

JOÃO LUCAS MAEHARA SAID DOS REIS

**Desenvolvimento de um Processo de Produção do Aminoácido
Treonina por Via Biotecnológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2022

JOÃO LUCAS MAEHARA SAID DOS REIS

**Desenvolvimento de um Processo de Produção do Aminoácido
Treonina por via Biotecnológica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Rosane Aparecida Moniz Piccoli

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2022

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Maehara Said dos Reis, João Lucas
Desenvolvimento de um Processo de Produção do
Aminoácido Treonina por via Biotecnológica / João
Lucas Maehara Said dos Reis; orientadora Rosane
Aparecida Moniz Piccoli. -- São Paulo, 2022.
82 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. BIOLOGIA MOLECULAR. 2. MICROBIOLOGIA
APLICADA. 3. BIOREATORES. 4. VIABILIDADE ECONÔMICA.
I. Moniz Piccoli, Rosane Aparecida , orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato: João Lucas Maehara Said dos Reis

Título da Dissertação: Desenvolvimento de um Processo de Produção do Aminoácido Treonina por via Biotecnológica.

Orientador: Rosane Aparecida Moniz Piccoli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o candidato:

() **Aprovado**

() **Reprovado**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia e ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas.

RESUMO

REIS, J. L. M. S. **Desenvolvimento de um Processo de Produção do Aminoácido Treonina por via Biotecnológica**. 2022. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O mercado global de aminoácidos foi avaliado em US\$ 21.768,2 milhões em 2019 e deve chegar a US\$ 41.296,7 milhões até 2027, progredindo a um CAGR (Compound Annual Growth Rate) de 8,3% de 2019 a 2027. Já a demanda global do aminoácido treonina foi de 1.007,5 quilo toneladas em 2019 e deve chegar a 2.165,2 quilo toneladas até 2027, crescendo a um CAGR estimado de 6,1% de 2020 a 2027 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021). Como a L-treonina é o terceiro aminoácido mais vendido com base no volume e o segundo aminoácido mais utilizado na alimentação de suínos e aves, o desenvolvimento do bioprocesso de produção de Treonina no Brasil mostra-se bastante promissor. Esse trabalho visou a desenvolver esse bioprocesso numa visão industrial. Primeiramente, foi feita a construção de linhagens mutantes da bactéria *Escherichia coli* para a produção de L-treonina por via biotecnológica. Foram utilizadas estratégias para a alteração de determinadas vias metabólicas de modo a direcionar o fluxo de carbono para a síntese do aminoácido de interesse. Foi realizada a superexpressão das principais enzimas na via sintética. O operon *thrABC* presente no genoma de *E. coli* é responsável pela síntese das principais enzimas envolvidas na biossíntese de treonina, que são: Aspartato Quinase, Homoserina Desidrogenase e Treonina Sintase. A estratégia adotada foi a superexpressão de apenas o gene *thrB*, contendo o promotor sintético pJ23100. Outra estratégia envolveu a engenharia de sistemas exportadores e importadores de treonina, que permitiu aumentar a produção, facilitando a acumulação extracelular de treonina. Dessa forma, a superexpressão de outro gene, o *rhtC* mostrou-se como uma alternativa para aumentar a concentração extracelular do aminoácido sem prejudicar a sua produção. Além disso, a deleção dos genes *tdcC* e *sstT*, responsáveis pela importação da treonina presente no meio para o interior da célula também se mostrou como uma alternativa promissora no aumento da quantidade produzida desse aminoácido. Como resultado, a superexpressão dos genes *thrB* e o *rhtC* foi a principal estratégia adotada. A bactéria utilizada como plataforma para a superexpressão foi uma *Escherichia coli* MG1655, com os genes

metJ e *lysA* previamente nocauteados. O gene *metJ* é um inibidor da enzima Aspartato Quinase, enquanto o nocaute do gene *lysA* torna a bactéria auxotrófica no aminoácido lisina, cuja via para síntese é concorrente da via da treonina. Ao total foram gerados 8 mutantes, sendo a linhagem MG1655 Δ *MetJ* Δ *lysA* pBBR-*rhtC-thrB* a que apresentou os melhores resultados de produção em *agitador rotativo*. Por esse motivo ela foi escolhida para ensaio em biorreator, atingindo uma concentração de treonina de 15,2 g/L em 48 horas de ensaio.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. L-Treonina. Bioprocessos. SuperPro Designer.

ABSTRACT

REIS, J. L. M. S **Development of a Biotechnological Production Process of the Amino Acid Threonine**. 2022. 82 p. Master thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

This work carried aims to develop a process of industrial production of the essential amino acid L-threonine. Mutant strains of the bacterium *Escherichia coli* were engineered to produce L-threonine through a biotechnological route. Metabolic engineering strategies were used to modify certain metabolic pathways to direct the carbon flow to the synthesis of the amino acid. The main enzymes in the L-threonine synthetic pathway were overexpressed. The *thrABC* operon present in *E. coli* genome is responsible for the synthesis of the main enzymes involved in threonine biosynthesis, which are: Aspartate Kinase, Homoserine Dehydrogenase and Threonine Synthase. The strategy adopted was to overexpress only the *thrB* gene, attached to the synthetic promoter pJ23100. Another strategy involved the engineering of threonine exporting and importing systems, which allowed for increased production, facilitating the extracellular accumulation of threonine. Thus, the overexpression of another gene, *rhtC*, proved to be an alternative to increase the threonine extracellular concentration, without harming its production. In addition, the deletion of the *tdcC* and *sstT* genes, responsible for importing threonine present in the medium into the cell, also proved to be a promising alternative for increasing the amount of this amino acid produced. As a result, the overexpression of *thrB* and *rhtC* genes was the main strategy adopted. The bacterium used as a platform for overexpression was the *Escherichia coli* MG1655, with the *metJ* and *lysA* genes previously knocked out. The *metJ* gene is an inhibitor of the Aspartate Kinase enzyme, while the knockout of the *lysA* gene turns the bacteria auxotrophic into the amino acid lysine, whose pathway for synthesis is concurrent with the threonine pathway. In total, 8 mutants were generated, and the MG1655 $\Delta metJ \Delta lysA$ pBBR-*rhtC-thrB* strain presented the best production results in flasks. For this reason, it was selected for testing in a bioreactor, reaching a threonine concentration of 15.2 g / L in 48 hours of testing.

Keywords: *Escherichia coli*. L-Threonine. Bioprocesses. SuperPro Designer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Receita do mercado de aminoácidos.....	15
Figura 2 - Importação e exportação de aditivos alimentícios em 2012.....	17
Figura 3 - Fluxo metabólico para a produção de aminoácidos provenientes do oxaloacetato em <i>E. coli</i> . Linhas vermelhas indicam inibição alostérica. Linhas verdes indicam inibição da transcrição do gene.	19
Figura 4 - Produção de treonina com diferentes linhagens de <i>Escherichia coli</i> W ATCC 9637.....	23
Figura 5 - Produção de treonina com linhagem K8280 de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 6 - Produção de treonina e formação do subproduto ácido acético	25
Figura 7 - Estrutura do plasmídeo pUC19	30
Figura 8 - Estrutura do plasmídeo PBBR1 MCS2.....	31
Figura 9 – Primer forward utilizado para PCR do operon thrABC.....	32
Figura 10 - Mecanismo de deleção Datsenko & Wanner	34
Figura 11 - Eliminação de gene sstT por meio do sistema de recombinação FLP-FRT	34
Figura 12 - Plasmídeo clonado contendo os genes thrABC e rhtA.....	47
Figura 13 - Extração de plasmídeos de linhagens DH5 α	48
Figura 14 - Estrutura do plasmídeo pBBR contendo os genes rhtC e thrB	49
Figura 15 - Reação de PCR para amplificação do inserto.....	50
Figura 16 - Reação de PCR para confirmação de clonagem no plasmídeo pBBR...51	51
Figura 17 - Confirmação da substituição dos genes sstT (esquerda) e tdcC (direita) pelo gene kanR	52
Figura 18 - Placa sem ampicilina (esquerda) e com ampicilina (direita): Seleção negativa.....	53
Figura 19 - Produção de L-Treonina de cada linhagem de <i>E. coli</i> ATCC9637	56
Figura 20 - Produção de L-Treonina de cada Linhagem de <i>E. coli</i> MG1655	56
Figura 21 - Ensaio em biorreator para a produção de treonina	59
Figura 22 - Monitoramento de variáveis no ensaio.....	60
Figura 23 - Variação da concentração de biomassa, treonina e glicose em função do tempo	61
Figura 24 - Variação da concentração celular, glicose e do aminoácido ao longo do tempo	Erro! Indicador não definido.
Figura 25 - Variação da fração volumétrica de CO ₂ e concentração de treonina ao longo do ensaio	Erro! Indicador não definido.
Figura 26 - Concentração de ácido acético e glicose ao longo do ensaio de produção de treonina	65
Figura 27 - Fluxograma do Processo de Produção de Treonina	67
Figura 28 - Custo de Treonina vs. Capacidade Anual de Produção.....	69
Figura 29 - Distribuição dos Custos Operacionais na Produção de L-Treonina	70
Figura 30 - Variação do Custo de Treonina pela Capacidade Produtiva utilizando Sacarose	71
Figura 31 - Comparação da Distribuição dos Custos em dois cenários diferentes...72	72
Figura 32 - Variação do Custo pela Capacidade Produtiva. Produtividades 0,64 e 1,28 g/(L.h).....	73
Figura 33 - Variação do Custo pela Capacidade Produtiva para produtividade de 2,56 g/(L.h).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho	28
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.....	29
Tabela 3 - Detalhamento dos primers: nome, sequências e finalidade.....	32
Tabela 4 - Volumes dos reagentes do kit Quick-Load Taq	37
Tabela 5 – Volume dos reagentes com a enzima Q5 DNA polimerase	37
Tabela 6 - Condições no termociclador com enzima de alta fidelidade	37
Tabela 7 - Condições de PCR Quick-Load® Taq 2x Master Mix	38
Tabela 8 - Volumes empregados na reação de digestão com a enzima xbaI	40
Tabela 9 - Volumes empregados na reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase	41
Tabela 10 - Linhagens construídas para teste de produção de treonina	54
Tabela 11 - Variação do custo de produção de acordo com a produção anual	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrometro
μx	Velocidade específica de crescimento celular
AK I	Aspartato Quinase I
AK II	Aspartato Quinase II
AK III	Aspartato Quinase III
Amp ^R	Gene que confere resistência à ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
D.O.	Densidade óptica
D.O. ⁶⁰⁰	Densidade óptica a 600 nanômetros de comprimento
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
H1	Zona de homologia a montante do gene de interesse
H2	Zona de homologia a jusante do gene de interesse
kb	Quilobases de nucleotídeos
kg	Quilograma
Km ^R	Gene que confere resistência à Canamicina
LB	Meio Luria Bertani
LBA	Meio LB contendo ampicilina
LBK	Meio LB contendo canamicina
M	Molar
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
$\text{mmol.g}^{\text{DW-1}}.\text{h}^{-1}$	Milimol de certo composto por grama de massa seca por hora
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida reduzido
NADP ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida fosfato
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida fosfato reduzido
ng	Nanograma
O.D.	Oxigênio Dissolvido
P	Concentração de Produto
P _P	Produtividade do produto
pb	Pares de base
PCR	Reação de polimerase em cadeia

pmol	Picomol
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
S	Concentração de substrato
seg	Segundo
UV	Ultravioleta
X	Concentração celular
$Y_{X/S}$	Fator de conversão substrato em célula
$Y_{P/S}$	Fator de conversão substrato em produto
$\Delta lysA$	Linhagem deletada no gene <i>lysA</i>
$\Delta metJ$	Linhagem deletada no gene <i>metJ</i>
$\Delta sstT$	Linhagem deletada no gene <i>sstT</i>
$\Delta tdcC$	Linhagem deletada no gene <i>tdcC</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1	Produção de L-treonina a partir de <i>Escherichia coli</i>	18
2.1.1	Estratégias de manipulação genética em <i>E. coli</i> para produção de L-treonina	20
2.1.2	Cultivo em Biorreator	21
2.2	Produção de Acetato em cultivos de <i>E. coli</i>	25
3	OBJETIVO	27
3.1	Objetivo geral.....	27
3.2	Objetivos específicos	27
4.	METODOLOGIA	27
4.1	Microrganismos.....	27
4.2	Genes	28
4.3	Plasmídeos utilizados	29
4.4	Oligonucleotídeos iniciadores	31
4.5	Deleção dos genes pela metodologia de Datsenko & Wanner	32
4.6	Reações em Cadeia da Polimerase (PCR- <i>Polymerase Chain Reaction</i>) ..	36
4.7	Purificação de DNA e Gel	39
4.8	Clonagem e Seleção de Mutantes	40
4.9	Meios de cultura.....	41

4.10 Ensaio de Produção	42
4.10.1 Preparo do inóculo	42
4.10.2 Cultivos em agitador rotativo.....	42
4.10.3 Cultivo em biorreator.....	43
4.11 Tratamento de Dados	44
4.12 SuperPro Designer	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1 Construção do plasmídeo pUC19-thrABC-rhtA.....	47
5.2 Construção do plasmídeo pBBR-thrB-rhtC	49
5.3 Nocaute dos genes em <i>Escherichia coli</i>	52
5.3.1 Nocaute dos genes <i>sstT</i> e <i>tdcC</i>	52
5.4 Linhagens construídas	53
5.5 Teste de produção em <i>agitador rotativo</i>	54
5.6 Produção em Biorreator	58
5.6.1 Cultivo em Biorreator de 5 L	58
5.6.1 Cultivo em Biorreator de 15 L	62
5.7 Viabilidade econômica do processo de produção de treonina	65
5.7.1 Fluxograma do processo.....	65
5.7.2 Viabilidade do processo de cultivo da linhagem THR14	68
5.7.3 Viabilidade de linhagens teóricas consumidoras de sacarose	71

5.7.4 Viabilidade de linhagens teóricas de alta produtividade e fator de conversão.....	72
5.8 Considerações finais para futuros desenvolvimentos	74
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	80
APÊNDICE A – Dados de custo dos equipamentos utilizados pelo software SuperPro Designer.....	81
APÊNDICE B – Dados de custo dos insumos utilizados pelo software SuperPro Designer.....	82

1 INTRODUÇÃO

Aminoácidos são substâncias essenciais para o processo metabólico animal ou vegetal, uma vez que são os blocos construtores (*building blocks*) para a síntese das proteínas. Com base na necessidade de aminoácidos para a nutrição do crescimento animal, os aminoácidos costumam ser classificados como essenciais ou não essenciais à nutrição animal, sendo os aminoácidos essenciais aqueles que o organismo não é capaz de sintetizar, porém são necessários para o seu funcionamento. Dos 20 aminoácidos padrões, nove deles são considerados essenciais: valina, leucina, isoleucina, lisina, treonina, metionina, histidina, fenilalanina e triptofano. Os aminoácidos mais importantes utilizados como aditivos na alimentação animal são a lisina, a metionina, a treonina e o triptofano (HANSEN et al., 1993).

O mercado mundial de aminoácidos em 2017 foi de US\$ 8 bilhões. A produção global de aminoácidos foi de 4,5 milhões de toneladas em 2012, 6,68 milhões de toneladas em 2014 e estima-se alcançar 10 milhões de toneladas em 2022, crescendo a uma CAGR (Compound Annual Growth Rate) de 5,6% de 2015 a 2022(SINGH; TIWARI, 2019). Dados durante e posteriores à pandemia mostram que o mercado global de aminoácidos foi avaliado em US\$ 21.768,2 milhões em 2019 e deve chegar a US\$ 41.296,7 milhões até 2027, progredindo a um CAGR de 8,3% de 2019 a 2027. O crescimento do mercado deverá ser impulsionado por sua crescente demanda por alimentos, indústrias farmacêuticas e nutracêuticas. O produto está amplamente presente em suplementos alimentares devido à sua capacidade de tratar dores musculares e entorses e fadiga mental (GRAND VIEW RESEARCH, 2021).

A crescente demanda por aminoácidos inclui mercados de ração animal, alimentos saudáveis, produtos farmacêuticos precursores, suplementos alimentares, adoçantes artificiais e cosméticos (Figura 1). Dentre eles, o segmento de suplementos para ração animal (envolvendo L-lisina, DL-metionina, L-treonina e L-triptofano) constitui a maior parcela (56%) do mercado total de aminoácidos e espera-se que continue alimentando o crescimento do mercado nos próximos anos (SINGH; TIWARI, 2019)

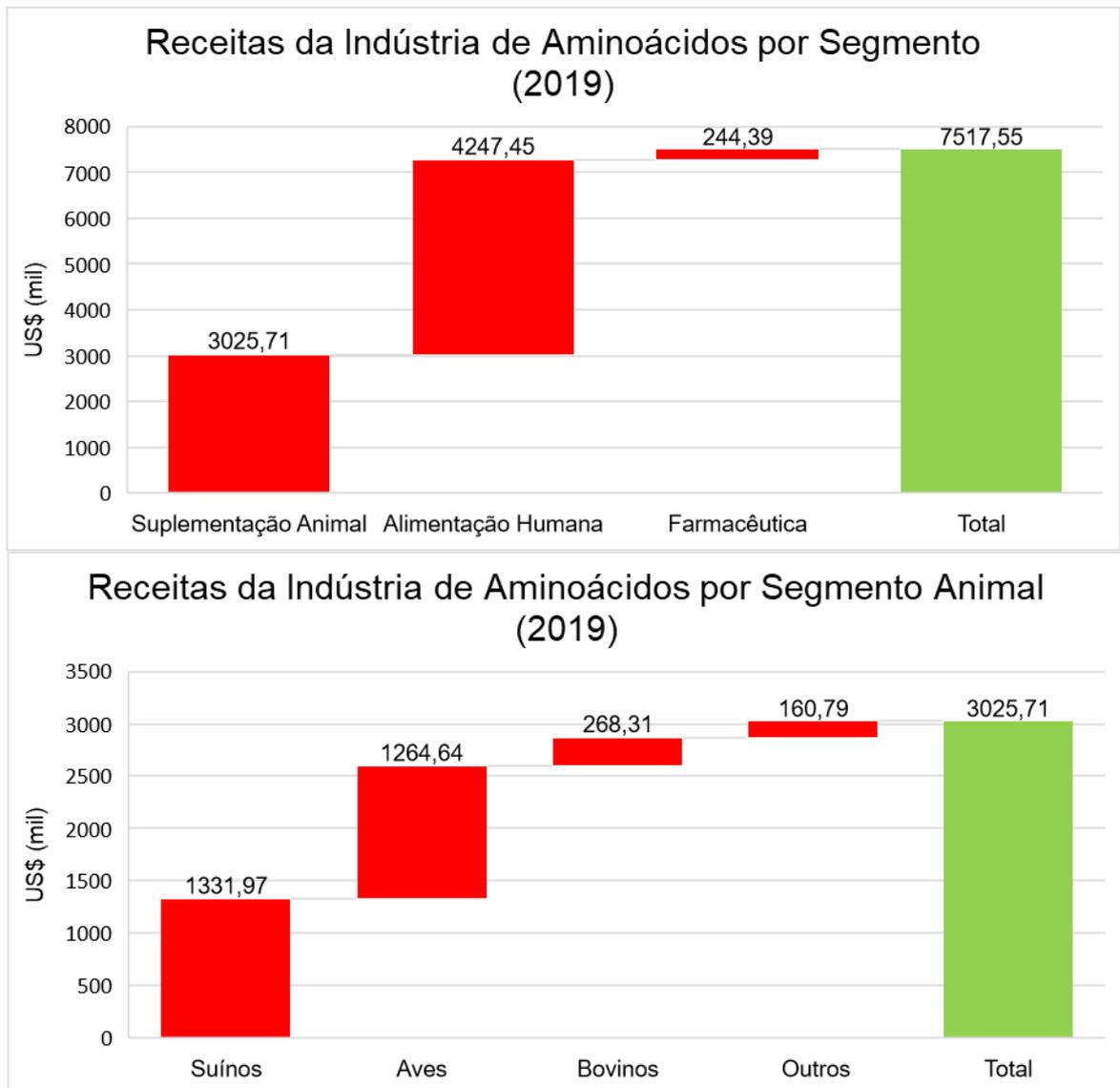


Figura 1 - Receita do mercado de aminoácidos

Fontes: (GRAND VIEW RESEARCH, 2021). Elaborado pelo autor.

Algumas empresas são grandes *players* na indústria de produção de aminoácidos. Entre eles estão Ajinomoto, Archer Daniels Midland, Cargill Inc., Daesang Corporation, Evonik Industries AG, Kyowa Hakko Kogyo, Nippon Soda, Prinova U.S. LLC, Royal DSM, Showa Denko KK e Zhejiang Chemicals. Participantes de pequena escala incluem Iris Biotech GmbH, Nanjing Liang Chemical, Sunrise Nutrachem Group, Tokyo Chemical Industry, Novus International

Inc., Anaspec Inc., CJ Cheil Jedang Corporation e Adisseo France SAS (SANCHEZ et al., [s.d.]).

Em 2014, segundo o relatório denominado “Estudo do potencial de diversificação da indústria química brasileira” sobre aditivos alimentícios e elaborado pelas empresas Bain & Company e Gas Energy, o mercado brasileiro registrou um faturamento de 1,1 bilhão de dólares em 2012 em aditivos alimentícios para animais, o que representou cerca de 10% do mercado global. Entre 2006 e 2012, apresentou um crescimento anual médio de 10,1%, comparado com 3,7% ao ano do mercado mundial (Figura 2) (BNDES, 2014).

O Brasil é o 5º maior exportador mundial de lisina, respondendo por 19% das exportações mundiais do produto. O total de exportações do segmento representou 28% da demanda local em 2012.

A demanda global de treonina foi de 1.007,5 quilo toneladas em 2019 e deve chegar a 2.165,2 quilo toneladas até 2027, crescendo a um CAGR estimado de 6,1% de 2020 a 2027. Em termos de receita, o mercado valeu US\$ 1.007,5 milhões em 2019 e é esperado atingir um mercado no valor de US\$ 2.165,2 milhões até 2027, crescendo a um CAGR estimado de 10,0% de 2020 a 2027 (GRAND VIEW RESEARCH, 2021)

A L-treonina é o terceiro aminoácido mais vendido com base no volume e o segundo aminoácido mais utilizado na alimentação de suínos e aves (SANCHEZ et al., [s.d.]). No Brasil, segue a mesma rota produtiva que a lisina, e sua importação resultou em um crescimento de 38% entre 2008 e 2012 (BNDES, 2014). O País tem capacidade produtiva anual de 20 mil toneladas de treonina com a planta da multinacional japonesa Ajinomoto para um mercado de 21 mil toneladas em 2012. Frente à crescente demanda existe ainda espaço para o desenvolvimento de novos produtores de aminoácidos para atender ao mercado interno e exportar o excedente (BNDES, 2014). É imprescindível o país continuar expandindo sua capacidade produtiva para suprir a crescente demanda interna e aumentar a relevância do Brasil como exportador de aminoácidos.

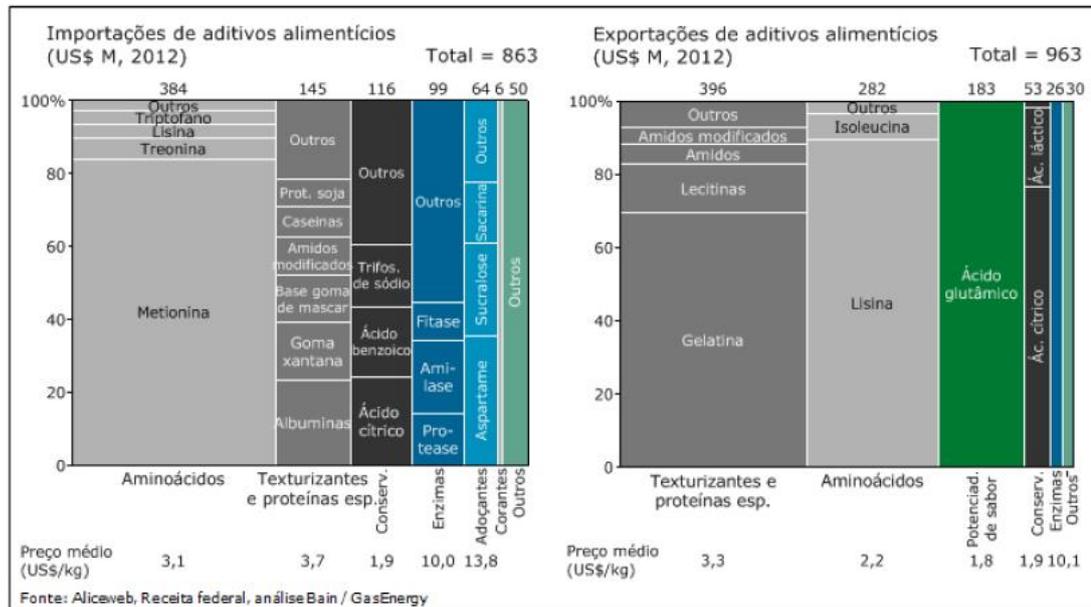


Figura 2 - Importação e exportação de aditivos alimentícios em 2012.

Fonte : (BNDES, 2014)

Dessa maneira, o metabolismo de produção do aminoácido treonina foi amplamente analisado para a construção de linhagens recombinantes de *Escherichia coli* com capacidade de produzir o aminoácido L-treonina em elevadas concentrações, de maneira a viabilizar o bioprocessamento técnica e economicamente.

As modificações identificadas e realizadas consistiram na clonagem e expressão de diferentes genes envolvidos na via bioquímica para a síntese de L-Treonina, clonagem de genes que expressam proteínas responsáveis por realizar o transporte desta molécula do meio intracelular para o meio extracelular, e o nocaute de genes que exercem o controle das vias de síntese do aminoácido.

Em paralelo a essas modificações do metabolismo, foi proposto um fluxograma de processo condizente com um processo de produção de aminoácidos para suplemento animal e conduzida a análise de viabilidade econômica do bioprocessamento. Essa análise permitiu nortear o desenvolvimento do processo de produção de treonina quanto aos custos e demandas das produções anuais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de L-treonina a partir de *Escherichia coli*

L-treonina é um aminoácido essencial utilizado como suplemento para alimentos de consumo animal e humano, com o objetivo de melhorar o seu valor nutricional (HANSEN et al., 1993). É produzido por um bioprocesso microbiológico, sendo que os mutantes da bactéria *Escherichia coli* gerados por mutagênese ou por manipulação genética são comumente escolhidos como produtores devido às suas velocidades de crescimento rápido e características fisiológicas bem conhecidas. A bactéria *Escherichia coli* sintetiza quatro aminoácidos a partir do ácido aspártico: L-treonina, L-lisina, L-metionina e L-isoleucina (LI et al., 2017). A primeira reação dessa via é catalisada por três enzimas aspartato quinases (AK I, AK II e AK III). A enzima aspartato quinase I é codificada pelo gene *thrA*, sendo sua atividade inibida pela treonina, e sua síntese reprimida pela ação combinada da treonina e da isoleucina. A enzima aspartato quinase II é codificada pelo gene *metL*, cuja atividade é insensível à metionina, embora sua síntese seja reprimida pela metionina. A enzima aspartato quinase III é codificada pelo gene *lysC*; sua atividade é inibida e sua síntese reprimida pela lisina (CHASSAGNOLE et al., 2001). Uma característica distintiva dos genes *thrA* e *metL* é que eles codificam proteínas de múltiplos domínios que possuem duas atividades enzimáticas, que são as atividades das enzimas aspartato quinase e homoserina desidrogenase (LI et al., 2017). Assim, seus produtos de proteína catalisam a primeira e a terceira etapas na via biossintética da L-treonina (Figura 3). A segunda reação é catalisada pela enzima aspartato semialdeído desidrogenase codificada pelo gene *asd*. A enzima não é inibida por aminoácidos, mas pode ser parcialmente reprimida em altas concentrações de lisina, treonina e metionina. Com isso, a lisina pode diminuir o nível de enzima na célula 50 vezes, enquanto os outros aminoácidos só podem reduzi-lo à metade. A expressão de *asd* também é influenciada pela glicose-6-fosfato (PATTE; BOY, 1972). As duas últimas reações são catalisadas pela enzima homoserina quinase (gene *thrB*) e pela treonina sintase (gene *thrC*) (LI et al., 2017). Os principais genes envolvidos diretamente na síntese de L-treonina (*thrA*, *thrB* e *thrC*) formam o operon *thrABC*. A Figura 3 apresenta um esquema com as principais

vias para a síntese dos aminoácidos L-Treonina, L-metionina, L-Lisina e L-Isoleucina a partir do aspartato.

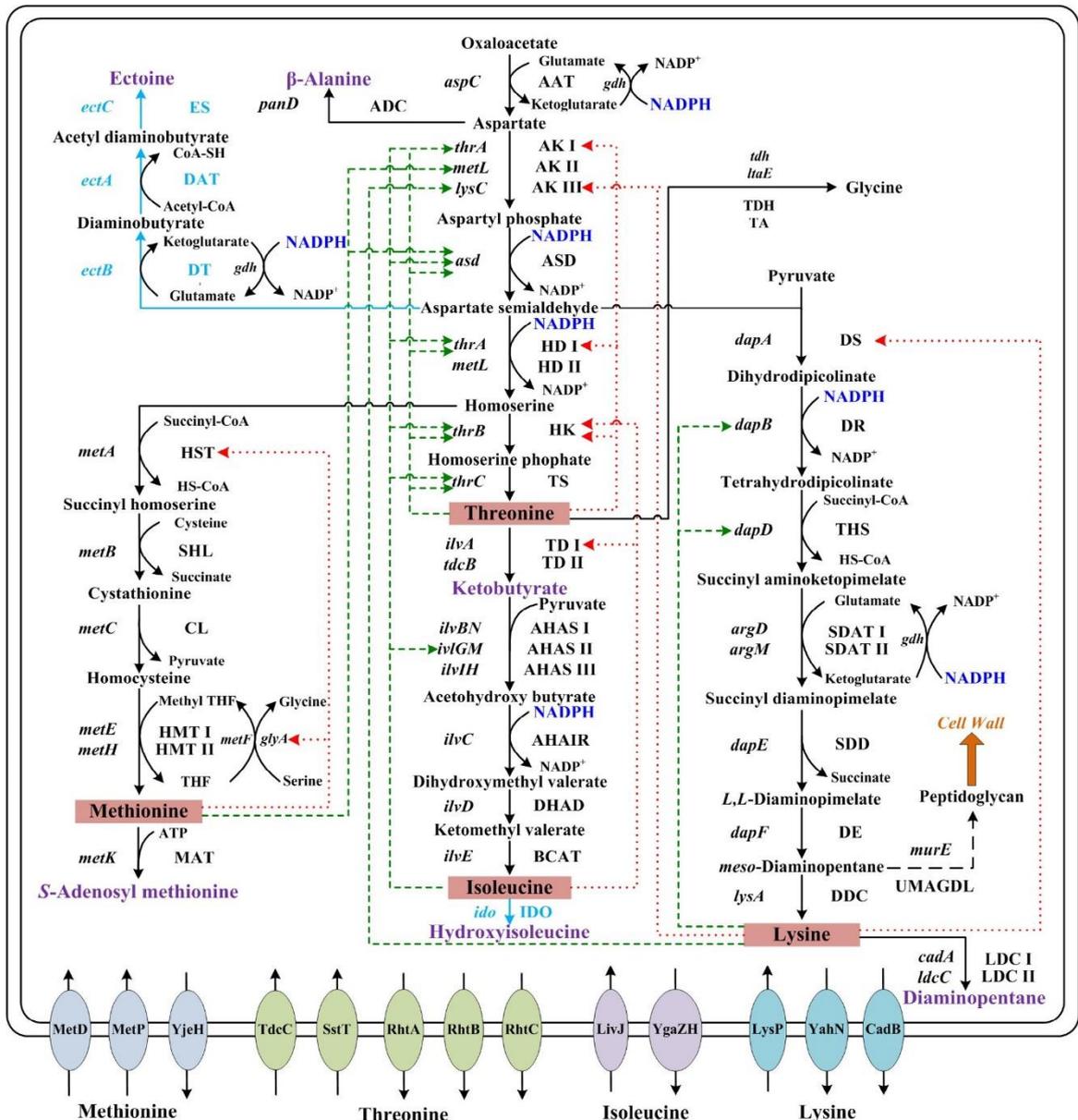


Figura 3 - Fluxo metabólico para a produção de aminoácidos provenientes do oxaloacetato em *E. coli*. Linhas vermelhas indicam inibição alostérica. Linhas verdes indicam inibição da transcrição do gene. Fonte: (LI et al., 2017)

Um gene não apresentado na Figura 3 é o *metJ*. Ele é responsável pela síntese de um repressor transcricional que atua nos genes *metL* e *metB*, da via de síntese da metionina (MAXON et al., 1989). Como o gene *metL* realiza a mesma função que o gene *thrA*, é provável que a desregulação do gene *metL* por meio do nocaute do gene *metJ* seja favorável à produção de treonina.

2.1.1 Estratégias de manipulação genética em *E. coli* para produção de L-treonina

A compreensão aprofundada das vias sintéticas da treonina aliada ao uso de ferramentas de manipulação genética permite o desenvolvimento de linhagens bacterianas superprodutoras desse aminoácido. A superexpressão dos genes da via de biossíntese de L-treonina, especialmente de genes desregulados que codificam enzimas-chave, costuma ser a estratégia mais eficiente e produtiva. Diversos trabalhos aplicaram tal estratégia, obtendo melhorias significativas na produção de L-treonina.

A maior parte das estratégias tem o foco na superexpressão dos genes da via terminal da L-treonina, e os melhores resultados são alcançados com alelos mutados que codificam enzimas-chave desreguladas. Em *E. coli*, os genes *thrA*, *thrB* e *thrC* estão agrupados no operon *thrABC*, e a enzima AK I codificada por *thrA* existe mais abundantemente entre as três aspartato quinases (DONG; QUINN; WANG, 2011). A modificação da via de produção de L-treonina tem o foco na manipulação dos genes presentes nesse operon. Na maioria dos casos, o operon *thrABC* superexpresso continha um gene *thrA* dessensibilizado para a inibição por treonina. LIVSHITS et al. (2003) introduziram um plasmídeo recombinante pVIC40 contendo o operon mutante *thrA₄₄₂BC* na linhagem MG442 de *E. coli* dessensibilizada. Como resultado, a produção de L-treonina foi aumentada de 8 g/L para 18,4 g/L em um processo de batelada alimentada. Em 2009, ZHANG et al. introduziram um plasmídeo recombinante de alto número de cópias pWYE134 contendo um operon mutado *thrA₃₄₅BC* sob seu promotor nativo na linhagem de tipo selvagem *E. coli* W3110. Como resultado, a produção de L-treonina aumentou de 0,036 g/L para 9,2 g/L num processo descontínuo alimentado (ZHANG et al., 2009).

LEE et al. (2007) desenvolveram uma linhagem de *Escherichia coli* capaz de super produzir L-treonina. As inibições de *feedback* da AK I e III (codificadas por *thrA* e *lysC*, respectivamente) foram removidas. As vias para a degradação de treonina

foram removidas por deleção de *tdh* e mutação de *ilvA*. Os genes *metA* e *lysA* foram deletados com o objetivo de tornar mais precursores disponíveis para a biossíntese de treonina. A linhagem final de *E. coli* projetada foi capaz de produzir treonina com uma elevada conversão de 0,393 g de treonina por grama de glicose e concentração final de 82,4 g/L de treonina, num cultivo em batelada alimentada (LEE et al., 2007).

Outra estratégia envolve a engenharia de sistemas exportadores e importadores de treonina, que pode aumentar a produção, facilitando a acumulação extracelular de treonina. KRUSE et al. (2002) descobriram que a concentração interna de treonina excedia significativamente a concentração externa durante o processo de produção da treonina, o que implica a importância da aceleração da secreção de treonina (KRUSE et al., 2002). A expressão aumentada do gene *rhtA* devido a uma substituição do nucleotídeo G para A no genoma também melhorou claramente a produção de treonina por *E. coli* MG422 (pAYC32-thrArBC) (LIVSHITS et al., 2003). Entretanto, esse transportador também é capaz de excretar a molécula homoserina (ATSUSHI YOKOTA, 1967), um importante intermediário da síntese da treonina. Portanto, a superexpressão de outro gene, o *rhtC*, mostra-se como uma alternativa para aumentar a concentração extracelular do aminoácido sem prejudicar sua produção.

Além disso, a deleção dos genes *tdcC* e *sstT* que promove a recaptura da treonina presente no meio também se mostra como uma alternativa promissora no aumento da quantidade produzida desse aminoácido (LEE et al., 2007).

2.1.2 Cultivo em Biorreator

Atualmente, os aminoácidos são produzidos em bioprocessos operados principalmente nos modos de produção em batelada ou batelada alimentada. Os cultivos de batelada são aplicados como um processo muito simples em termos de controle de processo, tecnologia ou esterilidade. O principal limite para uma possível intensificação de um processo em batelada é a osmolaridade do meio inicial. Especialmente, altas concentrações iniciais da fonte de carbono interferem no crescimento e na produtividade das bactérias (WOOD et al., 2001).

O controle do fornecimento de nutrientes, especialmente da fonte de carbono, permite executar o processo em condições de transferência ideal de oxigênio para o biorreator. Além disso, o controle da concentração do nutriente reduz as influências do nutriente na produtividade ou rendimento do processo. Se a concentração de nutrientes exceder um determinado nível, podem ocorrer efeitos indesejados, como inibição pelo substrato ou um *overflow* do metabolismo, produzindo diversos metabólitos indesejados (ENFORS et al., 2001). Os metabólitos tipicamente observados na produção de treonina são o lactato e o acetato. (LEE et al., 2007)

O acetato que as células excretam no meio de cultura apresenta um problema a essas células. O acetato, como outros ácidos fracos, é tóxico. Em sua forma indissociada ou ácida, esse ácido lipofílico fraco permeia facilmente as membranas, desacoplando o gradiente de pH transmembrana. Uma vez que se encontra no espaço transmembrana, ele se dissocia em um próton e um ânion. O próton acidifica o citoplasma, enquanto o ânion aumenta a pressão osmótica interna e interfere na biossíntese de metionina. No entanto, o acetato é apenas parcialmente oxidado e, portanto, é uma fonte potencial de carbono e energia. Uma forma que a bactéria *E. coli* remove essa toxina do ambiente é através de seu consumo (WOLFE, 2005a).

A seguir, serão apresentados alguns trabalhos que realizaram a produção de L-treonina por meio do cultivo em biorreator de linhagens geneticamente modificadas.

Primeiramente, (KASE; TANAKA; NAKAYAMA, 1971) foram capazes de produzir treonina a partir de uma linhagem de *Escherichia coli* denominada KY8280. Inicialmente, quinze linhagens de bactérias foram tratadas com luz ultravioleta para originar mutantes auxotróficos, que foram selecionados quanto à sua capacidade de produzir L-treonina. Observou-se que a melhor condição de produtividade foi obtida com a linhagem KY8280 de *E coli* W, cujo genótipo é apresentado na Figura 4.

	L-Treonina (mg/mL)
<i>E. coli</i> W ATCC 9637	0
↓ UV	
KY8270 Met ⁻	1.0
↓ UV	
KY8274 Met ⁻ , DAP ⁻	2.0
↓ UV	
KY8279 Met ⁻ , DAP ⁻ , Ile ⁻	2.5
↓ espontâneo	
KY8280 Met ⁻ , DAP ⁻ , Ile ⁺	5.0

Figura 4 - Produção de treonina a partir de diferentes linhagens de *Escherichia coli* W ATCC 9637

Fonte: (KASE; TANAKA; NAKAYAMA, 1971)

Varias fontes de carbono foram testadas para a produção de treonina em frascos de 10 mL em *shaker* a partir desta linhagem e a frutose obteve o melhor resultado: 6,3 g/L em 72 horas de ensaio em batelada não alimentada.

O melhor resultado desse estudo foi obtido a partir de um cultivo em biorreator não-alimentado, agitado e aerado por 48 horas, onde uma concentração final de treonina de 13,8 g/L foi atingida, com produtividade de 0,115 g/(L.h) e fator de conversão $Y_{P/S}$ de 0,25 g/g, conforme mostra a Figura 5.

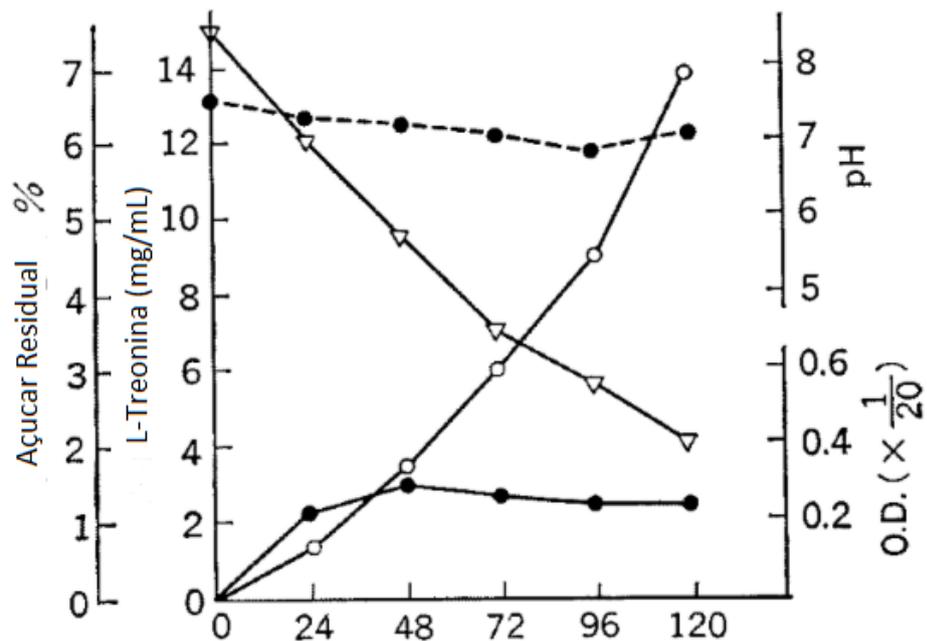


Figura 5 - Produção de treonina com linhagem K8280 de *Escherichia coli*

Fonte: (KASE; TANAKA; NAKAYAMA, 1971).(LEITE; RODRIGUES; PAULO, 2017)

Legenda: Triângulo: açúcar residual, Círculo aberto: L-treonina (mg/mL), Círculo fechado e Linha contínua: O.D., Círculo fechado e Linha tracejada: pH

Como mencionado anteriormente, (LEE et al., 2007) construíram duas linhagens produtoras de treonina (TH27C e TH28C) a partir da engenharia metabólica. Realizando ensaios de produção em biorreator, os autores obtiveram produtividade de produto igual a 1,37 g/(L.h) com concentração final de 77,1 g/L de treonina em um processo com duração de 56,1 horas. O ácido acético começou a acumular após o consumo de 180 g/L de glicose, ocasionando inibição no crescimento celular na produção de treonina. Os autores realizaram novas modificações no microrganismo com o objetivo de reduzir a produção de ácido acético (linhagem TH28C).

O resultado obtido foi a concentração de treonina final igual a 82,4 g/L com produtividade de 1,65 g/(L.h) em um processo que durou 50 horas. Os autores mostram uma produção de treonina 20,4% maior do que a produção com a linhagem TH27C anterior, mostrando a interferência do ácido acético na produção de treonina.

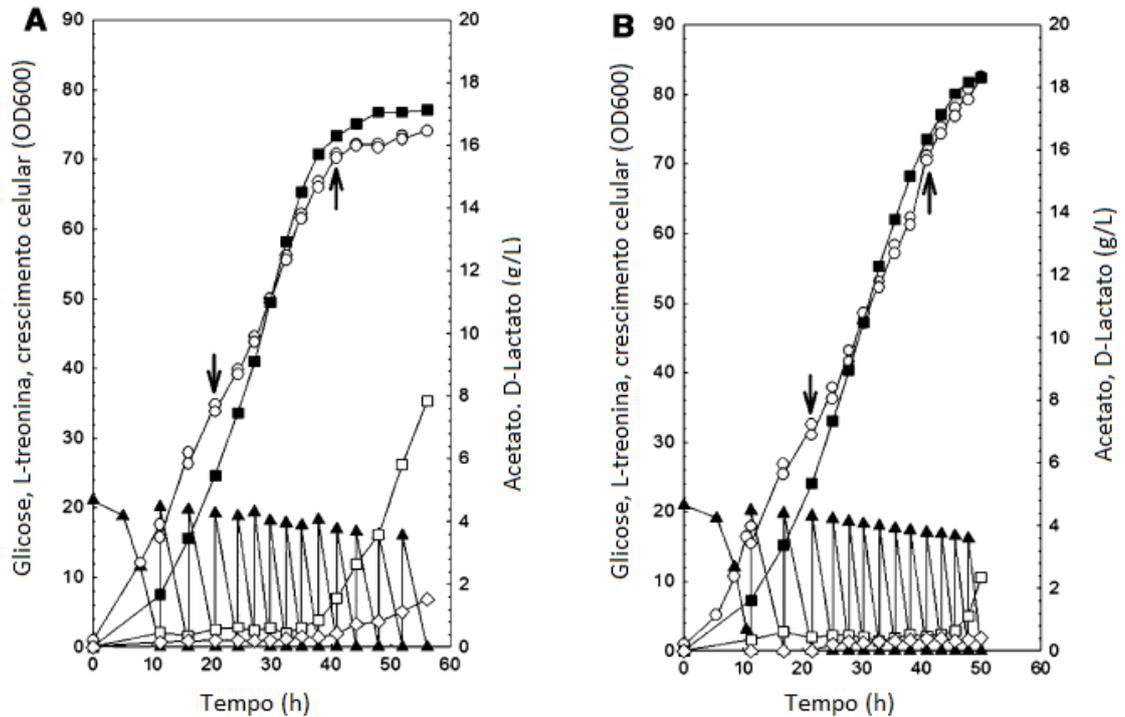


Figura 6 – Produção de treonina e a formação elevada (A) e baixa (B) do subproduto ácido acético

Fonte: (LEE et al., 2007). (LEITE; RODRIGUES; PAULO, 2017)

Legenda: Círculo aberto: (DO 600nm); Quadrado fechado: L-treonina (g/L); Triângulo fechado: glicose (g/L); Losango aberto: ácido láctico (g/L); Quadrado aberto: ácido acético (g/L)

2.2 Produção de Acetato em cultivos de *E. coli*

Os metabólitos tipicamente observados na produção de treonina são lactato e o acetato. (LEE et al., 2007). O acetato que as células excretam no meio de cultura apresenta um problema a essas células. O acetato, como outros ácidos fracos, é tóxico. Em sua forma não dissociada ou ácida, esse ácido lipofílico fraco permeia facilmente as membranas, desfazendo o gradiente de prótons transmembrana. Uma vez que se encontra no espaço transmembrana, ele se dissocia em um próton e um ânion. O próton acidifica o citoplasma, enquanto o ânion aumenta a pressão osmótica interna e interfere na biossíntese de metionina. O acetato é apenas parcialmente oxidado e, portanto, é uma fonte potencial de carbono e energia. Uma forma que a bactéria *E. coli* remove essa toxina do ambiente é através de seu

consumo (WOLFE, 2005). Embora o acúmulo excessivo de ácido acético seja prejudicial para as células no cultivo, um estudo utilizando linhagens de *Escherichia coli* conduzido por batelada alimentada, revelou que o fluxo de carbono direcionado para a síntese e excreção de acetato é fisiologicamente vantajoso para o organismo por possibilitar uma distribuição de fluxos metabólicos internos, de tal forma que o cultivo possa atingir uma taxa de crescimento maior (μ).

A bactéria *E. coli* excreta acetato para o ambiente pela necessidade de regenerar o NAD^+ consumido na via de glicólise e reutilizar a coenzima A (CoASH) necessária para converter piruvato em acetil-CoA. A formação de ácido acético na célula ocorre sempre que o ciclo completo do ácido tricarboxílico (TCA) não opera ou quando o fluxo de carbono para o interior das células excede a capacidade das vias metabólicas centrais de regenerar o NAD^+ , limitando o fluxo de carbono pelas vias principais. Desse modo, a excreção de acetato pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio, quando o crescimento em um meio com excesso de glicose (ou outras fontes de carbono altamente assimiláveis) inibe a respiração, um comportamento denominado efeito *Crabtree* bacteriano (PFEIFFER; MORLEY, 2014). A disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio e a natureza da fonte de carbono também podem influenciar nas reações do TCA. Em condições de baixa concentração de oxigênio e altas concentrações de glicose, as células de *E. coli* operam uma versão incompleta do TCA, que forma succinil-CoA por uma via redutora e 2-cetoglutarato por uma oxidativa e não gera energia (WOLFE, 2005b). Esta versão ramificada ocorre porque a ausência de oxigênio inibe severamente a expressão de muitas enzimas do ciclo do TCA.

Em cultivos celulares de alta densidade de *E. coli*, é possível observar um momento quando as células bacterianas transitam de um estado de crescimento rápido, em que há uma grande produção e excreção de acetato, para um estado de crescimento mais lento facilitado pela importação e utilização (assimilação) desse acetato excretado. Este fenômeno pode ser chamado de "*Acetate Switch*" e ocorre quando as células esgotam as fontes de carbono acetogênicas (como D-glicose ou piruvato) e passam a consumir o acetato presente no meio.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo desenvolver um processo de produção do aminoácido L-treonina por via biotecnológica. Para atingir os objetivos geral, foram considerados os seguintes objetivos específicos:

3.2 Objetivos específicos

- Análise do metabolismo de biossíntese de L-treonina na bactéria *Escherichia coli*;
- Desenvolvimento de uma linhagem bacteriana produtora de L-treonina, utilizando-se técnicas de biologia molecular;
- Realização de testes de produção em biorreator para a produção do aminoácido em elevada concentração;
- Análise da viabilidade econômica da produção de L-treonina a partir dos resultados obtidos experimentalmente;

4. METODOLOGIA

4.1 Microrganismos

As linhagens utilizadas neste trabalho foram a *Escherichia coli* K12 MG1655 (BACHMANN, 1996) selvagem e a modificada geneticamente com o nocaute do gene *metJ*, responsável por regular parte das reações da via de síntese da treonina. Outra modificação previamente feita nessa linhagem e que foi explorada neste trabalho foi o nocaute do gene *lysA*. Outra linhagem utilizada foi a *E. coli* W ATCC 9637 (ARCHER et al., 2011a), tanto a linhagem selvagem como a modificada com os nocautes mencionados anteriormente (Tabela 1). A bactéria *E. coli* W foi escolhida por ser uma bactéria capaz de consumir sacarose como fonte de carbono, que é uma matéria-prima de menor custo que a glicose.

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho

Bactéria	Genótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i> MG1655	<i>rph</i> ⁻¹ F ⁻ λ ⁻	(GUYER; REED; STEITZ, 1981)
<i>E. coli</i> MG1655 Δ <i>metJ</i>	<i>rph</i> ⁻¹ F ⁻ λ ⁻ Δ <i>metJ</i>	IPT
<i>Escherichia coli</i> MG1655 Δ <i>metJ</i> Δ <i>lysA</i>	<i>rph</i> ⁻¹ F ⁻ λ ⁻ Δ <i>metJ</i> Δ <i>lysA</i>	IPT
<i>Escherichia coli</i> W ATCC 9637	Selvagem	(ARCHER et al., 2011b)
<i>E. coli</i> W ATCC 9637 Δ <i>metJ</i>	Δ <i>metJ</i>	IPT
<i>E. coli</i> W ATCC 9637 Δ <i>sstT</i>	Δ <i>sstT</i>	Este trabalho
<i>E. coli</i> W ATCC 9637 Δ <i>metJ</i> Δ <i>lysA</i>	Δ <i>metJ</i> Δ <i>lysA</i>	IPT
<i>E. coli</i> W ATCC 9637 Δ <i>metJ</i> Δ <i>sstT</i>	Δ <i>metJ</i> Δ <i>sstT</i>	Este trabalho
<i>E. coli</i> W ATCC 9637 Δ <i>metJ</i> Δ <i>tdcC</i>	Δ <i>metJ</i> Δ <i>tdcC</i>	Este trabalho

4.2 Genes

Os principais genes de interesse utilizados neste trabalho são os responsáveis pela biossíntese da treonina (*thrABC*), e os genes envolvidos no consumo de treonina (*sstT* e *tdcC*), bem como na exportação desse aminoácido (*rhtA* e *rhtC*). Conhecendo a sequência de DNA da *E. coli*, depositada no GenBank com número U00096.3 (BLATTNER et al., 1997), deletou-se genes responsáveis pela recaptura da treonina e foi feita a superexpressão de genes relacionados à síntese deste bioproduto.

4.3 Plasmídeos utilizados

Os plasmídeos empregados neste trabalho são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho

Plasmídeo	Característica	Referência
pBBR1 MCS-2	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (5144 pb), Km ^R	KOVACH et al., 1995
pUC19	Plasmídeo mobilizável com amplo espectro de hospedeiros (2686 pb), Amp ^R	NORRANDER;KEMPE;MESSING, 1983
pCP20	<i>flp</i> de leveduras, repA101 _{ts} , Cm ^R , Amp ^R	CHEREPANOV e WACKERNGEL, 1995
pKD13	Plasmídeo com cassete de deleção FRT- Km ^R -FRT, Km ^R , Amp ^R	DATSENKO e WANNER, 2000
pKD46	Plasmídeo com recombinases do fago λ, repA101 _{ts} , Amp ^R	DATSENKO e WANNER, 2000
pBBR:: <i>rhtC</i> + <i>thrB</i>	Genes <i>rhtC</i> e <i>thrB</i> de <i>Escherichia coli</i> , Km ^R	Este trabalho

O plasmídeo pUC19 (NORRANDER; KEMPE; MESSING, 1983) foi utilizado como vetor na tentativa de clonagem e expressão do *operon thrABC* da linhagem bacteriana ATCC 9637 (Figura 7).

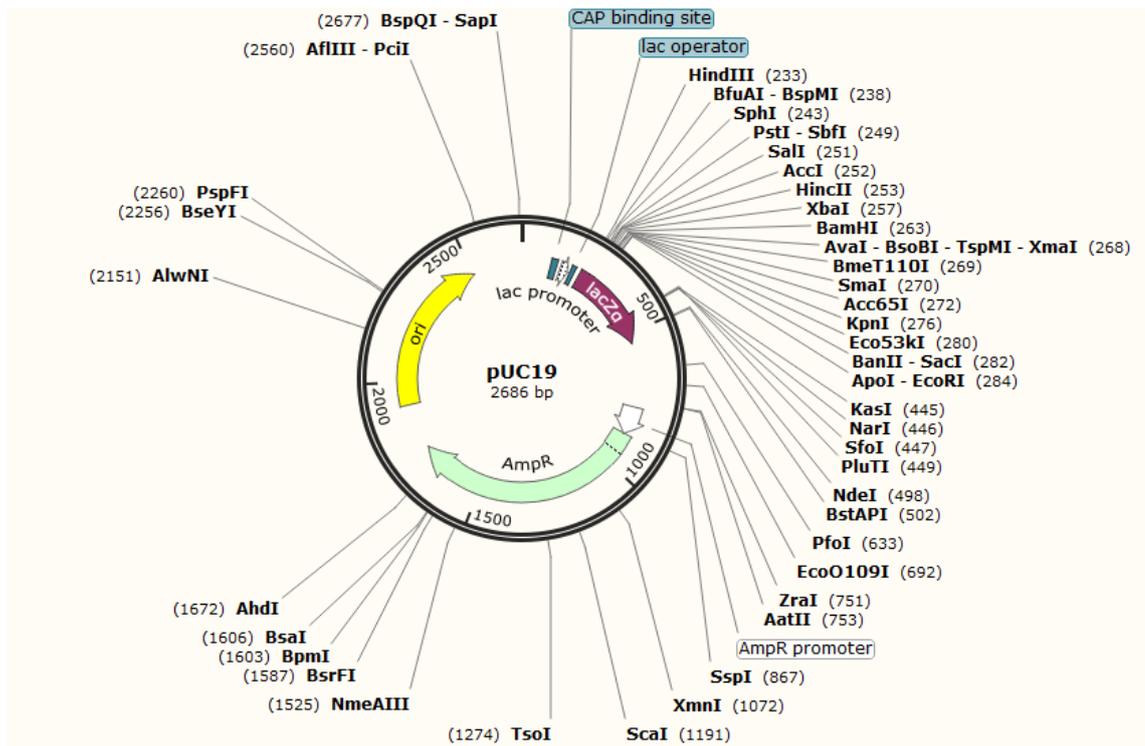


Figura 7 - Estrutura do plasmídeo pUC19

O plasmídeo pBBR1 MCS2 (KOVACH et al., 1995) foi utilizado como vetor de clonagem e expressão dos genes *thrB* e *rhtC* (Figura 8).

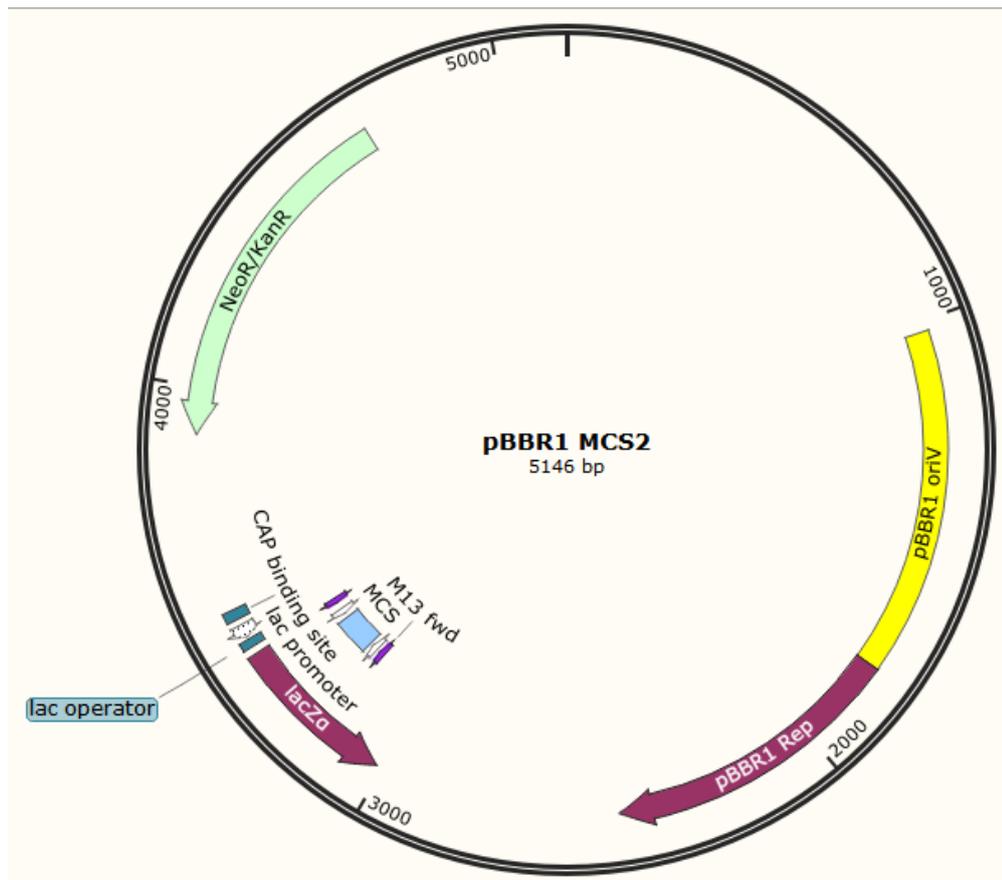


Figura 8 - Estrutura do plasmídeo PBBR1 MCS2

4.4 Oligonucleotídeos iniciadores

O desenho dos plasmídeos e *primers* utilizados para a modificação genética bacteriana foram desenhados empregando-se o *software* SnapGene®. As sequências do genoma de *Escherichia coli* K12 MG1655 disponíveis no GenBank (National Center for Biotechnology Information) foram utilizadas como base. Também foram utilizadas as ferramentas online *OligoAnalyzer* e *NEB Tm calculator*.

Em todas as sequências de genes que seriam expressas na célula bacteriana foi adicionado um promotor sintético, pJ23100 (Registry of Standard Biological Parts - IGEM)(MARKAKIS; DE LAS HERAS; ELFICK, 2016), seguido de uma região 5' não traduzida desenhada pelo *software* *UTR designer* (SEO, 2013) contendo RBS idêntica à subunidade 16s do ribossomo da *E. coli* de interesse (Figura 9).



Figura 9 – Primer forward utilizado para PCR do operon *thrABC*

O *primer* para a construção dos genes *thrB*, *rhtC* e *rhtA* também apresenta a sequência para o promotor *pj23100* e uma região de RBS própria desenhada com a ferramenta UTR Designer. A Tabela 3 apresenta as sequências dos *primers* utilizados:

Tabela 3 - Detalhamento dos *primers*: nome, sequências e finalidade

Nome	Sequência*	Finalidade
thrABCforward	GCTCTAGATTGACGGCTAGCTCAGTCCTA GGTACAGTGCTAGCTAGCTCTTAAGGAGG ATTCCATGCGAGTGTGAAGTTCGGCGGT	Iniciador a montante do operon <i>thrABC</i> para clonagem no pBBR
thrABCreverse	GCTCTAGACGGGCTGCATAAAAGCAAAC	Iniciador a jusante do operon <i>thrABC</i> para clonagem no pBBR
thrBforward	GACTAGTGTGACGGCTAGCTCAGTCCTA GGTACAGTGCTAGCGGATCGAAAATAAGG AGGTTTTTGTATGGTTAAAGTTTATGCCCC GGCTT	Iniciador a montante do gene <i>thrB</i> para clonagem no pBBR
thrBreverse	GCTCTAGACTTTCAGATTGTAGAGTTTCAT TTAG	Iniciador a jusante do gene <i>thrB</i> para clonagem no pBBR
rhtCforward	GACTAGTTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAG GTACAGTGCTAGCATTGTTATTAAGGA GGTTTACAATGTTGATGTTATTTCTCACCG TCG	Iniciador a montante do gene <i>rhtC</i> para clonagem no pBBR
rhtCreverse	GCTCTAGAGACGCGTCTGGCATCACCGC GAAAT	Iniciador a jusante do gene <i>rhtC</i> para clonagem no pBBR

4.5 Deleção dos genes pela metodologia de Datsenko & Wanner

Uma técnica de nocaute foi desenvolvida por Wanner & Datsenko (DATSENKO; WANNER, 2000). Esse procedimento envolve o uso de um sistema de recombinação FLP-FRT. A enzima *flippase recombinase* (FLP) reconhece um par de

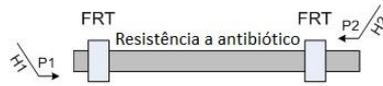
sequências de FLP *recombinase target* (FRT) que se unem eliminando uma região genômica de interesse.

Primeiramente, um gene de resistência a um determinado antibiótico é amplificado por PCR, contendo sítios FRT e regiões homólogas ao gene a ser inativado (Figura 10).

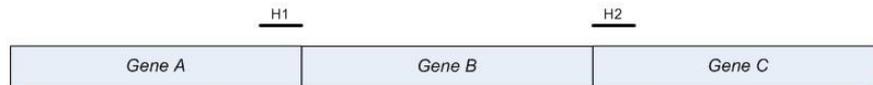
A recombinação requer a enzima recombinase do fago λ -Red, que é sintetizada sob o controle de um promotor induzível por arabinose no plasmídeo pKD46. O plasmídeo pKD46 apresenta genes de resistência à ampicilina e não se replica a temperaturas acima de 30° C.

A seleção dos mutantes é feita por meio da seleção pela resistência ao antibiótico adquirida durante recombinação. A remoção da resistência é feita utilizando-se o sistema FLP-FRT. O plasmídeo pCP20 contém um gene para a codificação da enzima FLP recombinase e é inserido no micro-organismo após a remoção do plasmídeo pKD46 (Figura 11).

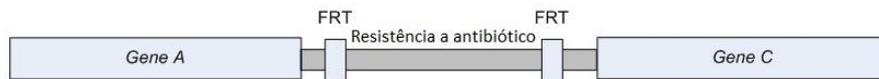
1. Amplificação do gene de resistência a antibiótico



2. Transformação em linhagem expressando a recombinase λ Red



3. Seleção de transformantes resistentes ao antibiótico



4. Eliminação do gene de resistência expressando a enzima FLP.

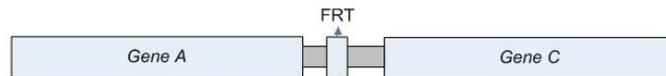


Figura 10 - Mecanismo de deleção Datsenko & Wanner

Fonte: (DATSENKO; WANNER, 2000)

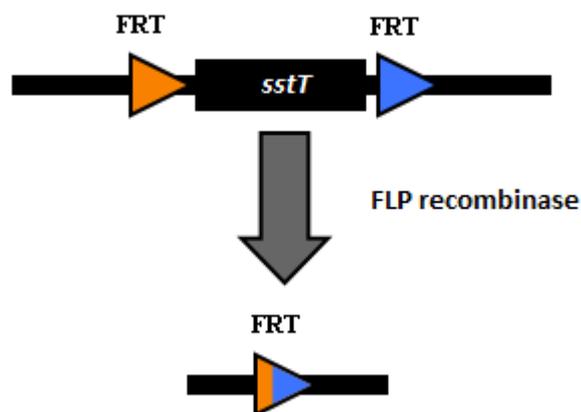


Figura 11 - Eliminação de gene *sstT* por meio do sistema de recombinação FLP-FRT

A recombinação requer a enzima recombinase do fago λ -Red, que é sintetizada sob o controle de um promotor induzível por arabinose no plasmídeo pKD46. O plasmídeo pKD46 apresenta genes de resistência à ampicilina e não se replica a temperaturas acima de 30° C devido a características de sua origem de replicação oriR101 (Tabela 3).

O plasmídeo pKD46 proporciona resistência ao antibiótico ampicilina (gene da enzima beta-lactamase) e codifica os genes do fago λ -Red (gama, beta e exonucleases) que produzem enzimas recombinases, auxiliando no processo de recombinação do DNA, controlados por um promotor induzível por arabinose (P_{araB}).

O segundo plasmídeo utilizado no protocolo é o pCP20 (Tabela 2). Esse plasmídeo também apresenta uma origem de replicação (pSC101 ori) termossensível e o gene para a produção da enzima *flipase* (FLP). O protocolo para a deleção de genes é resumido a seguir:

- 1) Inicialmente, a bactéria *E.coli* contendo o plasmídeo pKD46 foi cultivada em um frasco do tipo *Erlenmeyer* (*erlen*) de 125 mL contendo 25 mL de meio LB (Luria Bertani) e 25 μ L de ampicilina.
- 2) O frasco foi cultivado sob agitação de 180 rpm e 30 °C. No momento que o cultivo atingiu uma DO de aproximadamente 0,1, adicionou-se 250 μ L de solução de arabinose com o objetivo de induzir a expressão dos genes do fago λ -Red, para que haja uma maior disponibilidade de enzimas recombinases nas células. O frasco foi posicionado novamente sob agitação até que se atingisse uma DO de 0,5.
- 3) Em seguida, a solução de cultivo foi centrifugada a 6000 rpm por 8 minutos e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em uma solução estéril 10% de glicerol e água. Essa última operação foi repetida por mais duas vezes.
- 4) 100 μ L da solução de glicerol contendo as células bacterianas foi adicionado a uma cubeta de eletroporação estéril, juntamente com 6 μ L de uma solução contendo o cassete de deleção de cada gene. O choque foi dado por um aparelho de eletroporação.

- 5) Após a eletroporação, a solução foi transferida a um frasco Eppendorf® contendo 1 mL de meio LB e arabinose (para ajudar na recombinação). O frasco Eppendorf® foi posicionado sob agitação a 180 rpm e 30° C por 1 hora e 30 minutos. O seu conteúdo foi inoculado em uma placa de meio LB contendo os antibióticos canamicina e ampicilina. As placas foram posicionadas para crescimento *overnight* a 30° C.
- 6) Uma linhagem com o gene deletado foi cultivada por 24 horas em um *erlen* contendo meio LB com canamicina, a 180 rpm de agitação e temperatura de 37°C. Nessa temperatura, o plasmídeo pKD46 não se replica e espera-se que a linhagem o perca. A confirmação foi feita por meio de uma seleção negativa, cultivando-se a linhagem resultante em duas placas de meio LB, uma contendo o antibiótico ampicilina e outra o antibiótico canamicina. Espera-se que a linhagem não cresça na placa com ampicilina.
- 7) Com o plasmídeo pKD46 removido, o plasmídeo pCP20 foi transformado nas células por meio de choque térmico. A linhagem com o plasmídeo foi cultivada por 24 horas em um *erlen* contendo meio LB e ampicilina, a 180 rpm de agitação e temperatura de 30°C. Após esse período foi feito um repique da linhagem para um novo *erlen* com meio LB, sob as mesmas condições de cultivo. A confirmação também foi feita por seleção negativa, cultivando-se uma mesma colônia em duas placas de meio LB, uma contendo o antibiótico ampicilina e outra o antibiótico canamicina. Selecionou-se as colônias que cresceram em ampicilina, mas não em canamicina. A remoção do plasmídeo pCP20 foi feita da mesma forma que a do pKD46.

4.6 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*)

Foram feitas PCRs com os propósitos de: (1) gerar cassetes de deleção pelo método de Datsenko e Wanner (2000); (2) confirmar tamanhos de fragmentos de DNA específicos; (3) clonar os genes *rhtC* e *thrB* no plasmídeo pBBR. Para gerar os cassetes de deleção, fazer clonagem dos genes *rhtC*, *thrB*, o operon *thrABC* e amplificar regiões do plasmídeo com os guias, foi utilizada a enzima Q5 (New England Biolabs, Massachusetts, EUA) enquanto que para PCRs de rotina para

confirmar tamanhos de regiões do DNA foi utilizado o kit PCR Quick-Load® Taq 2x Master Mix (New England Biolabs, Massachusetts, EUA).

As reações com o kit Quick-Load® Taq 2x Master Mix foram montadas conforme a Tabela 4.

Tabela 4 - Volumes dos reagentes do kit Quick-Load Taq

Reativos	Volume (µL)
Água livre de Nuclease	8
Iniciador forward (10 µM)	0,5
Iniciador reverse (10 µM)	0,5
Solução Master Mix* (2x)	10
DNA molde (100 ng/µL)	1

As reações com a enzima Q5 DNA polimerase foram realizadas conforme a Tabela 5.

Tabela 5 – Volume dos reagentes com a enzima Q5 DNA polimerase

Reativos	Volume (µL)
Q5 buffer (5x)	10
Q5 enhancer (5x)	10
DMSO (100%)	1
Água livre de Nuclease	21,5
Mix dNTPs (solução com 10 mM de cada dNTP)	2
Iniciador <i>forward</i> (10 µM)	2
Iniciador <i>reverse</i> (10 µM)	2
DNA molde (200 ng/µL)	1
Enzima Q5 (2 U/ µL)	0,5

As PCRs para as amplificações de genes para clonagem e construção dos cassetes de deleção foram realizadas conforme a Tabela 6.

Tabela 6 - Condições no termociclador com enzima de alta fidelidade

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	98 °C	30 s	1
Desnaturação	98 °C	10 s	
Hibridização	-	30 s	30
Extensão	72 °C	-	
Extensão final	72 °C	5 min	1

A temperatura de hibridização variou entre 50 e 56°C, conforme calculado com a ferramenta *NEB Tm calculator* para cada iniciador utilizado, e o tempo de extensão também variou dependendo do tamanho do produto a ser formado. O cálculo utilizado foi de 30 segundos a cada 1000 pares de bases do produto desejado.

As PCRs para confirmação utilizando o kit Quick-Load® Taq 2x Master Mix seguiram de acordo com passos mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Condições de PCR Quick-Load® Taq 2x Master Mix

Passos	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação Inicial	94 °C	30 s	1
Desnaturação	94 °C	30 s	
Hibridização	-	20 s	35
Extensão	68 °C	-	
Extensão final	68 °C	3 min	1

A temperatura de hibridização variou entre 50 e 56°C conforme calculado com a ferramenta *NEB Tm calculator* para cada iniciador utilizado, e o tempo de extensão também variou dependendo do tamanho do produto a ser formado. O cálculo utilizado foi de 60 segundos a cada 1000 pares de bases do produto desejado.

4.7 Purificação de DNA e Gel

As reações de PCR foram verificadas por meio da aplicação em gel de agarose 1% feito com tampão de corrida Tris-Ácido acético-EDTA (TAE) contendo o corante SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies – Invitrogen, Califórnia, EUA). Foram aplicados também os marcadores de peso molecular Gene ruler 1 kb plus DNA ladder e Gene ruler 1kb DNA ladder (Fermentas – Life Technologies, Califórnia, EUA). A corrida em gel de agarose foi realizada sob a diferença de potencial de 90 - 100 Volts durante aproximadamente 40 - 50 min. O gel foi então exposto à luz UV (253 nm) e uma imagem capturada para registro.

Antes de realizar a etapa de purificação do produto de PCR, era feita uma corrida em gel de agarose utilizando-se cerca de 1 ou 2 microlitros deste produto. Caso a banda correspondente ao produto apresentasse o tamanho esperado e não fosse possível detectar bandas inespecíficas a olho nu, o produto de PCR era purificado diretamente. Em situações de detecção de bandas inespecíficas, era realizada uma nova corrida em gel utilizando-se toda a amostra obtida no PCR. A banda com o tamanho correto era então purificada a partir do gel.

Os produtos de PCR e bandas de DNA em gel de agarose foram purificados com o kit Wizard[®] SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, Madison, EUA). Todas as amostras de DNA purificadas deste trabalho foram eluídas em água e, quando necessário, foram quantificadas utilizando-se o equipamento NanoDrop[™] One/One^C Microvolume Cv-Vis Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc, Massachusetts, EUA).

Em experimentos cujo objetivo era apenas verificar se uma mutação ou deleção havia ocorrido de modo desejado, uma colônia da bactéria era diluída em cerca de

10 μL de água livre de nuclease utilizando-se um microtubo de 200 μL . A suspensão de células era aquecida a 98°C durante 5 min, centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos, e o sobrenadante era utilizado como a solução que continha o DNA a ser utilizado como molde para a reação de PCR. Para a extração do DNA total da bactéria, foi utilizado o kit de extração QIAmp DNA Kits (QIAGEN, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para a extração de DNA plasmidial foi utilizado o kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Winsconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Clonagem e Seleção de Mutantes

O *operon thrABC* foi clonado utilizando iniciadores próprios para esse fim, com a enzima Q5 (New England Biolabs, Massachusetts, EUA). Na ponta dos iniciadores havia um sítio de restrição para a enzima *xbaI*. Em seguida, o plasmídeo pUC19 e o trecho de DNA obtidos (*thrABC*) foram digeridos com a enzima *xbaI* (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), da forma como descrito na Tabela 8. Uma vez a reação pronta, esta era incubada a 37°C por 20 min.

Tabela 8 - Volumes empregados na reação de digestão com a enzima *xbaI*

Reativos	Volume (μL)
CutSmart Buffer (10x)	2
DNA a ser digerido	Volume para 1 μg
Enzima de Restrição (<i>xbaI</i>)	1
Água livre de Nuclease	q.s.p. 20 μL

A mistura de cada uma das digestões, depois de prontas, foi aplicada em gel de agarose e teve a banda purificada. Com os DNAs digeridos e purificados, foi realizada a ligação com a enzima T4 DNA ligase (Thermo Fisher Scientific Inc., California, EUA). As condições da ligação estão na Tabela 9. A mistura era mantida *overnight* a 16 °C em um termociclador.

Tabela 9 - Volumes empregados na reação de ligação com a enzima T4 DNA ligase

Reativos	Volume (μL)
T4 ligase buffer (10x)	2
Vetor	Volume para 100 ng
Inserto	Volume para 300 ng
T4 DNA ligase	1
Água livre de Nuclease	q.s.p. 20 μL

Após a ligação, o plasmídeo foi transferido por eletroporação em uma *E. coli* DH5 α .

4.9 Meios de cultura

Os cultivos das diferentes linhagens foram realizados em meios líquido e sólido a 30 ou 37 °C, contendo antibióticos quando necessário nas seguintes concentrações: Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A Canamicina foi utilizada em cultivos de linhagens que continham o plasmídeo pBBR e seus derivados, enquanto a Ampicilina em cultivos de linhagens contendo o plasmídeo pUC19 e seus derivados.

Luria Bertani (LB): Triptona a 10 g/L, Extrato de Levedura a 5 g/L e NaCl a 5 g/L. Para o meio sólido acrescentou-se ágar a uma concentração final de 20 g/L.

Meio Huang (Huang, 2017) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, KH_2PO_4 1,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 8 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,005 g/L, Extrato de Levedura 2 g/L, Lisina 0,1 g/L e Glicose 10 g/L. Nos cultivos de linhagens provenientes de *E. coli* W, a glicose foi substituída por sacarose na mesma concentração.

A solução de alimentação de glicose para o biorreator foi preparada com concentração de 500 g/L. A solução de alimentação contendo os sais e a lisina teve a seguinte composição: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 24 g/L, KH_2PO_4 12,5 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 16 g/L, extrato de levedura 1 g/L e Lisina 4,5 g/L.

4.10 Ensaios de Produção

4.10.1 Preparo do inóculo

A preservação das linhagens que seriam utilizadas posteriormente em ensaios de cultivo foi realizada do seguinte modo: uma colônia era isolada de uma placa e inoculada em 25 mL de meio LB com Canamicina, a 30 °C e 180 rpm no agitador rotativo. Após 12 horas, separou-se alíquotas de 1 mL do cultivo que foram misturadas com 1 mL de uma solução aquosa de glicerol 20% (v/v) em um tubo de 2 mL. As linhagens foram armazenadas em um congelador que opera na temperatura de -80°C.

Para o preparo do inóculo, a linhagem a ser cultivada foi descongelada e parte dessa suspensão de células transferida para frascos *erlenmeyers* com meio LB com Canamicina. Os frascos foram incubados durante 12 h em agitador rotativo a 180 rpm e temperatura de 30 °C.

4.10.2 Cultivos em agitador rotativo

Foram feitos ensaios de produção em agitador rotativo com as seguintes linhagens: (1) *E. coli* ATC9637 selvagem; (2) *E. coli* ATCC9637 $\Delta metJ$; (3) *E. coli* ATCC9637 $\Delta sstT$; (4) *E. coli* ATCC9637 $\Delta metJ \Delta sstT$; (5) *E. coli* ATCC9637 $\Delta metJ \Delta tdcC$; (6) *E. coli* ATCC9637 $\Delta metJ \Delta lysA$; (7) *E. coli* MG1655 selvagem; (8) *E. coli* MG1655 $\Delta metJ$; (9) *E. coli* MG1655 $\Delta metJ \Delta lysA$; todos contendo o plasmídeo pBBR-*thrB-rhtC*.

Em frascos *Erlenmeyers* de 125 mL, foram adicionados 25 mL de meio cultivo. Os experimentos foram realizados em agitador rotativo (30 °C ou 37 °C, 180 rpm), e tiveram duração variando entre 24h e 48h. Nestas amostragens foram retirados 1 mL de cultivo que passa por uma centrifugação de 10000 rpm por 10 min, e posteriormente é filtrado por uma membrana de porosidade de 0,22 μm . A amostra é então injetada em um aparelho de HPLC para determinar as concentrações de ácido acético, glicose, frutose e sacarose.

4.10.3 Cultivo em biorreator

Os ensaios em biorreator foram conduzidos em biorreator Biostat B-DCU, marca B.Braun (5 L) e no biorreator Sartorius CPlus (15 L), com aeração, agitação mecânica e controle automático das variáveis: temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Durante a montagem do biorreator, a sonda de pH e de oxigênio (internas) foram calibradas seguindo as orientações do fabricante e o meio de cultura previamente preparado foi adicionado no biorreator.

O primeiro ensaio, realizado no Biostat B-DCU partiu de um volume inicial do cultivo de 2,5 litros de meio. O segundo ensaio, realizado no reator Sartorius CPlus, partiu de um volume inicial de 5 L de meio de cultivo. O pH foi controlado em $7,00 \pm 0,05$ ao longo de todo o experimento, bem como a temperatura a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. A cada duas ou três horas foram retirados aproximadamente 10 mL de cultivo, e a partir desse volume foi determinada a massa seca celular e as concentrações de açúcares e ácido acético. Medidas de porcentagem de oxigênio ($p\text{O}_2$) dissolvido no meio e do pH do meio eram determinados por sondas específicas, enquanto as porcentagens volumétricas de oxigênio e de dióxido de carbono no gás de saída dos reatores eram tomadas por sensores específicos. O $p\text{O}_2$ foi mantido com valor mínimo de 20%, variando-se o nível de agitação e a vazão de ar na entrada do biorreator.

A densidade óptica (D.O.) da suspensão de células bacteriana foi determinada por leitura de absorbância em espectrofotômetro U-2000 (Hitachi Co.) com comprimento de onda de 600 nm. A concentração de biomassa total foi determinada pela massa seca presente nas amostras coletadas. Essas amostras foram filtradas em sistema a vácuo com membrana de éster de celulose com $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de porosidade (*Millipore*) previamente pesada. Uma vez seca a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 horas em estufa, a membrana foi colocada em dessecador por 5 minutos e pesada em balança analítica. Os aminoácidos produzidos pelos microrganismos e presentes em sua forma livre no sobrenadante dos ensaios de biorreator tiveram suas concentrações determinadas por cromatografia gasosa e metodologia comercial Phenomenex EZ:faast™.

4.11 Tratamento de Dados

Os dados obtidos nos experimentos de cultivo em agitador rotativo e biorreator foram tratados conforme equações descritas por (WILLIBALDO SCHMIDELL et al., 2001).

As variações da concentração celular (X), do substrato (S) e do produto (P) foram descritas conforme as Equação 1, Equação 2 e Equação 3.

$$\frac{dX}{dt} = \frac{d(X - X_0)}{d(t - t_0)}$$

Equação 1

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-d(S - S_0)}{d(t - t_0)}$$

Equação 2

$$\frac{dP}{dt} = \frac{d(P - P_0)}{d(t - t_0)}$$

Equação 3

A velocidade específica de crescimento celular μ_x (h^{-1}) foi determinada pela Equação 4

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

Equação 4

O fator de conversão substrato em célula ($Y_{X/S}$) foi calculado como a razão entre a variação da concentração celular (X) pela variação da quantidade do substrato (S) consumido (Equação 5).

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S}$$

Equação 5

Onde,

$Y_{X/S}$... fator de conversão de substrato em célula (g/g)

ΔX ... variação da concentração celular (g)

ΔS ... variação da quantidade de substrato consumido (g)

O fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi calculado como a razão entre a variação da quantidade de produto (P) formado pela variação da quantidade do substrato (S) consumido (Equação 6).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S}$$

Equação 6

Onde,

$Y_{P/S}$... fator de conversão de substrato em produto (g/g)

ΔP ... variação da quantidade de produto treonina (g)

ΔS ... variação da quantidade de substrato consumido (g)

A produtividade do produto (P_P) é definida como a razão entre a variação da concentração do produto pelo tempo de reação, expressa em g/(L.h). Nos processos em que a concentração inicial do produto é nula, a produtividade pode ser expressa pela razão entre a concentração final do produto e o tempo total da reação (Equação 7).

$$P_P = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

Equação 7

Onde,

P_P ... produtividade do produto g/(L.h);

ΔP ... variação da concentração de produto (g/L);

Δt ... variação do tempo (h);

4.12 SuperPro Designer

O *software* SuperPro Designer é um simulador de processos desenvolvido para auxiliar na modelagem, análise de custos, análise de gargalos de processos, redução de tempo dos ciclos dos processos relacionados a produtos bioquímicos, químicos especiais, farmacêuticos, alimentos e outros relacionados.

No projeto de um bioprocessos temos um produto e uma taxa de produção anual desejada. O uso do *software* se mostra como uma ferramenta para a obtenção das respostas às principais questões relacionadas ao bioprocessos (HARRISON et al., 2015):

- Quais são as quantidades necessárias de matérias-primas e equipamentos necessários para um único lote;
- Qual a quantidade total de recursos consumidos por ano pelo bioprocessos;
- Qual o tamanho necessário dos equipamentos do processo;
- Qual é o investimento total de capital;
- Qual o custo de fabricação;
- Quanto tempo é necessário para a produção de um único lote;
- Quanto produto pode ser gerado por ano;
- Quais etapas do processo ou recursos constituem os atuais gargalos do processo;
- Que mudanças podem aumentar a produção anual e redução do custo do produto;
- Qual *design* é o melhor entre várias alternativas possíveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Construção do plasmídeo pUC19-thrABC-rhtA

A construção do plasmídeo pUC19-thrABC-rhtA foi baseada na combinação do *operon thrABC* que contém genes para a produção de treonina e do gene *rhtA* para a exportação extracelular do mesmo aminoácido. A estrutura do plasmídeo encontra-se na Figura 12.

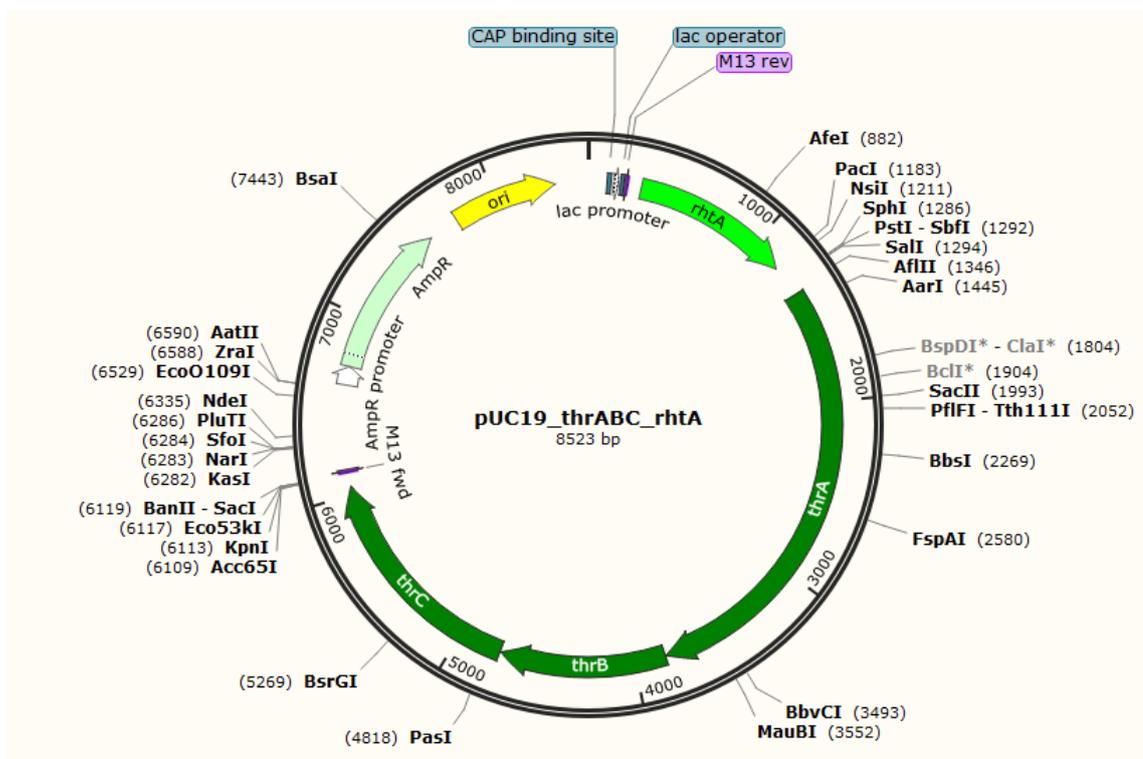


Figura 12 - Plasmídeo clonado contendo os genes *thrABC* e *rhtA*

O fragmento do *operon thrABC* foi amplificado utilizando-se o genoma de *E. coli* MG1655 como molde. O plasmídeo pUC19 e o inserto do gene *thrABC* foram digeridos separadamente com a enzima de restrição *xbaI*. Após uma etapa de digestão de 20 minutos a 37° C, foi feita a ligação entre o plasmídeo com o fragmento por meio da enzima T4-Ligase.

Após a ligação, foi feito o processo de transformação do plasmídeo em células de *E. coli* DH5 α e essas cultivadas em placas para seleção azul-branco. Colônias

brancas foram selecionadas para a extração do plasmídeo e a confirmação da ligação.

Parte da solução contendo o plasmídeo extraído foi digerida com a enzima de restrição *bam*HI e colocado para correr em gel de agarose para verificação (Figura 13).

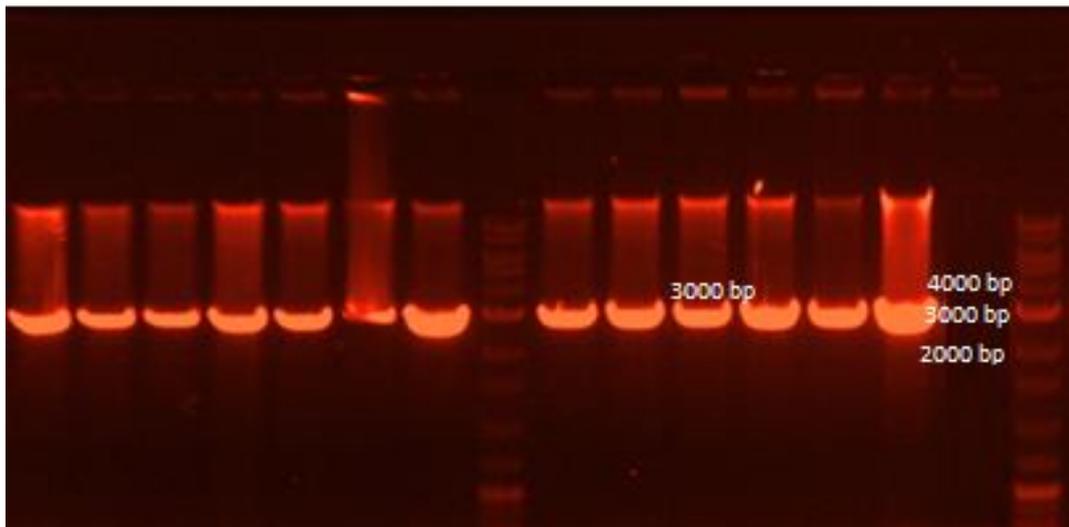


Figura 13 - Extração de plasmídeos de linhagens DH5 α

As bandas de plasmídeo digerido apresentaram tamanho de aproximadamente 2900 bp, que é condizente com o tamanho do plasmídeo pUC19 sem inserto.

Apesar de terem sido selecionadas apenas colônias brancas e estas terem sido inoculadas novamente em outra placa de LB-IPTG-X-gal para confirmação, foram obtidas colônias brancas que não possuíam o plasmídeo recombinante. Isso pode ter ocorrido porque um pequeno fragmento de DNA pode ter se ligado ao *Multiple Cloning Site* (MCS) do vetor e alterado o “*frame*” de transcrição para o gene LacZ α e, assim, impedir sua expressão, dando origem a clones falsos positivos. Além disso, é possível que vetores linearizados possam ter sido transformados nas células competentes, e as extremidades tenham sido “reparadas” e ligadas entre si pela própria maquinaria celular, de modo que nenhum clone LacZ $^{-}$ seja produzido, e

sejam células que não possuem a capacidade de converter X-gal na substância azul. (PADMANABHAN; BANERJEE; MANDI; ZHANG, 2016)

5.2 Construção do plasmídeo pBBR-thrB-rhtC

Como a construção do plasmídeo pUC19-thrABC-rhtA não apresentou bons resultados, foi testada uma alternativa para a construção de um plasmídeo mais simples. Foi feito o plasmídeo pBBR-thrB-rhtC. Ao contrário do plasmídeo anterior, ele apresenta apenas um gene para a produção de treonina, o *thrB*, e o gene *rhtC* para a exportação extracelular do mesmo aminoácido. Com um tamanho de inserto menor, esperava-se que a reação de ligação entre o plasmídeo e o inserto fosse mais favorável que o fechamento do próprio vetor. Além disso, foi utilizado o plasmídeo pBBR em vez do pUC19 por abrigar genes de resistência ao antibiótico canamicina. Ao contrário da ampicilina, a canamicina não é degradada pelo gene de resistência *kanR*, o que impede a formação de colônias satélite (Figura 14).

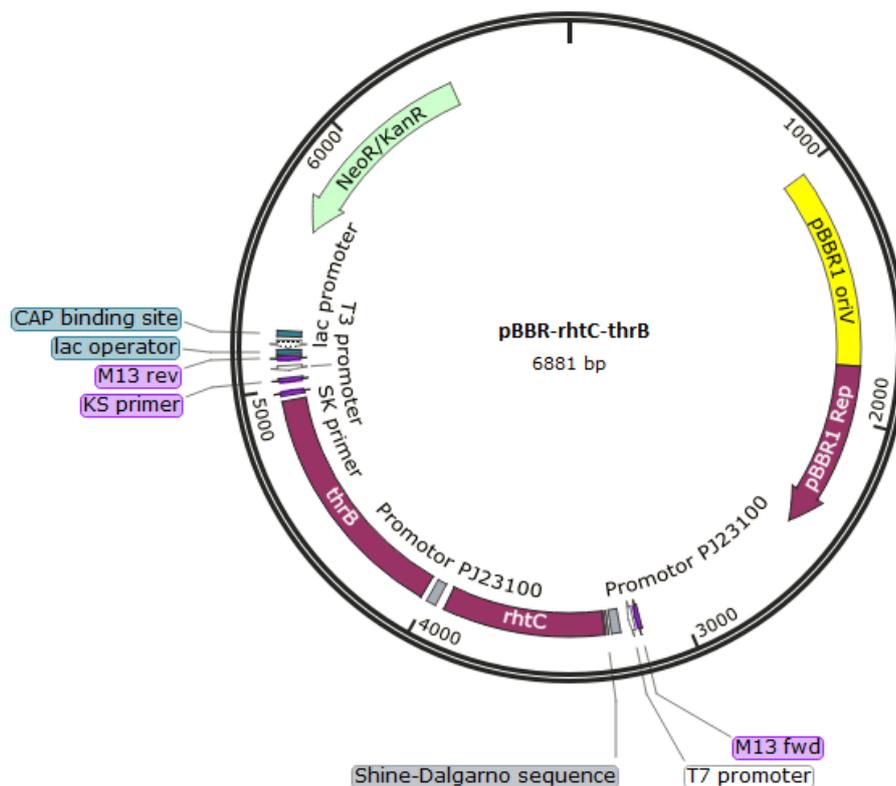


Figura 14 - Estrutura do plasmídeo pBBR contendo os genes *rhtC* e *thrB*

Primeiramente, foi feita uma reação de PCR para amplificar os genes *thrB* e *rhtC* separadamente, utilizando o genoma de *E. coli* MG1655 como molde. Os *primers* para a amplificação dos dois genes foram desenhados de forma que os genes *rhtC* e *thrB* pudessem ser digeridos pela enzima *speI* em sua extremidade *forward* e pela enzima *xbaI* em sua extremidade *reverse*. Após a digestão dos dois genes com as duas enzimas de restrição, foi feita uma reação de ligação dos dois genes com a enzima T4 Ligase por 1h a 37°C. A partir dessa reação de ligação foi realizada uma nova reação de PCR, utilizando o *primer forward* do gene *rhtC* e o *primer reverse* do gene *thrB*. O objetivo dessa reação foi amplificar os fragmentos de DNA formados pela ligação dos dois genes de interesse, obtendo assim muitas cópias do fragmento a ser inserido no vetor.

A Figura 15 mostra o resultado da reação de PCR para a amplificação do inserto. Uma banda de brilho mais intenso foi observada entre os marcadores de tamanho 1500 bp e 2000 bp. O inserto *rhtCthrB* apresenta tamanho de 1740 bp.

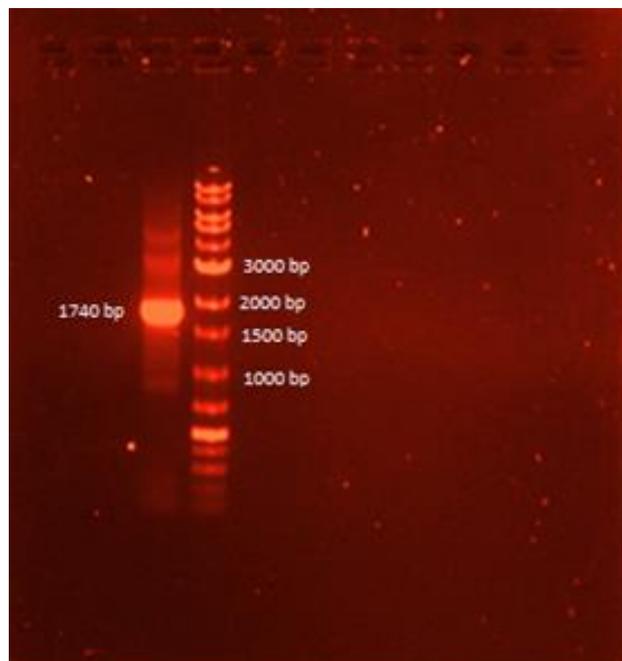


Figura 15 - Reação de PCR para amplificação do inserto

Com o inserto purificado, ele foi novamente digerido com as enzimas *xbaI* e *speI* e ligado ao plasmídeo pBBR digerido apenas com a enzima *xbaI*. Após a ligação, foi feito o processo de transformação do plasmídeo em células de *E. coli* DH5 α , e estas

cultivadas em placas para seleção azul-branco com o antibiótico canamicina. Três colônias brancas foram selecionadas para extração do plasmídeo. Após a extração, a confirmação foi feita por meio de uma reação de PCR. Utilizando-se os *primers* *rhtC_fw* e *thrB_rv*, esperava-se que a reação produzisse um fragmento de DNA do mesmo tamanho do inserto (1700 bp). A Figura 16 mostra a banda resultante de PCR que indica o fato de que apenas duas colônias brancas possuíam de fato o plasmídeo recombinante.

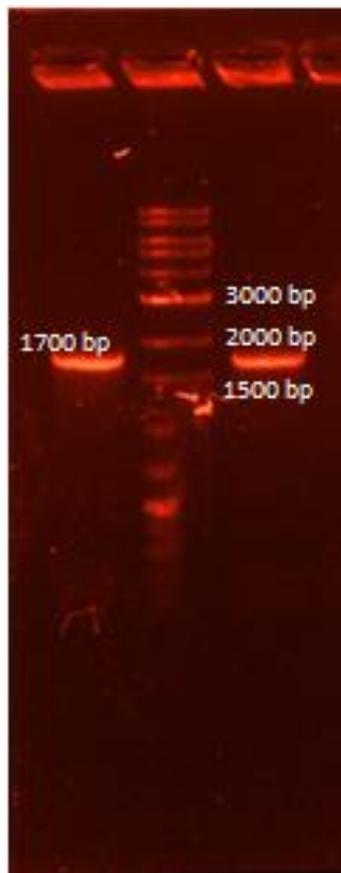


Figura 16 - Reação de PCR para confirmação de clonagem no plasmídeo pBBR

Com a finalização da construção do plasmídeo recombinante, foi possível inseri-lo em diferentes linhagens bacterianas para o teste de produção de treonina, como será apresentado nas próximas seções.

5.3 Nocaute dos genes em *Escherichia coli*

5.3.1 Nocaute dos genes *sstT* e *tdcC*

Para o nocaute dos genes *sstT* e *tdcC* foi utilizada a metodologia descrita por Datsenko & Wanner (DATSENKO K.A., 2000). Os resultados apresentados nesta seção comprovam a remoção dos genes do cromossomo bacteriano.

A confirmação da substituição dos genes de recaptura de treonina pelo gene *kanR* foi feita por uma reação de PCR. Foi utilizada uma combinação de *primers* na qual um se ligava em uma região do cromossomo bacteriano e o outro no gene *kanR*. Desse modo, uma banda de 1291 bp foi observada para a deleção do gene *sstT* e outra de 1473 bp para o gene *tdcC* (Figura 17).

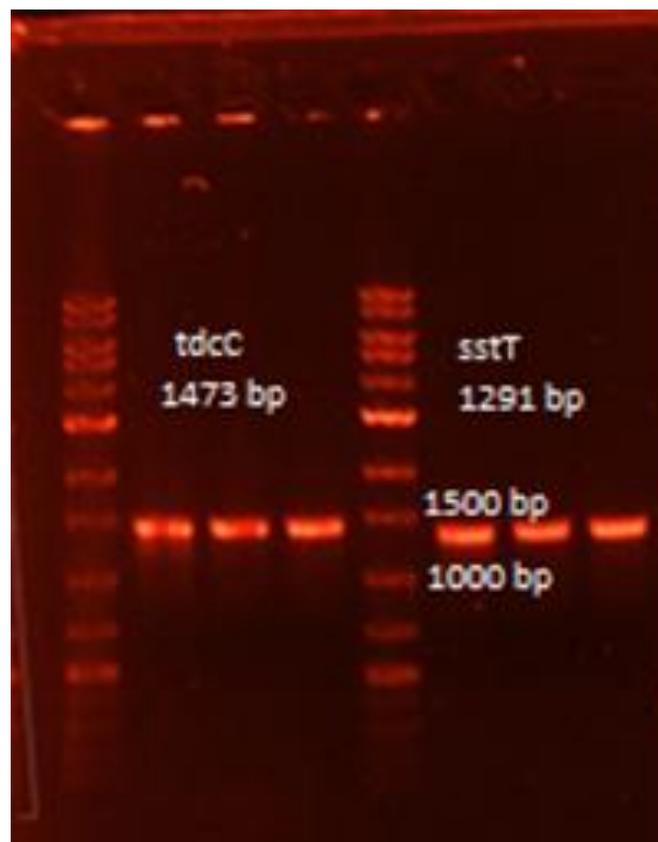


Figura 17 - Confirmação da substituição dos genes *sstT* (esquerda) e *tdcC* (direita) pelo gene *kanR*

Após a confirmação, o plasmídeo pCP20 foi inserido na colônia para que a enzima FLP recombinase removesse o gene *kanR* do cromossomo. A confirmação

foi feita por seleção negativa em duas placas de meio LB sólido, com uma contendo o antibiótico ampicilina e a outra canamicina. As colônias que perderam o gene cresceram na placa com ampicilina, mas não na placa com canamicina. A posterior remoção do plasmídeo pCP20 também foi confirmada por seleção negativa. Uma mesma colônia foi primeiramente semeada em uma placa de Petri contendo apenas meio LB sólido e posteriormente em uma segunda placa contendo meio LB sólido e ampicilina. As colônias que perderam o plasmídeo não cresceram na placa que continha ampicilina (Figura 18).

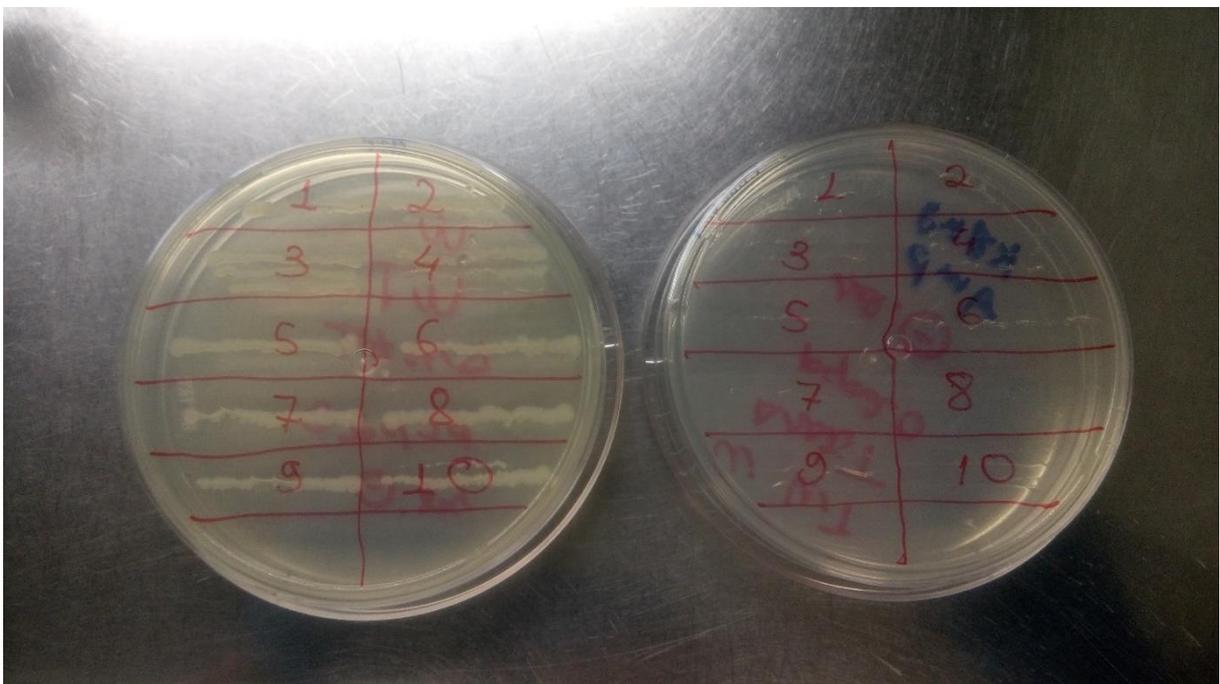


Figura 18 - Placa sem ampicilina (esquerda) e com ampicilina (direita): Seleção negativa

5.4 Linhagens construídas

Com o plasmídeo para a superexpressão dos genes, este foi inserido por eletrotransformação em diferentes linhagens bacterianas de *E. coli*. A descrição de cada linhagem construída encontra-se na Tabela 10.

Tabela 10 - Linhagens construídas para teste de produção de treonina

Número	Receptor	Características cromossomais	Plasmídeo
THR 01	ATCC9637	Selvagem	pBBR-rhtC- thrB
THR 02	ATCC9637	$\Delta sstT$	pBBR-rhtC- thrB
THR 03	ATCC9637	$\Delta metJ$	pBBR-rhtC- thrB
THR 04	ATCC9637	$\Delta metJ \Delta sstT$	pBBR-rhtC- thrB
THR 05	ATCC9637	$\Delta metJ \Delta tdcC$	pBBR-rhtC- thrB
THR 11	MG1655	Selvagem	pBBR-rhtC- thrB
THR 12	MG1655	$\Delta metJ$	pBBR-rhtC- thrB
THR 14	MG1655	$\Delta metJ \Delta lysA$	pBBR-rhtC- thrB

5.5 Teste de produção em *agitador rotativo*

Foi feito um teste de produção em *agitador rotativo* com o objetivo de selecionar uma boa linhagem produtora de treonina para posterior teste de produção em biorreator. As linhagens provenientes de ATCC9637 foram cultivadas em Meio Huang com sacarose como fonte de carbono em vez da glicose, enquanto as linhagens MG1655 foram cultivadas em Meio Huang padrão. A produção foi testada nas temperaturas de 30°C e 37°C a 180 rpm.

As análises de concentração de treonina no meio de cultivo após 48 horas foram feitas para algumas linhagens selecionadas com base em seu genótipo para comparação (Figura 19 , Figura 20 e Tabela 11).

Observa-se também que a produção da linhagem 14 a 30°C e 37°C foi bastante elevada quando comparada com as linhagens provenientes de *E. coli* W (Figura 20).

Tabela 11 - Produção de Treonina por diferentes linhagens a 30 °C e 37 °C

Linhagem	Temperatura (°C)	Produção (mg/L)
THR 01	30	17,62 ± 4,36
THR 01	37	33,22 ± 9,90
THR 02	30	25,13 ± 3,98
THR 02	37	47,09 ± 9,29
THR 03	30	98,64 ± 20,41
THR 03	37	181,82 ± 34,29
THR 04	30	107,02 ± 13,09
THR 04	37	201,17 ± 19,99
THR 05	30	92,92 ± 5,20
THR 05	37	173,59 ± 19,21
THR 11	30	56,46 ± 14,14
THR 11	37	107,07 ± 29,20
THR 12	30	251,84 ± 15,30
THR 12	37	467,81 ± 52,18
THR 14	37	1080,00 ± 23,12
THR 14	37	2057,67 ± 42,85

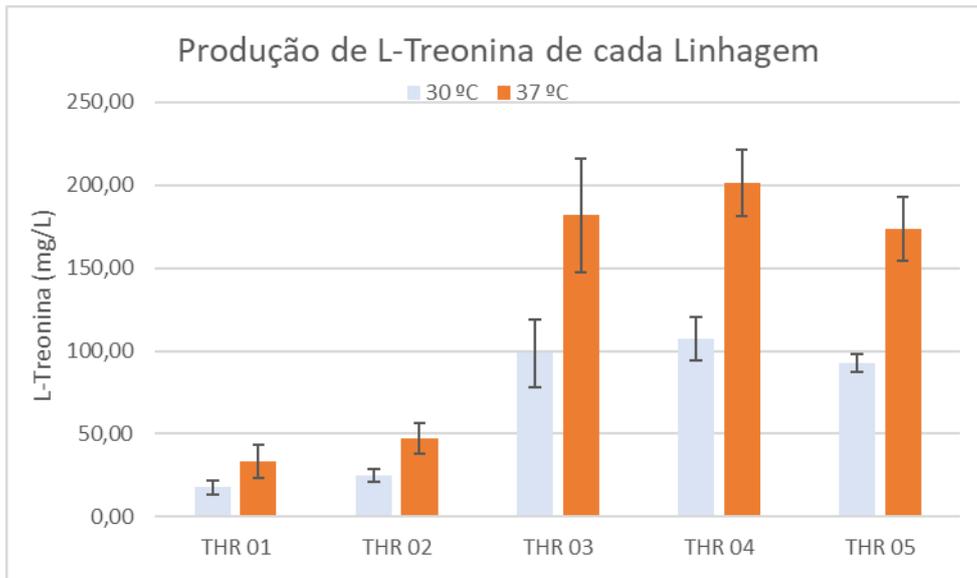


Figura 19 - Produção de L-Treonina de cada linhagem de *E. coli* ATCC9637

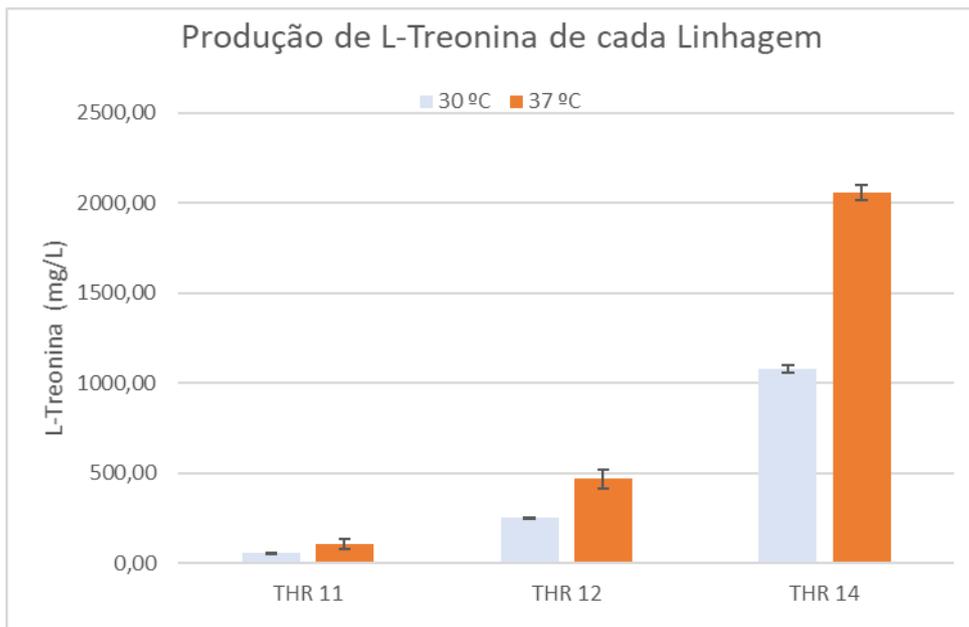


Figura 20 - Produção de L-Treonina de cada Linhagem de *E. coli* MG1655

Um ponto interessante de se observar é que a produção de treonina foi maior em cultivo realizado em temperatura de 37 °C quando comparada ao cultivo em 30 °C. A busca em literatura sobre a influência da temperatura sobre a produção de treonina em linhagens recombinantes de *E. coli* mostrou resultados controversos.

Um estudo realizado por (HIRAKAWA; WATANABE, 1974) apresentou os efeitos da temperatura na formação de uma das enzimas biossintéticas de L-treonina, a AK I. O estudo concluiu que a enzima aspartoquinase apresentou nível de atividade 20% superior em cultivo realizado a 37 °C quando comparado ao cultivo realizado a 28 °C. Por outro lado, (SHIMIZU et al., 1995) cultivou duas linhagens de *E. coli* recombinantes para a produção de L-Treonina em temperaturas entre 28° e 40 °C. Os resultados indicaram que embora o crescimento de ambas as linhagens se manteve essencialmente inalterado ao longo da faixa temperatura testada, as maiores produções foram observadas na temperatura de 31,5 °C. Conforme a temperatura foi aumentada, a produção sofreu decréscimos proporcionais.

Esta aparente contradição de resultados de diferentes trabalhos da literatura pode indicar que não existe uma correlação padrão entre a temperatura de cultivo e a produção de L-treonina por *E. coli* recombinante, pelo fato de que cada linhagem apresenta modificações, e conseqüentemente alterações de metabolismo únicas, o que dificulta a busca por uma explicação para o fato de que a linhagem THR14 ter apresentado uma produção muito maior em cultivo a 37 °C do que em 30 °C.

As linhagens THR 01 e THR 03 apresentam como única diferença genética, o nocaute do gene *metJ* na linhagem THR 03. O mesmo pode ser dito para as linhagens THR 11 (selvagem) e THR 12 ($\Delta metJ$). Comparando-se os resultados de produção do par de linhagens THR 01 e THR 03, é possível observar o efeito do nocaute do gene *metJ* sobre a produção de treonina. A concentração final de treonina no cultivo da linhagem THR 03 foi aproximadamente 5,5 vezes superior à concentração da linhagem THR 01. A produção final da linhagem THR 12 foi aproximadamente 4,5 vezes superior à produção da linhagem THR 11. O gene *metJ* é responsável pela síntese de um composto inibidor transcricional do gene *metL*, e o seu nocaute pode ter aumentado o fluxo de carbono pela via de síntese da treonina, uma vez que o gene *metL* é responsável pela conversão de aspartato em aspartil-fosfato e pela conversão do aspartato semialdeído em homoserina. Conforme o esquema apresentado na Figura 3, a homoserina pode ser direcionada para a via de síntese de metionina, pela expressão do gene *metA*, ou para a via de síntese da treonina pela expressão do gene *thrB*. A expressão do gene *thrB* combinada com a

ausência do regulador do gene *metJ* pode ter favorecido a produção do aminoácido treonina.

O nocaute dos genes *sstT* e *tdcC* não apresentou um aumento significativo na concentração final de treonina produzida, ao se comparar os resultados de produção das linhagens THR 03, THR 04 e THR 05. Embora os dados experimentais obtidos possam levar à conclusão de que o nocaute desses genes não proporciona o aumento da concentração da treonina extracelular, trabalhos na literatura apresentam aumentos significativos da produção de treonina com essas modificações (LEE et al., 2007).

A produção da linhagem THR 14 foi aproximadamente 4 vezes superior à produção da linhagem THR 12, sendo o nocaute do gene *lysA* na linhagem THR 14 a única diferença genética entre as duas linhagens. O nocaute do gene pode ter favorecido a produção de treonina por eliminar a produção do aminoácido lisina, que também é sintetizado a partir do aspartato. Portanto, menos carbono é direcionado para a síntese de lisina. A lisina atua como um inibidor transcricional do gene *lysC* e um inibidor alostérico da enzima aspartato quinase III (Figura 3), portanto a ausência de lisina no interior da célula pode contribuir para desinibir a reação de conversão do aspartato em aspartato semialdeído, favorecendo a formação de treonina.

A linhagem 14 foi então selecionada para a realização de um ensaio em biorreator.

5.6 Produção em Biorreator

5.6.1 Cultivo em Biorreator de 5 L

A linhagem 14 é auxotrófica para o aminoácido lisina, em outras palavras, as células são capazes de se reproduzir apenas na presença desse aminoácido no meio, uma vez que ela não é capaz de produzi-lo. Essa característica foi utilizada como uma estratégia para regular o crescimento de células no reator por meio de pulsos de uma solução de lisina e sais. A limitação do crescimento celular tem como objetivo direcionar a maior parte do fluxo de glicose (fonte de carbono) para a produção de treonina e não para a formação de biomassa. Quando as células

consomem a lisina presente no meio, elas são capazes de sintetizar compostos intermediários, enzimas, cofatores e outras moléculas necessárias para o crescimento celular. Na ausência de lisina no meio de cultivo, as células não são capazes de se multiplicar, e na ausência de reações de formação de biomassa, os diversos compostos sintetizados podem ser redirecionados para a síntese de outras moléculas, como a treonina, uma vez que as vias de síntese desse aminoácido se encontram superexpressas.

O ensaio teve duração de 48 horas e as amostras foram coletadas em intervalos de 3 horas (com intervalos maiores para períodos noturnos) (Figura 21)

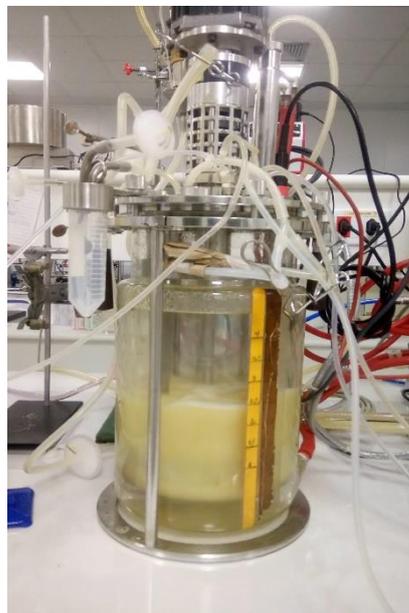


Figura 21 - Ensaio em biorreator para a produção de treonina

As condições de pH (7,0), temperatura (37 °C), agitação mecânica, porcentagem de O₂ dissolvido (30 %) e volume de base adicionada do ensaio foram monitorados com o software BioPAT® MFCS/win, (Figura 22).

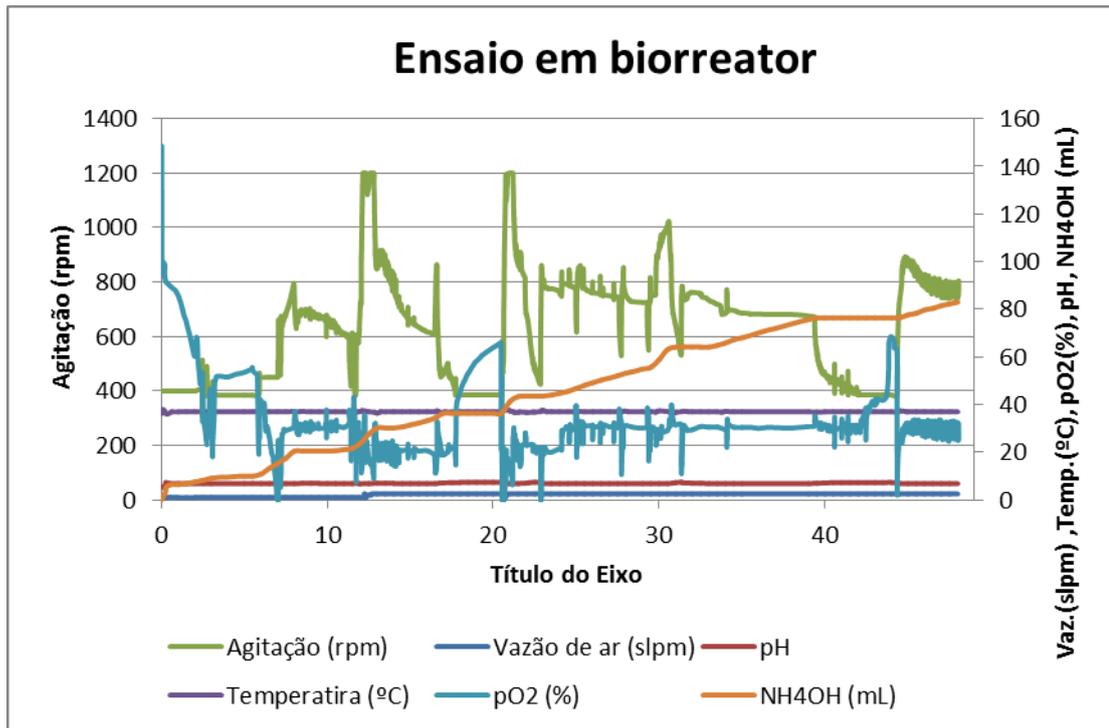


Figura 22 - Monitoramento de variáveis no ensaio em biorreator.

A agitação (0 – 1200 rpm) foi manipulada por um sistema de controle em cascata, que aumentava a agitação de modo a manter a porcentagem de saturação de O₂ dissolvido no reator acima de 30%. Portanto, os instantes em que o valor de agitação sofria uma queda brusca e a porcentagem de saturação de oxigênio passava por uma elevação indicavam o esgotamento de glicose no meio, sinalizando o instante certo para fornecer um novo pulso de glicose ao cultivo.

A diminuição do crescimento celular era indicada pela interrupção do fornecimento de base e conseqüente aumento do pH do meio para valores acima de 7,0.

As curvas de concentração celular, de treonina e de glicose além dos pulsos da solução de sais + lisina e da solução de glicose no decorrer do ensaio são mostrados na Figura 23.

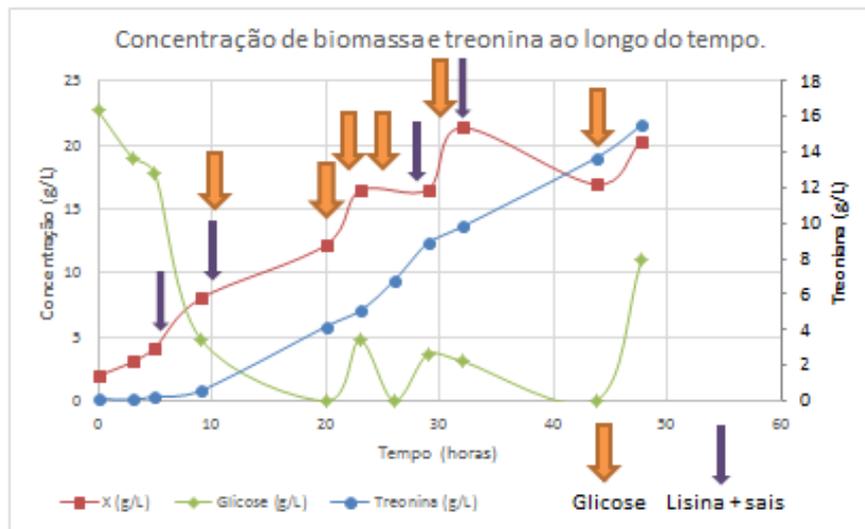


Figura 23 - Variação da concentração de biomassa, treonina e glicose em função do tempo

A velocidade específica de crescimento na primeira fase exponencial do cultivo (de 0 a 9 h) foi de $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$. Entre os instantes de 32 h a 44 h houve um erro experimental no qual um pulso de glicose programado não foi fornecido pelo reator. Isso fez com que o cultivo permanecesse 12 horas sem uma nova fonte de carbono, o que explica o declínio da concentração de biomassa entre esses instantes. Apesar disso, a concentração de treonina não diminuiu e não foi consumida pelas células, como forma de compensar a falta da glicose.

É possível visualizar que antes do esgotamento da glicose, a produção de treonina apresentou uma fase exponencial entre o período de 20 h a 29 h. Entretanto, foi interrompida pela falta de alimentação de açúcar.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa e substrato em produto do ensaio foram de $Y_{X/S} = 0,228 \text{ g/g}$ e $Y_{P/S} = 0,174 \text{ g/g}$ respectivamente, enquanto a produtividade foi de aproximadamente $0,32 \text{ g/(L.h)}$.

Comparando com o resultado obtido por KASE et al., 1971, esses realizaram um cultivo em biorreator onde uma concentração final de treonina de $13,8 \text{ g/L}$ foi atingida, com produtividade de $0,115 \text{ g/(L.h)}$ e fator de conversão $Y_{P/S}$ de $0,25 \text{ g/g}$. Embora o fator de conversão tenha sido menor, obteve-se um valor maior de produtividade. Entretanto, ainda existem condições para melhorias quando comparamos com outros trabalhos. No trabalho de (LEE et al., 2006) foi alcançada

uma produtividade de produto igual a 1,37 g/(L.h) com concentração final de 77,1 g/L de treonina em um processo com duração de 56,1 horas. Isso indica que pode haver condição para aumentar a produtividade do produto em pelo menos 4 vezes em relação ao valor atual.

5.6.1 Cultivo em Biorreator de 15 L

Para o segundo ensaio, realizado no biorreator Sartorius CPlus 15 litros foi utilizado o mesmo meio de cultura, mesma linhagem e mesmas soluções de alimentação do ensaio apresentado anteriormente.

Na Figura 24 encontram-se as curvas de concentração celular, do aminoácido e de glicose, além dos pulsos da solução de sais + lisina indicados pelas setas azuis. A alimentação de açúcar foi feita manualmente de modo a manter a concentração de glicose entre 7 e 15 g/L.

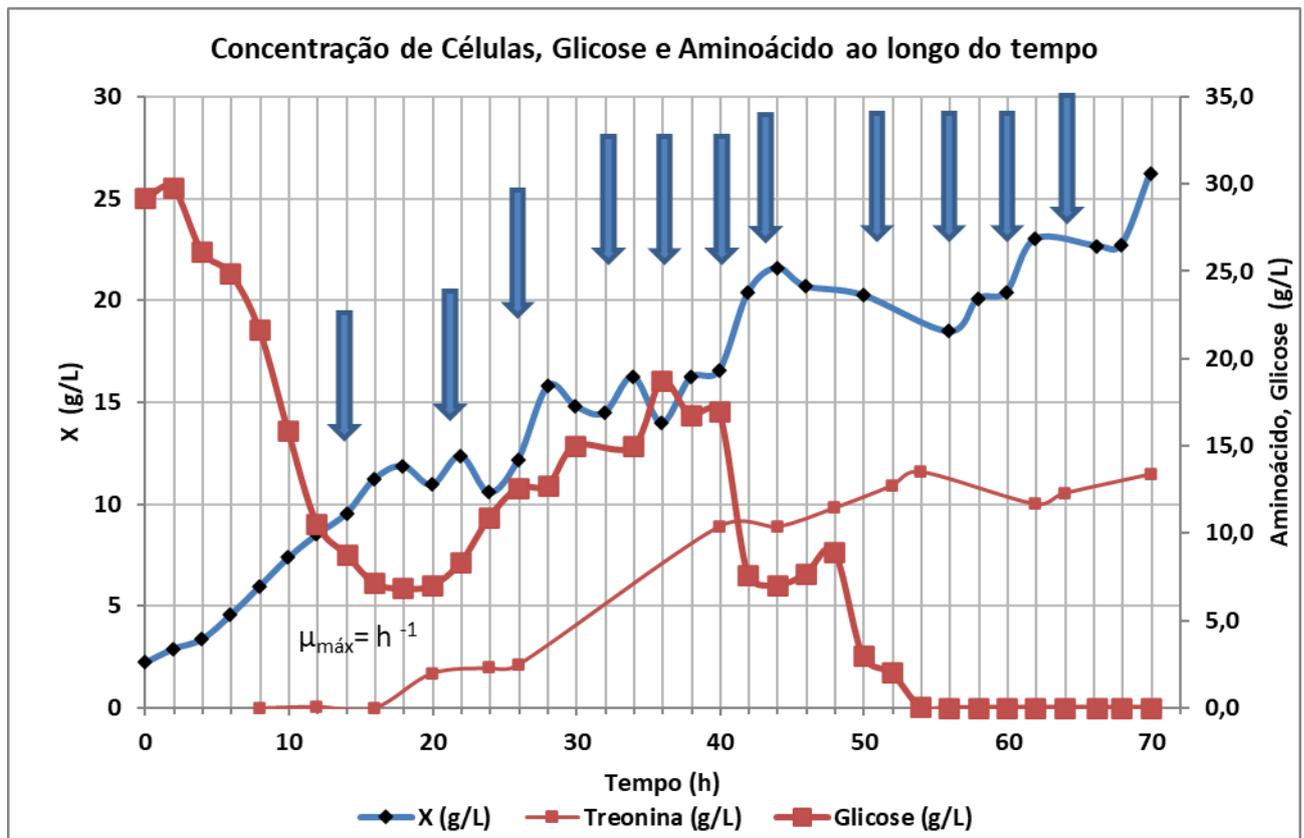


Figura 24 - Variação da concentração celular, de glicose e treonina ao longo do ensaio.

Os períodos em que houve uma queda no valor da concentração celular podem ser atribuídos à diluição do meio de cultura ocasionada pela adição de solução de glicose, além de erros experimentais de medição da massa seca.

A estratégia adotada consistiu em fornecer uma determinada quantidade de lisina para as células, para que o cultivo atingisse uma determinada concentração celular e produção concomitante do aminoácido de interesse. Com o esgotamento da lisina inicial, o aminoácido lisina passou a ser fornecido por meio de pulsos. Na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, o esgotamento da lisina pode ser observado nos instantes em que há uma queda na concentração celular, porque as células param de crescer, mas a alimentação de glicose continua, provocando uma diluição no meio.

Os períodos de crescimento celular ficam mais evidentes quando se analisa a figura da porcentagem volumétrica de CO₂ no gás da saída do reator. Observa-se que após a adição da solução de lisina + sais, a porcentagem volumétrica de CO₂ aumenta devido à maior atividade metabólica das células durante o crescimento. À medida que a lisina no meio se esgota, os níveis de CO₂ diminuem (Figura 25).

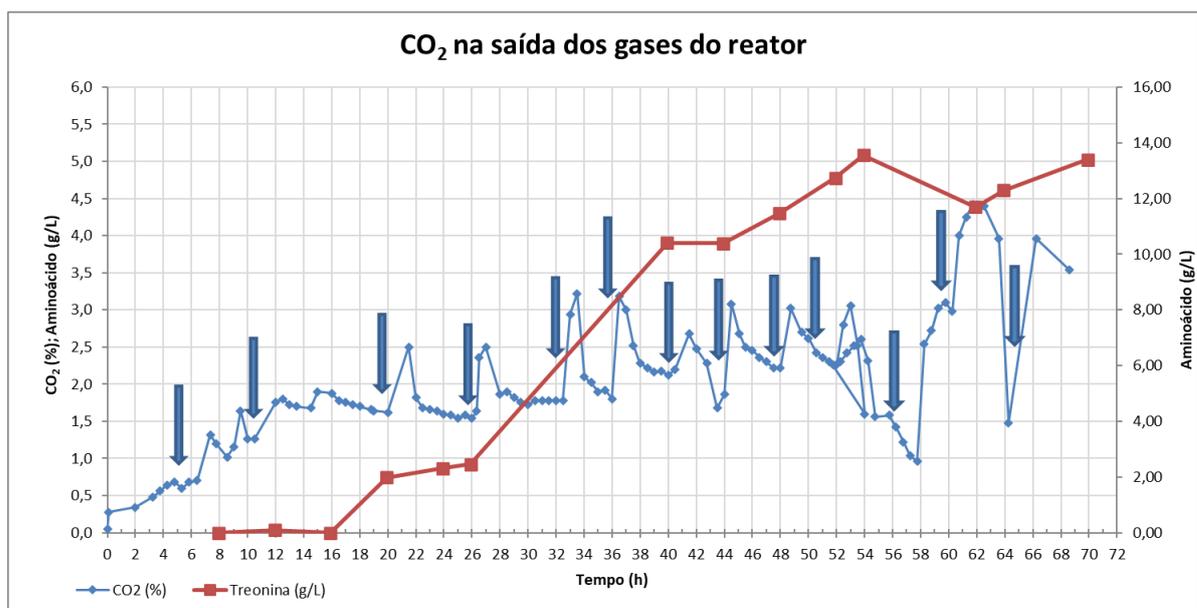


Figura 25 - Variação da fração volumétrica de CO₂ e concentração de treonina ao longo do ensaio.

Na análise da relação entre o crescimento e a produção do aminoácido, observa-se que no intervalo de tempo entre 20 h e 26 h, em que não houve adição de lisina, a produção do aminoácido sofreu uma diminuição em sua velocidade, voltando a aumentar após a adição de lisina. A partir do instante de 40 h ocorre uma desaceleração da produção, que pode ser explicada pela alta concentração de ácido acético no meio (Figura 26).

O ácido acético é um subproduto proveniente de um *overflow* do metabolismo, no qual a célula passa a realizar processos fermentativos em detrimento dos processos de respiração, apesar da disponibilidade de oxigênio. Esse fenômeno ocorre em células que estão passando por um rápido crescimento, com disponibilidade da fonte de carbono.

Para diminuir a concentração do ácido, reduziu-se o bombeamento de glicose para o seu valor mínimo, para que as células consumissem o ácido acético em excesso.

Portanto, a alta concentração de ácido acético e a redução da concentração de glicose no meio podem ter contribuído para a diminuição da taxa de produção do aminoácido nas últimas 30 horas do ensaio.

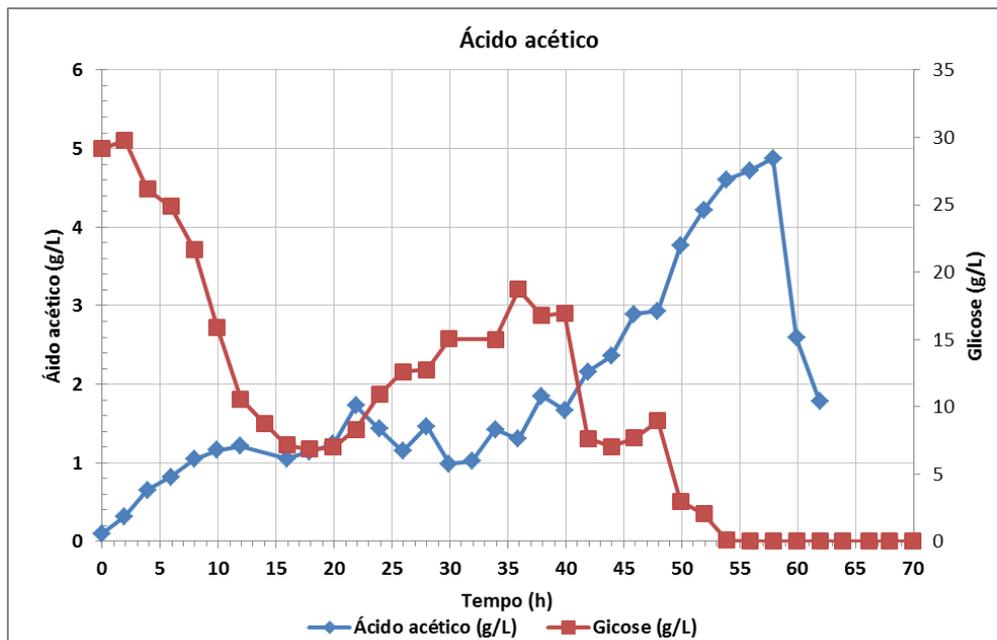


Figura 26 - Concentração de ácido acético e glicose ao longo do ensaio de produção de treonina

Portanto, o ensaio mostrou que é provável que a produção do aminoácido de interesse esteja ligada ao crescimento. Além disso, a produção de ácido acético pela bactéria precisa ser mais bem controlada em futuros ensaios para que seja eliminado o efeito de inibição do crescimento e de formação do produto.

Os fatores de conversão de substrato em biomassa e substrato em produto do ensaio foram de $Y_{X/S} = 0,324$ g/g e $Y_{P/S} = 0,149$ g/g respectivamente, enquanto a produtividade foi de aproximadamente 0,24 g/(L.h).

5.7 Viabilidade econômica do processo de produção de treonina

5.7.1 Fluxograma do processo

Com o objetivo de guiar futuros desenvolvimentos do processo, foi realizada uma análise do custo do produto de acordo com parâmetros obtidos experimentalmente. Para a simulação foi utilizado o fluxograma de processo representado na Figura 27.

O processo é alimentado com uma solução da fonte de carbono (glicose ou sacarose), que inicia por uma etapa de esterilização representada pelo equipamento P1/ST 101 - *Heat Sterilization*. A solução estéril é então armazenada em um tanque de mistura com capacidade de 80 m³ e 90% de volume útil (P-12/V-104 - *Blending Storage*). O conteúdo desse tanque é utilizado para alimentar o reator de inóculo e o reator principal. O reator de inóculo apresenta volume total de 20 m³ e 90% de volume útil (P-4/SFR-101 – *Seed Fermentation*). Nele acontece o crescimento das células por 8h, até que se atinja uma concentração de 10 g/L de células. Este cultivo é então utilizado como inóculo no reator principal. O reator principal apresenta capacidade de 200 m³ e 90% de volume útil (P-3/FR-101 – *Fermentation*). A solução proveniente do reator principal, que contém biomassa e treonina, é então direcionada para um tanque de armazenamento e mistura, com capacidade de 80 m³ e 90% de volume útil (P-2/V-101 – *Blending/Storage*). A partir desse ponto, inicia-se o processo de separação e purificação do produto (*downstream*) e o processo passa a ser conduzido de modo contínuo. O processo de *downstream* inicia-se com uma centrífuga com capacidade de 9.000 m³/h (P-6/DC-101 – *Centrifugation*), onde ocorre a remoção de 100% da biomassa e o sobrenadante contendo o produto é encaminhado para armazenamento em um tanque de mistura de 80 m³ com 90% de volume útil (P-5/V-102 – *Blending/Storage*). A corrente contendo o produto passa por um processo de secagem em um evaporador com capacidade de 8.500 kg/h (P-8/EV-101 – *Evaporation*), onde é removida 90% da água presente na solução. Em seguida, passa por um cristalizador com volume de 40 m³ e 90% de volume útil (P-9/CR-101 - *Crystallization*), onde ocorre a formação de cristais sólidos de treonina. Do cristalizador a corrente contendo o produto é filtrada pelo equipamento P-12/RVF-101 – *Rotary Vacuum Filtration*, e em seguida é conduzida a um secador com capacidade de 70,7 kg/h (P-1/FBDR-101 – *Fluid Bed Drying*), onde 90% da água restante é removida (LEITE; RODRIGUES; PAULO, 2017).

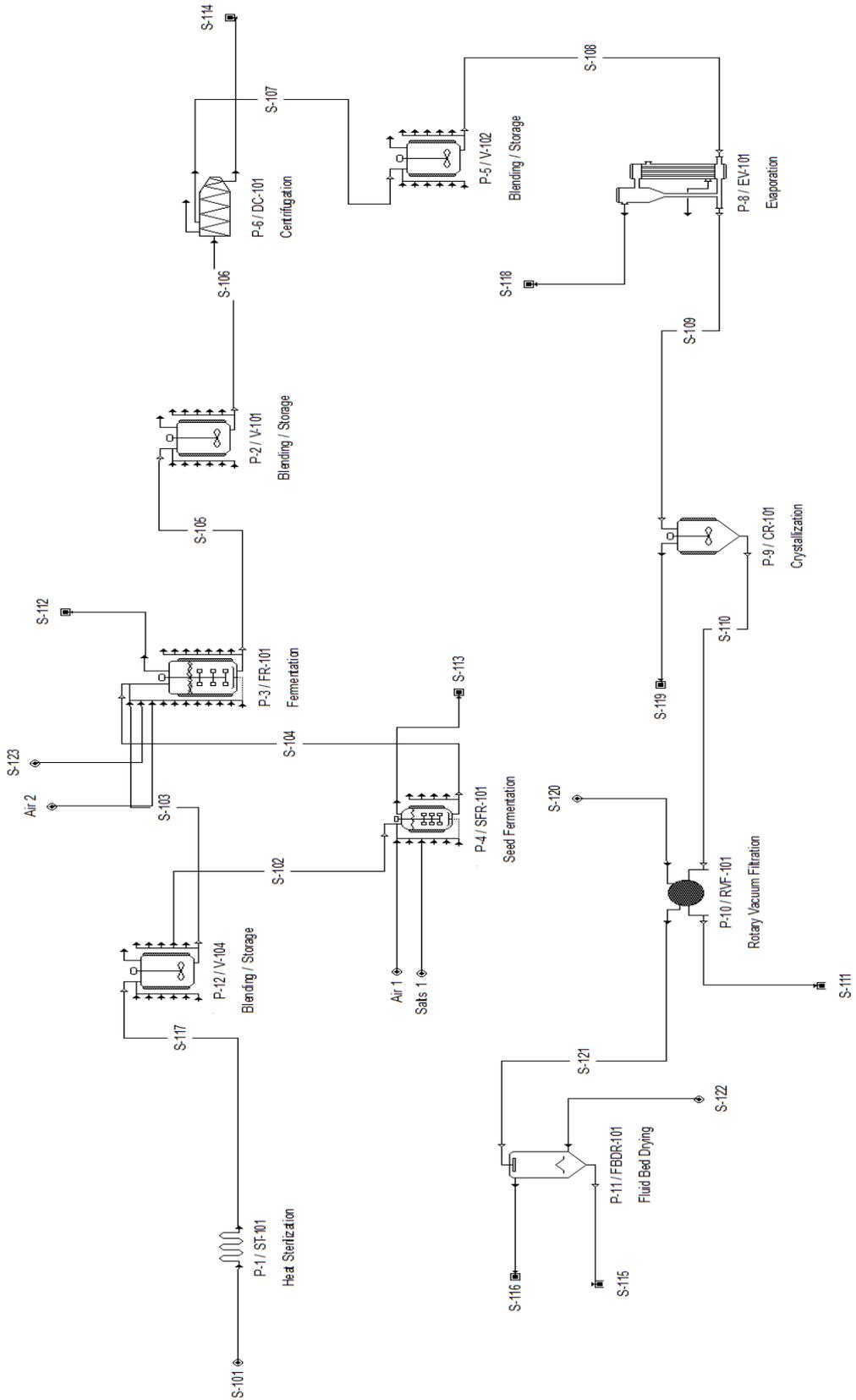


Figura 27 - Fluxograma do Processo de Produção de Treonina

5.7.2 Viabilidade do processo de cultivo da linhagem THR14

Para o cálculo do custo do Produto foram considerados os dados experimentais obtidos a partir do Ensaio em Biorreator 01, sendo $Y_{X/S} = 0,228$ g/g, $Y_{P/S} = 0,174$ g/g e $P_p = 0,32$ g/(L.h)

Dados sobre o valor de mercado da L-treonina foram obtidos da plataforma Glowlit (“Amino Acids prices”, [s.d.]). Considerando-se que o preço da L-treonina está sujeito às oscilações de mercado, assim como qualquer *commodity*, foi considerado um preço médio de US\$ 3,00 /kg para os cálculos de viabilidade deste trabalho.

Inicialmente, foi feita uma simulação considerando um cenário em que o processo apresenta apenas 1 reator principal e 1 reator de inóculo. Nesse cenário seria possível atingir uma produção anual de aproximadamente 265,6 toneladas a um custo de US\$ 30,84 por kg de L-treonina (138 bateladas anuais). Esse custo encontra-se muito acima do valor pelo qual a L-treonina poderia ser vendida no mercado. O custo total pode ser diminuído aumentando-se a capacidade de produção da planta industrial. Isso acontece porque certos custos e despesas fixos não sofrem, por definição, variação conforme aumentamos o volume de produção. Há, portanto, uma diluição dos custos fixos pelo maior volume do produto.

A Tabela 12 apresenta a variação do custo de produção conforme a variação da produção anual. Para aumentar a produção no SuperPro, adicionou-se o equipamento que era indicado como sendo o gargalo do processo. Neste caso, foram sendo adicionados reatores principais e reatores de inóculo.

Tabela 12 - Variação do custo de produção de acordo com a produção anual

<i>Nº de reatores de inóculo</i>	<i>Nº de reatores principais</i>	<i>Produção anual (toneladas/ano)</i>	<i>Custo (US\$/kg)</i>
1	1	265,6	30,4
1	2	529,3	23,4

1	3	793,1	20,98
1	4	1056,8	19,44
2	5	1320,5	18,91
2	6	1586,1	18,42
2	7	1849,6	18,07
3	9	2641,0	17,64
4	12	3170,3	17,24
5	15	3961,4	17,18

A Figura 28 mostra o perfil do custo de produção de L-treonina em função da demanda produtiva. A produção chega a um patamar em que o custo do produto passa a ser praticamente constante (~S\$17/kg), independente do aumento da demanda.

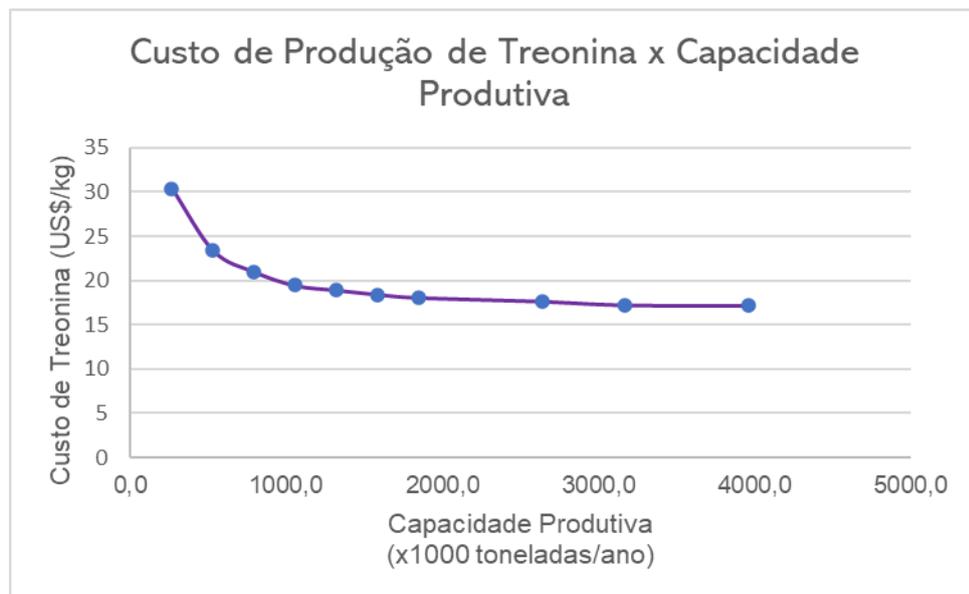


Figura 28 - Custo de Treonina vs. Capacidade Anual de Produção

Foi feita uma análise a partir dos dados econômicos gerados pelo SuperPro no cenário de produção de 3961,4 toneladas anuais. É possível analisar o impacto de cada segmento do processo sobre o custo do produto (Figura 29).

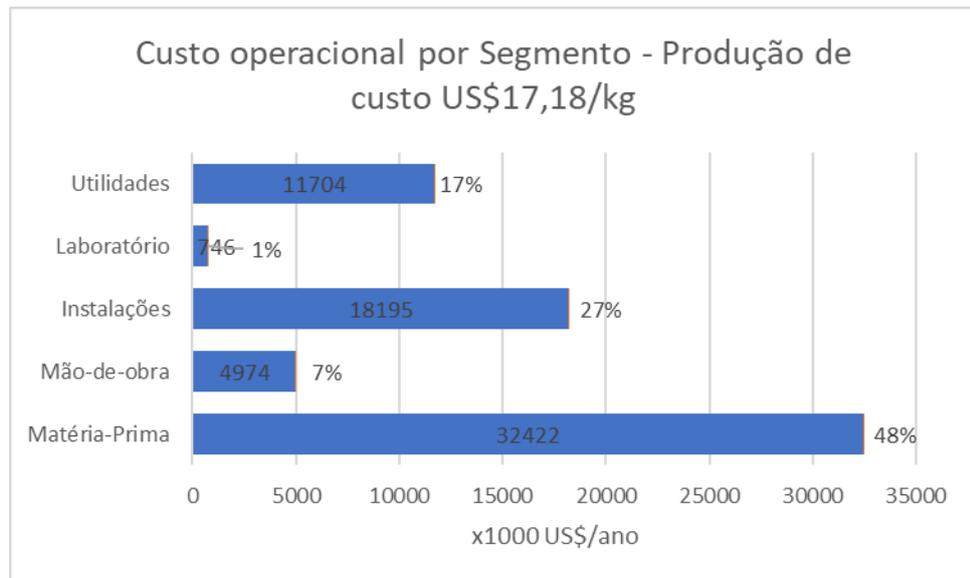


Figura 29 - Distribuição dos Custos Operacionais na Produção de L-Treonina

A Figura 29 mostra que os custos referentes à matéria-prima apresentam o maior impacto no produto (48%), que são os custos com os insumos utilizados no processo. Em seguida temos os custos com instalações (27%), utilidades (17%), mão de obra (7%) e laboratórios (1%).

Uma vez que os custos com matéria-prima representam o maior gargalo do processo, o único insumo que poderia ser substituído seria a fonte de carbono. A sacarose é um açúcar mais barato do que a glicose e poderia ser utilizado em seu lugar.

Os experimentos com as linhagens provenientes de ATCC9637 não apresentaram bons resultados de produção de L-treonina quando comparados às linhagens provenientes de MG1655. Para as próximas simulações, será considerada

que a linhagem ATCC9637 (consumidora de sacarose) produz treonina com os mesmos parâmetros da linhagem THR14.

5.7.3 Viabilidade de linhagens teóricas consumidoras de sacarose

Foi feita uma simulação com os mesmos parâmetros utilizados na Tabela 12, com a única diferença que se utilizou uma solução de sacarose VHP em vez de glicose. Os resultados podem ser visualizados na Figura 30.

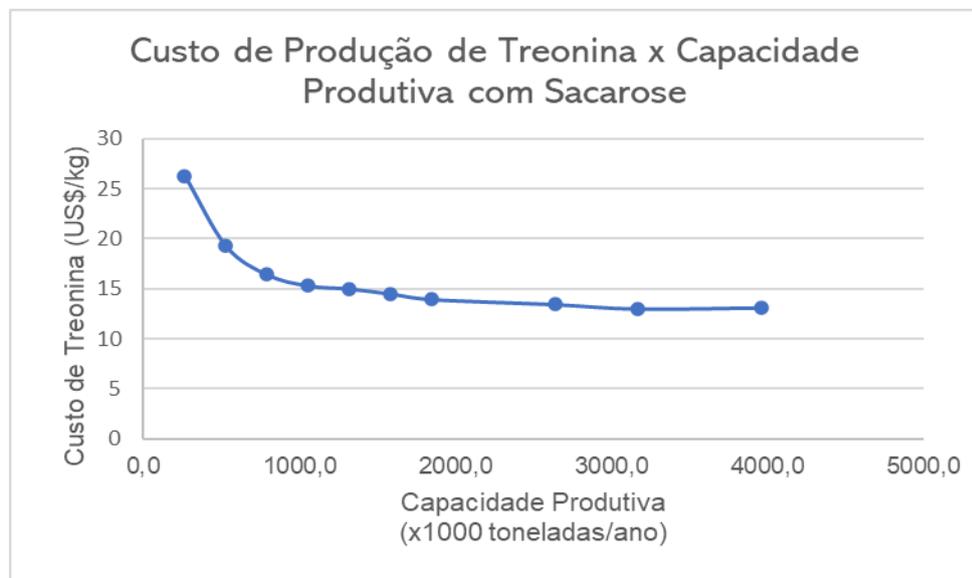


Figura 30 - Variação do Custo de Treonina pela Capacidade Produtiva utilizando Sacarose

A Figura 31 apresenta uma comparação entre as distribuições de custo em duas situações.

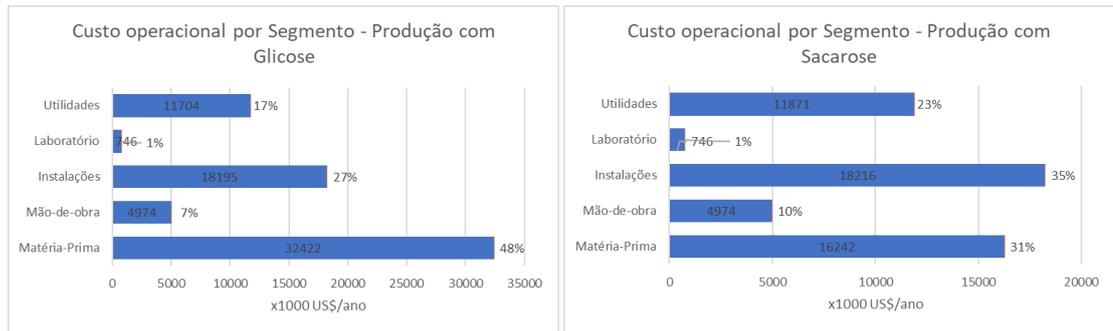


Figura 31 - Comparação da Distribuição dos Custos para fontes de açúcares diferentes

Primeiramente (à esquerda), temos a distribuição de custos para a simulação feita com base nos dados experimentais da linhagem THR14 utilizando a glicose como fonte de carbono. Nesse caso, os custos referentes à matéria-prima do processo apresentou maior peso (48%). À direita, temos a simulação da mesma produção, mas utilizando a sacarose como fonte de carbono. É importante observar que nesse caso o custo de matéria-prima apresentou um impacto menor (31%) no custo do produto. Com a substituição pela sacarose, o segmento de maior impacto no custo foi o relacionado às instalações (35%). Para diminuir os custos, nesse caso, o caminho a ser percorrido é a busca por uma linhagem que apresente valores de produtividade de treonina maiores.

5.7.4 Viabilidade de linhagens teóricas de alta produtividade e fator de conversão

Zhao et al., 2018 foram capazes de desenvolver uma linhagem de *E. coli* recombinante que atingiu o valor de fator de conversão de glicose em treonina de 0,53 (g/g). Esse valor é o maior encontrado na literatura e será considerado nas simulações. Com o objetivo de calcular qual o valor de produtividade do produto necessário para tornar o processo economicamente viável, foram feitas simulações variando o valor da produtividade (P_P), mantendo-se o valor do fator de conversão $Y_{P/S} = 0,53$ (g/g).

A Figura 32 a seguir mostra a variação do custo do produto com a capacidade de produção, considerando-se diferentes valores de produtividade.

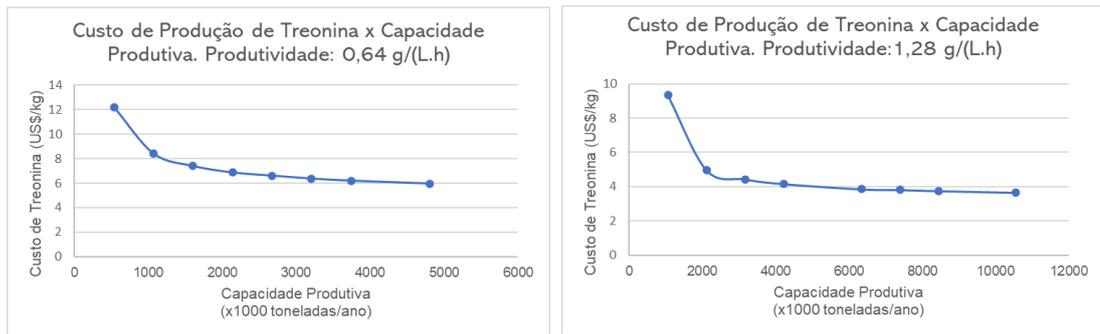


Figura 32 - Variação do custo pela capacidade produtiva para produtividades de 0,64 (A) e 1,28 (B) em g/(L.h)

A Figura 33 mostra que se considerarmos uma produtividade de 2,56 g/(L.h) e uma produção anual de 15536 toneladas por ano, é possível atingir um custo de produção de US\$ 2,44/kg (ROI de aproximadamente 8 anos). Esse valor é inferior ao custo médio de venda no mercado de treonina de US\$3,00/kg. Portanto, para obter um processo economicamente viável, a linhagem THR14 deve ser melhorada de forma a ser possível atingir um valor de pelo menos 2,56 g/(L.h) de produtividade do produto.

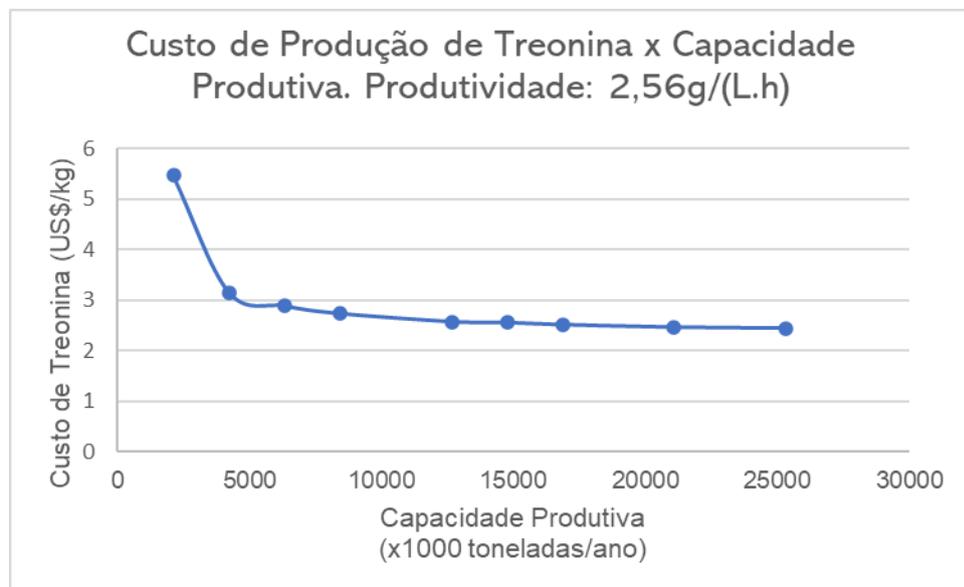


Figura 33 - Variação do Custo pela Capacidade Produtiva para produtividade de 2,56 g/(L.h)

Atingir valores tão altos de $Y_{P/S}$ e de P_P é um grande desafio de engenharia metabólica.(FANG et al., 2020) desenvolveram a linhagem TWF106/pFT24rp que foi

capaz de produzir L-treonina a partir de glicose com 111,78% mol/mol de fator de conversão (73,9% g/g). Foi utilizado um sistema “switch” térmico para “desligar” a via de síntese da L-alanina. Isso resultou no maior rendimento de L-treonina de 124,03% mol/mol, que excedeu o valor máximo teórico disponível de produção de L-treonina (122,47% mol/mol ou 81% g/g).

(ZHAO et al., 2018) mostraram que determinadas modificações no ciclo do glioxilato de *E. coli* pode aumentar de maneira significativa a produção de L-treonina. A linhagem TWF006/pFW01-thrA*BC-asd apresentou um fator de conversão $Y_{P/S}$ de 0,53 g L-treonina / g glicose.

Embora seja um grande desafio, trabalhos na literatura mostram ser possível desenvolver linhagens de *E. coli* capazes de superproduzir L-treonina.

5.8 Considerações finais para futuros desenvolvimentos

Este trabalho buscou desenvolver uma linhagem de *E. coli* produtora do aminoácido treonina. Os estudos de viabilidade econômica mostraram que a utilização de uma matéria-prima de baixo custo é essencial para uma produção de L-treonina viável economicamente. É recomendável que futuros estudos a partir deste trabalho tenham foco no melhoramento da linhagem *E. coli* W, uma vez que essa linhagem é capaz de consumir a sacarose como fonte de carbono. Neste momento, é essencial o aprofundamento dos estudos de diferentes estratégias de engenharia metabólica para se atingir altos valores de $Y_{P/S}$ e de P_P .

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento de uma linhagem bacteriana produtora do aminoácido treonina apresenta boas perspectivas de aplicabilidade na indústria brasileira, dada a grande demanda desse aminoácido pelo mercado interno e a ampla disponibilidade de uma matéria-prima de baixo custo, a sacarose. Neste trabalho foram desenvolvidas linhagens superprodutoras a partir de *E. coli* W e *E. coli* MG.

A deleção de genes responsáveis pela entrada de treonina no interior da célula (*sstT* e *tdcC*) foi realizada com sucesso na linhagem ATCC 9637 (*E. coli* W), que já é capaz de consumir sacarose como substrato a velocidades elevadas.

Com relação à superexpressão dos genes de produção de treonina, a construção do plasmídeo pUC19-*thrABC-rhtA* não foi bem-sucedida e foi substituída pela construção de um outro plasmídeo pBBR-*thrB-rhtC*. No total foram produzidas 8 linhagens mutantes para teste de produção de treonina.

As linhagens mutantes provenientes da *E. coli* W não se apresentaram como boas produtoras quando comparadas com as provenientes da *E. coli* MG. A principal hipótese é a de que essa bactéria necessite de mais modificações para se tornar uma boa produtora, por apresentar um sistema mais regulado para a produção do aminoácido.

O uso da linhagem 14 a 37°C para produção em biorreator apresentou valores de concentração final de treonina e produtividade inferiores aos trabalhos já apresentados na literatura. Entretanto, estratégias de alimentação da fonte de carbono mais controladas, evitando a limitação de substrato, devem aumentar a produção do aminoácido.

Até o momento, foi desenvolvido um processo de produção de treonina que apresenta um valor de produtividade (P_p) de 0,32 g/ (L.h) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) de 0,174 g substrato/ g produto.

7. REFERÊNCIAS

Amino Acids prices. Disponível em: <<https://www.allaboutfeed.net/market-prices/amino-acids-prices/>>. Acesso em: 19 maio. 2022.

ARCHER, C. T. et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): Comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. **BMC Genomics**, v. 12, n. Atcc 9637, 2011a.

ARCHER, C. T. et al. The genome sequence of *E. coli* W (ATCC 9637): Comparative genome analysis and an improved genome-scale reconstruction of *E. coli*. **BMC Genomics**, v. 12, 6 jan. 2011b.

ATSUSHI YOKOTA, M. I. **On Amino Acids Fermentation.** [s.l: s.n.]. v. 8

BACHMANN, B. J. Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology, 2nd ed.** ASM Press, Washington, DC, n. 143, p. 2460–2488, 1996.

BNDES. Diversificação da Indústria Química Brasileira O Estudo de Diversificação da Indústria Química Brasileira foi financiando pelo BNDES / FEP. 2014.

CHASSAGNOLE, C. et al. An integrated study of threonine-pathway enzyme kinetics in *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 356, n. 2, p. 415–423, 2001.

DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, 2000.

DONG, X.; QUINN, P. J.; WANG, X. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for the production of l-threonine. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 1, p. 11–23, 2011.

ENFORS, S. O. et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 175–185, 2001.

FANG, Y. et al. Rebalancing microbial carbon distribution for L-threonine maximization using a thermal switch system. **Metabolic Engineering**, v. 61, p. 33–46, 1 set. 2020.

GRAND VIEW RESEARCH. **Amino Acids Market MARKET ESTIMATES AND TREND ANALYSIS**. [s.l: s.n.].

GUYER, M. S.; REED, R. R.; STEITZ, J. A. Identification of a Sex-factor-affinity Site in *E. coli* as *yt*\$. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 45, p. 135–140, 1981.

HANSEN, J. A. et al. Evaluation of animal protein supplements in diets of early-weaned pigs. **Journal of animal science**, v. 71, n. 7, p. 1853–1862, 1993.

HARRISON, R. G. et al. **Bioseparations science and engineering**. 2. ed. [s.l.] Oxford University, 2015. v. 1

HIRAKAWA, T.; WATANABE, K. Mechanism of l-threonine production in *e. Coli* auxotrophs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 77–84, 1974.

KASE, H.; TANAKA, H.; NAKAYAMA, K. Studies on l-threonine fermentation part I. Production of l-threonine by auxotrophic mutants of various bacteria. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, n. 13, p. 2089–2096, 1971.

KOVACH, M. E. et al. <http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/software/>Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. **Gene**, v. 166, n. 1, p. 175–176, 1995.

KRUSE, D. et al. Influence of threonine exporters on threonine production in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2–3, p. 205–210, 2002.

LEE, K. H. et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for L-threonine production. **Molecular Systems Biology**, v. 3, n. 149, 2007.

LEE, M. H. et al. Improved l-threonine production of *Escherichia coli* mutant by optimization of culture conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 127–130, 2006.

LEITE, D.; RODRIGUES, R.; PAULO, S. **Estudo da pré-viabilidade técnico-econômica dos processos de produção dos aminoácidos treonina e triptofano.** [s.l: s.n.].

LI, Y. et al. Current status on metabolic engineering for the production of L-aspartate family amino acids and derivatives. **Bioresource Technology**, v. 245, n. 29, p. 1588–1602, 2017.

LIVSHITS, V. A. et al. Identification and characterization of the new gene *rhtA* involved in threonine and homoserine efflux in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 154, n. 2, p. 123–135, 2003.

MARKAKIS, K.; DE LAS HERAS, A.; ELFICK, A. **An analytical approach for the calculation of promoter activities based on fluorescent protein expression data.** IET Conference Publications. **Anais...Institution of Engineering and Technology**, 2016.

MAXON, M. E. et al. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*: Effect of the MetJ protein on the expression of the *metE* and *metR* genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 1, p. 85–89, 1989.

NORRANDER, J.; KEMPE, T.; MESSING, J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. **Gene**, v. 26, n. 1, p. 101–106, 1983.

PADMANABHAN, S.; BANERJEE, S.; MANDI, N. **Screening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.intechopen.com>.

PATTE, J.; BOY, E. Multivalent Repression of Aspartic Semialdehyde Dehydrogenase in *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 84–92, 1972.

PFEIFFER, T.; MORLEY, A. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, n. OCT, 21 out. 2014.

SANCHEZ, S. et al. Our microbes not only produce antibiotics, they also overproduce amino acids. **J. Antibiot.**, v. 71, p. 26–36, [s.d.].

SHIMIZU, E. et al. Culture Conditions for Improvement of L-Threonine Production Using a Genetically Self-Cloned L-Threonine Hyperproducing Strain of Escherichia Coli K-12. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 6, p. 1095–1098, 1995.

SINGH, S.; TIWARI, B. S. Biosynthesis of High-Value Amino Acids by Synthetic Biology – Chapter 11. Em: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l: s.n.]. p. 257–294.

WILLIBALDO SCHMIDELL et al. **Biotecnologia Industrial - Engenharia Bioquímica**. [s.l.] Blucher, 2001. v. 2

WOLFE, A. J. The Acetate Switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005a.

WOLFE, A. J. The Acetate Switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 1, p. 12–50, 2005b.

WOOD, J. M. et al. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 437–460, 2001.

ZHANG, X. et al. [Construction of recombinant plasmids containing threonine operon and their effects on L-threonine accumulation]. **Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica**, v. 49, n. 5, p. 591—596, 2009.

ZHANG, Y. S. Blue-white screening liquid can eliminate false positives in blue-white colony screening. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 10 jun. 2016.

ZHAO, H. et al. Increasing l-threonine production in Escherichia coli by engineering the glyoxylate shunt and the l-threonine biosynthesis pathway. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 13, p. 5505–5518, 1 jul. 2018.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Dados de custo dos equipamentos utilizados pelo software SuperPro Designer

APÊNDICE B – Dados de custo dos insumos utilizados pelo software SuperPro Designer

APÊNDICE A – Dados de custo dos equipamentos utilizados pelo software SuperPro Designer

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (\$)	Cost (\$)
1 / 0 / 0	FR-101	Fermentor Vessel Volume = 200,00 m3	650,000	650,000
1 / 0 / 0	SFR-101	Seed Fermentor Vessel Volume = 20000,00 L	170,000	170,000
1 / 0 / 0	DC-101	Decanter Centrifuge Throughput = 2496,96 L/h	295,000	295,000
1 / 0 / 0	EV-101	Evaporator Mean Heat Transfer Area = 4,76 m2	123,000	123,000
1 / 0 / 0	CR-101	Crystallizer Vessel Volume = 616,66 L	517,000	517,000
1 / 0 / 0	RVF-101	Rotary Vacuum Filter Filter Area = 0,95 m2	37,000	37,000
1 / 0 / 0	FBDR-101	Fluid Bed Dryer Dryer Volume = 126,09 L	35,000	35,000
1 / 0 / 0	V-104	Blending Tank Vessel Volume = 28112,39 L	330,000	330,000
1 / 0 / 0	ST-101	Heat Sterilizer Rated Throughput = 50361,58 L/h	15,000	15,000
1 / 0 / 0	V-101	Blending Tank Vessel Volume = 2774,40 L	231,000	231,000
1 / 0 / 0	V-102	Blending Tank Vessel Volume = 2662,90 L	229,000	229,000
		Unlisted Equipment		658,000
			TOTAL	3,290,000

APÊNDICE B – Dados de custo dos insumos utilizados pelo software SuperPro Designer

Bulk Material	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Air	0.000	36,636,098	kq	0	0.00
Ammonium Sulfat	0.080	183,264	kq	14,661	0.67
Glicose mix	0.470	3,723,378	kq	1,749,988	80.49
KH ₂ PO ₄	1.000	35,052	kq	35,052	1.61
Lysine	3.500	32,430	kq	113,505	5.22
NH ₄ OH	1.000	62,652	kq	62,652	2.88
Tiosulfato de	0.500	23,322	kq	11,661	0.54
Water	0.000	27,630,368	kq	0	0.00
Yeast Extract	4.000	46,644	kq	186,576	8.58
TOTAL				2,174,095	100.00

Bulk Material	Unit Cost (\$)	Annual Amount		Annual Cost (\$)	%
Air	0.000	35,311,923	kq	0	0.00
Ammonium Sulfat	0.080	161,276	kq	12,902	0.46
KH ₂ PO ₄	1.000	45,954	kq	45,954	1.63
Lysine	3.500	84,870	kq	297,045	10.53
NH ₄ OH	1.000	218,178	kq	218,178	7.74
Sacarose VHP	0.179	9,685,530	kq	1,729,836	61.34
Tiosulfato de	0.500	60,720	kq	30,360	1.08
Water	0.000	20,413,796	kq	0	0.00
Yeast Extract	4.000	121,440	kq	485,760	17.23
TOTAL				2,820,035	100.00