.
- LIRIA, C. W. **Processo descontínuo alimentado no cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS para produção de proteína recombinante troponina C**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 1995.
- MADISON, L.L.; HUISMAN G.W. Metabolic engineering off poly(3-hydroxyalkanoates) from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 63, p. 21 – 53. 1999.
- MAHISHI, L.; RAWAL, S. K. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis by recombinant *E. coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effects of various carbon and nitrogen sources. **Microbiol. Res.**, v. 157, p. 1 – 9. 2002.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 – 428. 1959.
- NAMDEV, P. K.; IRWIN, N.; THOMPSON, B. G.; GRAY, M. R. Effect of oxygen fluctuations on recombinant *E. coli* fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 666 – 670. 1993.
- NISHIDA, H.; TOKIWA, Y. Distribution of poly(beta-hydroxybutyrate) and polycaprolactone aerobic degrading microorganisms in different environments. **Journal of Environment Polymer Degradation**, v. 1, p. 227 - 233. 1993.
- PANDA, A. K.; KHAN, R. H.; APPA RAO, K. B. C.; TOTTEY, S. M. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 161 – 172. 1999.

PIRT, S. J. Principles of microbe and cell cultivation. **Blackwell Scientific Publications**. 1975.

POTTER, M.; MULLER, H.; REINECKE, F.; WIECZOREK, R.; FRICKE, F.; BOWIEN, B.; FRIEDRICH, B.; STEINBUCHER, A. **Microbiology**, v. 150, p. 2301. 2004.

PRADELLA, J. G. C.; IENCZAK, J. L.; DELGADO, C. R.; TACIRO, M. K. Carbon source pulsed feeding to attain high yield and high productivity in poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) production from soybean oil using *Cupriavidus necator*. **Biotechnol Lett**. Published online 08 February. 2012.

RAMSAY, B.A. Proceedings of the symposium on physiology, kinetics, production and use of biopolymers. Seggau, Austria. 1994.

REDDY, C. S. K., GHAI, R., KALIA, V. C. Polyhydroxyalkanoates: an overview. **Bioresource Technology**, v. 87, pp. 137-146. 2003.

REHM, B. H. A. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochem J.**, v. 376, p. 15 – 33. 2003.

ROSSI, M. **Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1**. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Universidade de São Paulo, USP, São Paulo/SP. 2001.

RUSLI, F. M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMAD, R.; PUSPANINGSIH, N. N. T.; ARIFF, A. B. Kinetics of xylanase fermentation by recombinant *Escherichia coli* DH5 α in shake flask culture. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 5, p. 110 – 118. 2009.

RYAN, W.; PARULEKAR, S. J.; STARK, B. C. Expression of beta-lactamase by recombinant *Escherichia coli* strains containing plasmids of different sizes--effects of pH, phosphate, and dissolved oxygen. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 34, p. 309 – 319. 1989.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.1989.

SCHMIDELL W. **Agitação e aeração em biorreatores**. In: W. Schimidell, U.A. Lima, E. Aquarone, W. Borzani. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica* São Paulo: Edgard Blücher, v. 2. 2001.

SCHMIDELL, W.; VITORATTO, E. O desafio do lixo urbano. **Revista Politécnica**, v. 204/205, p. 40 – 42. 1992.

SCHWARTZ, E.; HENNE, A.; CRAMM, R.; EITINGER, T.; FRIEDRICH, B.; GOTTSCHALK, G. **J. Mol. Biol.**, v. 332, p. 369. 2003.

SEZONOV, G.; PETIT, D.; D'ARI, R. Broth physiology in Luria-Bertani *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8746 – 8749. 2007.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G. C.; ROCHA, R. C. S.; TACIRO, M. K.; PRADELLA J. G. C. Produção biotecnológica de poli-hidroxicanoatos para geração de polímeros biodegradáveis no Brasil. **Química Nova**, v. 30, p. 1732 – 1743. 2007.

SLATER, S.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of Poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Applied and environmental microbiology**, v.58, p.1089 – 1094. 1992.

SLATER, S.; HOUMIEL, K.L.; TRAN, M.; MITSKY, T.A.; TAYLOR, N. B.; PADGETTE, S.R.; GRUYS, K.J. Multiple β -ketothiolases mediate poly (β -hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v.180, p.1979 – 1987. 1997.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal. Biochem.**, v. 150, p.76 - 85. 1985.

SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHEUER, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBUHEL, A. A sensitive, viable colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalkanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch.Microbiol.**, v. 171, p. 73 – 80. 1999.

SQUIO, C. R. **Estratégia de alimentação e utilização de suplementos nutricionais na produção de poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha***. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. 2003.

SQUIO, C. R.; ARAGÃO, G. M. F. Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxibutirato) e poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por bactérias. **Química Nova**, v. 27, p. 615 – 622. 2004.

STEINBUHEL, A. PHB and other polyhydroxyalkanoic acids. In REHM, H. J.; REED, G. ROEHR, M. (Ed.). **Products of primary metabolism**. 2nd. Ed. New York: Wiley: John&Sons, v.6, p.405 – 464.1996.

STEINBUHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. Byron D, editors. **Biomaterials Novel materials from biological sources**. Macmillan Publishers, Basingstoke. p. 123 – 213. 1991.

STENBUHEL, A.; AERTS, K.; BABEL, W.; FOLLNER, M.; LIEBERGESELL, M. H. Considerations of the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. **Can. J. Microbiol.**, v. 41, p. 94 – 105. 1995.

STEINBUHEL, A.; FUCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 419 – 427. 1998.

STEINBUHEL, A; HEIN, S. Biochemical and Molecular Basis of Microbial Synthesis of Polyhydroxyalkanoates in Microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 71. Managing Editor: Th.Scheper Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2001.

STEINBUHEL, A., LUTKE-EVERSLOH, T. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant

polyhydroxyalkanoates in microorganisms. **Biochem. Eng. J.**, v. 16, p. 81 – 96. 2003.

STEINBUCHER, A., SCHLEGEL, H.G. Physiology and molecular genetics of Poly(β -hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Molecular Microbiology**, v. 5, p. 535 – 542. 1991.

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

STUBBE, J.; TIAN, J.; HE, A.; SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization process: Polyhydroxyalkanoate synthases as a Paradigm. **Annu. Rev. Biochem.**, v.74, p.433 – 480. 2005.

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

SWARTZ, J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 195 – 201. 2001.

TAGUCHI, H.; HUMPHREY, A.E. Dynamic Measurement of the Volumetric Oxygen Transfer Coefficient in Fermentation Systems, **J. Ferment. Technol.**, v. 44, p. 881 – 889. 1966.

THE QIA EXPRESSIONIST. A handbook for high level expression and purification of 6x. His-tagged proteins. Qiagen. 2003.

TIM, A.; STEINBUCHER, A. Formation of polyester consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *Pseudomonas*. **Applied and Environ. Microbiology**, v. 56, p. 3360 - 3367. 1990.

TOKIWA, Y.; IWAMOTO, A.; KOYAMA, M.; KATAOKA, N.; NISHIDA, H. Biological recycling of plastics containing ester bonds. **Makromolekulare Chemie Makromolecular Symposia**, v. 57, p. 273 - 279. 1992.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **International journal of systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2285 - 2289. 2004.

VAZ, M. R. F. **Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinante (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da *Leishmania chagasi***. Dissertação de Mestrado (Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal/RN. 2008.

WANG, J.G.; BAKKEN, L.R. Screening of soil bacteria for polybeta-hydroxybutyric acid production and its role in the survival of starvation. **Microb. Ecol.**, v. 35, p. 94 – 101. 1998.

WANG, F.; LEE, S. Y. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 4765 – 4769. 1997.

WONG, H. H.; LEE, S. Y. Increased PHB production by high cell density fed batch culture of *Alcaligenes latus*, a growth associated PHB producer. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 50, p. 30 – 33. 1998.

WIECZOREK, R.; PRIES, A.; STEINBUCHER, A.; MAYER, F. J. **Bacteriol.**, v. 177, p. 2425. 1995

YORK, G. M.; LUPBERGER, J.; TIAN, J. M.; LAWRENCE, A. G.; STUBBE, J.; SINSKEY, A. J. **J. Bacteriol.**, v.185, p. 3788. 2003.

ZINN, M.; WITHOLT, B.; EGLI, T. Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 53, p. 5–21. 2001.

APÊNDICE

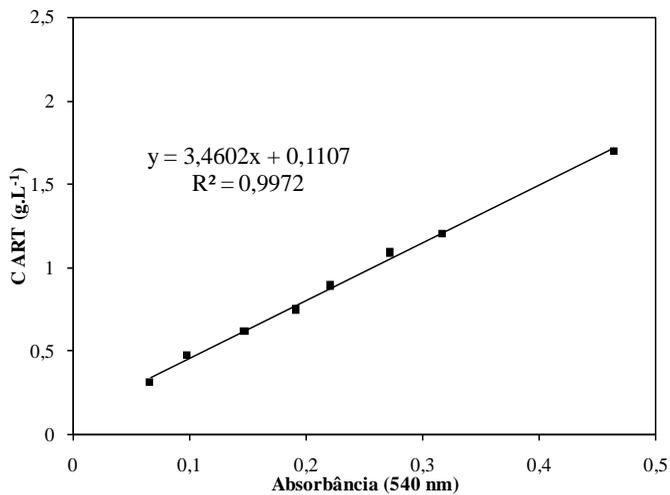


Figura A1 Curva típica padrão para determinação da concentração de açúcares redutores totais.

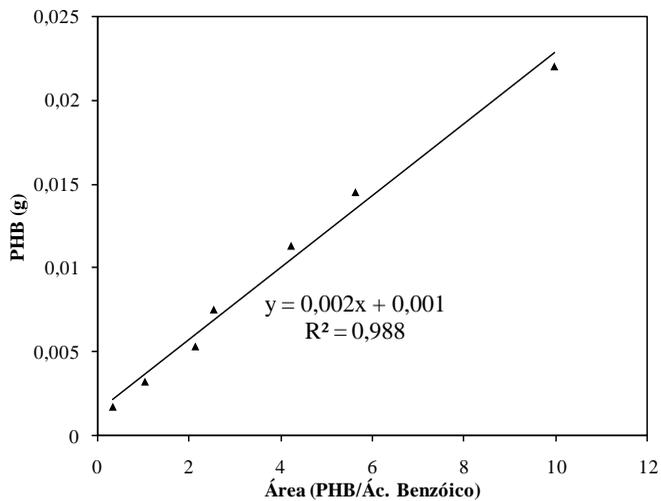


Figura A2 Curva típica padrão para determinação da concentração de P(3HB).