

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS**

Karina Cesca

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIALCANOATOS
ESCHERICHIA COLI RECOMBINANTE A PARTIR DE SORO DE
QUEIJO**

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

Área de concentração: Desenvolvimento de Tecnologias Limpas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Regina Vasconcellos Antônio

Florianópolis/SC
2011

**“ESTUDO DA PRODUÇÃO DE POLI-HIDROXIALCANOATOS
POR *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE A PARTIR DE
SORO DE QUEIJO”**

Por

Karina Cesca

Dissertação julgada para obtenção do Título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^ª Dr^ª Regina Vasconcellos Antônio
Orientadora

Prof^ª Dr^ª Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora

Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Regina Vasconcellos Antônio

Dr^ª Márcio José Rossi

Prof^ª Dr^ª Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof Dr José Miguel Miller

**Dedico esta dissertação a uma pessoa muito especial em minha vida
que tornou tudo isso possível,
minha orientadora Regina.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Em especial:

A professora Regina Vasconcellos Antônio pela orientação, paciência, pela ajuda disponibilizada ao longo do mestrado, um tempo com certeza inesquecível na minha vida. Pelos ensinamentos que levarei pra vida toda.

Aos professores Marcio Rossi e Luciani Ouriques, pela ajuda na realização deste trabalho.

Ao professor Sérgio, Danilo e Rosangela por ter cedido os laboratórios e equipamentos para a realização deste trabalho.

Aos professores Márcio, Glaucia, José Miguel e Edna, que aceitaram participar da banca de defesa desta dissertação e contribuir para melhorá-lo.

Aos meus colegas de laboratório Léo, Raquel, Malu e Jenniffer pela ajuda disponibilizada nas horas difíceis.

Ao amigo Léo pela ajuda na realização das análises estatísticas.

As amigas Raquel e Renata pela amizade e ajuda nas correções.

A minha amiga Karyta pela amizade de hoje e sempre.

A Capes, pela concessão de uma bolsa durante a realização deste trabalho.

À minha família e a todos os amigos e colegas, que de uma forma ou outra nos auxiliam e estimularam para perseguir os objetivos.

RESUMO

Os PHAS são um grupo de poliésteres acumulados sob a forma de grânulos intracelulares por inúmeras bactérias, como reserva de carbono e energia. Entre os PHAs mais estudados estão os polímeros de cadeia curta PHB e P(3HB-co-3HV). O conhecimento das vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação dos PHAs podem auxiliar na implementação de estratégias para sua produção industrial a partir de substratos renováveis e de baixo custo. Isolados de *Escherichia coli* recombinante contendo os genes de biossíntese de PHAs são capazes de acumular até 90 % (m/m) de biomassa seca de biopolímero. Este trabalho teve como objetivo geral a produção de PHA por *Escherichia coli* recombinante contendo a PHA sintase de *Chromobacterium violaceum* e *Cupriavidus necator*, em presença de soro de queijo. Neste estudo, foi avaliada a capacidade de produção de PHA por três isolados de *E. coli* (DH5 α , JM101 e DH10B), a especificidade da enzima PHA sintase de *C. violaceum* em *E. coli* recombinante na produção de P(3HB-co-3HV) em presença de ácido propiônico e a composição do meio de cultivo, através de técnica de planejamento experimental (DCCR), onde as variáveis de estudo foram a quantidade de soro de queijo e concentração de glicose na produção de PHA, concentração de ácido propiônico na incorporação de unidades de valerato e o efeito da adição de IPTG como indutor de expressão gênica. Os resultados mostraram comportamento diferenciado da PHA sintase de *C. violaceum* para cada um dos isolados de *E. coli* estudadas sobre a produção de PHB. A PHA sintase de *C. violaceum* quando inserida em *E. coli* e em presença de ácido propiônico é capaz de incorporar 8,83 mol % de unidades de 3HV. Uma produção de PHA igual a 0,43 g de MCS.L⁻¹ foi observada, em meio contendo 37 % (v/v) de soro de queijo, 2 g.L⁻¹ de glicose, 4 mmol.L⁻¹ de ácido propiônico na ausência de IPTG. Conclui-se que é possível produzir PHA a partir de isolados JM101 de *E. coli* contendo os genes da PHA sintase de *C. violaceum* a partir de soro de queijo, na presença ou ausência de indutor (IPTG).

Palavras chave: Poli-hidroxialcanoatos, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, soro de queijo.

ABSTRACT

The PHAs are a group of polyesters accumulated in the form of intracellular granules by many bacteria as carbon and energy reserves. Among the most studied PHAs are the short-chain polymers PHB and P (3HB-co-3HV). The information of biochemical pathways and enzymes involved in biosynthesis and degradation of PHAs can support in the strategies implementation for industrial production across renewable and low cost substrates. Recombinant strains of *Escherichia coli* containing the genes of the PHAs biosynthesis, are able to accumulate up 90% (w/w) of dry biomass biopolymer. This study aimed at the production of PHA by recombinant *E. coli* containing the *Chromobacterium violaceum* and *Cupriavidus necator* PHA synthase in the presence of cheese whey. This study evaluated the capacity to production of PHA by three strains of *E. coli* (DH5 α , DH10B and JM101), the specificity of the enzyme PHA synthase of *C. violaceum* in *E. coli* recombinant in the production of P (3HB-co-3HV) in presence of propionic acid and the composition of the culture media, through experimental planning technique (DCCR), where the variables were the amount of cheese whey and concentration of glucose in the production of PHA, propionic acid concentration on the incorporation of valerate units and the effect of the added IPTG to induce gene expression. The results showed different behavior of the PHA synthase of *C. violaceum* for each strains of *E. coli* studied on the production of PHB. The PHA synthase of *C. violaceum* when inserted into *E. coli* and in the presence of propionic acid is able to incorporate valerate units. (8.83 mol% of 3HV units). A production of PHA (0.43 gCDW.L⁻¹) was observed in medium containing 37% (v/v) of cheese whey, 2 g.L⁻¹ glucose, 4 mmol.L⁻¹ propionic acid and absence of IPTG. Concluded that it is possible to production of PHA across strains of *E. coli* recombinant containing the PHA synthase of *C. violaceum*.

Keywords: Polyhydroxialkanoates, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, Cheese whey.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura geral dos Poli-hidroxicanoatos.	29
Figura 2 Esquema simplificado da biossíntese dos PHAs.....	36
Figura 3 Ilustração esquemática do operon da biossíntese de PHB de <i>C. necator</i>	37
Figura 4 Processo de síntese de P(3HB-co-3HV).	38
Figura 5 Organização dos grânulos e moléculas envolvidas na biossíntese e no catabolismo de poli-hidroxicanoatos.....	42
Figura 6 Micrografia eletrônica de Transmissão de corte fino de células de <i>C. necator</i> (<i>R. eutropha</i>). (A) e de <i>E. coli</i> XL1-Blue (B).....	43
Figura 7 Fluxograma de obtenção da bactéria recombinante.	48
Figura 8 Fluxograma dos ensaios realizados no estudo.	51
Figura 9 Curso temporal do crescimento celular (MSC) e produção de PHB, realizado com os isolados de <i>E. coli</i> JM101, DH10B e DH5 α contendo plasmídeos pRLC2 e pBHR68.....	62
Figura 10 Acompanhamento do pH do meio durante cultivo dos isolados de <i>E. coli</i> JM101, DH10B e DH5 α contendo os plasmídeos pRLC2 e pBHR68.	62
Figura 11 Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis sobre a produção de PHA. À direita do tracejado encontram-se as variáveis e suas interações que tiveram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sobre a produção de PHA.	72
Figura 12 Superfície de resposta da produção de PHA, variando a concentração de glicose e a percentagem de soro de queijo mantendo a concentração de ácido propiônico constante em a) 0 mmol.L ⁻¹ ácido propiônico; b) 0,74 g.L ⁻¹ ácido propiônico.	73
Figura 13 Superfície de resposta da produção de PHA, variando a concentração de ácido propiônico e a percentagem de soro de queijo mantendo a concentração de glicose constante em; a) sem glicose e b) concentração máxima de glicose 20 g.L ⁻¹	74
Figura 14 - Superfície de resposta dos efeitos da concentração de soro de queijo e ácido propiônico sobre a incorporação de PHA (%) contendo 4 g.L ⁻¹ de glicose para <i>E. coli</i> DH5 α (pRLC2).	75
Figura 15 Cinética de produção de PHA e MCS, para <i>E. coli</i> DH5 α (pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 20 g.L ⁻¹ de glicose e 0,148 g.L ⁻¹ de ácido propiônico.	77
Figura 16 Cinética de produção de PHA e MCS, para <i>E. coli</i> DH5 α (pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 4 g.L ⁻¹ de glicose, 0,74 g.L ⁻¹ de ácido	78

Figura 17 Cinética de produção de PHA e MCS, para <i>E. coli</i> DH5 α (pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 4 g.L ⁻¹ de glicose, 0,148 g.L ⁻¹ de ácido propiônico, para.....	79
Figura 18 Imagem TEM de <i>E. coli</i> recombinante hospedando a PHA sintase de <i>C. violaceum</i> , contendo grânulos de PHB, depois de 24 horas de cultivo em meio LB contendo glicose.....	82
Figura 19 Curva padrão para determinação de glicose	100
Figura 20 Curva padrão Poli-hidrixibutirato	101
Figura 21 Curva padrão Poli-hidrixivalerato	101
Figura 22 Ilustração esquemática do procedimento experimental adotado para clonagem do gene <i>phaC</i> de <i>C. violaceum</i> e obtenção da <i>E. coli</i> recombinante.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Produção de PHAs por E. coli recombinante utilizando soro de queijo como substrato.....	34
Tabela 2 Resumo de estudos que utilizaram soro de queijo hidrolisado como substrato na produção de PHAs.....	35
Tabela 3 Classificação de PHA sintases.....	40
Tabela 4 Isolados bacterianos e suas características relevantes.	45
Tabela 5 Plasmídeos e suas características relevantes.....	45
Tabela 6 Composição do meio Mineral M1.....	46
Tabela 7 Composição do meio mineral M2.	46
Tabela 8 Composição centesimal média do soro de queijo.....	47
Tabela 9 Níveis das variáveis estudadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).	53
Tabela 10 Condições dos cultivos realizados para E. coli DH5 α /pRLC2.	54
Tabela 11 Procedimento de determinação de glicose pelo kit Gold Analisa.....	56
Tabela 12 Produção de MCS (g.L ⁻¹) e PHB (g.L ⁻¹) e percentagem de acúmulo de PHA em 24 horas de cultivo para os isolados de E. coli recombinante.	63
Tabela 13 Concentração de MCS, PHA, lactose consumida, conversão de substrato (lactose) em biomassa e PHB (Y _{MCS/S} e Y _{PHB/S} , respectivamente) obtidas em diferentes concentrações de lactose para E. coli JM101(pBHR68).	64
Tabela 14 Concentração de MCS, PHA, percentual de lactose consumida, Y _{MCS/S} e Y _{PHB/S} , obtidas em diferentes concentrações de tiamina, para E. coli JM101(pBHR68).	65
Tabela 15 Avaliação da produção de PHA a partir de soro de queijo... 66	
Tabela 16 Valores reais para as variáveis do DCCR-2 ³ e seus efeitos sobre e valores de pH, produção de MCS, PHA e a composição dos monômeros nos diferentes níveis estudados, produzidos por E. coli DH5 α (pRLC2) ao final de 24 horas de cultivo.	69
Tabela 17 Análise de variância (ANOVA). Avaliação dos efeitos das variáveis sobre a produção de PHA, em E. coli DH5 α (pRLC2).	71
Tabela 18 Condições experimentais dos meios de cultivo para a avaliação das cinéticas de crescimento e acúmulo de PHA por E. coli recombinante (DH5 α /pRLC2).....	76
Tabela 19 Parâmetros cinéticos, velocidades de produção de MCS e PHA e consumo de substrato, Y(MCS/S) e PHA Y(MCS/S) nos cultivos com E. coli recombinante (DH5 α , hospedando a PHA sintase de C.	

violaceum) em meio de cultivo contendo soro de queijo (37 % (v/v)) e em diferentes concentrações de glicose e ácido propiônico.....	79
Tabela 20 Efeito das concentrações de glicose e de ácido propiônico sobre a produção de MCS, PHA e a incorporação de unidades de 3HV ao copolímero por E. coli DH5 α /pRLC2.	80
Tabela 21 Efeito da adição de ácido propiônico sobre a incorporação de unidades de 3HV por E. coli DH5 α hospedando a PHA sintases de C. violaceum (pRLC2) e C necator (pBHR68))	81

NOMENCLATURA

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ANOVA	Análise de variância
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
HSS	High salinity solution
IPTG	Isopropil-1-tio- β -D-galactopiranosídeo
LB	Luria Bertani
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MM	Meio mineral
MSC	Massa seca celular
OGM	Organismos geneticamente modificados
Pb	Pares de bases
<i>phaA</i>	Gene codificando para β -cetotiolase
<i>phaB</i>	Gene codificando para NADPH-dependente acetoacetil-CoA-redutase
<i>phaC</i>	Gene codificando para PHA sintase
PHAs	Poli-hidroxialcanoatos
P(3HB)	Poli(3-hidroxibutirato)
P(3HB- <i>co</i> -3HV)	Poli(3-hidroxibutirato- <i>co</i> -3-hidroxivalerato)
TE	Tampão Tris-EDTA
T.	Temperatura
TENS	Tampão Tris-EDTA mais NaOH e SDS
<i>thi</i> ⁻¹	Genótipo deficiente na biossíntese de tiamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	Objetivo geral	27
2.2	Objetivos específicos	27
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
3.1	Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs)	29
3.1.1	Classificação	30
3.1.2	Aplicações.....	30
3.1.3	Micro-organismos produtores	31
3.1.4	Micro-organismos recombinantes	32
3.2	Produção de PHA por <i>E. coli</i> recombinante a partir de soro de queijo	32
3.3	Produção de PHAs por outros micro-organismos a partir de soro de queijo	34
3.4	Biossíntese de poli-hidroxicarboxilatos (PHAs)	35
3.4.1	Biossíntese de PHB.....	36
3.4.2	Biossíntese de P(3HB-co-3HV).....	37
3.5	Enzimas envolvidas na síntese de PHAs.....	38
3.5.1	β -cetotiolase (<i>phaA</i>)	38
3.5.2	Acetil CoA redutase (<i>phaB</i>).....	39
3.5.3	PHA Sintase (<i>phaC</i>).....	39
3.6	Estrutura dos grânulos de PHAs	40
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1	Isolados bacterianos e plasmídeos	45
4.2	Meios e soluções.....	45
4.2.1	Meio Lúria Bertani (LB).....	45
4.2.2	Meio mineral.....	46
4.2.3	Preparo do soro de queijo	46
4.2.4	Preparação da solução de glicose e lactose	47

4.2.5	Preparação da solução de ácido propiônico	47
4.2.6	Preparação da solução de ampicilina	47
4.2.7	Preparo da solução de IPTG.....	47
4.3	Obtenção da bactéria recombinante.	47
4.3.1	Preparação das células competentes.....	48
4.3.2	Transformação das células competentes	49
4.3.3	Cultivo da <i>E. coli</i> transformada (ou recombinante)	49
4.3.4	Extração do DNA plasmideal.....	49
4.3.5	Eletroforese em gel de agarose.....	50
4.4	Produção de PHA por diferentes isolados de <i>E. coli</i> recombinante. 50	
4.4.1	Preparo do pré-inóculo e inóculo	51
4.4.2	Ensaio para a avaliação e acompanhamento do crescimento e produção de PHAs pelos isolados de <i>E. coli</i> recombinantes	52
4.4.3	Estudo do efeito da concentração de lactose sobre a produção de PHA por <i>E. coli</i> JM101/pBHR68.....	52
4.4.4	Estudo do efeito da concentração de tiamina sobre a produção de PHA por <i>E. coli</i> JM101/pBHR68.....	52
4.4.5	Avaliação do crescimento e da produção de PHA por isolados de <i>E. coli</i> recombinante a partir de soro de queijo.....	53
4.4.6	Estudo dos efeitos de soro de queijo, ácido propiônico, glicose e IPTG sobre o crescimento e produção de PHA por <i>E. coli</i> (DH5 α /pRRC2).....	53
4.4.7	Avaliação da cinética de crescimento e acúmulo de PHAs por <i>E. coli</i> (DH5 α /pRRC2).	54
4.4.8	Avaliação da especificidade da PHA sintase de <i>C. violaceum</i> por unidades de valerato	55
4.4.9	Observação dos grânulos intracelulares acumulados pela <i>E. coli</i> DH5 α /pRRC2 por TEM.....	55
4.5	Determinações analíticas.....	55
4.5.1	Determinação da massa celular seca (MCS)	55
4.5.2	Determinação da concentração de açúcares	56

4.5.3	Determinação do PHA	57
4.5.4	Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)	57
4.5.5	Determinação das grandezas cinéticas	58
4.5.6	Tratamento estatístico	59
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1	Avaliação do crescimento e acúmulo de PHA por diferentes isolados de <i>E. coli</i> a partir de lactose.....	61
5.2	Avaliação da concentração de lactose SOBRE O CRESCIMENTO E produção de PHA PELO RECOMBINANTE JM101/ pBHR68.	63
5.3	Avaliação da concentração DE tiamina SOBRE O CRESCIMENTO E produção de PHA PELO RECOMBINANTE JM101/ pBHR68.....	64
5.4	Avaliação da produção de PHA a partir de soro de queijo	65
5.4.1	Avaliação dos efeitos da variação na concentração e suplementação do soro de queijo sobre a produção de PHA por <i>E. coli</i> DH5 α /pRLC2	67
5.5	Avaliação da cinética de crescimento e acúmulo de PHAs por <i>E. coli</i> DH5 α /pRLC2	76
5.6	Efeito da adição de ácido propiônico sobre a incorporação de unidades de valerato	80
5.7	Avaliação da especificidade da PHA sintase de <i>C. violaceum</i> por unidades de valerato <i>em E. coli</i> recombinante.....	81
5.8	Observação da formação dos grânulos intracelulares pela PHA sintase de <i>C. violaceum</i>	82
6	CONCLUSÕES.....	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a poluição ambiental vem ganhando cada dia mais importância, devido ao aumento mundial na produção de resíduos plásticos de origem petroquímica e o grande intervalo de tempo necessário para a sua degradação. Uma alternativa vem sendo desenvolvida como uma tentativa de substituir os polímeros derivados do petróleo por biopolímeros, que são produzidos por micro-organismos, cujas vantagens principais estão no menor tempo necessário para biodegradação e a utilização de substratos renováveis (REHM, 2003).

Os poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres biológicos acumulados por uma grande variedade de micro-organismos, em condições nutricionais favoráveis para o seu crescimento, como reserva de carbono e energia (TSUGE, 2002). A produção de poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)) que é o PHA melhor caracterizado, por bactérias nativas, está muito bem estudado e diversas bactérias são capazes de sintetizá-lo. Porém, este biopolímero, não apresenta características adequadas para algumas aplicações tecnológicas, sendo considerado duro e quebradiço. A incorporação de monômeros de valerato ao copolímero poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (P(3HB-*co*-3HV -), resulta na formação de um polímero, que por ser mais flexível do que o P(3HB) tem suas aplicações ampliadas. O copolímero também é mais fácil de ser moldado, visto que apresenta menor temperatura de fusão, e pode ser usado para produção de filmes resistentes ao vapor d'água e gases, com propriedades similares ao polipropileno (MARCHESSAULT, 1996).

A composição dos polímeros produzidos depende de vários fatores, tais como o micro-organismo produtor, o substrato carbônico utilizado, a especificidade da PHA sintase, as vias metabólicas envolvidas na utilização da fonte de carbono e as condições de operação empregadas no processo de produção (CASTILHO; MITCHEL; FREIRE, 2009; SANKHLA et al., 2010; LI et al., 2011; MATSUMOTO et al., 2011; SALIM et al., 2011).

O conhecimento mais aprofundado sobre as vias bioquímicas e enzimas envolvidas na biossíntese e degradação destes polímeros vem sendo uma importante ferramenta, para auxiliar a produção industrial de PHAs (STUBBE et al, 2005). Os mecanismos envolvidos na biossíntese de PHAs foram amplamente investigados especialmente em

Cupriavidus necator, onde as rotas metabólicas e as respectivas enzimas e genes envolvidos na biossíntese de P(3HB) já foram bem caracterizados e definidos. *C. necator* é capaz de produzir P(3HB) com os maiores valores de produtividade relatados até agora. Esta bactéria é capaz de produzir também o copolímero P(3HB-co-3HV). Neste caso, o precursor de valerato usualmente empregado é o ácido propiônico, o qual é convertido a propionil-CoA, condensado com acetil-CoA, por ação da enzima β -cetotiolase. O acetovaleril-CoA resultante é reduzido o 3-hidroxicetovaleril-CoA (3-HV-CoA), por atividade da acetil-CoA redutase dependente de NADPH, o qual é substrato da PHA sintase, assim como o 3-hidroxicetobutiril-CoA (3-HB-CoA). A atividade da sintase sobre estes substratos pode resultar na produção do copolímero, P(3HB-co-3HV) (LAW et al., 2004). A produção de PHA por linhagens nativas de *Chromobacterium violaceum* já foi relatada, assim como, a clonagem e expressão do gene que codifica PHA sintase de *C. violaceum* (*phaC_v*) (STEINBUCHER, et al., 1993; KOLIBACHUK et al., 1999). Steinbucher et al (1993) relataram uma afinidade marcante da PHA sintase de *C. violaceum* por unidades de valerato.

A produção biotecnológica de PHA é cara, quando comparado ao custo de produção de polímeros convencionais. Estudos para seleção e ou modificação de linhagens bacterianas que levem ao aumento da produtividade, bem como a melhoria da eficiência dos bioprocessos e de recuperação são fundamentais para diminuir os custos de produção do biopolímero e, conseqüentemente, a ampliação de seu uso (CHEN, 2009).

O desenvolvimento de isolados de *E. coli* recombinante, contendo os genes da biossíntese de *C. necator*, capaz de produzir PHA pode ser vantajosa. Quando comparada a linhagens nativas produtoras de PHA, *E. coli* apresenta maior velocidade de crescimento em altas temperaturas, suas células são de fácil lise, pode acumular até 80 % de seu peso seco em biopolímeros, não possui despolimerases e é capaz de utilizar fontes renováveis de carbono (KAHAR et al., 2004).

A utilização de substratos de baixo custo é de fundamental importância para redução de custos do processo, tornando-o industrialmente competitivo (KIM, 2000; SURESH et al., 2004). O soro de queijo apresenta potencial como substrato na produção de PHA, uma vez que o mesmo apresenta elevada concentração de lactose (~46 g.L⁻¹).

Estima-se que no Brasil sejam consumidos anualmente 478 milhões de quilogramas de queijo (ABIQ, 2007). Para cada quilograma de queijo produzido, aproximadamente 9 litros de soro de queijo são gerados. Em algumas plantas de processamento de leite, o soro de queijo

é destinado ao fabrico de derivados, dentre eles, destacam-se a bebida láctea, ricota e doces; uma parcela é enviada à nutrição animal, outra parcela utilizada na obtenção de proteínas concentradas (HOSSEINI, 2003).

Os PHAs destacam-se pela similaridade das suas propriedades com as encontradas em polímeros de origem petroquímica e ao potencial para novas aplicações, graças as suas propriedades únicas como, por exemplo, a biocompatibilidade, biodegradabilidade, insolubilidade em água, atoxicidade, propriedades termoplásticas e/ou elastoméricas (CHEN et al., 2001). Estas características os tornam adequados para aplicações na indústria de embalagens, medicina, agricultura, indústria alimentar, indústria farmacêutica, como matéria prima para produtos químicos enantioméricos puros e na produção de tintas (STEINBUCHEL; FUCHTENBUSCH, 1998; KOLLER et al., 2007).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de PHB por três isolados de *Escherichia coli* recombinante, modificadas através da engenharia genética pela introdução de plasmídeos contendo genes que codificam as principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHA de *C. necator* e *C. violaceum*, utilizando como substrato soro de queijo. O efeito da adição do co-substrato, propionato, sobre a produção do copolímero P(3HB-co-3HV) pelos recombinantes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de produção de PHB e P(3HB-co-3HV) por três isolados de *Escherichia coli* recombinante geneticamente modificados pela introdução de plasmídeos contendo genes que codificam as principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHA de *C. necator* e *C. violaceum*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a capacidade de crescimento de isolados de *E. coli* recombinante utilizando lactose como substrato.

Avaliar o efeito da concentração de lactose sobre a produção de PHA em um dos isolados de *E. coli* recombinante, em meios de cultivo definido com e sem a suplementação com a vitamina tiamina.

Avaliar capacidade de crescimento e produção de PHA por um dos isolados de *E. coli* recombinante a partir de soro de queijo.

Avaliar o efeito da composição do meio de cultivo sobre a produção de PHA em um dos isolados de *E. coli* recombinante.

Avaliar cinética de crescimento e da produção de PHA em um dos isolados de *E. coli* recombinante.

Observar a formação dos grânulos intracelulares pela PHA um dos isolados de *E. coli* recombinante usando microscopia de transmissão eletrônica (TEM).

Avaliar a especificidade das PHA sintases de *C. violaceum* e *C. necator* em incorporar unidades de valerato a partir da adição de ácido propiônico ao meio de cultivo de *E. coli*

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAS)

Poli-hidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres produzidos e armazenados por diversas bactérias, sob a forma de grânulos intracelulares como reserva de carbono, energia e equivalentes redutores, podendo atingir até cerca de 90 % da massa seca celular, sob condições nas quais há limitação de pelo menos um nutriente essencial à multiplicação celular e excesso de fonte de carbono (ANDERSON; DAWES, 1990). Os PHAs são polímeros de ácidos R-(-)-3-hidroxicanoicos, sendo a fórmula estrutural geral dos PHAs apresentada na Figura 1.

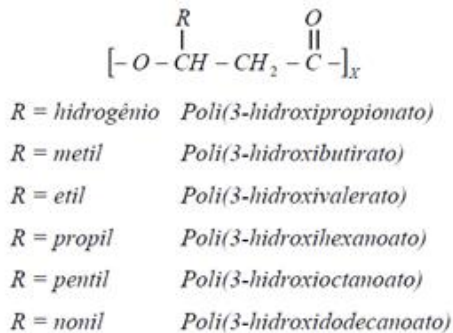


Figura 1 Estrutura geral dos Poli-hidroxicanoatos.

Fonte: (Verlinden, *et al.* 2007)

A composição da cadeia lateral, radical R e o valor de X, determinam a identidade da unidade polimérica (LEE et al., 1996). Dependendo da cadeia lateral, os polímeros apresentam características que variam desde termoplásticos (R= CH₃, CH₂CH₃) a elastômeros (R=C₃H₇-C₁₁H₂₃) (VALAPPIL et al., 2007). Estas características possibilitam sua aplicação industrial para produção de diversos materiais, tais como: embalagens plásticas, veículo de liberação controlada de agroquímicos e fármacos, confecção de materiais médicos e outros. Sua aplicação na área médica deve-se ao fato de serem materiais biocompatíveis.

Porém, o principal atrativo dos PHAs, além de serem biodegradáveis, é o fato de poderem ser produzidos a partir de fontes de carbono renováveis, tais como açúcares e óleos vegetais, existe ainda a possibilidade de ser produzidos com resíduos provenientes de atividades

agrícolas e industriais (SOLAIMAN et al., 2006), como o soro de queijo e melaços (SERAFIM et al., 2008; OBRUCA et al., 2010). A fonte de carbono é um dos fatores que determina o tipo de PHA produzido, e tem um peso significativo no custo final do produto (CHOI; LEE, 1999).

3.1.1 Classificação

Os PHAs podem ser classificados, de acordo com o comprimento da cadeia monomérica em poli-hidroxicanoatos de cadeia curta (PHA_{SCL}) e poli-hidroxicanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}). Os PHA_{SCL} são formados por monômeros com 3 a 5 átomos de carbono e são produzidos por bactérias que contenham PHA sintase do tipo I, como *Cupriavidus necator*, *Chromobacterium violaceum*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodospirillum rubrum*, *Azospirillum brasilense* e *Bacillus thuringiensis*, entre outras bactérias (VALENTIN et al., 2000). Os PHA_{MCL} são formados por monômeros com 6 a 14 átomos de carbono e são encontrados em bactérias contendo PHA sintase do tipo II, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas fluorescens* e outras *Pseudomonas* sp. (VALENTIN et al., 2000; JENDROSSEK; SCHIRMER; SCHLEGEL, 1996).

O poli-(3-hidroxi-butarato) (P(3HB)) é um dos PHAs produzido por bactérias e o mais estudado. Uma das características deste homopolímero é ser rígido e quebradiço o que dificulta seu processamento industrial, devido à baixa moldabilidade. No entanto, alguns heteropolímeros, entre os quais pode destacar o copolímero poli-(3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato) (P(3HB-co-3HV)), que apresenta melhores características físicas e químicas para as aplicações industriais (BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998).

3.1.2 Aplicações

As características físicas e químicas dos PHAs lhes conferem um grande potencial de aplicação. Eles podem ser aplicados na confecção de objetos e embalagens descartáveis e biodegradáveis, artefatos usados na medicina, tais como válvulas cardíacas, suturas, implantes ósseos, na engenharia de tecido, sistemas de distribuição de fármacos (CHEN; WU, 2005).

Além disso, podem-se citar diversas aplicações industriais, tais como transportadores biodegradáveis para liberação controlada de fertilizantes, fungicidas, herbicidas e inseticidas, confecção de tubulações para irrigação, redes de pesca, frascos, filmes, recipientes, garrafas e sacolas, emulsificantes, borrachas, itens de higiene

descartáveis, como fraldas e barbeadores, matéria prima para a produção de tintas e adesivos (CHEN, 2009).

Porém, a maioria dos estudos atuais tem como foco as aplicações dos PHAs na área médica como em curativos, grampos e pinos cirúrgicos, seringas, suturas, enxertos de vasos sanguíneos e materiais osteosintéticos, como placas ósseas (GRAGE et al., 2009).

3.1.3 Micro-organismos produtores

Embora o número de bactérias capazes de produzir e acumular PHAs, seja superior a 300 espécies, somente algumas destas foram estudadas e efetivamente empregadas na produção deste biopolímero. Incluem-se neste grupo *Cupriavidus necator*, *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*, vários isolados de *metilotrofos*, *Pseudomonas oleovorans* e, recentemente, as versões recombinantes de *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli* e *Klebsiella aerogenes* (LU; TAPPEL; NOMURA, 2009). Estas bactérias foram selecionadas pela produção de alta densidade celular, acumulando alta concentração de PHAs em um período relativamente curto de tempo, resultando em alta produtividade. A alta produtividade é um fator indispensável para obter uma redução dos custos de produção dos polímeros biodegradáveis (LEE et al., 1996).

As bactérias utilizadas na produção de PHAs podem ser divididas em dois grupos, baseados nas condições de culturas requeridas para a síntese. O primeiro grupo necessita de limitação em algum nutriente essencial como nitrogênio (N), fósforo (P), magnésio (Mg), potássio (K), oxigênio (O₂) ou enxofre (S) e excesso de carbono para uma eficiente síntese, enquanto que o segundo grupo não requer limitação de nutriente para a síntese de PHAs, sendo capaz de acumular o polímero durante a fase de crescimento. *C. necator*, *P. oleovorans*, *C. violaceum* e muitas outras bactérias pertencem ao primeiro grupo, enquanto *A. latus* e *A. vinelandii* fazem parte do segundo grupo (NIKEL et al., 2005; WONG et al., 2008; LI, 2011).

A seleção de micro-organismos para a produção de PHAs deve ser baseada em diversos fatores, incluindo a habilidade da célula em utilizar fontes de carbono de baixo custo, sua velocidade de crescimento, velocidade de síntese do biopolímero e a produtividade alcançada. Avanços recentes na compreensão da bioquímica e biologia molecular envolvidas na biossíntese de PHAs e a clonagem dos genes responsáveis por essa biossíntese, em várias bactérias, conduziram ao desenvolvimento de bactérias recombinantes com uma capacidade superior de produção de biopolímero (KHANNA; SRIVASTAVA,

2009). Entre estas se destacam isolados de *E. coli* recombinante, contendo os genes de isolados selvagens de biossíntese de PHA. Além de ter seu metabolismo muito bem caracterizado bioquímica e geneticamente estes isolados apresentam alta aplicação industrial (WONG et al., 2008).

3.1.4 Micro-organismos recombinantes

A metodologia do DNA recombinante é a clonagem molecular, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem molecular compreende pelo menos dois estágios importantes. Primeiro, o fragmento do DNA de interesse chamado de *inserto* é ligado à outra molécula de DNA chamada de *vetor* para formar o que se chama de *DNA recombinante*. Segundo, a molécula do DNA recombinante é introduzida em uma célula hospedeira compatível, num processo chamado de *transformação*. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de *transformante* ou *célula transformada*. Um único transformante, em condições ideais, sofre muitos ciclos de divisão celular, produzindo uma colônia que contém milhares de cópias do DNA recombinante (MULLIS, 1990).

A tecnologia do DNA recombinante possibilita a obtenção de organismos com características novas ou não encontradas na natureza, o que permite uma nova alternativa para o melhoramento genético de espécies de valor biotecnológico. Desse modo, células de bactérias, leveduras e mesmo eucariontes superiores como plantas podem ser programadas com genes exógenos, abrindo a perspectiva de produção nestes organismos de polipeptídeos de interesse, como hormônio de crescimento, a insulina, biopolímeros, entre outros. A utilização de microrganismos "engenheirados", capazes de sintetizar proteínas em grande quantidade, apresenta, sob o ponto de vista econômico, uma vantagem considerável em relação aos processos clássicos de produção (LIMA, 2001).

3.2 PRODUÇÃO DE PHA POR *E. COLI* RECOMBINANTE A PARTIR DE SORO DE QUELJO

E. coli recombinante tem várias vantagens para a produção de PHAs, em relação aos micro-organismos naturalmente produtores, sendo um dos únicos recombinantes utilizados em produção industrial, pois possui um rico histórico genético, mostra um bom crescimento celular, pode utilizar diversos substratos como fonte de carbono, dispensa a necessidade de limitação nutricional, apresentando crescimento celular e acúmulo de biopolímeros simultaneamente, possui

a capacidade de acumular grandes quantidades de PHAs, podendo superar 90 % da massa celular seca, e ao contrário de isolados nativos usadas na produção de PHAs, não possui a enzima PHA despolimerase (CHOI; LEE; HAN, 1998).

Uma grande variedade de substratos tem sido usada como matéria prima, para a produção de PHAs, associada ao emprego de diversas espécies bacterianas (CASTILHO, MITCHEL, FREIRE, 2009; LI, 2011; SALIM et al., 2011). Os substratos utilizados na produção de PHAs representam uma porcentagem significativa no custo final de produção. Por este motivo, há vários estudos sendo realizados com o intuito de aproveitar rejeitos industriais como potenciais fontes de carbono, para a produção de PHAs (KIM, 2000).

E. coli é capaz de consumir lactose presente no soro de queijo como fonte de carbono para produção de PHAs (WONG; LEE, 1998; AHN; PARK; LEE, 2000; PARK; PARK; LEE, 2002; NIKEL et al., 2006). O soro de queijo torna-se um bom substrato devido ao seu alto teor de lactose, cerca de 40 %. A presença de aproximadamente 46 g.L⁻¹ de lactose, 7 g.L⁻¹ de proteínas e 3 g.L⁻¹ de gordura, faz com que o soro de queijo apresente uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 30 a 50 g.L⁻¹ e uma demanda química de oxigênio (DQO) de 50 a 80 g.L⁻¹, representando um dos principais poluentes da indústria alimentícia (HOSSEINI; SHOJAOSADATI; TOWFIGHI, 2003).

Alguns autores já relataram a capacidade de produção de PHAs a partir de soro de queijo *in natura* ou hidrolizado, por vários micro-organismos (KIM, 2000; MARANGONI; FURIGO; ARAGÃO, 2002.; NIKEL et al., 2006; KOLLER et al., 2008; BOSCO; CHIAMPO, 2010; POVOLO et al., 2010), e a utilização da lactose presente no soro de queijo como indutor de expressão gênica (NEUBAUER et al., 1992; GOMBERT; KILIKIAN, 1998; VIITANEN et al., 2003).

Os primeiros estudos relatados sobre a produção de PHAs a partir de soro de queijo enfatizaram, a sua utilização como um substrato de baixo custo, tornando assim, o biopolímero economicamente mais competitivo (WONG; LEE, 1998; AHN; PARK; LEE, 2000). A Tabela 1 apresenta alguns estudos, utilizando soro de queijo como substrato, a partir de isolados de *E. coli* recombinante e o micro-organismo da referência da PHA sintase, bem como os meios de cultivo empregados.

Tabela 1 Produção de PHAs por *E. coli* recombinante utilizando soro de queijo como substrato.

Isolados/Genes	Meio de cultivo	Referência
<i>E. coli</i> recombinante/ <i>A. latus</i>	Soro de queijo	Ahn; Park; Lee, 2000
<i>E. coli</i> recombinante/ <i>A. latus</i>	Soro de queijo em pó	Park; Park; Lee, 2002
<i>E. coli</i> recombinante/ <i>P. aeruginosa</i>	Óleo de soja, amido de milho hidrolisado e suplemento com soro de queijo.	Fonseca; Antônio, 2006
<i>E. coli</i> recombinante/ <i>Azotobacter sp.</i>	Soro de queijo em pó, milhocina e fosfato	Nikel et al., 2005
<i>E. coli</i> recombinante/ <i>Azotobacter sp.</i>	Soro de queijo, milhocina e sais minerais	Nikel et al., 2006

Fonseca (2006) avaliou a produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo a PHA sintase de *C. necator* e *P. aeruginosa*, utilizando como substratos óleo de soja, amido de milho hidrolisado e suplemento com soro de queijo. O isolado de *E. coli* JM101 contendo a PHA sintase de *C. necator* teve uma produção de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ de PHB, em meio mineral suplementado com 5 % (v/v) de amido de milho hidrolisado, 5 % (v/v) de soro de queijo e 1,5 % (v/v) de óleo de soja. Enquanto que o mesmo isolado de *E. coli* contendo a PHA sintase de *P. aeruginosa* apresentou uma produção $0,015 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA, meio mineral suplementado com 5 % (v/v) de soro de queijo, ausente de amido de milho hidrolisado, óleo de soja e ácido acrílico.

Nikel et al., (2005) através de um delineamento experimental Plackett-Burman variou as concentrações de soro de queijo, licor de milho e fosfatos, utilizando um isolado de *E. coli* contendo a PHA sintase de *Azotobacter sp.* O trabalho apresentou uma produção de MCS e PHB de $9,41 \text{ g.L}^{-1}$ e $6,12 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Essas condições foram encontradas quando em presença de $37,96 \text{ g.L}^{-1}$ de soro de queijo, $29,39 \text{ g.L}^{-1}$ de licor de milho e $23,76 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfatos.

3.3 PRODUÇÃO DE PHAS POR OUTROS MICRO-ORGANISMOS A PARTIR DE SORO DE QUEIJO

A maioria dos micro-organismos não são capazes de utilizar a lactose presente no soro de queijo como fonte de carbono. Assim, os estudos atuais avaliam a utilização de soro de queijo hidrolizado que disponibiliza glicose e galactose, como fonte de carbono no meio de cultivo.

A Tabela 2 apresenta em resumo de alguns estudos que utilizaram soro de queijo hidrolisado como fonte de carbono para a produção de PHAs por diversos micro-organismos.

Entre os estudos mostrados na Tabela 2, destaca-se o realizado por Povolo (2010) que através da engenharia genética realizou modificações em *C. necator*, tornando-a capaz de consumir a lactose do soro de queijo para a produção de PHAs. Neste isolado, o gene *phaZ1* que codificaria a PHA depolimerase de PHA intracelular, foi retirado e no seu lugar foram inseridos os genes *lacZ*, *LacI* e *LacO* de *E. coli*. Este recombinante seria capaz, então, de utilizar lactose como fonte de carbono para a produção de polímeros, ao mesmo tempo, em que parte do sistema de degradação PHA intracelular seria removido, levando a rendimentos elevados, em comparação com o isolado do tipo selvagem.

Tabela 2 Resumo de estudos que utilizaram soro de queijo hidrolisado como substrato na produção de PHAs.

Isolados	Substrato	Referência
Organismos altamente osmofílicos	Soro hidrolisado	KOLLER et al, 2005
<i>Hydrogenophaga pseudoflava</i>		
<i>Halcyferax mediterranei</i>	Soro hidrolisado	KOLLER et al, 2007
<i>Pseudomonas hydrogenovara</i>		
<i>Methylobacterium sp.</i>	Soro	NATH et al, 2008
<i>Pseudomonas hydrogenovara</i>	Soro hidrolisado	KOLLER et al, 2008
<i>Cupriavidus necator</i>	Soro e soro hidrolisado	POVOLO et al, 2010.

A biossíntese de copolímeros de PHA em biorreator, contendo unidades P(3HB) e P(3HV), foi estudada a partir de soro permeado hidrolisado e valerato, obtendo uma concentração máxima de biopolímero de 1,27 g.L⁻¹ de PHB em *Pseudomonas hydrogenovara* (KOLLER et al., 2008).

3.4 BIOSÍNTESE DE POLI-HIDROXIALCANOATOS (PHAS)

A biossíntese de PHAs tem sido estudada em diversas bactérias e depende de três fatores principais: fonte de carbono, da rota metabólica e do tipo de PHA sintase. Os PHAs são acumulados nas células pelo uso de inúmeras fontes de carbono, que são consumidas pelas células por diferentes rotas metabólicas para gerar o monômero,

que é o substrato para a PHA sintase. Observando o processo genérico de biossíntese dos PHAs (Figura 2), três fases podem ser claramente identificadas. Na primeira ocorre a absorção de uma fonte de carbono passível de participar da biossíntese do PHA. Essa absorção pode ser realizada por um sistema de transporte específico ou por difusão através da membrana celular. Uma segunda etapa é constituída por reações anabólicas e catabólicas, responsáveis pela produção de hidróxi-acil coenzima-A, que são substratos para a PHA sintase. Na terceira etapa, ocorre a biossíntese do PHA, na qual as PHA sintases usam os hidróxi-acil coenzima-A como substratos e catalisam a formação da ligação éster do polímero, simultaneamente há liberação da coenzima-A (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

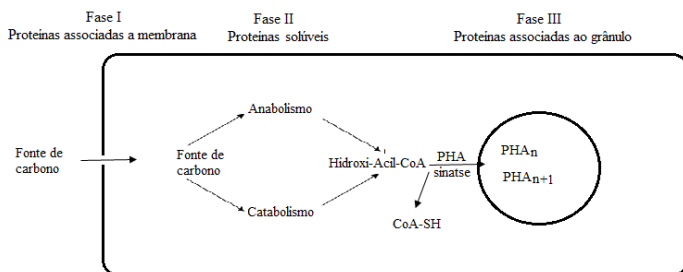


Figura 2 Esquema simplificado da biossíntese dos PHAs.

Fonte: Steinbüchel; Valentin, (1995).

3.4.1 Biossíntese de PHB

Dentre as vias de biossíntese de PHAs, a mais estudada e conhecida é a via de biossíntese de PHB por *C. necator* (anteriormente *Ralstonia eutropha*). Para esta bactéria, as rotas metabólicas, enzimas e genes envolvidos na biossíntese do biopolímero já foram bem caracterizados e definidos, sendo considerado hoje o organismo modelo para o estudo do metabolismo do PHB e outros PHAs de cadeia curta (ANDERSON; DAWES, 1990; POVOLO et al., 2010).

Em *C. necator*, o processo de síntese de PHB, a partir da acetil-CoA, envolve uma sequência de três reações catalisadas, respectivamente, pelas enzimas β -cetotiolase (PhbA), acetoacetyl-CoA redutase NADPH-dependente (PhbB) e PHA sintase. Nesta bactéria, os genes codificadores das três enzimas, *phbA*, *phbB* e *phbC*, encontram-se agrupados em um operon, ou seja, os três genes são contíguos e sob um

único controle de expressão, de tal modo que nos isolados nativos de *C. necator*, ou ocorre a expressão simultânea dos três genes, ou de nenhum deles (REHM, 2003; STUBBE; TIAN, 2003; SURIYAMONGKOL et al., 2007).

Na Figura 3 está esquematizada a estrutura do operon de biossíntese de PHB de *C. necator*, bem como as enzimas codificadas pelo operon e as reações por elas catalisadas (MADISON; HUISMAN, 1999; REHM; STEINBUCHER, 1999).

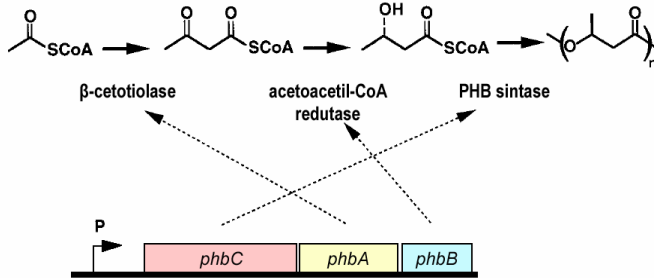


Figura 3 Ilustração esquemática do operon da biossíntese de PHB de *C. necator*.
Fonte: Madison; Huisman (1999).

Embora, em todos os organismos estudados, a expressão de pelo menos estas três enzimas seja necessária para a biossíntese de PHAs, a estrutura e disposição dos genes ao longo do genoma diferem entre estes. Em *C. violaceum*, por exemplo, os genes *phaC* e *phaA* codificadores da PHA sintase e β -cetotilase, respectivamente, encontram-se contíguos em um agrupamento gênico, enquanto que o gene *phaB*, codificador da acetoacil-CoA redutase ocorre em local distante destes dois primeiros. Sendo assim, em *C. violaceum*, os genes estruturais de biossíntese de PHA não compõem um operon (STEINBÜCHEL et al., 1993; STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995).

3.4.2 Biossíntese de P(3HB-co-3HV)

Embora existam isolados bacterianos capazes de sintetizar P(3HB-co-3HV) a partir de carboidratos (MATSUMOTO et al., 2011), essas bactérias apresentam baixa eficiência de produção. Assim, processos de produção do copolímero economicamente viáveis são conseguidos apenas com o uso de precursores de unidades de valerato, como ácido propiônico. O copolímero constituído de unidades de 3-hidroxibutirato (3-HB) e 3-hidroxivalerato (3-HV) é sintetizado a partir dos substratos: acetil-CoA e propionil-CoA (MATSUMOTO et al., 2011).

A Figura 4 apresenta o processo de síntese de P(3HB-co-3HV), a partir de glicose e propionato.

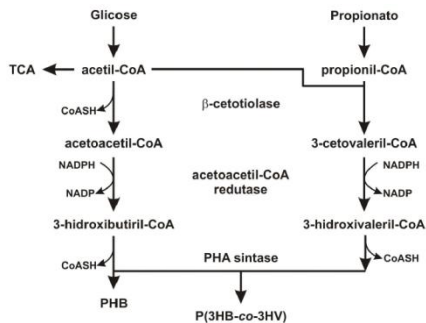


Figura 4 Processo de síntese de P(3HB-co-3HV).

Fonte: Doi et al., (1988).

A produção de P(3HB-co-3HV) por *C. necator* requer a presença de co-substratos como propionato ou valerato ou outros que possam dar origem a estes precursores das unidades de 3-HV (CHOI; LEE, 1999)

A primeira etapa da via corresponde à condensação de duas moléculas de acetil-CoA ou de uma molécula de acetil-CoA com uma de propionil-CoA, numa reação catalisada pela enzima β -cetotiolase. Os produtos da reação são os compostos acetoacetil-CoA e cetovaleril-CoA, os quais são reduzidos pela acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente a 3-hidroxiacetil-CoA e hidroxivaleril-CoA, respectivamente. Esses compostos são incorporados na cadeia polimérica pela PHA sintase ou PHA polimerase (ALDOR et al., 2002).

Araujo (2005) avaliou a produção de P(3HB-co-3HV) através de *E. coli* contendo o plasmídeo pBHR68, que hospeda o operon de síntese de PHA de *C. necator* e pela adição de ácido propiônico 0,74 g.L⁻¹ produzindo 0,47 g.L⁻¹ do copolímero, em cultivo em frascos agitados.

3.5 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE DE PHAS

3.5.1 β -cetotiolase (*phaA*)

A enzima β -cetotiolase catalisa a primeira reação na rota de biossíntese do P(3HB). Ela é um membro da família de enzimas envolvidas na clivagem tiolítica de substratos em acil-CoA mais acetil-CoA. Essas enzimas estão presentes nos eucariotos superiores e também

nos os procariotos. As tiolases são classificadas em dois grupos, com base na especificidade pelos substratos. O primeiro grupo se caracteriza por ter uma ampla especificidade por grupos acilas contendo cadeias de 4 a 16 carbonos (C4 a C16) e tem como principal função a degradação de ácidos graxos. A segunda tiolase é considerada biossintética e tem uma faixa mais específica, apresentando maior afinidade por cadeias carbônicas de (C3 a C5) (LEE; CHOI, 2001).

3.5.2 Acetil CoA redutase (*phaB*)

O segundo passo na rota de produção do P(3HB) é a redução da acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, pela ação da enzima acetoacetil-CoA redutase dependente de NADPH (STEINBÜCHEL et al., 1993). Dois tipos de acetoacetil-CoA redutases, possuindo diferentes especificidades a substratos e coenzimas, foram encontrados em *C. necator*. O fator crítico determinante da atividade de enzima é a razão de NADPH/NADP⁺ na célula. Quando esta razão é alta, a atividade da enzima é aumentada (LEE, 1996). Verificou-se que a taxa de síntese em *C. necator*, crescida em diferentes substratos, é estritamente dependente da concentração de NADPH na célula (VOLOVA et al., 2004).

3.5.3 PHA Sintase (*phaC*)

A PHA sintase é considerada a enzima chave para o acúmulo de PHA, pois catalisa a polimerização de (*R*)-3-hidroxiacil-CoA à cadeia de PHA em crescimento, com a liberação de coenzima A. A identificação de novos genes codificadores da PHA sintase tem sido incrementada com o sequenciamento de um número cada vez maior de genomas bacterianos. Recentemente, uma sequência de nucleotídeos de pelo menos 88 genes de PHA sintases foi obtida (GRAGE et al., 2009).

De acordo com as estruturas primárias, o número de subunidades e a especificidade pelo substrato, as PHA sintases foram classificadas em quatro grupos, mostrados na Tabela 3. As PHA sintases da classe I utilizam (*R*)-3-hidroxiácidos de 3 a 5 átomos de carbono como substrato e o PHA produzido é do tipo PHA_{SCL}, enquanto que, PHA sintases da classe II utilizam (*R*)-3-hidroxiácidos de 6-14 átomos de carbono e sintetizam PHA_{MCL}. PHA sintases da classe III são compostas por 22 subunidades PhaC, similar às subunidades da classe I e II e PhaE. PHA sintases da classe IV, encontra-se constituída por duas subunidades, PhaC e outra PhaR. Os PHAs sintetizados pelas PHA sintases III e IV são PHA_{SCL} (REHM, 2003).

Tabela 3 Classificação de PHA sintases.

Classe	Subunidades	Espécies	Substrato
I	PhaC ~60-73 kDa	<i>Ralstonia eutropha</i>	3HA _{SCL} -CoA (~ C ₃ a C ₅)
			4HA _{SCL} -CoA
			5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	PhaC ~60-65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~ ≥ C ₅)
III	PhaC – PhaE ~40-kDa ~40kDa	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{SCL} -CoA
			3HA _{MCL} -CoA (~ C ₆ -C ₈)
			4HA-CoA, 5HA-CoA
IV	PhaC – PhaR ~40kDa ~22kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Determinadas condições experimentais podem ser manipuladas na síntese biológica do PHA para resultar em polímeros de interesse. Uma dessas condições é a escolha de PHA sintase de um determinado micro-organismo (STEINBÜCHEL et al., 1993).

A expressão da enzima PHA sintase de *C. violaceum* foi estudada por Kolibachuk (1999). Os autores verificaram a expressão da PHA sintase em *C. necator* e *Klebsiella aerogenes*, não conseguindo verificar esta expressão em outros dois isolados de *E. coli* e *P. putida*.

Piemolini (2004) conseguiu expressar em *E.coli*. Essa construção ainda levou os outros dois genes de produção de PHA de *C. necator*, alcançando um acúmulo de 1,48 % (g de PHA/g de MCS).

Bressam (2005) clonou a PHA sintase de *C. violaceum*, através de uma construção diferente da realizada por Kolibachuk (1999), tendo expressado a *phaC* sintase de *C. violaceum* em *E. coli*, juntamente com os outros genes de biossíntese de PHA de *C. necator* (*phaA* e *phaB*), obtendo 42,6 % (gPHB/gMCS) de acúmulo de PHB.

3.6 ESTRUTURA DOS GRÂNULOS DE PHAS

Os PHAs são acumulados por micro-organismos, sob a forma de grânulos no citoplasma celular como reserva de carbono, energia e poder redutor. Estas inclusões são geralmente esféricas, com diâmetros médios de 0,2-0,5 µm, visíveis em microscópio óptico por contraste de fase, devido à sua alta refratividade (KIM; LENZ, 2001).

O grânulo encontra-se envolto por uma monocamada de 2 nm de espessura, constituída por 0,5 % de fosfolipídios. Esta camada pode ter a função de proteção, evitando o contato com a água, o que poderia levar o polímero da forma amorfa para a cristalina. Nesta camada

fosfolipídica, encontram-se proteínas catabólicas e não-catabólicas, que correspondem a apenas 2 % (g/g) da massa do grânulo e estão associadas estruturalmente a ele (JURASEK; MARCHESSAULT, 2004).

Em *C. necator* foram descritas quatro classes de proteínas, compondo os grânulos: a classe I compreende as PHA sintases, a classe II compreende as PHA despolimerases intracelulares, que são as enzimas responsáveis pela mobilização intracelular dos PHAs, a classe III é composta pelas proteínas não catabólicas denominadas PHAsinas, que podem constituir cerca de 5 % (g/g) do total de proteínas presentes no grânulo (DENNIS et al., 2008) Estas proteínas agem como uma barreira entre o citoplasma celular e o polímero, evitando sua interação com outros componentes celulares (De ALMEIDA et al., 2007). As PHAsinas parecem controlar o tamanho dos grânulos, podendo participar na regulação da síntese e degradação (POTTER et al., 2002; KUCHTA et al., 2007).

A classe IV engloba todas as outras proteínas associadas ao grânulo, como as proteínas regulatórias (RODRIGUES; VICENTE; STEINBUHEL, 2000). A Figura 5 apresenta a organização das proteínas envolvidas na biossíntese dos PHAs.

A investigação do metabolismo de produção de PHA, durante as duas últimas décadas, levou a um aumento considerável na compreensão da função de proteínas individuais, tais como PHA sintases, PHAsinas, PhaR ou PHA depolimerases (JENDROSSEK, 2009). No entanto, o início da síntese de PHA e montagem de grânulos PHA não são completamente compreendidos. Alguns estudos mostraram que a dimerização de duas subunidades de PHB sintase é necessária, durante o processo de iniciação de formação de PHB *in vitro* (JIA et al., 2001; STUBBE et al., 2005; SATO et al., 2008).

As vantagens de estudos *in vitro* para investigação de eventos moleculares que ocorrem durante a catálise enzimática, sobre o início da formação de grânulos de PHA também são necessários para a compreensão da montagem de grânulos de PHA. Dois modelos de formação de grânulos de PHA têm sido propostos, o modelo de micela e o de brotamento (STUBBE e TIAN, 2003).

consideravelmente dependendo do isolado bacteriana e também das condições de cultivo. Na maioria das vezes, 8 a 12 grânulos variando entre 0,2 a 0,5 μm de diâmetro, são encontrados intracelularmente, podendo, em bactérias constituir o volume praticamente total da célula (ANDERSON; DAWES, 1990; GERNGROSS; MARTIN, 1995; YORK, et al, 2001).

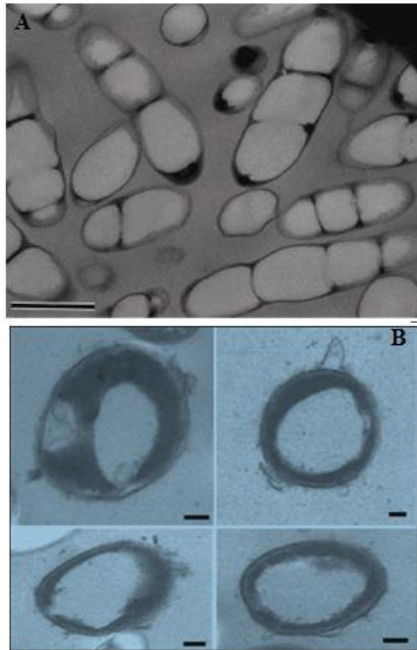


Figura 6 Micrografia eletrônica de Transmissão de corte fino de células de *C. necator* (*R. eutropha*). (A) e de *E. coli* XL1-Blue (B).

Fonte: Sudesh et al., (2000).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Micro-organismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica (BQA) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As análises de microscopia foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME, da UFSC.

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS E PLASMÍDEOS

As características relevantes dos isolados de *E. coli* usados neste estudo são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Isolados bacterianos e suas características relevantes.

Isolados bacterianas	Características relevantes
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Expressão constitutiva do repressor LacI normal
<i>Escherichia coli</i> JM101	<i>thi-1</i> ; expressão aumentada do repressor LacI
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Expressão constitutiva do repressor LacI normal

Os isolados de *E. coli* selvagem foram armazenadas em glicerol (20 % V/V) a -80 °C, e à temperatura ambiente em meio Luria Bertani (LB).

As características relevantes dos plasmídeos empregados neste estudo são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 Plasmídeos e suas características relevantes.

Plasmídeos	Tamanho	Características relevantes
pBHR68	8,6 kb	Hospeda os genes <i>Amp^r</i> e <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>C.necator</i>
pRLC2	7,3 kb	Plasmídeo desenvolvido por Bressan, 2007, contendo o gene <i>phaC</i> de <i>C. violaceum</i> a montante dos genes <i>phaA</i> e <i>phaB</i> de <i>C. necator</i> , todos sob regulação do promotor Lac.

4.2 MEIOS E SOLUÇÕES

4.2.1 Meio Lúria Bertani (LB)

Para o preparo do inóculo, preparo de células competentes, estocagem dos isolados de *E. coli* e realização de alguns experimentos, foi utilizado o meio (LB), conforme descrito por Bertani (1951). O meio LB é constituído de 10 g.L⁻¹ de triptona, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 5

g.L^{-1} NaCl, acrescentando-se 15 g.L^{-1} de Agar para obtenção do meio sólido.

4.2.2 Meio mineral

Os meios utilizados na produção de PHA estão listados nas Tabelas 6 e 7. A Tabela 6 apresenta a composição do meio mineral (MM) descrito por Lee et al., (2008).

Tabela 6 Composição do meio Mineral M1.

Componentes	Quantidade/Litro
KH_2PO_4	6,67 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4,00 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,80 g
Ácido cítrico	0,80 g
Oligoelementos	0,5 mL

E a Tabela 7 apresenta o meio mineral (M2) descrito por Nikerel (2006).

Tabela 7 Composição do meio mineral M2.

Componentes	Quantidade/Litro
KH_2PO_4	20 g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	6,6 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,2 g
Ácido cítrico	1,7 g
Oligoelementos	0,5 mL

A solução de oligoelementos continha por Litro: 5 mol de HCl, 10 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g de CaCl_2 , 2,2 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,02 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$.

4.2.3 Preparo do soro de queijo

O soro de queijo utilizado nos estudos de produção de PHA foi gentilmente cedido pelo Instituto Federal Catarinense, Campus de Camboriú e, armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, até uso. O soro de queijo foi descongelado à temperatura ambiente e autoclavado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Após, o soro de queijo permaneceu em repouso, sob refrigeração, por 18 horas. Após este período, o soro de queijo foi filtrado em gaze estéril e o pH ajustado para 7,0 em condições assépticas, utilizando NaOH 10 mol.L^{-1} e armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até sua utilização. As análises foram realizadas no IFC-Camboriú e a composição centesimal do soro de queijo está apresentada na Tabela 8.

Tabela 8 Composição centesimal média do soro de queijo.

Componentes	% m/v
Sólidos Totais	5,50 ($\pm 0,23$)
Umidade	94,50 ($\pm 0,23$)
Proteínas	0,80 ($\pm 0,06$)
Gordura	1,01 ($\pm 0,03$)
Lactose	4,15 ($\pm 0,12$)

4.2.4 Preparação da solução de glicose e lactose

As soluções estoque de glicose ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e lactose ($200 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) foram preparadas e esterilizadas separadamente em autoclave (121°C por 15 minutos), a fim de se evitar a sua decomposição térmica catalisada pelos sais do meio. Após esterilização, as soluções foram armazenadas a 4°C .

4.2.5 Preparação da solução de ácido propiônico

A solução estoque de ácido propiônico ($1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) foi preparada, pela adição de 14,96 mL de ácido propiônico em 200 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. O ácido propiônico foi adicionado aos meios de cultivo quando necessário, em concentrações variadas.

4.2.6 Preparação da solução de ampicilina

A solução estoque de ampicilina ($100 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi preparada para seleção e cultivo da *E. coli* recombinante. O antibiótico foi dissolvido em água ultra pura previamente esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos. A solução foi filtrada em sistema Millipore em membrana de porosidade $0,22 \mu\text{m}$ sob condições assépticas e estocadas a -20°C . Esta solução foi adicionada aos meios de cultivo no preparo do pré-inóculo, inóculo e na produção de PHA.

4.2.7 Preparo da solução de IPTG

A solução estoque de IPTG $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ foi preparada a partir da adição de 2 mL de água ultra pura em 0,95 g de IPTG, agitado até completa dissolução. A solução foi filtrada em sistema Millipore em membrana de porosidade $0,22 \mu\text{m}$, sob condições assépticas e estocada a -20°C .

4.3 OBTENÇÃO DA BACTÉRIA RECOMBINANTE.

Para avaliar a produção de PHA, cada um dos isolados de *E. coli* recombinante, seguiram os procedimentos, de obtenção da bactéria

recombinante, conforme ilustrado na Figura 7, para inserção de um dos plasmídeos pRLC2 ou pBHR68.

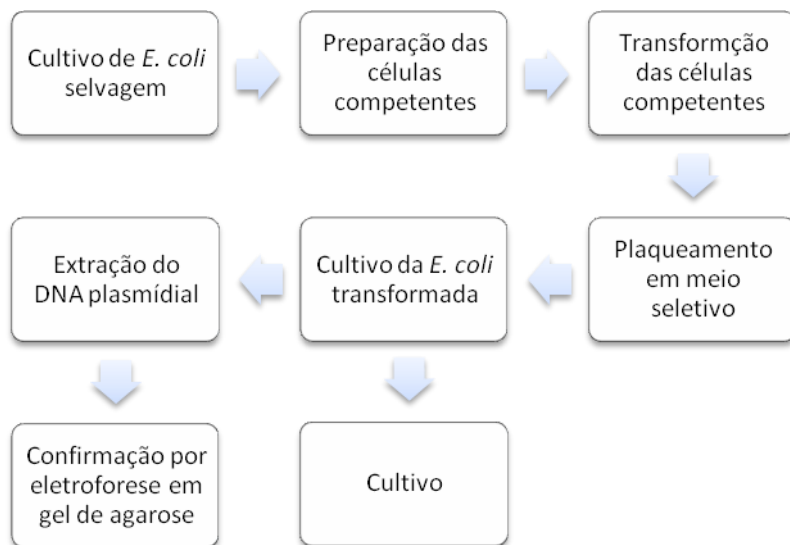


Figura 7 Fluxograma de obtenção da bactéria recombinante.

4.3.1 Preparação das células competentes

Para a introdução dos plasmídeos utilizados neste estudo para o preparo de isolados de *E. coli* recombinante foi utilizada a mesma metodologia – uma primeira etapa de preparo de células competentes e uma segunda de transformação. As células competentes de cada isolado foram preparadas para a transformação, utilizando um método baseado na permeabilização da membrana por solução de cloreto de cálcio (HANAHAN, 1983). Para tanto, uma alíquota de 50 μL da suspensão estoque de *E. coli* foi transferida para o meio LB líquido e cultivada por aproximadamente 3 horas a 37° C. A bactéria foi inoculada em estrias em meio agar-LB, sendo incubada por aproximadamente 18 horas, até o aparecimento de colônias isoladas. Com o auxílio de um palito de madeira estéril, foi transferida uma única colônia isolada da bactéria para um tubo contendo 5 mL de meio LB, que foi cultivado até a absorbância aproximada de 0,6 (ABS_{600}). Um mililitro do caldo de cultivo foi transferido para 2 tubos de 2 mL estéreis, sendo os mesmos centrifugados a 4000 rpm e 4 °C por 1 minuto. O meio sobrenadante foi

descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL de CaCl_2 0,1 mol.L⁻¹ previamente resfriado, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições e novamente ressuspensionado em 0,1 mL de CaCl_2 0,1 mol.L⁻¹ previamente resfriado.

4.3.2 Transformação das células competentes

Transformação de células competentes é o processo de introdução de vetor (plasmídeo) que carregue um gene de interesse estranho a estas células. Neste estudo, a transformação ou introdução de um dos dois plasmídeos estudados, pBHR68 ou pRLC2, foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sambrook et al., (1989). Para isto, transferiu-se 200 µL de suspensão de células competentes para microtubos de 1 mL, aos quais foram adicionados 5µL da solução de DNA plasmídeo (aproximadamente 10 pmol. µL⁻¹). Após homogeneização, o tubo foi incubado em banho de gelo por 30 minutos e em seguida em banho termostatizado a 42 °C por 45 segundos. Resfriou-se a mistura em banho de gelo por 5 minutos e adicionou-se 800 µL de meio de cultura LB fresco. Incubou-se a solução a 37 °C, sob agitação de 150 rpm, durante 1 hora, para recuperação das células. Após este período, a suspensão celular foi centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensionado em 100 µL de meio de cultura LB e 50 µL foi transferido e espalhado em 2 placas de Petri, contendo agar LB e ampicilina (100 µg·mL⁻¹). A adição de ampicilina ao meio tem a função de selecionar as células transformadas, ou seja, as que carregam o plasmídeo, uma vez que este contém um gene que expressa uma enzima capaz de hidrolisar o antibiótico, conferindo resistência apenas às células transformadas. As placas foram incubadas a temperatura de 37 °C por 24 horas, ou até o aparecimento de colônias isoladas.

4.3.3 Cultivo da *E. coli* transformada (ou recombinante)

Para confirmar se a transformação foi eficiente, uma colônia isolada da placa foi transferida a partir de um palito estéril para um frasco contendo meio LB líquido e ampicilina (100 µg·mL⁻¹). Este frasco foi cultivado por 18 horas em agitador orbital a 37 °C e agitação de 200 rpm, até o aparente crescimento de bactérias.

4.3.4 Extração do DNA plasmídeo

O DNA plasmídeo foi extraído de acordo com o protocolo do *Kit Ultraclean* (MO BIO). Dois mililitros do caldo cultivado, realizado conforme descrito no item 4.3.3, foram centrifugados por 1 minuto a

10.000 rpm, à temperatura ambiente. A massa celular foi ressuspensa nos tampões adequados (fornecido pelo Kit), a fim de ocorrer o rompimento das células, o DNA genômico foi eliminado, obtendo o DNA plasmideal. O produto da extração foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.5 Eletroforese em gel de agarose

Para verificação da presença do DNA plasmideal no produto extraído, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Azul de bromofenol foi utilizado como referência para acompanhamento da migração da amostra no gel. Para visualização das bandas de DNA, o gel foi imerso por 20 minutos em solução de brometo de etídio a $0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) e posteriormente observado em transluminador com lâmpada de luz UV.

4.4 PRODUÇÃO DE PHA POR DIFERENTES ISOLADOS DE *E. COLI* RECOMBINANTE.

Os ensaios realizados com *E. coli* recombinante seguiram uma série de experimentos para avaliar a produção de PHA. As etapas de produção estão apresentadas na Figura 8. Onde cada um dos isolados passou pelo processo de transformação, para obtenção da bactéria recombinante. O procedimento de transformação para obtenção da bactéria recombinante foi realizado anteriormente a cada experimento.

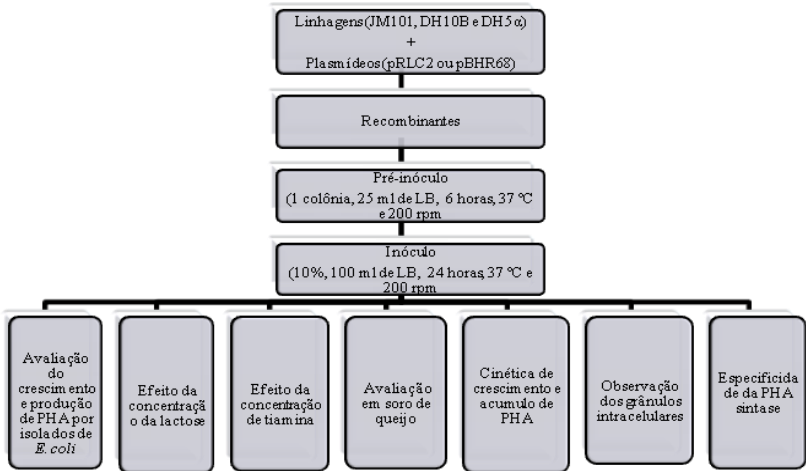


Figura 8 Fluxograma dos ensaios realizados no estudo.

4.4.1 Preparo do pré-inóculo e inóculo

O pré-inóculo utilizado em cada um dos cultivos foi preparado da seguinte maneira: a partir de uma colônia da placa contendo meio seletivo, transferida para um frasco com capacidade volumétrica de 125 mL, contendo 20 mL de meio LB mais ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta cultura foi incubada por 6 horas em incubadora com agitação orbital, a 37°C e agitação de 120 rpm.

Para o preparo do inóculo, o pré-inóculo foi transferido para um frasco com capacidade volumétrica de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo LB, ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e glicose ($20 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), lactose ($20 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Em todos os ensaios em que os isolados JM101 e DH10B recombinantes foram utilizados, adicionou-se ao inóculo e aos meios de cultivo o indutor da expressão do operon Lac isopropyl-D-tiogalactopiranosídeo –IPTG– (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) na concentração de $0,5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de. O inóculo foi incubado por 18 horas, nas mesmas condições descritas no preparo do pré-inóculo. O inóculo foi adicionado ao meio de cultivo na concentração de 10 % (v/v) do volume total de meio de cultivo.

4.4.2 Ensaios para a avaliação e acompanhamento do crescimento e produção de PHAs pelos isolados de *E. coli* recombinantes

Todos os ensaios para avaliação do crescimento e produção de PHAs foram realizados em triplicatas, em frascos erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultivo, sob agitação a 200 rpm a 37 °C, por 24 horas. Os meios de cultivo utilizados são os descritos em cada ensaio e todos com a adição de ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O pH inicial dos meios de cultivo foi ajustado para 7,2 com NaOH 3 mol.L^{-1} exceto para o isolado JM101. Nos ensaios de acompanhamento da cinética de crescimento, a cada 1 hora, 3 frascos de sacrifício foram coletados e o caldo de cultivo centrifugado a 5000 rpm, 10 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi seco em estufa a 50 °C, até peso constante e pesado para determinação da MCS e PHA acumulado. O pH do sobrenadante foi medido para a determinação do pH final.

4.4.3 Estudo do efeito da concentração de lactose sobre a produção de PHA por *E. coli* JM101/pBHR68

Para avaliar efeito da concentração de lactose sobre a produção de PHA e MCS pelo recombinante JM101 hospedando o plasmídeo pBHR68 (JM101/pBHR68), utilizou-se o meio mineral (Tabela 7), contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. As concentrações de lactose utilizadas no estudo foram 5, 10, 20, 30, e 40 g.L^{-1} . O cultivo foi realizado em agitador orbital a 37 °C e agitação de 200 rpm por 24 horas.

4.4.4 Estudo do efeito da concentração de tiamina sobre a produção de PHA por *E. coli* JM101/pBHR68

Para avaliar efeito da concentração de tiamina sobre o crescimento e a produção de PHA pelo recombinante JM101 (dependente de tiamina) hospedando o plasmídeo pBHR68, utilizou-se meio mineral (MR) (Tabela 6), contendo ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), lactose (20 g.L^{-1}) e $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. As concentrações de tiamina estudadas foram 0,04, 0,08, 0,12 e $0,16 \text{ g.L}^{-1}$. O cultivo foi realizado em agitador orbital a 37 °C e agitação de 200 rpm por 24 horas.

Após este período, os frascos foram coletados e os caldos de cultivo centrifugados (5000 rpm, 30 minutos a 4 °C) e o sedimento celular foi utilizado para determinação de crescimento celular (MCS) e a produção de PHB. O sobrenadante foi utilizado, para a determinação da concentração de lactose residual.

4.4.5 Avaliação do crescimento e da produção de PHA por isolados de *E. coli* recombinante a partir de soro de queijo.

A avaliação da produção de PHA a partir de soro de queijo foi realizada para os isolados de *E. coli* recombinantes (JM101, DH5 α e DH10B) contendo um dos plasmídeos (pBHR68 ou pRLC2). Nestes experimentos, o inóculo foi cultivado com 20 g.L⁻¹ de glicose, sendo este, centrifugado (5000 rpm por 20 minutos) em condições estéreis e ressuspensão no soro de queijo em frascos com capacidade volumétrica de 125 mL contendo 30 mL de soro de queijo. Ao soro de queijo foi adicionado ampicilina (100 μ g.ml⁻¹) e apenas para os meios de cultivo dos isolados JM101 e DH10B, adicionou-se de IPTG (0,5 mmol.L⁻¹). O estudo foi realizado em agitador orbital a 37 °C e agitação de 200 rpm por 24 horas.

Após 24 horas de cultivo, os frascos foram coletados e os caldos de cultivo centrifugados (5000 rpm, 30 minutos a 4 °C) e o sedimento celular foi utilizado para determinação de crescimento celular (MCS) e a produção de PHB.

4.4.6 Estudo dos efeitos de soro de queijo, ácido propiônico, glicose e IPTG sobre o crescimento e produção de PHA por *E. coli* (DH5 α /pRLC2)

Visando avaliar a influência de soro de queijo, ácido propiônico, glicose e IPTG sobre o crescimento e produção de PHA por *E. coli* (DH5 α /pRLC2), aplicou-se a metodologia hospeda de planejamento experimental, denominado de Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR 2³). O DCCR 2³ foi constituído de uma matriz experimental composta por quatro variáveis independentes, sendo três quantitativas (concentrações de soro de queijo, glicose e ácido propiônico) e uma qualitativa (presença ou ausência de IPTG). Os níveis codificados e reais das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 Níveis das variáveis estudadas no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Níveis	Glicose (g.L ⁻¹)	Soro de queijo (%)	Ac. Propiônico (g.L ⁻¹)	IPTG
-1, 6818	0	0	0	
-1	4	15	0,148	Sem IPTG (-1)
0	10	37	0,37	
+1	16	59	0,593	Com IPTG (+1)
+1, 6818	20	74	0,74	

A adição de pontos axiais em um delineamento desta natureza permite a análise das interações entre as variáveis, neste caso, com dois níveis (máximo e mínimo), seis réplicas de pontos centrais e seis pontos axiais. A presença de três variáveis quantitativas independentes permitiu que os pontos axiais da matriz experimental fossem codificados na ordem de $\pm 1,6818$, conforme sugerido por Montgomery, (1996) e Rodrigues, (2005).

A presença da variável qualitativa (IPTG) no delineamento experimental, chamada por Montgomery (1995) de variável “dummy”, sugere uma matriz com 20 ensaios experimentais.

Para estes ensaios, o inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.4.1. Os 20 ensaios experimentais foram realizados em frascos com capacidade volumétrica de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultivo. Ao meio Mineral como descrito por Lee et al., (2008), (Tabela 6), com adição de ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). O estudo foi realizado em agitador orbital a 37°C e agitação de 200 rpm por 24 horas.

Após o final do cultivo, um volume de 15 mL do caldo de cultivo foi centrifugado (5000 rpm, 30 minutos a 4°C), para determinação da MCS e produção de PHA. O sobrenadante foi mantido a -20°C , para a determinação de açúcares redutores (glicose e lactose - contida no soro de queijo).

4.4.7 Avaliação da cinética de crescimento e acúmulo de PHAs por *E. coli* (DH5 α /pRLC2).

Este estudo foi realizado em duplicata, em meio mineral M2 (Tabela 7), contendo ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 37 % (v/v) de soro de queijo, preparado conforme descrito no item 4.2.3 e concentrações variáveis de glicose e ácido propiônico, conforme mostra a Tabela 10.

Tabela 10 Condições dos cultivos realizados para *E. coli* DH5 α /pRLC2.

Ensaio	Condições experimentais
1	$20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e $0,148 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido propiônico.
2	$4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e $0,74 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido propiônico.
3	$4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose e $0,148 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ácido propiônico.

O cultivo foi acompanhado por 24 horas, sendo retirados dois frascos a cada duas horas. Após coletadas, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 30 minutos a 4°C). O sedimento celular foi utilizado para determinação da MCS e PHA e o sobrenadante para a determinação do pH e concentração de lactose e glicose.

4.4.8 Avaliação da especificidade da PHA sintase de *C. violaceum* por unidades de valerato

Para testar a especificidade da PHA sintase de *C. violaceum* por unidades de valerato, utilizou-se o isolado *E. coli* recombinantes DH5 α , hospedando um dos plasmídeo pRLC2 ou pBHR68. O estudo foi realizado em triplicata em frascos com capacidade volumétrica de 125 mL contendo 25 mL de meio LB, contendo glicose (20 g.L⁻¹), ampicilina (100 μ g.mL⁻¹) e, para os isolados JM101 e DH10B, IPTG (0,5 mmol.L⁻¹). Ácido propiônico, na concentração de 0,74 g.L⁻¹, foi utilizado para avaliar a incorporação de valerato. Os cultivos foram realizados por 24 horas a 37 °C sob agitação de 120 rpm. Ao final do cultivo, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 30 minutos a 4 °C) e o sedimento celular foi utilizado para determinação de MCS e produção de P(HB-co-HV), enquanto no sobrenadante foram determinados pH final do caldo de cultivo e a concentração de glicose residual.

4.4.9 Observação dos grânulos intracelulares acumulados pela *E. coli* DH5 α /pRLC2 por TEM

Para observar a formação dos grânulos intracelulares produzidos por *E. coli* DH5 α hospedando o plasmídeo pRLC2, a bactéria foi em frascos com capacidade volumétrica de 125 mL, contendo 20 mL de meio de LB, ampicilina (100 μ g.mL⁻¹) e glicose (20 g.L⁻¹). Após cultivo por 24 horas, em agitador orbital, a 37 °C e agitação de 200 rpm, 2 mL do caldo de cultivo foi recolhido, centrifugado e preparado segundo o protocolo descrito item 0 para a visualização por Microscopia eletrônica de transmissão (TEM).

4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

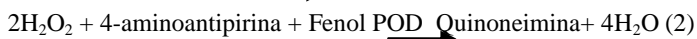
4.5.1 Determinação da massa celular seca (MCS)

A quantificação da massa celular seca (MCS) foi realizada através de método gravimétrico. Um mililitro de caldo de cultivo foi transferido para microtubos previamente pesados, centrifugado a 5000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e a biomassa decantada foi ressuspensa com água destilada. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos. Após descarte do sobrenadante, os tubos foram incubados em estufa a 50 °C, até peso constante.

4.5.2 Determinação da concentração de açúcares

4.5.2.1 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose residual foi determinada pelo kit de determinação de glicose Gold Analisa que utiliza o método enzimático-colorimétrico. O fundamento do método consiste no fato de a glicose oxidase (GOD) catalisar a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio (Equação 1). Através de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor vermelha (quimoneimina) (Equação 2), cuja absorvância medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.



O procedimento adotado para a determinação de glicose é apresentado na Tabela 11.

Tabela 11 Procedimento de determinação de glicose pelo kit Gold Analisa.

Tubos	Branco	Teste	Padrão
Amostra	-----	10 µL	-----
Padrão (1)	-----	-----	10 µL
Reagente de cor (2)	1000 µL	1000 µL	1000 µL

Para a análise, 10 µL da amostra previamente diluída, de maneira a atingir concentração na faixa do padrão utilizado, foram adicionadas ao reagente de cor e incubada por 5 minutos a 37 °C. Procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (Helo DB-20) a 500 nm.

4.5.2.2 Determinação de açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais foi determinada pelo método 3,5-DNS descrito por Muller (1959). Para a determinação da concentração de açúcares redutores totais, foi preparada uma curva padrão de glicose nas concentrações de 0,05 a 0,4 g.L⁻¹ de glicose. Para a análise, adicionou-se 1,5 mL de uma amostra já diluída em um tubo de ensaio onde foram adicionados 1,5 mL de solução de DNS. Os tubos foram aquecidos a 100 °C por 15 minutos. Após adição de 0,5 mL de uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio (Apêndice A), os tubos foram submetidos a um banho de gelo. Após a estabilização da

temperatura realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 575 nm.

4.5.2.3 Determinação da concentração de lactose

A concentração de lactose residual presente nas amostras foi determinada pelo método de DNS, descrito por Muller (1959).

4.5.3 Determinação do PHA

A produção de PHA foi avaliada por cromatografia gasosa. As amostras foram submetidas ao processo de metanólise prévia seguindo a metodologia descrita por Brandl (1988). À MCS foi adicionada 1 mL de uma solução de metanol acidificado (Apêndice) e 1 mL de clorofórmio. Esta mistura foi aquecida em banho termostaticado a 100 °C durante 3 horas e 30 minutos, sendo agitada durante 30 segundos após duas horas de aquecimento. Ao final do processo de aquecimento as amostras foram resfriadas em banho de gelo e, adicionado 0,5 mL de água destilada, agitando cada amostra por 30 segundos, e após deixando separar as fases. A fase inferior (orgânica) foi recolhida com auxílio de uma micropipeta e levada para análise em cromatógrafo gasoso (Shimadzu 2014), equipado com coluna empacotada Restek - Rtx-Stabilwax Silcoport W 110/120 com 1,83 m de comprimento e 2 mm de diâmetro. Nitrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 20 mL/minutos. A análise foi realizada utilizando um protocolo, onde se estabeleceu uma rampa de temperatura, iniciando com 140 °C, aumentando a temperatura a uma velocidade de 2 °C/minutos até 160 °C, e por fim, 40 °C/minutos até 240 °C, permanecendo por 2 minutos. A temperatura utilizada para o injetor e o detector foram de 250 °C e 270 °C, respectivamente. Utilizou-se ácido benzóico 0,4 g.L⁻¹ como padrão interno. A curva de calibração foi construída utilizando como padrão poli (ácido 3-hidroxibutírico-co-3-hidroxivalérico) 88 mol % HB e 12 mol % HV (Aldrich Chem. Co.) com massa variando de 1 a 10 mg. A curva padrão obtida está no (Apêndice B).

4.5.4 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram fixadas utilizando-se uma solução de paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1 mol.L⁻¹, a pH 7,2, por 24 horas. A fixação foi seguida por 3 lavagens, de 20 minutos cada, no mesmo tampão. Em seguida, o material foi transferido para microtubos de 1 ml, onde foi centrifugado por 20 minutos (5000 rpm), sendo o precipitado resultante incluído em solução de agarose (3 %). Logo depois, o material incluído em agarose

foi pós fixado em tetróxido de ósmio (OsO_4), a 1 %, em tampão cacodilato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, a pH 7,2, por 5 horas a temperatura ambiente. O material foi lavado novamente em tampão cacodilato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, a pH 7,2, por três vezes, de 20 minutos cada, e desidratado em uma série de soluções de concentrações crescentes de acetona (30 %, 50 %, 70 %, 90 % e 100 %), por 20 minutos em cada concentração, exceto a acetona 100 %, com 2 trocas de 20 minutos cada.

Após a desidratação, o material foi infiltrado lentamente em resina *Spurr* em uma seqüência de sete etapas, com acetona 100 % + resina 3:1 (12 horas), 2:1 (12 horas), 1:1 (12 horas), 1:2 (12 horas) e 1:3 (12 horas), e 2 vezes, em resina pura, durante 12 horas cada vez. O material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70°C por 24 horas. Os cortes ultra-finos foram realizados utilizando uma navalha de diamante e contrastados em acetato de uranila a 1 % durante 10 minutos, no escuro e, logo após, em citrato de chumbo a 1 % durante 7 minutos (REYNOLDS, 1963). Os cortes ultra finos foram observados e fotografados pelo Microscópio Eletrônico de Transmissão, modelo Jeol (JEM)1011, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME, da UFSC.

4.5.5 Determinação das grandezas cinéticas

4.5.5.1 Fator de conversão substrato em massa celular seca ($Y_{\text{MCS/S}}$) e substrato em produto ($Y_{\text{PHA/S}}$)

Os fatores de conversão de substrato em MCS ($Y_{\text{MCS/S}}$) e PHA ($Y_{\text{PHA/S}}$) foram calculados pelas Equações 1 e 2.

$$Y_{\text{PHA/S}} = \frac{\text{PHA}_t - \text{PHA}_{t_0}}{S_i - S_f} \quad (3)$$

$$Y_{\text{MCS/S}} = \frac{\text{MCS}_f - \text{MCS}_i}{S_i - S_f} \quad (4)$$

Onde:

PHA_t : concentração de polímero no tempo t (g.L^{-1});

PHA_{t_0} : concentração de polímero no tempo t_0 (g.L^{-1});

S_i : concentração de substrato inicial (g.L^{-1});

S_f : concentração de substrato final (g.L^{-1});

MCS_f : concentração de massa celular seca final (g.L^{-1});

MCS_i : concentração de massa celular seca inicial (g.L^{-1})

4.5.5.2 Velocidades

As velocidades de crescimento, produção de PHA e consumo de substrato foram calculadas usando método de linearização, onde os coeficientes angulares das retas representam as velocidades

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (5)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (6)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (7)$$

4.5.6 Tratamento estatístico

Os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de significância com o auxílio do software Statistica 7.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE PHA POR DIFERENTES ISOLADOS DE *E. COLI* A PARTIR DE LACTOSE.

Com o objetivo de se avaliar o potencial de aproveitamento da lactose presente em soro de queijo, como substrato para a produção de PHA, inicialmente testou-se a capacidade de crescimento e produção de biopolímero, por três isolados de *E. coli* recombinantes, hospedando os genes responsáveis pela biossíntese de PHA. Assim, foram estudados os isolados de *E. coli* JM101, DH5 α e DH10B, cada um hospedando um dos plasmídeos pRLC2 ou pBHR68. Conforme descrito em material de métodos, ambos plasmídeos hospedam os genes codificadores da β -cetotiolase e da hidroxialcil-CoA desidrogenase dependente de NADPH de *C. necator*. Adicionalmente os plasmídeos pRLC2 e pBHR68 hospedam o gene codificador da PHA sintase de *C. violaceum* ou de *C. necator*, respectivamente. Os isolados recombinantes foram cultivados em meio LB, contendo lactose 20g.L⁻¹.

A Figura 9 apresenta o curso do crescimento celular ou produção de massa celular seca (MCS) para cada um dos isolados recombinantes. Observa-se que, embora todos os isolados hospedando qualquer um dos plasmídeos tenham crescido, o isolado JM101(pRLC2) foi o que alcançou a maior acúmulo de MCS, chegando a uma concentração celular igual a 3 g.L⁻¹, em 24 horas de cultivo. Os isolados JM101(pRLC2), DH10B(pRLC2) e DH5 α (pRLC2), neste caso, alcançaram o final da fase exponencial de crescimento em aproximadamente 10 a 12 horas de cultivo, enquanto os isolados JM101(pBHR68), DH10B(pBHR68) e DH5 α (pBHR68) cresceram mais lentamente e parecem ainda não ter alcançado a fase estacionária de crescimento, no período 24 horas. Os isolados de *E. coli* recombinante hospedando o plasmídeo pRLC2, alcançaram os maiores valores de produção de MCS durante o período de cultivo.

O pH do meio de cultura influencia grandemente o crescimento de isolados de *E. coli* e conseqüentemente a produção de PHB (AHN, 2000; BOSCO, 2010). Sendo assim, acompanhou-se também a variação do pH da cultura descrita acima. A Figura 10 mostra que ao longo das 24 horas de cultivo, o pH do meio variou de pH 7,3 (inicial) até 8,75 (ao final de 24 horas). Bosco (2010) em seus estudos utilizando soro de queijo, como substrato e lodo ativado como inóculo, obteve um acúmulo

de PHA de 6,44 % (g/gMCS), quando pH foi mantido igual a 7,0 e de 8,67 % (g/gMCS) sem o ajuste do pH inicial do meio de cultivo.

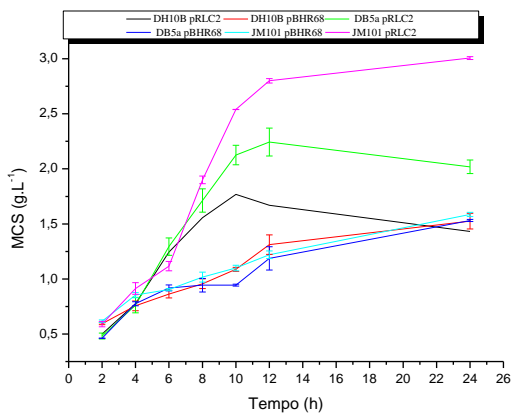


Figura 9 Curso temporal do crescimento celular (MCS) e produção de PHB, realizado com os isolados de *E. coli* JM101, DH10B e DH5 α contendo plasmídeos pRLC2 e pBHR68.

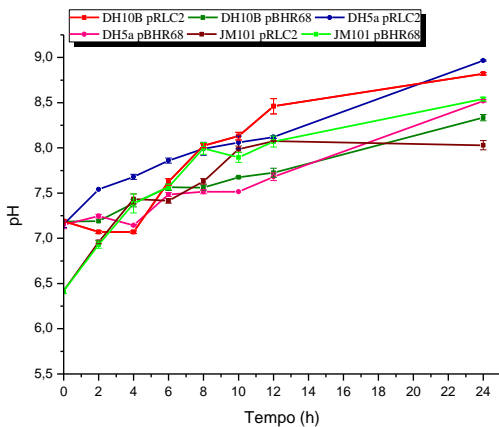


Figura 10 Acompanhamento do pH do meio durante cultivo dos isolados de *E. coli* JM101, DH10B e DH5 α contendo os plasmídeos pRLC2 e pBHR68.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de acúmulo de biomassa e PHB, ao final das 24 horas de cultivo. Observa-se que os maiores percentuais de acúmulo de PHB, na MCS ocorrem quando os isolados hospedam o plasmídeo pBHR68. Dentre os isolados estudados JM101/pBHR68 foi o que alcançou o maior acúmulo de PHB ($0,68 \text{ g.L}^{-1}$), correspondendo a 43,22 % (g.g MCS^{-1}).

Dentre os isolados de *E. coli*, contendo o plasmídeo pRLC2 (PHA sintase de *C. violaceum*), o que apresentou o maior acúmulo de PHB foi também JM101, cujos valores de MCS e acúmulo PHB foram de $3,01 \text{ g.L}^{-1}$, $0,23 \text{ g.L}^{-1}$ e 7,8 % (g PHB.gMCS^{-1}), respectivamente.

Os valores de MCS e PHAs encontrados neste estudo estão de acordo com os encontrados na literatura para outros isolados de *E. coli* recombinantes, hospedando PHAs sintases. Matsumoto (2009), por exemplo, observou a produção de PHA em *E. coli*, contendo a PHA sintase de *C. necator* e *P. aeruginosa*, obtendo em seus estudos acúmulos de 13 e 40 %, respectivamente. No presente trabalho, as maiores percentagens de acúmulo foram 7,8 e 43,22% (g/gMCS), obtidas para com os isolados JM101/pRLC2 e JM101/pBHR68 hospedando as PHA sintases de *c. violaceum* e *C. necator*, respectivamente.

Tabela 12 Produção de MCS (g.L^{-1}) e PHB (g.L^{-1}) e percentagem de acúmulo de PHA em 24 horas de cultivo para os isolados de *E. coli* recombinante.

Isolado de <i>E. coli</i>	Plasmídeo	MCS (g.L^{-1})	% PHB (g/g MCS)
DH5 α	pBHR68	1,53	$26,35 \pm 0,08$
DH5 α	pRLC2	2,24	$3,74 \pm 0,04$
DH10B	pBHR68	1,52	$27,12 \pm 0,13$
DH10B	pRLC2	1,43	$6,99 \pm 0,09$
JM101	pBHR68	1,58	$43,11 \pm 0,07$
JM101	pRLC2	3,01	$7,81 \pm 0,05$

5.2 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LACTOSE SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PHA PELO RECOMBINANTE JM101/ PBHR68.

Uma vez que o isolado recombinante JM101/pBHR68 foi o que apresentou o maior crescimento e acúmulo celular de PHB, foi avaliada a influência da variação da concentração de lactose, em meio mineral definido, sobre a produção de PHA, por este isolado.

Na Tabela 13 estão apresentados os valores obtidos para a concentração de MCS e PHA produzidos, o percentual de lactose consumida e a

conversão de substrato (lactose) em biomassa e PHB ($Y_{MCS/S}$ e $Y_{PHB/S}$, respectivamente) obtidas a partir de diferentes concentrações de lactose, ao final de 24 horas de cultivo de *E. coli* JM101(pBHR68).

A análise estatística dos dados obtidos (ANOVA) mostrou que a concentração de lactose tem efeito estatisticamente significativo sobre a produção de PHB ($p < 0,05$). Porém, tornou-se necessário utilizar o teste de Tukey para identificar quais resultados eram estatisticamente diferentes, classificando-os em três grupos distintos, identificados como a, b e c (Tabela 13).

Tabela 13 Concentração de MCS, PHA, lactose consumida, conversão de substrato (lactose) em biomassa e PHB ($Y_{MCS/S}$ e $Y_{PHB/S}$, respectivamente) obtidas em diferentes concentrações de lactose para *E. coli* JM101(pBHR68).

Lactose (g.L ⁻¹)	MCS (g.L ⁻¹)	% PHB	PHB (g.L ⁻¹)	% Consumo de lactose (g/g)	$Y_{MCS/S}$	$Y_{PHB/S}$
5	0,93±0,09 ^a	45,13	0,41±0,00 ^a	44,44±2,72	0,43	0,19
10	0,99±0,03 ^a	35,47	0,35±0,00 ^{bc}	53,90±4,72	0,18	0,07
20	0,95±0,05 ^a	36,49	0,34±0,02 ^{bc}	45,54±6,97	0,13	0,05
30	1,00±0,02 ^a	31,63	0,32±0,01 ^{bc}	17,15±3,42	0,19	0,06
40	1,00±0,04 ^a	29,87	0,30±0,01 ^c	17,63±0,82	0,14	0,04

Observa-se que no ensaio em que se utilizou 5 g.L⁻¹ de lactose, obteve-se a maior concentração de PHB (0,41 g.L⁻¹), sendo este valor estatisticamente diferente dos demais. Nesta concentração, foram obtidos os maiores fatores de conversão, $Y_{MCS/S}$ e $Y_{PHB/S}$, sendo respectivamente iguais a 0,43 g_{MCS}·g_{lactose}⁻¹ e 0,19 g_{PHB}·g_{lactose}⁻¹.

Uma das possíveis razões para este resultado é o fato de que este isolado bacteriano não possui a capacidade de hidrólise da lactose. Assim, uma hidrólise não enzimática, com produção de glicose e galactose, que possa ter ocorrido durante o preparo do meio de cultivo, pode ter possibilitado a utilização da glicose produzida através desta hidrólise. As saturação dos transportadores de glicose, por galactose pode ter inibido proporcionalmente a utilização da glicose, quando concentrações maiores de lactose foram utilizadas. Além disso, as concentrações mais elevadas podem ter sido limitantes por alterarem a pressão osmótica do meio de cultivo.

5.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TIAMINA SOBRE O CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE PHA PELO RECOMBINANTE JM101/ PBHR68

É sabido que o isolado *E. coli* JM101 é deficiente na biossíntese da vitamina tiamina. Com o objetivo de testar se esta deficiência seria a

causa do baixo crescimento celular, foi estudado o efeito da adição de diferentes concentrações de tiamina sobre o crescimento e a produção de PHA por *E. coli* JM101/pBHR68, em meio definido.

A Tabela 14 apresenta os valores de concentração de MCS, acúmulo de PHA, percentual de consumo de lactose, $Y_{MCS/S}$ e $Y_{PHB/S}$ obtidos a partir da adição de diferentes concentrações de tiamina. Neste estudo, utilizou-se como fonte de carbono, lactose na concentração de 20 g.L⁻¹.

Tabela 14 Concentração de MCS, PHA, percentual de lactose consumida, $Y_{MCS/S}$ e $Y_{PHB/S}$, obtidas em diferentes concentrações de tiamina, para *E. coli* JM101(pBHR68).

Tiamina (g.L ⁻¹)	MCS (g.L ⁻¹)	% PHB	PHB (g.L ⁻¹)	Consumo de lactose (%)	$Y_{MCS/S}$	$Y_{PHB/S}$
0,040	1,06±0,07	44,76	0,47±0,01	27,70±4,98	0,19	0,09
0,080	1,00±0,05	43,06	0,43±0,05	21,65±0,18	0,23	0,10
0,120	0,84±0,02	43,12	0,36±0,05	31,29±8,14	0,12	0,05
0,160	1,05±0,06	42,14	0,44±0,04	31,32±2,58	0,10	0,04

Através da análise de variância (ANOVA), verificou-se que diferentes concentrações de tiamina estudadas não levaram à produção de biomassa ou de PHB com valores produção estatisticamente diferentes. Porém, a presença da mesma contribuiu para o aumento da produção de PHB de 0,34 g.L⁻¹ (Tabela 13) para 0,47 g.L⁻¹ (Tabela 14), considerando-se a mesma concentração de lactose (20 g.L⁻¹).

5.4 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PHA A PARTIR DE SORO DE QUEIJO

Tendo-se avaliado que os três isolados estudados foram capazes de crescer e produzir PHA utilizando lactose como única fonte de carbono, deu-se continuidade ao estudo visando avaliar o potencial de utilização do soro de queijo como substrato para o crescimento e produção de PHA, pelos três isolados recombinantes, *E. coli* (DH10B, DH5 α e JM101) hospedando um dos dois plasmídeos – pRLC2 e pBHR68.

Na Tabela 15, são apresentados os valores de produção de MCS e concentração e porcentagem de acúmulo de PHA, ao final de 24 horas de cultivo, para cada um dos isolados, cultivados em soro de queijo esterilizado, acrescido de ampicilina (100 μ g.ml⁻¹). Para o cultivo dos isolados JM101e DH10, adicionou-se, também, IPTG (0,5 mmol.L⁻¹), uma vez que estes isolados super expressam proteína LacR, inibidora da

expressão do operon Lac, que é ativado por IPTG. Neste estudo, o pH inicial foi ajustado para 7,0.

Tabela 15 Avaliação da produção de PHA a partir de soro de queijo.

Isolado/plasmídeo	MCS (g.L ⁻¹)	% PHB (g/g de MCS)	PHB (g.L ⁻¹)
DH5a/pRLC2	2,07	3,08	0,064
DH5a/pBHR68	2,95	23,07	0,680
DH10B/pRLC2	2,37	9,93	0,236
DH10B/pBHR68	2,34	31,34	0,733
JM101/pRLC2	2,59	3,40	0,088
JM101/pBHR68	2,98	25,21	0,751

Quando se compara o crescimento celular e a produção de PHA obtidos utilizando-se o soro queijo como meio de cultivo e os resultados obtidos na presença de lactose em meio LB (Tabela 12), observa-se que de modo geral o acúmulo de biomassa aumentou, na presença do soro de queijo, ou se manteve igual à produzida em LB+lactose (JM101/pRLC2). Quanto ao percentual de acúmulo de PHA, observou um ligeiro aumento apenas para os isolados recombinantes DH10B/pRLC2 e DH10B/pBHR68. Para os isolados JM101/pRLC2 e JM101/pBHR68 observou-se, respectivamente, decréscimo no percentual de acúmulo de PHB de 7,81 e 43,11% (g/g MCS), em LB+lactose, para 3,4 e 25,21% (g/g MCS), em soro de queijo. O isolado JM101 (pBHR68) apresentou a maior produção de PHB de 0,751 g.L⁻¹. Entre os isolados hospedando o plasmídeo pRLC2, o isolado DH10B apresentou o maior percentual de acúmulo e de produção de PHB, 0,24 g.L⁻¹ e 9,93 % (g/g de MCS).

Considerando-se que uma das limitações ao uso de PHAs como matéria prima para a confecção de embalagens, por exemplo, é o custo elevado dos substratos carbônicos utilizados nos bioprocessos de produção destes biopolímeros, vários estudos estão sendo realizados, com o intuito de selecionar micro-organismo com elevada velocidade de crescimento de acúmulo de PHA, bem como com capacidade de utilizar com eficiência de fontes de carbono renovável de baixo custo. (MATSUMOTO et al., 2009). Estudos utilizando lactose, como substrato para a produção de PHA têm sido realizados por diversos autores. Cita-se, como exemplo, estudos realizados por Castelan et al., 2007, no qual a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* foi geneticamente modificada através da inserção dos genes lacZ e lacY de *E. coli*. Esta modificação levou ao acúmulo de 36 % de polímero. Os genes *LacI*

(permease), *LacZ* (β -galactosidase) e são responsáveis respectivamente pelo transporte da lactose para interior da célula e hidrólise da lactose (CATALÁN et al., 2007).

5.4.1 Avaliação dos efeitos da variação na concentração e suplementação do soro de queijo sobre a produção de PHA por *E. coli* DH5 α /pRLC2

Embora o isolado *E. coli* não tenha sido o que apresentou o melhor crescimento e acúmulo de PHA, utilizando-se soro de queijo como meio de cultivo, esta linhagem foi escolhida para dar prosseguimento aos estudos descritos nesta etapa deste trabalho, porque ao contrário dos isolados JM101 e DH10B, não apresenta superexpressão do inibidor (LacI) do operon Lac. Adicionalmente o plasmídeo pRLC2 foi construído por este grupo de pesquisa e a expressão do gene da PHA sintase de *C. violaceum*, ancorado a este plasmídeo foi pouco explorada.

É sabido que composição do meio de cultivo influencia na quantidade de biomassa produzida e, portanto, pode influenciar no desempenho dos processos microbianos para a produção de PHA. O soro de queijo quando utilizado como substrato, disponibiliza junto ao meio de cultivo, nutrientes essenciais para o crescimento celular e acúmulo de biopolímero (NIKEL et al., 2005; BOSCO; CHIAMPO, 2010).

Os resultados deste estudo sugerem o soro de queijo em substrato adequado à produção de PHA, por *E. coli* recombinante, hospedando os genes codificadores das principais enzimas envolvidas na biossíntese de PHAs. Embora tenha sido observado um aumento do crescimento celular, quando o soro de queijo foi utilizado, os isolados neste estudo mostraram-se pouco eficientes na utilização da lactose. Sendo assim, objetivando-se avaliar se o soro de queijo poderia ser utilizado como co- substrato, juntamente com glicose na produção de PHA, os efeitos concentração de soro de queijo, de glicose e ácido propiônico, bem como o efeito da presença ou ausência de IPTG, indutor da expressão do operon Lac, ou seja, dos genes ancorados no plasmídeo pRLC2, foram avaliados. Para esta avaliação foi utilizado um planejamento experimental denominado Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR-2³). Através deste delineamento, foram avaliados os efeitos de quatro variáveis independentes, sendo três quantitativas (concentrações de soro de queijo, glicose e ácido propiônico) e uma qualitativa (presença ou ausência de IPTG), sobre o crescimento celular (MCS), o

acúmulo de PHA e a incorporação de unidades de 3-hidroxi-valerato (3-HV) no polímero.

Na Tabela 16, são apresentados os valores reais das variáveis estudadas: concentração de glicose, concentração do soro de queijo (SQ), concentração de ácido propiônico (Ác. Pr) e ausência ou presença de IPTG.

São apresentadas também as respostas ou efeito das variáveis estudadas sobre o crescimento celular (MCS), pH final, percentual de PHA na MCS (%PHA) e as composições molares dos monômeros 3-HV e 3-HB, produzidos pela *E. coli* recombinante DH5 α (pRLC2), após 24 horas de cultivo.

Numa visão geral, observa-se que as condições experimentais 10 e 20 proporcionaram a maior produção de PHA, sendo iguais a 0,547 g.L⁻¹ e 0,538 g.L⁻¹, respectivamente. As condições experimentais 12 e 14 foram as que levaram às menores produções de biopolímero, sendo iguais a 0,233 g.L⁻¹ e 0,238 g.L⁻¹, respectivamente. Tanto o soro de queijo, quanto a glicose sozinhos foram propiciaram o acúmulo de PHA. No entanto, a elevação da concentração do soro de queijo acima de 37% (v/v) levou à diminuição da concentração do polímero.

Tabela 16 Valores reais para as variáveis do DCCR-2³ e seus efeitos sobre e valores de pH, produção de MCS, PHA e a composição dos monômeros nos diferentes níveis estudados, produzidos por *E. coli* DH5 α (pRLC2) ao final de 24 horas de cultivo.

Condição	G (g·L ⁻¹)*	% S Q* (v/v)	Ác. P(mM)*	IPTG (mM)	pH final	MSC(g·L ⁻¹)	% PHA (g·gMCS ⁻¹)	PHA (g·L ⁻¹)	%HB g/gPHA)**	%HV (g/gPHA)**
01	4	15	2	Sem	6,60	2,28	21,5	0,489	99,24	0,76
02	16	15	2	Com	6,62	2,84	18,0	0,510	99,38	0,62
03	4	59	2	Com	6,31	2,67	19,0	0,506	99,40	0,60
04	4	15	8	Com	6,62	2,99	14,7	0,438	97,55	2,45
05	16	59	2	Sem	5,02	3,39	11,3	0,383	99,63	0,37
06	16	15	8	Sem	6,52	2,65	10,5	0,278	97,81	2,19
07	4	59	8	Sem	6,05	2,11	18,4	0,390	98,61	1,39
08	16	59	8	Com	5,26	2,38	11,5	0,275	98,02	1,98
09	0	37	5	Sem	6,80	2,10	15,7	0,330	98,26	1,74
10	20	37	5	Com	6,38	2,85	19,2	0,547	98,83	1,17
11	10	0	5	Sem	6,65	3,50	10,5	0,367	98,24	1,76
12	10	74	5	Com	4,66	1,79	13,0	0,233	99,55	0,45
13	10	37	0	Com	6,51	3,11	16,8	0,522	99,89	0,11
14	10	37	10	Sem	6,22	3,04	7,8	0,238	98,32	1,68
15	10	37	5	Com	6,51	1,70	20,9	0,356	98,72	1,28
16	10	37	5	Com	6,95	2,93	14,9	0,437	98,80	1,20
17	10	37	5	Sem	6,92	1,75	21,7	0,380	98,63	1,37
18	10	37	5	Com	6,89	2,57	14,7	0,379	98,95	1,05
19	10	37	5	Sem	6,47	2,67	19,4	0,519	98,77	1,23
20	10	37	5	Sem	6,91	2,77	19,4	0,538	98,27	1,73

*G=Concentração de glicose; SQ = Concentração de soro de queijo; Ac. P = Concentração de ácido propiônico. ** HB e HV = percentual molar de unidades de unidades de 3-hidroxiobutirato e 3-hidroxi valerato, contido no biopolímero

Muitas espécies de bactérias são conhecidas por acumularem P(3HV-co-3HV), quando ácido propiônico está presente no meio de cultivo. A fração de 3HV no polímero é determinada pela razão entre a concentração de glicose e a de ácido propiônico, na fase de acúmulo do polímero (DOI et al., 1988). Assim, comparando-se os resultados obtidos nas condições experimentais 13, ausência de ácido propiônico, e os experimentos 15, 16 e 18, todos na presença do ácido propiônico 5 mmol.L⁻¹, destacam-se dois efeitos deste ácido, inibição na produção do polímero e aumento na incorporação de unidades de 3HV, no mesmo. Mostra-se, assim, que este ácido contribui como precursor na produção das unidades de 3HV, no entanto observa-se, conforme esperado, um efeito inibidor sobre o crescimento celular, podendo ser esta a razão para a diminuição na produção de PHA. Neste estudo, a razão glicose/ácido propiônico que apresentou melhores resultados de incorporação de unidades de valerato foram as usadas no ensaio 4, com uma relação de 8,77, resultando numa produção de copolímero de 0,438 g. L⁻¹, contendo 2,45 % (g.gPHA⁻¹) de 3HV.

A análise de variância (ANOVA) para as variáveis estudadas e suas interações são apresentadas na Tabela 17. Considerando-se um nível de significância de 95% de confiança ($p < 0,05$), observa-se que as variáveis quadráticas, concentração de glicose (G), e de soro de queijo (SQ), a variável linear concentração de ácido propiônico (Ac. Prop), além das interações entre as variáveis lineares G x Ac. Prop, SQ x Ac. Prop e SQ x IPTG apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre a produção de PHAs. Embora a variável IPTG não tenha efeito estatisticamente significativo sobre a produção de PHA, a interação desta variável qualitativa com o soro de queijo, influenciou de maneira significativa a produção do biopolímero. Uma possível razão para este resultado pode explicada pelo fato de que a lactose presente no soro de queijo, atua sinergicamente, com o IPTG, análogo da lactose, contribuindo com o aumento da concentração de indutores de expressão dos genes do plasmídeo pRLC2 que se encontram sob controle do operador Lac. Alguns estudos mostraram que do soro de queijo pode atuar como indutor de expressão gênica de genes sob regulação do operon Lac (GOMBERT; KILIKIAN, 1998; VIITANEN et al., 2003).

Tabela 17 Análise de variância (ANOVA). Avaliação dos efeitos das variáveis sobre a produção de PHA, em *E. coli* DH5 α (pRCLC2).

Variáveis	SS	DF	MS	F _{cal}	P
(1)Glicose (L)	-0,616	0	-0,616	1,713	0,551
Glicose (Q)	0,040	1	0,040	7,619	0,028
(2)% Soro de queijo (L)	0,010	1	0,010	1,817	0,220
% Soro de queijo (Q)	0,040	1	0,040	7,626	0,028
(3)Ácido Propiônico (L)	0,070	1	0,070	13,133	0,008
Ácido Propiônico (Q)	0,005	1	0,005	0,852	0,387
(4)IPTG(L)	0,000	1	0,000	0,060	0,814
1L by 2L	0,001	1	0,001	0,231	0,645
1L by 3L	0,040	1	0,040	7,587	0,028
1L by 4L	0,040	1	0,040	7,617	0,028
2L by 3L	0,040	1	0,040	7,622	0,028
2L by 4L	0,040	1	0,040	7,573	0,028
Error	0,037	7	0,005		
Total SS	0,197	19			

DF=graus de liberdade, SS=soma dos quadrados mínimos, MS= (SS/DF), F_{cal}=(MF reg/MS Res), P= probabilidade de que a estatística F seja significativa.

Na Figura 11 é apresentado o diagrama de Pareto ilustrando os efeitos das variáveis estudadas e suas interações sobre a concentração de PHA produzido. O diagrama mostra que os principais efeitos calculados sobre a produção de PHA foram observados para as variáveis concentração de ácido propiônico (linear) e de soro de queijo (quadrático), seguido das suas interações lineares

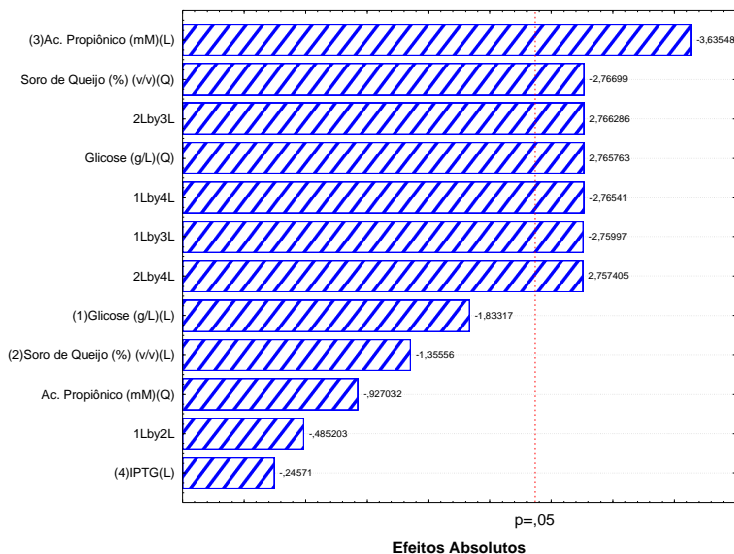
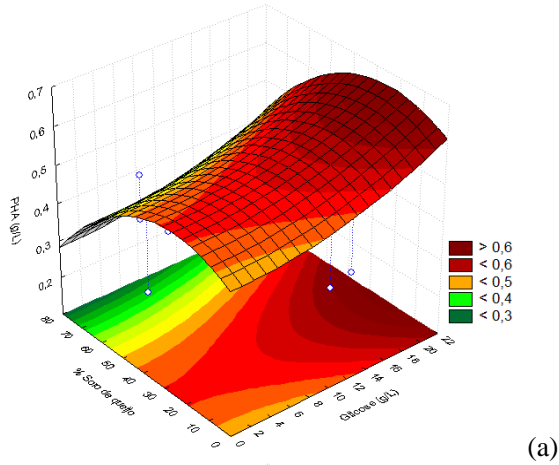


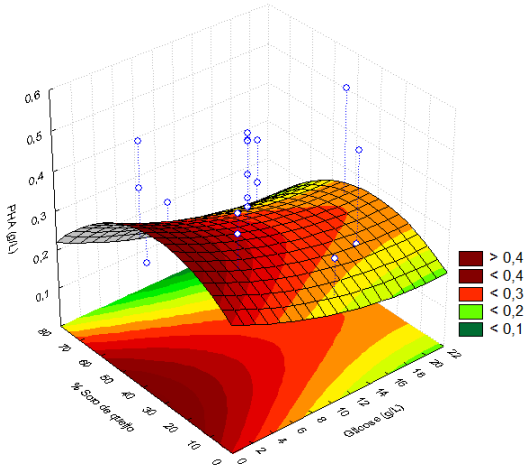
Figura 11 Diagrama de Pareto para o efeito das variáveis sobre a produção de PHA. À direita do tracejado encontram-se as variáveis e suas interações que tiveram efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sobre a produção de PHA.

Identificadas as variáveis que tiveram efeitos significativos sobre produção de PHA, foram construídos gráficos das superfícies de resposta dos efeitos para melhor visualizar o comportamento da produção de PHA.

As Figuras 12 e 13 apresentam as superfícies de resposta dos efeitos da variação da concentração de soro de queijo, glicose e ácido propiônico na produção de PHA. A Figura 12(a) apresenta o efeito das concentrações de soro de queijo e glicose na produção de PHA, sem a adição de ácido propiônico ao meio de cultivo. A Figura 12(b) apresenta o efeito das concentrações de soro de queijo e glicose na produção de PHA, com a adição de ácido propiônico ($0,74 \text{ g.L}^{-1}$) ao meio de cultivo. Observa-se um decréscimo na produção de PHA de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, quando ácido propiônico, na concentração de $0,74 \text{ g.L}^{-1}$, é adicionado ao meio de cultivo, isso ocorre possivelmente devido a toxicidade que o ácido propiônico exerce sobre a célula, inibindo o crescimento celular (YU et al., 2002).



(a)

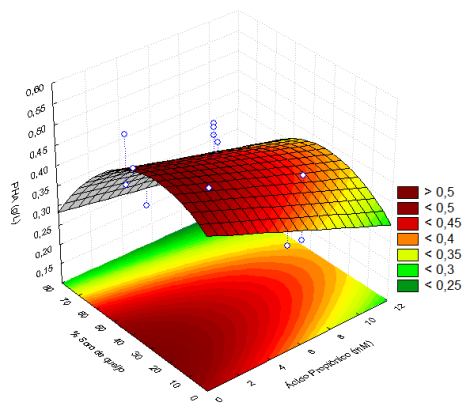


(b)

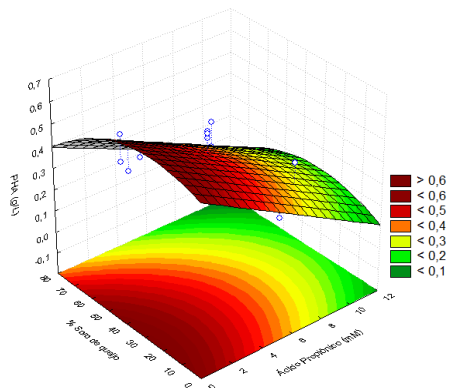
Figura 12 Superfície de resposta da produção de PHA, variando a concentração de glicose e a percentagem de soro de queijo mantendo a concentração de ácido propiônico constante em a) 0 mmol.L^{-1} ácido propiônico; b) $0,74 \text{ g.L}^{-1}$ ácido propiônico.

A Figura 13 (a) apresenta o efeito das concentrações do soro de queijo e ácido propiônico na produção de PHA, sem adição de glicose ao meio de cultivo. A Figura 13(b) apresenta o efeito das concentrações de soro de queijo e ácido propiônico na produção de PHA, com adição de glicose (20 g.L^{-1}) ao meio de cultivo. A análise das figuras demonstra que ocorreu uma produção de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA em ausência de glicose,

mostrando que sem a adição de glicose no meio de cultivo, a bactéria busca uma fonte de carbono alternativa, hidrolisando unidades de lactose, presentes no soro de queijo, para obter glicose e galactose (KOLLER, 2007). Quando a glicose foi adicionada ao meio de cultivo, obteve-se uma produção de $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ de PHA, pois com uma fonte de carbono mais acessível obteve-se um aumento de 10% na produção de PHA.



(a)



(b)

Figura 13 Superfície de resposta da produção de PHA, variando a concentração de ácido propiônico e a percentagem de soro de queijo mantendo a concentração de glicose constante em; a) sem glicose e b) concentração máxima de glicose 20 g.L^{-1} .

A condição experimental 10 que permitiu a maior produção de PHA continha 37 % (v/v) de soro de queijo, com uma concentração equivalente a $6,69 \text{ g.L}^{-1}$ de lactose. Uma concentração muito próxima de

lactose igual a $6,8 \text{ g.L}^{-1}$ também foi utilizada por Viitanen (2003), que observou que a concentração era suficiente para a produção de PHA em frascos agitados, quando cultivados contendo $0,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ de IPTG. O autor observou ainda, que esta indução não é afetada pela presença de glicose, e o indutor não é metabolizado pelas células. IPTG é, contudo, tóxico e caro, fato que impacta significativamente no custo de produção de PHA.

Dentre as superfícies de resposta obtidas, a que melhor retratou uma condição otimizada de acúmulo intracelular de PHA pela *E. coli* recombinante (DH5 α hospedando a PHA sintase de *C. violaceum*), foi a superfície presente na Figura 14.

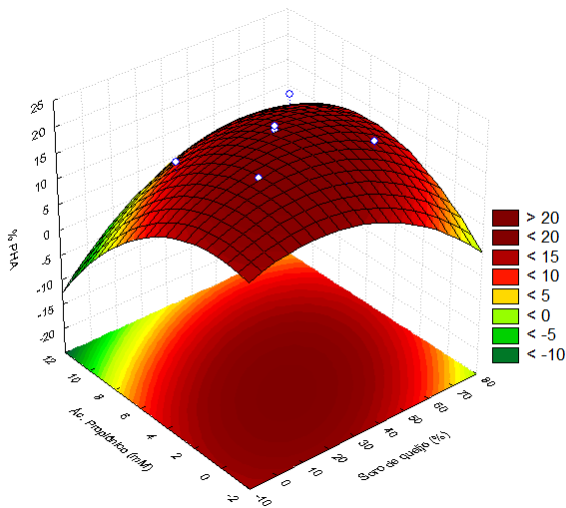


Figura 14 - Superfície de resposta dos efeitos da concentração de soro de queijo e ácido propiônico sobre a incorporação de PHA (%) contendo 4 g.L^{-1} de glicose para *E. coli* DH5 α (pRLC2).

Através da Figura 14, observa-se um acúmulo de aproximadamente 20 % de PHA, quando a concentração de soro de queijo foi mantida em seu nível intermediário (37 %), ácido propiônico na concentração de 2 mmol.L^{-1} e glicose na concentração de 4 g.L^{-1} . Nesta condição, não houve inibição do crescimento provocada pelo soro de queijo e nem pelo do ácido propiônico.

5.5 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO E ACÚMULO DE PHAS POR *E. COLI* DH5A/PRLC2

Baseado nos resultados da otimização da composição do meio de cultivo, foram acompanhadas as cinéticas de crescimento e acúmulo de PHA em três condições experimentais nas quais se variou as razões glicose/ácido propiônico, utilizados como substratos carbônicos, suplementados pela adição de soro de queijo, 37 % (v/v). Os experimentos foram realizados em triplicatas, em frascos agitados, tendo sido retirados três frascos a cada 2 horas, até 24 horas (frascos de sacrifício). As concentrações de glicose foram 4 e 20 g.L⁻¹, enquanto as de ácido propiônico foram 2 e 10 mmol.L⁻¹, em todos os ensaios, na presença de 37 % (v/v) de soro de queijo e ausência de IPTG, como resumido na Tabela 18.

Tabela 18 Condições experimentais dos meios de cultivo para a avaliação das cinéticas de crescimento e acúmulo de PHA por *E. coli* recombinante (DH5α/pRLC2)

Condição experimental	Glicose (g.L ⁻¹)	Ácido propiônico (mmol.L ⁻¹)	Razão Gli/Ac. Prop.	% Soro de queijo (v/v)
1	20	2	135	37
2	4	10	5,4	37
3	4	2	27	37

As Figuras 15, 16 e 17 apresentam o comportamento das cinéticas de crescimento e produção de PHA ao longo das 24 horas de cultivo, para *E. coli* recombinante (DH5α/pRLC2), para os três experimentos.

A Figura 15 mostra que, na condição experimental 1, a produção de biomassa seca (MCS) e o acúmulo de PHA ocorreram paralelamente; a produção de MCS e a de PHA alcançaram valores de 1,29 g.L⁻¹ e 0,34 g.L⁻¹, respectivamente, ao final de 24 horas de cultivo. Observa-se, ainda, que houve um consumo de aproximadamente 75 % (g/g) de açúcares redutores totais do meio que diminuiu de 20 para 5 g.L⁻¹, ao final do cultivo. A queda observada do pH (de 6,59 para 6,26), devida à formação de ácidos orgânicos, como consequência da oxidação incompleta dos açúcares do meio (glicose e lactose do soro de queijo), confirmam um efeito tamponante do soro de queijo, conforme sugerido anteriormente por Marangoni (2002). Alguns estudos têm mostrado a influência do pH do meio de cultivo na produção de PHA a partir de soro de queijo, por culturas mistas, indicando ser desnecessária a

correção do pH para produção de PHA a partir deste substrato (BOSCO; CHIAMPO, 2010).

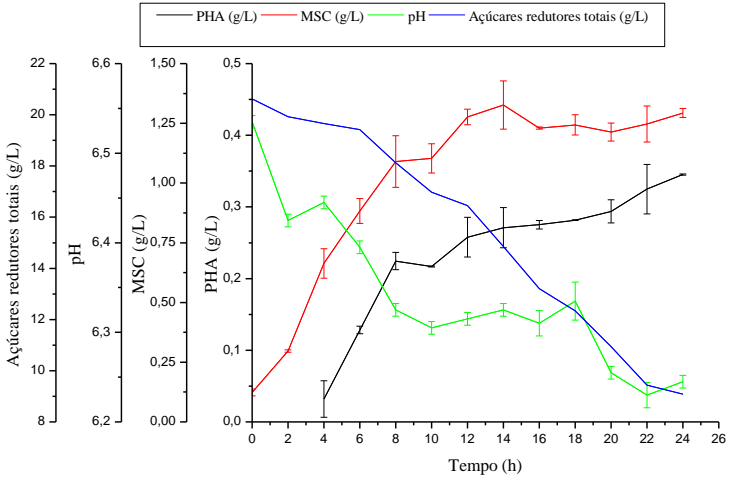


Figura 15 Cinética de produção de PHA e MCS, para *E. coli* DH5 α (pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 20 g.L⁻¹ de glicose e 0,148 g.L⁻¹ de ácido propiônico.

Na Figura 16, na qual se apresentam os resultados obtidos na condição experimental 2 (Tabela 18) observa-se comportamento bastante similar ao da condição experimental 1. Neste caso, também se observa que a formação de MCS e PHA ocorrem paralelamente, além do consumo aproximado de 90% (g/g) dos açúcares redutores totais e uma queda ligeira do pH, sugerindo novamente o efeito tamponante do soro de queijo. Nestas condições, se obteve, ao final de 24 horas de cultivo, uma produção de 1,54 g.L⁻¹ de MCS e 0,36 g.L⁻¹ de PHA, com um consumo de 5,5 g.L⁻¹ de glicose e 1 g.L⁻¹ de lactose presente no soro de queijo, uma relação de 0,32 g de lactose consumida para cada g de glicose.

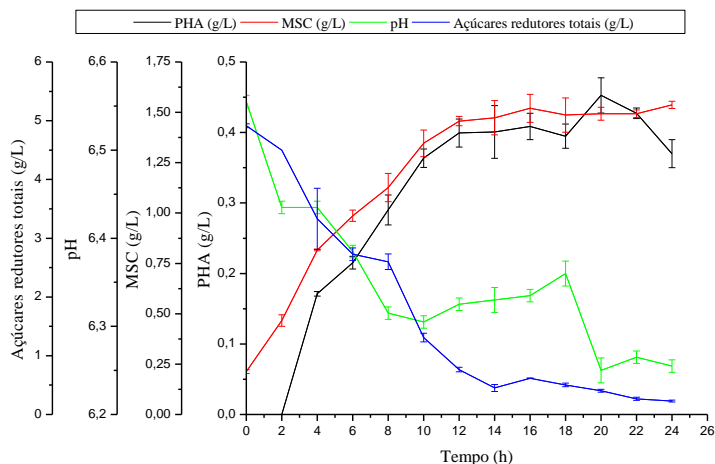


Figura 16 Cinética de produção de PHA e MCS, para *E. coli* DH5α(pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 4 g.L⁻¹ de glicose, 0,74 g.L⁻¹ de ácido

Na condição experimental 3, (Tabela 18) se observou o maior acúmulo de MCS, dentre as três condições experimentais estudadas, tendo sido igual a 2,27 g.L⁻¹. No entanto a produção de PHA foi ligeiramente inferior às anteriores e igual a 0,311 g.L⁻¹, conforme pode ser observado na Figura 17.

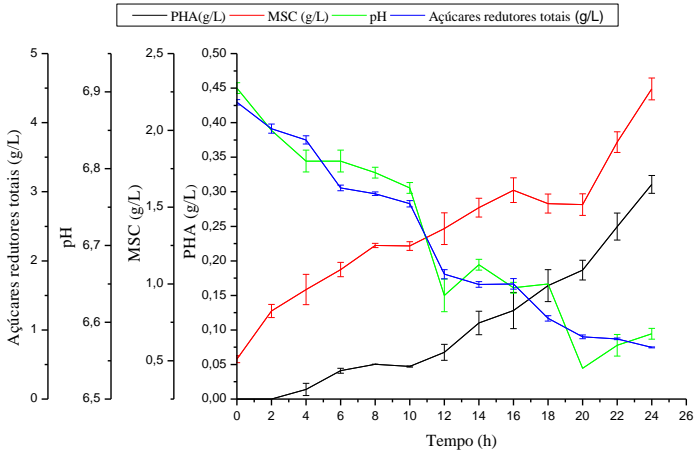


Figura 17 Cinética de produção de PHA e MCS, para *E. coli* DH5 α (pRLC2), nas condições de cultivo de 37 % (v/v) de soro de queijo, 4 g·L⁻¹ de glicose, 0,148 g·L⁻¹ de ácido propiônico, para

A Tabela 19 apresenta as velocidades específicas de produção de MCS (μ_{MCS}), PHA (μ_{PHA}), consumo de substrato ($\mu_{Substrato}$), bem como os fatores de conversão de substrato em MCS ($Y_{(MCS/S)}$) e PHA ($Y_{(PHA/S)}$), nas três condições experimentais (Tabela 18).

Tabela 19 Parâmetros cinéticos, velocidades de produção de MCS e PHA e consumo de substrato, $Y_{(MCS/S)}$ e PHA $Y_{(MCS/S)}$ nos cultivos com *E. coli* recombinante (DH5 α , hospedando a PHA sintase de *C. violaceum*) em meio de cultivo contendo soro de queijo (37 % (v/v)) e em diferentes concentrações de glicose e ácido propiônico.

Condição experimental	μ_{MCS} (h ⁻¹)	μ_{PHA} (h ⁻¹)	$\mu_{substrato}$ (h ⁻¹)	$Y_{MCS/S}$ (g/g)	$Y_{PHA/S}$ (g/g)
1	0,127	0,174	0,17	0,049	0,020
2	0,061	0,091	0,38	0,197	0,076
3	0,125	0,032	0,10	0,299	0,064

Através da Tabela 19, observa-se que as maiores velocidades de formação de biomassa foram obtidas nos ensaios em que a concentração de ácido propiônico era igual a 2 mmol·L⁻¹. A maior velocidade de produção de PHA foi obtida na concentração de 20 g·L⁻¹ de glicose, enquanto a maior velocidade de consumo de substrato foi obtida quando

a concentração de glicose foi de 4 g.L⁻¹ e a de ácido propiônico foi de 10mmol.L⁻¹, condição na qual se obteve o maior fator de conversão de substrato em produto ($Y_{PHA/S}$).

5.6 EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁCIDO PROPIÔNICO SOBRE A INCORPORAÇÃO DE UNIDADES DE VALERATO

O tipo de PHA produzido por um determinado micro-organismo não é somente função da enzima PHA sintase, mas também das vias metabólicas utilizadas pelo micro-organismo e do substrato utilizado. Glicose conduz à formação de acetil-CoA através da glicólise, enquanto o propionato é diretamente ativado por propionil-CoA sintetase (prpE) a propionil-CoA. Estes precursores são então colocados em prática pela via de síntese de PHA (phaBCA) para incorporar uma unidade 3HB ou uma unidade de 3HV na cadeia polimérica pela PHA sintase (*phaC*) (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). A Tabela 20 apresenta um resumo da produção de MCS e PHA, e suas frações molares de HB e HV em 24 horas de cultivo, com *E. coli* recombinante (DH5 α , hospedando a PHA sintase de *C. violaceum*). Das três cinéticas realizadas no estudo anterior.

Tabela 20 Efeito das concentrações de glicose e de ácido propiônico sobre a produção de MCS, PHA e a incorporação de unidades de 3HV ao copolímero por *E. coli* DH5 α /pRLC2.

Condição exp.	Ác.Prop. (mmol.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	MCS (g.L ⁻¹)	PHA (g.L ⁻¹)	% PHA (g/gMCS)	Monômeros	
						%3HB (g/gPHA)	%3HV (g/gPHA)
1	2	20	1,29	0,34	26,46	98,81	1,19
2	10	4	1,49	0,45	30,36	98,59	1,41
3	2	4	2,27	0,31	13,66	100,0	<0,01

Mesmo conhecendo o efeito do ácido propiônico sobre a produção de MSC, estudou-se o efeito da adição do ácido propiônico sobre a incorporação de unidades de valerato, para obter um polímero com características desejáveis para a indústria, com maleabilidade, tornando o polímero menos quebradiço e duro, com menores temperaturas de fusão, podendo ser utilizado para formação de filmes com barreiras ao vapor d'água e gases, com características similares ao polipropileno (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992).

A maior incorporação de unidades de 3HV foi observada quando o meio de cultivo foi constituído de 4 g.L⁻¹ de glicose e 10 mmol.L⁻¹ de ácido propiônico, com uma percentagem de unidades de HV incorporadas de 1,41 % (g/gPHA). Nos ensaios nos quais a

concentração de ácido propiônico foi igual a 2 mmol.L^{-1} , a baixa disponibilidade de propionil-CoA presentes no meio para se unir as acetil-CoA, resultou na não formação do HV.

5.7 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DA PHA SINTASE DE *C. VIOLACEUM* POR UNIDADES DE VALERATO EM *E. COLI* RECOMBINANTE

Embora as vias metabólicas envolvidas na produção de PHB sejam bem estudadas e a produção deste PHA seja amplamente distribuída dentre vários isolados selvagens conhecidos e caracterizados, este biopolímero apresenta propriedades físicas e químicas que impedem sua aplicação industrial. PHB é pouco resistente à tração mecânica. A incorporação de unidades de 3HV, com produção do copolímero P(3HB-co-3HV) confere propriedades mais atrativas ao PHA.

Trabalhos prévios mostraram isolados de *C. violaceum* apresentaram uma elevada capacidade de incorporação de unidades de 3HV ao PHA produzido. Steinbuchel *et al*, 1993 mostraram que na presença de ácido valérico, como única fonte de carbono, alguns isolados de *C. violaceum* foram capazes de produzir homopolímeros constituídos apenas de unidades de 3-HV (STEINBUCHEL *et al.*, 1993)

Tabela 21 Efeito da adição de ácido propiônico sobre a incorporação de unidades de 3HV por *E. coli* DH5 α hospedando a PHA sintases de *C. violaceum* (pRLC2) e *C. necator* (pBHR68))

Isolado /plasmídeo	Substrato	MCS (g.L-1)	PHA (g.L-1)	%HB (g/gPHA)	%HV (g/gPHA)
DH5 α /pRLC2	Gli.	1,34 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	100	0
DH5 α /pRLC2	Gli.+ ác. prop	1,33 \pm 0,10	0,08 \pm 0,05	91,17	8,83
DH5 α /pBHR68	Gli.	1,91 \pm 0,22	0,90 \pm 0,17	100	0
DH5 α /pBHR68	Gli. + ác.prop	1,36 \pm 0,03	0,52 \pm 0,01	95,55	4,45

Cultivo em meio LB, contendo glicose (20 g.L^{-1}), ampicilina ($100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido propiônico 10 mmol.L^{-1} ($0,74 \text{ g.L}^{-1}$)

Assim, visando avaliar o papel e a especificidade PHA sintase de *C. violaceum* sobre a incorporação de unidades de 3HV, avaliou-se a capacidade de acúmulo de P(3HB-co-3HV) pelo isolado DH5 alfa/pBHR68 (contendo a PHA sintase de *C. necator*) e DH5alfa/pRLC2 (contendo a PHA sintase de *C. violaceum*). O isolado hospedando um dos dois plasmídeos foi cultivado em meio LB + glicose, suplementado com ácido propiônico (10 mmol.L^{-1}).

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 21. Nesta tabela observa-se que, de fato, a adição de ácido propiônico ao meio de cultivo levou à incorporação de unidades de 3HV pelas PHA sintases de ambos os plasmídeos, pBHR68 e pRLC2. No entanto, a pesar da produção de PHA ser menor para o isolado contendo a sintase de *C. violaceum* (pRLC2), a incorporação de unidades de 3HV é maior, para este recombinante, sugerindo uma maior afinidade da PHA sintase de *C. violaceum* pelas unidades de 3-hidroxisvalerato.

5.8 OBSERVAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS GRÂNULOS INTRACELULARES PELA PHA SINTASE DE *C. VIOLACEUM*

A Figura 18 apresenta uma micrografia dos grânulos de PHA por microscopia eletrônica de transmissão, formados em 24 horas de cultivo, em *E. coli* recombinante DH5 α contendo a PHA sintase de *C. violaceum*.

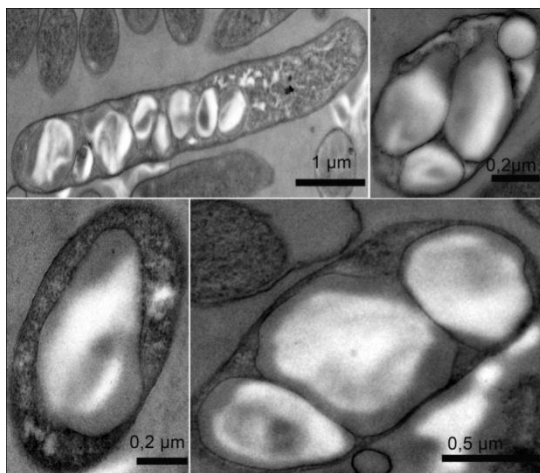


Figura 18 Imagem TEM de *E. coli* recombinante hospedando a PHA sintase de *C. violaceum*, contendo grânulos de PHB, depois de 24 horas de cultivo em meio LB contendo glicose.

Dois modelos de formação de grânulos de PHB têm sido formulados na literatura: o modelo de micela e o modelo de brotação. Ambos os modelos representam a localização estabelecida da PHA sintase e PHAsina na superfície do grânulo (POTTER et al., 2002; TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005). Por isso, realizou-se uma análise da formação dos grânulos em *E. coli* recombinante contendo os genes de

biossíntese de PHB (phaA e phaB) de *C. necator* a phaC sintase de *C. violaceum*. Estudos anteriores indicaram que a PHA sintase e grânulos de PHA são localizados nos pólos da célula (JENDROSSEK, 2005; PETERS; REHM, 2005). Isso foi observado em bactérias naturalmente produtoras de grânulos de PHA, bem como em *E. coli* recombinante. Em contraste, estudo de microscopia eletrônica de transmissão indica que, os grânulos de PHA são formados em elementos de mediação central (TIAN; SINSKEY; STUBBE, 2005).

Os grânulos encontrados neste estudo estão de acordo com os encontrados por outros autores. Estes grânulos geralmente apresentam 2 a 8 grânulos de 0,2 a 0,5 μm (KIM; LENZ, 2001). A maioria das células visualizadas pela MET, possuem 3 a 6 grânulos de PHA de diferentes tamanhos. Observa-se que nem todas as células presentes acumulam polímeros, isso pode ser devido a falta do antibiótico de seleção. Nesse estudo adicionou-se ampicilina no início do cultivo como forma de seleção. Porém, esta pode ser degradada pela presença da enzima β -lactamase, que é excretada por bactérias recombinantes durante seu crescimento.

6 CONCLUSÕES

A partir destes estudos foi possível concluir que:

Os três isolados estudados (DH5 α , DH10B e JM101) hospedando os plasmídeos pBHR68 ou pRLC2, contendo as PHA sintases de *C. necator* ou *C. violaceum*, respectivamente, foram capazes de crescer e acumular PHA. Contudo, estes recombinantes apresentaram valores de acúmulo de MCS e PHA que variaram em função do plasmídeo e do isolado. A incorporação do plasmídeo pRLC2 em qualquer das linhagens levou, de modo geral, a um menor crescimento e acúmulo de biopolímero. Pode-se especular que a construção do plasmídeo pRLC2 de algum modo no metabolismo geral de *E. coli*. As linhagens JM101 e DH5 α , hospedando a PHA sintase de *C. violaceum*, apresentaram as melhores produções de MCS e PHA.

A variação da concentração de lactose influenciou na produção e acúmulo de PHA. Observou-se que para o isolado JM101/pBHR68, o aumento na concentração de lactose levou a um ligeiro decréscimo na porcentagem de acúmulo de PHB, sem contudo, ter alterado a produção de biomassa (MCS). Uma vez que os isolados testados neste estudo, apresentam como característica genotípica uma deficiência no metabolismo de lactose, supõe-se que de o substrato utilizado para o crescimento observado experimentalmente, seja o produto da hidrólise da lactose adicionada ao meio (glicose + galactose). Além, disso a lactose não hidrolisada e a galactose devam atuar saturando os transportadores de glicose, impedindo até mesmo o uso deste substrato, mesmo em concentrações maiores.

A adição de tiamina ao meio de cultivo do isolado JM101/pBHR68, o qual apresenta como característica genotípica a incapacidade de sintetizar a vitamina tiamina, levou a um aumento do crescimento e acúmulo de PHB, conforme esperado. Contudo, a variação na concentração de tiamina, na faixa estudada (de 0,04 a 0,16 g. l⁻¹) não produziu nenhum efeito estatisticamente significativo, sobre estes parâmetros.

Mesmo não sendo eficiente no uso de lactose para o crescimento e acúmulo de PHA o isolado DH5 α , hospedando o plasmídeo pRLC2 ou pBHR68 foi capaz de crescer e acumular PHB, em soro de queijo puro. Embora não se tenha observado grandes diferenças na biomassa acumulada pelo isolado hospedando um ou outro plasmídeo, observou-se que quando o isolado hospeda o plasmídeo pBHR68, o acúmulo de biopolímero é 3 a 7 vezes maior do que o acúmulo obtido para o isolado hospedando o plasmídeo pRLC2, nas

mesmas condições. O planejamento experimental visando avaliar o efeito de algumas variáveis sobre o crescimento e produção de PHB e de p(3HB-co-3HV), pelo isolado DH5 α /pRLC2, em meio mineral acrescido de soro de queijo, IPTG, glicose e ácido propiônico mostrou que, nas condições estudadas, a concentração de soro de queijo e sua combinação com as outras variáveis, exceto para o IPTG, teve efeito estatisticamente significativo sobre a produção dos PHA. De modo geral, a elevação na concentração de soro de queijo, no meio de cultivo, tende a inibir a produção de PHA.

O estudo da cinética de crescimento e produção de PHA pelo isolado recombinante DH5 α /pRLC2, na presença de quantidades idênticas de soro de queijo e variações nas razões glicose/ácido propiônico mostraram que dentre as três condições estudadas aquela em que esta razão foi menor obteve-se a produção de PHA.

A PHA sintase de *C. violaceum* possui especificidade para incorporar unidades de valerato ao homopolímero PHB, quando em presença de ácido propiônico e glicose.

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET) nos possibilitou visualizar a formação dos grânulos acumulados pela PHA sintase de *C. violaceum* em *E. coli*, mesmo que em pequena quantidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDOR, I. S.; KIM, S. W.; PRATHER, K. L.; KEASLING, J. D. Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica serovar typhimurium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3848-3854, 2002.

ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Review**, v.54, p.450-72. 1990.

AHN, W. S; PARK, S. J; LEE, S. Y. Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3624-3627, 2000.

ARAUJO, D. G. Produção de Poli[3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato] por *Escherichia coli* recombinante a partir de Glicose e Ácido Propiônico (Dissertação). Programa de pós graduação em Engenharia de alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 76p, 2005.

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

BOSCO, F.; CHIAMPO, F. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) using milk whey and dairy wastewater activated sludge production of bioplastics using dairy residues. **Journal Bioscience Bioengineer**, v.109, p.418-421, 2010.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v.65, p.127-161, 1998.

BRESSAM, C.R. Clonagem gênica, expressão heteróloga e proposição de um modelo estrutural teórico para a polihidroxialcanoato sintase de

Chromobacterium violaceum. (Dissertação). Programa de pós graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 75p, 2007.

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v.100, p.5996-6009, 2009.

CHEN, G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. **Chemical society Review**, v.38, p.2434-2446, 2009.

CHEN, G. Q.; WU, Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. **Biomaterials**, v.26, p.6565-6578, 2005.

CHEN, G. Q.; ZHANG, G.; PARK, S. J.; Lee, S. Y. Industrial scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). **Applied Microbiology Biotechnology**, v.57, p.50-55, 2001.

CHOI, J. I.; LEE, S. Y. High-level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4363-4368, 1999.

DE 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**, v.73, p.7912-7916, 2007.

DENNIS, D.; SEIN, V.; MARTINEZ, E.; AUGUSTINE, B. PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator* H16. **Journal Bacteriology**, v.190, p.555-563, 2008.

DOI, Y.; KANESAMA, Y.; KUNIOKA, M.; SAITO, T. Biodegradation of microbial copolyesters: poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). **Macromolecules**, v.23, p. 26-31, 1988.

FONSECA, G.; ANTÔNIO, R. V. Use of Vegetable Oils as Substrate for Medium-chain-length Polyhydroxyalkanoate Production by Recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology**, v.5, p. 277-279, 2006.

GERNGROSS, T. U.; MARTIN, D. P. Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: formation of macroscopic granules in vitro. **Proceedings of the National Academy of sciences**, v.92, p.6279-6283, 1995.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal Biotechnology**, v.60, p.47-54, 1998.

GRAGE, K.; JAHNS, A. C.; PARLANE, N.; PALANISAMY, R.; RASIAH, I. A.; ATWOOD, J. A.; REHM, B. H. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. **Biomacromolecules**, v.10, p.660-669, 2009.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal Molecular Biology**, v.166, p.557-580, 1983.

HOSSEINI, M.; SHOJAOSADATI, S. A.; TOWFIGHI, J. Application of a bubble-column reactor for the production of a single-cell protein from cheese whey. **Industrial and Engineering chemistry research**, V.42, p. 764-766, 2003.

JENDROSSEK, D.; SELCHOW, O.; HOPPERT, M. Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon latum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.586-593, 2007.

JENDROSSEK, D. Fluorescence microscopical investigation of poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in bacteria. **Biomacromolecules**, v.6, p.598-603, 2005.

JENDROSSEK, D. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). **Journal Bacteriology**, v.191, p.3195-3202, 2009.

- JENDROSSEK; SCHIRMER; SCHLEGEL, 1996. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, p.451-463, 1996.
- JIA, Y.; YUAN, W.; WODZINSKA, J.; PARK, C.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Mechanistic studies on class I polyhydroxybutyrate (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: class I and III synthases share a similar catalytic mechanism. **Biochemistry**, v.40, p.1011-1019, 2001.
- JURASEK, L.; MARCHESSAULT, R. H. Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.611-617, 2004.
- KHANNA, S.; SRIVASTAVA, A. K. On-line characterization of physiological state in poly(beta-hydroxybutyrate) production by *Wautersia eutropha*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.157, p.237-243, 2009.
- KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microbiol Technology**, v.27, n.10, Dec, p.774-777, 2000.
- KIM, Y. B.; LENZ, R. W. Polyesters from microorganisms. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.71, p.51-79, 2001.
- KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid synthase (phaC) gene from *Chromobacterium violaceum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.3561-3565, 1999.
- KOLLER, M.; BONA, R.; BRAUNEGG, G.; HERMANN, C.; HORVAT, P.; KROUTIL, M.; MARTINZ, J.; NETO, J.; PEREIRA, L.; VARILA. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. **Biomacromolecules**, v.6, p.561-565, 2005.
- KOLLER, M.; HESSE, P.; BONA, R.; KUTSCHERA, C.; ATLIC, A.; BrauneGG, G. Potential of various archae- and eubacterial strains as industrial polyhydroxyalkanoate producers from whey. **Macromolecular Bioscience**, v.7, p.218-226, 2007.

KOLLER, M.; BONA, R.; CHIellini, E.; FERNANDES, E. G.; HORVAT, P.; KUTSCHERA, C.; HESSE, P.; BRAUNEGG, G. Polyhydroxyalkanoate production from whey by *Pseudomonas hydrogenovora*. **Bioresoursses Technology**, v.99, p. 4854-4863, 2008.

KUCHTA, K.; CHI, L.; FUCHS, H.; POTTER, M.; STEINBUHEL, A. Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. **Biomacromolecules**, v.8, p.657-662, 2007.

LEE, S.Y. Bacterial polyhydroxialkanoates. **Biotechnology and bioengineering**, v.49, p. 1-14, 1996

LEE, I. Y.; KIM, M. K.; PARK, Y. H.; LEE, S. Y. Regulatory effects of cellular nicotinamide nucleotides and enzyme activities on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Bioengineer**, v.52, p.707-712, 1996.

LEE, S. H.; PARK, S. J.; LEE, S. Y.; HONG, S. H. Biosynthesis of enantiopure (S)-3-hydroxybutyric acid in metabolically engineered *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.79, p.633-641, 2008.

LEGAT, A.; GRUBER, C.; ZANGGER, K.; WANNER, G.; STAN-LOTTER, H. Identification of polyhydroxyalkanoates in *Halococcus* and other *haloarchaeal* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.87, p.1119-1127, 2010.

LIMA, B. D. A produção de insulina humana por engenharia genética. **Biociência**, v.23, 2001

LI, Q; CHEN, Q; LI, M; WANG, F.S; SHENG, Q. Pathway engineering results the altered polyhydroxyalkanoates composition in recombinant *Escherichia coli*. **Journal Biotechnology**, v.28, 92-95, 2011.

LI, S. Y.; DONG, C. L.; WANG, S. Y.; YE, H. M.; CHEN, G. Q. Microbial production of polyhydroxyalkanoate block copolymer by recombinant *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.90, p.659-669, 2011.

LU, J.; TAPPEL, R. C.; NOMURA, C. T. Mini-Review: Biosynthesis of poly(hydroxyalkanoates). **Polymers review**, v.49, p. 226-248, 2009.

LUENGO, J. M.; GARCIA, B.; SANDOVAL, A.; NAHARRO, G.; OLIVERA, E. R. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion Microbiology**, v.6, p.251-260, 2003.

MATSUMOTO, K.; MURATA, T.; NAGAO, R.; NOMURA, C. T.; ARAI, S.; ARAI, Y.; TAKASE, K.; NAKASHITA, H.; TAGUCHI, S.; SHIMADA, H. Production of short-chain-length/medium-chain-length polyhydroxyalkanoate (PHA) copolymer in the plastid of *Arabidopsis thaliana* using an engineered 3-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III. **Biomacromolecules**, v.10, p.686-690, 2009.

MATSUMOTO, K.;KITAGAWA, K.; JO, S.; SONG, Y.; TAGUCHI, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Corynebacterium glutamicum* using propionate as a precursor. **Journal Biotechnology**, v 2, p.144-146, 2011.

MARANGONI, C.; FURIGO, A.; ARAGÃO, G.M.F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with acid propionic feeding. **Process Biochemistry**, v.38, p 137-141, 2002.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.

MULLIS K. B. Recombinant DNA technology and molecular cloning, **Scientific American** 262:36, 1990.

NATH, A.; DIXIT, M.; BANDIYA, A.; CHAVDA, S.; DESAI, A. J. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresources Technology**, v.99, p.5749-5755, 2008.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.63, p.21-53, 1999.

NEUBAUER, P.; HOFMANN, K.; HOLST, O.; MATTIASSON, B.; KRUSCHKE, P. Maximizing the expression of a recombinant gene in

Escherichia coli by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Applied and Environmental Microbiology**, v.36, p.739-744. 1992.

NIKEL, P. I.; PETTINARI, M. J.; MENDEZ, B. S.; GALVAGNO, M. A. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. **International Microbiology**, v.8, p.243-250, 2005.

NIKEL, P. I.; de ALMEIDA, A.; MELILLO, E. C.; GALVAGNO, M. A.; PETTINARI, M. J. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, p.3949-3954, 2006.

NIKEREL, E.; ONER, T. E.; KIRDAR, B.; YILDIRIM, R. Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v.32, p. 1–6, 2006.

OBRUCA, S.; MAROVA, I.; SNAJDAR, O.; MRAVCOVA, L.; SVOBODA, Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1925-1932. 2010.

PARK, S. J.; PARK, J. P.; LEE, S. Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates rich in specific monomers. **FEMS Microbiology Letters**, v.214, p.217-222, 2002.

PETERS, V.; REHM, B. H. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. **FEMS Microbiology Letters**, v.248, p.93-100, 2005.

PETERS, V.; BECHER, D.; REHM, B. H. The inherent property of polyhydroxyalkanoate synthase to form spherical PHA granules at the cell poles: the core region is required for polar localization. **Journal Biotechnology**, v.132, p.238-245, 2007.

POTTER, M.; MADKOUR, M. H.; MAYER, F.; STEINBUCHER, A. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v.148, p.2413-2426, 2002.

POVOLO, S.; TOFFANO, P.; BASAGLIA, M; CASELLA, S. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupriavidus necator* from waste material containing lactose. **Bioresourceteclonology**, v.26, 7902-7907, 2010.

REHM, B. H. Polyester synthases: natural catalysts for plastics. **Biochemistry Journal**, v.376, p.15-33, 2003.

REHM, B. H. e STEINBUCHER, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.25, p.3-19, 1999.

REIMER, L. Transmission Electron Microscopy. 4th Edition, **Springer Verlag**, Berlin, 1997.

REYNOLDS ES The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biology** v. 17, p. 208-212, 1963.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1ª edição, ed. Casa do Pão, Campinas/SP, Brasil, 2005.

RODRIGUES, M. F. DE A.; VICENTE, E. J.; STEINBUCHER, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia isoladocia* generated by homogenization. **FEMS Microbiol Letters**, v.193, p.179-185, 2000.

SALIM, Y. S.; ABDULLAH, A. A.; NASRI, C. S.; IBRAHIM, M. N. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and characterisation of its blend with oil palm empty fruit bunch fibers. **Bioresources Technology**, v.102, p.3626-3628, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, A. A generalized model of plasmid replication. **Biotechnology Bioengineering**, v. 33, p. 1135, 1989.

SANKHLA, I. S.; BHATI, R.; SINGH, A. K.; MALLICK, D. N. Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) co-polymer production from a local isolate, *Brevibacillus invocatus* MTCC 9039. **Bioresource Technology**, v.101, p.1947-1953, 2010.

SATO, S.; ONO, Y.; MOCHIYAMA, Y.; SIVANIAH, E.; KIKKAWA, Y.; SUDESH, K.; HIRAIISHI, T.; DOI, Y.; ABE, H.; TSUGE, T. Polyhydroxyalkanoate film formation and synthase activity during in vitro and in situ polymerization on hydrophobic surfaces. **Biomacromolecules**, v.9, p.2811-2818, 2008.

SERAFIM, L. S.; LEMOS, P. C.; ALBUQUERQUE, M. G.; REIS, M. A. Strategies for PHA production by mixed cultures and renewable waste materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.81, p.615-628, 2008.

SILVA, L. F.; GOMEZ, J. G.; OLIVEIRA, M. S.; TORRES, B. B. Propionic acid metabolism and poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (P3HB-co-3HV) production by *Burkholderia* sp. **Journal Biotechnology**, v.76, p.165-174, 2000.

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.

SOLAIMAN, D. K.; ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.71, p.783-789, 2006.

STEINBÜCHEL, A.; DEBZI, E.M.; MARCHESSAULT, R. H.; TIMM, A. Synthesis and production of poly(3-hydroxyvaleric acid) homopolyester by *Chromobacterium violaceum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p. 443-449, 1993.

STEINBUCHER, A.; HUSTEDEL, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiology Review**, v.10, p.347-50, 1993.

STEINBÜCHER, A.; VALENTIN, H.E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v.128, p.219-228, 1995.

STUBBE, J.; TIAN, J. Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. **Natural Product Report**, v.20, p.445-57, 2003.

STUBBE, J. T., J.; HE, A. SINSKEY, A. J.; LAWRENCE, A. G.; LIU, P. Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm. **Annual Review of Biochemistry**, v.74, p.433-80, 2005

SUDESH, K.; FUKUI, T.; IWATA, T.; DOI, Y. Factors affecting the freeze-fracture morphology of in vivo polyhydroxyalkanoate granules. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.304-311. 2000.

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

SURESH K. M.; MUDLIAR, S. N.; REDDY, K. M.; CHAKRABARTI, T. Production of biodegradable plastics from activated sludge generated from a food processing industrial wastewater treatment plant. **Bioresources Technology**, v.95, p.327-330, 2004.

TIAN, J.; SINSKEY, A. J.; STUBBE, J. Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by transmission electron microscopy. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.3814-3824, 2005.

TSUGE, T. "Metabolic improvement and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 94, n. 6, p. 579-584, 2002

VALAPPIL, S. P.; BOCCACCINI, A. R.; Bucke, C.; Roy, I. Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.91, p.1-17, 2007.

VALENTIN, H. E.; ZWINGMANN, G.; SCHONEBAUM, A.; STEINBUHEL, A. Metabolic pathway for biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*. **European Journal of Biochemistry** v.227, p.43-60, 1995.

VALENTIN, H. E.; MITSKY, T. A.; MAHADEO, D. A.; TRAN, M.; GRUYS, K. J. Application of a propionyl coenzyme A synthetase for poly(3-hydroxypropionate-co-3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5253-5258, 2000.

VERLINDEN, R. A.; HILL, D. J.; KENWARD, M. A.; WILLIAMS, C. D.; RADECKA, I. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal Applied Microbiol**, v.102, p.1437-1449, 2007.

VIITANEN, M. I.; VASALA, A.; NEUBAUER, P.; ALATOSSAVA, T. Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Microbial cell Factories**, v.2, p.2, 2003.

VOLOVA, T. G.; KALACHEVA, G. S.; GORBUNOVA, O. V.; ZHILA, N. O. Dynamics of activity of the key enzymes of polyhydroxyalkanoate metabolism in *Ralstonia eutropha*. **Prikl Biokhim Mikrobiol**, v.40, p.201-209, 2004.

WONG, M. S.; CAUSEY, T. B.; MANTZARIS, N.; BENNETT, G. N.; SAN, K. Y. Engineering poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in *E. coli*. **Biotechnololy Bioengineering**, v.99, p.919-928, 2008.

WONG, H. H.; LEE, S. Y. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50, p.30-33, 1998.

YORK, G. M.; JUNKER, B. H.; STUBBE, J. A.; SINSKEY, A. J.
Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.4217-4226, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A Soluções

Solução de cloreto de cálcio (CaCl₂)

Uma solução de CaCl₂ 0,1 M, foi utilizada para a Preparopreparo das células competentes e transformação. Foram pesados 1,11 g de CaCl₂, dissolvidos em 100 mL de água destilada filtrada e esterilizada.

Solução de tampão Tris-HCl, 1M, pH=8,0

Foram pesados 12,1 g de tris (hidroximetil) amino metano e dissolvidos em 50 mL de água destilada e filtrada. A solução resultante foi levada ao pHmetro. Com agitação constante foi adicionado ácido clorídrico concentrado, gota a gota, até que a solução alcançasse o pH 8,0. Completou-se o volume da solução para 100 mL, com água destilada e filtrada.

Solução de EDTA 0,5M, pH=8,0

Pesou-se 18,6 g do sal dissódico do ácido etileno diamino tetraacético Na₂EDTA e completou-se o volume até 100 mL com uma solução de NaOH 0,5 M. O pH final deverá ser aproximadamente igual a 8,0.

Solução de tampão Tris-EDTA (TE)

Foram misturados 1 mL de tampão tris-HCl (1 M, pH 8,0) e 0,2 mL de EDTA (0,5 M, pH 8,0). O volume da mistura foi completado com água destilada filtrada até 100 mL e posteriormente esterilizada, em autoclave, a 121° C / 1atm/ 15 min.

Solução de DNS

Pesar 2,5 gramas de NaOH de dissolver em 200 ml de água destilada em bloco de aquecimento, adicionar 0,2 g de fenol e 2,5 g de ácido3,5-dinitrosalicílico (C7H4N2O7) DNS (aos poucos para não precipitar), colocar em balão volumétrico e completar com água destilada até um volume final de 250 ml. 0,05 % de sulfito de sódio deve ser adicionado a esta solução no momento da análise.

Solução de tartarato duplo de sódio e potássio

Uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio 40 % foi preparada. 100 g de tartarato duplo de sódio e potássio completados com 250 ml de água destilada em balão volumétrico.

Solução de metanol acidificado

Pesar 0,4 g de ácido benzóico e adicionar 150 ml de ácido sulfúrico e reserve. Em um balão volumétrico de 1L adicione \pm 750 ml de Álcool metílico em banho de gelo, na seqüência vá adicionando aos poucos a solução reservada e agitando, até colocar toda solução reservada e no final com muito cuidado adicione o restante do metanol até completar o balão volumétrico. Procedimento realizado em capela.

APENDICE B Curvas de correlação

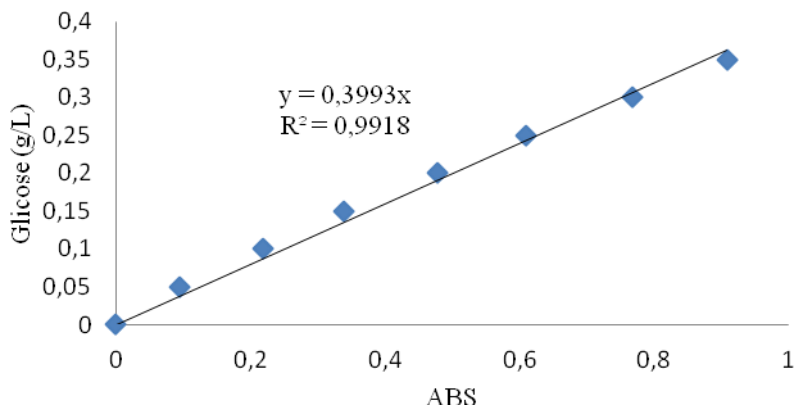


Figura 19 Curva padrão para determinação de glicose

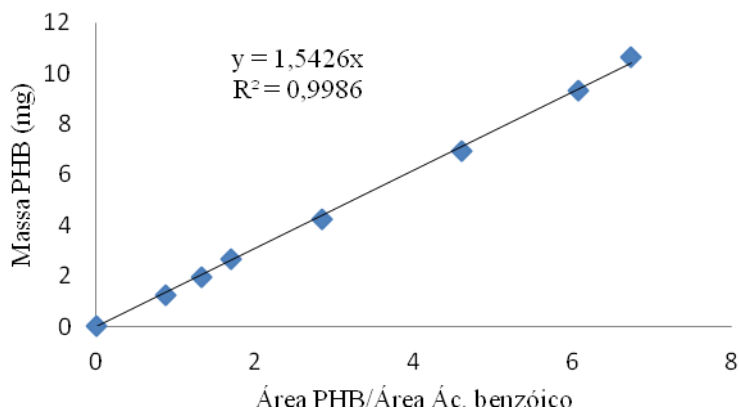


Figura 20 Curva padrão Poli-hidrixibutirato

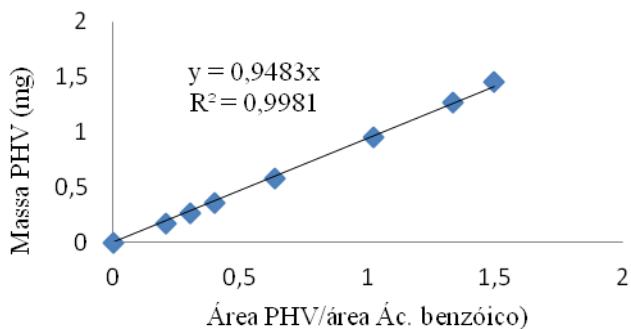


Figura 21 Curva padrão Poli-hidrixivalerato

APÊNDICE C Construção do plasmídeo pRLC2 que contém a PHA sintase de *C. violaceum*

Um esquema simplificado do processo de construção do plasmídeo pRLC2 (que hospeda a PHA sintase de *C. violaceum*) realizado por Bressam, 2007, está esquematizado na Figura 22 e descrito resumidamente nas etapas a seguir.

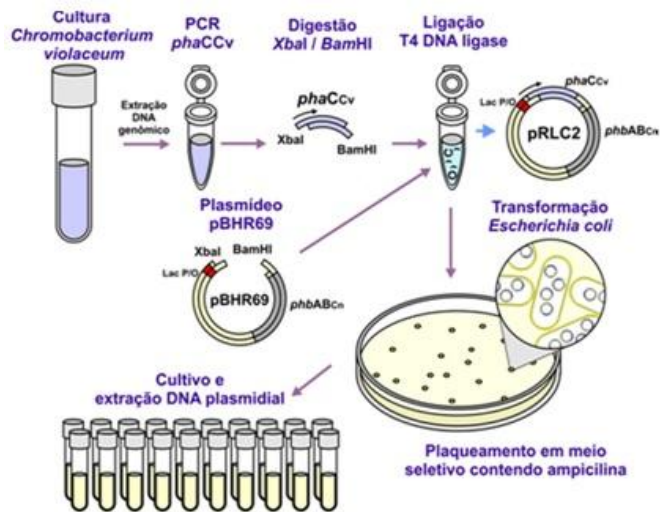


Figura 22 Ilustração esquemática do procedimento experimental adotado para clonagem do gene *phaC* de *C. violaceum* e obtenção da *E. coli* recombinante.

A extração do DNA genômico de *C. violaceum* para foi realizada utilizando-se o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante.

Para amplificação do gene foi desenhado um iniciador direto (CCVF2) em relação a um iniciador reverso previamente existente (CCVR) O desenho do iniciador CCVF2 foi realizado com auxílio de ferramentas de bioinformática.

A purificação do DNA amplificado foi realizada antes dos ensaios enzimáticos, para aumentar a pureza e concentração da solução, uma vez que resíduos de reagentes da PCR, especialmente resíduos da *Taq* DNA polimerase, poderiam comprometer a eficiência das endonucleases de restrição nas etapas subsequentes.

Para a digestão do DNA amplificado e do DNA plasmidial. O DNA foi inicialmente tratado com a enzima *XbaI* e, após precipitação em etanol, tratado então com a enzima *BamHI*.

A adição da enzima *T4* DNA Ligase, produziu-se ligação do gene *phaC* de *C. violaceum* ao plasmídeo já existente (pBHR69), contendo os genes *phaA* e *phaB* de biossíntese de PHA de *C. necator*. Nas etapas subseqüentes ocorre a transformação da *E. coli*. e o plaqueamento para seleção dos recombinantes e extração do DNA plasmidial (descritos no item 4.3 obtenção da bactéria recombinante). A solução plasmidial foi armazenada em freezer -80 °C.