JOHANNA KATHERINE BOCANEGRA RODRIGUEZ

**Produção de Poli-hidroxicarboxilatos por Linhagens
Recombinantes de *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan /IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

São Paulo
2012

JOHANNA KATHERINE BOCANEGRA RODRIGUEZ

**Produção de Poli-hidroxialcanoatos por Linhagens
Recombinantes de *Escherichia coli***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto
Butantan /IPT, para obtenção do Título de Doutor
em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Dr. José Geraldo da Cruz Pradella

Versão corrigida

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bocanegra Rodriguez, Johanna Katherine.

Produção de Polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli* / Johanna Katherine Bocanegra Rodriguez. – São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção de biopolímeros.

Versão do título para o inglês: Production of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli*.

1. Polihidroxialcanoatos 2. Biopolímeros 3. Poli-3-hidroxibutirato 4. *Escherichia coli* I. Pradella, Prof. Dr. José Geraldo da Cruz II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB081/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Johanna Katherine Bocanegra Rodriguez.

Título da Tese: Produção de Polihidroxialcanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli*.

Orientador(a): Prof. Dr. José Geraldo da Cruz Pradella.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome:
 Instituição:

*Áo Cesar,
o motor e o amor da minha vida.*

*Á minha família,
por estar sempre comigo, a pesar da distância.*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor José Gregório Cabrera Gomez, grande exemplo de pesquisador, pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório e especialmente por me transmitir seu valioso conhecimento e orientar meu caminho acadêmico, desde minha iniciação científica até o ultimo momento da realização deste trabalho.

Ao Doutor José Geraldo da Cruz Pradella por aceitar e acreditar em meu trabalho, pelas discussões dos resultados e pelos bons conselhos e disposição para me ajudar.

À Doutora Marilda Keiko Taciro, a quem admiro pela difícil tarefa de ser uma dedicada mãe, esposa e excelente profissional, pela paciência em me explicar todo o relacionado ao biorreator, e por estar sempre disposta a me ajudar e discutir os meus resultados.

À Professora Doutora Luiziana Ferreira da Silva pelo incentivo constante a procurar novos desafios e perspectivas acadêmicas e intelectuais, pelo apoio, e pela colaboração.

À Professora Doutora Julia Pettinari pelos conselhos e ajuda com os experimentos de integração e por me receber no seu laboratório.

Aos colegas do laboratório de bioprocessos, especialmente a Karina, Debora, Kelli, Thati, Eliza e Rogerio pela colaboração e pela ajuda com os longos ensaios em biorreator e especialmente a Daniela Licio pela valiosa amizade.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq pela bolsa concedida.

A mi mamá, Gloria Amparo Rodriguez, por ser mi ejemplo, por estar conmigo en cada etapa de mi vida, por su amor y dedicación que solo una madre podría dar.

A mi adorada familia en Colombia, mi abuelita Hilda, mi tia Yolanda, Cristian, Marcela, Danielito, a quienes extraño a diario, por entender mis decisiones y por apoyarme en todas ellas. Gracias por todo el amor y la fuerza constante para seguir adelante.

À minha segunda família, Julius, Maria eugenia, Felícia, Laila, Leila, Lilian e o Sr. Jose, pelo apoio constante e pelo carinho, e especialmente a quem a pesar do pouco tempo de convivência, foi um grande exemplo de vida, obrigada dona Shirley (*in memoriam*).

Ao Cesar, meu namorado, não só por entender e compreender o tempo que teve que dedicar para realizar e finalizar este trabalho, mas também pelo apoio constante e enorme colaboração, obrigada por estar ao meu lado naquelas noites e fins de semana de trabalho ajudando ou fazendo companhia, e especialmente obrigada por ser minha guia, minha fortaleza, meu amigo, mi compañero, meu amor e por fazer desses dias os mais felizes.

À aquele que com sua energia me brindo proteção e força para terminar este trabalho. Obrigada S.T

A Deus por me dar a oportunidade de viver e realizar meus sonhos.

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar,
mas também acreditar.”
(Anatole France)*

RESUMO

BOCANEGRA RODRIGUEZ, J. K. **Produção de poli-hidroxialcanoatos por linhagens recombinantes de *Escherichia coli***. 2012. 202 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Os Poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados por diversos microorganismos como reserva de carbono e energia, e são considerados a melhor alternativa para o plástico tradicional, devido às suas propriedades biodegradáveis e biocompatíveis. *Escherichia coli* é considerada um hospedeiro ideal para a produção de PHAs, devido a várias vantagens sobre outros microrganismos. Linhagens de *E. coli* foram avaliadas com o intuito de escolher aquela que apresentasse as melhores características como hospedeira dos genes envolvidos na produção dos PHAs. Foram avaliados diferentes plasmídeos abrigando os genes da síntese de P3HB de *C. necator*, e as linhagens recombinantes obtidas, foram avaliadas em frascos agitados e em biorreator. A linhagem *E. coli* LS5218 apresentou os melhores resultados de consumo das fontes de carbono avaliadas, assim como as melhores velocidades de crescimento. Os resultados obtidos a partir dos cultivos em frascos agitados demonstraram que, a linhagem *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::phaCAB', conseguiu produzir P3HB correspondendo a cerca de 40% da massa seca celular (MSC). Cultivos em biorreator realizados sob condições de limitação de oxigênio e controle da alimentação da fonte de carbono e nitrogênio, levaram a um crescimento linear e acúmulo de P3HB simultâneo, correspondendo a cerca de 30% da MSC. Para estes cultivos, foi realizada uma análise dos fluxos metabólicos e foi determinado que existe uma considerável perda de carbono na forma de CO₂, devido ao suprimento de NADPH pela enzima isocitrato desidrogenase. Esta análise aponta que, para se atingir desempenhos melhores, o fluxo na via das pentoses deveria ser aumentado significativamente, de forma a que todo o NADPH necessário para biossíntese de P3HB, fosse suprido por essa via, e, que o fluxo no ciclo de Krebs deveria ser o menor possível suprimindo apenas a demanda de precursores para a biossíntese de biomassa residual. O P3HB-co-3HB foi acumulado por linhagens recombinantes de *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, que é incapaz de metabolizar o propionato, sob a expressão simultânea do operon phaCAB e do gene bktB de *C. necator*. Estas linhagens recombinantes foram submetidas a ensaios de evolução dirigida em acetato e atingiram cerca de 20% da MSC na forma de P3HB e cerca de 4 mol% de 3HV do copolímero. A partir destes resultados, fica evidente que a utilização da linhagem LS5218 é interessante sob o ponto de vista industrial, devido ao fato de ela utilizar eficientemente diferentes fontes de carbono, e ter a capacidade de acumular o P3HB e seu copolímero P3HB-co-3HB.

Palavras-chave: PHAs. Poli-hidroxialcanoatos. Biopolímeros. *Escherichia coli*. Poli(3-hidroxi-3-oxobutirato). Poli(3-hidroxi-3-oxobutirato-co-3-hidroxi-3-oxovalerato).

ABSTRACT

BOCANEGRA RODRIGUEZ, J. K. **Production of polyhydroxyalkanoates by recombinant *Escherichia coli* strains**. 2012. 202 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters accumulated by several microorganisms as a source of carbon and energy, and are considered as the best alternative to the traditional plastic, due to their biocompatible and biodegradable properties. *Escherichia coli* is considered an ideal host for the production of PHAs, due to several advantages over other microorganisms. *Escherichia coli* strains were evaluated in order to choose the one that presented the best characteristics as a host of genes involved in the production of PHAs. Different plasmids harboring the genes of biosynthesis of P3HB of *C. necator* were evaluated. The strain *E. coli* LS5218 showed the best results in terms of consumption of carbon sources tested and the best growth rates. The results obtained from cultivation in shake flasks showed that *E. coli* LS5218 strain harboring pBBR1MCS-2::*phaCAB* was able to produce P3HB corresponding to about 40% of the dry cell mass (DCM). Bioreactors cultivation performed under conditions of limited oxygen supply and feed control of source carbon and nitrogen, led to linear growth and accumulation of P3HB simultaneously, about 30% of (DCM). From these cultures, we performed an analysis of the metabolic flow and was indicated that there is a considerable loss of carbon as CO₂, due to NADPH supply by the enzyme isocitrate dehydrogenase. This analysis shows that to achieve better performance, the flow of the pentose pathway should be substantially increased, in order to all the NADPH necessary for the biosynthesis of P3HB can be supplied by this pathway. Even so, the flow in the Krebs cycle should be as small as possible, only to supply the demand of precursors for the biosynthesis of residual biomass. The P3HB-co-3HB was accumulated by recombinant strains of *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ that is unable to metabolize propionate, under the simultaneous expression of operon *phaCAB* and *bkTB* gene of *C. necator*. These recombinant strains were subjected to directed evolution testing in acetate and reached about 20% of DCM of P3HB and about 4mol% of 3HV in the copolymer. From these results it is evident that the use of LS5218 strain is interesting from the industrial point of view due to the efficient utilization of carbon sources and presenting the capacity to accumulate the P3HB and its copolymer P3HB-co-3HB.

Keywords: PHAs. Polyhydroxyalkanoates. Biopolymers. *Escherichia coli*. Poly (3-hydroxybutyrate). Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate).

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 -	Formula genérica de poli-hidroxiálcanoatos	25
Figura 2.2 -	Estrutura dos diferentes monômeros constituintes dos poli-hidroxiálcanoatos	26
Figura 2.3 -	Via metabólica de síntese de P3HB-co-3HV a partir de carboidratos e ácido propiônico em <i>Cupriavidus necator</i>	29
Figura 2.4 -	Via metabólica de síntese de P3HB a partir de Glicose em <i>E. coli</i> recombinante	34
Figura 3.1 -	Determinação da porcentagem de células carregando o plasmídeo no final do ensaio em biorreator	53
Figura 4.1 -	Perfil da velocidade de crescimento das linhagens de <i>E. coli</i> avaliadas em diferentes fontes de carbono	62
Figura 4.2 -	Cultivo de <i>E. coli</i> XL1-Blue abrigando o plasmídeo pSK ⁺ :: <i>phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose. Ensaio 01- Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	68
Figura 4.3 -	Cultivo de <i>E. coli</i> XL1-Blue abrigando o plasmídeo pSK ⁺ :: <i>phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose e extrato de levedura. Ensaio 02 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	71
Figura 4.4 -	Cultivo de <i>E. coli</i> XL1-Blue abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose. Ensaio 03 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	73
Figura 4.5 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> >< em meio mineral contendo glicose. Ensaio 04 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	76

Figura 4.6 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pBBR1MCS-2::phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose. Ensaio 05 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	78
Figura 4.7 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pBBR1MCS-2::phaCAB`</i> em meio mineral contendo glicose e extrato de levedura. Ensaio 06 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)	80
Figura 4.8 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pSK`::phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose. Ensaio 07 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G) e nitrogênio residual (N)	82
Figura 4.9 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pBBR1MCS-2::phaCAB`</i> em meio mineral contendo glicose. Ensaio 08 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G) e nitrogênio residual (N)	85
Figura 4.10 -	Crescimento celular das linhagens <i>E. coli</i> BL21 <i>pBBR1MCS2::phaCAB`</i> e <i>E. coli</i> LS5218 <i>pBBR1MCS2::phaCAB`</i> medido por Densidade óptica (D.O) dos cultivos	92
Figura 4.11 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pBBR1MCS-2::phaCAB`</i> em meio mineral contendo glicose sem limitação de oxigênio. Ensaio 12 - Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR) e Taxa de produção de CO_2 (CER)	97
Figura 4.12 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídio <i>pBBR1MCS-2::phaCAB`</i> em meio mineral contendo glicose com limitação de oxigênio. Ensaio 13 - Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR) e taxa de produção de CO_2 (CER).....	99

Figura 4.13 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose com limitação de oxigênio. Ensaio 15 - Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR); taxa de produção de CO ₂ (CER) e ácido acético produzido (Ac. Act)	101
Figura 4.14 -	Cultivo de <i>E. coli</i> LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> em meio mineral contendo glicose sem limitação de oxigênio. Ensaio 16 - Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR); taxa de produção de CO ₂ (CER) e ácido acético produzido (Ac. Act)	102
Figura 4.15 -	Rede metabólica representativa da produção de P3HB por <i>E. coli</i> a partir de glicose	107
Figura 4.16 -	Distribuição de fluxos representando <i>E. coli</i> produzindo 16,9% de P3HB.....	108
Figura 4.17 -	Distribuição de fluxos representando <i>E. coli</i> produzindo 50% de P3HB.....	109
Figura 4.18 -	Distribuição de fluxos representando a eficiência máxima teórica de conversão de glicose em P3HB em <i>E. coli</i> . P3HB correspondendo a 16,9% da massa seca celular.....	110
Figura 4.19 -	Distribuição de fluxos representando a eficiência máxima teórica de conversão de glicose em P3HB em <i>E. coli</i> . P3HB correspondendo a 50% da massa seca celular.....	111
Figura 4.20 -	Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; A. 1) Fragmento amplificado de 391 pb da região interna do gene <i>prpC</i> , amostra <i>prpC</i> 1; 2) Amostra <i>prpC</i> 2; 3) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; B. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pSK:: <i>prpC</i> digerido com <i>Sma</i> I; C. 1) Vetor pBBR1MCS-2; 2) Vetor construído: pBBR1MCS-2:: <i>phaCABprpC</i> digerido <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI para visualizar a banda do <i>prpC</i> clonado e, posteriormente, digerido <i>Hind</i> III para visualizar a banda de <i>phaCAB</i> e a do plasmídeo; 3) pBBR1MCS-2:: <i>prpC</i> digerido com as enzimas digerido <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI	114
Figura 4.21 -	Esquema da construção do vetor pBBR1MCS-2:: <i>prpC</i> :: <i>CAB</i>	115

Figura 4.22 -	Placas de crescimento em meio mineral com propionato para a obtenção dos mutantes; 1-2 - Evidência de possíveis mutantes incapazes de crescer meio contendo propionato; 3 - Teste em “Sudan Black” para avaliar o acúmulo dos mutantes escolhidos, controle negativo: Linhagem sem plasmídio, controle positivo: Linhagem com plasmídio.....	116
Figura 4.23 -	Concentração celular (X), percentual da massa seca celular (P3HB %), concentração de glicose residual presente no meio (G) do ensaio 09 avaliando o mutante 45	118
Figura 4.24 -	Crescimento avaliado por medida da Densidade Ótica (DO) para as linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 GSC.....	124
Figura 4.25 -	Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; A. 1) DNA λ digerido com <i>HindIII</i> , Invitrogen; 2) pJM9131 digerido com <i>HindIII</i> ; B. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2-3) pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> digerido <i>HindIII</i> . C. plasmídio pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > <. D. plasmídio pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> `	126
Figura 4.26 -	Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2-3-4) pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > < digerido <i>Apal</i> ; 5) pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ` digerido <i>Apal</i> ..	128
Figura 4.27 -	A. Eletroforeces em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ` digerido <i>XhoI</i> e <i>NcoI</i> ; 3) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 4) pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> >< digerido <i>XhoI</i> e <i>NcoI</i> . <b>B.</b> pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> `. C. pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><	130
Figura 4.28 -	Comparação do perfil de crescimento das linhagens evoluídas em acetato e seus controles.....	140
Figura 4.29 -	Eletroforese de amostras de DNA em gel de agarose 0,8% demonstrativo a construção dos plasmídios <i>pBBR21MCS-5::CB</i> >< e <i>pBBR21MCS-5::CB</i> `. <b>A.</b> 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ><; 3) pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> >< digerido <i>StuI</i> ; 4) pBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> `; 5) BR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ` digerido <i>StuI</i> . <b>B.</b> Esquemas do plasmídio BR1MCS-5:: <i>phaCB</i> ` construído C. Esquema do plasmídio BR1MCS-5:: <i>phaCB</i> >< construído	142

Figura 4.30 - Eletroforeses em gel de agarose 0,8% para confirmação dos transformantes obtidos. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2-3) Transformantes positivos para pBBR1MCS-5:*phaCB*`; 4-6) Transformantes negativos para pBBR1MCS-5:*phaCB*`; 7-9) Transformantes negativos para pBBR1MCS-5::*phaCB*><; 10-11) Transformantes positivos para pBBR1MCS-5::*phaCB*>< **144**

Figura 4.31 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% da confirmação das linhagens transformantes evoluídas e não evoluídas. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2) *E. coli* LS5218 evoluída pBBR1MCS-5::CB>< pBBR1MCS-3::bktB><; 3) *E. coli* LS5218 evoluída pBBR1MCS-5::CB` pBBR1MCS-3::bktB`; 4) *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída pBBR1MCS-5:CB>< pBBR1MCS-3::bktB><; 5) *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída pBBR1MCS-5:CAB` pBBR1MCS-3:bktB` **145**

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 -	Valores de $\mu_{\max}$ (h^{-1}) das linhagens bacterianas de <i>E. coli</i> em meio mineral a partir de diferentes fontes de carbono ...	61
Tabela 4.2 -	Produção de P3HB a partir de diferentes fontes de carbono por <i>E. coli</i> LS5218 pSK ⁺ :: <i>phaCAB</i>	64
Tabela 4.3 -	Produção de P3HB por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> abrigando os plasmídios pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> e pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁻	66
Tabela 4.4 -	Percentual de células resistente a canamicina no final do ensaio 08	84
Tabela 4.5 -	Produção de P3HB em frascos agitados contendo diferentes concentrações de canamicina, pela linhagem <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁻	87
Tabela 4.6 -	Avaliação do efeito do tratamento do inóculo na produção de P3HB em <i>E. coli</i> recombinante	91
Tabela 4.7 -	Produção de P3HB por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> a partir de glicose e frutose, sob a indução do IPTG	94
Tabela 4.8 -	Velocidade de crescimento das linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> cultivadas em glicose e frutose sob a presença do IPTG	94
Tabela 4.9 -	Consumo de glicose e formação de bioprodutos em cultivo de <i>E. coli</i> para produção de P3HB	105
Tabela 4.10 -	Avaliação dos mutantes <i>prpC</i> para produção de PHA	118
Tabela 4.11 -	Avaliação da produção de PHA pelas linhagens recombinantes <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	121
Tabela 4.12 -	Avaliação das linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 GSC	123
Tabela 4.13 -	Avaliação da influência da concentração de gentamicina no meio de acúmulo em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	132
Tabela 4.14 -	Avaliação da influência da concentração de tetraciclina e gentamicina no crescimento e acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ expressando os plasmídios pBBR5: <i>CAB</i> ⁻ pBBR3: <i>bktB</i> ⁻ ou pBBR5: <i>CAB</i> ⁻ pBBR3: <i>bktB</i> ⁻	134

Tabela 4.15 -	Avaliação do acúmulo de PHAs a partir de diferentes concentrações de propionato pela <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ recombinante	136
Tabela 4.16 -	Avaliação do acúmulo de PHAs a partir de diferentes concentrações de propionato pela <i>E. coli</i> LS5218 recombinante	137
Tabela 4.17 -	Produção de PHAs pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> LS5218 expressando os plasmídios pBBR5::CB` e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB` pBBR3::bktB` e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><.....	148
Tabela 4.18 -	Produção de PHAs pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> LS5218 evoluída em acetato expressando os plasmídios pBBR5::CB` e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB` pBBR3::bktB` e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	149
Tabela 4.19 -	Produção de PHAs pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ expressando os plasmídios pBBR5::CB` e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB` pBBR3::bktB` e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><.....	150
Tabela 4.20 -	Produção de PHAs pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato expressando os plasmídios pBBR5::CB` e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB` pBBR3::bktB` e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	151
Tabela 4.21 -	Produção de PHAs pelas linhagens recombinantes <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ evoluídas em acetato com indução de IPTG	152
Tabela 4.22 -	Produção de PHAs pela linhagem recombinante <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato contendo duas β -cetotiolases de <i>Cupriavidus necator</i> e indução de IPTG	153

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 -	Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.....	42
Quadro 3.2 -	Plasmídios utilizados neste estudo.....	43
Quadro 3.3 -	Antibióticos e concentrações utilizados.....	44
Quadro 3.4 -	Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaio 01 a 08 em biorreator.....	50
Quadro 3.5 -	Composição do meio de cultura utilizado nos ensaios 10 e 11 em biorreator.....	51
Quadro 3.6 -	Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios 12 a 16 em biorreator.....	51
Quadro 3.7 -	Condição específica para cada cultivo. Ensaios 12 a 16.....	52
Quadro 3.8 -	Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados.....	56
Quadro 4.1 -	Linhagens recombinantes obtidas após transformação com os plasmídios construídos	131
Quadro 4.2 -	Linhagens recombinantes obtidas após transformação com os plasmídios construídos (<i>pBBR21MCS-5::CB</i>) (<i>pBBR21MCS-3::bktB</i>)	146

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Plásticos como problema ambiental	23
2.2 Poli-hidroxialcanoatos	24
2.3 Metabolismo dos Poli-hidroxialcanoatos	26
2.4 Metabolismo do P3HB	27
2.5 Metabolismo do P3HB-co-3HV	28
2.6 Linhagens recombinantes de <i>Escherichia coli</i>	31
2.6.1 Genes envolvidos na síntese de PHAs expressos em <i>E. coli</i>	33
2.6.2 Engenharia genética em <i>E. coli</i>	35
2.6.3 Resíduos industriais como fontes de carbono para a produção de P3HB por <i>E. coli</i> recombinante	37
2.7 Produção de P3HB em biorreator por <i>E. coli</i> recombinante	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados	42
3.2 Antibióticos	44
3.3 Meios de cultura	44
3.4 Condições de cultivo em frascos agitados	46
3.4.1 Cultivos em frascos agitados com tratamento do inóculo	46
3.4.2 Cultivos em frascos agitados sem tratamento do inóculo	46
3.4.3 Cultivos em frascos agitados com adição de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)	46
3.4.4 Cultivos em frascos agitados com adição de propionato	47
3.4.5 Cultivos de Evolução dirigida em meio mineral contendo acetato	47
3.5 Condições de cultivo em biorreator	47
3.5.1 Preparo do inóculo	47
3.5.2 Condições do cultivo em biorreator	48
3.5.3 Condições do cultivo em biorreator dos ensaios 01 a 09	48
3.5.4 Condições do cultivo em biorreator dos ensaios 10 a 16	48
3.5.5 Avaliação de fluxos metabólicos	49
3.6 Determinação do percentual de células carregando o plasmídio no final dos ensaios em biorreator	52

3.7 Manipulações com DNA	53
3.7.1 Extração de DNA genômico e plasmidial	53
3.7.2 Digestão de DNA	53
3.7.3 Ligação de fragmentos de DNA	54
3.7.4 Transformação bacteriana	54
3.7.4.1 Preparo de células competentes	54
3.7.4.2 Transformação bacteriana por choque térmico	54
3.7.4.3 Transformação bacteriana por eletroporação	55
3.7.4.3.1 Preparo de células electrocompetentes	55
3.7.4.3.2 Eletroporação	55
3.8. Integração do operon <i>phaCAB</i> no genoma da <i>Escherichia coli</i>	56
3.8.1 Amplificação do gene <i>prpC</i>	56
3.8.2 Construção do vetor <i>pBBR1MCS-2::prpC phaCAB</i>	57
3.8.3 Obtenção de mutantes <i>prpC</i>	57
3.9 Métodos analíticos	58
3.9.1 Determinação da massa seca celular	58
3.9.2 Concentração de carboidratos	58
3.9.3 Teor e composição do polímero	58
3.9.4 Concentração de nitrogênio amoniacal	59
3.9.5 Concentração de ácido acético	59
3.10 Preservação de linhagens bacterianas	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1 Avaliação preliminar de linhagens bacterianas de <i>Escherichia coli</i> .	61
4.1.1 Avaliação da capacidade de acúmulo de P3HB pela linhagem <i>E. coli</i> LS5218 utilizando o vetor de expressão <i>pSK::phaCAB</i>	63
4.1.2 Avaliação da capacidade de acúmulo de P3HB pelas linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> XL1Blue, utilizando-se o vetor de expressão <i>pBBR1MCS2</i>	65
4.2 Avaliação das linhagens bacterianas de <i>Escherichia coli</i> em cultivos em biorreator.....	66
4.2.1 Avaliação da linhagem <i>E. coli</i> XL1-Blue	67
4.2.1.1 Ensaio 01 - <i>E. coli</i> XL1-Blue <i>pSK::phaCAB</i>	67
4.2.1.2 Ensaio 02 - <i>E. coli</i> XL1-Blue <i>pSK::phaCAB</i>	70
4.2.1.3 Ensaio 03 - <i>E. coli</i> XL1-Blue <i>pBBR1MCS-2::phaCAB`</i>	72
4.2.2 Avaliação da linhagem <i>E. coli</i> LS5218	74
4.2.2.1 Ensaio 04 - <i>E. coli</i> LS5218 <i>pBBR1MCS-2::phaCAB</i>	74

4.2.2.2 Ensaio 05 – <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB	77
4.2.2.3 Ensaio 06 – <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB`	79
4.2.2.4 Ensaio 07 – <i>E. coli</i> LS5218 pSK::phaCAB	81
4.2.2.5 Ensaio 08 – <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB`	83
4.2.2.6 Avaliação da influência da concentração de canamicina no acúmulo de P3HB na linhagem <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB`	87
4.3 Avaliação do efeito do tratamento do inóculo na produção do P3HB nas linhagens de <i>E. coli</i> BL21 e <i>E. coli</i> LS5218 em frascos agitados.....	90
4.4 Produção de P3HB em linhagens de <i>E. coli</i> recombinante utilizando frutose como fonte de carbono.....	93
4.5 Cultivos em biorreator com limitação de oxigênio (O₂) para a produção de P3HB por <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB`	96
4.5.1 Ensaio sem limitação de oxigênio. <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB` - Ensaio 12	96
4.5.2 Ensaio com limitação de oxigênio. <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB` - Ensaio 13	98
4.5.3 Ensaios com e sem limitação de oxigênio e alimentação constante de glicose e nitrogênio. <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB` - Ensaio 15 – Ensaio 16	100
4.5.4 Análise de fluxos metabólicos da linhagem <i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB` dos ensaios 15 e 16	103
4.6 Integração do operon <i>phaCAB</i> no cromossomo da <i>Escherichia coli</i> LS5218	112
4.6.1 Construção do vetor pBBR1MCS-2::prpC::CAB	114
4.6.2 Obtenção de mutantes deficientes no metabolismo de propionato (<i>prpC</i>)	116
4.6.3 Avaliação dos mutantes nocauteados no gene <i>prpC</i>	117
4.7 Produção do copolímero P3HB-co-HV pela linhagem <i>E. coli</i> LS5218	120
4.7.1 Avaliação das linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 GSC	122
4.7.2 Construção de plasmídeos contendo os genes de biossíntese de PHA de <i>Cupriavidus necator</i>	125
4.7.2.1 Construção de plasmídeos contendo os genes da síntese de P3HB de <i>Cupriavidus necator</i>	125
4.7.2.2 Construção de plasmídeos contendo o gene de biossíntese da <i>BktB</i> de <i>Cupriavidus necator</i>	129
4.7.3 Construção das linhagens recombinantes	131
4.7.3.1 Avaliação do acúmulo de P3HB nas linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e <i>E. coli</i> LS5218 Δ<i>prpC</i> contendo os plasmídios pBBR1MCS-5::phaCAB` e pBBR1MCS-5::CAB><	131

4.7.3.2 Avaliação do acúmulo de P3HB nas linhagem <i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídeos pBBR5::phaCAB' / pBBR5::phaCAB>< e pBBR3::bktB' / pBBR3::bktB><	133
4.7.3.3 Avaliação do acúmulo de PHA nas linhagens <i>E. coli</i> LS5218 e LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídios pBBR1MCS-5::phaCAB' ou pBBR1MCS-5::CAB><. e pBBR1MCS-3::bktB' ou pBBR3::bktB><	135
4.8 Evolução dirigida para a produção do copolímero P3HB-co-3HV por <i>E. coli</i> recombinante	138
4.8.1 Construção dos plasmídeos contendo os genes de expressão de PhaC e PhaB de <i>Cupriavidus necator</i>. pBBR21MCS-5::CB e pBBR21MCS-5::CB'	141
4.8.2 Transformação das linhagens evoluídas com os plasmídeos construídos	144
4.8.3 Avaliação da produção do copolímero P3HB-co-3HV pelas linhagens recombinantes evoluídas	146
5 CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS	163
ANEXOS	174
ANEXO A - Esquemas dos plasmídios utilizados	175
ANEXO B - Seqüenciamento da região interna do gene <i>prpC</i>.....	176
ANEXO C - Ensaios em biorreator - <i>E. coli</i> BL21	178
ANEXO D - Análise de Fluxos	181
ANEXO E - Planilhas dos ensaios em biorreator	187

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os Poli-hidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres acumulados por bactérias, como reserva de carbono e energia, na forma de grânulos intracelulares. Os PHAs têm sido considerados excelentes substitutos dos plásticos sintéticos derivados do petróleo, devido à sua grande similaridade em relação às propriedades mecânicas e ao seu alto grau de biodegradabilidade. *Escherichia coli* é considerada um hospedeiro ideal para a produção de PHAs, devido a várias vantagens sobre outros microrganismos, como a utilização de uma grande variedade de fontes de carbono, fragilidade das células para extração do polímero, a não degradação do PHA, devido à ausência de despolimerases intracelulares, e seu rápido crescimento, sendo, atualmente, uma das bactérias metabolicamente mais estudadas.

Um aspecto relevante para a obtenção de plásticos biodegradáveis de boa qualidade são suas propriedades físicas e químicas, que dependem basicamente da sua composição monomérica, resultando em uma grande variedade de possíveis aplicações. Nossos resultados, obtidos em trabalhos anteriores, que visaram a obtenção de biopolímeros com alta massa molar, demonstraram que, em cultivos em biorreator com pH controlado, em diferentes valores, a linhagem recombinante *E. coli* XL1-Blue pSK⁺::*phaCAB*, abrigando genes de biossíntese de P3HB, foi capaz de acumular cerca de 40% e 25% da massa seca celular na forma de P3HB, a partir de glicose e xilose, respectivamente. Utilizando-se glicose como única fonte de carbono, foi observado crescimento nos três valores de pH avaliados (6,0; 6,5 e 7,0), tendo apresentado valores de teor de polímero acumulado e peso molecular (Mw) bastante semelhantes, correspondendo a 30-35% da massa seca celular e Mw de até 3,0 megaDaltons (MDa). Entretanto, foi demonstrado que a linhagem de *E. coli* utilizada, apresentava limitação no crescimento, não tendo sido possível atingir densidades celulares elevadas. A falta de estratégias otimizadas para produção eficiente de biopolímeros de alta massa molecular a partir de *E. coli* recombinante, têm impedido maiores avanços nos estudos de suas aplicações. Assim, a partir dos dados obtidos nos resultados dos trabalhos anteriores, foi realizada uma análise das condições *in vitro* a serem implementadas em processos de produção, para a síntese e acúmulo de P3HB e seu copolímero P3HB-co-3HV, produzido por linhagens de *E. coli* manipuladas geneticamente e caracterizadas de acordo a sua capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono. Assim, a principal

necessidade foi estabelecer os requisitos necessários, e as possíveis condições ideais de cultivo em biorreator, com o objetivo de compreender o sistema metabólico da *E. coli*, direcionado para a produção de PHA, para, desta forma, atingir uma alta produtividade de P3HB e P3HV-co-3HV, a partir de fontes de carbono renováveis, mediante a otimização dos cultivos em um meio indutor para a produção dos PHAs.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de linhagens recombinantes de *E. coli* como hospedeiras para expressão de genes de biossíntese de PHAs, mediante o entendimento do metabolismo destas linhagens, direcionado à produção e acúmulo dos biopolímeros. Para atingir este objetivo os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Seleção das linhagens de *Escherichia coli* como hospedeiro dos genes da biossíntese de P3HB.
- Construção de vetores de clonagem contendo os genes da biossíntese de P3HB e P3HB-co-3HV e transformação das linhagens de *E. coli* com os plasmídeos obtidos.
- Avaliação das linhagens recombinantes em frascos agitados sob diferentes condições experimentais e determinação da melhor condição de cultivo nos frascos agitados.
- Avaliação das linhagens recombinantes em biorreator e análise da cinética de crescimento, consumo de substratos, produção de metabolitos e acúmulo de P3HB.
- Análise dos fluxos metabólicos da linhagem recombinante que apresentou os melhores resultados de acúmulo nos ensaios em biorreator.
- Integração do operon *phaCAB* no cromossoma da *E. coli* e avaliação dos mutantes obtidos.
- Avaliação dos recombinantes obtidos para a produção de P3HB-co-3HV.
- Ensaios de evolução dirigida para o melhoramento da produção de P3HB-co-3HV nas linhagens recombinantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plásticos como problema ambiental

Os plásticos desempenham papéis importantes em todas as situações da vida diária, no entanto, com o aumento do preço do petróleo e as preocupações sobre o aquecimento global, plásticos convencionais feitos a partir de petroquímicos, enfrentam hoje dois grandes desafios: a maioria destes plásticos não são biodegradáveis e representam recursos não renováveis em um curto espaço de tempo. Estima-se que cerca de 150 milhões de toneladas de plásticos são produzidos por ano (SHANG et al., 2012) e pelo menos 25 milhões de toneladas destes plásticos são descartados para a biosfera, representando uma ameaça aos componentes bióticos e abióticos do ambiente (COELHO et al., 2010). Como alternativa ao uso de plásticos de base petroquímica, não biodegradáveis, as atenções estão cada vez mais voltadas aos plásticos ecológicos biodegradáveis, que podem ajudar a superar alguns problemas de poluição e reduzir a dependência do petróleo.

Os avanços da ciência e tecnologia exigem uma variedade de novos polímeros com bom desempenho e baixo custo. Plásticos biodegradáveis são uma via atrativa para gestão de resíduos e podem substituir polímeros convencionais quando a recuperação para reciclagem ou incineração é difícil e não rentável (CAMARGO et al., 2012). A Biotecnologia industrial envolve a utilização de microrganismos ou enzimas para a produção de uma grande variedade de produtos bioquímicos, desenvolvendo uma bio-economia que pode substituir partes da economia petroquímica atual. Muitos polímeros naturais, dependendo de suas propriedades químicas, térmicas e mecânicas, se apresentam excelentes candidatos para a produção de novas formulações de plástico para diversas aplicações.

Os poliésteres microbianos, conhecidos como poli-hidroxialcanoatos (PHAs), têm atraído muita atenção nos últimos anos como uma alternativa para a substituição de plásticos derivados do petróleo, devido à sua termoplasticidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e diversas propriedades mecânicas, além de serem produzidos a partir de recursos renováveis (LAN et al., 2011). Porém, atualmente, uma grande desvantagem para a comercialização destes produtos é o

seu preço elevado em comparação com os materiais plásticos convencionais baseados em petroquímicos.

Alcançar um preço competitivo na produção de poli-hidroxicarboxilatos em bactérias, em comparação com a produção petroquímica, é um dos grandes objetivos nos dias de hoje. Embora os plásticos produzidos por bactérias tenham um custo de produção mais elevado, estes possuem pelo menos duas vantagens sobre os equivalentes petroquímicos que hoje dominam o mercado, eles são biodegradáveis e podem ser produzidos utilizando matérias primas renováveis.

A demanda do mercado para o produto é, portanto, suficiente para justificar a sua produção, e várias empresas produzem atualmente este biopolímero. Assim, uma utilização mais elevada depende da diminuição dos custos de produção. Por ser um produto intracelular, sua recuperação contribui significativamente para o seu custo final. Neste processo são utilizados diversos tipos de solventes orgânicos, muitos deles prejudiciais ao meio ambiente. Sendo assim, o desenvolvimento de um processo que permita uma recuperação simples, eficiente e menos poluidora, mediante o uso de solventes menos tóxicos, destes biopolímeros, a partir de microrganismos, é uma proposta atraente, assim como a utilização de substratos de baixo custo e o desenvolvimento de linhagens modificadas geneticamente, mediante estudos do metabolismo celular.

2.2 Polihidroxicarboxilatos

Os Poli-hidroxicarboxilatos (PHAs) são poliésteres acumulados por bactérias como reserva de carbono e energia na forma de grânulos intracelulares. Estes polímeros são acumulados, na maioria dos microorganismos, quando ocorre uma limitação no crescimento celular pela falta de pelo menos um nutriente essencial para sua multiplicação (Nitrogênio, fósforo, magnésio, ferro, etc.) ou em condições limitantes de oxigênio, e um excesso da fonte de carbono (ANDERSON; DAWES, 1990; KIM et al., 1997; LAGEVEEN et al., 1998; YAGI et al., 1996). Existe uma ampla variedade de PHAs produzidos por diversas espécies de microrganismos, sendo que pelo menos 150 diferentes monômeros já foram identificados como constituintes de PHAs sintetizados por bactérias (LUENGO et al., 2003). Os grânulos acumulados têm um diâmetro de 0,2 μm a 0,7 μm e estão rodeados por uma camada proteica de 3 a 4 nm de espessura. Estes grânulos podem representar até

80% da massa seca celular (SUDESH; ABE; DOI, 2000). A fórmula genérica dos PHAs é apresentada na Figura 2.1. O radical R pode ser um átomo de hidrogênio ou uma cadeia com até 16 átomos de carbono contendo insaturações, ramificações ou outros átomos como bromo, flúor ou cloro.

A conformação da estrutura desta cadeia lateral depende tanto do microorganismo produtor como da fonte de carbono usada para a síntese dos PHAs. As propriedades físicas e químicas dos PHAs dependem basicamente da sua composição monomérica e são classificados em termoplásticos e elastômeros. Os termoplásticos são os PHAs de cadeia curta, que, em geral, representam materiais mais rígidos enquanto que os elastômeros são os PHAs de cadeia média e possuem propriedades de maior flexibilidade (STEINBÜCHEL, 1991).

Figura 2.1 - Fórmula genérica de polihidroxicanoatos.

Fonte: Modificado de Ojumo et al. (2004).

As unidades constituintes dos PHAs estão divididas em dois grupos. O primeiro grupo é conhecido como hidroxicanoatos (HAs) de cadeia curta (do inglês HA_{SCL} – “Hydroxyacids of Short-Chain-Length”), que compreende monômeros de hidroxicanoatos contendo de 3 a 5 átomos de carbono; e o segundo grupo, conhecido como HAs de cadeia média (do inglês HA_{MCL} – “Hydroxyacids of Medium-Chain-Length”), correspondem a monômeros contendo de 6 a 16 átomos de carbono (STEINBÜCHEL; VALENTIN, 1995). Alguns exemplos de HA_{SCL} e HA_{MCL}, estão apresentados na Figura 2.2.

Os microrganismos produtores de PHAs também estão classificados de acordo com o tipo de PHAs que são capazes de acumular. Dentro do grupo de microrganismos que acumulam PHAs contendo monômeros de cadeia curta, o principal produtor e mais estudado é *Cupriavidus necator*, anteriormente denominado como *Hydrogenomonas eutropha*, *Alcaligenes eutrophus* *Ralstonia eutropha* e *Wautersia eutropha* (VADNAMME; COENYE, 2004). Por outro lado, dentro do grupo de microrganismos que têm a capacidade de acumular PHAs

contendo monômeros de cadeia média, o gênero *Pseudomonas* tem sido o mais estudado, sendo *P. putida*, e *P. aeruginosa* as mais analisadas (SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Figura 2.2 – Estrutura dos diferentes monômeros constituintes dos polihidroxicanoatos.

(A-B) HA_{SCL} . (C-D-E) HA_{MCL} . A. (3-hidroxi butirato), B. (3-hidroxi valerato), C. (3-hidroxi hexanoato), D. (3-hidroxi octanoato), E. (3-hidroxi decanoato).

Fonte: Modificado de Lee e Choi (1999).

2.3 Metabolismo dos Polihidroxicanoatos

A síntese e incorporação na cadeia polimérica dos monômeros que constituem os PHAs dependem do substrato fornecido, das vias metabólicas e das enzimas, como a Pha sintase, existentes nos microrganismos que acumulam estes biopolímeros. Fazem parte do metabolismo dos PHAs, importantes vias metabólicas como a via dos ácidos tricarboxílicos (TCA), degradação oxidativa de ácidos graxos (β -Oxidação) e a biossíntese de ácidos graxos como precursores, além da utilização de metabólitos como acetil-CoA e equivalentes redutores como NADPH (ALDOR; KEASLING, 2003).

Todas as bactérias hoje conhecidas como produtoras de PHAs possuem a enzima PHA sintase, que cataliza a formação de ésteres por meio da polimerização dos monômeros de (*R*)-3-hidroxiacil-CoAs na cadeia de PHA que está sendo formada, sendo esta considerada a enzima chave na síntese dos PHAs. Existem diversas classes de PHA sintases que se diferenciam principalmente na estrutura protéica, pelo número de subunidades e pela especificidade pelo substrato. Com

base nesta diferenciação, as PHA sintases foram classificadas em quatro grupos. PHA sintases da classe I - são compostas por uma única unidade polipeptídica (codificadas pelo gene *phaC*) e apresentam especificidade por HA_{SCL}. PHA sintases da classe II – são constituídas de uma única unidade polipeptídica e apresentam especificidade por HA_{MCL}. PHA sintases das classes III e IV - são formadas por duas subunidades protéicas diferentes (PhaC e PhaE ou PhaC e PhaR) e apresentam especificidade por HA_{SCL} (REHM, 2003).

Além da utilização das vias metabólicas comuns em bactérias para a síntese dos hidroxiaçil-CoAs, também participam enzimas específicas para a síntese de HAs, diferentes da PHA sintase (GOMES, 2000). Dentro das vias metabólicas de síntese dos PHAs, as rotas biossintéticas do poli-3-hidroxibutirato (P3HB) e o copolímero poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (P3HB-co-3HV) têm sido as mais estudadas.

2.4 Metabolismo do P3HB

O P3HB foi o primeiro PHA descoberto por Lemoigne em 1926, mas, só na década de 1950 foi reconhecida sua função como reserva de carbono e energia, sendo hoje um dos PHAs mais estudado e melhor caracterizado (LENZ; MARCHESSAULT, 2005). A via metabólica para a produção de P3HB de *Cupriavidus necator* é a mais estudada. Além deste microrganismo, diversas bactérias têm a capacidade de sintetizar o P3HB (STEINBÜCHEL, 1991).

A síntese de P3HB em *Cupriavidus necator* ocorre a partir de acetil-CoA (intermediário entre as vias de degradação de carboidratos e a via dos ácidos tricarboxílicos) e envolve três etapas metabólicas (Figura 2.3). Inicialmente, duas moléculas de acetil-CoA são condensadas pela ação da enzima β -cetotiolase (PhaA), formando acetoacetil-CoA; posteriormente o acetoacetil-CoA é reduzido a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA pela ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB) e, finalmente, o monômero (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA é incorporado à cadeia polimérica em crescimento pela ação da PHA sintase (PhaC) (ANDERSON; DAWES, 1990; STEINBÜCHEL, 1991).

Os genes que codificam as enzimas (β -cetotiolases) (*phaA*), acetoacetil-CoA redutase NADPH-dependente (*phaB*) e PHA sintase (*phaC*) que participam da síntese do P3HB em *Cupriavidus necator*, assim como em muitas outras bactérias,

encontram-se organizados no operon – *phaCAB* (SCHUBERT; KRÜGER; STEINBÜCHEL, 1991).

2.5 Metabolismo do P3HB-co-3HV

Quando fontes adicionais de carbono, como o ácido propiônico ou valérico, são fornecidas ao meio de cultura, torna-se possível sintetizar unidades de 3HV que, posteriormente, são incorporadas ao copolímero P3HB-co-3HV.

A síntese do P3HB é iniciada pela condensação de duas moléculas de acetil-CoA, enquanto que a síntese das unidades de 3HV requer a condensação de acetil-CoA com propionil-CoA. (SLATER et al., 1999). A biossíntese de P3HB-co-3HV em bactérias envolve duas vias paralelas (Figura 2.3), por um lado, a formação de monômeros C4 (3-hydroxybutirato) (3HB), e, por outro lado, a formação de um monômero C5 (3-hidroxicaproato) (3HV) (CHEN et al., 2011). Inicialmente, a enzima β -cetotiolase condensa uma molécula de propionil-CoA, proveniente de um co-substrato como o propionato, com uma molécula de acetil-CoA, proveniente do metabolismo de carboidratos, formando assim, 3-Cetovaleril-CoA.

Paralelamente, a β -cetotiolase codificada pelo gene *phaA*, realiza a condensação de duas moléculas de acetil-CoA, formando uma molécula de acetoacetil-CoA. Posteriormente, a enzima 3-cetoacil-CoA redutase, dependente de NADPH, reduz tanto o 3-Cetovaleril-CoA como o acetoacetil-CoA, formando (*R*)-3-hidroxicaproil-CoA e (*R*)-3-hidroxybutiril-CoA, respectivamente. Finalmente, a enzima PHA sintase, incorpora estas duas moléculas sintetizadas [(*R*)-3-hidroxicaproil-CoA e (*R*)-3-hidroxybutiril-CoA] à cadeia polimérica em crescimento, formando, assim, o copolímero P3HB-co-3HV (SLATER et al., 1999, 1998).

Quando glicose e ácido propiônico são fornecidos como substratos, a linhagem *Cupriavidus necator* consegue sintetizar o copolímero P3HB-co-3HV, sendo possível controlar a fração molar de 3HV no copolímero, em função da proporção de glicose e ácido propiônico que é fornecida.

Os genes que codificam estas proteínas em *C. necator*, residem em um operon que foi bem caracterizado e, posteriormente, clonado e expresso em *Escherichia coli* (PEOPLES; SINSKEY 1989; SCHUBERT; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1988).

Figura 2.3 - Via metabólica de síntese de P3HB-co-3HV a partir de carboidratos e ácido propiônico em *Cupriavidus necator*.

Fonte: Modificado de Gomez (2000).

Ensaio de produção do biopolímero na *E. coli* recombinante, apresentaram um alto teor de acúmulo de P3HB (90% da massa seca celular), no entanto, o polímero produzido por *E. coli* não apresentou níveis detectáveis de 3HV quando a cultura foi cultivada no mesmo esquema que induz a incorporação de 3HV em *C. necator* (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992).

Estudos posteriores identificaram a existência de outras enzimas que participam no metabolismo do copolímero, especificamente três β-cetotiolases expressas constitutivamente em *C. necator*. Os autores demonstraram que a enzima PhaA (β-cetotiolase) codificada pelo gene *phaA* é pouco eficiente na tiólise de β-cetovaleril-CoA, e, determinaram que *C. necator* expressa duas β-cetotiolases, além da PhaA, e, também, que estas enzimas adicionais, designadas como BktB e BktC utilizam eficientemente β-cetovaleril-CoA.

Os genes que codificam as duas enzimas (*bktB* e *bktC*) foram isolados e caracterizados, tendo sido estabelecido que a enzima BktB é a principal responsável pela geração de β -cetovaleril-CoA, que é de grande importância para a síntese de unidades de 3HV. Já a β -cetotiolase, codificada pelo gene *bktC*, parece ser um contribuinte menos ativo para a formação de β -cetovaleril-CoA. Estudos em *E. coli* também demonstraram que BktB pode complementar PhaA, na produção do copolímero P3HB-co-HV, em um sistema recombinante (SLATER et al., 1998).

Outros estudos têm desenvolvido várias estratégias para aumentar a produção do copolímero em *C. necator* ou nas linhagens recombinantes de *E. coli*. Yim et al. (1996) demonstraram que *E. coli* recombinante, abrigando os genes da biossíntese de P3HB de *Cupriavidus necator*, é capaz de produzir P3HB-co-HV a partir de glicose e propionato e, que, as concentrações de 3HV no copolímero aumentaram quando a cultura foi induzida com acetato, sugerindo, desta forma, que as enzimas envolvidas no metabolismo de acetato poderiam facilitar a utilização de propionato.

Diferentes enzimas envolvidas na incorporação e utilização do propionato também têm sido foco de estudo. A enzima propionil-CoA sintetase codificada pelo gene *prpE* é a responsável pela síntese de propionil-CoA (precursor para a formação de 3HV) a partir da ativação do propionato.

Foi demonstrado que a superexpressão do gene *prpE*, que codifica a propionil-CoA sintetase, em linhagens recombinantes de *E. coli*, aumentou a fração molar de 3HV no copolímero, em até 25% mol (ALDOR; KEASLING, 2003); e, que a expressão heteróloga do operon *phaCAB*, e o gene *prpE*, com diferentes níveis de indução em *E. coli* recombinante, poderia levar à biossíntese de P3HB-co-HV, com várias frações molares de 3HV (WONG et al., 2008).

A enzima propionato permease, codificada pelo gene *prpP*, envolvida na incorporação de propionato também foi clonada e expressa na *E. coli* recombinante, juntamente com o operon *phaCAB*, para poder avaliar os efeitos no conteúdo de 3HV no copolímero sintetizado (LIU et al., 2009).

Recentemente, Chiem et al. (2012) clonaram e expressaram os genes *prpP* e *prpE*, proveniente de *C. necator* e de *Cupriavidus taiwanensis*, respectivamente, em *E. coli*, contendo o operon *phaCAB* de *C. necator*. Foram avaliadas diferentes composições no meio de cultura, que incluíram o uso de diferentes fontes de carbono (acetato de sódio, piruvato de sódio e gluconato de sódio) junto com o

propionato, com a finalidade de avaliar se a produção do P3HB-co-3HV poderia ser melhorada, mas nenhum deles provou ser melhor do que a glicose utilizada como fonte de carbono. Foram ajustadas as concentrações de extrato de levedura e propionato no meio de cultura, tendo sido demonstrado que elevadas concentrações de extrato de levedura reduzem a fração de 3HV no P3HB-co-3HV produzido; por conseguinte, através do ajuste da concentração do extrato de levedura no meio, foi possível modificar a fração de 3HV no copolímero sintetizado (CHIEM et al., 2012).

Como uma alternativa mais econômica para a produção do P3HB-co-3HV, vem sendo estudada a produção do copolímero a partir de uma fonte de carbono não relacionada. Restou demonstrado, em estudos anteriores, que P3HB-co-3HV poderia ser produzido a partir de substratos independentes de propionato por *Cupriavidus necator* e *Escherichia coli* recombinante. No entanto, a fração molar de 3HV no copolímero demonstrou ser muito baixa (STEINBÜCHEL; PIEPER, 1992). Utilizando-se linhagens de *E. coli* foi possível sintetizar o copolímero através da via da treonina, porém, não foi possível produzir uma alta fração molar do 3HV no copolímero, a menos que um aminoácido exógeno fosse alimentado, tornando assim, o processo ainda mais custoso (ESCHENLAUER et al., 1996).

Em estudos recentes, foi proposta a biossíntese do copolímero, a partir de uma única fonte de carbono não relacionada, através da via biossintética da treonina em linhagens recombinantes de *E. coli* (CHEM et al., 2011). Para aumentar a fração molar de 3HV no copolímero, os autores superexpressaram a treonina deaminase, que é o fator chave para a produção de propionil-CoA, a partir de diferentes substratos, bem como interromperam as vias que competem com a via de produção do copolímero, para a utilização do propionil-CoA. Contudo, foi possível produzir P3HB-co-HV com uma fração molar de 3HV em torno de 17.5 mol%, porém, com baixas concentrações do polímero total produzido.

2.6 Linhagens recombinantes de *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo pertencente à família das enterobacteriaceae. São elas aeróbias facultativas, podendo crescer tanto na presença e na ausência de oxigênio (PINSKE et al., 2011).

A *E. coli* é, atualmente, utilizada por muitas instituições de pesquisa e empresas em todo o mundo como sendo um organismo base para o desenvolvimento de produtos biológicos e bioquímicos em altas quantidades (VICKERS et al., 2012).

Comparado com outros microrganismos recombinantes, *E. coli* é um dos mais atraentes, por ser hoje uma das bactérias mais conhecidas geneticamente e bioquimicamente. Atualmente, existe uma riqueza de conhecimentos e ferramentas abrangentes para sistemas de clonagem e expressão em *E. coli*, assim como diferentes linhagens com características específicas, que permitem a implementação de várias tecnologias para a elaboração de produtos recombinantes a nível industrial. Além disso, é vantajoso utilizar linhagens de *E. coli*, para a produção em escala industrial, devido ao seu rápido crescimento, baixo custo do processo, facilidade de escalonar o processo e pela capacidade de sintetizar produtos recombinantes com alto rendimento e qualidade, além do fato de ter sido utilizada exitosamente para expressar uma ampla gama de proteínas recombinantes (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Embora a *E. coli* não seja uma produtora natural de PHAs, considera-se um hospedeiro ideal para sua produção, devido a diversas vantagens em relação às linhagens selvagens produtoras do biopolímero (JIAN et al., 2010).

Algumas das vantagens incluem a capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono de baixo custo (HORNG et al., 2011; LO et al., 2011), e seu rápido crescimento, permitindo atingir densidades celulares mais elevadas, bem como a realização de cultivos em alta densidade celular para várias linhagens de *E. coli* (CHEN et al., 2011; LEE, 1996; SHILOACH; FASS, 2005). Além disso, as linhagens de *E. coli* apresentam a capacidade de acumular um alto teor de polímero, devido à falta do sistema de despolimerização intracelular, que está presente nas linhagens selvagens, fazendo, desta forma, com que o polímero acumulado não seja posteriormente degradado (HORNG et al., 2011; LI et al., 2007).

Outra vantagem importante é a fragilidade da parede celular, uma vez que facilita o processo de extração, purificação e recuperação do polímero, característica tal que permite a redução do custo final de produção dos PHAs (HORNG et al., 2011; JIAN et al., 2010).

2.6.1 Genes envolvidos na síntese de PHAs expressos em *E. coli*

Os genes que codificam as enzimas que participam da biossíntese de P3HB em *C. necator*, organizados no operon *phaCAB*, foram clonados e expressos em *E. coli* pela primeira vez na década de 80 (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SCHUBERT; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1988; SLATER et al., 1988). A partir destes estudos, foi possível demonstrar a produção de PHAs por organismos recombinantes, e, desde então têm sido desenvolvidas inúmeras pesquisas, que levam à otimização do processo de produção destes biopolímeros em linhagens de *E. coli* recombinante. A via metabólica principal para a produção de P3HB por linhagens recombinantes de *E. coli*, a partir de glicose, esta representada na Figura 2.4

Os genes responsáveis pela biossíntese de PHAs a partir de vários microrganismos, tais como *Pseudomonas aeruginosa* (LANGENBACH; REHM; STEINBÜCHEL, 1997), *Alcaligenes latus* (CHOI; LEE; HAN, 1998), *Thiocapsa pfennigii* (LIU; STEINBÜCHEL, 2000), *Azotobacter* sp (NIKEL et al., 2006) e *Streptomyces aureofaciens* (MAHISHI; TRIPATHI; RAWAL, 2003), também foram clonados e expressos em *E. coli*. Na maioria dos casos, estes genes biossintéticos foram expressos sob o controle dos seus promotores originais, e, as linhagens recombinantes resultantes foram capazes de acumular PHAs a partir de diferentes fontes de carbono.

Choi et al. (1998) clonaram e expressaram os genes da biossíntese de P3HB de *Alcaligenes latus* em linhagens recombinantes de *E. coli*, desenvolvendo um modelo de produção mais eficiente do que aquele obtido quando as linhagens recombinantes albergaram os genes de *C. necator* (CHOI; LEE; HAN et al., 1998). Posteriormente, um fragmento de DNA genômico de aproximadamente 5.0 kb, de *Streptomyces aureofaciens* foi clonado em um plasmídeo e transferido para *E. coli*. A linhagem recombinante, utilizando diversas fontes de carbono como glicose, glicerol, óleo de palma, e etanol, acumulou quase 28 vezes mais P3HB do que a linhagem selvagem *S. aureofaciens* (MAHISHI; TRIPATHI; RAWAL, 2003; RAMACHANDER et al., 2002).

Figura 2.4 - Via metabólica de síntese de P3HB a partir de Glicose em *E. coli* recombinante.

Fonte: Modificado de Hong et al. (2003).

A produção de PHAs de cadeia média (PHA_{MCL}) também foi estudada em linhagens recombinantes de *E. coli*. Em 1992 foi possível realizar a expressão do operon proveniente da *P. aeruginosa*, contendo dois genes da PHA_{MCL}-sintase, um gene que expressa uma PHA depolimerase e dois genes reguladores em *E. coli* (TIMM; STEINBÜCHEL, 1992). Porém, só em 1997 foi possível desenvolver, com êxito, a primeira produção de PHA_{MCL} em linhagens recombinantes de *E. coli*, que foi conseguida utilizando-se linhagens deficientes na oxidação de ácidos graxos (mutantes *E. coli fadB*) (LANGENBACH; REHM; STEINBÜCHEL, 1997; QI; REHM; STEINBÜCHEL, 1997). Posteriormente, a co-expressão de vários genes em *E. coli* (*paaG*, *paaF*, e *ydbU*) aumentou, em quase o dobro, a produção de PHA_{MCL} obtida por mutantes de *E. coli fadB*, que expressaram os genes da *P. aeruginosa* (PARK; LEE, 2004).

Ren et al. (2005) investigaram a expressão de dois genes *phaC1* e *phaC2* que codificam duas polimerases da *Pseudomonas putida*, em *E. coli*. Os autores determinaram ser necessária a expressão dos dois genes em *E. coli*, para obter uma produção significativa de PHAs; além disso, desenvolveram um sistema, no qual a expressão dos genes *phaC* foi controlada por um promotor heterólogo forte, a partir de um plasmídeo de baixo número de cópias, com a finalidade de atingir uma produção de PHA estável em *E. coli* (REN et al., 2005).

Davis et al. (2008) demonstraram a produção de um copolímero de P(3HB) e (PHA_{MCL}) em *Escherichia coli*, a partir da expressão dos genes de *Pseudomonas aeruginosa*, *phaC1* e *phaJ1*, que codificam uma PHA sintase e uma enoil-CoA hidratase, respetivamente, sob a regulação do promotor *lacZ*. A fim de melhorar o rendimento e a qualidade do PHA, foram expressos também os genes *phaA* (β -cetotiolase) e *phaB* (cetoacil-CoA redutase NADPH dependente) de *Bacillus* sp. A *E. coli* recombinante, cultivada em vários ácidos graxos, juntamente com glicose, acumulou o biopolímero em torno de 28% e 34% do peso seco celular (DAVIS et al., 2008).

2.6.2 Engenharia genética em *E. coli*

Um dos maiores desafios, para conseguir um ótimo acúmulo do biopolímero em linhagens recombinantes de *E. coli*, é a expressão estável dos genes da síntese de PHAs durante os diferentes cultivos. Portanto, se faz necessária, a utilização de

vetores de expressão estáveis, que gerem um alto número de cópias. Foi demonstrado que um dos fatores importantes, que afeta a estabilidade do plasmídeo, é a condição do cultivo.

A fim de avaliar as mudanças nos números de cópias dos plasmídeos e as atividades enzimáticas, durante um cultivo alimentado e seu efeito sobre a síntese e acúmulo do P(3HB), foram realizados diversos estudos em linhagens recombinantes de *E. coli* (KIDWELL; VALENTIN; DENNIS, 1995; LEE et al., 1994; YU et al., 2003).

Embora a estabilidade e construção plasmidial sejam fatores importantes para a produção de PHAs por *E. coli* recombinante, existem outros fatores que podem afetar esta produção, como por exemplo o acetil-CoA, que é um elemento intermediário essencial, pode aumentar diretamente a formação de 3-hidroxibutiril-CoA. Outro fator importante, é a disponibilidade do NADPH, necessária para a produção destes biopolímeros. Portanto, a inativação, superexpressão ou deleção de alguns genes que intervenham direta ou indiretamente neste processo, podem favorecer a disponibilidade destes co-substratos ou co-fatores essenciais (KABIR; SHIMIZU, 2003; MIYAKE et al., 2000).

A enzima PHA sintase (*phaC*) tem uma ampla especificidade pelo substrato, de forma que ela pode incorporar a cadeia polimérica em formação, precursores como 3-hidroxibutiril-CoA, 3 hidroxipropionil-CoA (3HP-CoA), 3-hidroxivaleril-CoA, bem como 4-hidroxibutiril-CoA (4HB-CoA), para, assim, permitir a formação dos diferentes copolímeros, como o P3HB-co-3HV ou o Poli(3-hidroxipropionato-co-4-hidroxibutirato). Além da disponibilidade das vias metabólicas, que conduzem a formação destes copolímeros, devem ser suplementados os substratos que permitam a síntese destes precursores, como por exemplo, a glicose e o propionato (ESCHENLAUER et al., 1996; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992).

Neste contexto, a manipulação da expressão gênica, permite também a obtenção de quantidades maiores do copolímero. No caso do copolímero contendo unidades 3HP, este pode ser obtido na presença do propionato, por co-expressão do gene *prpE*, que codifica uma propionil-CoA sintetase (WONG et al., 2008). O copolímero contendo unidades 4HB, também pode ser obtido por co-expressão do gene *orfZ*, que codifica uma 4-hidroxibutiril-CoA transferase do *Clostridium kluyveri* (HEIN et al., 1997; VALENTIN et al., 2000).

2.6.3 Resíduos industriais como fontes de carbono para a produção de P3HB por *E. coli* recombinante

Entre as estratégias utilizadas para diminuir o custo de produção dos biopolímeros, a partir de linhagens recombinantes de *E. coli*, a utilização de resíduos da indústria agrícola, ricos em carbono, vem atraindo a atenção de muitos pesquisadores. A produção de PHAs, a partir de uma fonte de carbono de baixo custo, é necessária para reduzir o custo de produção destes biopolímeros. Avaliações econômicas da produção de PHAs, envolvendo diversas fontes de carbono, utilização de linhagens recombinantes ou produção de polímeros específicos, são realizadas continuamente a fim de tornar o produto final economicamente mais competitivo (CHOI; LEE 2000; LEE 1998; RAICHER 2011). Avaliações econômicas do processo de produção de P3HB demonstraram que o custo da matéria prima (fonte de carbono) contribui significativamente para o custo total do processo, podendo atingir entre 40% e 50% do custo total (CHOI; LEE 1997; KIM, 2000).

Linhagens recombinantes de *E. coli* têm a capacidade de utilizar substratos de baixo custo, derivados de práticas agrícolas, tais como soro de leite (SOLAIMAN et al., 2006; WONG; LEE 1998), melaço de cana e beterraba (LIU et al., 1998), hidrolisados de hemicelulose (LEE, 1998), hidrolisado de amido e óleos vegetais (FONSECA; DE ARRUDA-CAULKINS; ANTONIO, 2008), entre outros. A maioria destes substratos se trata de mistura de açúcares (glicose, xilose ou sacarose) e/ou ácidos graxos. A *E. coli* tem a capacidade de selecionar, a partir de uma mistura de fontes de carbono, aquela que lhe proporciona uma maior taxa de crescimento (LI et al., 2007).

Estudos em que foi utilizado glicerol como fonte de carbono, também foram desenvolvidos em linhagens recombinantes de *E. coli*. O glicerol constitui cerca de 10% do produto da síntese do biodiesel, assim, tornou-se um resíduo poluente. Fato este que levou a possibilitar a utilização desta fonte de carbono como uma alternativa de substrato econômico para a produção de biopolímeros. Cultivos em microaerobiose, utilizando glicerol como fonte de carbono, atingiram teores de 51% e rendimentos de 10,81 g L⁻¹ de P3HB em linhagens de *E. coli* recombinante *arcA* (NIKEL et al., 2008). Estudos posteriores utilizando linhagens de *E. coli*, abrigando os genes da biossíntese de P3HB de *Azotobacter* SP., demonstraram que em

condições de agitação reduzida e, utilizando o glicerol como fonte de carbono, foi possível atingir 30,1% e 4,75 g L⁻¹ de peso seco celular de P3HB (DE ALMEIDA et al., 2010).

A *E. coli* recombinante, abrigando os genes da biossíntese de P3HB de *Cupriavidus necator*, foram avaliadas em meios suplementados com diferentes hidrolisados ricos em nitrogênio e com xilose como fonte de carbono. O teor de P3HB acumulado por *E. coli*, a partir de xilose em cultivo suplementado com hidrolisado de soja, atingiu 73,9% da massa seca celular, com um fator de conversão de xilose em P3HB de 0,23 g/g, e, uma produtividade volumétrica de 0,07 g/L.h. (LEE, 1998).

Fonseca et al. (2008) avaliaram a produção de P3HB por *E. coli* recombinante em meios mínimos e meios complexos, utilizando amido de milho hidrolisado e óleo de soja como alternativa de co-substratos, e soro de queijo como suplemento. Os resultados demonstraram que é possível produzir um polímero com as características físico-químicas semelhantes aos polímeros comerciais, utilizando meios definidos (1.29 g L⁻¹ P3HB), meios complexos (1.63 g L⁻¹ P3HB), e substratos de baixo custo, sendo, deste modo, uma alternativa economicamente mais vantajosa (FONSECA; DE ARRUDA-CAULKINS; ANTONIO, 2008).

O soro de leite, co-produto da indústria de laticínios, é considerado um substrato adequado para a produção de PHAs. Este soro é o principal subproduto da fabricação de queijo, representando entre 80% e 90% do volume de leite transformado. Contém ele, aproximadamente 4,5% (w/v) de lactose, 0,8% (w/v) de proteína, 1% (w/v) de sais, e 0,1-0,8% (w/v) de ácido láctico (NIKEL et al., 2005).

Várias linhagens recombinantes de *E. coli*, contendo os genes de biossíntese de P3HB de *C. necator*, foram construídas a fim de comparar sua capacidade de sintetizar P3HB em um meio definido, com soro de leite, como única fonte de carbono. A maior concentração e conteúdo de P3HB obtidos, foram 5,2 g/L e 81% do peso seco celular, respectivamente (LEE; MIDDELBERG; LEE, 1997).

Posteriormente, Wong e Lee (1998) demonstraram pela primeira vez que o P3HB podia ser produzido eficientemente, a partir de soro de leite em cultivos de alta densidade, utilizando-se linhagens de *E. coli* recombinantes. Neste estudo, a *E. coli*, abrigando um plasmídio de elevado número de cópias, contendo os genes de *C. necator*, para a síntese de P3HB, foi utilizada para a produção do polímero, a

partir de soro de leite. A massa seca celular e a concentração de P3HB foram de 109 g.l⁻¹ e 50 g.l⁻¹, respectivamente (WONG; LEE, 1998).

Ahn et al. (2001) desenvolveram uma estratégia para a produção de P3HB, a partir de soro de leite, em linhagens recombinantes de *E. coli*. Nestes cultivos, os pesquisadores obtiveram um teor de polímero de 87% de massa seca celular, com uma concentração de 168 g l⁻¹, tendo sido utilizada uma solução de soro de leite concentrada.

2.7 Produção de P3HB em biorreator por *E. coli* recombinante

A produção de biopolímeros em biorreator é, basicamente, desenvolvida mediante duas estratégias, quais sejam, cultivos descontínuos e cultivos contínuos. Dentro da estratégia de cultivo descontínuo, destacam-se os cultivos descontínuos cíclicos e cultivos descontínuos alimentados (*fed batch*), também conhecidos como batelada alimentada (CARVALHO; SATO, 2001).

Os processos descontínuos operam em sistemas fechados, de modo que o substrato é adicionado ao início do processo e os produtos são retirados ao fim do mesmo (DORAM, 1998). No decorrer do processo nada é adicionado, exceto em processos aeróbios, em que, devido à baixa solubilidade do oxigênio no meio aquoso, este deve ser adicionado de forma contínua (na forma de ar) enquanto é eliminado o dióxido de carbono e outros gases produzidos no processo (CARVALHO; SATO, 2001; DORAM, 1998). Portanto, os cultivos descontínuos são descritos como sendo processos em que o volume, no decorrer da reação, permanece constante, ou seja, não há adição de soluções para o controle do processo nem perda de líquido por evaporação (CARVALHO; SATO, 2001).

Processos descontínuos alimentados são definidos como uma técnica, na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator, durante o cultivo, sendo que os produtos nele permanecem até o final do processo. Nesses cultivos, a alimentação do nutriente se realiza de maneira intermitente ou contínua, com a finalidade de controlar a concentração de substrato no biorreator, iniciando com uma solução diluída de substrato e acrescentando-se mais nutrientes, conforme avança a conversão, controlando assim, as velocidades de crescimento (CARVALHO; SATO, 2001; DORAM, 1998).

O P3HB e seu copolímero P3HB-co-3HV têm sido eficientemente produzidos em cultivos descontínuos alimentados, utilizando-se diferentes fontes de carbono, a partir de linhagens selvagens, produtoras destes polímeros, como a linhagem *Burkholderia sacchari* (PRADELLA; TACIRO; PATAQUIVA, 2010; ROCHA et al., 2008).

A produção de P3HB a partir de *E. coli* recombinante, é realizada frequentemente, em cultivo descontínuo alimentado (AHN; PARK; LEE, 2000, 2001; ARIFIN et al., 2011; CHOI; LEE; HAN, 1998; KIM; LEE; CHANG, 1992; WANG; LEE, 1997).

O acúmulo de P3HB a partir de *E. coli* recombinante, em processos descontínuos alimentados, consiste em um desbalanceamento nutricional no meio de cultura inicial, em que um dos nutrientes, imprescindível ao crescimento, torna-se limitante, geralmente, após a primeira fase de crescimento celular, conhecida como fase exponencial. A fonte de carbono é mantida em excesso durante todo o cultivo, mediante a alimentação descontínua, promovendo o acúmulo do polímero nas células. Os cultivos contínuos realizados para produção de P3HB consistem em uma alimentação de modo contínua da fonte de carbono, de forma que, tanto o crescimento celular como o acúmulo do polímero, seja contínuo, mediante uma relação carbono/nutriente adequada para o acúmulo e crescimento (TACIRO, 2008).

Os primeiros processos realizados em biorreator, utilizando linhagens recombinantes de *E. coli*, foram cultivos descontínuos alimentados, visando a produção de P3HB (KIM; LEE; CHANG, 1992). Posteriormente, estes processos foram desenvolvidos por vários grupos de pesquisa, com o objetivo de melhorar a produtividade do biopolímero. A *E. coli*, contendo os genes biossintéticos de P3HB de *C. necator* atingiu uma produtividade de P3HB, a partir de glicose, de aproximadamente $2,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (LEE et al., 1994). Wang e Lee (1997) verificaram que uma das razões da reduzida produção de P3HB se devia à filamentação celular; no entanto, mediante a superexpressão de uma proteína essencial da divisão celular em *E. coli*, FtsZ, a filamentação foi diminuída, e a linhagem recombinante atingiu uma produtividade de $3,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de P3HB, em um processo descontínuo alimentado. Mais tarde, o mesmo processo foi melhorado ($4,63 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), com a expressão dos genes da síntese de P3HB de *A. latus* em *E. coli* (CHOI; LEE; HAN, 1998), indicando que a otimização do processo em biorreator poderia ser melhorado, levando em conta aspectos genéticos, e, dessa forma, tornando o processo ainda

mais econômico. Processos descontínuos alimentados utilizando linhagens de *E. coli* recombinante, vêm sendo realizados a partir de diversos substratos (AHN; PARK; LEE, 2000, 2001; ARIFIN et al., 2011) sendo que, algum deles, visando a obtenção de altas densidades celulares (WANG; LEE, 1998).

A síntese de P3HB, ou do copolímero P3HB-co-3HV, em biorreatores, têm sido amplamente estudada, levando inclusive à implantação de diversos processos de produção industrial e escala piloto em biorreatores de até 300 litros (CHOI et al., 2002; PARK; PARK; LEE, 2002).

A otimização de qualquer bioprocesso pode ser conduzida pela modificação de um fator de cada vez, ou por alteração de vários fatores ao mesmo tempo, examinando-se os seus efeitos e interações, por meio de análise estatística e análise metabólica. Assim, a otimização do meio de fermentação é incluído na análise estratégica de viabilidade do processo biotecnológico.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e plasmídios utilizados

As linhagens bacterianas e plasmídios utilizados neste trabalho estão descritos nos Quadros 3.1 e 3.2.

Quadro 3.1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

Linhagem	Características	Origem/Referência
<i>E. coli</i> LS5218	<i>fadR601, atoC2(Con)</i>	(SPRATT; GINSBURGH; NUNN, 1981)
<i>E. coli</i> BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B -m _B -) <i>gal</i>	Stratagene
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 <i>gyrA96</i> (nal ^R) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'</i> [::Tn10 <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>)M15] <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)	Stratagene
<i>E. coli</i> LS5218 Δ <i>prpC</i>	<i>fadR601, atoC2(Con)</i>	(BABA et al., 2006) Keio collection
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	Bethesda Research Laboratories

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Quadro 3.2 - Plasmídios utilizados neste estudo.

Plasmídeo	Característica	Origem/Referência
pJM9131	Plasmídio abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>C. necator</i>	(KIDWELL; VALENTIN; DENNIS, 1995)
pGEM® – T Easy	<i>lacPOZ'</i> , <i>mcs</i> , <i>Amp^r</i> , pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	Promega
pBluescript SK ⁻	<i>Ap^r</i> , <i>lacPOZ'</i> , MCS	Stratagene
pSK ⁻ :: <i>phaCAB</i>	Derivado de pBluescript SK ⁻ abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>C. necator</i>	(GARCÍA; GARZÓN, 2002)
pBBR1MCS-2	<i>Km^r</i> , <i>lacPOZ'</i> , MCS, Mob	(KOVACH et al., 1995)
pBBR1MCS-3	<i>Tr^r</i> , <i>lacPOZ'</i> , MCS, Mob	(KOVACH et al., 1995)
pBBR1MCS-5	<i>Gm^r</i> , <i>lacPOZ'</i> , MCS, Mob	(KOVACH et al., 1995)
pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i>	Derivado de pBBR1MCS-2, abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>C. necator</i>	(GOMES, 2010)
pBBR1MCS-2:: <i>prpC</i>	Derivado de pBBR1MCS-2, abrigando o fragmento do gene <i>prpC</i> <i>E. coli</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>prpC-phaCAB</i>	Derivado de pBBR1MCS-2, abrigando o fragmento do gene <i>prpC</i> <i>E. coli</i> e o operon <i>phaCAB</i> de <i>C. necator</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-2:: <i>bktB</i>	Derivado de pBBR1MCS-2, abrigando o gene <i>bktB</i> de <i>C. necator</i>	(GOMES, 2010)
pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i>	Derivado de pBBR1MCS-5, abrigando o operon <i>phaCAB</i> de <i>C. necator</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-5:: <i>phaCB</i>	Derivado de pBBR1MCS-5, abrigando o operon <i>phaCB</i> de <i>C. necator</i>	Este trabalho
pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i>	Derivado de pBBR1MCS-3, abrigando o gene <i>bktB</i> de <i>C. necator</i>	Este trabalho

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

3.2 Antibióticos

As soluções de antibióticos empregadas foram preparadas de acordo com Sambrook e Russell (2001) e filtradas em membrana com porosidade 0,22 µm, estéril. Alíquotas de soluções estoque de antibióticos foram mantidas a -22 °C, e, quando necessário, adicionadas aos meios de cultura após esterilização e resfriamento destes a 50 °C. As concentrações dos antibióticos foram utilizadas conforme Quadro 3.3.

Quadro 3.3 - Antibióticos e concentrações utilizados.

Antibiótico	Solução estoque (mg/mL)	Concentração final (µg/mL) no meio de cultivo
Ampicilina (Ap)	100 (em H ₂ O bidestilada)	100
Canamicina	50 (em H ₂ O bidestilada)	50
Gentamicina	15 (em H ₂ O bidestilada)	15
Tetraciclina	12,5 (em H ₂ O bidestilada)	12,5

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

3.3 Meios de cultura

A composição dos meios sólidos é idêntica à dos meios líquidos acrescidos de 15 g/L de ágar-ágar. As soluções de sais e os meios de cultura foram esterilizados em autoclave, por 20 min, a 121 °C, 1 atm.

Meio Luria-Bertani – (LB) (SAMBROOK et al., 1989)

Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
NaCl	5 g/L
H ₂ O q.s.p.	1000 mL

Meio Mineral (MM)

Cada litro do meio sintético continha a seguinte base de sais (RAMSAY et al., 1990).

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,0 g
Na_2HPO_4	3,5 g
KH_2PO_4	1,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
Citr. Fe NH_4	0,06 g
Solução elementos traços	1,0 mL

Cada litro da solução de elementos traços continha:

H_3BO_3	0,30 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,20 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,10 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,01 g

Meio Mineral M9 (SAMBROOK et al., 1989)

Na_2HPO_4	20,0 g
KH_2PO_4	3,0 g
NH_4Cl	1,0 g
NaCl	0,5 g

Foi adicionada a seguinte solução, esterilizada por filtração. Utilizaram-se filtros de 0,22 μm .

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 ml 1M
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1 ml 1M
Thiamina – HCl	1,0 ml 1M

3.4 Condições de cultivo em frascos agitados

Os ensaios em frascos agitados foram realizados em MM ou M9 a 37 °C e 150 rotações por minuto (rpm). As fontes de carbono utilizadas foram glicose, xilose, glicerol e frutose na concentração de 15 g/L.

3.4.1 *Cultivos em frascos agitados com tratamento do inóculo*

Culturas mantidas em freezer a -80 °C foram estriadas em LB sólido e cultivadas por 24 horas em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram cultivadas em meio LB a 37 °C, durante 12 horas a 150 rpm. Após crescimento, o cultivo foi centrifugado (4000 rpm por 10 minutos a -4 °C) e ressuspensão em solução salina 0,85%. Este procedimento foi repetido por duas vezes e, finalmente, uma alíquota do pellet final, ressuspensa em solução salina, foi adicionada ao meio de mineral.

3.4.2 *Cultivos em frascos agitados sem tratamento do inóculo*

Culturas mantidas em freezer a -80 °C foram estriadas em LB sólido e cultivadas por 24 horas em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram cultivadas em meio LB a 37 °C, durante 12 horas a 150 rpm. Após crescimento, um volume de 5 mL da cultura em meio LB, correspondente a 10% do volume final do cultivo, foi utilizado para inocular 50 mL de MM ou M9, adicionado diretamente ao meio de cultura.

3.4.3 *Cultivos em frascos agitados com adição de Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)*

Quando necessário, o IPTG foi adicionado ao meio de cultura, a uma concentração final de 5 mM, após 4 horas do início do cultivo.

3.4.4 Cultivos em frascos agitados com adição de propionato

Quando necessário, o propionato foi adicionado ao meio de cultura, a uma concentração final de 0,25; 0,5 ou 1,0 g/L, após 24 horas do início do cultivo.

3.4.5 Cultivos de Evolução dirigida em meio mineral contendo acetato

Culturas mantidas em freezer a -80 °C foram estriadas em LB sólido e cultivadas por 24 horas em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram cultivadas em meio LB a 37 °C, durante 12 horas a 150 rpm. Após crescimento, o cultivo foi centrifugado (4000 rpm - 10 minutos – 4 °C) e ressuspensão em 3 ml de solução salina 0,85%. Posteriormente, 1 mL da massa celular, ressuspensa em solução salina, foi adicionada a 25 mL de MM contendo 1 g/L de acetato, a fim de se obter uma DO inicial de aproximadamente 0,1, e cultivado a 37 °C e 150 rpm. Este cultivo foi Após evidência de crescimento, avaliada por turbidez do meio, um mL do cultivo anterior foi adicionado a um novo MM contendo 1 g/L de acetato. Este procedimento foi realizado durante uma semana e, posteriormente, a concentração de acetato no MM foi aumentada para 2 g/L. Repasses neste meio foram realizados continuamente durante 60 dias, e o tempo entre cada repasse foi determinado pela avaliação da velocidade de crescimento, mediante determinação da densidade óptica (DO₆₁₀). Controles de contaminação em meio sólido LB, foram realizados continuamente, assim como controles de crescimento em meio sólido MM contendo 2 g/L de acetato.

3.5 Condições de cultivo em biorreator

3.5.1 Preparo do inóculo

Pré-inóculo: Culturas mantidas em freezer a -80 °C foram estriadas em LB sólido e cultivadas por 24 horas em estufa a 37 °C. Colônias isoladas provenientes do meio sólido foram utilizadas para inocular 25 mL de meio LB, e foram cultivadas a 37°C, durante 12 horas a 150 rpm em agitador rotativo.

Inóculo: O volume total do pré-inóculo foi utilizado para inocular 250 mL de MM, sendo adicionado diretamente ao meio de cultura. Foi adicionada uma solução

concentrada de glicose (250 g/L) para obter uma concentração final de 15 g/L. As células foram, então, cultivadas a 37 °C, durante 14 horas a 150 rpm em agitador rotativo. Após o crescimento, o cultivo foi utilizado para inocular o meio do biorreator, representando uma fração de inóculo de 10%.

3.5.2 Condições do cultivo em biorreator

Todos os ensaios em biorreator foram realizados com pH e temperatura controlados a 7,0 e 37 °C, respectivamente. Para o controle de pH foram utilizadas soluções de NaOH e H₂SO₄ 0,5 N, sendo o consumo acompanhado com auxílio de balança. Os ensaios foram realizados em biorreator B. Braun modelo Biostat B (2,5 L), com dorna de 4 litros. Amostragens periódicas foram realizadas para a análise de: biomassa celular, teor e composição de PHA, concentração das fontes de carbono, nitrogênio e ácidos, segundo as metodologias descritas na seção 3.10. O controle de possíveis contaminantes, ao longo dos ensaios, também foi realizado através de observação microscópica de lâminas coradas (coloração de Gram), e estrias em placas com meio sólido LB e o respectivo antibiótico.

3.5.3 Condições do cultivo em biorreator dos ensaios 01 a 09.

Nestes cultivos, o oxigênio dissolvido foi mantido acima de 30% de saturação mediante aumento manual da agitação, e fornecimento de ar atmosférico, em uma vazão aproximada de 2 litros por minuto (lpm), controlado pelo biorreator. As concentrações de cada componente do meio de cultura utilizado para cada ensaio estão listadas no Quadro 3.4.

A glicose foi alimentada a partir de uma solução concentrada de 500 g/L, sempre que o aumento no valor do oxigênio dissolvido indicava exaustão da fonte de carbono, ou por determinação da concentração residual de glicose no meio de cultura, mediante análise por cromatografia líquida (HPLC).

3.5.4 Condições do cultivo em biorreator dos ensaios 10 a 16

Para estes cultivos, o biorreator foi acoplado a analisadores de CO₂ e O₂ do gás de saída do biorreator, da marca Applikon, para realização do balanço gasoso e

a um fluxômetro de massa marca Bronkhorst High – Tech B.V serie E-7000, para o controle da vazão de ar comprimido. O oxigênio dissolvido, quer seja a 1% ou acima de 30% de saturação, foi controlado mediante aumento da agitação, de forma automática (1%), ou manual (30%), bem como o fornecimento de ar atmosférico foi controlado em 1 lpm pelo fluxômetro de massa.

Para alimentação da solução concentrada de glicose e nitrogênio, quando necessário, utilizaram-se bombas peristálticas Masterflex, modelo 77800-60. A composição do meio de cultura para os ensaios 10 e 11 está listada no Quadro 3.5. A composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios 12, 13, 14, 15 e 16 está listada no Quadro 3.6. A condição específica do cultivo, para cada ensaio, está listada no Quadro 3.7.

3.5.5 Avaliação de fluxos metabólicos

A rede metabólica foi constituída, considerando as seguintes vias metabólicas: via Embden-Meyerhof-Parnas, via das Pentoses, complexo piruvato desidrogenase, ciclo de Krebs, ciclo do glioxilato, carboxilação do piruvato, descarboxilação do oxaloacetato, síntese de acetato e P3HB a partir de acetil-CoA, síntese de biomassa residual. A composição da biomassa residual foi aquela apresentada por Neidhardt et al. (1990). Para a determinação dos modos elementares foi utilizado o programa Metatool (PFEIFFER et al., 1999).

Quadro 3.4 – Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaio 01 a 08 em biorreator.

Composição (g/L) / (mL)	Ensaio								
	01	02	03	04	05	06	07	08	09
Na ₂ HPO ₄	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512
NH ₄ Cl	2,72	2,72	2,72	2,72	2,72	2,72	2,72	-	2,72
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	3,37	-
NaCl	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extrato de levedura	-	-	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KH ₂ PO ₄ ^a	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488	0,488
MgSO ₄ . 7 H ₂ O 20% ^{ab}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CaCl ₂ . 2 H ₂ O 1% ^{ab}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Cit, Fe NH ₄ 6% ^{ab}	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Sl, Elm, Traços ^{ab}	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Tiamina (10 mg/ml) ^{BC}	2,5	2,5	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina 100 mg/ml ^{bc}	1,0	-	1,0				1,0		-
Canamicina 50 mg/ml ^{bc}	-	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	-

a: Autoclavados separadamente

b: Soluções adicionadas em ml/L

c: Esterilizadas por filtração (filtro 0,22 µm)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Quadro 3.5 – Composição do meio de cultura utilizado nos ensaios 10 e 11 em biorreator.

Composição	g/L ou mL/L
Na ₂ HPO ₄	0,512
NH ₄ CL	2,8
NaCL	0,5
Cit. Fe NH ₄	0,1008
MgSO ₄	1,2
Sl. Elm. Traços ^{ab}	10
CaCl ₂ 1% ^{ab}	1
KH ₂ PO ₄ ^a	1,22
Acido Cítrico 20% ^{ab}	21
Tiamina ^c	0,005
Canamicina 50 mg/ml ^{bc}	1,0
Glicose inicial ^a	15

a: Autoclavados separadamente

b: Soluções adicionadas em mL/L

c: Esterilizadas por filtração (filtro 0,22µm)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Quadro 3.6 – Composição dos meios de cultura utilizados nos ensaios 12 a 16 em biorreator.

Composição g/L ou mL	Ensaio	
	12 – 13 - 14	15 - 16
Na ₂ HPO ₄	0,512	0,512
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,37	0,5
NaCL	0,5	0,5
Extrato de levedura	1	1
KH ₂ PO ₄ ^a	0,488	0,488
MgSO ₄ 7 H ₂ O 20% ^{ab}	1,0	1,0
CaCl ₂ 2 H ₂ O 1% ^{ab}	1,0	1,0
Sl, Elm. Traços ^{ab}	2,0	2,0
Canamicina 50 mg/ml ^{bc}	1,0	1,0
Glicose Inicial ^a	15	5

a: Autoclavados separadamente

b: Soluções adicionadas em mL

c: Esterilizadas por filtração (filtro 0,22µm)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Quadro 3.7 – Condição específica para cada cultivo. Ensaios 12 a 16.

Ensaios	Condição	
	O ₂ dissolvido (% saturação)	Alimentação
12	>30	Pulsos
13	1,0	Pulsos
14	1,0	Pulsos
15	1,0	Contínua ^a
16	>30	Contínua ^a

a: A concentração da glicose e do sulfato de amônio na solução de alimentação corresponderam a 200 g/L e 25,1 g/L, respectivamente, correspondendo a 5,33 g/L de nitrogênio.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

3.6 Determinação do percentual de células carregando o plasmídeo no final dos ensaios em biorreator

Foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}), de uma amostra retirada sob condições asépticas, no final do ensaio em biorreator. Placas com meio sólido LB contendo ou não canamicina, foram divididas em 4 quadrantes, sendo que 25 μ L de cada uma das diluições, foi semeada em um dos 4 quadrantes da placa com meio sólido LB, com o sem canamicina. Posterior ao cultivo em estufa a 37 °C, por 24 horas, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônia para cada quadrante, em cada uma das placas semeada. Assim, segundo a equação (1), foi determinada a concentração de células resistentes a canamicina no final do ensaio em biorreator. A Figura 3.1 esquematiza o procedimento deste experimento.

$$\frac{\text{Células viáveis}}{\text{mL}} = \frac{\sum \text{UFC} \times 40}{\text{Diluição}} \quad (1)'$$

Figura 3.1 – Determinação da concentração de células carregando o plasmídio no final do ensaio em biorreator.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

3.7 Manipulações com DNA

3.7.1 Extração de DNA genômico e plasmidial

Para extração e purificação do DNA genômico bacteriano, utilizou-se o *kit* DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, São Paulo, S.P., Brasil), conforme instruções do fabricante.

Para extração e purificação do DNA plasmidial bacteriano utilizou-se o *kit* QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

3.7.2 Digestão de DNA

Nas reações de digestão de DNA, para cada 1 µL de DNA, utilizaram-se 1 - 2 unidades da enzima, de forma que esta representasse no máximo 10% do volume. As reações de digestão ocorreram de acordo com a temperatura e tempo especificadas pelo fabricante (Invitrogen, São Paulo, S.P., Brasil; New England Biolabs (NEB), São Paulo, S.P., Brasil; Fermentas, São Paulo, S.P., Brasil; Promega, São Paulo, S.P., Brasil).

3.7.3 Ligação de fragmentos de DNA

As reações de ligação dos fragmentos de DNA foram realizadas, utilizando-se a enzima DNA ligase do bacteriófago T4 (Invitrogen - NEB), de acordo com a indicação do fabricante.

3.7.4 Transformação bacteriana

3.7.4.1 Preparo de células competentes

As linhagens de *E. coli* utilizadas neste estudo foram inoculadas em 25 mL de meio LB contendo MgCl_2 10 mM e MgSO_4 10 mM e sempre que necessário, o antibiótico apropriado. Foram incubadas em agitador rotativo a 37 °C até uma densidade óptica (DO_{610}) de 0,3 - 0,5. Em tubos estéreis, foram centrifugados 8 mL da cultura por 15 min, 4000 rpm, 4 °C; a massa células resultante foi ressuspensa com 4 mL de tampão de transformação. As células foram mantidas por 15 minutos em gelo e novamente centrifugadas. Para obtenção das células competentes, a massa de células foi ressuspensa em 0,8 mL do tampão de transformação, dividida em alíquotas de 200 μL e mantida em banho de gelo. As células foram utilizadas imediatamente ou estocadas até o dia seguinte em refrigerador doméstico.

Tampão de transformação

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
CaCl_2	50 mM
MgCl_2	10 mM
MgSO_4	10 mM
Água destilada qsp	1000 mL

3.7.4.2 Transformação bacteriana por choque térmico

Para cada 200 μL de células competentes, adicionaram-se 5 μL de DNA, (~250 ng), incubou-se em banho de gelo por 30 min, e a mistura foi submetida a um choque térmico a 42 °C por 90 segundos e imediatamente resfriada em gelo.

Adicionou-se 600 µL de meio LB, e incubou-se por 1 hora a 37 °C. Clones transformantes foram selecionados em meio de cultura contendo o antibiótico apropriado. IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo) foram adicionados, quando necessário, para diferenciar clones recombinantes contendo ou não o inserto de DNA.

3.7.4.3 Transformação bacteriana por eletroporação

3.7.4.3.1 Preparo de células eletrocompetentes

Linhagens de *E. coli* foram preparadas conforme descrito por Ausubel et al., (1992). Colônias de *E. coli* foram inoculadas em 500 mL de meio LB líquido e incubadas em agitador rotativo, a 37 °C, até uma densidade óptica (DO₆₁₀) de 0,3 - 0,5. A cultura foi transferida para tubos de centrifuga pré-resfriados, colocados no gelo por 30 minutos e centrifugados por 20 min, 4000 rpm e 4 °C. Após centrifugação, a massa de células foi ressuspensa em 100 mL de água milli-Q esteril, gelada, e centrifugados por 20 min, 4000 rpm e 4 °C. Este procedimento foi repetido mais uma vez. Após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 5 mL de solução aquosa de glicerol a 10% gelada e centrifugadas por 20 minutos, 4000 rpm e 4 °C. As células obtidas foram ressuspensas em 1,0 mL de solução aquosa de glicerol a 10% gelado, distribuídas em alíquotas de 40 µL, em tubos de microcentrifuga e estocadas em freezer -80 °C.

3.7.4.2.2 Eletroporação

Para 40 µL de células electrocompetentes, adicionaram-se 2 µL de DNA (100 ng/µL). A mistura foi transferida para cubetas de eletroporação de 0.1 cm, previamente geladas. As células foram eletroporadas a pulsos 1,8 KV/cm, capacitância 25 µF e resistência 200 Ω em eletroporador da marca Bio-Rad Gene Pulser TM, e incubadas em meio LB líquido por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, as células foram semeadas em placas de LB, contendo antibiótico adequado e incubadas a 37 °C.

3.8 Integração do operon *phaCAB* no genoma da *Escherichia coli*

3.8.1 Amplificação do fragmento interno do gene *prpC*

Parte do gene *prpC* foi obtido através de amplificação, utilizando a técnica de PCR, com iniciadores específicos construídos a partir da sequência de DNA desse gene em *E. coli*. Também foram analisadas as sequências do gene *gltA*, que codifica a enzima citrato sintase. Desta forma, buscou-se por uma região não conservada entre *prpC* e *gltA*, visando a inserção por recombinação homóloga, especificamente em *prpC* e não em *gltA*. Esta amplificação foi realizada com termociclador (Mastercycler Gradient, marca Eppendorf, São Paulo, S.P., Brasil), nas seguintes condições:

Para um volume final de 30 µl de reação: enzima pFU 1 U/µL 0,6 µL; Buffer (Mg) 3 µL; DNTPS (0,25 mM) 0,6 µL; oligonucleotídeo *forward* (10 ng/µl) 0,2 µL; oligonucleotídeo *reverse* (10 ng/µl) 0,2 µL; DNA (*E.coli* LS5218) <100ng 1,0 µL; DMSO (10 mM) 3 µL; água livre de nuclease 21,4 µL. As reações de amplificação foram realizadas a uma temperatura inicial de desnaturação de 96 °C por 5 minutos, e subseqüentes ciclos de desnaturação a 96 °C por 40 segundos, anelamento a 57 °C (gradiente +/- 3 °C) por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto, tendo este ciclo sido repetido por 30 vezes. Duas das amostras dos fragmentos amplificados, obtidos por PCR, foram seqüenciadas e analisadas. O seqüenciamento foi realizado no centro de estudos do genoma humano (USP). Os oligonucleotídeos utilizados (Quadro 3.8) para amplificação do fragmento *prpC* foram desenhados a partir da sequência do gene *prpC* de *E. coli*.

Quadro 3.8 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados.

Gene	DNA molde	Seqüência 5' -3'	Fragmento
<i>prpC</i>	<i>E. coli</i> LS5218	CGGAAACCGATGACGACTCCATCG GGCGATGTTGTACATCTTCAGCGA	391 pb

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

3.8.2 Construção do vetor pBBR1MCS-2:*prpC* *phaCAB*

Para a construção do plasmídeo pSK⁺:*prpC*, o fragmento do gene *prpC* (400 pb), obtido por PCR, foi ligado com enzima T4 DNA ligase (NEB) ao plasmídeo pSK⁺ digerido com a enzima *Sma*I. O plasmídeo pSK⁺:*prpC* foi transformado para *E. coli* XL1Blue e clones recombinantes contendo o fragmento de interesse foram selecionados com IPTG-Xgal. O plasmídeo pSK⁺:*prpC* e o plasmídeo pBBR1MCS2, foram digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Bam*HI e religado com T4 DNA ligase (NEB), dando origem ao plasmídeo pBBR1MCS2:*prpC*. O plasmídeo foi transformado para *E. coli* XL1-Blue. Os clones recombinantes com o plasmídeo de interesse foram selecionados em meio LB/cam IPTG-Xgal. O plasmídeo pBBR1MCS2:*prpC* foi digerido com a enzima *Hind*III e o fragmento *CAB* foi extraído do plasmídeo pJM9131 com a enzima *Hind*III e purificado do gel com o kit QIAquick Gel Extraction QUIAGEN. O plasmídeo pBBR1MCS2:*prpC* e o fragmento *CAB* foram ligados com a enzima T4 DNA ligase e transformados para *E. coli* XL1Blue. Os clones recombinantes foram selecionados em meio LB/Can contendo glicose 10 g/L. Colônias opacas foram escolhidas, e o plasmídeo foi extraído e confirmado por digestão das respectivas enzimas. A orientação do operon, em relação ao promotor *LacZ* do plasmídeo, também foi avaliada, a fim de utilizar aquele plasmídeo em que a transcrição do operon pudesse ocorrer a partir do promotor *LacZ*.

3.8.3 Obtenção de mutantes *prpC*

O plasmídeo pBBR1MCS-2::*prpC*:*CAB* foi transferido para *E. coli* LS5218 por eletroporação. Transformantes foram selecionados em placas LB, contendo canamicina (LBK), e, quatro colônias de *Escherichia coli*, resultantes da transformação com a construção pBBR1MCS-2::*prpC*:*CAB*, foram inoculadas em meio LB/kam líquido. Passagens diárias foram realizadas durante uma semana, no meio líquido LB/Kam; posteriormente, durante 2 semanas em meio líquido LB, e finalmente, em meio líquido (LBK), durante 1 semana. Ao longo das passagens da quarta semana, foram feitas diluições das quatro culturas 10⁻¹ -10⁻² -10⁻³ -10⁻⁴ -10⁻⁵ -10⁻⁶ -10⁻⁷. As diluições 10⁻⁷ e 10⁻⁶ das culturas transformantes, foram espalhadas em placa para obtenção de colônias isoladas, e, posteriormente, cada uma das colônias isoladas foi transferida para meio mineral, contendo 1 g/L de propionato (MMP), e

em placas de LBK. Desta forma, bactérias deletadas no gene *prpC* poderiam crescer em LBK, mas não poderiam crescer em MMP. Foram realizados os respectivos controles de crescimento para as duas placas, sendo que a linhagem *E. coli* LS5218, tendo a capacidade de metabolizar propionato, cresce em MMP mas não em LBK, enquanto que, a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ cresce em LBK, mas não consegue metabolizar o propionato, não podendo crescer em MMP.

3.9 Métodos analíticos

3.9.1 Determinação da massa seca celular

A massa seca celular foi determinada gravimetricamente, após centrifugação de volume conhecido da cultura, filtração e lavagem das células com água destilada em membrana de poro 0,45 μm (Millipore), e secagem em estufa a 100 °C por 5 horas.

3.9.2 Concentração de carboidratos

A concentração de glicose, xilose e frutose foi determinada por cromatografia de fase líquida (HPLC). A dosagem dos carboidratos foi realizada em cromatógrafo Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos), com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H_2SO_4 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 μL . Padrões foram preparados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de cada um dos açúcares, e as amostras foram diluídas até concentrações compreendidas no intervalo da curva de calibração construída.

3.9.3 Teor e composição do polímero

A quantidade e composição de PHA foram determinadas através de cromatografia de fase gasosa de propil-ésteres (RIIS; MAI, 1988). Cerca de 10 a 15 mg de células liofilizadas foram transferidas para tubos, aos quais foram adicionados 2 mL de uma solução de ácido clorídrico em propanol (1:4 v/v), 2 mL de 1,2–

dicloreto e 100 µL de uma solução de ácido benzóico (40 g/L) em propanol. Os tubos foram fechados fortemente, agitados e submetidos à propanólise por 3 horas a 100 °C, com agitação após os primeiros 30 minutos. Após resfriamento, foram adicionados aos tubos, 4 ml de água destilada, agitando-os vigorosamente por 30 segundos. Após separação, a fase aquosa (superior) foi descartada e a fase orgânica (inferior) utilizada para análise. Um volume de 1 µL da fase orgânica foi analisado após fracionamento da amostra ("split" 1:20) em cromatógrafo gasoso HP7890 Series GC System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos), equipado com uma coluna HP-5 (5% fenil-metilsiloxano, comprimento 30 m, diâmetro 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm) (Agilent Technologies). A análise foi conduzida nas seguintes condições: Gás de arraste: Hélio (0,8 mL/min); Temperatura do injetor: 250 °C; Temperatura do detector: 300 °C; Sistema de detecção: ionização de chama (FID); Programa de temperaturas do forno: 100 °C por 1 minuto, elevação da temperatura até 210 °C, a 8 °C/ min e 210 °C, por 15 minutos. Ácido benzóico foi utilizado como padrão interno. Polímeros produzidos por *P. oleovorans* ou *P. putida*, a partir de diferentes fontes de carbono, ou P3HB e P3HB-co-3HV (Aldrich), foram utilizados como padrões para a geração das curvas de calibração. O PHA total foi calculado somando-se as quantidades dos constituintes 3HB (3-Hidroxibutirato) e 3HV (3-Hidroxivalerato).

3.9.4 Concentração de nitrogênio amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal foi determinada em potenciômetro (Orion 4 STAR), com eletrodo específico para detecção de amônia (Orion 9512HPBNWP), após alcalinização da amostra (pH>9) com NaOH 10 M. Soluções de (NH₄)₂SO₄, contendo cerca de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 ppm de nitrogênio foram utilizadas para obtenção da curva de calibração.

3.9.5 Concentração de ácido acético

A concentração de ácido acético foi determinada por cromatografia de fase líquida (HPLC). Um volume de 10 µL de amostra, adequadamente diluída para uma concentração entre 0 e 1,2 g/L, filtrada em membrana de poro 0,45 µm (Millipore), foi injetado em cromatógrafo Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos)

com detector UV (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de H₂SO₄ 5 mM com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 20 µL. Padrões foram preparados nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 g/L de ácido acético e as amostras foram diluídas até concentrações compreendidas no intervalo da curva de calibração construída.

3.10 Preservação de linhagens bacterianas

Cada uma das linhagens bacterianas foi cultivada em meio líquido LB por 12 horas e, em seguida, 500 µL de cada uma das culturas foi diluída em 500 µL de uma solução aquosa de glicerol a 20%. A suspensão de células na solução de glicerol foi distribuída em tubos de microcentrífuga (500 µL por tubo), que foram mantidos em congelador de refrigerador doméstico por 90 minutos e finalmente congelados em freezer a -80 °C.

Para a preservação das linhagens bacterianas por liofilização, 25 mL de uma cultura em meio líquido LB (12 horas) foram centrifugados e as células ressuspensas em 2 mL de solução aquosa de leite desnatado (10%) e glutamato de sódio (5%). A suspensão de células no lioprotetor foi distribuída em ampolas de vidro (0,2 mL por ampola), congelada lentamente até -35 °C e liofilizada em aparelho Labconco Triad (Labconco, Kansas City, MO, Estados Unidos). As ampolas foram fechadas a vácuo e estocadas em refrigerador doméstico (4-8 °C).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação preliminar de linhagens bacterianas de *Escherichia coli*

Com o intuito de avaliar a capacidade de utilização de fontes de carbono e a velocidade de crescimento das linhagens bacterianas: *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* BL21 e *E. coli* LS5218, como possíveis hospedeiros para a expressão dos genes envolvidos na produção dos PHAs, estas foram cultivadas em meio mineral M9, descrito na seção 3.2, contendo como única fonte de carbono cada um dos substratos avaliados (glicose, xilose e glicerol).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi determinada a partir da avaliação da concentração celular obtida por medida de densidade óptica (DO_{610}), para cada uma das linhagens, nas diferentes fontes de carbono avaliadas (Tabela 4.1).

Foram retiradas amostras a cada hora, durante a fase de crescimento exponencial, e, posteriormente, a cada duas horas a partir do momento em que a linhagem estabilizou seu crescimento. Após 18 horas de cultivo, o pH reportava valores aproximados de 5,0 para todos os cultivos avaliados, tempo em que todas as linhagens já tinham atingido o valor máximo da velocidade de crescimento. A Figura 4.1 apresenta as curvas de crescimento para cada linhagem com cada uma das fontes de carbono avaliadas.

Tabela 4.1 - Valores de $\mu_{\max}$ (h^{-1}) das linhagens bacterianas de *E. coli* em meio mineral a partir de diferentes fontes de carbono.

Linhagens <i>Escherichia coli</i>	Fontes de carbono		
	Glicose (h^{-1})	Xilose (h^{-1})	Glicerol (h^{-1})
XL1-Blue	0,06	0,07	0,07
BL21	0,14	0,08	0,07
LS5218	0,23	0,11	0,28

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.1 – Perfil de crescimento das linhagens de *E. coli* avaliadas em diferentes fontes de carbono.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

As três linhagens avaliadas apresentaram capacidade de crescer no meio mineral adaptado para o acúmulo do polímero, e de utilizar todas as fontes de carbono testadas.

A linhagem *E. coli* LS5218 foi a que atingiu os mais altos valores de μ_{max} nas três fontes de carbono, sendo 0,23, 0,11 e 0,28 h⁻¹, respectivamente, para glicose, xilose e glicerol. Do ponto de vista industrial/ambiental, a utilização desta linhagem é interessante, devido ao fato de esta utilizar eficientemente fontes de carbono, como a glicose, que é o principal carboidrato encontrado no meio ambiente, e o glicerol, presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal, representando ainda um subproduto do processo de produção de biodiesel. Além disso, essa linhagem também consumiu, com grande eficiência, a xilose, um carboidrato presente em hidrolisados de materiais lignocelulósicos de resíduos agrícolas, como o bagaço e a palha de cana-de-açúcar.

Os resultados obtidos em trabalhos anteriores demonstraram a capacidade de acúmulo da linhagem *E. coli* XL1-Blue, abrigando o plasmídio pSK⁺::*phaCAB* contendo os genes da biossíntese do P3HB, provenientes de *Cupriavidus necator* (BOCANEGRA et al., 2007). Com o intuito de determinar a capacidade de produção do polímero da linhagem *E. coli* LS5218, que apresentara os melhores resultados de crescimento e utilização das diferentes fontes de carbono, esta linhagem foi transformada com o vetor pSK⁺::*phaCAB*, e avaliada em frascos agitados.

4.1.1 Avaliação da capacidade de acúmulo de P3HB pela linhagem *E. coli* LS5218 utilizando o vetor de expressão pSK⁺::*phaCAB*

Inicialmente, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 com o intuito de determinar a sua capacidade de síntese e acúmulo do polímero P3HB. O plasmídio pSK⁺::*phaCAB* (Figura A.1 – ANEXO A), abrigando o operon *phaCAB* que codifica as enzimas que participam da biossíntese do P3HB, proveniente de *Cupriavidus necator*, foi transferido para a linhagem de interesse por choque térmico (SAMBROOK et al., 1989). Esse ensaio foi realizado no meio M9, tendo sido avaliadas três fontes de carbono individualmente (glicose, xilose e glicerol). Os resultados da média das duplicatas estão apresentados na Tabela 4.2.

O resultado do cultivo, utilizando glicose como fonte de carbono, apresentou um teor de acúmulo do polímero maior. Entretanto, o percentual de acúmulo destes ensaios foi baixo, se comparado com os resultados mencionados na literatura, onde a linhagem *E. coli* LS5218 é capaz de acumular o polímero correspondendo até 80% da massa seca celular (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992).

Tabela 4.2 - Produção de P3HB a partir de diferentes fontes de carbono por *E. coli* LS5218 pSK::phaCAB.

Tempo (h)	Fonte de carbono	pH	X_T (g/L)	P3HB %MSC
0	Glicose	7,3	0,64	0,0
24		5,7	1,04	12,5
48		5,5	2,30	16,7
72		5,2	3,15	16,8
0	Xilose	7,4	0,81	0,0
24		5,2	2,88	6,6
48		5,4	2,97	12,1
72		5,0	3,01	12,3
0	Glicerol	7,4	0,73	0,0
24		5,3	2,56	12,9
48		5,0	2,76	13,9
72		4,9	3,10	14,2

X_T: Biomassa seca celular total produzida.

P3HB %MSC: percentual de P3HB da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

São vários os fatores que podem influenciar a quantidade de polímero acumulado nas linhagens recombinantes, como, por exemplo, o vetor utilizado para a expressão dos genes (LEE et al., 1994), as características metabólicas da linhagem utilizada (HO et al., 1999) e o meio de cultura empregado, que pode limitar o crescimento, restringindo a massa celular disponível para o acúmulo, entre tantos outros .

A utilização de meios mínimos ou definidos se faz necessária, devido à necessidade de produção de P3HB em escalas maiores, de modo que, meios econômicos favorecem a redução do custo total na produção destes polímeros.

Com o objetivo de aumentar o teor de polímero acumulado pelas linhagens de *E. coli* recombinantes, novos ensaios em frascos agitados foram realizados utilizando-se outros vetores de expressão.

4.1.2 Avaliação da capacidade de acúmulo de P3HB pelas linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* XL1Blue, utilizando-se o vetor de expressão pBBR1MCS-2.

Os plasmídios pBBR1MCS-2::*phaCAB* e pBBR1MCS-2::*phaCAB*⁺ (Figura A.2 ANEXO A), foram transferidos, por choque térmico, para as linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* XL1-Blue. Esses plasmídios se diferenciam pela orientação do operon *phaCAB*, proveniente de *Cupriavidus necator*, em relação ao promotor *lacZ* presente no vetor. No caso do plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*⁺, o operon encontra-se na orientação que permite a transcrição a partir do promotor *lacZ* do plasmídio, e no caso do pBBR1MCS-2::*phaCAB*, o operon encontra-se na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lacZ*, sendo sua expressão controlada unicamente pelo promotor original de *Cupriavidus necator* presente no operon. Assim, a finalidade deste ensaio, além de avaliar a capacidade de acúmulo das linhagens de *E. coli*, utilizando-se o plasmídio pBBR1MCS-2, foi avaliar a relevância do promotor *lacZ* deste vetor, na expressão dos genes de biossíntese de P3HB. Este ensaio foi realizado em meio mineral M9 utilizando glicose como fonte de carbono. O cultivo foi acompanhado por 72 horas, com amostras retiradas a cada 24 horas. Os resultados dos ensaios estão apresentados na Tabela 4.3, tendo sido considerado o valor médio dos resultados obtidos.

Segundo os resultados deste ensaio, a linhagem *E. coli* XL1-Blue acumulou em torno de 10% de P3HB da massa seca celular, com uma diferença pouco significativa em relação ao tipo de plasmídio utilizado. Já a linhagem *E. coli* LS5218, acumulou quase o dobro do polímero quando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*⁺ foi empregado, indicando assim, que, provavelmente, a orientação do operon *phaCAB*, em relação ao promotor *lacZ*, poderia influenciar a síntese e acúmulo do P3HB na linhagem *E. coli* LS5218. Porém, não se pode afirmar que este fato ocorra para todas as linhagens de *E. coli* avaliadas. Gomes, (2009) expressou os genes da biossíntese de PHA de *C. necator* em linhagens de *P. putida* para a produção de PHA_{MCL}. Estes genes foram clonados no vetor pBBR1MCS-2 e foram avaliadas as duas possíveis orientações nas quais o operon *phaCAB* encontrava-se em relação ao promotor *LacZ* do vetor. Os resultados demonstraram que a linhagem *P. putida*, abrigando o plasmídio no qual o operon encontrava-se na mesma orientação em

relação ao promotor *LacZ*, acumulou teores de PHA maiores em relação a linhagem abrigando o plasmídio com a orientação contrária (Gomes, 2009).

Com o objetivo de confirmar estes resultados, foram programados ensaios em biorreator, utilizando-se as linhagens recombinantes, até então avaliadas em frascos agitados, além de avaliar a cinética de crescimento, consumo de substratos e o perfil de acúmulo do P3HB.

Tabela 4.3 - Produção de P3HB por linhagens recombinantes de *E. coli* abrigando os plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB* e pBBR1MCS-2::*phaCAB*⁺.

Linhagem	Tempo (h)	pH	X _t (g/L)	G (g/L)	P3HB %MSC
<i>E. coli</i> XL1-Blue pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁺	0	7,1	0,50	13,7	0,0
	24	4,7	1,54	8,7	10,5
	48	4,5	1,32	7,7	11,3
	72	4,4	1,35	5,1	11,5
<i>E. coli</i> XL1-Blue pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i>	0	6,9	0,45	13,9	0,0
	24	4,7	1,25	11,6	9,8
	48	4,4	1,26	7,7	10,5
	72	4,5	1,52	5,5	10,6
<i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁺	0	7,1	0,52	13,4	0,0
	24	5,5	1,47	7,6	19,4
	48	5,1	1,90	6,6	20,4
	72	4,8	1,93	6,2	22,4
<i>E. coli</i> LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i>	0	7,2	0,57	13,3	0,0
	24	5,2	1,70	7,7	11,2
	48	4,8	1,73	6,7	12,9
	72	4,5	1,78	6,3	13,0

X_t: Biomassa seca celular total produzida.

G: Concentração de glicose residual.

P3HB %MSC: percentual de P3HB da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.2 Avaliação das linhagens bacterianas de *Escherichia coli* em cultivos em biorreator

Visando a otimização dos resultados da produção de P3HB, bem como o entendimento do mecanismo de síntese de PHAs, nas linhagens de *E. coli* recombinantes, foram realizados diversos ensaios em biorreator, nos quais foram avaliadas cada uma das linhagens acima descritas. Estes ensaios foram realizados em meio indutor para a produção de P3HB, utilizando-se glicose como fonte de carbono em todos os ensaios descritos a seguir.

4.2.1 Avaliação da linhagem *E. coli* XL1-Blue

Foram realizados três ensaios em biorreator, com a finalidade de avaliar a capacidade de acúmulo da linhagem recombinante *E. coli* XL1-Blue, abrigando os genes da biossíntese de P3HB de *C. necator*.

Foram realizados cultivos descontínuos alimentados, utilizando-se glicose como fonte de carbono. As planilhas contendo os dados destes três ensaios encontram-se no Anexo E – Tabelas E1, E2 e E3.

4.2.1.1 Ensaio 01 - *E. coli* XL1-Blue pSK⁻::*phaCAB*

Este ensaio foi realizado com o intuito de reproduzir e aperfeiçoar os resultados dos ensaios obtidos em trabalhos anteriores, nos quais foi utilizada a linhagem *E. coli* XL1-Blue, abrigando os genes da biossíntese de P3HB de *C. necator*, no vetor de expressão pBluescript SK (-) (BOCANEGRA et al., 2007).

O meio mineral utilizado foi elaborado a partir do cálculo dos valores de rendimento para cada componente do meio de cultura, visando a obtenção de 5 g/L de biomassa residual e 10 g/L de biomassa total. Entende-se por biomassa total (X_t), a biomassa total produzida, enquanto que a biomassa residual (X_r) é o resultado da subtração da massa do polímero acumulado, da massa total produzida (X_t) ($X_t - \text{P3HB} = X_r$). No meio de cultura, foi fornecida uma quantidade limitada da fonte de nitrogênio, de forma a permitir um crescimento inicial. Posteriormente, uma vez que o nitrogênio se esgotasse, e, a partir da glicose disponível, oferecida em excesso, ocorreria o acúmulo de P3HB. Os resultados deste ensaio estão representados na Figura 4.2.

A glicose inicial, presente no meio de cultura, correspondente a 16 g/L, foi consumida após 30 horas do início do ensaio; posteriormente, foi necessária a realização de duas alimentações de glicose para manter em excesso a fonte de carbono no meio de cultura e, assim, induzir o acúmulo do polímero.

O oxigênio dissolvido no meio de cultura se manteve em torno de 30% e 50% ao longo do cultivo, mediante o aumento, quando necessário, da agitação.

Durante as primeiras 20 horas do ensaio observou-se uma fase *lag* e, posteriormente, um crescimento exponencial, atingindo uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de $0,17 \text{ h}^{-1}$ e uma biomassa total (X_t) de 5 g/L.

Figura 4.2 – Cultivo de *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídio pSK::phaCAB, em meio mineral contendo glicose. Ensaio 01- Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

O nitrogênio se esgotou completamente em torno de 30 horas de cultivo, tempo em que se daria início à fase de acúmulo, porém, os resultados mostraram que a linhagem avaliada só apresentou valores de acúmulo próximos aos reportados em frascos agitados, durante as primeiras horas do ensaio, provavelmente oriundos do inóculo do mesmo.

Após esse período, a concentração do polímero diminuiu em relação à biomassa formada, permanecendo em uma concentração entre 2% e 3% da massa seca celular. O cultivo foi acompanhado durante 72 horas, tendo sido retiradas amostras em intervalos de duas a três horas. Conforme os resultados obtidos neste ensaio, aparentemente, há uma deficiência no meio de cultura utilizado, que induz a célula a permanecer durante um longo período de tempo em uma fase de adaptação (fase *lag*). Além disso, o fato da célula consumir constantemente glicose e não acumular polímero indica que a fonte de carbono estaria sendo utilizada para a produção de algum outro metabólito.

Alguns autores sugerem que, quando o fluxo de carbono na via metabólica central excede a demanda biossintética e a capacidade de geração de energia dentro da célula, ocorre uma importante produção de ácido acético (SUZUKI et al., 1990). Em linhagens de *E. coli* recombinante, o acúmulo de ácido acético durante o cultivo causa inibição do crescimento celular, reduzindo a produção de proteínas recombinantes para a produção de P3HB, fato este, que, pode ser minimizado através do controle da velocidade específica de crescimento, abaixo do valor crítico de formação de ácido acético (LEE, 1996). No entanto, a concentração de ácido acético produzido neste ensaio não é prejudicial para a célula, o que significa que nem o crescimento, nem o acúmulo de P3HB estariam afetados por essa concentração.

Apenas altas concentrações de ácido acético (acima de 5 g/L em pH 7) podem reduzir a taxa de crescimento no meio de cultivo em linhagens de *E. coli* recombinante (KIM et al., 2004). Portanto, outros fatores estariam afetando a síntese e acúmulo do P3HB na linhagem avaliada. Assim, algumas modificações no meio de cultura foram realizadas, na tentativa de aumentar o teor de polímero acumulado.

4.2.1.2 Ensaio 02 - *E. coli* XL1-Blue pSK⁺::*phaCAB*

Este ensaio foi realizado sob os mesmos parâmetros do ensaio anterior, porém, o meio empregado foi suplementado com 1 g/L de extrato de levedura, na tentativa de diminuir a fase *lag* apresentada durante as primeiras 20 horas desse ensaio. Além disso, a tiamina que foi suplementada no meio de cultura anterior, não foi adicionada neste ensaio, devido ao fato de que, resultados de cultivos em frascos agitados, demonstraram que em linhagens de *E. coli* XL1-Blue, o acúmulo do P3HB não sofre influência pela presença da tiamina, tornando, desta forma, o meio de cultura ainda mais econômico (resultados não apresentados).

Neste ensaio, a linhagem *E. coli* XL1Blue pSK⁺::*phaCAB* apresentou uma fase de crescimento exponencial de aproximadamente 5 horas, alcançando uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de 0,15 h⁻¹. Após este período, a linhagem apresentou uma fase de crescimento linear até aproximadamente 14 horas de decorrido o ensaio, quando estabilizou o crescimento. A glicose e o nitrogênio foram consumidos quase que em sua totalidade até o final do ensaio, não sendo necessário realizar alimentações de glicose durante o cultivo, devido à baixa velocidade de consumo da fonte de carbono. O ensaio 02 está representado na Figura 4.3.

Os resultados mostraram que, novamente, o percentual do polímero produzido foi baixo, indicando que o meio de cultura ainda apresentara alguma deficiência nutricional, mesmo com a adição do extrato de levedura sendo positiva, resultando na diminuição da fase *lag*. Cabe destacar que, quando a concentração de nitrogênio atingiu valores em torno de 0,2 g/L, a concentração da fonte de carbono encontrava-se em torno de 1,2 g/L, fato este, que, não favorecia o acúmulo do polímero, já que a quantidade de glicose no meio não era excessiva.

A concentração de ácido acético no meio de cultura não atingiu valores significativos que pudessem inibir o crescimento ou o acúmulo do polímero. Portanto, possivelmente, outro fator como o tipo de plasmídeo utilizado, poderia estar afetando o acúmulo do polímero.

Figura 4.3 – Cultivo de *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídio pSK::phaCAB em meio mineral contendo glicose e extrato de levedura. Ensaio 02 - Biomassa total produzida (X), percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC), glicose residual (G), nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.2.1.3 Ensaio 03 - *E. coli* XL1-Blue pBBR1MCS-2::*phaCAB*

Neste ensaio, foi avaliada a linhagem *E. coli* XL1Blue abrigoando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB*, que possui resistência a canamicina, com o objetivo de determinar a capacidade de acúmulo sob condições controladas em biorreator e comparar seu rendimento com os ensaios anteriores, no tocante a produção do polímero.

Como já mencionado na seção 4.1.2, o operon *phaCAB* deste plasmídeo se situa na orientação que permite a transcrição a partir do promotor *lacZ* do vetor. Assim, seria possível determinar se tal orientação seria relevante na expressão dos genes da biossíntese de P3HB em cultivos em biorreator. Este ensaio foi realizado sob os mesmo parâmetros e concentrações do meio de cultura do ensaio anterior. A glicose inicial presente no meio de cultura foi consumida com uma velocidade maior, esgotando-se em torno das 26 primeiras horas do ensaio, tempo em que o nitrogênio se fez limitante. Posteriormente, foram realizadas duas alimentações a fim de manter a fonte de carbono em excesso e favorecer a condição de acúmulo.

Neste ensaio, a linhagem não apresentou fase *lag* e a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi de $0,17 \text{ h}^{-1}$. O marcador de resistência utilizado para manter a pressão seletiva, nos ensaios anteriores (ampicilina), provavelmente, pode ter influenciado a adaptação da linhagem no meio de cultura do biorreator, pois a única diferença entre este ensaio e os anteriores, foi o plasmídeo utilizado, com marcadores de resistência diferentes. O cultivo foi acompanhado durante 60 horas, sendo retiradas amostras a cada 2 horas. Este ensaio está representado na Figura 4.4.

Não foi possível atingir concentrações elevadas com relação ao acúmulo do polímero. O teor de polímero acumulado permaneceu em torno 3% da biomassa celular durante todo o ensaio.

Embora a quantidade de ácido acético, produzida pela linhagem neste ensaio, tenha sido maior que nos ensaios anteriores, ainda não representa uma concentração que possa inibir o crescimento ou prejudicar a síntese e acúmulo do polímero. Portanto, como no caso anterior, a célula estaria usando a fonte de carbono para a produção de algum outro metabólito.

Figura 4.4 – Cultivo de *E. coli* XL1-Blue abrigando o plasmídeo *pBBR1MCS-2::phaCAB* em meio mineral contendo glicose. Ensaio 03 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Alguns dos estudos realizados, visando à produção de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli*, utilizaram a linhagem *E. coli* XL1-Blue como hospedeira dos genes da síntese deste polímero (HORNG et al., 2010; KAHAR et al., 2005; LO et al., 2011; SONG; HEIN; STEINBÜCHEL, 1999). Dados reportados nesses estudos sugerem que a *E. coli* XL1-Blue é capaz de acumular P3HB correspondendo até 80% de da massa seca celular. Apesar das diferentes tentativas realizadas para atingir um acúmulo representativo de P3HB na linhagem *E. coli* XL1-Blue, não foi possível obter resultados similares aos obtidos nos ensaios realizados anteriormente (BOCANEGRA et al., 2007) nem aos reportados na literatura.

Os diferentes valores de P3HB acumulados por esta linhagem, e reportados na literatura, dependem do tipo de plasmídio utilizado, do meio de cultura empregado, dos genes biossintéticos, entre muitos outros. Os resultados obtidos até então, demonstraram que mesmo nos ensaios em frascos agitados, não foi possível obter um teor de polímero maior do que 11% da massa seca celular, sendo que, sob as mesmas condições e utilizando o mesmo meio de cultura, a linhagem *E. coli* LS5218 atingiu o dobro do teor de polímero, o que indica que a linhagem *E. coli* XL1-Blue não é um bom hospedeiro dos genes da biossíntese de P3HB de *C. necator* sob as condições aqui avaliadas.

Neste trabalho poderia ter sido realizada a análise das possíveis causas que afetam o acúmulo do P3HB nesta linhagem, porém, optamos por dar continuidade aos ensaios com a linhagem que apresentou os melhores resultados de crescimento e acúmulo, para tentar aperfeiçoar estes resultados.

4.2.2 Avaliação da linhagem *E. coli* LS5218

Foram realizados vários ensaios em biorreator, com o intuito de avaliar a produção do P3HB na linhagem *E. coli* LS5218, e determinar as melhores condições para favorecer o acúmulo do polímero nesta linhagem. As planilhas contendo os dados destes ensaios encontram-se no Anexo E – planilhas E4, E5, E6, E7 e E8.

4.2.2.1 Ensaio 04 - *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB

Neste ensaio, a linhagem *E. coli* LS5218 foi avaliada com o plasmídio pBBR1MCS-2::phaCAB. O meio empregado foi o mesmo utilizado nos ensaios com

a *E. coli* XL1-Blue, sem suplementação do extrato de levedura, e sob as mesmas condições experimentais (Seção 3.5.3).

Não foi identificada uma fase *lag* no início do ensaio, e a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi de $0,34 \text{ h}^{-1}$. Após 8 horas de cultivo, o crescimento se manteve linear, atingindo uma concentração aproximada de 4,5 g/L e, desta mesma forma, até o fim do ensaio, foi consumido o nitrogênio.

Após 4 horas de cultivo, foi realizada uma adição de glicose, momento em que, a concentração desta fonte de carbono aumentou para 26 g/L, tendo sido mantida acima de 10 g/L, quase que na totalidade do ensaio. A velocidade de consumo desta linhagem foi menor que a reportada para *E. coli* XL1-Blue nos ensaios anteriores, provavelmente por conta da menor velocidade de crescimento para este ensaio. O oxigênio dissolvido se manteve sempre acima de 50% de saturação.

O percentual de P3HB se manteve crescente até às 40 horas do ensaio, tempo em que tinha atingido 10% da massa seca celular e, posteriormente, permaneceu constante até o término do ensaio na mesma concentração. O ensaio foi acompanhado durante 54 horas, tendo sido retiradas amostras periodicamente, em um intervalo de 2 horas durante todo o ensaio. O ensaio 04 está representado na Figura 4.5.

Os primeiros trabalhos, reportados na literatura, usando a linhagem *E. coli* LS5218, demonstraram que, esta linhagem pode acumular entre 20% e 30% quando cultivadas em frascos agitados (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). Estudos mais recentes demonstraram que esta linhagem tem a capacidade de acumular P3HB correspondendo até 60% da massa seca celular quando cultivada em meios enriquecidos como LB (NDUKO et al., 2012). Assim, provavelmente, o meio de cultura e/ou a construção utilizada por estes autores podem ter levado a resultados diferentes aos observados no presente estudo.

Este ensaio foi reproduzido, porém com uma modificação no meio de cultura, sendo adicionado 1g/L de extrato de levedura e por um período de tempo mais curto, para confirmar se a suplementação de nutrientes no meio influenciaria no acúmulo do P3HB.

Figura 4.5 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio *pBBR1MCS-2::phaCAB*>< em meio mineral contendo glicose. Ensaio 04 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.2.2.2 Ensaio 05 – *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

A linhagem *Escherichia coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB* foi avaliada com o intuito de analisar o crescimento, consumo de substrato e produção de polímero, sendo cultivada em meio mineral contendo 1 g/L de extrato de levedura. Neste ensaio, apesar da suplementação do extrato de levedura, a linhagem atingiu uma concentração celular em torno de 1,5 g/L até as primeiras 4 horas de ensaio e, logo após este período, entrou na fase de crescimento estacionário, mantendo este comportamento até o final do ensaio.

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi estimada em 0,33 h⁻¹, embora, como uma quantidade limitada de pontos durante as 4 horas iniciais do cultivo. A partir das 5 horas de ensaio, tanto a glicose como o nitrogênio foram consumidos muito lentamente.

A concentração de nitrogênio permaneceu em torno de 0,2 g/L e a concentração de glicose se manteve em valores um pouco acima de 10 g/L. O ensaio foi acompanhado durante 25 horas, sendo retiradas amostras periodicamente em um intervalo de 2 horas durante quase todo o ensaio.

Apesar do baixo crescimento, o teor de polímero acumulado atingiu uma concentração de 5% da massa seca celular; se comparado com o ensaio anterior, a biomassa produzida nesse ensaio (ensaio 04), foi três vezes maior do que no presente ensaio, mas o teor de P3HB foi só duas vezes maior, o que pode indicar que a suplementação do extrato de levedura contribuiu para a formação e acúmulo do polímero, porém, algum outro fator afetou o crescimento da linhagem neste ensaio. A produção do ácido acético não apresentou valores representativos que pudessem inibir o crescimento. Para tentar explicar o fato da baixa concentração de biomassa neste ensaio, uma possibilidade é que algum nutriente necessário para o crescimento não fosse adicionado na concentração necessária para este ensaio, esgotando-se, logo após o início do mesmo.

Para confirmar este resultado, o ensaio foi reproduzido utilizando o mesmo meio de cultura e sob as mesmas condições. O ensaio 05 está representado na Figura 4.6.

Figura 4.6 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio *pBBR1MCS-2::phaCAB* em meio mineral contendo glicose. Ensaio 05 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.2.2.3 Ensaio 06 – *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar o perfil de crescimento, síntese e acúmulo do polímero na linhagem *E. coli* LS5218, e confirmar os resultados obtidos no ensaio anterior. O plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB*, no qual o operon *phaCAB* encontra-se na orientação que permite a transcrição a partir do promotor *lacZ* do próprio vetor, foi utilizado, neste ensaio, com a finalidade de avaliar se esta orientação é relevante na expressão dos genes da biossíntese de P3HB com esta linhagem.

Neste ensaio, a biomassa produzida atingiu uma concentração de 6 g/L em torno das 10 horas decorridas de cultivo. Durante este período, a velocidade máxima de crescimento atingida ($\mu_{\max}$) foi de $0,43 \text{ h}^{-1}$, apresentando também uma alta velocidade de consumo de substratos. Tanto a glicose como o nitrogênio se esgotaram durante as 8 horas iniciais do ensaio, tendo sido necessário efetuar três alimentações de glicose, para manter esta fonte de carbono em excesso, para favorecer, assim, o acúmulo do P3HB.

Apesar do constante consumo de glicose e após atingir a concentração de biomassa reportada, a bactéria permaneceu durante 10 horas em crescimento estacionário até aproximadamente 22 horas de ensaio, tempo em que se iniciou a lise celular, devido, ao provável esgotamento de algum nutriente essencial para o crescimento da célula. O cultivo foi acompanhado através de amostras retiradas periodicamente em um intervalo de duas e três horas, durante um tempo total de 38 horas.

Embora o meio de cultura apresentasse todos os fatores ideais para propiciar o acúmulo de P3HB (limitação de nitrogênio e excesso da fonte de carbono), não foi possível atingir um alto teor de acúmulo do polímero. Entretanto, a linhagem *E. coli* LS5218 acumulou o dobro do polímero (6% MSC) se comparado com a linhagem *E. coli* XL1-Blue nas mesmas condições de cultivo (ensaio 03), porém, mesmo assim é um teor de acúmulo baixo, fato que demonstra que a célula não consegue aproveitar a fonte de carbono consumida para o acúmulo do polímero. Como nos casos anteriores, a produção de ácidos neste ensaio não foi um fator indicativo da perda de carbono no metabolismo da *E. coli*. O ensaio 06 está representado na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio *pBBR1MCS-2::phaCAB* em meio mineral contendo glicose e extrato de levedura. Ensaio 06 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G); nitrogênio residual (N) e concentração de ácido acético produzido (AA)

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

O plasmídio avaliado neste ensaio não revelou ser um fator favorável ao acúmulo do P3HB, uma vez que, apesar de uma maior concentração celular, o teor de polímero acumulado foi próximo ao reportado nos ensaios anteriores com esta mesma linhagem. Desta forma, a orientação do operon com relação ao promotor do vetor parece não influenciar no acúmulo do polímero nos ensaios em biorreator. Visando avaliar a produção de P3HB nesta linhagem e identificar as possíveis causas que estariam afetando o acúmulo do polímero na célula, nos ensaios em biorreator, foi realizado um novo ensaio avaliando o plasmídio pBluescript SK (-).

4.2.2.4 Ensaio 07 – *E. coli* LS5218 pSK⁺::*phaCAB*

Neste ensaio, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 contendo o plasmídio pSK⁺::*phaCAB*, avaliado nos ensaios anteriores (01-02) na linhagem *E. coli* XL1Blue. Este ensaio foi realizado com o intuito de avaliar se a expressão do plasmídio nesta linhagem favorecia o acúmulo do P3HB, bem como comparar os resultados obtidos anteriormente.

Nas primeiras 12 horas do ensaio, a linhagem já havia chegado ao ponto máximo de crescimento, atingindo uma concentração celular de aproximadamente 7 g/L, e um valor de velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de 0,32 h⁻¹. Posterior a esta fase exponencial, a linhagem estabilizou seu crescimento, permanecendo na fase estacionária até o final do ensaio. O nitrogênio e a glicose presentes no meio de cultura foram consumidos totalmente em aproximadamente 8 horas, tendo sido realizadas três alimentações de glicose durante o ensaio a fim de manter em excesso a fonte de carbono. Apesar da quantidade de glicose fornecida à produção de ácido, uma vez mais apresentou valores mínimos que não representam dano à célula ou sequer foram desfavoráveis ao acúmulo (dados não apresentados).

Como no ensaio anterior, apesar das condições do meio estarem favoráveis para promover o acúmulo, a produção de P3HB foi insatisfatória, do mesmo modo como aconteceu com os ensaios realizados com a *E. coli* XL1-Blue abrigando o mesmo plasmídio. Portanto, neste caso, utilizando a linhagem *E. coli* LS5218, o plasmídio pBBR1MCS-2 tem uma maior eficiência de expressão gênica nos ensaios em biorreator. O ensaio 07 está representado na Figura 4.8.

Figura 4.8 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio pSK::phaCAB em meio mineral contendo glicose. Ensaio 07- Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G) e nitrogênio residual (N).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Durante as primeiras horas do ensaio, foi reportado um acúmulo de P3HB correspondente a 17% da massa seca celular, provavelmente, oriundo do acúmulo realizado pela linhagem durante o inóculo. Posteriormente, devido ao rápido crescimento inicial da bactéria, esta concentração diminuiu, com relação à massa celular. Linhagens de *E. coli* recombinantes não possuem as enzimas encarregadas de degradar o P3HB (despolimerases), o que impossibilita o re-consumo do polímero por parte da célula.

Os ensaios em frascos agitados da mesma linhagem, com este plasmídio, indicaram acúmulo de P3HB em torno de 16% da massa seca celular, o que significa que a linhagem consegue acumular o polímero com este plasmídio, mas provavelmente, a concentração inicial de ampicilina no meio não seja suficiente para garantir a manutenção do plasmídio na célula.

Outra possível explicação para o fato da célula não acumular P3HB com esse plasmídio, é devido à perda da pressão seletiva ocasionado pela β -lactamase, que é produzida quando as células atingem uma alta concentração celular, ocasionando a degradação da ampicilina e permitindo o crescimento das células sem o plasmídio. Nikel et al. (2006) demonstraram que em linhagens recombinantes de *E. coli*, o acúmulo do polímero atingiu concentrações maiores quando o vetor empregado possuía como marcador de resistência a canamicina. Nas mesmas condições de acúmulo, utilizando o mesmo vetor, mas sendo a ampicilina o marcador de resistência, o acúmulo diminuiu consideravelmente após 20 horas de cultivo. Assim, é possível que neste ensaio, o fato da célula não conseguir acúmulo do polímero seja decorrente da perda do plasmídio, devido à eliminação da pressão seletiva (NIKEL et al., 2006).

4.2.2.5 Ensaio 08 – *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

Com o objetivo de melhorar o acúmulo do polímero obtido, nos ensaios anteriores, pela linhagem *E. coli* LS5218 contendo o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB*, foi realizada uma modificação no meio de cultura. A fonte de nitrogênio, assim como sua concentração, foi diferente nesse ensaio em relação aos ensaios realizados anteriormente (Seção 3.5.3 - Quadro 3.4).

Os resultados deste ensaio demonstraram novamente um rápido crescimento inicial, no qual a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi de $0,42 \text{ h}^{-1}$, atingindo uma concentração de biomassa de $6,5 \text{ g/L}$. Uma vez que o nitrogênio foi esgotado totalmente, o crescimento celular se manteve constante (fase estacionária) até o final do ensaio. No mesmo período de tempo (durante as primeiras 8 horas após o início do ensaio), a glicose inicial foi rapidamente consumida, tendo sido necessário realizar duas alimentações de glicose, até o fim do ensaio, na tentativa de manter a concentração de glicose perto dos 10 g/L .

O percentual de P3HB inicial, proveniente do acúmulo realizado durante o inóculo, diminuiu em relação à quantidade de biomassa celular. Provavelmente, devido ao rápido crescimento, nem todas as células filhas conseguiram manter o plasmídeo; já a população de células que ainda mantiveram o plasmídeo, após o crescimento, acumulou uma pequena porcentagem em torno de 7% da massa seca celular, até o final do ensaio. O ensaio 08 está representado na Figura 4.9.

Para confirmar esta hipótese, foi realizado um experimento com a finalidade de se determinar a quantidade de células que ainda carregavam o plasmídeo ao final do ensaio, mediante a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) resistentes à canamicina (marcador de resistência do plasmídeo utilizado neste ensaio). Este experimento está descrito na seção 3.6. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Percentual de células resistente a canamicina no final do ensaio 08.

Meio de cultura	Diluição	Média	UFC/mL	% Km ^r
LB	$1,00 \times 10^{-07}$	14,33	$5,73 \times 10^{-09}$	
LBK	$1,00 \times 10^{-07}$	3,67	$1,47 \times 10^{-09}$	25,6
LBK	$1,00 \times 10^{-06}$	25,83	$1,03 \times 10^{-09}$	18,0

% Km^r: percentual de células resistentes a canamicina.

LB: Meio Luria Bertani.

LBK: Meio Luria Bertani contendo canamicina.

UFC: Unidades formadoras de colônia.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.9 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio *pBBR1MCS-2::phaCAB* em meio mineral contendo glicose. Ensaio 08 - Biomassa total produzida (X); percentual acumulado de P3HB da massa seca celular (P3HB %MSC); glicose residual (G) e nitrogênio residual (N).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Segundo os resultados acima descritos, uma pequena parcela de células, que se estima entre 18 e 20% do total das células presentes no final do ensaio, ainda carregavam o plasmídeo. Tal fato nos levou a crer, que, uma das razões pela qual o polímero não estava se acumulando em alta concentração, foi devido à perda do plasmídeo, fato este que poderia estar ocorrendo, provavelmente, desde o início do ensaio, quando a célula cresceu exponencialmente a uma alta velocidade. Porém, esse ainda não era o único motivo que nos pode levar à conclusão de que o polímero não estivesse sendo acumulado, nos ensaios em biorreator, conforme esperado.

O antibiótico utilizado como marcador de resistência do plasmídio neste ensaio, a canamicina, é um antibiótico que não é degradado no meio, favorecendo a manutenção da pressão seletiva que determina a manutenção do plasmídio e sua expressão na célula, porém, provavelmente uma concentração maior do antibiótico seja necessária para garantir esta expressão do plasmídio.

Outro problema relacionado à utilização de plasmídios nas linhagens recombinantes a ser considerado, é o observado por Tyo et al. (2009). Segundo os autores, existe um fenômeno conhecido como instabilidade estrutural ou segregacional, no qual em uma cópia de um plasmídeo, uma mutação inicial ocorre no gene(s) de interesse, sem afetar o marcador de seleção. Neste caso, os plasmídios com a mutação, não produtivos, ainda conferem resistência ao antibiótico devido a que a mutação ocorre no gene recombinante e não no gene que confere a resistência. Em seguida, o plasmídeo mutante é copiado, e sobre a divisão celular, são esperados dois resultados: ou cada célula filha recebe uma cópia do plasmídeo mutante, ou uma célula filha recebe ambas as cópias mutantes. Assim, uma mutação inicial no gene de interesse, clonado no plasmídio, pode ser rapidamente propagada nos cultivos diminuindo a produtividade independentemente da taxa de mutação. Os plasmídios produtivos são transferidos para as células filhas aleatoriamente, as células que não recebem o plasmídio são eliminadas pela pressão seletiva do antibiótico. As novas vias metabólicas assim como os produtos recombinantes podem gerar um efeito citotóxico na célula gerando pesados fardos metabólicos, de forma que, plasmídios mutantes não produtivos conferem vantagens de crescimento na célula que teria como preferência a propagação de tais plasmídios e deslocamento dos plasmídios produtivos (TYO; AJIKUMAR; STEPHANOPOULOS, 2009). Por tanto, segundo o demonstrado pelos autores, nem

todos os plasmídios presentes na célula, que conferem resistência ao antibiótico, podem ser produtivos, gerando assim uma baixa produtividade associado a um rápido crescimento e consumo de substratos.

4.2.2.6 Avaliação da influência da concentração de canamicina no acúmulo de P3HB na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

Com o objetivo de se avaliar se uma maior concentração de canamicina poderia incrementar a síntese e acúmulo do polímero, foram realizados cultivos em frascos agitados tendo sido testadas diversas concentrações de canamicina. A linhagem *E. coli* LS5218, contendo o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB*, foi cultivada em meio mineral sendo avaliadas individualmente concentrações entre 50 e 200 µg /mL de canamicina. Este ensaio foi realizado em duplicata, tendo sido considerado o valor médio dos valores obtidos. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Produção de P3HB em frascos agitados contendo diferentes concentrações de canamicina, pela linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*.

Concentração de canamicina	Tempo (h)	pH	X _t (g/L)	P3HB %MSC
50 µg/mL	0	6,93	-	-
	24	4,8	2,4	38,3
	48	4,52	2,5	47,2
100 µg/mL	0	7,14	-	-
	24	4,81	2,0	37,2
	48	4,51	2,4	33,0
150 µg/mL	0	7,03	-	-
	24	4,81	1,7	28,4
	48	4,54	2,1	31,0
200 µg/mL	0	7,08	-	-
	24	4,83	2,2	33,9
	48	4,57	2,1	42,7

X_t: Biomassa total produzida.

P3HB %MSC: percentual de P3HB da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Segundo os resultados deste experimento, foi demonstrado, que altas concentrações de antibiótico no meio de cultura não foram necessárias para garantir a pressão seletiva e manutenção do plasmídeo na célula, bem como aumentar a

síntese do P3HB. Com a concentração normalmente utilizada (50 µg/mL) nos ensaios realizados em biorreator, o polímero ainda foi acumulado em teores correspondendo a cerca de 50 % da massa seca celular.

Causou surpresa a comparação dos resultados destes cultivos com os resultados obtidos nos ensaios em frascos agitados anteriormente realizados utilizando a mesma linhagem e plasmídeo (Seção 4.1.2), visto que o percentual de acúmulo atingiu quase que o dobro dos valores obtidos no ensaio mencionado.

Ao se analisar a diferença entre os ensaios realizados inicialmente (Seção 4.1.2) e estes últimos, foi concluído que, provavelmente, devido ao tratamento dispensado ao inóculo, dos ensaios iniciais, o meio de cultura utilizado nesses ensaios não favorecia o acúmulo do polímero devido à falta de algum nutriente fornecido no meio enriquecido. Entretanto, para estes ensaios, em que foi avaliada a concentração de canamicina, o inóculo utilizado não foi tratado como mencionado na seção 3.4.1, a fim de reproduzir as condições dos ensaios em biorreator nos quais foi adicionado 1 g/L de extrato de levedura.

O inóculo para este caso foi adicionado diretamente ao meio mineral no início do ensaio, segundo a porcentagem indicada em relação ao volume final do meio. Portanto, os nutrientes necessários à bactéria, presentes no meio enriquecido LB, permaneceram com o inóculo adicionado ao meio mineral e poderiam, hipoteticamente, ter favorecido o acúmulo do polímero. Para confirmar esta hipótese, foram realizados novos experimentos nos quais se avaliou o tratamento do inóculo. Linhagens selvagens de *E. coli* crescem muito bem em meios definidos com glicose como a única fonte de carbono, porém, requerem um período de adaptação de aproximadamente 20 horas (FURMANSKI et al., 1987). Lee e Chang (1994) reduziram o período de adaptação, através da adição de uma pequena quantidade de triptona, tendo sido comprovado que esta é uma efetiva fonte de nitrogênio, para a formação de PHA por *E. coli* recombinante (LEE; CHANG, 1994).

Considerando o que foi apresentado até agora, se pode concluir que o plasmídeo pBBR1MCS-2 é mais apropriado, que o pBluescript SK (-), para ser utilizado em ensaios em biorreator pois, no caso do pBluescript SK (-) a alta concentração celular, desejada para atingir altos teores de polímero, interfere na permanência do marcador de resistência, eliminando a pressão seletiva contra as células que perdem o plasmídeo. No entanto, a síntese e acúmulo do P3HB não dependem exclusivamente da utilização deste plasmídeo. Como se pode observar

nos resultados obtidos, tanto nos frascos agitados como no biorreator, nos quais, utilizando a mesma linhagem e o mesmo plasmídio, a diferença na produção do polímero é considerável, indicando que provavelmente, algum fator relacionado com o meio de cultura e fonte de carbono ou com as condições do processo tais como oxigênio dissolvido, temperatura ou pH, possam estar interferindo nessa produtividade.

As linhagens avaliadas apresentaram algumas diferenças relacionadas com crescimento, utilização de fontes de carbono e acúmulo do polímero. A linhagem *E. coli* LS5218, demonstrou ser mais eficiente na produção do P3HB em frascos agitados e biorreator e, além de atingir concentrações celulares mais elevadas assim como uma maior velocidade de crescimento e consumo das fontes de carbono avaliadas. Como já mencionado, os dados da literatura demonstraram que esta linhagem tem a capacidade de produzir um alto teor de polímero (20% – 60%), quando cultivadas em meios enriquecidos. Além disso, foi demonstrado que a *E. coli* LS5218 conseguiu acumular o copolímero P3HB-co-3HV quando cultivadas em meio mineral suplementado com propionato (NDUKO et al., 2012; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992; YIM; LEE; CHANG, 1995).

Recentemente, foi demonstrado que esta linhagem tem a capacidade de crescer em meios com concentrações de até 4g/L de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), um dos principais compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, representando uma opção interessante para a utilização de um dos principais resíduos industriais produzidos hoje no Brasil, como o bagaço de cana de açúcar, para a produção dos PHAs (NDUKO et al., 2012).

Os resultados ora apresentados também demonstraram que a concentração do ácido acético produzida, não representou um fator que pudesse inibir a síntese e posterior acúmulo do P3HB na *E. coli*. A análise por cromatografia líquida (HPLC) das amostras retiradas dos ensaios em biorreator não demonstraram a produção de outro tipo de ácido, normalmente produzido e excretado por linhagens de *E. coli*, que pudessem justificar a perda de carbono pelo consumo constante da glicose, indicando que, provavelmente, este carbono esteja sendo perdido na forma de CO₂.

A velocidade de crescimento da *E. coli* LS5218 obtida nos ensaios em biorreator, pode ser um dos fatores que estaria interferindo no acúmulo do P3HB, visto que, uma alta velocidade de multiplicação pode gerar uma porcentagem maior de células sem o plasmídeo, obtendo no final do crescimento exponencial uma

mínima porcentagem de células abrigando dito vetor de expressão, e, por tanto, uma baixa síntese e acúmulo do P3HB (TYO; AJIKUMAR; STEPHANOPOULOS, 2009). Holms (1996) demonstrou que a utilização de fontes de carbono como a frutose, metabolizada lentamente por *E. coli*, diminui progressivamente a taxa de crescimento nestas linhagens. Nossos resultados, utilizando xilose como fonte de carbono para a produção de P3HB da alta massa molar em *E. coli*, também confirmam esta hipótese, embora, como por nós observado anteriormente, a produção do polímero utilizando xilose tivesse sido menor em comparação com outras fontes de carbono (BOCANEGRA et al., 2007).

Seguindo este raciocínio, a utilização de fontes de carbono como frutose, poderia diminuir a velocidade de crescimento, permitindo que uma porcentagem maior de células filhas carregasse o plasmídio. Outra possibilidade seria controlar a velocidade de crescimento mediante o controle da velocidade de alimentação da fonte de carbono. Com base nesta análise, experimentos avaliando a frutose como fonte de carbono foram realizados, inicialmente em frascos agitados, assim como para confirmar a influencia do tratamento do inóculo no acúmulo do P3HB. Posteriormente, após a análise dos resultados obtidos nesses experimentos, foram planejados novos cultivos em biorreator.

4.3 Avaliação do efeito do tratamento do inóculo na produção do P3HB nas linhagens de *E. coli* BL21 e *E. coli* LS5218 em frascos agitados

Com o intuito de confirmar os resultados obtidos anteriormente em frascos agitados, foram realizados ensaios nos quais foi avaliada a produção do P3HB sob a influência do tratamento do inóculo. Estes cultivos foram realizados sob as mesmas condições e os mesmos parâmetros. Entretanto, a condição variável foi o tratamento do inóculo, sendo que, ensaios designados como inóculo tratado, correspondem aos ensaios em que o inóculo foi centrifugado e lavado com solução salina e, ensaios com inóculo sem tratar, corresponde aos ensaios em que o inóculo foi adicionado ao meio mineral diretamente (Tabela 4.6). A descrição detalhada do tratamento do inóculo e deste ensaio está descrita na seção 3.4. Além da confirmação dos ensaios realizados com a linhagem *E. coli* LS5218, foi avaliada a linhagem *E. coli* BL21, com o objetivo de se verificar a capacidade de síntese e acúmulo do P3HB como

hospedeira dos genes envolvidos na produção dos PHAs. Este ensaio foi realizado em triplicata, tendo sido considerado o valor médio dos valores obtidos.

Tabela 4.6 - Avaliação do efeito do tratamento do inóculo na produção de P3HB em *E. coli* recombinante.

Linhagem <i>E. coli</i>	Inóculo	24 (h)					48 (h)			
		$\mu_{\max}$	X _t (g/L)	P3HB %MSC	G (g/L) consumida	pH	X _t (g/L)	P3HB %MSC	G (g/L) consumida	pH
BL21 pBBR1MCS2:: <i>phaCAB</i> ⁺	Sem tratar	0.47	1.1	2.3	4.7	4.5	1.2	4.0	6.8	4.3
	Tratado	0.36	1.0	1.3	5.5	4.4	1.2	2.0	7.9	4.3
LS5218 pBBR1MCS2:: <i>phaCAB</i> ⁺	Sem tratar	0.45	1.6	26.0	5.6	4.6	2.4	40.6	11.6	4.4
	Tratado	0.37	0.9	12.6	3.9	4.4	1.1	14.6	7.8	4.3

$\mu_{\max}$: Velocidade máxima específica de crescimento.

X_t : Biomassa total produzida.

P3HB %MSC: percentual de P3HB da massa seca celular.

G: Glicose consumida.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Segundo os resultados obtidos neste ensaio, pode-se afirmar que existe uma grande diferença na síntese e acúmulo do P3HB quando o cultivo é realizado de forma que o inóculo é adicionado diretamente no meio mineral sem um pré-tratamento.

Como esperado, valores acima de 40% foram obtidos com a linhagem *E. coli* LS5218 após 48 horas de cultivo quando o inóculo foi adicionado sem tratamento ao meio mineral no início do ensaio, indicando que, é necessário realizar uma suplementação inicial no meio mineral a fim de atingir altas concentrações do P3HB, embora, não seja o valor máximo de produção que esta linhagem poderia atingir.

O resultado obtido com a linhagem *E. coli* BL21, também confirmou o resultado reportado com a linhagem *E. coli* LS5218 relacionado ao tratamento do inóculo. Por outro lado, o teor de acúmulo de P3HB nesta linhagem não atingiu valores expressivos, indicando que esta linhagem não é uma boa hospedeira dos genes envolvidos na produção dos PHAs, apesar dos trabalhos que descrevem a *E. coli* BL21 como uma ótima hospedeira de genes para a produção de diferentes

proteínas recombinantes (ALMECIGA-DIAZ et al., 2011; CHENG et al., 2011; SU et al., 2012). No entanto, não foram encontradas referências acerca da produção de PHAs nesta linhagem. Estes resultados foram confirmados através de outros ensaios, realizados, desta vez, em biorreator, nos quais igualmente não foi possível obter teores de PHAs expressivos (Anexo E- Planilhas E.10 e E.11).

Nas duas linhagens avaliadas uma maior velocidade de crescimento foi reportada, quando o inóculo sem tratar foi adicionado no meio mineral no início do ensaio, contudo, a porcentagem de polímero acumulado foi maior para as duas linhagens, nesta condição. O perfil de crescimento destes cultivos esta representado na Figura 4.10.

Figura 4.10 – Crescimento celular das linhagens *E. coli* BL21 pBBR1MCS2::*phaCAB*' e *E. coli* LS5218 pBBR1MCS2::*phaCAB*' medido por Densidade óptica (D.O) dos cultivos.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

A velocidade de crescimento aqui reportada é similar à velocidade de crescimento calculada nos ensaios em biorreator, porém, a concentração de células produzida nesses ensaios é aproximadamente três vezes maior do que nos ensaios em frascos agitados, ou seja, uma alta velocidade de crescimento com baixa concentração celular pode não interferir no acúmulo do polímero no caso dos ensaios em frascos agitados.

Após a confirmação destes resultados, os próximos cultivos em frascos agitados foram realizados de acordo com o procedimento em que o inóculo foi adicionado sem tratar, no meio de cultura. Experimentos avaliando a frutose como fonte de carbono foram realizados com o intuito de avaliar o perfil de crescimento e produção das diferentes linhagens de *E. coli*, a partir deste substrato.

4.4 Produção de P3HB em linhagens de *E. coli* recombinante utilizando frutose como fonte de carbono

Com o objetivo de avaliar a frutose como fonte de carbono para a produção de P3HB em linhagens de *E. coli* recombinante, foram realizados experimentos em frascos agitados sendo avaliadas as três linhagens de *E. coli* propostas contendo o plasmídio pBBR1MCS2::*phaCAB*, a fim de comparar a produção de P3HB entre elas, a partir desta fonte de carbono.

Paralelamente e sob as mesmas condições, foram realizados ensaios com glicose como fonte de carbono com a finalidade de ter um controle, dado que já era conhecida a produção do polímero com este substrato. Por outro lado, foi avaliada também, no mesmo ensaio, a expressão dos genes induzidos pela adição do Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), que é um indutor da transcrição e, assim, avaliar o efeito deste indutor na produção de P3HB nas linhagens recombinantes de *E. coli*. Os resultados obtidos nestes cultivos estão apresentados na Tabela 4.7.

Como se pode observar, a linhagem *E. coli* LS5218 foi a que apresentou a maior produção de P3HB a partir de glicose correspondendo aproximadamente a 40% da massa seca celular. As linhagens *E. coli* BL21 e XL1-Blue atingiram teores de P3HB inferiores a 10% da massa seca celular com o mesmo substrato.

Tabela 4.7 – Produção de P3HB por linhagens recombinantes de *E. coli* a partir de glicose e frutose, sob a indução do IPTG.

Linhagem <i>E. coli</i>	Fonte de carbono	24 (h)						48 (h)					
					IPTG						IPTG		
		PHB %MSC	X _t (g/L)	pH	PHB %MSC	X (g/L)	pH	PHB %MSC	X _t (g/L)	Ph	PHB %MSC	X (g/L)	Ph
XL1-Blue	Glicose	2.4	1.3	4.7	3.5	1.5	4.7	6.0	1.5	4.2	7.5	1.6	4.4
	Frutose	2.3	1.6	4.6	3.7	1.8	4.7	4.5	1.7	4.6	5.1	1.9	4.3
BL21	Glicose	7.4	1.7	4.6	2.2	1.5	4.8	7.3	1.6	4.5	4.8	1,7	4.7
	Frutose	7.5	1.6	4.7	1.9	1.3	4.9	10.2	1.7	4.6	2.1	1.5	4.8
LS5218	Glicose	23.6	1.8	4.5	17.8	1.7	4.6	39.6	2.3	4.5	35.8	1.9	4.5
	Frutose	11.3	1.5	4.6	11.1	1.5	4.7	17.7	1.7	4.4	16.5	1.6	4.6

X_t: Biomassa total produzida.

P3HB %MSC: percentual de P3HB da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Utilizando frutose como fonte de carbono, a linhagem *E. coli* LS5218 atingiu menos da metade (17%) do teor de polímero que foi atingido com glicose. Já a linhagem *E. coli* BL21 acumulou uma porcentagem um pouco maior de P3HB com frutose, mas ainda assim em baixas concentrações. Como esperado, a utilização de frutose como fonte de carbono diminuiu a velocidade de crescimento nas três linhagens avaliadas (Tabela 4.8). No entanto, o índice de produtividade com este substrato, não atingiu teores representativos de acúmulo de P3HB.

Tabela 4.8 - Velocidade de crescimento das linhagens recombinantes de *E. coli* cultivadas em glicose e frutose sob a presença do IPTG.

Linhagem <i>E. coli</i>	μ_{max}			
	IPTG		IPTG	
	Glicose (h ⁻¹)	Glicose (h ⁻¹)	Frutose (h ⁻¹)	Frutose (h ⁻¹)
XL1-Blue	0,24	0,13	0,20	0,14
BL21	0,41	0,30	0,38	0,25
LS5218	0,86	0,35	0,62	0,26

μ_{max} : Velocidade máxima específica de crescimento.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

O IPTG é um indutor bastante eficiente sendo hoje um dos mais usados em sistemas de expressão. No entanto, a produção do polímero não apresentou grandes diferenças quando o IPTG foi adicionado no meio de cultura, indicando que o nível de transcrição é similar com o sem a presença deste indutor. O IPTG tem sido demonstrado como sendo tóxico à maioria das células, diminuindo o crescimento após algumas horas de indução (HANSEN; KNUDSEN; SØRENSEN, 1998). Os resultados de velocidade de crescimento indicam que, na presença de IPTG a taxa de velocidade de crescimento diminui para todas as linhagens, em cada uma das fontes de carbono avaliadas. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a glicose continua sendo a fonte de carbono mais eficiente para a produção do P3HB. No entanto a linhagem *E. coli* LS5218 conseguiu acumular porcentagens expressivas de P3HB a partir de frutose, indicando que esta linhagem pode utilizar a sacarose, após sua hidrólise, como fonte de carbono, abundante em melaços de cana e beterraba, para a produção de biopolímeros e outros produtos de interesse biotecnológico como o bioetanol.

Visando ao entendimento das diferenças entre a produção de P3HB por *E. coli* LS5218 nos cultivos em frascos agitados e biorreator, foi considerado que, dentre as diversas diferenças que existem entre estes dois tipos de cultivo, a disponibilidade do oxigênio dissolvido e o pH são as mais representativas. No biorreator, estes parâmetros são controlados constantemente desde o início ao fim do experimento (Seção 3.5.2). Já, nos ensaios em frascos agitados, o pH é controlado unicamente no início do ensaio, mediante o tamponamento do meio a partir do ajuste dos sais, enquanto que a disponibilidade do oxigênio é limitada pela área disponível do frasco e pela sua velocidade de rotação. Assim, no caso do oxigênio, é difícil conhecer com exatidão o quanto o cultivo pode estar sendo limitado nos frascos agitados e se este parâmetro pode estar influenciando positivamente a produção do P3HB nas linhagens recombinantes de *E. coli*.

Com base na análise acima, experimentos em biorreator foram planejados com o intuito de confirmar se a limitação de oxigênio nos cultivos de produção de P3HB poderia funcionar como fator importante na produção do biopolímero. Assim, foram realizados cultivos em biorreator de tal forma que o oxigênio dissolvido no meio de cultura se mantivesse em torno de 1% da saturação, e assim avaliar sua influência durante o cultivo e produção de P3HB com *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*.

4.5 Cultivos em biorreator, com limitação de oxigênio (O₂), para a produção de P3HB por *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

No planejamento destes ensaios, inicialmente, foi determinado que, para que se possa obter uma referência de comparação, dois ensaios em biorreator, utilizando o mesmo meio de cultura, com as mesmas concentrações e sob os mesmos parâmetros de pH e temperatura, seriam realizados. A fim de avaliar a limitação de oxigênio na produção de P3HB por *E. coli* recombinante, no primeiro cultivo, a disponibilidade de oxigênio foi mantida acima de 30% de saturação durante todo o ensaio e no segundo cultivo a disponibilidade de oxigênio foi limitada a 1% de saturação. As planilhas contendo os dados destes ensaios encontram-se no Anexo E- Tabelas E.12 e E.13 . Os ensaios realizados em biorreator, descritos anteriormente, não possuíam uma análise da produção de gases, nem mesmo um controle da vazão do ar comprimido que era fornecido, devido ao fato de que, não se contava com os instrumentos necessários. Já para a realização destes ensaios, o biorreator foi acoplado a um analisador de gases e a vazão de ar suprida foi controlada por um fluxômetro de massa (Seção 3.5.4).

4.5.1 Ensaio sem limitação de oxigênio - *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB* - Ensaio 12

Parâmetros como temperatura, pH, volume e meio de cultura foram similares aos parâmetros utilizados nos ensaios anteriores. O oxigênio dissolvido neste ensaio manteve-se em torno de 30% mediante o aumento, quando necessário, da agitação, mantendo-se a vazão de ar em 1 litro por minuto (SLPM) ao longo do cultivo (Figura 4.11)

Inicialmente, a linhagem apresentou um crescimento exponencial durante as primeiras 6 horas, até que o nitrogênio tornou-se limitante, atingindo uma velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) de 0,61 h⁻¹. A glicose inicial presente no meio (15 g/L) foi rapidamente consumida, sendo que após 5 horas do início do cultivo a concentração de glicose estava em torno de 4 g/L. Posteriormente, e até o fim do ensaio, se fez necessária a realização de duas alimentações de glicose com a finalidade de se manter a fonte de carbono acima de 10 g/L. Após o crescimento exponencial, a linhagem manteve um crescimento linear até o final do ensaio.

Figura 4.11 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose sem limitação de oxigênio. Ensaio 12- Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR) e Taxa de produção de CO_2 (CER).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Os resultados em gramas da biomassa total (X_r) correlacionados com os resultados de produção de P3HB indicam que o teor de polímero acumulado foi de 5% da massa seca celular, similar ao teor de polímero obtido nos resultados dos ensaios anteriores, com a mesma linhagem. Da mesma forma, o ácido acético produzido (0,7 g/L), não apresentou valores expressivos que pudessem inibir o crescimento e produção de P3HB.

4.5.2 Ensaio com limitação de oxigênio - *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB` Ensaio 13

Neste ensaio, o oxigênio dissolvido, após atingir 1% da saturação, foi mantido neste valor pelo controle automático do biorreator variando-se a agitação para controle e mantendo-se a vazão de ar em 1 litro por minuto. Os demais parâmetros, não foram alterados a fim de se manter condições comparáveis.

Durante um curto período de tempo inicial, aproximadamente as primeiras 4 horas decorridas do ensaio, a linhagem apresentou um crescimento exponencial, seguido de um crescimento linear que foi estendido até aproximadamente as 16 horas de ensaio, tempo em que, o nitrogênio se fez limitante. Como observado na Figura 4.12, neste intervalo de tempo a linhagem conseguiu acumular, finalmente, teores expressivos de P3HB em torno de 28% da massa seca celular, sendo este um acúmulo associado ao crescimento. Após o esgotamento do nitrogênio o P3HB ainda continuo sendo produzido, porem com uma menor velocidade. Segundo os resultados reportados em gramas, a biomassa total produzida (X_t) no final do ensaio, foi de 16 g, sendo que 11,5 g corresponderam à biomassa residual (X_r) produzida e 4,5 g ao P3HB acumulado. Neste ensaio, ouve um consumo de glicose em gramas (145 g), quase duas vezes maior, em comparação com o ensaio anterior (85 g). Isto ocorreu devido ao fato de que, além da produção do polímero, a *E. coli*, neste ensaio, produziu cerca de 37 gramas de ácido acético e 11,5 gramas de biomassa residual.

A partir da análise destes resultados, fica evidente que esta condição de cultivo favoreceu notavelmente a produção do P3HB por *E. coli* LS5218, assim mesmo, a baixa velocidade de crescimento inicial apresentada ($\mu_{\max}$ 0,20 h⁻¹) pode ter favorecido a conservação do plasmídio na célula incrementando ainda mais a produção e acúmulo do P3HB.

Figura 4.12 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose com limitação de oxigênio. Ensaio 13- Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR) e taxa de produção de CO_2 (CER).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Nestes cultivos foi fornecida constantemente a fonte de carbono e nitrogênio, a fim de aumentar a fase de crescimento linear, período em que o P3HB foi acumulado a uma maior velocidade, e com isso atingir maiores concentrações de P3HB. A fim de avaliar a produção de P3HB na *E. coli* BL21 sob limitação de O₂, este ensaio foi reproduzido com esta linhagem, porém, não foi possível obter concentrações significativas do polímero, confirmando-se, assim, que a linhagem não é uma boa hospedeira dos genes da biossíntese dos PHAs. Os resultados deste ensaio estão apresentados no Anexo C, Figura C-3 e a planilha contendo os dados experimentais encontram-se no Anexo E Tabela E.14

4.5.3 Ensaios com e sem limitação de oxigênio e alimentação constante de glicose e nitrogênio. E. coli LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB'- Ensaio 15 – Ensaio 16

Estes ensaios foram planejados com o objetivo de avaliar se a produção de P3HB dependia ou não da limitação de O₂, mantendo o crescimento em uma condição linear a uma baixa velocidade o maior tempo possível. Assim como no ensaio anterior, em que a maior taxa de produção foi obtida durante esta fase de crescimento, seria possível estender este comportamento e aumentar o teor de acúmulo de P3HB, mediante a alimentação constante de glicose e nitrogênio a uma determinada velocidade. A partir dos resultados obtidos no ensaio anterior, foi possível calcular a velocidade de consumo da glicose e nitrogênio, a fim de se determinar a velocidade em que a solução de alimentação seria adicionada ao cultivo. Estes ensaios estão apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14 e as planilhas com os dados experimentais encontrasse no Anexo E tabelas E.15 e E.16.

Os dois ensaios foram realizados sob os mesmos parâmetro e condições de alimentação, porem no ensaio 16 o oxigênio dissolvido se manteve sempre acima de 30%, enquanto que no ensaio 15 o oxigênio dissolvido se manteve limitante em torno de 1%. Segundo os resultados dos ensaios anteriores foi determinado que, para cada 1,5 g de glicose consumida, eram consumidos 0,4 g de sulfato de amônio. Estes valores foram obtidos a partir dos valores da velocidade especifica de consumo de glicose e sulfato de amônio. Com base nos dados obtidos acerca da velocidade de consumo, foi calculada a vazão da alimentação imposta na bomba peristáltica acoplada ao biorreator.

Figura 4.13 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose com limitação de oxigênio. Ensaio 15- Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR); taxa de produção de CO_2 (CER) e ácido acético produzido (Ac. Act).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.14 – Cultivo de *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose sem limitação de oxigênio. Ensaio 16-Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N); taxa de consumo de oxigênio (OUR); taxa de produção de CO_2 (CER) e ácido acético produzido (Ac. Act).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Inicialmente, a vazão foi estabelecida a uma velocidade de alimentação de 0,0136 L/h, posteriormente, a velocidade foi aumentando gradativamente a partir das 10 horas de início do cultivo até se estabelecer em 0,0408 L/h após as 16 horas decorridas do cultivo. Nesse período de tempo, foi necessário aumentar a vazão de alimentação a fim de manter a concentração de glicose numa condição de excesso que permitisse o acúmulo do polímero.

Segundo os resultados obtidos nestes ensaios, a concentração de polímero produzido diminuiu em relação ao ensaio anterior, em que não foi fornecida uma alimentação constante de glicose e sulfato de amônio (Ensaio 13). No ensaio 15, com limitação de oxigênio, foram acumulados em torno de 12 gramas de P3HB, correspondendo a 19% da massa seca celular, enquanto que no ensaio 16, sem limitação de oxigênio, o acúmulo de P3HB foi de 9 gramas, correspondendo a 15% da massa seca celular. Estes resultados demonstraram que a limitação de oxigênio resulta ser eficiente no acúmulo do polímero, apesar de não ter uma notável diferença entre as produções de P3HB nos dois ensaios, porém não é o único parâmetro que possa influenciar no acúmulo.

Segundo a análise dos resultados obtidos, aparentemente a relação carbono / nitrogênio não favoreceu o acúmulo nestes ensaios. Provavelmente uma condição de maior excesso da fonte de carbono poderia garantir uma maior concentração de acúmulo do polímero.

No entanto, a partir da análise global do consumo de glicose, a uma perda excessiva de carbono na forma de CO₂, além de uma alta produção de ácido acético nestes dois ensaios. Se o fluxo de carbono pudesse ser direcionado para a produção de P3HB o rendimento da glicose em relação ao produto poderia ser incrementado. Para isso uma análise do fluxo metabólico, apresentado nestes ensaios, foi realizada a fim de analisar as melhores condições metabólicas que poderiam direcionar o fluxo de carbono para uma maior produção de polímero.

4.5.4 Análise de fluxos metabólicos da linhagem E. coli LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB' dos ensaios 15 e 16.

Com o objetivo de avaliar o desempenho da linhagem recombinante *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB' na produção de P3HB, bem como o potencial que poderia ser atingido por essa bactéria na geração desse bioproduto, os cultivos

apresentados nas Figuras 4.14 e 4.15 foram avaliados para a implementação de análise de fluxos metabólicos. Para a realização dessa análise, inicialmente é necessário definir regiões pseudo-estacionárias, ou seja, aquelas em que embora se observem variações nas concentrações de substratos e produtos, o metabolismo procede de uma forma constante sem o acúmulo de intermediários metabólicos.

A análise dos cultivos apresentados nas Figuras 4.13 e 4.14, revela que, nas 4-6 horas iniciais de cultivo se observa um crescimento exponencial com características de um estado pseudo-estacionário. Entretanto, nesse período do cultivo as massas celulares ainda eram muito pequenas tornando qualquer cálculo muito impreciso.

Até 16 horas de cultivo, as vazões de alimentação da solução contendo glicose e sulfato de amônio variaram ao longo do tempo e portanto não é possível considerar um estado pseudo-estacionário.

A partir das 16 horas de cultivo, as vazões de alimentação da solução contendo glicose e sulfato de amônio não variaram e, portanto, podem representar um estado pseudo-estacionário. Considerando as taxas de produção de biomassa residual e P3HB, bem como as taxas de consumo de glicose e sulfato de amônio, este período pode ser dividido em dois períodos pseudo-estacionários: 16 a 28-30 horas e de 28-30 a 44 horas. Entretanto, considerando a taxa de produção de ácido acético, o período entre 16 e 28-30 horas deve ser dividido em dois períodos possivelmente correspondendo a estados pseudo-estacionários: 16 a 22 horas, quando ocorre a produção de acetato, e 22 a 28-30 horas, quando o acetato é consumido.

A análise das taxas de formação de CO_2 (CER – *carbon evolution rate*) e de consumo de O_2 (OUR – *oxygen uptake rate*) indicam que apenas os períodos entre 16 e 22 horas e entre 30 e 35 horas podem ser considerados como pseudo-estacionários, pois não há alterações nessas taxas.

Assim, os dados do intervalo entre 16 e 22 horas foram utilizados para análise de fluxos metabólicos, pois correspondem ao período em que uma maior taxa de formação de P3HB e biomassa residual foi observada.

A Tabela 4.9 apresenta os resultados para o intervalo entre 16 e 22 horas de cultivo das velocidades de produção de biomassa residual, P3HB, acetato e CO_2 , bem como para o consumo de glicose e O_2 . Os dados indicam que para o Ensaio 15, o carbono detectado na forma de biomassa residual, P3HB, acetato e CO_2

corresponde a 101% do carbono presente na glicose consumida. Para o Ensaio 16, o carbono dos produtos corresponde a 102% do carbono presente na glicose consumida. Desta forma, considerando os desvios experimentais, a rede metabólica pode ser construída tomando em conta a formação apenas desses produtos a partir da glicose fornecida.

Tabela 4.9 - Consumo de glicose e formação de bioprodutos em cultivo de *E. coli* para produção de P3HB.

Experimento		Glicose	Xr	P3HB	Acetato	CO ₂	Recuperação carbono (%)
Ensaio 15	g/L.h	2,46	0,48	0,12	0,44	1,88	101,6
	mmol/L.h	13,66	-	1,39	7,45	42,83	
	Cmmol/L.h	82,00	20,00	5,58	14,91	42,83	
Ensaio 16	g/L.h	2,45	0,6	0,09	0,22	2,06	102,2
	mmol/L.h	13,66	-	1,05	3,80	47,03	
	Cmmol/L.h	81,99	25,00	4,20	7,60	47,03	

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Foi construída uma rede metabólica conforme Figura 4.15. A partir dessa rede, foram construídos arquivos de entrada para o programa Metatool (PFEIFFER et al., 1999) considerando a produção de P3HB correspondendo a 20% da biomassa seca total (Ensaio 15) e 13% (Ensaio 16). Os arquivos de entrada do programa Metatool estão apresentados no Anexo D.

Foram obtidos 12 modos elementares para cada uma das redes metabólicas analisadas. Um modo elementar correspondia a oxidação da glicose a CO₂ e H₂O. Um modo elementar correspondia a formação de acetato. Os demais modos elementares correspondiam a formação de biomassa residual e P3HB sem a formação de acetato. Como para o período do cultivo em análise se observa a produção de acetato, biomassa residual e P3HB, foram realizadas combinações dos diferentes modos elementares que consideravam a produção de P3HB e biomassa residual e aquele que descrevia a produção de acetato.

Fatores de conversão / correlação foram calculados para os dados experimentais e comparados aos valores estimados a partir das reações globais das

diferentes combinações de modos elementares. Considerando um desvio de 10% nos valores de fatores de conversão/correlação, foram detectados duas combinações de modos elementares que representavam o período pseudo-estacionário analisado do Ensaio 15 e cinco combinações para o Ensaio 16. As respectivas combinações de modos elementares para cada um dos ensaios não apresentavam variações significativas. Assim, a Figura 4.16 apresenta a distribuição de fluxos metabólicos relativa ao período pseudo-estacionário analisado para o Ensaio 15, e a Figura 4.17 para o Ensaio 16. Mesmo quando comparados os dois experimentos observa-se grande semelhança na distribuição de fluxos na rede metabólica. O fluxo na via das pentoses é muito pequeno e o NADPH necessário para produção de P3HB é praticamente todo gerado pela ação da enzima isocitrato desidrogenase. Dessa forma, o fluxo no ciclo de Krebs corresponde a aproximadamente 45% do Acetil-CoA gerado.

Foram analisados modos elementares que poderiam atingir a conversão máxima de glicose em P3HB. A distribuição de fluxos para cultivos com acúmulo de P3HB correspondendo a 20% e 13% da massa seca celular estão representadas nas Figuras 4.18 e 4.19, respectivamente. A concentração de P3HB produzido, em relação à glicose consumida, poderia aumentar mais de 100% e cerca de 60%, para os cultivos acumulando P3HB correspondendo a 20 e 13% da massa seca celular, respectivamente. Para atingir esse objetivo, a produção de acetato deveria ser eliminada. Além disso, o fluxo na via das pentoses deveria ser aumentado significativamente de forma a que todo o NADPH para biossíntese de P3HB fosse suprido por essa via. O fluxo no ciclo de Krebs deveria ser o menor possível, servindo apenas para atender a demanda de precursores para a biossíntese de biomassa residual.

Desta forma, os resultados obtidos indicam que a biossíntese de P3HB em *E. coli* ocorre com uma eficiência bastante menor que os valores máximo teóricos possíveis e que o desempenho dessa bactéria pode ser melhorado expressivamente com uma nova distribuição de fluxos no metabolismo central.

Figura 4.15 - Rede metabólica representativa da produção de P3HB por *E. coli* a partir de glicose.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.16 – Distribuição de fluxos representando *E. coli* produzindo 20% de P3HB.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.17 - Distribuição de fluxos representando *E. coli* produzindo 13% de P3HB.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.19 - Distribuição de fluxos representando a eficiência máxima teórica de conversão de glicose em P3HB em *E. coli*. P3HB correspondendo a 13% da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Em decorrência aos resultados obtidos nos cultivos em biorreator, foi concluído que, uma das possibilidades para se atingir um maior acúmulo de PHA nos cultivos em *E. coli*, seria estabilizar o plasmídio nesta linhagem, e, para atingir tal objetivo foi planejada uma estratégia que permitiria, por recombinação homóloga, integrar o operon *phaCAB* no cromossomo da *E. coli*.

4.6 Integração do operon *phaCAB* no cromossomo da *Escherichia coli* LS5218

No planejamento desta estratégia, foi objetivada a realização da integração do operon *phaCAB* no cromossomo da *Escherichia coli*, em um gene relacionado ao metabolismo de propionato, de forma que, além da produção do polímero P3HB, o propionato poderia ser utilizado para a síntese de copolímeros de P3HB-co-3HV. Na *Escherichia coli*, o propionato é metabolizado pelo ciclo de 2-metilcitrato sintase (2-MCC); nestas bactérias, os genes codificadores das enzimas envolvidas no ciclo do 2-MCC estão organizados no operon *prpBCD* (BRÄMER; STEINBÜCHEL, 2001; TEXTOR et al., 1997). Nesta via, inicialmente, o propionato é convertido a propionil-CoA pela ação de uma propionil-CoA sintetase, em seguida, a molécula de propionil-CoA é condensada com oxaloacetato, através da ação da enzima 2-metilcitrato sintase (*prpC*), sendo formado o 2-metilcitrato. Posteriormente, a enzima 2-metilcitrato desidratase (*prpD*) catalisa a conversão de 2-metilcitrato para 2-metilisocitrato e, finalmente, a clivagem do 2-metilisocitrato, em piruvato e succinato, é catalisada pela enzima 2-metilisocitrato liase (*prpB*) (BROCK et al., 2002). Desta forma, a deleção do gene *prpC* nesta via, impediria a formação do 2-metilcitrato, interrompendo o ciclo e a posterior produção de piruvato e succinato.

Na presença de um co-substrato, como o propionato, uma molécula de propionil-CoA, pode ser condensada com uma molécula de acetil-CoA, gerando 3-cetovaleril-CoA, que é reduzido a (*R*)-3-hidroxisovaleril-CoA pela ação da cetoacetil-CoA redutase. A PHA sintase, incorpora tanto moléculas de (*R*)-3-hidroxisovaleril-CoA como (*R*)-3-hidroxi-butilil-CoA à cadeia polimérica em crescimento, para formar o copolímero P3HB-co-3HV (STEINBÜCHEL; PIEPER 1992). Desta forma, nas linhagens incapazes de crescer em propionato (*prpC*⁻), nas quais a via 2-MCC está interrompida, o propionil-CoA, que seria destinado para a formação de piruvato e succinato, é então aproveitado para formação do copolímero P3HB-co-3HV.

Linhagens selvagens de *E. coli* não possuem um sistema eficiente para a conversão de propionato a propionil-CoA. Quando a *E. coli* cresce em um meio rico, as vias de absorção (*atoC*) e utilização de ácidos graxos (*fadR*) não são expressas por causa da regulação dos genes ativadores (*atoC*) e repressores (*fadR*). No entanto, quando uma cultura de *E. coli* é transferida para um meio contendo ácidos graxos, como única fonte de carbono, como por exemplo o propionato, ocorre uma desrepressão e um crescimento é detectável após um longo período de adaptação que vão desde várias horas até vários dias. Quando a regulação genética do transporte e utilização de ácido graxo é eliminada por mutações *atoC* (Con) e *fadR*, as enzimas de utilização do propionato são constitutivamente expressas e a *E. coli* cresce relativamente bem em propionato, sem a necessidade de longos períodos de adaptação (SHARON et al., 1981).

A linhagem *E. coli* LS5218 possui duas mutações, *fadR* e *atoC*, que induzem, respectivamente, a transcrição constitutiva dos genes necessários para a degradação de ácidos graxos e os genes que participam no transporte e metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta, como o propionato, butirato ou valerato (SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). Assim, a utilização desta linhagem reduziria o tempo em que o propionato poderia ser metabolizado e aproveitado para a produção do copolímero.

Utilizando-se uma estratégia de mutagênese por recombinação homóloga direta, foram obtidas linhagens mutantes contendo o operon de biossíntese *phaCAB*. Essa estratégia consistiu, inicialmente, na construção de um cassete com marca de resistência a canamicina, que carregasse o operon a ser integrado (*phaCAB*) e um fragmento do gene alvo a ser deletado (*prpC*), que codifica a enzima 2-metilcitrate sintase (2-MCC), e participa no ciclo do metabolismo de propionato em *Escherichia coli* e outras bactérias. Posteriormente, mediante a recombinação homóloga, foram obtidos mutantes de *Escherichia coli* afetados diretamente em regiões genômicas codificadoras da enzima 2-MCC, obtendo-se mutantes com o plasmídeo integrado ao genoma. A linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, deficiente no metabolismo de propionato, (proveniente do *E. coli* Genetic Stock Center- EUA) foi utilizada como controle para a obtenção de mutantes deficientes neste metabolismo (BABA et al., 2006).

4.6.1 Construção do vetor *pBBR1MCS-2::prpC::CAB*

Este vetor foi construído pela clonagem de um fragmento da região interna do gene *prpC* no plasmídeo *pBBR1MCS-2* e clonagem do operon *phaCAB* da biossíntese de P3HB no mesmo vetor. Um fragmento de 391 pb foi amplificado por PCR a partir do DNA cromossômico da *E. coli* LS5218. Esta amplificação foi realizada com oligonucleotídeos desenhados a partir da sequência do gene *prpC*. Foram seqüenciadas, para confirmação, duas amostras (*prpC1* – *prpC2*). O resultado do seqüenciamento esta apresentado no Anexo B.

O produto amplificado foi clonado por inserção no sítio *SmaI* do vetor *pSK*⁺. Posteriormente, o fragmento contendo parte do gene *prpC*, foi extraído por digestão com as enzimas *EcoRI/BamHI* do *pSK*⁺ e ligado ao *pBBR1MCS-2* previamente digerido com as mesmas enzimas. Finalmente, o operon *phaCAB* foi inserido no sítio *HindIII* do *pBBR1MCS-2::prpC*, também digerido *HindIII* previamente. A confirmação por digestão enzimática está apresentada na Figura 4.20. O esquema da construção e o esquema do vetor resultante estão apresentados na Figura 4.21.

Figura 4.20 - Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; **A.** 1) Fragmento amplificado de 391 pb da região interna do gene *prpC*, amostra *prpC1*; 2) Amostra *prpC2*; 3) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; **B.** 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) *pSK::prpC* digerido com *SmaI*; **C.** 1) Vetor *pBBR1MCS-2*; 2) Vetor construído: *pBBR1MCS-2::phaCABprpC* digerido *EcoRI/BamHI* para visualizar a banda do *prpC* clonado e, posteriormente, digerido *HindIII* para visualizar a banda de *phaCAB* e a do plasmídeo; 3) *pBBR1MCS-2::prpC* digerido com as enzimas digerido *EcoRI/BamHI*.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.21 – Esquema da construção do vetor pBBR1MCS-2::*prpC*::*CAB*.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.6.2 Obtenção de mutantes deficientes no metabolismo de propionato (*prpC*⁻).

Quatro colônias da *E. coli* LS5218, resultantes da transformação com a construção pBBR1MCS-2::*prpCphaCAB*, foram submetidas a sucessivas passagens em LB líquido, seguidos de várias passagens em LB líquido contendo canamicina (LBK). Colônias resistentes a canamicina foram isoladas e cultivadas em meio mineral sólido contendo 1 g/L de propionato (MMP), com o objetivo de identificar mutantes deletados no gene *prpC*. Foram obtidos 2650 clones recombinantes dos quais seis apresentaram crescimento negativo em MMP e crescimento positivo em meio LBK, indicando, desta forma, um possível evento de recombinação homóloga que levou ao nocaute do gene *prpC*. Assim, a hipótese é de que estes mutantes tenham sofrido um único evento de recombinação, ou simples *crossing over* e integração do operon *phaCAB* no genoma desta linhagem.

A Figura 4.22 apresenta alguns dos mutantes escolhidos e a confirmação de acúmulo por teste com coloração “Sudan Black”.

Figura 4.22 - Placas de crescimento em meio mineral com propionato para a obtenção dos mutantes; 1-2 - Evidência de possíveis mutantes incapazes de crescer meio contendo propionato; 3 - Teste em “Sudan Black” para avaliar o acúmulo dos mutantes escolhidos, controle negativo: Linhagem sem plasmídio, controle positivo: Linhagem com plasmídio.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Considerando a possibilidade desta recombinação simples, se verificou, após a extração de DNA plasmidial, que nenhum dos seis mutantes possuía o plasmídeo *pBBR1MCS-2::prpC-phaCAB*.

Portanto, estes seis mutantes com indício de integração, incapazes de crescer em propionato, resistentes a canamicina e sem conter o plasmídio, foram

cultivados em meio mineral contendo glicose e propionato como fonte de carbono, para favorecer o acúmulo do polímero P3HB e do copolímero P3HB-co-3HV. Foram avaliadas, simultaneamente, como controles a linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB* e a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$.

4.6.3 Avaliação dos mutantes nocauteados no gene *prpC*

Inicialmente, foram realizados cultivos em frascos agitados para avaliar os seis mutantes obtidos. Os ensaios foram realizados em meio mineral contendo 15 g/L de glicose e sem adição de antibiótico. Como controle negativo, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ sem plasmídio, e nas mesmas condições em que os mutantes foram avaliados. Como controle positivo, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 abrigando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*, também sob as mesmas condições que as linhagens mutantes, porém com adição de canamicina para garantir a presença do plasmídio mediante a pressão seletiva. Os resultados destes cultivos estão apresentados na Tabela 4.10.

Foi observada a produção de P3HB nos seis mutantes avaliados. Como esperado, o controle negativo (linhagem sem o plasmídio), não apresentou acúmulo do polímero, e a linhagem abrigando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB* atingiu teores de acúmulo entre 15 e 19% da massa seca celular, próximos a os reportados pelas linhagens mutantes. Assim, após esta primeira confirmação em cultivos em frascos agitados, foi realizado um ensaio em biorreator, a fim de avaliar a produção dos mutantes e comparar a produção com as linhagens recombinantes nos cultivos em biorreator. A partir dos resultados obtidos nos ensaios em frascos agitados, nos quais o mutante 45 obteve os melhores resultados em relação ao acúmulo do polímero, foi escolhido dito mutante para a avaliação nos ensaios em biorreator. Este ensaio está representado na Figura 4.23 e a planilha contendo os dados experimentais encontrasse no Anexo E, Tabela E.9.

Tabela 4.10 – Avaliação dos mutantes *prpC* para produção de PHA.

Linhagem <i>E. coli</i>	Tempo (h)	X (g/L)	PHA (% MSC)
Mutante 10	24	1,0	15,7
	48	1,2	18,4
	72	1,2	20,0
Mutante 26	24	0,8	14,2
	48	1,1	14,4
	72	1,1	19,1
Mutante 44	24	0,8	17,0
	48	0,9	19,0
	72	1,1	22,9
Mutante 45	24	1,25	21,6
	48	1,25	23,8
	72	1,35	25,6
Mutante 47	24	0,7	14,8
	48	0,9	11,0
	72	1,1	10,9
Mutante 58	24	0,8	14,5
	48	0,9	13,6
	72	1,1	15,3
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	24	1,0	0,0
	48	1,1	0,0
	72	1,2	0,0
LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i>	24	0,9	15,6
	48	1,0	15,0
	72	1,0	19,8

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura 4.23 - Concentração celular (X), percentual da massa seca celular (P3HB %), concentração de glicose residual presente no meio (G) do ensaio 09 avaliando o mutante 45.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

O perfil de crescimento desta linhagem foi similar ao obtido pela linhagem recombinante anteriormente avaliada, a $\mu_{\max}$ foi de $0,48 \text{ h}^{-1}$, e foram feitas duas alimentações de glicose durante todo ensaio. No entanto, o acúmulo do polímero neste ensaio apresentou valores em torno de 2% da massa seca celular. Assim, provavelmente, o mesmo problema metabólico das linhagens recombinantes esteja afetando o acúmulo do polímero na linhagem mutante. A realização de ensaios em biorreator, nos quais seja implementada uma condição de limitação de oxigênio e uma relação apropriada de carbono / nitrogênio, provavelmente, permita obter maiores teores de acúmulo nestas linhagens mutantes.

O grupo de pesquisadores do laboratório de Genética Ambiental da Universidade de Buenos Aires, coordenado pela Doutora Julia Pettinari, 2010 (comunicação pessoal)¹, realizaram a integração dos genes da biossíntese de PHA no cromossomo da *E. coli*, mediante técnicas de PCR e mediante a utilização de um promotor forte para a expressão deste genes. Os resultados do grupo de pesquisa foram insatisfatórios, não sendo possível obter teores de acúmulo de PHA pelas linhagens integradas.

Segundo a Doutora Pettinari, este resultado, possivelmente, se deve ao fato de que uma única cópia do operon no cromossomo da *E. coli*, não é suficiente para que a linhagem possa acumular o polímero. Tyo (2009) desenvolveu um sistema para a expressão de um alto número de cópias de genes no cromossoma de *E. coli*, denominado evolução cromossômica quimicamente induzida. O sistema, baseado na recombinação homologa por *recA*, permitiu obter aproximadamente 40 cópias do operon *phaCAB* no cromossomo da *E. coli*, com o qual conseguiram um acúmulo de 70% de P3HB nesta linhagem.

¹ PETTINARI, J. Buenos Aires, 2010.

4.7 Produção do copolímero P3HB-co-3HV pela linhagem *E. coli* LS5218

Com o objetivo de avaliar a capacidade de acúmulo de P3HB e seu copolímero P3HB-co-3HV, as linhagens recombinantes de *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, abrigando plasmídios contendo o operon *phaCAB* de *C. necator*, foram cultivadas em meio mineral contendo 15 g/L de glicose. Diferentes concentrações de propionato foram adicionadas após 24 horas de cultivo.

Linhagens de *E. coli* crescem lentamente na presença de propionato, concentrações entre 30 mM e 50 mM de propionato, são altamente tóxicas para a célula, ocasionando baixa produção do copolímero e inibição do crescimento (RAMSAY et al., 1990; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992). Portanto, a concentração de propionato (1 g/L) adicionada ao meio de cultura, 24 horas após o início do ensaio, não afetaria o crescimento das linhagens, podendo ser utilizado para a formação de monômeros de (*R*)-3-hidroxisovaleril-CoA.

A linhagem *E. coli* LS5218 recombinante, tem a capacidade de acumular P3HB devido a presença do plasmídio, e de acordo com Dennis et al., (1998) possui a capacidade de acumular o copolímero. Entretanto, se espera que a fração molar do co-monômero seja menor nesta linhagem que na linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, devido ao fato de que nesta linhagem o propionato estaria disponível exclusivamente para a formação das unidades 3HV e não poderia ser oxidado a Acetil-CoA. Foram avaliadas diferentes concentrações de propionato (0,25 g/L e 0,5 g/L). Cultivos sem a adição do propionato foram realizados como controle dos experimentos. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Tabela 4.11

Tabela 4.11 - Avaliação da produção de PHA pelas linhagens recombinantes *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$.

Linhagem <i>E. coli</i>	Propionato adicionado	Tempo (h)	X (g/L)	pH	Glicose (g/L)	PHA %MSC	PHA % mol	
							3HB	3HV
LS5218 $\Delta prpC$ pSK ⁺	Ø	24	1,08	4,5	8,71	0,0	100	0,0
		48	0,96	4,3	6,89	0,0	100	0,0
		72	1,01	4,3	5,08	0,0	100	0,0
	0,25 g/l	24	1,13	4,6	6,65	0,0	100	0,0
		48	0,94	4,3	6,61	0,0	100	0,0
		72	0,87	4,5	6,44	0,0	100	0,0
	0,5 g/l	24	1,05	4,7	8,03	0,0	100	0,0
		48	1,14	4,3	6,94	0,0	100	0,0
		72	0,73	4,5	6,86	0,0	100	0,0
LS5218 $\Delta prpC$ pSK:: <i>phaCAB</i>	Ø	24	1,5	4,6	5,21	20,6	100	0,0
		48	1,09	4,3	5,97	18,4	100	0,0
		72	1,06	4,4	6,43	18,1	100	0,0
	0,25 g/l	24	1,37	4,7	6,45	16,9	100	0,0
		48	1,23	4,3	5,91	19,3	100	0,0
		72	0,99	4,5	5,18	23,8	100	0,0
	0,5 g/l	24	0,66	4,8	7,49	17,3	100	0,0
		48	1,03	4,5	6,14	22,1	100	0,0
		72	0,95	4,6	5,27	25,7	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-2	Ø	24	1,35	4,6	8,29	0,0	100	0,0
		48	1,02	4,3	5,73	0,0	100	0,0
		72	0,91	4,3	6,72	0,0	100	0,0
	0,25 g/l	24	1,11	4,7	7,51	0,0	100	0,0
		48	0,89	4,3	6,04	0,0	100	0,0
		72	0,73	4,4	4,05	0,0	100	0,0
	0,5 g/l	24	1,06	4,8	8,01	0,0	100	0,0
		48	0,94	4,4	6,35	0,0	100	0,0
		72	0,81	4,4	6,82	0,0	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS- 2:: <i>phaCAB</i>	Ø	24	1,55	4,7	6,52	32,1	100	0,0
		48	1,18	4,3	4,53	30,2	100	0,0
		72	1,1	4,3	3,52	32,0	100	0,0
	0,25 g/l	24	1,53	4,8	7,29	29,1	100	0,0
		48	1,09	4,3	5,22	29,1	100	0,0
		72	1,02	4,4	5,1	28,9	100	0,0
	0,5 g/l	24	1,62	4,8	6,26	27,1	100	0,0
		48	1,04	4,4	3,54	30,2	100	0,0
		72	0,99	4,4	3,37	30,5	100	0,0

X: Biomassa total.

PHA % MCS: percentual de PHA da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Segundo os resultados obtidos, como esperado, nos cultivos com a linhagem *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ abrigando apenas o vetor de expressão (*pSK*), nenhum acúmulo foi observado. A partir da expressão dos genes *phaCAB*, foi observado um teor de acúmulo de P3HB correspondendo a 25,7% da massa seca celular para a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ e 32 % da massa seca celular a partir da linhagem *E. coli* LS5218. A adição de propionato não levou à incorporação de 3HV ao copolímero, em nenhuma das linhagens avaliadas. Os dados apresentados na literatura demonstram que esta linhagem tem a capacidade de acumular o copolímero com frações de até 39 mol% de 3HV (SLATER et al., 1992; NCUDO et al., 2012). Porém, nestes ensaios iniciais não foi possível confirmar os resultados obtidos pelos autores.

Tendo em vista que a linhagem *E. coli* LS5218, preservada no banco de cepas do laboratório, não apresentava os resultados esperados e ainda reportados na bibliografia (RHIE et al., 1995; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992), foi solicitada uma outra linhagem de *E. coli* LS5218 ao *E. coli* Genetic Stock Center. Posteriormente, foram realizadas as transformações com os correspondentes plasmídeos para conferir a capacidade de acúmulo bem como referendar os resultados anteriormente obtidos. Esta nova linhagem foi nomeada *E. coli* LS5218 GSC.

4.7.1 Avaliação das linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 GSC

Com intuito de avaliar a linhagem *E. coli* LS5218, preservada no laboratório, e confirmar sua identidade, foi avaliada uma nova linhagem requerida ao *E. coli* Genetic Stock Center. A linhagem *E. coli* LS5218 GSC foi então transformada por choque térmico com o plasmídeo *pBBR1MCS-2::phaCAB*, assim como a linhagem *E. coli* LS5218. Foram realizados ensaios em meio mineral, contendo diferentes concentrações de propionato (0,5 g/L e 1,0 g/L), adicionado 24 horas após o início do cultivo. Foram realizados cultivos sem a adição do propionato como controle dos experimentos. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Tabela 4.12

Tabela 4.12 - Avaliação das linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 GSC

Linhagem <i>E. coli</i>	Propionato adicionado	Tempo (h)	X (g/L)	G (g/L)	PHA %MSC	PHA%mol	
						3HB	3HV
LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁻	Ø	0	0,6	12,5	0,0	100	0,0
		24	1,2	4,2	12,5	100	0,0
		48	1,3	3,3	13,8	100	0,0
	0,5 g/L	0	0,7	15,3	0,0	100	0,0
		24	1,3	3,0	9,0	100	0,0
		48	1,9	2,6	9,9	100	0,0
	1,0 g/L	0	1,5	10,1	0,0	100	0,0
		24	1,5	4,2	9,4	100	0,0
		48	1,9	3,1	10,7	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ><	Ø	0	1,2	10,9	0,0	100	0,0
		24	1,4	4,0	11,2	100	0,0
		48	1,4	2,1	11,1	100	0,0
	0,5 g/L	0	1,2	10,8	0,0	100	0,0
		24	1,2	4,5	9,0	100	0,0
		48	1,9	4,0	9,5	100	0,0
	1,0 g/L	0	1,1	11,3	0,0	100	0,0
		24	1,2	4,0	9,8	100	0,0
		48	1,5	2,5	10,7	100	0,0
LS5218 GSC pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ⁻	Ø	0	1,0	14,2	0,0	100	0,0
		24	1,4	3,4	10,6	100	0,0
		48	1,4	2,8	11,4	100	0,0
	0,5 g/L	0	1,4	10,5	0,0	100	0,0
		24	1,8	4,7	7,4	100	0,0
		48	1,7	4,1	7,9	100	0,0
	1,0 g/L	0	1,1	15,6	0,0	100	0,0
		24	1,4	3,8	8,3	100	0,0
		48	1,8	3,2	8,9	100	0,0
LS5218 GSC pBBR1MCS-2:: <i>phaCAB</i> ><	Ø	0	1,1	10,7	0,0	100	0,0
		24	1,2	4,0	10,8	100	0,0
		48	1,3	3,2	10,6	100	0,0
	0,5 g/L	0	0,9	13,9	0,0	100	0,0
		24	0,9	4,2	6,8	100	0,0
		48	1,0	3,6	8,1	100	0,0
	1,0 g/L	0	1,0	13,1	0,0	100	0,0
		24	1,3	3,9	7,9	100	0,0
		48	1,4	3,3	8,2	100	0,0

X: Biomassa total.

G: Glicose residual.

PHA %MCS: percentual de PHA da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Nas três condições em que foram avaliadas as duas linhagens, não foi verificado acúmulo do copolímero P3HB-co-3HV, porém, acumularam o polímero P3HB. Tanto o perfil de crescimento quanto o de acúmulo foram bastante similares para as duas linhagens, indicando que, a linhagem preservada no laboratório realmente corresponde à linhagem LS5218. Desta forma, os resultados até o momento apresentados, não corroboram com os dados publicados por Slater et al. (1992), que afirmam que a *E. coli* LS5218 consegue acumular 3HV correspondendo até 39 mol% do copolímero. Além dos ensaios de acúmulo, foi realizado um ensaio com a finalidade de calcular a velocidade específica máxima de crescimento. Os valores de $\mu_{\max}$ foram semelhantes para as duas linhagens avaliadas, sendo este de $0,77 \text{ h}^{-1}$ para a linhagem *E. coli* LS5218 e $0,78 \text{ h}^{-1}$ para a linhagem *E. coli* LS5218 GSC Figura 4.24.

Figura 4.24 - Crescimento avaliado por medida da Densidade Ótica (DO) para as linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 GSC.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Cupriavidus necator produz, além do homopolímero P3HB, o copolímero P3HB-co-3HV quando substratos como o propionato são suplementados como fonte de carbono. O passo principal para a produção do 3-hidroxivalerato é a

condensação de acetil-CoA e propionil-CoA, para formar β -cetovaleril-CoA. Slater et al. (1998) reportaram que o gene *bktB* que codifica uma β -cetotiolase em *Cupriavidus necator*, é capaz de formar β -cetovaleril-CoA, a partir do Acetil-CoA e o propionil-CoA para a produção de β -hidroxivalerato. Os autores determinaram que *Cupriavidus necator* expressa outras β -cetotiolases, além da PhaA, designadas como BktB e BktC e que estas produzem eficientemente β -cetovaleril-CoA. Finalmente eles isolaram e caracterizaram a enzima β -cetotiolase B, que tem uma ampla especificidade pelo substrato e é necessária para uma eficiente produção de P3HB-co-3HV. A partir desses dados, foram realizados trabalhos para avaliar o efeito do produto do gene *bktB* de *Cupriavidus necator*, amplificado e clonado no vetor pBBR1MCS-2 (GOMES, 2010), na produção do copolímero P3HB-co-3HV.

4.7.2 Construção de plasmídeos contendo os genes de biossíntese de PHA de *Cupriavidus necator*

Com o objetivo de oferecer ferramentas biossintéticas para o acúmulo do copolímero pela *E. coli* LS5218, foram construídos vetores que expressam as proteínas encarregadas da biossíntese dos PHAs. A inativação do gene *prpC* na linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, foi realizada pelo sistema λ Red, no qual o gene alvo foi inativado por um cassete de resistência a canamicina (BABA et al., 2006). Devido a isso, foi necessário realizar as construções em vetores de clonagem com marca de resistência diverso da canamicina.

4.7.2.1 Construção de plasmídeos contendo os genes da síntese de P3HB de *Cupriavidus necator*

As construções realizadas foram fundamentadas nos genes presentes no operon *phaCAB* da *Cupriavidus necator*, cujo produto gênico, participa na biossíntese de P3HB neste microorganismo. Este operon se encontra presente no plasmídeo pBBR1MCS-2, que tem resistência a canamicina; foi necessário realizar uma nova construção no plasmídeo pBBR1MCS-5 (KOVACH et al., 1995), com resistência a gentamicina, uma vez que a linhagem de interesse, *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, possui resistência a canamicina, proveniente da deleção do gene *prpC* (BABA et al., 2006).

A nova construção foi iniciada com a transferência do operon *phaCAB*, presente no plasmídio pJM9131, para o vetor mencionado pBBR1MCS-5. O plasmídio pJM9131 foi inicialmente digerido com a enzima *HindIII*, resultando em um fragmento de 5,8 Kb correspondente ao operon *phaCAB*, e um fragmento de 2,6 Kb correspondente ao plasmídio pJM9131. Em seguida o fragmento de 5,8 Kb, correspondente ao operon de interesse, foi purificado a partir do gel de agarose e ligado ao vetor pBBR1MCS-5, previamente digerido com a enzima *HindIII*. O produto ligado foi então transferido por transformação para a linhagem *E. coli* DH5 α pelo método de eletroporação. O resultado da transformação foi semeado em meio LB sólido contendo gentamicina (LBG) e IPTG/Xgal. Após crescimento, colônias apresentando coloração branca foram selecionadas, posteriormente o DNA plasmidial foi extraído e digerido *HindIII* para confirmação da correta ligação do operon *phaCAB* ao vetor. O gel confirmando a construção e o esquema dos plasmídios obtidos está apresentado na Figura 4.25.

Figura 4.25 - Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; **A.** 1) DNA λ digerido com *HindIII*, Invitrogen; 2) pJM9131 digerido com *HindIII*; **B.** 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2-3) pBBR1MCS-5::*phaCAB* digerido *HindIII*. **C.** plasmídio pBBR1MCS-5::*phaCAB* > <. **D.** plasmídio pBBR1MCS-5::*phaCAB*

C.

D.

Com o intuito de determinar a orientação na qual o operon *phaCAB* foi inserido, a construção resultante foi digerida com a enzima de restrição *Apal*, sendo que, o operon *phaCAB* apresenta um sitio de restrição para essa enzima em uma região cerca de 960 bp *downstream* ao códon de iniciação do gene *phaA*, e, o outro sítio de restrição, para a mesma enzima, estando localizado no *multiple cloning site* (MCS) do vetor.

O resultado da digestão com essas enzimas permitiu então determinar os dois perfis de clonagem, sendo que quando a inserção do operon no plasmídio ocorreu, de tal forma que a transcrição dos genes poderia ser dirigida tanto pelo promotor σ^{70} original do operon *phaCAB*, como pelo promotor *lacZ* do plasmídio pBBR1MCS-5, duas bandas de 7.0 Kb e 3.0 Kb, aproximadamente, foram visualizadas no gel de agarose. Neste caso, a construção resultante foi denominada como pBBR1MCS-5::*phaCAB*'. O segundo perfil de clonagem, ou seja, aquele em que o promotor original do operon se encontrava na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lacZ* do plasmídio; foi determinado pela presença de duas bandas de 8,5 Kb e 2,5 Kb aproximadamente, quando digerido com a mesma enzima (*Apal*), representando a totalidade da soma do tamanho do plasmídio e do operon (9768 bp), sendo determinado como pBBR1MCS-5::*phaCAB*><. A confirmação dos perfis esta apresentada na Figura 4.26.

Figura 4.26 - Eletroforeses em gel de agarose 0,8%; **1)** DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; **2-3-4)** pBBR1MCS-5::*phaCAB* > < digerido *Apal*; **5)** pBBR1MCS-5::*phaCAB*' digerido *Apal*.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.7.2.2 Construção de plasmídeos contendo o gene de biossíntese da *BktB* de *Cupriavidus necator*

Com a finalidade de obter linhagens capazes de acumular P3HB-co-3HV, foi construído um vetor que carrega o gene que codifica a β -cetotiolase *BktB*, envolvida na condensação de acetil-CoA e propionil-CoA que permite a síntese de unidades 3HV do copolímero. A partir da amplificação e clonagem do gene *bktB* proveniente da *Cupriavidus necator* no plasmídeo pBBR1MCS-2 (GOMES, 2010), foi realizada a transferência do gene para o vetor pBBR1MCS-3, de modo a obter-se um plasmídeo com marca de resistência diferente da canamicina ou gentamicina; sendo nesse caso, a marca de resistência correspondente a tetraciclina.

Para esta construção, o fragmento contendo o gene *bktB* foi removido do plasmídeo pBBR1MCS-2, mediante a realização de duas digestões individuais e contínuas. Inicialmente, foi realizada uma digestão com a enzima de restrição *Xho*I e, posteriormente, com a enzima de restrição *Xba*I. Em seguida, o fragmento contendo o gene de interesse foi purificado a partir do gel de agarose e ligado ao plasmídeo pBBR1MCS-3, previamente digerido com as mesmas enzimas (*Xho*I/*Xba*I).

Posteriormente, o produto da ligação foi transferido para a linhagem *E. coli* DH5 α por eletroporação. Finalmente, o resultado da transformação, foi semeado em meio Luria-Bertani sólido contendo tetraciclina (LBT) e IPTG/Xgal. Após decorrido o tempo de incubação, colônias apresentando coloração branca foram selecionadas, e o DNA plasmidial extraído e digerido (*Xho*I/*Xba*I) para confirmação.

Esta estratégia permitiu controlar a orientação na qual o gene *bktB* seria clonado no vetor, uma vez sendo determinada inicialmente, a orientação em que o gene se encontraria no plasmídeo original (pBBR1MCS-2), em relação ao promotor *lacZ* desse vetor. Desta forma, tendo as duas orientações confirmadas foram gerados os dois plasmídios contendo o gene *bktB*, nas duas possíveis orientações, sendo determinadas como pBBR1MCS-3::*bktB* quando o gene estivesse orientado no sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lacZ* do vetor utilizado, e, pBBR1MCS-3::*bktB*><, no caso que o gene se encontrasse na orientação contrária ao sentido que permitiria a transcrição pelo promotor *lacZ*.

A digestão com as enzimas *Xho*I e *Nco*I permitiu confirmar as orientações, uma vez que o gene *bktB* apresenta um sítio de restrição para a enzima *Nco*I em

uma região cerca de 1000 bp *downstream* ao códon de iniciação desse gene, e, o outro sítio de restrição, para a enzima *Xho*I, está localizado no *multiple cloning site* (MCS) no vetor clonado. Sendo que como resultado da digestão do plasmídio pBBR1MCS-3::*bktB* serão visualizadas duas bandas de 5.5 Kb e 1.0 Kb, aproximadamente, e com a digestão do pBBR1MCS-3::*bktB*><, as bandas visualizadas no gel de agarose apresentariam tamanhos de 6,2 Kb e 400 pb.

A Figura 4.27 apresenta os resultados da digestão para identificar os perfis de orientação destes plasmídios e o esquema dos plasmídios construídos.

Figura 4.27 – **A.** Eletroforese em gel de agarose 0,8%; 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) pBBR1MCS-3::*bktB* digerido *Xho*I e *Nco*I; 3) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 4) pBBR1MCS-3::*bktB*>< digerido *Xho*I e *Nco*I. **B.** pBBR1MCS-3::*bktB*. **C.** pBBR1MCS-3::*bktB*><.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.7.3 Construção das linhagens recombinantes

As construções realizadas como descrito no item anterior, foram transferidas por transformação pelo método de choque térmico para as linhagens *E. coli* LS5218 GSC e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$. As linhagens recombinantes obtidas estão apresentadas no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 - Linhagens recombinantes obtidas após transformação com os plasmídios construídos.

Linhagem	Plasmídio
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > <
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > <
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > < / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > < / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > < / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> > < / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ' / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ' / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> '
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ' / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ' / pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.7.3.1 Avaliação do acúmulo de P3HB nas linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídios pBBR1MCS-5::*phaCAB*' e pBBR1MCS-5::*CAB*><

Inicialmente, as linhagens recombinantes foram avaliadas, com o intuito de determinar a influência da concentração de gentamicina no crescimento e acúmulo do P3HB. Concomitantemente, foi avaliada a relevância do promotor *lacZ*, do vetor pBBR1MCS-5, na expressão dos genes de biossíntese de P3HB. Esses ensaios foram realizados em meio mineral, tendo sido avaliadas diferentes concentrações de gentamicina no meio. Os resultados deste ensaio estão apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13 - Avaliação da influencia da concentração de gentamicina no meio de acúmulo em linhagens recombinantes de *E. coli*.

Linhagem <i>E. coli</i>	Gentamicina (µg/mL)	Tempo (h)	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA%mol	
						3HB	3HV
LS5218 pBBR1MCS-5::phaCAB ⁺	15	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,4	10,6	100	0,0
		48	4,5	1,6	10,7	100	0,0
	30	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,5	10,0	100	0,0
		48	4,5	1,6	10,4	100	0,0
	45	0	6,9	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,6	10,9	100	0,0
		48	4,5	1,7	11,0	100	0,0
	60	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,3	10,1	100	0,0
		48	4,5	1,4	10,6	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS- 5::phaCAB > <	15	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,4	12,2	100	0,0
		48	4,4	1,6	12,4	100	0,0
	30	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,2	15,0	100	0,0
		48	4,3	1,7	15,9	100	0,0
	45	0	6,9	-	-	100	0,0
		24	4,7	1,7	17,9	100	0,0
		48	4,4	1,8	19,1	100	0,0
	60	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,6	1,3	12,0	100	0,0
		48	4,4	1,7	13,4	100	0,0
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5::phaCAB ⁺	15	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,7	1,9	22,7	100	0,0
		48	4,5	2,3	24,0	100	0,0
	30	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,8	2,5	27,7	100	0,0
		48	4,6	2,6	27,3	100	0,0
	45	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	5,0	2,2	35,3	100	0,0
		48	4,6	2,3	38,1	100	0,0
	60	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	5,0	1,5	29,7	100	0,0
		48	4,6	2,2	31,8	100	0,0
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS- 5::phaCAB > <	15	0	7,1	-	-	100	0,0
		24	4,8	1,9	30,5	100	0,0
		48	4,6	2,1	26,4	100	0,0
	30	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	4,9	2,1	33,4	100	0,0
		48	4,6	3,0	35,3	100	0,0
	45	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	5,0	2,0	36,2	100	0,0
		48	4,6	2,6	38,1	100	0,0
	60	0	7,0	-	-	100	0,0
		24	5,4	1,9	27,0	100	0,0
		48	4,7	2,3	37,2	100	0,0

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Segundo os resultados obtidos nesses ensaios, aparentemente, as concentrações de antibiótico utilizadas não interferiram no crescimento ou acúmulo das linhagens avaliadas. Por outro lado, a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5::*CAB*>< apresentou um maior percentual de acúmulo de P3HB indicando que, neste caso, a orientação do promotor do operon em relação ao promotor do vetor não tem relevância para o acúmulo do polímero, fato confirmado com o acúmulo apresentado pela linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-5::*CAB*><, embora com um percentual de acúmulo menor. Estes resultados também demonstraram, que a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ tem a capacidade de acumular uma quantidade maior de P3HB em relação a linhagem *E. coli* LS5218, embora não tenha sido detectado acúmulo de P3HB-co-3HV, indicando que, provavelmente seja necessária a utilização de uma β -cetotiolase com maior afinidade pelas unidades propionil-CoA.

4.7.3.2 Avaliação do acúmulo de P3HB nas linhagens *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídeos pBBR5::*CAB*` pBBR5::*CAB*>< e pBBR3::*bktB*` pBBR3::*bktB*><

Com o objetivo de avaliar se o uso de tetraciclina e gentamicina poderia afetar o crescimento e acúmulo da linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, que apresentou os melhores resultados de acúmulo do ensaio anterior, foram testadas diferentes concentrações de tetraciclina e gentamicina no meio de cultura. Foi avaliado um meio com glicose (15 g/L), assim como também uma segunda fonte de carbono, xilose (15 g/L). Foi realizada uma única amostragem após 48 horas de cultivo. As linhagens e condições do ensaio estão apresentadas na Tabela 4.14.

Segundo os resultados deste ensaio, o maior teor de polímero acumulado foi obtido nos ensaios em que não houve adição de nenhum antibiótico, indicando que, o uso dos dois antibióticos pode ter afetado o acúmulo do polímero nesta linhagem. Por tanto, os ensaios avaliando os plasmídios pBBR5::*phaCAB*` e pBBR3::*bktB*`, apresentados a seguir, foram realizados usando as mínimas concentrações de antibiótico requeridas. Os ensaios com xilose, não apresentaram valores representativos de acúmulo em relação aos ensaios empregando glicose como fonte de carbono, indicando que, com esta linhagem, a glicose continua a ser o substrato melhor utilizado para o acúmulo do polímero.

Tabela 4.14 - Avaliação da influência da concentração de tetraciclina e gentamicina no crescimento e acúmulo de P3HB em linhagens recombinantes de *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ expressando os plasmídios pBBR5:*phaCAB*⁺ pBBR3:*bktB*⁺ ou pBBR5:*phaCAB*⁺ pBBR3:*bktB*⁻.

Concentração de antibióticos	Condição	Parâmetros	<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$			
			LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5:: <i>phaCAB</i> ⁺ pBBR3:: <i>bktB</i> ⁺	LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5:: <i>phaCAB</i> ⁺ pBBR3:: <i>bktB</i> ⁻	LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5:: <i>phaCAB</i> ^{><} pBBR3:: <i>bktB</i> ⁺	LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5:: <i>phaCAB</i> ^{><} pBBR3:: <i>bktB</i> ⁻
Ø Tetraciclina Ø Gentamicina	Glicose	pH	4,6	4,4	4,5	4,5
		X (g/L)	1,7	1,4	2,2	1,8
		PHB %MSC	26,9	21,6	36,2	33,1
	Xilose	pH	4,5	4,4	4,5	4,3
		X (g/L)	1,6	1,4	2,1	1,5
		PHB %MSC	20,0	14,2	25,1	20,9
Gentamicina 15 mg/mL Tetraciclina 12,5 mg/mL	Glicose	pH	4,5	4,5	4,5	4,5
		X (g/L)	1,4	1,1	2,0	1,8
		PHB %MSC	11,6	7,7	30,2	21,5
	Xilose	pH	4,7	4,7	4,8	4,8
		X (g/L)	1,5	1,0	1,5	1,1
		PHB %MSC	13,6	2,6	2,5	2,6
Gentamicina 15 mg/mL Tetraciclina 25 mg/mL	Glicose	pH	4,4	4,4	4,4	4,6
		X (g/L)	1,5	1,4	2,0	1,3
		PHB %MSC	9,2	5,9	24,9	14,8
Gentamicina 30 mg/mL Tetraciclina 25 mg/mL	Glicose	pH	4,5	4,6	4,6	4,6
		X (g/L)	1,1	1,1	1,0	1,1
		PHB %MSC	4,9	1,4	0,5	0,0

X: Biomassa total produzida.

P3HB % MCS: percentual de P3HB da massa seca celular.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.7.3.3 Avaliação do acúmulo de PHA nas linhagens *E. coli* LS5218 e LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídios *pBBR1MCS-5::phaCAB'* ou *pBBR1MCS-5:CAB><*. e *pBBR1MCS-3:bktB'* ou *pBBR3:bktB><*

Com o objetivo de avaliar o acúmulo do copolímero P3HB-co-3HV, foram realizados ensaios com diferentes concentrações de propionato (0,5 g/L e 1,0 g/L) em meio mineral, contendo 15 g/L de glicose. Foram avaliadas diferentes combinações, das construções de plasmídios anteriormente realizadas, nas linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, com o intuito de determinar a melhor combinação possível dos plasmídios utilizados, sendo que, estas diferentes combinações foram testadas para as duas linhagens avaliadas. As linhagens recombinantes e os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 4.15 e 4.16.

Segundo os resultados obtidos, foi observado que a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ acumulou um maior percentual de P3HB em relação a linhagem *E. coli* LS5218, para todas as combinações de plasmídios avaliadas, confirmando os resultados obtidos nos ensaios anteriores. Foi observado também, que valores de aproximadamente 40% de P3HB da massa seca celular, foram obtidos pela linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídios *pBBR1MCS-5::phaCAB><* e *pBBR1MCS-3::bktB'*. Teores de acúmulo próximos (30% PHA da MSC) foram reportados também com os plasmídeos *pBBR1MCS-5::phaCAB'* e *pBBR1MCS-3::bktB'*. Nestas mesmas combinações de plasmídios, com esta linhagem, foi detectada a produção de PHA contendo uma pequena fração molar de unidades 3HV (entre 1% e 7% mol de 3HV), indicando que, a expressão das duas β -cetotiolases favoreceu a produção do copolímero, embora este acúmulo não atingisse as concentrações de 3HV reportadas na literatura (25% mol de 3HV). Estes resultados também indicam que, possivelmente, o promotor *LacZ* do plasmídio incrementou a expressão do gene favorecendo a síntese e acúmulo do P3HB-co-3HV, mais ainda, não foi suficiente para atingir os valores de acúmulo do copolímero esperados. Por tanto, a fim de avaliar outras possíveis causas que estariam interferindo na síntese e acúmulo do copolímero, foi implementada uma metodologia de engenharia evolutiva, para tentar incrementar o acúmulo do P3HB-co-3HV, mediante o desenvolvimento do mecanismo de transporte do propionato.

Tabela 4.15 - Avaliação do acúmulo de PHAs a partir de diferentes concentrações de propionato pela *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ recombinante.

Linhagem <i>E. coli</i>	Propionato adicionado (g/L)	Tempo (h)	pH	X (g/L)	Propionato residual (g/L)	PHA (%)	PHA %mol	
							3HB	3HV
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i>	Ø	24	4,8	1,75	ND	24,5	100	0,0
		48	4,5	1,88	ND	24,0	100	0,0
	0,5	24	4,8	1,42	ND	24,6	100	0,0
		48	4,1	1,90	ND	20,3	100	0,0
	1,0	24	5,0	1,67	ND	18,5	100	0,0
		48	4,5	1,73	ND	20,7	100	0,0
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ><	Ø	24	4,3	1,84	ND	22,2	100	0,0
		48	4,8	1,89	ND	21,2	100	0,0
	0,5	24	4,2	1,34	ND	17,7	100	0,0
		48	4,5	1,57	ND	18,0	100	0,0
	1,0	24	4,2	1,73	ND	19,7	100	0,0
		48	4,7	1,68	ND	17,1	100	0,0
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i>	Ø	24	4,6	1,90	0	26,5	97,9	2,1
		48	4,5	2,11	0	27,1	98,7	1,3
	0,5	24	5,3	2,25	0,864	29,2	97,5	2,5
		48	4,2	2,45	0,827	30,4	97,3	2,7
	1,0	24	5,4	1,85	1,622	29,3	99,1	0,9
		48	4,8	2,03	1,545	28,2	98,9	1,1
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> >< pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i>	Ø	24	4,0	2,32	0	39,9	98,9	1,1
		48	4,0	2,57	0	35,5	98,9	1,1
	0,5	24	5,8	2,51	0,724	36,4	98,7	1,3
		48	4,7	2,56	0,470	35,1	98,5	1,5
	1,0	24	5,5	2,69	1,435	34,7	98,5	1,5
		48	4,1	2,69	1,514	34,6	98,4	1,6
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> >< pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><	Ø	24	4,9	1,39	ND	4,5	100	0,0
		48	4,7	1,62	ND	4,4	100	0,0
	0,5	24	4,3	1,42	ND	6,8	100	0,0
		48	4,8	1,45	ND	6,9	100	0,0
	1,0	24	4,1	1,66	ND	6,6	100	0,0
		48	4,3	1,75	ND	6,8	100	0,0

X: Biomassa total produzida.

PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular.

PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido.

ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.16 - Avaliação do acúmulo de PHAs a partir de diferentes concentrações de propionato pela *E. coli* LS5218 recombinante

Linhagem	Propionato adicionado (g/L)	Tempo (h)	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol	
						3HB	3HV
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ⁺	Ø	24	4,64	1,44	7,3	100	0,0
		48	4,45	1,52	7,4	100	0,0
	0,5	24	4,73	1,36	5,7	100	0,0
		48	4,53	1,51	5,8	100	0,0
	1,0	24	4,92	1,50	8,8	100	0,0
		48	4,66	1,59	9,2	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ><	Ø	24	4,59	1,37	11,8	100	0,0
		48	4,42	1,66	11,9	100	0,0
	0,5	24	4,98	1,48	11,6	100	0,0
		48	4,58	1,44	12,6	100	0,0
	1,0	24	5,00	1,52	11,1	100	0,0
		48	4,66	1,59	11,1	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ⁺ pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ⁺	Ø	24	4,66	1,17	2,9	100	0,0
		48	4,53	1,43	3,3	100	0,0
	0,5	24	4,88	1,29	5,6	100	0,0
		48	4,63	1,29	5,8	100	0,0
	1,0	24	4,92	1,30	5,1	100	0,0
		48	4,70	1,11	5,2	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> >< pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ⁺	Ø	24	4,67	1,29	13,3	100	0,0
		48	4,58	1,37	14,5	100	0,0
	0,5	24	4,88	1,30	15,6	100	0,0
		48	4,70	1,43	15,9	100	0,0
	1,0	24	4,96	1,45	12,2	100	0,0
		48	4,78	1,50	12,5	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> ⁺ pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><	Ø	24	4,81	1,96	28,8	100	0,0
		48	4,52	1,85	27,8	100	0,0
	0,5	24	4,78	1,54	9,1	100	0,0
		48	4,6	1,53	9,7	100	0,0
	1,0	24	4,93	1,72	13,3	100	0,0
		48	4,73	1,64	17,1	100	0,0
LS5218 pBBR1MCS-5:: <i>phaCAB</i> >< pBBR1MCS-3:: <i>bktB</i> ><	Ø	24	4,74	1,32	7,9	100	0,0
		48	4,51	1,50	ND	100	0,0
	0,5	24	4,77	1,30	5,5	100	0,0
		48	4,63	1,39	5,5	100	0,0
	1,0	24	4,92	1,47	5,0	100	0,0
		48	4,69	1,54	5,2	100	0,0

X: Biomassa total produzida.

PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular.

PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido.

ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.8 Evolução dirigida para a produção do copolímero P3HB-co-3HV por *E. coli* recombinante

Estudos realizados visando à obtenção de P3HB-co-3HV com alta fração molar de 3HV, em linhagens de *E. coli* recombinante, demonstraram que as concentrações de 3HV aumentaram quando os cultivos foram induzidos com acetato (CHIEN et al., 2012; SLATER; GALLAHER; DENNIS, 1992; YIM et al., 1996;). Inicialmente, Slater et al. (1992) observaram que em cultivos utilizando linhagens de *E. coli* recombinante, o copolímero P3HB-co-3HV era produzido na presença de glicose e propionato, e que a adição de acetato favorecia o aumento nas unidades 3HV do copolímero acumulado. Porém, eles determinaram que a produção de unidades 3HV era absolutamente dependente da presença de propionato no meio, mas independente da presença de acetato. Assim, eles propuseram que, possivelmente, o sistema de transporte de propionato era semelhante ao sistema de transporte de acetato, e que, portanto a condição que promove o transporte e ativação de acetato também estimulava o metabolismo do propionato. Posteriormente, Yim et al. (1996) demonstraram que em cultivos com *E. coli* recombinante usando propionato como co-substrato, as concentrações 3HV aumentaram significativamente com indução de acetato (10 mM) quando comparados com cultivos sem indução. A partir da análise dos resultados, os autores determinaram que a expressão das enzimas envolvidas no metabolismo de acetato facilitava a utilização de propionato, de modo que, o propionato podia ser ativado por enzimas envolvidas na ativação de acetato como a acetato-quinase (Ack) e fosfotransferase (Pta). Recentemente, Chien et al. (2012) também identificaram, em cultivos com *E. coli* recombinante, que as concentrações de 3HB e 3HV aumentaram quando a cultura era induzida com acetato, e demonstraram que as enzimas envolvidas na ativação de acetato eram necessárias para a absorção e degradação de propionato. Portanto, segundo os resultados obtidos nesses trabalhos, foi proposto que o propionato pode ser também transportado pelo sistema de transporte de acetato, e posteriormente ativado para propionil-CoA através de uma das duas vias do sistema de ativação de acetato, sendo fosforilado pela acetato-quinase e/ou fosfotransferase. Assim, foi proposta uma metodologia para a indução do metabolismo de acetato em *E. coli* a partir da evolução dirigida destas linhagens em acetato.

As linhagens *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ foram submetidas a repasses contínuos em MM contendo acetato como fonte de carbono. As linhagens em questão foram cultivadas, primeiramente, em meio LB e, posteriormente, uma alíquota deste cultivo foi utilizada para inocular o cultivo em MM contendo acetato (MMA). Inicialmente, o crescimento das linhagens em MMA foi avaliado por turbidez do meio de cultura, sendo que, após evidente crescimento, uma alíquota deste cultivo foi transferida para um segundo MMA e posteriormente, após crescimento do cultivo, uma alíquota deste foi transferida para um novo MMA. Este processo foi repetido durante uma semana, tempo em que as linhagens apresentaram uma rápida adaptação ao MMA, avaliado pelo tempo em que a turbidez do meio de cultura era evidente. Após seis repasses realizados, durante a primeira semana, foi realizado um ensaio para avaliar o perfil de crescimento das linhagens em MMA, por medidas de densidade óptica (DO_{610}), tendo sido determinado que a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ cultivada em acetato já apresentava uma velocidade de crescimento maior no meio MMA se comparada com a mesma linhagem não evoluída. Já a linhagem a *E. coli* LS5218 cultivada em acetato, não apresentou uma diferença notável no crescimento comparada com a linhagem não evoluída após a primeira semana de repasses em acetato. Após esta primeira avaliação, os repasses contínuos prosseguiram por mais 60 dias, sendo que, controles de crescimento foram realizados a cada semana assim como a avaliação de crescimento por medida da DO_{610} entre cada passagem. Este ensaio, assim como as concentrações de acetato utilizadas, está descrito na seção 3.4.5. A velocidade de crescimento foi aumentando a cada semana, sendo que no final do experimento, após aproximadamente 5 horas de cultivo, a linhagem evoluída em acetato, *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, apresentava diferenças expressivas em relação à linhagem não evoluída. Durante os cultivos, a linhagem *E. coli* LS5218 sempre apresentou uma velocidade de crescimento maior do que a apresentada pela *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, sendo que, na comparação com a linhagem não evoluída, a diferença nas velocidades de crescimento não foram muito representativas para esta linhagem. As curvas do perfil de crescimento, obtidas ao final do ensaio de engenharia evolutiva, estão apresentadas na Figura 4.28.

Figura 4.28 - Comparação do perfil de crescimento das linhagens evoluídas em acetato e seus controles.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.8.1 Construção dos plasmídeos contendo os genes de expressão de *PhaC* e *PhaB* de *Cupriavidus necator* pBBR21MCS-5::CB>< e pBBR21MCS-5::CB`

Com o intuito de confirmar se a enzima BktB de *Cupriavidus necator* tem uma maior afinidade por unidades de propionil-CoA, provenientes da ativação do propionato, para sintetizar as unidades de 3HV e posterior formação do copolímero, foram construídos plasmídios, expressando unicamente os genes *phaB* e *phaC* que codificam as enzimas cetoacil-CoA redutase e pHA sintase, respectivamente, a fim de avaliar a atividade da enzima BktB codificada pelo gene *bktB* expresso no plasmídio pBBR1MCS-3::bktB, anteriormente construído (Seção 4.7.2.2), sem a interferência da β -cetotiolase codificada pelo gene *phaA*.

Para a construção dos novos vetores, foram utilizados os plasmídios pBBR1MCS-5::phaCAB>< e pBBR1MCS-5::phaCAB`, construídos inicialmente neste trabalho, que possuem resistência a gentamicina e abrigam o operon *phaCAB* de *Cupriavidus necator*.

Para a deleção do gene *phaA* que codifica a enzima β -cetotiolase, o plasmídio pBBR1MCS-5::phaCAB>< (9.7 kb) foi digerido com a enzima *StuI*. Este plasmídio apresentou dois sítios únicos de restrição para esta enzima, sendo que um deles está situado 103 pb *downstream* ao códon de iniciação do gene *phaA*, enquanto que, o outro sítio está situado 1098 pb *downstream* ao códon de iniciação do mesmo gene. Desta forma, um fragmento de aproximadamente 995 pb correspondente ao gene *phaA* e um fragmento de 8,7 kb correspondente ao, pBBR1MCS-5::CB, ou seja, o restante do plasmídio digerido, foram obtidos.

A mesma digestão foi realizada no plasmídio pBBR1MCS-5::phaCAB` a fim de obter o plasmídio de interesse contendo os genes *phaCB* na outra orientação em relação ao promotor *lacZ*. Neste caso, no plasmídio pBBR1MCS-5::phaCB><, o promotor original do operon encontra-se na orientação contrária ao sentido que permite a transcrição pelo promotor *lacZ* do plasmídio e, no plasmídio pBBR1MCS-5::phaCB`, a transcrição dos genes pode ser dirigida tanto pelo promotor σ^{70} original do operon *phaCB*, como pelo promotor *lacZ* do plasmídio pBBR1MCS-5. A confirmação da digestão e o esquema dos plasmídios obtidos estão apresentados na Figura 4.29.

Figura 4.29 – Eletroforese de amostras de DNA em gel de agarose 0,8% demonstrativo a construção dos plasmídios *pBBR21MCS-5::CB><* e *pBBR21MCS-5::CB'*. **A.** 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2) *pBBR1MCS-5::phaCAB><*; 3) *pBBR1MCS-5::phaCAB><* digerido *Stul*; 4) *pBR1MCS-5::phaCAB'*; 5) *BR1MCS-5::phaCAB'* digerido *Stul*. **B.** Esquemas do plasmídio *BR1MCS-5::phaCB'* construído **C.** Esquema do plasmídio *BR1MCS-5::phaCB><* construído.

A.

B.

C.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

O fragmento de interesse quer seja, o pBBR1MCS-5::CB>< ou o pBBR1MCS-5::CB', foi purificado a partir do gel de agarose e posteriormente religado. O produto ligado foi então transferido por transformação para a linhagem *E. coli* XL1-Blue pelo método de choque térmico.

O resultado da transformação foi semeado em meio LB sólido contendo gentamicina (LBG). Após crescimento, foram selecionadas 5 colônias resistentes a gentamicina, de cada uma das transformações dos produtos de ligação, correspondente aos plasmídios pBBR1MCS-5::CB>< ou pBBR1MCS-5::CB'. O DNA plasmidial das linhagens transformantes foi extraído e digerido com a enzima *StuI* para confirmação da correta digestão e ligação anterior dos plasmídios pBBR1MCS-5::CB ou pBBR1MCS-5::CB'. Das 5 linhagens transformantes avaliadas, para cada um dos plasmídios construídos, duas amostras apresentaram o perfil esperado para cada um dos plasmídios construídos. A digestão da confirmação das linhagens transformantes positivas, para cada plasmídio, esta apresentada na Figura 4.30.

Figura 4.30 – Eletroforeses em gel de agarose 0,8% para confirmação dos transformantes obtidos. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder Plus, Fermentas; 2-3) Transformantes positivos para pBBR1MCS-5:*phaCB*`; 4-6) Transformantes negativos para pBBR1MCS-5:*phaCB*`; 7-9) Transformantes negativos para pBBR1MCS-5::*phaCB*><; 10-11) Transformantes positivos para pBBR1MCS-5::*phaCB*><.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.8.2 Transformação das linhagens evoluídas com os plasmídeos construídos

Os plasmídios resultantes da construção anterior (pBBR1MCS-5::*CB*>< e pBBR1MCS-5::*CB*`) foram transferidos por transformação pelo método de choque térmico para as linhagens evoluídas em acetato *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, assim como para às mesmas linhagens não evoluídas. Após confirmação, as linhagens transformantes abrigando o plasmídio pBBR1MCS-5::*CB*>< ou pBBR1MCS-5::*CB*`, resistentes a gentamicina, foram transformadas com os plasmídios pBBR1MCS-3::*bktB*>< e pBBR1MCS-3::*bktB*` construídos anteriormente (Seção 4.7.2.2).

Posteriormente, foi extraído o DNA plasmidial das linhagens transformantes, resistentes à gentamicina e tetraciclina, resultantes da transformação anterior com os plasmídios pBBR1MCS-3::*bktB*>< e pBBR1MCS-3::*bktB*`. A confirmação da presença dos dois plasmídeos, nas linhagens transformantes, foi realizada por digestão com a enzima *Xba*I, sendo que, cada um dos plasmídios apresentou um único sítio de corte para esta enzima, resultando em fragmentos únicos lineares.

Assim, fragmentos de 8,7 kb correspondiam aos plasmídios pBBR1MCS-5::CB>< ou pBBR1MCS-5::CB`, e fragmentos de 6,5 kb correspondiam aos plasmídios pBBR1MCS-3::bktB>< ou pBBR1MCS-3::bktB`. A eletroforese em gel de agarose, resultante da confirmação de algumas das linhagens transformantes, está apresentada na Figura 4.31. Todas as linhagens recombinantes evoluídas e não evoluídas em acetato, obtidas após transferência por transformação dos diferentes plasmídios construídos, estão listadas no Quadro 4.2.

Figura 4.31 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% da confirmação das linhagens transformantes evoluídas e não evoluídas. 1) DNA GeneRuler 1Kb Ladder, Fermentas; 2) *E. coli* LS5218 evoluída pBBR1MCS-5::CB>< pBBR1MCS-3::bktB><; 3) *E. coli* LS5218 evoluída pBBR1MCS-5::CB` pBBR1MCS-3::bktB`; 4) *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída pBBR1MCS-5::CB>< pBBR1MCS-3::bktB><; 5) *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída pBBR1MCS-5::CAB` pBBR1MCS-3::bktB`

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Quadro 4.2 - Linhagens recombinantes obtidas após transformação com os plasmídios construídos (*pBBR21MCS-5::CB*) (*pBBR21MCS-3::bktB*)

Linhagem	Plasmídio
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:CB
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:CB`
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:CB pBBR1MCS-3:bktB
<i>E. coli</i> LS5218	pBBR1MCS-5:CB` pBBR1MCS-3:bktB`
<i>E. coli</i> LS5218 Evoluída	pBBR1MCS-5:CB
<i>E. coli</i> LS5218 Evoluída	pBBR1MCS-5:CB`
<i>E. coli</i> LS5218 Evoluída	pBBR1MCS-5:CB pBBR1MCS-3:bktB
<i>E. coli</i> LS5218 Evoluída	pBBR1MCS-5:CB` pBBR1MCS-3:bktB`
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:CB
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:CB`
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:CB pBBR1MCS-3:bktB
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$	pBBR1MCS-5:CB` pBBR1MCS-3:bktB`
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5:CB
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5:CB`
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5:CB pBBR1MCS-3:bktB
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5:CB` pBBR1MCS-3:bktB`
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5: <i>phaCAB</i> `
<i>E. coli</i> LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	pBBR1MCS-5: <i>phaCAB</i> `
	pBBR1MCS-3:bktB`

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

4.8.3 Avaliação da produção do copolímero P3HB-co-3HV pelas linhagens recombinantes evoluídas

Com o intuito de avaliar a produção do P3HB-co-3HV pelas linhagens transformantes obtidas, foram realizados experimentos que avaliaram cada grupo das linhagens transformantes. Estes ensaios foram realizados com adição de 1 g/L de propionato e uma concentração de 5 mM de IPTG em alguns cultivos.

Os resultados dos ensaios com as linhagens evoluídas e seus controles estão apresentados nas Tabelas 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21 e 4.22.

Inicialmente, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 não evoluída e evoluída abrigando os plasmídios pBBR1MCS-5::CB>< ou pBBR1MCS-5::CB` e pBBR1MCS-3::bktB` ou pBBR1MCS-3:bktB><, a fim de comparar a produção do copolímero entre as linhagens contendo estas diferentes combinações de plasmídios (Tabelas 4.17 e 4.18).

Posteriormente, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída e não evoluída, abrigando os mesmas combinações de plasmídios (Tabelas 4.19 e 4.20).

Foram também avaliadas as linhagens *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ e *E. coli* LS5218 evoluídas e não evoluídas, abrigando os plasmídios pBBR1MCS-5::CB` pBBR1MCS-3::bktB`, sob a indução do IPTG com a finalidade de avaliar a influencia deste indutor na expressão dos genes e posterior síntese do copolímero (Tabela 4.21).

Finalmente, foi avaliada a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ contendo os plasmídios pBBR1MCS-5::phaCAB` e pBBR1MCS-3:bktB`, com o objetivo de avaliar a produção do P3HB-co-3HV na presença das duas β -cetotiolases de *C. necator* e se a co-expressão destas duas enzimas poderia interferir positiva ou negativamente na síntese do copolímero (Tabela 4.22).

Estes cultivos foram acompanhados durante 72 horas sendo retiradas amostras para avaliação da produção do PHA a cada 24 horas. Os cultivos foram realizados com uma concentração inicial de 15 g/L de glicose e após 24 horas do início do cultivo foi adicionado o propionato para uma concentração de 1 g/L, com o objetivo de evitar que o propionato fosse metabolizado durante a multiplicação celular da bactéria.

Tabela 4.17 - Produção de PHAs pela linhagem recombinante *E. coli* LS5218 expressando os plasmídios pBBR5::CB⁻ e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB⁻ pBBR3::bktB⁻ e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)					48 (h)					72 (h)				
	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol	
				HB	HV				HB	HV				HB	HV
LS5218 pBBR5::CB ⁻	5.21	1.10	5.3	100	-	4.66	1.5	5.5	100	-	4.52	1.6	5.7	100	-
	5.14	1.00	5.4	100	-	4.70	1.2	5.3	100	-	4.56	1.5	5.6	100	-
LS5218 pBBR5::CB	5.19	1.30	-	-	-	4.65	1.35	-	-	-	4.65	1.39	1.2	100	-
	5.16	1.37	-	-	-	4.62	1.37	-	-	-	4.55	1.40	1.3	100	-
LS5218 pBBR5::CB ⁻ pBBR3::bktB ⁻	5.24	1.50	9.4	100	-	4.75	2.10	9.7	100	-	4.73	2.12	9.7	100	-
	5.21	1.20	10.0	100	-	4.76	1.92	10.7	100	-	4.63	1.98	10.8	100	-
LS5218 pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	5.23	1.40	6.7	100	-	4.71	1.85	8.0	100	-	4.65	1.92	8.1	100	-
	5.17	0.90	5.5	100	-	4.69	1.48	7.4	100	-	4.55	1.64	7.6	100	-

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.18 - Produção de PHAs pela linhagem recombinante *E. coli* LS5218 evoluída em acetato expressando os plasmídios pBBR5::CB⁺ e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB⁺ pBBR3::bktB⁺ e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)					48 (h)					72 (h)				
	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol	
				HB	HV				HB	HV				HB	HV
LS5218 evoluída pBBR5:CB ⁺	4.89	1.10	2.0	100	-	4.74	1.30	2.4	100	-	4.60	1.37	2.4	100	-
	4.80	1.17	1.6	100	-	4.65	1.23	1.5	100	-	4.65	1.24	1.8	100	-
LS5218 evoluída pBBR5:CB	4.75	1.02	-	-	-	4.73	1.06	-	-	-	4.72	1.05	-	-	-
	4.68	0.98	-	-	-	4.66	1.01	-	-	-	4.65	1.07	-	-	-
LS5218 evoluída pBBR5::CB ⁺ pBBR3::bktB ⁺	4.90	1.09	9.3	100	-	4.72	1.60	14.1	98.5	1.5	4.62	1.94	14.4	98.0	2.0
	4.88	1.03	8.0	100	-	4.70	1.55	11.5	98.2	1.8	4.60	1.91	11.6	98.2	1.8
LS5218 evoluída pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	4.65	1.00	2.3	100	-	4.65	1.07	3.1	100	-	4.62	1.05	3.1	100	-
	4.63	1.06	2.8	100	-	4.60	1.10	3.5	100	-	4.60	1.12	3.4	100	-

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.19 - Produção de PHAs pela linhagem recombinante *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ expressando os plasmídios pBBR5::CB⁻ e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB⁻ pBBR3::bktB⁻ e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)					48 (h)					72 (h)				
	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC C	PHA %mol	
				HB	HV				HB	HV				HB	HV
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5::CB ⁻	5.14	1.10	-	-	-	4.88	1.23	-	-	-	4.84	1.22	-	-	-
	5.13	1.07	-	-	-	4.88	1.16	-	-	-	4.79	1.18	-	-	-
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5::CB><	5.13	1.00	-	-	-	4.91	1.15	-	-	-	4.84	1.15	-	-	-
	5.12	1.07	-	-	-	4.89	1.21	-	-	-	4.86	1.26	-	-	-
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5::CB ⁻ pBBR3::bktB ⁻	5.18	1.33	7.5	100	-	4.94	1.86	8.8	98.06	1.94	4.86	1.9	8.8	98.05	1.95
	5.19	1.43	8.0	100	-	4.94	1.95	8.2	97.40	2.60	4.89	1.98	8.3	97.00	3.00
LS5218 $\Delta prpC$ pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	5.23	1.03	5.6	100	-	4.98	1.25	5.7	100	-	4.9	1.26	5.91	100	-
	5.21	1.17	4.6	100	-	4.95	1.37	5.4	100	-	4.9	1.39	5.4	100	-

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.20 - Produção de PHAs pela linhagem recombinante *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato expressando os plasmídios pBBR5::CB⁻ e/ou pBBR5::CB>< e pBBR5::CB⁻ pBBR3::bktB⁻ e/ou pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)					48 (h)					72 (h)				
	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol	
				HB	HV				HB	HV				HB	HV
LS5218 $\Delta prpC$	5.23	1.30	-	-	-	5.02	1.32	-	-	-	4.98	1.31	-	-	-
Evoluida pBBR5:CB ⁻	5.23	1.13	-	-	-	5.02	1.15	-	-	-	4.91	1.16	-	-	-
LS5218 $\Delta prpC$	5.21	1.13	-	-	-	5.01	1.16	-	-	-	4.94	1.15	-	-	-
Evoluida pBBR5:CB	5.15	1.37	-	-	-	5.02	1.41	-	-	-	4.91	1.41	-	-	-
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	5.27	1.27	14.2	100	-	5.07	1.34	16.3	97.5	2.5	5.02	1.35	11.3	96.5	3.5
pBBR5::CB ⁻ pBBR3::bktB ⁻	5.24	1.47	15.5	100	-	5.11	1.55	17.7	98.0	2.0	4.95	1.60	17.9	96.9	3.1
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	5.26	1.43	2.7	100	-	5.04	1.68	3.8	100	-	4.94	1.70	3.8	100	-
pBBR5::CB>< pBBR3::bktB><	5.21	1.47	2.0	100	-	5.07	1.70	2.7	100	-	4.93	1.72	2.8	100	-

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.21 - Produção de PHAs pelas linhagens recombinantes *E. coli* LS5218 e *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluídas em acetato com indução de IPTG.

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)						48 (h)					72 (h)				
	Ph	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		
				HB	HV				HB	HV				HB	HV	
LS5218	4,99	1,27	6,7	100	-	4,82	1,60	8,6	100	-	4,66	1,96	8,6	100	-	
pBBR5::CB`																
pBBR3::bktB`	4,98	1,47	6,2	100	-	4,75	1,77	9,2	100	-	4,68	1,95	9,3	100	-	
LS5218 Evoluída	4,85	1,27	5,8	100	-	4,66	1,48	6,9	100	-	4,60	1,73	7,1	100	-	
pBBR5::CB`																
pBBR3::bktB`	4,84	1,17	6,7	100	-	4,65	1,23	7,5	100	-	4,61	1,66	8,0	100	-	
LS5218 $\Delta prpC$	5,04	1,50	14,4	100	-	4,82	1,89	18,6	96,76	3,24	4,66	2,20	19,5	97,52	3,48	
pBBR5::CB`																
pBBR3::bktB`	5,01	1,77	15,4	100	-	4,74	1,97	19,4	97,60	2,40	4,68	2,33	19,8	97,52	2,48	
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída	4,99	1,43	16,1	100	-	4,84	1,19	19,7	95,80	4,20	4,66	1,25	20,4	96,69	4,31	
pBBR5::CB`																
pBBR3::bktB`	4,88	1,30	15,7	100	-	4,71	1,08	18,1	96,75	3,25	4,66	1,05	19,2	98,53	3,47	

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
 ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela 4.22 - Produção de PHAs pela linhagem recombinante *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato contendo duas β -cetotiolases de *Cupriavidus necator* e indução de IPTG.

Linhagem <i>E. coli</i>	24 (h)					48 (h)					72 (h)				
	pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol		pH	X (g/L)	PHA %MSC	PHA %mol	
				HB	HV				HB	HV				HB	HV
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída pBBR5:: <i>phaCAB</i>	4.91	1.73	28.09	100	-	4.78	2.30	34.0	99.62	1.38	4.75	2.87	37.0	98.44	1.56
	4.93	1.87	27.50	100	-	4.77	2.56	33.2	98.79	1.21	4.69	2.96	40.8	98.40	1.60
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída pBBR5:: <i>phaCAB</i> pBBR3:: <i>bktB</i>	4.95	1.43	19.7	100	-	4.83	1.89	26.9	97.05	2.95	4.81	2.29	27.9	96.09	3.91
	4.95	1.60	21.4	100	-	4.79	1.96	27.5	96.64	3.36	4.77	2.44	28.2	96.56	3.44
LS5218 $\Delta prpC$ Evoluída pBBR5:: <i>phaCAB</i> pBBR3:: <i>bktB</i> IPTG	4.96	1.50	20.6	100	-	4.82	1.80	25.8	96.49	3.51	4.80	2.23	26.3	96.28	3.72
	4.91	1.50	19.8	100	-	4.79	1.88	26.0	96.03	3.97	4.74	2.38	27.4	95.97	4.03

X: Biomassa total produzida; PHA %MSC: percentual de PHA da massa seca celular; PHA %mol: percentual em mol para cada PHA produzido
ND: Não determinado.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Os resultados dos cultivos realizados com a linhagem *E. coli* LS5218 expressando os plasmídeos pBBR5::*CB*⁺ ou pBBR5::*CB*>< e pBBR3::*bktB*⁺ ou pBBR3::*bktB*>< (Tabela 4.17), demonstraram que nesta linhagem o teor de polímero acumulado atingiu em torno de 8 e 10% da massa seca celular nas linhagens contendo os dois plasmídios, pBBR5::*CB* e pBBR3::*bktB*, nas duas orientações, não sendo detectada a produção de unidades 3HV. Nas linhagens contendo só o plasmídio pBBR5::*CB*⁺ ou pBBR5::*CB*>< o teor de polímero acumulado diminuiu em relação ao resultado anterior, sendo que a linhagem contendo o plasmídio pBBR5::*CB*>< apresentou um teor de acúmulo ainda menor (1,3% da MSC). Embora as concentrações de polímero acumuladas não sejam expressivas, os resultados indicam que é possível acumular PHA a partir de β -cetotilases presentes em *E. coli* capazes de condensar duas moléculas de acetil-CoA, porém, para se obter maiores concentrações do polímero é necessária a expressão de β -cetotilases específicas para o acúmulo do PHA como aquelas de *C. necator*.

Os cultivos realizados com a linhagem *E. coli* LS5218 evoluída em acetato expressando os mesmos plasmídios citados acima (Tabela 4.18), demonstraram que, foi possível obter teores de acúmulo entre 11 e 14% da massa seca celular, com a linhagem abrigando os plasmídios pBBR5::*CB*⁺ e pBBR3::*bktB*⁺, sendo detectado uma pequena fração molar em torno de 1,5 e 2,0% de 3HV. Teores de acúmulo entre 3,0% e 3,5% da massa seca celular foram obtidos com a linhagem abrigando os plasmídios pBBR5::*CB*>< e pBBR3::*bktB*><. Nas demais linhagens, foi detectado um mínimo teor de acúmulo de PHA (entre 1,8 e 2,4% da MSC) unicamente na linhagem abrigando o plasmídio pBBR5::*CB*⁺.

Os resultados destes dois cultivos indicam que, aparentemente, a orientação do operon em relação ao promotor *LacZ* do plasmídio, neste caso, pode influenciar positivamente no acúmulo do polímero, devido a que os maiores teores de acúmulo de PHA foram obtidos nos cultivos com as linhagens expressando os plasmídios pBBR5::*CB*⁺ e pBBR3::*bktB*⁺. A evolução em acetato nesta linhagem, possivelmente, permitiu um maior aproveitamento do propionato, já que foram detectadas frações molares do 3HV, embora em pequenas quantidades.

Os cultivos com a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ expressando os plasmídios pBBR5::*CB*⁺ e pBBR3::*bktB*⁺, apresentaram teores de acúmulo em torno de 8,8% da massa seca celular e uma fração molar entre 1,9 e 3,0% de 3HV (Tabela 4.19). As linhagens abrigando os plasmídios pBBR5::*CB*>< e pBBR3::*bktB*>< acumularam em

torno de 5,9% de PHA, porém não foi detectada a produção de unidades de 3HV. Nos cultivos das linhagens contendo apenas os plasmídios pBBR5::CB⁻ ou pBBR5::CB[>] não se observou a produção do polímero.

Os resultados dos cultivos com a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato, demonstraram que a partir da expressão dos plasmídios pBBR5::CB⁻ e pBBR3::bktB⁻, a linhagem evoluída atingiu um teor de PHA em torno de 11 e 17% da massa seca celular e uma fração molar de 3HV entre 2,0 e 3,5% no copolímero (Tabela 4.20). A produção de PHA observada, quando a linhagem expressou os plasmídios pBBR5::CB[>] e pBBR3::bktB[>], foi entre 2,0 e 3,8% da massa seca celular, não sendo detectada a produção de 3HV. Estes resultados indicam que, novamente, a orientação do operon em relação ao promotor do plasmídio é importante para a expressão dos genes e consequente produção do polímero. A linhagem evoluída *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ em acetato, apresentou um maior acúmulo de PHA em comparação a linhagem não evoluída, o resultado em relação a fração molar de 3HV não apresentou grandes diferenças, indicando que a evolução em acetato pode ter favorecido a produção de unidades 3HV, nesta linhagem ainda que sutilmente.

A fim de confirmar estes resultados e avaliar o efeito do indutor da transcrição (IPTG) na expressão destes genes, foram realizados cultivos com as linhagens evoluídas e não evoluídas contendo os plasmídios pBBR5::CB⁻ e pBBR3::bktB⁻. Segundo os resultados destes cultivos a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ acumulou PHA correspondendo a aproximadamente, 20% da massa seca celular, sendo entre 2,4 e 4,3% a fração molar de unidades 3HV no copolímero (Tabela 4.21). Estes resultados foram similares tanto na linhagem evoluída como para a linhagem não evoluída, indicando que a evolução em acetato não representou um fator que melhorasse a fração molar de 3HV no copolímero. A linhagem *E. coli* LS5218 acumulou porcentagens de PHA próximos aos reportados nos ensaios anteriores, entretanto, não foi possível detectar acúmulo de 3HV nestes ensaios. Se comparados com os ensaios anteriores, aparentemente há um pequeno aumento na produção do polímero na presença do IPTG, porém os resultados não demonstram que a utilização deste indutor seja necessária para obter maiores índices de acúmulo nestas linhagens.

Finalmente, foram realizados cultivos avaliando o plasmídio pBBR5::phaCAB⁻, que contém o gene *phaA*, que codifica a β -cetotiolase de *C. necator*, presente no

operon *phaCAB*. Este plasmídio foi avaliado individualmente e com o plasmídio pBBR3::*bktB* na linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$ evoluída em acetato. Os resultados destes cultivos demonstraram que a linhagem contendo o plasmídio pBBR5::*phaCAB* acumulou PHA correspondendo a 40% da massa seca celular, sendo a fração molar de 3HV 1,6% (Tabela 4.22). Já a linhagem abrigando os dois plasmídios, (pBBR5::*phaCAB* e pBBR3::*bktB*) acumulou uma porcentagem menor de PHA (em torno de 28% da MSC), porém a fração molar das unidades de 3HV foi maior nesta situação (entre 3 e 4 mol% de 3HV). Estes resultados confirmam o observado nos trabalhos de Slater et al. (1998) nos quais foi determinado que a enzima BktB tem uma maior especificidade por propionil-CoA sendo mais eficiente que a enzima PhaA, para a formação do copolímero. Porém, o teor de polímero total acumulado utilizando os dois plasmídios com as duas β -cetotiolases foi menor, provavelmente, por conta de uma menor condensação de grupos acetil-CoA para a formação de unidades 3HB. Finalmente, a indução com IPTG nestes cultivos não demonstrou, novamente, ser um fator determinante na expressão dos genes que pudesse incrementar a produção do copolímero na *E. coli* recombinante.

Apesar das diferentes tentativas, voltadas à construção de linhagens recombinantes de *E. coli*, capazes de sintetizar altas concentrações de unidades de 3HV para a produção do copolímero, ainda não foi possível obter concentrações expressivas do P3HB-co-3HV acumulado por estas linhagens. Assim, a fim de determinar as possíveis causas que possam estar interferindo na síntese e acúmulo do copolímero, se faz necessário realizar uma análise do metabolismo da *E. coli* e do catabolismo dos substratos envolvidos neste processo, bem como dos genes envolvidos no metabolismo como um todo, fato este, que intervém na síntese e o acúmulo do P3HB-co-3HV.

Primeiramente, a fim de analisar o consumo e metabolismo das fontes de carbono fornecidas para a produção do copolímero em *E. coli*, foram analisadas as características específicas de *E. coli* para a assimilação destas fontes de carbono. *E. coli* tem a capacidade de selecionar, a partir de uma mistura de fontes de carbono, aquela que lhe proporciona uma maior taxa de crescimento. Esta resposta é chamada repressão catabólica de carbono (CCR), e envolve vários fenômenos, como, por exemplo, a inibição da capacidade da célula de transportar outras fontes de carbono, a atividade de enzimas relacionadas, e a expressão de genes na presença de uma fonte de carbono rapidamente metabolizável. Todos estes

fenômenos estão relacionados com o sistema PTS o sistema de fosfotransferase de glicose dependente de fosfoenolpiruvato (GOSSET, 2005).

Devido à repressão catabólica, *E. coli* apresenta um consumo de fontes de carbono sequencial quando é cultivada em uma mistura de substratos, tal fato é também aplicado quando a mistura de substratos têm, além da glicose, fontes de ácidos graxos; neste caso, a *E. coli* não utiliza os ácidos graxos na presença de açúcares (DIRUSSO; METZGER; HEIMERT, 1993). Analisando os resultados dos cultivos realizados para a produção de P3HB-co-3HV em *E. coli* recombinante, pode ser sugerido que o catabolismo do propionato esteja sendo afetado pela repressão catabólica da glicose em *E. coli*. Lee et al. (2005) demonstraram que o operon *prpBCDE*, que codifica as enzimas que participam no metabolismo do propionato (2-MCC) é modulado por repressão catabólica em *E. coli*. Em *E. coli*, o controle da utilização de fontes de carbono alternativas é controlado pela regulação da expressão dos genes em resposta ao esgotamento da glicose. A regulação da transcrição, é modulada pelo nível de AMP cíclico (cAMP), sintetizado pelo adenilato ciclase, ligado à membrana e pela proteína receptora (CRP), um regulador global da transcrição. Assim, os autores determinaram que o regulador global da transcrição em *E. coli*, o complexo cAMP-CRP, atua diretamente na ativação dos promotores do operon *prpBCDE*, e concluíram que, o catabolismo do propionato pode ser afetado pela presença da glicose (LEE et al., 2005).

Neste trabalho, nos cultivos realizados com *E. coli* recombinante, o propionato foi adicionado 24 horas após a adição da glicose, nestes últimos cultivos, não foi determinada a concentração de glicose remanescente no meio de cultura no momento da adição do propionato, porem nos resultados de cultivos utilizando as mesmas linhagens de *E. coli* (Seção 4.7), nos quais foi determinada a concentração de glicose, foi observado que, após 24 horas, ainda há uma concentração em torno de 3 e 4 g/L residual de glicose, no meio de cultura, o que pode sugerir que no momento em que o propionato é adicionado, a expressão dos genes que participam no catabolismo deste substrato é regulada pela repressão catabólica da glicose.

A confirmação desta hipótese poderia ser realizada com a avaliação de linhagens de *E. coli* mutadas no sistema PTS que controla a repressão catabólica nestas linhagens. Foram construídas linhagens com sistema PTS interrompido com a finalidade de produzir PHA_{MCL} a partir do consumo simultâneo de ácidos graxos e mistura de açúcares (LI et al., 2007). Os autores observaram que, na linhagem PTS⁻,

a glicose e o ácido graxo foram utilizados simultaneamente. Assim, a *E. coli* mutante construída utilizou glicose e ácido graxo simultaneamente, o que favorece não só a utilização de misturas de substratos, mas também pode fornecer precursor diretos para PHA_{SCL} bem como para PHA_{MCL}. Embora, o sistema de repressão catabólica esteja bem caracterizado e definido nas linhagens de *E. coli*, nenhum trabalho direcionado a produção do P3HB-co-3HV em *E. coli* relatam este fenômeno como sendo um fator que possa interferir na produção do copolímero. Os trabalhos realizados, focados para a produção de P3HB-co-3HV a partir de *E. coli* recombinante, em sua maioria, concentram os esforços na superexpressão de genes relacionados com o metabolismo do propionato e ao entendimento do metabolismo da *E. coli* para a utilização do propionato.

Trabalhos recentes, têm demonstrado que a análise das vias metabólicas que utilizam o propionato na *E. coli*, e que poderiam competir com a via metabólica da síntese do copolímero, é um fator importante a ser levado em conta para a otimização da produção do P3HB-co-3HV nestas linhagens.

Diversos trabalhos, visando à obtenção do copolímero em diversas bactérias, foram realizados a fim de identificar e deletar as vias que participam no metabolismo do propionato. Na linhagem *Burkholderia sacchari* foi interrompida a via do 2-metil citrato sintase (MCC), o copolímero acumulado nesta mutante, apresentou uma maior fração molar de 3HV do que a linhagem selvagem na presença de propionato (BRÄMER et al., 2002; SILVA et al., 2000). Da mesma forma, o mutante *prpC* de *Salmonella enterica* conseguiu acumular P3HB-co-3HV com uma fração molar de até 30% de 3HV no copolímero (ALDOR et al., 2002). Os resultados destes estudos sugerem que a via metabólica do MCC para o propionil-CoA é mais ativa nestas bactérias se comparado com nossos resultados nos quais a linhagem *E. coli* LS5218 $\Delta prpC$, mutada na via do MCC, não atingiu elevadas frações molares de 3HV no copolímero. Assim, possivelmente, a interrupção das vias metabólicas que desviam o propionato ou o propionil-CoA, que é o substrato principal para a síntese do copolímero, leve a uma maior concentração intracelular deste substrato na célula e posterior síntese das unidades 3HV aumentando a fração molar de 3HV no copolímero. Recentemente, Chen et al. (2011) interromperam duas vias que competem pela utilização do propionil-CoA, a via do 2-metilcitrato sintase (2-MCC) e a via do metilmaloni-CoA. Os resultados obtidos demonstraram que só a deleção do gene *prpC* que participa na via do 2-MCC, não foi suficiente para aumentar a fração

molar de 3HV no copolímero, enquanto que, a deleção do gene *scpC*, que codifica uma succinil-CoA transferase, pela via do metilmalonil-CoA, e catalisa a conversão de propionil-CoA em succinil-CoA, aumentou significativamente a fração 3HV no copolímero. Este resultado sugeriu que o fluxo metabólico, a partir de propionil-CoA para a via metilmalonil-CoA, era muito maior do que para o ciclo do 2-MCC em *E. coli*. Para confirmar estes resultados, os autores cultivaram linhagens de *E. coli* abrigando os genes *phaCAB* de *Cupriavidus necator*, e deletadas no gene *prpC* da via MCC e no gene *scpC* da via metilmalonil-CoA, individualmente, na presença de propionato e observaram uma produção maior da fração de 3HV (19,08%) nas linhagens de *E. coli* deletadas no gene *scpC* quando comparadas com as linhagem deletada no gene *prpC* (6,63%), indicando que o propionil-CoA em *E. coli* é catabolizado preferencialmente pela via do metilmalonil-CoA do que pelo ciclo do 2-MCC.

Heßlinger et al. (1998) detectaram a presença de propionato em uma fase tardia do crescimento celular em cultivos de *E. coli*. Os autores determinaram que a enzima fosfato acetiltransferase codificada pelo gene *pta*, que catalisa duas conversões: acetil-CoA para acetato e propionil-CoA para propionato, era a encarregada da produção do propionato nesta fase de crescimento. A fim de reduzir a formação de propionato e disponibilizar o propionil-CoA para a formação do 3HV, o gene *pta* foi deletado. Como esperado, não foi detectado propionato no cultivo na fase tardia de crescimento. No entanto, a supressão do *pta* não aumentou significativamente o teor de 3HV no copolímero (HEßLINGER; FAIRHURST; SAWERS, 1998).

Embora a expressão do gene *bktB*, que codifica uma segunda β -cetotiolase, e que tem uma maior afinidade pelo propionil-CoA, não foi suficiente para atingir uma alta fração de 3HV no copolímero, a expressão de outros genes que participam no transporte e ativação do propionato na célula podem melhorar a produção de P3HB-co-3HV em *E. coli* recombinante. Por exemplo, a enzima propionil-CoA sintetase, codificada pelo gene *prpP*, participa na ativação do propionato para formar propionil-CoA que é o principal precursor de 3-hidroxicaprolil-CoA. Por outro lado a propionato permease, codificada pelo gene *prpP*, participa no transporte e absorção do propionato facilitando sua assimilação na célula. Assim, a superexpressão destes genes poderia resultar no aumento da fração molar de 3HV no copolímero. A fim de aumentar a fração de 3HV no P3HB-co-3HV, recentemente, Chien et al. (2012)

clonaram o gene *prpP* que codifica uma propionato permease, de *C. necator* e o gene da *prpE* que codifica uma propionil-CoA sintase de *C. taiwanensis* e transferiram para *Escherichia coli* contendo o operon *phaCAB* de *C. necator*. A fração de 3HV do copolímero aumentou quando *prpE* ou *prpP* foram superexpressas nas células. Portanto, a expressão do conjunto das enzimas chaves, que participam nos diferentes processos do metabolismo do propionato, poderá facilitar o mecanismo de síntese e acúmulo do P3HB-co-3HV.

Pelo apresentado, pode-se concluir que a análise do metabolismo de *E. coli* para a produção específica do copolímero, é fundamental para o entendimento do processo e posterior definição das ferramentas a serem utilizadas para o melhoramento deste processo. Assim, visando ao melhoramento do processo, a utilização de todas as ferramentas aqui descritas, para a obtenção de linhagens geneticamente modificadas, são necessárias para a obtenção de uma “super linhagem”, que possa acumular o copolímero em altas concentrações, a partir de fontes de carbono, contendo misturas de açúcares e ácidos graxos, como é o caso da maioria de resíduos agroindustriais produzidos nos dias de hoje.

5 CONCLUSÕES

A seguir, são enunciadas as principais conclusões do presente trabalho:

Dentre as linhagens de *E. coli* testadas, a LS5218 foi a que apresentou os melhores resultados, tanto do ponto de vista da ampla faixa de consumo de fontes de carbono em velocidades específicas de crescimento compatíveis com sistemas industriais, quanto do ponto de vista de hospedeiro de plasmídios para a produção do homopolímero P3HB.

Dos plasmídeos construídos e avaliados neste trabalho, o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB* foi o que apresentou um melhor resultado na expressão dos genes, para o acúmulo de P3HB, utilizado na linhagem *E. coli* LS5218.

E. coli LS5218, abrigando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*, atingiu teores de P3HB em torno de 40% da massa seca celular, em ensaios em frascos agitados, sob condições de excesso da fonte de carbono e limitação de nitrogênio, sendo estes valores próximos aos reportados na literatura.

E. coli LS5218, abrigando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*, atingiu teores de P3HB em torno de 10% da massa seca celular, em ensaios em biorreator, sob condições de excesso da fonte de carbono, pH 7,0 e sem limitação do oxigênio dissolvido. Estes valores não foram representativos, devido a que houve uma perda significativa do plasmídio nas células de *E. coli* LS5218, quando cultivadas em biorreator ao longo do cultivo, levando a um baixo teor de acúmulo.

Experimentos realizados em biorreator, utilizando-se a linhagem *E. coli* LS5218 albergando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB*, conduzidos em regime de limitação de oxigênio (1% da saturação de O₂) e alimentação controlada da fonte de carbono e nitrogênio, conduziram ao acúmulo de P3HB correspondendo a cerca de 30% da massa seca celular. Esta condição de cultivo proporcionou um crescimento linear na *E. coli* LS5218, e demonstrou que o crescimento e acúmulo de P3HB simultâneos são mais significativos para promover a produção de quantidades maiores desse polímero, quando comparados ao cultivo em duas fases separadas

(crescimento e acúmulo), embora a disponibilidade de oxigênio teve um papel menos expressivo no crescimento linear, sendo a velocidade de alimentação da fonte de carbono e nitrogênio, o fator mais representativo para atingir maiores teores de acúmulo do polímero.

A análise de fluxos metabólicos demonstrou que, para *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*, a eficiência de conversão de glicose em P3HB corresponde a 45-60% do valor máximo teórico. Esse desempenho é resultado de um fluxo na via das pentoses apenas para suprir precursores de biossíntese de biomassa residual e com a enzima isocitrato desidrogenase suprindo o NADPH necessário para biossíntese de P3HB e biomassa residual. Para se atingir a eficiência máxima teórica, seria necessário aumentar o fluxo da fonte de carbono pela via das pentoses, minimizando o fluxo no ciclo de Krebs.

As linhagens mutantes, obtidas a partir da integração do operon *phaCAB* no cromossoma da *E. coli*, acumularam teores de polímero próximos as linhagens recombinantes, nos ensaios em frascos agitados. Apesar disso, não foi possível atingir teores de acúmulo representativos nos ensaios em biorreator, provavelmente, devido ao reduzido número de cópias do operon *phaCAB* no cromossomo da *E. coli*, ou pela condição do cultivo implementada. Novos experimentos em biorreator com estas linhagens mutantes, avaliando condições que favoreçam o crescimento linear, devem ser realizados.

O melhor resultado observado, para acúmulo do copolímero P3HB-co-3HV, foi obtido com a linhagem apresentando interrupção na via do 2-metilcitrato sintase do catabolismo do propionato (*E. coli* LS5218 $\Delta prpC$), e expressando simultaneamente os genes *phaC*, *phaA*, *phaB* e *bktB*. Esta linhagem atingiu cerca de 20% da massa seca celular na forma de P3HB e cerca de 4 mol% de 3HV no copolímero. As linhagens recombinantes, submetidas a engenharia evolutiva, aumentaram a sua capacidade de utilização do propionato, embora as concentrações de acúmulo do copolímero não apresentaram um aumento representativo.

REFERÊNCIAS²

- AHN, W.; PARK, S.; LEE, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 8, p. 3624-3627, 2000.
- AHN, W.; PARK, S.; LEE, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 235–240, 2001.
- ALDOR, L.; KEASLING, J. Metabolic engineering of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) composition in recombinant *Salmonella enteric* serovar Typhimurium. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 76, p. 108–114, 2001.
- ALDOR, L.; KIM, S.; PRATHER, K.; KEASLING, J. Metabolic engineering of a novel propionate-independent pathway for the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 3848–3854, 2002.
- ALDOR, L.; KEASLING, J. Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, p. 475-483, 2003.
- ALMECIGA-DIAZ, C. et al. Production and characterization of a recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *E. coli* BL21. **Mol. Genet. Metaboli.**, v. 102, n. 2, p. S5-S5, 2011.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ARIFIN, Y. et al. Deletion of cscR in *Escherichia coli* W improves growth and poly-3-hydroxybutyrate (PHB) production from sucrose in fed batch culture. **J. Biotechnol.**, v. 156, n. 4, p. 275-278, 2011.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R.; MOORE, D.; SEIDMAM, J.; SMITH, J.; STRUHL, K. **Current protocols in Molecular Biology**. New York: John e Sons, 1992.
- BABA, T.; ARA, T.; HASEGAWA, M.; TAKAI, Y.; OKUMURA, Y.; BABA, M.; DATSENKO, K.; TOMITA, M.; WANNER, B.; MORI, H. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. **Mol. Syst. Biol.**, v. 2, p. 1-11, 2006.

² De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOCANEGRA, J. K.; GOMEZ, J. G. C.; PRADELLA, J. G. C.; SILVA, L. F.; TACIRO, M. K. Avaliação da Produção de Poli-hidroxialcanoatos em Linhagens Recombinantes de *Escherichia coli* utilizando Substratos de Baixo Custo ou Resíduos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 16, 2007, Curitiba. **Anais...** Curitiba, PR: UFPR, 2007. 1 CD-ROM.

BRÄMER, C.; SILVA, L.; GOMEZ, J.; PRIEFERT, H.; STEINBÜCHEL, A. Identification of the 2-methylcitrate pathway involved in the catabolism of propionate in the polyhydroxyalkanoate-producing strain *Burkholderia sacchari* IPT101(T) and analysis of a mutant accumulating a copolyester with higher 3-hydroxyvalerate content. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 271–279, 2002.

CAMARGO, F. et al. Processing and characterization of composites of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) and lignin from sugar cane bagasse. **J. Compos. Mater.**, v. 46, n. 4, p. 417-425, 2012.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 2. p. 193-205.

CHEN, Q. et al. Production in *Escherichia coli* of Poly(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) with Differing Monomer Compositions from Unrelated Carbon Sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 77, n. 14, p. 4886-4893, 2011.

CHENG, J. et al. High-Level Extracellular Production of alpha-Cyclodextrin Glycosyltransferase with recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). **J. Agric. Food. Chem.**, v. 59, n. 8, p. 3797-3802, 2011.

CHIEN, C. et al. Effects of Different Substrate Composition on Biosynthesis of Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate by Recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 166, n. 3, p. 796-804, 2012.

CHOI, J.; LEE, S. Process analysis and economic evaluation for Poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Eng.**, v. 17, p. 335-342, 1997.

CHOI, J.; LEE, S.; HAN, K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 4897–4903, 1998.

CHOI, J.; LEE, S. Economic considerations in the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, n. 6, p. 646-649, 2000.

CHOI, J. et al. Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioprocess. Eng.**, v. 7, p. 371–374, 2002.

COELHO, J. et al. Modification of Poly(3-hydroxybutyrate)-co-Poly(3-hydroxyvalerate) with Natural Rubber. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 116, n. 2, p. 718-726, 2010.

COSLOY, S.; OISHI, M. Genetic transformation in *Escherichia coli* K12. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 70, p. 84-87, 1973.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **PNAS**, v. 97, p. 6640–6645, 2000.

DAVIS, R. et al. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates co-polymer in *E. coli* using genes from *Pseudomonas* and *Bacillus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 207-216, 2008.

DE ALMEIDA, A. et al. Effects of Aeration on the Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) from Glycerol and Glucose in Recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 6, p. 2036-2040, 2010.

DENNIS, D.; MCCOY, M.; STANGL, A. et al. Formation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by PHA synthase from *Ralstonia eutropha*. *J. Biotechnol.*, v. 64, p. 177-186, 1998.

DIRUSSO, C.; METZGER, A.; HEIMERT, T. Regulation of transcription of genes required for fatty acid transport and unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* by FadR. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 311–322, 1993.

DORAM, P. M. Ingeniería de los reactores. In: DORAM, P. M. (Ed.). **Principios de ingeniería de los bioprocesos**. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 371 – 377.

ESCHENLAUER, A.; STOUP, S.; SRIENC, F.; SOMERS, D. Production of heteropolymeric polyhydroxyalkanoate in *Escherichia coli* from a single carbon source. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 19, p. 121–130, 1996.

FONSECA, G.; DE ARRUDA-CAULKINS, J.; ANTONIO, R. Production and characterization of poly-(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* grown on cheap renewable carbon substrates. **Waste Manage. Res.**, v. 26, n. 6, p. 546-552, 2008.

FURMANSKI, P.; WEGENER, W. S.; REEVES, H. C.; AJL, S. J. Function of the glyoxylate-condensing enzymes: I. Growth of *Escherichia coli* on n-valeric acid. **J. Bacteriol.**, v. 94, p. 1075-1081, 1987.

GARCÍA, V.; GARZÓN, P. **Produção de Poli(3-HB-co-3-HAmcl) e clonagem dos genes da biossíntese de PHAs de *Ralstonia eutropha***. 2002. 64 f. (Tese Graduação em Microbiologia) – Facultad de Ciencias Basicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogota, 2002.

GOMES, R. S. **Obtenção de mutantes deficientes no acúmulo de PHA e construção de linhagens recombinantes para o controle da composição monomérica.** 2010. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GOMEZ, J. G. C. **Produção por *Pseudomonas* de poli-hidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média a partir de carboidratos:** avaliação da eficiência, modificação da composição e obtenção de mutantes. 2000. 155 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GOSSET, G. Improvement of *Escherichia coli* production strains by modification of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system. **Microb. Cell Factor.**, v. 4, p. 4–14, 2005.

HANSEN, L.; KNUDSEN, S.; SØRENSEN, S. The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Curr. Microbiol.**, v. 36, p. 341–347, 1998.

HEßLINGER, C.; FAIRHURST, S.; SAWERS, G. Novel keto acid formate-lyase and propionate kinase enzymes are components of an anaerobic pathway in *Escherichia coli* that degrades L-threonine to propionate. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 477–492, 1998.

HEIN, S.; SOHLING, B.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 153, p. 411–418, 1997.

HO, W.; WEGEN, R.; CHOI, J.; LEE, S.; MIDDELBERG, A. Metabolic Analysis of Poly(3-hydroxybutyrate) Production by Recombinant *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9, p. 593–603, 1999.

HORNG, T. et al. Enhanced polyhydroxybutyrate (PHB) production via the coexpressed *phaCAB* and *vqb* genes controlled by arabinose P_{BAD} promoter in *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 50, p. 158–167, 2010.

HORNG, T. et al. Functional cis-expression of *phaCAB* genes for poly(3-hydroxybutyrate) production by *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 52, n. 5, p. 475–483, 2011.

HUANG, J. R.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, n. 3, p. 383–399, 2012.

JIAN, J. et al. Production of polyhydroxyalkanoates by *Escherichia coli* mutants with defected mixed acid fermentation pathways. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 6, p. 2247–2256, 2010.

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

KAHAR, P. et al. Effective production and kinetic characterization of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in recombinant *Escherichia coli*. **Polym. Degrad. Stab.**, v. 87, p. 161–169, 2005.

KIDWELL, J.; VALENTIN, H.; DENNIS, D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus* pha biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, n. 4, p. 1391-1398, 1995.

KIM, B.; LEE, S.; CHANG, H. Production of Poly- β -hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 14, n. 9, p. 811-816, 1992.

KIM, B.; YOON, S.; JAE, D.; LENZ, R. Effect of C/N ratio on the production of poly (3-hydroxyalkanoates) by the Methylophil *Paracoccus denitrificans*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v.7, p. 391–396, 1997.

KIM, B. S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 27, p. 774-777, 2000.

KOVACH, M.; ELZER, P.; HILL, D.; ROBERTSON, G.; FARRIS, M.; ROOP II, R.; PETERSON, K. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **GENE**, v. 166, p. 175-176, 1995.

LAN, Z. et al. Miscibility and Crystallization Behaviors of Poly(3-hydroxybutyrate-co-11%-4-hydroxybutyrate)/Poly(3-hydroxybutyrate-co-33%-4-hydroxybutyrate) Blends. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 119, n. 6, p. 3467-3475, 2011.

LAGEVEEN, R.; HUISMAN, G.; PREVSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly-(R)-3-hydroxyalkanoates and poly-(R)-3 hydroxyalkenoates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, p. 2924–2932, 1988.

LANGENBACH, S.; REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 150, p. 303–309, 1997.

LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. **J. Environ. Polymer Degrad.**, v. 2, p. 169-176, 1994.

LEE, S. et al. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of Poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 32, n. 2, p. 203-211, 1994.

LEE, S. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v. 14, p. 98–105, 1996.

LEE, S.; MIDDELBERG, A.; LEE, Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 19, n. 10, p. 1033-1035, 1997.

LEE, S. Poly (3-hydroxybutyrate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess. Eng.**, v. 18, p. 397-399, 1998.

LEE, S.; CHOI, J. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. **Wast. Managem.**, v. 19, p. 133-139, 1999.

LEMOIGNE, M. Products of dehydration and of polymerization of β -hydroxybutyric acid. **Bull. Soc. Chem. Biol.**, v. 8, p. 770-782, 1926.

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. **Biomacromolecules.**, v. 6, p. 1-8, 2005.

LI, R. et al. A novel-designed *Escherichia coli* for the production of various polyhydroxyalkanoates from inexpensive substrate mixture. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 75, n. 5, p. 1103-1109, 2007.

LI, R.; ZHANG, H.; QI, Q. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant *Escherichia coli*. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 2313–2320, 2007.

LIU, F.; LI, W.; RIDGWAY, D.; GU, T.; SHEN, Z. Production of poly- β -hydroxybutyrate on molasses by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 345-348, 1998.

LIU, S.; STEINBÜCHEL, A. A novel genetically engineered pathway for synthesis of poly(hydroxyalkanoic acids) in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 739–743, 2000.

LIU, X.-W. et al. Biosynthesis of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli* harboring propionyl-CoA synthase gene (*prpE*) or propionate permease gene (*prpP*). **Biochem. Eng. J.**, v. 43, n. 1, p. 72-77, 2009.

LO, W.; WU, S.; WEI, H. High throughput study of separation of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* XL1 blue. **J. Taiw Insti Chem. Eng.**, v. 42, n. 2, p. 240-246, 2011.

LORENZ, M.; WACKERNAGEL, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiol. Rev.** v. 58, p. 563–602, 1994.

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

MAHISHI, L.; TRIPATHI, G.; RAWAL, S. Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthesis by recombinant *Escherichia coli* harbouring *Streptomyces aureofaciens* PHB biosynthesis genes: effect of various carbon and nitrogen sources. **Microbiol. Res.**, v. 158, p. 19–27, 2003.

MIYAKE, M.; MIYAMOTO, C.; SCHNACKENBERG, J.; KURANE, R.; ASADA, Y. Phosphotransacetylase as a key factor in biological production of polyhydroxybutyrate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 84–86, p. 1039–1044, 2000.

NDUKO, J. et al. Polyhydroxyalkanoates production from cellulose hydrolysate in *Escherichia coli* LS5218 with superior resistance to 5-hydroxymethylfurfural. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 113, p. 70–72, 2012.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell: a molecular approach**. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1990. 506 p.

NIKEL, P. et al. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly(3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. **Int. Microbiol.**, v. 8, n. 4, p. 243-250, 2005

NIKEL, P. et al. New recombinant *Escherichia coli* strain tailored for the production of poly(3-hydroxybutyrate) from agroindustrial by-products. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 6, p. 3949-3954, 2006.

NIKEL, P. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis from glycerol by a recombinant *Escherichia coli* *arcA* mutant in fed-batch microaerobic cultures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 78, n. 6, p. 1089-1089, 2008.

OJUMU, T.; YU, J.; SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. **Afric. J. Biotechnol.**, v. 3, p. 18-24, 2004

PARK, S.; PARK, J.; LEE, S. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* in a pilot-scale fermenter. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 185–189, 2002.

PARK, S.; LEE, S. New FadB homologous enzymes and their use in enhanced biosynthesis of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates in *FadB* mutant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 86, p. 681– 686, 2004.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding β -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 15293-15297, 1989.

PFEIFFER, T.; SÁNCHEZ-VALDENEBO, I.; NUÑO, J. C.; MONTERO, F.; SCHUSTER, S. Metatool: for studying metabolic networks. **Bioinformatics.**, v. 15, n. 3, p. 251-257, 1999.

PINSKE, C. et al. Metabolic Deficiencies Revealed in the Biotechnologically Important Model Bacterium *Escherichia coli* BL21(DE3). **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. 1 -13, 2011.

PRADELLA, J.; TACIRO, M.; PATAQUIVA, A. High-cell-density poly (3-hydroxybutyrate) production from sucrose using *Burkholderia sacchari* culture in airlift bioreactor. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 8355–8360, 2010.

QI, Q.; REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene phaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of PhaC1 and PhaC2. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 157, p. 155–162, 1997.

RAICHER, G. **Análise Econômica da Produção de Polímeros Biodegradáveis no contexto de uma Biorefinaria a partir de cana-de-açúcar**. 2011. 148 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RAMACHANDER, T. et al. Synthesis of PHB by recombinant *E. coli* harboring an approximately 5 kb genomic DNA fragment from *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 31, n. 1-3, p. 63-69, 2002.

RAMSAY, B.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P.; RAMSAY, J. Production of Poly-(β -Hydroxybutyric-Co- β -Hydroxyvaleric) Acids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.

REHM, B. Polyester synthase: natural catalysts for plastics. **Biochem. J.**, v. 376, p. 15-33, 2003.

REN, Q. et al. Expression of PHA polymerase genes of *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* and its effect on PHA formation. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 2, p. 91-100, 2005.

RIIS, V.; MAI, W. Gas chromatography determination of poly- β -hydroxybutyric acid in microbial biomass - ester hydrochloric acid propanolysis. **Jour. Chromatogr.**, v. 445, p. 285-289, 1988.

ROCHA, R.; SILVA, L.; TACIRO, M.; PRADELLA, J. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) P(3HB-co-3HV) with a broad range of 3HV content at high yields by *Burkholderia sacchari* IPT 189. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 24, p. 427-431, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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

SCHUBERT, P.; KRÜGER, N.; STEINBÜCHEL, A. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthesis operon: identification of the N terminus of poly(3-hydroxybutyrate) synthase and the identification of the promoter. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 168-175, 1991.

SCHUBERT, P.; STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H.G. Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly- β -hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 5837-5847, 1988.

SHANG, L. et al. Thermal Properties and Biodegradability Studies of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). **J. Polym. Environ.**, v. 20, n. 1, p. 23-28, 2012.

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

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

SLATER, S. et al. Multiple beta-ketothiolases mediate Poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 8, p. 1979-1987, 1998.

SLATER, S.; GALLAHER, T.; DENNIS, D. Production of Poly-(3-Hydroxybutyrate-co-3-Hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 1089-1094, 1992.

SLATER, S. et al. Metabolic engineering of *Arabidopsis* and *Brassica* for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer production. **Nat. Biotechnol.**, v. 17, v. 10, p. 1011-1016, 1999.

SOLAIMAN, D.; ASHBY, R.; FOGLIA, T.; MARMER, W. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 71, p. 783–789, 2006.

SONG, S.; HEIN, S.; STEINBÜCHEL, A. Production of poly(4-hydroxybutyric acid) by fed-batch cultures of recombinant strains of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 21, p. 193–197, 1999.

SPRATT, S.; GINSBURGH, C.; NUNN, W. Isolation and genetic characterization of *Escherichia coli* mutants defective in propionate metabolism. **J. Bacteriol.**, v. 146, p. 1166-1169, 1981.

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. In: BYROM, D. (Ed.). **Biomaterial: Novel materials from biological sources**. Basingstoke: Macmillan Publisher, 1991. p. 123-213.

STEINBÜCHEL, A.; PIEPER, U. Production of a copolyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from single unrelated carbon sources by a mutant of *Alcaligenes eutrophus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 1-6, 1992.

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

SU, L. et al. Extracellular overexpression of recombinant *Thermobifida fusca* cutinase by alpha-hemolysin secretion system in *E. coli* BL21(DE3). *Microbial Cell Factories*, v. 11, 2012.

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

TACIRO, M. K. **Processo contínuo de produção de Poli-hidroxialcanoatos de cadeia média (PHA_{MCL}) sob limitação múltipla de nutrientes.** 2008. 98 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) gene locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 15–30, 1992.

TYO, K.; AJIKUMAR, P.; STEPHANOPOULOS, G. Stabilized gene duplication enables long-term selection-free heterologous pathway expression. **Nat. Biotechnol.**, v. 27, p. 760–765, 2009.

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*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 5253–5258, 2000.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: a tale of lost and found. **Int J Syst Evol Microbiol.**, v. 54, p. 2285-2289, 2004.

VICKERS, E.; KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; KROEMER, O. Examining the feasibility of bulk commodity production in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 34, n. 4, p. 585-596, 2012.

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

WANG, F.; LEE, S. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 58, n. 2-3, p. 325-328, 1998.

WONG, H.; LEE, S. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, n. 1, p. 30-33, 1998.

WONG, S.; CAUSEY, T.; MANTZARIS, N.; BENNETT, G.; SAN, K. Engineering Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymer composition in *E. coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 99, p. 919–928, 2008.

YAGI, K. et al. Biosynthesis of poly(3-hydroxyalkanoic acid) copolymers from CO₂ in *Pseudomonas acidophila* through introduction of the DNA fragment responsible for chemolithoautotrophic growth of *Alcaligenes hydrogenophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 62, p. 1004–1007, 1996.

YIM, K.; LEE, S.; CHANG, H. Synthesis of poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 49, n. 5, p. 495-503, 1996.

YU, H. et al. Effect of Poly(beta-hydroxybutyrate) accumulation on the stability of a recombinant plasmid in *Escherichia coli*. **J. Biosci. Bioengi.**, v. 96, n. 2, p. 179-183, 2003.

ANEXOS

ANEXO A - Esquemas dos plasmídios utilizados

Figura A.1 - Esquema do plasmídio pSK::phaCAB

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Figura A.2 - Esquema dos plasmídios pBBR1MCS-2::phaCAB e pBBR1MCS-2::phaCAB`

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

ANEXO B - Seqüenciamento da região interna do gene *prpC*.

E. coli K-12

01	ATGAGCGACA	CAACGATCCT	GCAAAACAGT	ACCCATGTCA	TTAAACCGAA
51	AAAATCTGTG	GCACTTTCTG	GCGTTCCGGC	GGGCAATACG	GCGCTCTGCA
101	CCGTGGGTAA	AAGTGGCAAT	GACCTGCATT	ACCGCGGCTA	CGATATTCTT
151	GATCTGGCGA	AACATTGCGA	ATTTGAAGAA	GTGGCGCATC	TGCTGATCCA
201	CGGCAAACTG	CCGACCCGTG	ACGAACTCGC	CGCTTACAAA	ACGAAACTGA
251	AAGCCCTGCG	CGGTTTACCG	GCTAACGTGC	GTACCGTGCT	GGAAGCCTTA
301	CCGGCGGCGT	CGCACCCGAT	GGATGTTATG	CGCACCGGTG	TTTCCGCGCT
351	CGGCTGCACG	CTGCCAGAAA	AAGAGGGGCA	TACCGTCTCT	GGCGCGCGGG
401	ATATTGCCGA	CAAAC TGCTG	GCGTCGCTTA	GCTCGATTCT	CCTTTATTGG
451	TATCACTACA	GCCACAACGG	CGAACGCATC	CAACCGGAAA	CCGATGACGA
501	CTCCATCGGC	GGTCACTTCC	TGCATCTGCT	GCACGGCGAA	AAGCCATCGC
	<i>prpC1</i>	GTT- ACTT-C	TG-ATCTGCT	GCACGGCGAA	AAGC-ATCGC
	<i>prpC2</i>	CGTg tcNctC	TGCATCTGCT	GCACGGCGAA	AAGC-ATCGC
551	AAAGCTGGGA	AAAGGCGATG	CATATCTCGC	TGGTGCTGTA	CGCCGAACAC
	AAAGCTGGGA	AAAGGCGATG	CATATCTCGC	TGGTGCTGTA	CGCCGAACAC
	AAAGCTGGGA	AAAGGCGATG	CATATCTCGC	TGGTGCTGTA	CGCCGAACAC
601	GAGTTTAACG	CCTCCACCTT	TACCAGTCGG	GTGATTGCGG	GCACCGGCTC
	GAGTTTAACG	CCTCCACCTT	TACCAGTCGG	GTGATTGCGG	GCACCGGCTC
	GAGTTTAACG	CCTCCACCTT	TACCAGTCGG	GTGATTGCGG	GCACCGGCTC
651	TGATATGTAT	TCCGCGATTA	TTGGCGCGAT	TGGCGCACTG	CGCGGGCCAA
	TGATATGTAT	TCCGCGATTA	TTGGCGCGAT	TGGCGCACTG	CGCGGGCCAA
	TGATATGTAT	TCCGCGATTA	TTGGCGCGAT	TGGCGCACTG	CGCGGGCCAA
701	AACACGGCGG	GGCGAATGAA	GTGTCGCTGG	AGATCCAGCA	ACGCTACGAA
	AACACGGCGG	GGCGAATGAA	GTGTCGCTGG	AGATCCAGCA	ACGCTACGAA
	AACACGGCGG	GGCGAATGAA	GTGTCGCTGG	AGATCCAGCA	ACGCTACGAA
751	ACGCCGGACG	AAGCCGAAGC	AGATATCCGC	AAGCGCGTGG	AAAACAAAGA
	ACGCCGGACG	AAGCCGAAGC	AGATATCCGC	AAGCGCGTGG	AAAACAAAGA
	ACGCCGGACG	AAGCCGAAGC	AGATATCCGC	AAGCGCGTGG	AAAACAAAGA
801	AGTGGTCATT	GGTTTTGGTC	ATCCGGTTTA	CACCATCGCT	GACCCGCGCC
	AGTGGTCATT	GGTTTTGGTC	ATCCGGTTTA	CACCATCGCT	GACCCGCGCC
	AGTGGTCATT	GGTTTTGGTC	ATCCGGTTTA	CACCATCGCT	GACCCGCGCC
851	ACCAGGTGAT	TAAACGTGTG	GCGAAGCAGC	TCTCGCAGGA	AGGCGGCTCG
	ACCAGGTGAT	TAAACGTGTG	GCGAAGCAGC	TCTCGCAGGA	AGGCGGCTCG
	ACCAGGTGAT	TAAACGTGTG	GCGAAGCAGC	TCTCGCAGGA	AGGCGGCTCG
901	CTGAAGATGT	ACAACATCGC	CGATCGCCTG	GAAACGGTGA	TGTGGGAGAG
	CCT				
951	CAAAAAGATG	TTCCCCAATC	TCGACTGGTT	CTCTGCTGTT	TCCTACAACA

```
1001   TGATGGGCGT TCCCACCGAG ATG TTCACAC CACTGTTTGT TATCGCCCGC
1051   GTCACCGGCT GGGCGGCGCA CATTATCGAA CAACGTCAGG ACAACAAAAT
1101   TATCCGTCCT TCCGCCAATT ATGTTGGACC GGAAGACCGC CCGTTTGTCT
1151   CGCTGGATAA GCGCCAGTAA
```

ANEXO C – Ensaios em biorreator - *E. coli* BL21

Figura C.1 – Cultivo de *E. coli* BL21 abrigo o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose com adição de IPTG. Ensaio 10 - Biomassa total produzida (X); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N) e oxigênio consumido.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura C.2 – Cultivo de *E. coli* BL21 abrigando o plasmídeo pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose com adição de IPTG. Ensaio 11 - Biomassa total produzida (X); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N) e oxigênio consumido.

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Figura C.3 – Cultivo de *E. coli* BL21 abrigando o plasmídio pBBR1MCS-2::*phaCAB* em meio mineral contendo glicose com limitação de oxigênio. Ensaio 14 -Biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); P3HB acumulado (P3HB); glicose consumida (G); nitrogênio consumido (N) e taxa de consumo de oxigênio (OUR); taxa de produção de CO_2 (CER).

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

ANEXO D – Análise de Fluxos

Programa de entrada de dados do Metatool - condição PHB Biomassa 50–E16

Biossíntese de PHB por E.coli a partir de glicose considerando também a biossíntese de biomassa

considera vias EMP, PPP, CK, Glioxilato, anapleróticas e respiração aeróbia de coenzimas sem transidrogenase

#

#

#

-ENZREV

EMP2 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

**EMP1 EMP3 EMP4 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8
CGLX1 CGLX2 AD1 AD2 P3HB BIOMASSA OXFAD OXNAD ACET ACET2
BIOTOT**

-METINT

**G6P NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA Rbl5P Rb5P X5P
S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD
FADH2 NAD NADH CoASH AcP XR HB**

-METEXT

Gliex ADP ATP CO2 HB Xt Acet O

-CAT

EMP1 : Gliex + ATP = G6P + ADP .

EMP2 : G6P = F6P .

EMP3 : $F6P + ATP = F16P + ADP$.

EMP4 : $F16P = G3P + DHP$.

EMP5 : $DHP = G3P$.

EMP6 : $G3P + NAD = BPG13 + NADH$.

EMP7 : $BPG13 + ADP = PG3 + ATP$.

EMP8 : $PG3 = PG2$.

EMP9 : $PG2 = PEP$.

EMP10 : $PEP + ADP = PIR + ATP$.

CPD : $PIR + NAD + CoASH = AcCoA + NADH + CO_2$.

VP1 : $G6P + NADP = PG6 + NADPH$.

VP5 : $PG6 + NADP = NADPH + RbI5P + CO_2$.

VP6 : $RbI5P = Rb5P$.

VP7 : $RbI5P = X5P$.

VP8 : $Rb5P + X5P = S7P + G3P$.

VP9 : $G3P + S7P = E4P + F6P$.

VP10 : $X5P + E4P = F6P + G3P$.

CK1 : $OAA + AcCoA = Cit + CoASH$.

CK2 : $Cit = IsoCit$.

CK3 : $IsoCit + NADP = KG2 + NADPH + CO_2$.

CK4 : $KG2 + NAD + CoASH = SucCoA + NADH + CO_2$.

CK5 : $SucCoA + ADP = Suc + ATP + CoASH$.

CK6 : $Suc + FAD = Fum + FADH_2$.

CK7 : $Fum = Mal$.

CK8 : $Mal + NAD = OAA + NADH$.

CGLX1 : $IsoCit = GLX + Suc$.

CGLX2 : $\text{GLX} + \text{AcCoA} = \text{Mal} + \text{CoASH}$.

AD1 : $\text{PIR} + \text{CO}_2 + \text{ATP} = \text{OAA} + \text{ADP}$.

AD2 : $\text{OAA} + \text{ATP} = \text{PEP} + \text{ADP} + \text{CO}_2$.

ACET : $\text{AcCoA} = \text{AcP} + \text{CoASH}$.

ACET2 : $\text{AcP} + \text{ADP} = \text{Acet} + \text{ATP}$.

P3HB : $2 \text{ AcCoA} + 1 \text{ NADPH} = \text{HB} + 2 \text{ CoASH} + 1 \text{ NADP}$

BIOMASSA : $205 \text{ G6P} + 71 \text{ F6P} + 897 \text{ Rb5P} + 361 \text{ E4P} + 129 \text{ G3P} + 1496 \text{ PG3} + 519 \text{ PEP} + 2833 \text{ PIR} + 3748 \text{ AcCoA} + 1079 \text{ KG2} + 1787 \text{ OAA} + 3547 \text{ NAD} + 18225 \text{ NADPH} + 18485 \text{ ATP} = 1 \text{ XR} + 18485 \text{ ADP} + 3547 \text{ NADH} + 18225 \text{ NADP} + 3748 \text{ CoASH}$.

BIOTOT : $11628 \text{ HB} + \text{XR} = \text{Xt}$.

OXFAD : $\text{FADH}_2 + 2 \text{ ADP} + \text{O} = \text{FAD} + 2 \text{ ATP}$.

OXNAD : $\text{NADH} + 3 \text{ ADP} + \text{O} = \text{NAD} + 3 \text{ ATP}$.

Programa de entrada de dados do Metatool- condição PHB Biomassa 16,9–E 15

Biossíntese de PHB por E.coli a partir de glicose considerando também a biossíntese de biomassa

considera vias EMP, PPP, CK, Glioxilato, anapleróticas e respiração aeróbia de coenzimas sem transidrogenase

#

#

#

-ENZREV

EMP2 EMP5 EMP6 EMP7 EMP8 EMP9 VP6 VP7 VP8 VP9 VP10

-ENZIRREV

EMP1 EMP3 EMP4 EMP10 CPD VP1 VP5 CK1 CK2 CK3 CK4 CK5 CK6 CK7 CK8
CGLX1 CGLX2 AD1 AD2 P3HB BIOMASSA OXFAD OXNAD ACET ACET2
BIOTOT

-METINT

G6P NADP NADPH PG6 PIR G3P BPG13 PG3 PG2 PEP AcCoA RbI5P Rb5P X5P
S7P E4P F6P DHP F16P OAA Cit KG2 IsoCit SucCoA Suc Fum Mal GLX FAD
FADH2 NAD NADH CoASH AcP XR HB

-METEXT

Gliex ADP ATP CO2 HB Xt Acet O

-CAT

EMP1 : Gliex + ATP = G6P + ADP .

EMP2 : G6P = F6P .

EMP3 : F6P + ATP = F16P + ADP .

EMP4 : F16P = G3P + DHP .

EMP5 : $\text{DHP} = \text{G3P}$.

EMP6 : $\text{G3P} + \text{NAD} = \text{BPG13} + \text{NADH}$.

EMP7 : $\text{BPG13} + \text{ADP} = \text{PG3} + \text{ATP}$.

EMP8 : $\text{PG3} = \text{PG2}$.

EMP9 : $\text{PG2} = \text{PEP}$.

EMP10 : $\text{PEP} + \text{ADP} = \text{PIR} + \text{ATP}$.

CPD : $\text{PIR} + \text{NAD} + \text{CoASH} = \text{AcCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$.

VP1 : $\text{G6P} + \text{NADP} = \text{PG6} + \text{NADPH}$.

VP5 : $\text{PG6} + \text{NADP} = \text{NADPH} + \text{RbI5P} + \text{CO}_2$.

VP6 : $\text{RbI5P} = \text{Rb5P}$.

VP7 : $\text{RbI5P} = \text{X5P}$.

VP8 : $\text{Rb5P} + \text{X5P} = \text{S7P} + \text{G3P}$.

VP9 : $\text{G3P} + \text{S7P} = \text{E4P} + \text{F6P}$.

VP10 : $\text{X5P} + \text{E4P} = \text{F6P} + \text{G3P}$.

CK1 : $\text{OAA} + \text{AcCoA} = \text{Cit} + \text{CoASH}$.

CK2 : $\text{Cit} = \text{IsoCit}$.

CK3 : $\text{IsoCit} + \text{NADP} = \text{KG2} + \text{NADPH} + \text{CO}_2$.

CK4 : $\text{KG2} + \text{NAD} + \text{CoASH} = \text{SucCoA} + \text{NADH} + \text{CO}_2$.

CK5 : $\text{SucCoA} + \text{ADP} = \text{Suc} + \text{ATP} + \text{CoASH}$.

CK6 : $\text{Suc} + \text{FAD} = \text{Fum} + \text{FADH}_2$.

CK7 : $\text{Fum} = \text{Mal}$.

CK8 : $\text{Mal} + \text{NAD} = \text{OAA} + \text{NADH}$.

CGLX1 : $\text{IsoCit} = \text{GLX} + \text{Suc}$.

CGLX2 : $\text{GLX} + \text{AcCoA} = \text{Mal} + \text{CoASH}$.

AD1 : $\text{PIR} + \text{CO}_2 + \text{ATP} = \text{OAA} + \text{ADP}$.

AD2 : $OAA + ATP = PEP + ADP + CO_2$.

ACET : $AcCoA = AcP + CoASH$.

ACET2 : $AcP + ADP = Acet + ATP$.

P3HB : $2 AcCoA + 1 NADPH = HB + 2 CoASH + 1 NADP$

BIOMASSA : $205 G6P + 71 F6P + 897 Rb5P + 361 E4P + 129 G3P + 1496 PG3 + 519 PEP + 2833 PIR + 3748 AcCoA + 1079 KG2 + 1787 OAA + 3547 NAD + 18225 NADPH + 18485 ATP = 1 XR + 18485 ADP + 3547 NADH + 18225 NADP + 3748 CoASH$.

BIOTOT : $2373 HB + XR = Xt$.

OXFAD : $FADH_2 + 2 ADP + O = FAD + 2 ATP$.

OXNAD : $NADH + 3 ADP + O = NAD + 3 ATP$.

Anexo E - Planilhas dos ensaios em biorreator

Tabela E.1 - Ensaio 01, valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* XL1Blue pSK::phaCAB.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA (g/L)	X (g/L)	DO	P3HB (%MSC)
0	15,9	0,736	0,04	0,46	0,435	ND
3	15,6	ND	0,04	0,47	0,462	19,0
6	15,0	0,702	0,05	0,47	0,584	18,0
9	14,8	ND	0,05	0,47	0,585	17,9
12	14,8	0,705	0,06	0,52	0,616	17,8
15	14,8	ND	0,05	0,54	0,843	17,8
18	14,0	0,667	0,11	0,54	1,158	17,2
20	13,9	0,596	0,18	0,84	2,365	8,5
22	12,9	0,549	0,22	1,12	3,898	6,0
24	11,2	0,363	0,27	1,24	3,924	4,0
26	11,1	0,353	0,33	2,44	5,701	3,1
28	8,2	0,195	0,44	3,43	9,739	2,4
30	5,3	0,002	0,47	4,47	11,290	1,7
32	3,1	0,001	0,23	4,73	12,908	2,9
34	14,6	0,001	0,16	4,84	12,496	2,5
38	11,4	0,001	0,14	5,06	12,220	2,0
41	9,1	0,000	0,13	5,10	11,276	1,8
44	7,2	0,000	0,13	5,10	11,284	1,8
46	5,9	0,000	0,12	5,18	11,514	2,2
50	4,5	0,000	0,14	5,18	11,930	2,1
53	3,3	0,000	0,15	5,34	11,606	1,9
56	17,4	0,000	0,16	5,82	11,524	1,7
72	10,2	0,000	0,25	4,37	11,236	1,9

ND: Não determinado

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E.2 - Ensaio 02, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC). *Escherichia coli* XL1Blue pSK::*phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA(g/L)	X (g/L)	P3HB (%MSC)
0	13,3	0,710	0,12	0,58	2,1
4	10,9	0,560	0,24	0,66	6,6
10	10,9	0,508	0,37	1,75	8,2
12	10,1	0,510	0,42	2,27	9,2
14	7,9	0,424	0,28	2,90	1,4
16	5,5	0,407	0,26	2,90	1,0
18	4,6	0,340	0,72	3,08	1,2
20	3,8	0,270	0,43	3,15	0,9
22	2,6	0,240	0,28	2,94	1,1
24	2,1	0,229	0,17	2,99	1,2
26	1,2	0,054	0,14	3,02	1,2

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E.3 - Ensaio 03, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* XL1Blue pBBR1MCS-2::phaCAB`.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA(g/L)	X (g/L)	DO	P3HB (%MSC)
0	14,9	0,892	0,15	0,48	0,216	2,4
3	14,9	0,713	0,23	0,89	0,641	2,0
6	14,4	0,648	0,36	0,98	1,043	1,8
8	14,6	0,596	0,37	1,30	1,164	1,8
10	14,6	0,452	0,40	1,58	1,900	1,9
12	14,4	0,430	0,36	1,76	2,576	2,2
14	13,4	0,416	0,40	1,82	3,261	2,3
16	10,6	0,330	0,43	2,18	3,274	2,4
18	10,3	0,277	0,56	2,34	4,454	2,1
20	8,5	0,243	0,77	2,74	5,152	2,1
22	6,1	0,142	0,86	3,05	6,461	2,2
24	3,5	0,035	1,21	3,46	6,731	2,2
26	1,9	0,001	0,79	3,58	6,877	2,3
28	11,4	0,001	0,24	3,64	7,082	2,7
30	9,5	0,001	0,00	3,75	6,968	2,6
32	8,5	0,000	0,00	3,96	7,474	2,7
34	7,6	0,000	0,00	4,44	7,556	2,8
36	6,8	0,000	0,00	4,18	7,905	2,7
38	6,0	0,000	0,00	4,24	7,914	2,8
40	5,3	0,000	0,00	4,36	7,660	2,7
42	4,8	0,000	0,00	4,06	7,667	2,8
44	4,3	0,000	0,00	4,28	7,747	2,6
46	3,8	0,000	0,00	4,32	7,537	2,7
48	3,5	0,000	0,00	4,06	7,796	2,8
50	2,9	0,000	0,00	4,18	7,744	2,8
55	7,4	0,000	0,00	4,42	7,600	3,1
58	6,3	0,000	0,00	3,92	7,788	2,9

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E.4 - Ensaio 04, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA(g/L)	X (g/L)	DO	P3HB (%MSC)
0	14,5	0,284	0,18	0,38	1,345	0,0
2	13,2	0,273	0,24	0,74	1,541	0,0
4	10,4	0,271	0,24	1,49	2,211	0,3
6	25,3	0,270	0,29	1,78	3,592	0,9
8	23,1	0,268	0,31	1,91	4,042	0,4
10	23,0	0,267	0,41	2,07	4,560	0,5
12	21,2	0,272	0,29	2,11	4,906	2,2
14	21,9	0,272	0,36	2,21	5,635	3,0
16	21,4	0,259	0,43	2,29	5,899	3,2
18	19,6	0,255	0,32	2,43	7,147	3,8
20	19,4	0,244	0,32	2,52	7,124	4,7
22	18,6	0,242	0,39	2,58	7,180	4,1
24	17,8	0,233	0,49	2,73	7,872	5,1
26	17,1	0,229	0,47	2,87	8,790	4,9
28	16,2	0,238	0,63	3,02	8,129	6,6
30	15,0	0,228	0,64	3,19	8,885	6,2
32	14,2	0,229	0,59	3,27	9,895	8,3
34	13,9	0,207	0,71	3,31	9,998	8,0
36	12,8	0,198	0,62	3,32	10,474	8,9
38	11,1	0,181	0,62	3,42	10,584	10,1
40	11,6	0,187	0,72	3,62	11,092	10,6
42	10,9	0,181	0,74	3,57	12,494	10,3
44	9,2	0,181	0,85	3,86	12,536	11,2
46	8,8	0,167	1,14	3,88	12,030	11,6
48	9,2	0,157	1,19	3,87	12,864	10,7
50	8,3	0,154	1,33	4,13	12,874	10,4
52	7,1	0,125	1,51	4,27	12,624	10,1
54	8,0	0,125	1,50	4,39	13,212	10,4

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Tabela E.5 - Ensaio 05, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA(g/L)	X (g/L)	P3HB (%MSC)
0	15,4	0,363	0,10	0,42	0,0
3	14,1	0,315	0,22	1,15	0,1
5	13,4	0,214	0,23	1,21	0,8
7	13,5	0,208	0,20	1,25	1,2
9	13,4	0,205	0,17	1,25	1,0
11	12,6	0,199	0,15	1,37	1,7
13	11,7	0,205	0,12	1,38	2,4
15	11,6	0,203	0,18	1,37	3,2
17	10,7	0,212	0,22	1,37	3,8
19	10,5	0,213	0,27	1,43	4,0
25	10,0	0,217	0,34	1,51	4,9

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Tabela E.6 - Ensaio 06, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), Acido acético (AA), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	AA(g/L)	X (g/L)	DO	P3HB (%MSC)
0	17,1	0,382	0,12	0,55	0,301	6,2
3	13,3	0,271	0,59	0,92	1,543	3,4
5	8,4	0,142	0,53	3,15	6,468	1,5
7	2,2	0,002	0,14	5,23	11,457	1,4
9	11,3	0,001	0,08	5,84	11,770	1,5
11	9,6	0,000	0,11	5,96	11,904	1,7
13	7,6	0,000	0,08	6,08	12,002	1,7
15	5,3	0,000	0,06	6,10	12,114	2,1
17	3,7	0,000	0,07	5,92	12,402	2,6
20	9,7	0,000	0,09	5,76	11,970	3,1
23	6,4	0,000	0,12	5,68	11,936	3,2
26	4,3	0,000	0,13	5,42	11,118	4,0
29	2,9	0,000	0,13	5,12	10,706	4,6
32	1,7	0,000	0,13	4,66	10,730	5,5
35	10,7	0,000	0,12	4,58	9,582	5,7
38	7,7	0,000	0,14	4,52	9,422	5,6

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E.7 - Ensaio 07, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC) avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pSK⁺::*phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	X (g/L)	DO	P3HB (%MSC)
0	13,8	0,313	0,45	0,355	16,7
2	13,7	0,256	0,66	1,020	7,3
4	12,9	0,252	1,24	2,294	2,8
6	9,5	0,235	2,01	4,318	1,2
8	3,1	0,002	4,56	11,026	0,5
10	1,5	0,000	4,86	12,524	0,4
12	8,5	0,000	5,54	12,590	0,3
14	6,8	0,000	5,66	16,278	0,3
17	4,3	0,000	6,12	16,904	0,4
20	2,7	0,000	6,26	18,096	0,4
23	0,9	0,000	6,62	17,622	0,5
26	9,4	0,000	6,40	17,804	0,4
29	6,4	0,000	6,46	17,798	0,6
32	4,5	0,000	6,68	17,936	0,3
35	4,2	0,000	6,42	17,944	0,3
38	15,3	0,000	6,46	17,372	0,4
41	11,0	0,000	6,80	15,124	0,3
44	9,4	0,000	6,62	15,236	0,4

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Tabela E.8 - Ensaio 08, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	N (g/L)	X (g/L)	P3HB (%MSC)
0	15,7	0,991	0,47	7,9
2	15,2	0,630	0,79	3,8
4	11,3	0,430	2,88	1,7
6	2,8	0,002	5,66	1,3
8	12,3	0,001	6,10	1,0
10	9,9	0,000	6,08	1,2
12	7,1	0,000	6,40	1,6
14	4,4	0,000	6,18	1,9
17	2,0	0,000	6,22	2,5
20	8,2	0,000	6,31	2,8
23	5,2	0,000	6,20	3,5
26	2,3	0,000	5,85	3,5

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Tabela E.9 - Ensaio 09, Valores de concentrações de glicose (G) nitrogênio (N), concentração celular (X), densidade óptica (DO) e percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC), avaliados no mutante 45 correspondente a *E. coli* LS5218 *pBBR1MCS-2::prpC-phaCAB*.

Tempo (h)	G (g/L)	X (g/L)	P3HB %MSC
0	17,3	0,32	2,0
2	17,7	0,65	1,4
4	13,9	1,93	1,2
6	6,38	5,37	1,2
8	3,14	5,82	1,1
10	13,7	6,02	0,2
12	10,9	5,84	0,1
14	8,6	5,78	1,1
16	6,7	5,44	0,1
18	4,8	5,32	0,8
21	2,5	5,02	0,4
24	10,1	5,02	0,4
27	8,1	5,03	0,5

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E. 10 – Ensaio 10. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); Nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) avaliados na linhagem *E. coli* BL21 pBBR1MCS-2::phaCAB`.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)
0	0,50	1,25	0,47	1,18	5,84	0,073	19,27	0,00	0,642	0,00
1	0,54	1,35	0,53	1,33	1,26	0,017	19,14	0,26	0,609	0,08
2	0,44	1,11	0,44	1,11	0,00	0,001	19,09	0,33	0,588	0,13
3	0,47	1,18	0,47	1,18	0,00	0,001	19,10	0,25	0,572	0,17
4	0,81	2,00	0,81	2,00	0,00	0,001	18,41	1,82	0,471	0,41
5	1,16	2,85	1,16	2,85	0,00	0,001	17,71	3,33	0,371	0,64
6	1,85	4,51	1,85	4,51	0,00	0,001	15,52	8,30	0,240	0,95
7	2,94	7,17	2,94	7,17	0,00	0,001	12,22	15,72	0,056	1,38
8	4,92	12,10	4,92	12,10	0,00	0,001	6,30	29,37	0,001	1,51
9	5,64	13,87	5,64	13,87	0,00	0,001	3,41	36,25	0,001	1,51
10	5,93	15,00	5,92	14,97	0,22	0,033	10,13	43,39	0,001	1,51
11	5,99	15,24	5,97	15,18	0,36	0,054	7,83	48,85	0,000	1,51
12	5,92	15,16	5,90	15,11	0,37	0,055	5,63	54,08	0,000	1,51
14	5,33	14,27	5,31	14,22	0,38	0,053	11,67	65,63	0,000	1,51
16	5,03	13,66	5,01	13,61	0,39	0,052	8,53	73,19	0,000	1,51
19	5,20	14,62	5,18	14,56	0,40	0,057	13,98	85,46	0,000	1,51
22	5,41	15,43	5,39	15,37	0,41	0,061	10,59	93,58	0,000	1,51
25	4,46	13,16	4,44	13,11	0,42	0,053	6,93	102,74	0,000	1,51
28	4,46	13,77	4,44	13,71	0,43	0,058	4,31	146,72	0,000	1,51
40	3,33	11,22	3,32	11,17	0,44	0,047	16,00	112,68	0,000	1,51

Fonte: Bocanegra Rodriguez, (2012).

Tabela E. 11- Ensaio 11. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) avaliados na linhagem *E. coli* BL21 pBBR1MCS-2::phaCAB`.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)
0	0,47	1,18	0,47	1,18	0,00	0,00	21,34	0,00	0,64	0,00
1	0,56	1,40	0,56	1,40	0,00	0,00	21,22	0,23	0,61	0,08
2	0,69	1,72	0,69	1,72	0,00	0,00	21,14	0,37	0,59	0,13
3	0,84	2,09	0,84	2,09	0,00	0,00	20,84	1,03	0,57	0,17
4	1,29	3,18	1,29	3,18	0,00	0,00	19,06	5,22	0,47	0,41
5	2,07	5,06	2,07	5,06	0,00	0,00	16,10	12,12	0,37	0,64
6	3,41	8,29	3,41	8,29	0,00	0,00	12,89	19,49	0,24	0,95
7	5,06	12,34	5,06	12,34	0,00	0,00	7,43	32,17	0,06	1,38
8	5,43	13,62	5,41	13,57	0,34	0,05	14,72	37,65	0,00	1,51
9	4,88	12,31	4,86	12,27	0,38	0,05	12,01	44,16	0,00	1,51
10	6,08	15,22	6,06	15,16	0,40	0,06	11,81	44,60	0,00	1,51
12	6,37	15,96	6,34	15,89	0,40	0,06	6,89	56,29	0,00	1,51
15	6,03	15,67	6,01	15,61	0,41	0,06	11,60	67,97	0,00	1,51
19	5,63	14,90	5,61	14,84	0,39	0,06	5,97	81,45	0,00	1,51
23	4,76	13,17	4,74	13,12	0,38	0,05	12,31	88,81	0,00	1,51
27	4,58	12,81	4,56	12,75	0,45	0,06	8,11	99,12	0,00	1,51
39	3,80	11,57	3,78	11,51	0,55	0,06	11,92	118,21	0,00	1,51
45	3,80	11,73	3,78	11,68	0,51	0,06	7,67	129,15	0,00	1,51

Fonte: Bocanegra Rodriguez, (2012).

Tabela E. 12- Ensaio12. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); Nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) e ácido acético produzido (AA), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB* sem limitação de O_2 ($O_2 > 30\%$)

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)	AA produzido (g/L)	AA produzido (g)
0	0,37	0,93	0,35	0,87	6,55	0,06	15,64	0,00	0,18	0,00	0,22	0,55
1	0,49	1,23	0,48	1,20	2,96	0,04	14,46	2,85	0,18	0,00	0,32	0,80
2	0,83	2,07	0,81	2,02	2,30	0,05	14,38	2,94	0,18	0,00	0,61	1,50
3	1,52	3,79	1,49	3,72	1,84	0,07	13,46	4,86	0,18	0,00	0,76	1,86
4	3,09	7,72	3,05	7,62	1,23	0,10	10,24	12,34	0,14	0,09	0,62	1,54
5	5,11	12,97	5,04	12,80	1,33	0,17	4,23	26,74	0,01	0,41	0,68	1,72
6	5,49	14,43	5,42	14,27	1,14	0,17	16,81	31,52	0,00	0,45	0,40	1,03
7	5,47	14,38	5,41	14,23	1,04	0,15	15,27	35,45	0,00	0,45	0,25	0,64
8	5,46	14,39	5,40	14,21	1,21	0,17	14,22	38,07	0,00	0,45	0,11	0,27
10	5,43	14,40	5,34	14,18	1,53	0,22	10,22	47,93	0,00	0,45	0,11	0,28
12	5,87	15,64	5,75	15,34	1,95	0,30	8,00	53,30	0,00	0,45	0,12	0,30
15	5,81	15,67	5,66	15,29	2,48	0,38	4,60	61,69	0,00	0,45	0,18	0,47
18	5,85	16,56	5,66	16,06	3,12	0,50	17,72	63,69	0,00	0,45	0,17	0,45
21	5,75	16,51	5,52	15,90	3,87	0,61	14,55	71,51	0,00	0,45	0,14	0,38
24	4,84	14,29	4,65	13,74	4,02	0,55	9,04	85,77	0,00	0,45	0,19	0,51

Fonte: Bocanegra Rodriguez, (2012).

Tabela E. 13- Ensaio13. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); Nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) e ácido acético produzido (AA), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB em condições de 1% de limitação de O_2 dissolvido.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)	AA produzido (g/L)	AA produzido (g)
0	0,39	0,98	0,34	0,85	12,53	0,12	16,32	0,00	0,69	0,00	0,25	0,61
1	0,41	1,02	0,39	0,98	4,08	0,04	16,19	0,00	0,65	0,10	0,36	0,88
2	0,75	1,87	0,73	1,82	2,63	0,05	13,52	0,00	0,62	0,16	0,52	1,29
3	0,90	2,24	0,87	2,18	2,96	0,07	12,48	0,00	0,58	0,26	0,75	1,83
4	1,13	2,82	1,10	2,74	2,70	0,08	10,96	0,00	0,51	0,41	1,99	4,84
5	1,37	3,44	1,33	3,35	2,56	0,09	9,54	0,00	0,50	0,42	3,34	8,15
6	1,93	4,86	1,87	4,71	3,06	0,15	6,43	0,00	0,47	0,48	4,38	10,70
7	2,08	5,30	2,01	5,11	3,49	0,18	3,91	0,00	0,37	0,70	4,51	11,04
8	2,10	5,59	2,02	5,37	3,90	0,22	12,50	33,01	0,32	0,78	5,75	14,59
9	2,63	7,01	2,51	6,71	4,40	0,31	10,93	33,01	0,27	0,89	7,78	19,82
10	3,12	8,34	2,98	7,98	4,42	0,37	8,40	33,01	0,19	1,10	8,50	21,68
12	4,30	11,55	4,01	10,78	6,83	0,77	2,91	33,01	0,08	1,37	12,07	31,12
14	4,96	13,92	4,49	12,64	9,42	1,28	9,33	67,25	0,00	1,57	13,38	36,05
16	5,50	15,49	4,79	13,54	12,87	1,94	5,67	67,25	0,00	1,57	13,88	37,37
19	5,40	15,29	4,49	12,80	16,87	2,50	3,01	67,25	0,00	1,57	13,83	37,16
23	5,46	16,00	4,33	12,81	20,68	3,19	11,70	101,49	0,00	1,57	13,53	37,48
27	5,41	15,91	4,18	12,43	22,75	3,48	6,39	101,49	0,00	1,57	13,22	36,47
29	5,42	16,31	4,14	12,61	23,59	3,70	13,68	125,06	0,00	1,57	13,14	36,89
41	5,30	16,16	3,82	11,84	27,96	4,32	6,05	125,06	0,00	1,57	13,02	36,78

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E. 14- Ensaio14. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); Nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) e ácido acético produzido (AA), avaliados na linhagem *E. coli* BL21 pBBR1MCS-2::phaCAB em condições de 1% de limitação de O_2 dissolvido.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)
0	0,40	1,00	0,40	1,00	0,00	0,00	15,12	0,00	0,62	0,00
1	0,40	1,01	0,40	1,01	0,00	0,00	15,02	0,00	0,62	-0,01
2	0,54	1,35	0,54	1,35	0,00	0,00	15,01	0,00	0,61	0,03
3	0,57	1,43	0,57	1,43	0,00	0,00	15,00	0,00	0,61	0,02
4	0,82	2,04	0,82	2,04	0,00	0,00	14,93	0,11	0,58	0,10
5	0,85	2,11	0,85	2,11	0,00	0,00	13,94	2,44	0,49	0,30
6	1,09	2,69	1,09	2,69	0,00	0,00	12,57	5,64	0,50	0,28
7	1,21	2,97	1,21	2,97	0,00	0,00	11,09	9,11	0,46	0,38
8	1,56	3,80	1,56	3,80	0,00	0,00	9,43	12,94	0,41	0,49
9	1,86	4,51	1,86	4,51	0,00	0,00	9,34	13,09	0,34	0,65
10	2,21	5,33	2,20	5,31	0,55	0,03	7,42	17,48	0,31	0,72
11	2,66	6,38	2,64	6,33	0,87	0,05	5,34	22,21	0,25	0,84
12	3,01	7,20	2,97	7,12	1,22	0,08	2,86	27,83	0,19	0,99
13	3,56	8,84	3,51	8,71	1,51	0,13	17,10	34,65	0,14	1,08
14	3,94	9,76	3,87	9,60	1,73	0,16	14,78	39,98	0,00	1,41
17	4,58	11,37	4,47	11,12	2,35	0,26	7,35	57,13	0,00	1,41
21	5,40	13,40	5,23	12,99	3,14	0,41	2,35	68,78	0,00	1,41
24	5,46	14,17	5,27	13,70	3,44	0,47	14,12	80,51	0,00	1,41
27	5,20	13,60	4,99	13,08	3,95	0,52	11,52	86,70	0,00	1,41
31	4,80	13,18	4,63	12,73	3,53	0,45	20,08	104,62	0,00	1,41
39	4,28	12,46	4,09	11,93	4,47	0,53	16,16	157,80	0,00	1,41
48	3,58	10,72	3,38	10,15	5,67	0,57	27,90	126,22	0,00	1,41

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).

Tabela E. 15- Ensaio15. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) e ácido acético produzido (AA), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::phaCAB' em condições de 1% de limitação de O_2 dissolvido e alimentação contínua de glicose e nitrogênio.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)	AA produzido (g/L)	AA produzido (g)
0	0,31	0,78	0,28	0,69	10,78	0,08	6,98	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
1	0,45	1,12	0,43	1,07	4,83	0,05	6,04	2,31	0,11	0,00	0,34	0,85
2	0,59	1,47	0,57	1,41	3,79	0,06	5,60	3,34	0,11	0,01	0,62	1,54
3	0,78	1,95	0,75	1,87	4,02	0,08	5,76	4,99	0,12	0,04	0,90	2,24
4	1,06	2,67	1,02	2,56	4,21	0,11	5,67	7,73	0,12	0,09	1,64	4,07
5	1,34	3,41	1,28	3,27	4,17	0,14	5,08	11,71	0,10	0,20	2,52	6,32
6	2,18	5,55	2,08	5,31	4,43	0,25	3,88	17,27	0,03	0,44	2,73	6,94
7	2,71	6,92	2,57	6,58	5,00	0,35	3,41	21,08	0,00	0,59	2,70	6,94
8	3,17	8,10	2,98	7,62	5,99	0,48	2,90	25,02	0,00	0,66	1,92	5,05
9	3,57	9,15	3,32	8,51	7,05	0,64	2,23	29,35	0,00	0,73	2,29	6,00
10	4,01	10,31	3,66	9,43	8,64	0,88	1,50	34,08	0,00	0,80	2,18	5,75
11	4,48	11,61	4,09	10,61	8,72	1,00	0,90	39,50	0,00	0,90	2,02	5,42
12	4,93	12,93	4,40	11,57	10,65	1,35	0,50	45,91	0,00	1,04	2,59	6,89
14	5,96	16,13	5,31	14,41	10,84	1,72	0,67	59,09	0,00	1,38	2,83	7,61
16	7,43	21,05	6,53	18,55	12,07	2,51	1,38	76,50	0,00	1,87	4,44	12,09
18	8,02	23,78	6,86	20,39	14,51	3,39	0,00	98,59	0,00	2,34	5,47	15,58
20	9,12	28,09	7,77	23,99	14,82	4,10	0,00	114,91	0,00	2,75	6,75	20,00
22	10,90	34,55	9,32	29,59	14,52	4,96	0,00	131,23	0,00	3,16	7,01	21,64
24	12,40	40,22	10,59	34,41	14,60	5,81	0,00	147,55	0,00	3,57	5,18	16,85
26	12,60	41,87	10,71	35,66	14,99	6,21	0,00	163,87	0,00	3,98	3,52	12,15
28	14,42	48,74	12,23	41,42	15,17	7,32	0,00	180,19	0,00	4,39	1,84	7,14
30	14,44	49,98	12,16	42,19	15,76	7,79	0,00	196,51	0,00	4,80	1,00	4,58
33	14,96	53,49	12,48	44,75	16,55	8,74	0,00	220,99	0,00	5,42	0,57	3,27
36	16,24	59,87	13,39	49,53	17,54	10,34	0,00	245,47	0,00	6,04	0,87	4,34
39	16,78	64,08	13,70	52,50	18,38	11,58	0,00	269,95	0,00	6,65	1,49	6,59
43	16,16	65,06	13,14	53,11	18,70	11,95	0,00	302,59	0,00	7,48	1,92	8,29

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012)

Tabela E. 16- Ensaio16. Valores de concentração da biomassa total produzida (X_t); biomassa residual produzida (X_r); percentual de P3HB da massa seca celular P3HB (%MSC); concentração de P3HB produzido (g), Glicose residual no meio de cultura (g/L) e glicose produzida (g); Nitrogênio residual (g/L) e nitrogênio consumido (g) e ácido acético produzido (AA), avaliados na linhagem *E. coli* LS5218 pBBR1MCS-2::*phaCAB* sem limitação de O_2 ($O_2 > 30\%$) e alimentação contínua de glicose e nitrogênio.

T (h)	X_t produzido (g/L)	X_t produzido (g)	X_r produzido (g/L)	X_r produzido (g)	PHB %MSC	PHB produzido (g)	Glicose residual (g/L)	Glicose consumida (g)	Nitrogênio residual (g/L)	Nitrogênio consumido (g)	AA produzido (g/L)	AA produzido (g)
0	0,23	0,58	0,21	0,52	9,75	0,06	6,02	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
1	0,38	0,95	0,37	0,91	3,91	0,04	5,50	1,27	0,12	-0,01	0,27	0,66
2	0,68	1,68	0,66	1,63	2,93	0,05	4,92	2,68	0,10	0,04	0,48	1,18
3	1,19	2,94	1,16	2,87	2,31	0,07	4,84	4,44	0,07	0,17	0,57	1,41
4	1,92	4,74	1,89	4,66	1,76	0,08	3,70	9,78	0,00	0,40	0,46	1,15
5	2,41	5,96	2,37	5,87	1,50	0,09	3,11	13,82	0,00	0,48	0,49	1,24
6	2,87	7,13	2,82	6,99	1,89	0,14	2,58	17,70	0,00	0,55	0,69	1,73
7	2,76	6,91	2,70	6,76	2,17	0,15	1,00	24,14	0,00	0,62	0,81	2,04
8	3,33	8,35	3,23	8,09	3,15	0,26	2,08	24,17	0,00	0,70	0,79	2,01
9	3,61	9,11	3,45	8,72	4,37	0,39	1,54	28,09	0,00	0,77	1,15	2,90
10	3,90	9,91	3,66	9,30	6,28	0,60	0,00	34,62	0,00	0,85	1,12	2,85
11	4,37	11,15	4,01	10,28	8,15	0,88	0,00	37,85	0,00	0,94	1,41	3,58
12	4,52	11,66	4,15	10,73	8,17	0,92	0,00	42,39	0,00	1,06	1,54	3,93
14	5,97	15,72	5,49	14,49	7,96	1,22	0,86	53,35	0,00	1,43	1,87	4,92
16	7,64	20,83	6,95	19,00	8,99	1,84	2,13	67,49	0,00	1,92	2,36	6,44
18	9,08	25,96	8,23	23,57	9,38	2,39	2,40	86,19	0,00	2,46	2,97	8,45
20	9,64	28,67	8,59	25,60	10,94	3,07	1,57	104,23	0,00	2,91	3,52	10,38
22	10,12	31,36	8,96	27,85	11,42	3,51	0,00	124,62	0,00	3,35	3,33	10,29
24	10,90	34,83	9,67	30,97	11,28	3,86	0,00	140,61	0,00	3,80	3,32	10,65
27	13,92	45,62	12,02	39,52	13,65	6,10	0,00	164,60	0,00	4,46	1,07	4,03
30	14,50	49,30	12,51	42,68	13,69	6,63	0,00	188,59	0,00	5,13	0,73	3,09
33	14,10	49,87	12,01	42,62	14,85	7,25	0,00	212,58	0,00	5,79	1,17	4,63
36	14,56	53,26	12,39	45,50	14,87	7,76	0,00	236,57	0,00	6,46	1,17	4,78
39	15,01	56,70	12,76	48,38	14,96	8,32	0,00	260,56	0,00	7,12	1,51	6,12
43	15,58	60,50	13,16	51,33	15,51	9,17	0,00	284,55	0,00	7,79	1,49	6,27

Fonte: Bocanegra Rodriguez (2012).