

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**Produção de polihidroxialcanoatos por  
*Escherichia coli* recombinante**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**Gustavo Graciano Fonseca**

Engenheiro de Alimentos

Orientadora: Regina Vasconcellos Antônio, Dr<sup>a</sup>

Florianópolis, fevereiro de 2003

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos (LBBMM) do Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

“Morre lentamente quem não vira a mesa quando está infeliz com seu trabalho, quem não arrisca o certo pelo incerto para ir atrás de um sonho, quem não se permite pelo menos uma vez na vida fugir dos conselhos sensatos”.

Luís Fernando Veríssimo

*Aos meus pais.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE EQUAÇÕES .....	ix
NOMENCLATURA .....	xi
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xv
1. Introdução .....	1
2. Revisão bibliográfica .....	5
2.1. Polihidroxicanoatos (PHAs) .....	5
2.1.1. Propriedades e características .....	6
2.1.2. Aplicações.....	7
2.1.3. Biodegradação.....	7
2.2. Biossíntese de PHAs.....	8
2.2.1. Biossíntese de PHAs por <i>R. eutropha</i> .....	9
2.2.2. Biossíntese de PHAs por <i>Pseudomonas</i> .....	12
2.3. Clonagem e expressão de genes .....	13
2.4. Microrganismos produtores de PHAs .....	17
2.4.1. Produtores naturais.....	17
2.4.1.1. Aeromonas .....	17
2.4.1.2. Ralstonia.....	17
2.4.1.3. Azobacter.....	17
2.4.1.4. Methylobacterium.....	18
2.4.1.5. Pseudomonas.....	18
2.4.2. Produtores recombinantes .....	18
2.4.2.1. Recombinantes naturais .....	19
2.4.2.2. <i>E. coli</i> recombinante.....	19
2.4.3. Produtores transgênicos .....	20
2.4.3.1. Insetos .....	20
2.4.3.2. Plantas.....	20
2.5. PHA produzido por linhagens recombinantes.....	20
2.6. Produção de PHAs em <i>E. coli</i> recombinante.....	21
2.6.1. Produção visando monômeros e copolímeros específicos .....	21
2.6.1.1. Produção de P(3HB).....	21
2.6.1.2. Produção de P(3HB-co-3HV).....	24

2.6.1.3. Produção de P(3HB-co-4HB) e P(4HB) .....	25
2.6.1.4. Produção de P(3HB-co-3HHx) e P(3HB-co-3HV-co-3HHx).....	26
2.6.1.5. Produção de P(3HO-co-3HD) .....	27
2.6.2. Produção a partir substratos de baixo custo.....	28
2.6.2.1. Amiláceos .....	28
2.6.2.2. Soro de queijo.....	29
2.6.2.3. Óleos vegetais .....	30
2.6.2.4. Xilose.....	31
2.6.3. Indutores e suplementos.....	31
2.6.3.1. IPTG .....	31
2.6.3.2. Ácido acético .....	32
2.6.3.3. Ácido acrílico .....	32
2.6.3.4. Ácido propiônico .....	33
2.6.4. Custos.....	33
2.7. Estabilidade de microrganismos recombinantes transformados com plasmídios.....	34
2.7.1. Cinética da perda de plasmídios em culturas com microrganismos recombinantes .	35
2.8. Planejamento experimental e análise estatística .....	37
3. Materiais e métodos .....	39
3.1. Materiais .....	39
3.1.1. Microrganismo e plasmídios.....	39
3.1.2. Meios de cultura.....	41
3.1.2.1. Meio caldo nutriente (NB) .....	41
3.1.2.2. Meio Luria-Bertani (LB) .....	41
3.1.2.3. Meio mineral (MR) .....	41
3.1.3. Substratos de baixo custo .....	41
3.1.4. Soluções e tampões empregados .....	42
3.1.4.1. Tampão Tris-EDTA (TE) .....	42
3.1.4.2. Tampão de lise (TENS).....	42
3.1.4.3. Tampão de neutralização (HSS) .....	42
3.1.4.4. Solução de metanólise.....	42
3.1.4.5. Solução de ampicilina .....	43
3.2. Métodos .....	43
3.2.1. Preparo de células competentes para transformação .....	43
3.2.2. Transformação de células competentes e seleção dos transformantes.....	43
3.2.3. Seleção de colônias para a extração de DNA plasmidial.....	44

3.2.4. Extração de DNA plasmidial.....	44
3.2.5. Culturas em frascos erlenmeyer.....	44
3.2.6. Determinações analíticas.....	45
3.2.6.1. Amostragem .....	45
3.2.6.2. Concentração de biomassa .....	45
3.2.6.3. Análise dos PHAs .....	45
3.2.6.4. Extração de PHAs.....	46
3.2.6.5. Estabilidade plasmidial.....	46
3.2.6.6. Planejamento experimental e análise estatística.....	47
3.2.7. Etapas da produção de polihidroxicanoatos por <i>E. coli</i> recombinantes .....	48
3.2.8. Estratégias de cultivo .....	49
3.2.8.1. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> recombinante contendo os genes estruturais das PHAs sintases de <i>R. eutropha</i> (pBHR68) utilizando substratos e suplemento de baixo custo.....	49
3.2.8.2. Otimização da produção de PHAs por <i>E. coli</i> recombinante contendo os genes estruturais das PHAs sintases de <i>R. eutropha</i> (pBHR68) .....	51
3.2.8.3. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> recombinante contendo o gene estrutural da PHA sintases de <i>P. aeruginosa</i> (pHBR71) .....	54
3.2.8.4. Utilização de óleos vegetais como substrato para a produção de PHAs de cadeia média por <i>E. coli</i> recombinante.....	57
3.2.9. Avaliação da estabilidade plasmidial em <i>E. coli</i> recombinante .....	57
4. Resultados .....	58
4.1. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> (DH10B e JM101) recombinante contendo o operon completo de <i>R. eutropha</i> para a síntese de polihidroxicanoatos (pBHR68) .....	58
4.1.1. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> (DH10B) recombinante ancorando o plasmídio pBHR68 .....	58
4.1.2. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> (JM101) recombinante ancorando o plasmídio pBHR68 .....	66
4.2. Estudo do efeito de outros parâmetros sobre a produção de PHB por <i>E. coli</i> JM101 recombinante ancorando o plasmídio pBHR68. ....	73
4.3. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> recombinante contendo o gene estrutural da PHA sintase de <i>P. aeruginosa</i> (pHBR71) .....	86
4.3.1. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> (DH10B) recombinante contendo o plasmídio pBHR71 .....	86
4.3.2. Produção de PHAs por <i>E. coli</i> (JM101) recombinante contendo o plasmídio pBHR71 .....	92

4.4. Utilização de óleos vegetais como substrato para a produção de PHAs de cadeia média por <i>E. coli</i> recombinante.....	97
4.5. Avaliação da estabilidade plasmidial em <i>E. coli</i> recombinante .....	98
5. Discussão.....	105
5.1. Estudos com a PHA sintase de <i>R. eutropha</i> .....	105
5.2. Estudos com a PHA sintase de <i>P. aeruginosa</i> .....	108
5.3. Utilização de diversos óleos vegetais para o acúmulo de PHA <sub>SCL</sub> .....	109
5.4. Estabilidade plasmidial.....	111
6. Conclusões .....	116
7. Sugestões .....	119
8. Referências bibliográficas .....	120

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias que tiveram suas PHA sintases clonadas e caracterizadas .....	13
Tabela 2. Características genotípicas relevantes dos plasmídios e linhagens de <i>E. coli</i> .....	39
Tabela 3. Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo $2^3$ .....	49
Tabela 4. Matriz de planejamento fatorial completo $2^3$ com variáveis codificadas .....	50
Tabela 5. Matriz de planejamento fatorial completo $2^3$ com variáveis reais .....	50
Tabela 6: Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo $2^5$ .....	51
Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial completo $2^5$ com variáveis codificadas .....	52
Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial completo $2^5$ com variáveis reais .....	53
Tabela 9. Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo $2^4$ .....	54
Tabela 10. Matriz de planejamento fatorial completo $2^4$ com variáveis codificadas .....	55
Tabela 11. Matriz de planejamento fatorial completo $2^4$ com variáveis reais .....	56
Tabela 12. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHB de acordo com o planejamento experimental $2^3$ para <i>E. coli</i> DH10B (pBHR 68) .....	59
Tabela 13. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de polihidroxibutirato e massa de polihidroxibutirato de acordo com o planejamento experimental $2^3$ para <i>E. coli</i> DH10B (pBHR 68) .....	59
Tabela 14. ANOVA modificada para massa celular seca para <i>Escherichia coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68 .....	64
Tabela 15. ANOVA modificada para percentual de PHB acumulado para <i>Escherichia coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68 .....	64
Tabela 16. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada para <i>Escherichia coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68 .....	65
Tabela 17. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHB de acordo com o planejamento experimental $2^3$ para <i>E. coli</i> JM101 (pBHR 68) .....	66
Tabela 18. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de polihidroxibutirato (%PHB) e massa de polihidroxibutirato (mPHB) de acordo com o planejamento experimental $2^3$ para <i>Escherichia coli</i> JM101 (pBHR 68) .....	67
Tabela 19. ANOVA modificada para massa celular seca para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR 68 .....	71
Tabela 20. ANOVA modificada para percentual de PHB acumulado para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68 .....	72
Tabela 21. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada para <i>Escherichia coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68 .....	72

Tabela 22. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, de acordo com o planejamento 2 <sup>5</sup> para <i>E. coli</i> JM101 (pBHR 68) .....	74
Tabela 23. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual e massa de polihidroxibutirato em função de seu erro padrão e nível de significância ( $\delta$ ).....	75
Tabela 24. ANOVA modificada para massa celular seca.....	84
Tabela 25. ANOVA modificada para percentual acumulado de PHB .....	85
Tabela 26. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada .....	85
Tabela 27. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHA de acordo com o planejamento experimental 2 <sup>4</sup> para <i>E. coli</i> DH10B (pBHR 71) .....	87
Tabela 28. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de PHA de acordo com o planejamento experimental 2 <sup>3</sup> para <i>Escherichia coli</i> DH10B (pBHR 71).....	88
Tabela 29. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHA de acordo com o planejamento experimental 2 <sup>4</sup> para <i>E. coli</i> JM101 (pBHR 71) .....	92
Tabela 30. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca e percentual de PHA para a <i>E. coli</i> JM101 (pBHR71) .....	93
Tabela 31. Valores de massa celular seca, percentual de PHB e massa de PHB acumulados para <i>Escherichia coli</i> JM101 (pBHR 71) em função de diversos tipos de óleos vegetais ..	97
Tabela 32. Concentração adimensional de biomassa estimada pela absorvância do caldo de cultivo em 600nm ( $Abs_{600}$ ) para <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo.....	99
Tabela 33. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo...	101
Tabela 34. Percentual de estabilidade plasmidial em <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo .....	102
Tabela 35. Velocidade específica de crescimento .....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via metabólica de <i>R. eutropha</i> a partir de diferentes substratos (LEE <i>et al.</i> , 1995) ...	10
Figura 2. Via metabólica de para a biosíntese de PHAs por <i>Pseudomonas</i> (MADISON; HUISMAN,1999).....	12
Figura 3. Plasmídio pBHR68, ancorando os genes <i>Amp<sup>r</sup></i> e <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i> .....	40
Figura 4. Plasmídio pBHR71, ancorando os genes <i>Amp<sup>r</sup></i> e <i>phaC1</i> de <i>P. aeruginosa</i> .....	40
Figura 5. Fluxograma das etapas de produção de polihidroxicanoatos.....	48
Figura 6. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68.....	62
Figura 7. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68.....	62
Figura 8. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68.....	63
Figura 9. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR68 ....	63
Figura 10. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	69
Figura 11. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	69
Figura 12 . Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	70
Figura 13. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	70
Figura 14. Superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR 68.....	79

Figura 15. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função do tempo e temperatura (concentração de inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	79
Figura 16. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68 .....	80
Figura 17. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	80
Figura 18. Superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68 .....	82
Figura 19. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	82
Figura 20. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68 .....	83
Figura 21. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR68.....	83
Figura 22. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acrílico (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR71.....	90
Figura 23. Superfície de resposta do percentual de PHA acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acrílico (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR71 .....	90
Figura 24. Superfície de resposta da massa de PHA acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acrílico (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR71 .....	91

Figura 25. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHA acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acrílico (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para <i>E. coli</i> DH10B ancorando o plasmídio pBHR71.....	91
Figura 26. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR71.....	95
Figura 27. Superfície de resposta do percentual de PHA acumulado, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR71.....	95
Figura 28. Superfície de resposta da massa de PHA acumulada, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR71.....	96
Figura 29. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHA acumulados, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para <i>E. coli</i> JM101 ancorando o plasmídio pBHR71.....	96
Figura 30. Concentração adimensional de biomassa ( $Abs_{600}$ ) para <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo.....	99
Figura 31. Concentração adimensional de células sem plasmídio em função do tempo .....	100
Figura 32. Concentração adimensional de células com plasmídio em função do tempo .....	100
Figura 33. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo...	101
Figura 34. Percentual de estabilidade plasmidial em <i>Escherichia coli</i> DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo .....	102
Figura 35. Relação entre F e o número de gerações n.....	104
Figura 36. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental $2^5$ com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1) .....	143
Figura 37 Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental $2^5$ com dois níveis em	

função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1) ..... 144

Figura 38. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1)..... 145

Figura 39. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e IPTG (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e IPTG (-1); (C) TEMP. e IPTG (-1) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1)..... 146

Figura 40. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1) ..... 147

Figura 41. Curvas de nível da resposta acúmulo de PHB, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1) ..... 148

Figura 42. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1) 149

Figura 43. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e IPTG (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e IPTG (-1); (C) TEMP. e IPTG (-1) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1) ..... 150

Figura 44. Curvas de nível da resposta massa de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1) ..... 151

Figura 45 Curvas de nível resposta massa de PHB, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1) ..... 152

Figura 46. Superfícies da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG

(+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1) 153

Figura 47. Curvas de nível da resposta massa de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÒC. e IPTG (-1); (B) TEMP. (+1), INÒC. e IPTG (-1); (C) TEMP. e IPTG (-1) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1) ..... 154

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Culturas mistas de células com plasmídeo .....	36
Equação 2. Culturas mistas de células sem plasmídeo .....	36
Equação 3. Taxa de formação de células com plasmídeo.....	36
Equação 4. Taxa de formação de células sem plasmídeo .....	36
Equação 5. Fração de células F com plasmídeo em um determinado tempo, após n gerações	36
Equação 6. Relação entre as taxas específicas de crescimento .....	36
Equação 7. Número de gerações .....	36
Equação 8. Relação entre células recombinantes com ( $X^+$ ) e sem ( $X^-$ ) plasmídeo .....	37
Equação 9. Soma quadrática total em função dos valores observados e preditos.....	47
Equação 10. Soma quadrática total em função dos valores de regressão e resíduos .....	47
Equação 11. Teste F de significância .....	47
Equação 12. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de MCS em <i>E. coli</i> DH10B (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	66
Equação 13. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de PHB em <i>E. coli</i> DH10B (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	66
Equação 14. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de massa de PHB em <i>E.</i> <i>coli</i> DH10B (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	66
Equação 15. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de MCS em <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	73
Equação 16. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de PHB em <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	73
Equação 17. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de massa de PHB em <i>E.</i> <i>coli</i> JM101 (pBHR68) em função dos percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja.....	73
Equação 18. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de MCS em <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68) em função das concentrações de inóculo, IPTG e ácido acrílico, temperatura e tempo de cultivo em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja.....	86

Equação 19. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de PHB em <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68) em função das concentrações de inóculo, IPTG e ácido acrílico, temperatura e tempo de cultivo em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja.....	86
Equação 20. Modelo matemático de primeira ordem para o acúmulo de massa de PHB em <i>E. coli</i> JM101 (pBHR68) em função das concentrações de inóculo, IPTG e ácido acrílico, temperatura e tempo de cultivo em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja.....	86

## NOMENCLATURA

2M3HB	ácido 2-metil-3-hidroxiбутírico
3HÁ	ácido 3-hidroxiálcanóico
3HB	ácido 3-hidroxiбутírico
3HD	ácido 3-hidroxi-decanoico
3HDD	ácido 3-hidroxi-dodecanoico
3HHx	ácido 3-hidroxi-hexanoico
3HHp	ácido 3-hidroxi-heptanoico
3HO	ácido 3-hidroxi-octanoico
3HTD	ácido 3-hidroxi-tetradecanoico
3HV	ácido 3-hidroxi-valérico
4HB	ácido 4-hidroxi-butírico
4HV	ácido 4-hidroxi-valérico
$\alpha$	relação entre as taxas específicas de crescimento
$\sigma$	número de células sem plasmídeo originadas das células com plasmídeo por geração (coeficiente de segregação)
$\delta$	nível de significância
$\Delta\mu$	velocidade específica de crescimento das células hospedeiras e das células sem plasmídeo
$\mu^-$	velocidade específica de crescimento das células sem plasmídeo
$\mu^+$	velocidade específica de crescimento das células com plasmídeo
AA	ácido acrílico
Abs	absorbância
ACP	acil-carrier proteína
Amp <sup>r</sup>	gene conferindo resistência a ampicilina
B	taxa específica de síntese protéica
DNA	ácido desoxinucleico
F	fração de células com plasmídeo em um determinado tempo
$F_{v1, v2}$	freqüência de referência ao nível de significância desejado (teste F de significância)
HA	ácido hidroxiálcanóico (hidroxiálcanoato)
$HA_{SCL}-co-HA_{SCL}$	copolímeros de hidroxiálcanoatos de cadeia curta
$HA_{MCL}-co-HA_{MSL}$	copolímeros de hidroxiálcanoatos de cadeia média
$HA_{SCL}-co-HA_{MSL}$	copolímeros de hidroxiálcanoatos de cadeias curtas e médias

HSS	solução de acetato de potássio
Inóc.	concentração de inóculo
IPTG	isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
K	número de variáveis envolvidas no estudo
LB	caldo Luria Bertani
MCL	cadeia média
MCS	massa celular seca
mPHB	massa de polihidroxibutirato
MQ <sub>T</sub>	média quadrática dos resíduos
MQ <sub>R</sub>	média quadrática da regressão
MR	meio mineral
MSL	cadeia lateral média
<i>n</i>	número total de observações (ensaios)
N	número de gerações
NA	ágar nutriente
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NB	caldo nutriente
<i>P</i>	número de parâmetros do modelo
$\rho$	probabilidade da célula perder o plasmídeo durante a divisão celular
P	produto
pBHR68	plasmídeo contendo os genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i>
pBHR71	plasmídeo contendo o gene <i>phaC1</i> de <i>P. aeruginosa</i>
PHA	ácido polihidroxialcanoico (polihidroxialcanoato)
PHA <sub>SCL</sub>	polihidroxialcanoato de cadeia curta
PHA <sub>MCL</sub>	polihidroxialcanoato de cadeia média
<i>phaA</i>	gene codificando para $\beta$ -cetotiolase
<i>phaB</i>	gene codificando para NAD(P)H-dependente acetoacetil-CoA-redutase
<i>phaC</i>	gene codificando para PHA sintase
<i>phaCAB</i>	operon contendo os genes <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i>
PHB	ácido polihidroxibutírico (polihidroxibutirato)
PHB-co-HV	(polidroxibutirato-co-valerato)
$r_x^-$	velocidade específica de formação de células sem plasmídeo
$r_x^+$	velocidade específica de formação de células com plasmídeo

rpm	rotações por minuto
S	concentração de substrato
SCL	cadeia lateral curta
SDS	dodecil sulfato de sódio
SQ <sub>R</sub>	soma quadrática devido à regressão
SQ <sub>r</sub>	soma quadrática devido aos resíduos
SQ <sub>T</sub>	soma quadrática total
T	tempo (h)
TE	tampão Tris-EDTA
Temp.	temperatura
TENS	tampão Tris-EDTA mais NaOH e SDS
<i>thi-1</i>	genótipo deficiente na biossíntese de tiamina
X <sup>-</sup>	cultura mista de células sem plasmídeo
X <sup>+</sup>	cultura mista de células com plasmídeo

## RESUMO

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por várias bactérias que possuem características termoplásticas, biocompatíveis e biodegradáveis. Sua aplicação comercial é limitada pelo alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, o substrato contribui mais significativamente com os custos de produção totais. Para reduzir tais custos, linhagens recombinantes e estratégias de cultivo vêm sendo desenvolvidas. Desta forma, estudaram-se linhagens recombinantes de *Escherichia coli*, DH10B e JM101, ancorando os genes para a biossíntese de PHA de *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*), utilizando fontes de carbono de baixo custo. Visando estabelecer as melhores condições de cultivo com relação à fonte de carbono (amido de milho hidrolisado e óleo de soja) e suplemento (soro de queijo), efetuou-se um planejamento experimental  $2^3$  nas concentrações de 0 e 5% para cada substrato ou suplemento. Para a linhagem DH10B o maior acúmulo de PHA deu-se no meio com o amido (53,21% da MCS) enquanto o maior crescimento celular (MCS) foi obtido em meio contendo amido, soro e óleo ( $4,60\text{g.L}^{-1}$ ). Para a linhagem JM101 o comportamento foi análogo, com maior acúmulo de PHA com amido (68,27% da MCS) e maior crescimento celular em amido, soro e óleo ( $2,42\text{g.L}^{-1}$ ). A combinação das respostas fornecidas pelos modelos estatísticos indicou como melhores, de acordo com os níveis propostos, os valores de 5% (m/v) de amido e 5% (v/v) de soro para ambas as linhagens, enquanto para o óleo, os valores foram estabelecidos em 0% (v/v) para DH10B e 1,5% (v/v) para JM101. Com estes resultados desenvolveu-se um segundo planejamento experimental  $2^5$  visando-se testar as concentrações de inóculo (2 e 5% sobre uma  $\text{Abs}=1,2$ ), IPTG e ácido acrílico (0 e  $0,1\text{mg.L}^{-1}$ ), tempo (48 e 96h) e temperatura (30 e  $37^\circ\text{C}$ ) em *E. coli* JM101, ancorando os genes para a biossíntese de PHA de *R. eutropha*, em meio mineral contendo 5% de amido e 5% de soro e 1,5% de óleo (obtidos pelo planejamento anterior), as melhores respostas foram: MCS de  $3,5\text{g.L}^{-1}$ , 75% de PHB, com o acúmulo de  $2,5\text{g.L}^{-1}$  de PHB, quando inóculo foi fixado em 5% ( $\text{Abs} = 1,2$ ), sem a adição de IPTG e ácido acrílico durante 96h a  $37^\circ\text{C}$ . IPTG não teve influência significativa sobre as respostas, ácido acrílico não atendeu ao objetivo de permitir a incorporação do monômero HHx ao polímero e a temperatura de  $30^\circ\text{C}$  favoreceu preferencialmente o acúmulo de PHB e  $37^\circ\text{C}$  o acúmulo de massa celular. A fim de promover a síntese de PHAs de cadeia média ( $\text{PHA}_{\text{MCL}}$ ), um terceiro estudo foi realizado em *E. coli* recombinante, linhagens DH10B e JM101, ancorando os genes para a biossíntese de PHA de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando fontes de carbono de baixo custo. Através de um planejamento experimental  $2^4$  avaliou-se a composição de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja ao meio mineral e a adição de ácido acrílico como inibidor da  $\beta$ -oxidação para a síntese de  $\text{PHA}_{\text{MCL}}$ . As melhores respostas experimentais obtidas para *E. coli* DH10B foram MCS de  $0,95\text{g.L}^{-1}$ , 20% de PHA, com o acúmulo de  $0,2\text{g.L}^{-1}$  de PHA, em meio mineral contendo 5% de amido, 5% de soro e 5% de óleo, além de  $0,1\text{mg.L}^{-1}$  de ácido acrílico, e para *E. coli* JM101 alcançou-se MCS de  $0,85\text{g.L}^{-1}$ , 3% de PHA, com o acúmulo de  $0,015\text{g.L}^{-1}$  de PHA, em meio mineral contendo 5% de amido e 5% de soro e 1,5% de óleo. Com o mesmo objetivo, utilizaram-se diversos óleos vegetais (algodão, arroz, canola, dendê, girassol, milho, oliva, soja) para o acúmulo de  $\text{PHA}_{\text{MCL}}$  por *E. coli* JM101, ancorando os genes para a biossíntese de PHA de *P. aeruginosa* em meio mineral contendo 5% de soro e 1% do respectivo óleo vegetal, sendo que o maior acúmulo de PHA deu-se em óleo de dendê (11,64%). Por fim, analisou-se a estabilidade dos plasmídios, que até 24h de cultivo mantiveram praticamente 100% de sua estabilidade.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalcanoates (PHAs) are polyesters synthesized for several bacteria that have thermoplastic, biocompatible and biodegradable properties. However its commercial application is limited by the high cost of production. By the economic point of view, the substrates contribute more significantly with the total costs of production. To reduce such costs, recombinant strains and culture strategies have being developed. In this way, recombinant *Escherichia coli*, strains DH10B and JM101, harboring *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*) PHA biosynthesis genes, have been studied using low cost carbon sources. Aiming the establishment of the best culture conditions with relation to the carbon source (glucose syrup and soy oil) and supplement (cheese whey), an experimental design  $2^3$  in the concentrations of 0 and 5% for each substrate or supplement has been done. For DH10B strain the highest PHA accumulation was given on the medium with glucose syrup (53.21% of the DCM) while the highest cell growth (DCM) was obtained in medium contends glucose syrup, cheese whey and soy oil ( $4.60\text{g.L}^{-1}$ ). For JM101 strain the behavior was analogous, with higher PHA accumulation in glucose syrup (68.27% of the DCM) and greater cellular growth in glucose syrup, cheese whey and soy oil ( $2.42\text{g.L}^{-1}$ ). The combination of the answers supplied by statistical models indicated as better, in accordance to the considered levels, the values of 5% (m/v) of glucose syrup and 5% (v/v), cheese whey for both strains, while for the oil, the values had been established in 0% (v/v) for DH10B and 1.5% (v/v) for JM101. With ownership of these results, an experimental design  $2^5$  was developed according to test the concentrations of inocule (2 and 5% on a Abs=1.2), IPTG and acrylic acid (0 and  $0.1\text{mg.L}^{-1}$ ), time (48 and 96h) and temperature (30 and  $37^\circ\text{C}$ ) in *E. coli* JM101, harboring *R. eutropha* PHA biosynthesis genes, in mineral medium containing 5% of glucose syrup, 5% of cheese whey and 1.5% of soy oil (obtained by the previous design), the best answers were DCM of  $3.5\text{g.L}^{-1}$ , 75% of PHB, with the accumulation of  $2.5\text{g.L}^{-1}$  of PHB, when inocule was fixed in 5% (Abs=1.2), without the addition of IPTG and acrylic acid, during 96h at  $37^\circ\text{C}$ . IPTG did not have significant influence on the answers, acrylic acid did not satisfied the objective to allow the incorporation of the HHx monomer to polymer and the temperature of  $30^\circ\text{C}$  preferentially improved the PHB synthesis and  $37^\circ\text{C}$  the biomass accumulation. Aiming to promote the synthesis of PHAs of medium chain length ( $\text{PHA}_{\text{MCL}}$ ), a third study was carried out in recombinant *E. coli*, DH10B and JM101 strains, harboring *Pseudomonas aeruginosa* PHA biosynthesis genes, using low cost carbon sources. Through an experimental design  $2^4$  was evaluated the composition of glucose syrup, cheese whey and soy oil of in mineral medium and acrylic acid addition as  $\beta$ -oxidation inhibitor for the  $\text{PHA}_{\text{MCL}}$  synthesis. The best experimental answers obtained for *E. coli* DH10 were DCM of  $0.95\text{g.L}^{-1}$ , 20% of PHA, with the accumulation of  $0.2\text{g.L}^{-1}$  of PHA, in mineral medium containing 5% glucose syrup, 5% of cheese whey and 5% of soy oil, beyond  $0.1\text{mg.L}^{-1}$  acid acrylic, and for *E. coli* JM101, DCM of  $0.85\text{g.L}^{-1}$ , 3% of PHA, with the accumulation of  $0.015\text{g.L}^{-1}$  of PHA, in mineral medium containing 5% glucose syrup, 5% of cheese whey and 1.5% of soy oil. With the same objective, several vegetal oils (cotton, rice, canol, african palm, sunflower, corn, olive, soy) were used for  $\text{PHA}_{\text{MCL}}$  accumulation by *E. coli* JM101, harboring *P. aeruginosa* PHA biosynthesis genes in mineral medium containing 5% of cheese whey and 1% of the respective vegetal oil. The highest PHA accumulation was obtained with african palm oil (11.64%). Finally, it was analyzed stability of the studied plasmids, which until 24h of culture had kept practically 100% of its stability.

## 1. Introdução

Plásticos são muito usados porque são moldáveis, versáteis quanto a aplicação e de baixo custo, além de serem duráveis. Estas mesmas características que os tornaram tão amplamente utilizados, os têm tornado um grande problema, devido ao seu acúmulo no meio ambiente.

Como resposta a uma crescente preocupação com os problemas ambientais causados pela produção e acúmulo de materiais plásticos de origem petroquímica bem e o esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, muitos países estão realizando estudos de gerenciamento e diminuição do volume de lixo sólido, bem como, buscando a produção de materiais plásticos biodegradáveis, a partir de fontes renováveis de carbono. Contudo, estes novos materiais plásticos devem possuir as propriedades desejáveis dos plásticos convencionais e ainda serem completa e rapidamente biodegradados quando descartados no meio ambiente (LEE, 1996b).

Os polidroxialcanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por inúmeras bactérias, como um material de reserva energética, geralmente quando um nutriente essencial, tal como, nitrogênio, fósforo, enxofre ou oxigênio, é limitado, na presença de excesso de fonte de carbono. Os PHAs são considerados fortes candidatos a material plástico biodegradável porque possuem propriedades similares a vários plásticos convencionais correntemente em uso (do polipropileno a borrachas sintéticas) e são completamente degradados a dióxido de carbono e água, quando descartados no meio ambiente

As vias bioquímicas para a síntese de PHAs têm sido estudadas em nível molecular. Os genes envolvidos na biossíntese de PHAs de várias bactérias foram clonados e analisados a nível molecular (STEINBÜCHEL, 1991; STEINBÜCHEL, *et al.* 1992; REHM; STEINBÜCHEL, 1999). O PHA mais estudado e bem caracterizado é o poli-3-hidroxiбутирато, produzido pela bactéria gram negativa *Ralstonia eutropha*. Neste microrganismo os genes estruturais *phaC*, *phaA* e *phaB* codificando, respectivamente, para a PHB sintase (polidroxibutirato sintase), a  $\beta$ -cetotiolase e a acetoacetyl-CoA redutase, estão organizados em um único operon (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SCHUBERT *et al.*, 1991; SLATER *et al.*, 1988).

As bactérias utilizam diferentes vias para converter intermediários da via central do metabolismo em tioésteres de hidroxiaçil-CoA (HA-CoA), os quais são substratos para as PHAs sintases, sob determinadas condições.

Um interesse particular tem sido dado a enzima da via de biossíntese de PHAs, a polidroxialcanoato sintase (PHA sintase). Esta enzima catalisa um passo fundamental desta via, que é a polimerização, propriamente dita, utilizando como substrato unidades de tioésteres de hidroxiaçil coenzima A (HA-CoA).

PHAs copoliméricos, constituídos de 3- hidroxialcanoatos de cadeia média (6 a 14 átomos de carbono), são sintetizados e acumulados em grande quantidade por várias *Pseudomonas sensu stricto* (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992). Neste caso, a composição dos monômeros de PHAs depende principalmente da fonte de carbono, das condições de cultivo e das vias metabólicas que levam à sua formação.

Tão importante quanto a biodegradabilidade dos PHAs, é o fato de que sua produção ocorre a partir de fontes de carbono renováveis. Alguns processos fermentativos, para a produção de PHAs, utilizam produtos agrícolas, tais como, açúcares e ácidos graxos, como fontes de carbono e energia. Estes produtos são derivados do CO<sub>2</sub> e água e, após sua conversão em PHAs, são novamente convertidos em CO<sub>2</sub> e água, fechando completamente o ciclo do carbono.

Embora os PHAs apresentem vantagens ambientais sobre os plásticos de origem petroquímica, estes possuem um alto custo de produção que limitam a aplicação comercial. Estes custos estão relacionados às exigências nutricionais dos microrganismos produtores. Para uma implementação bem sucedida do sistema de produção de PHAs, um requisito essencial é a otimização das condições de fermentação. O preço do PHA produzido dependerá de parâmetros tais como, custo do substrato, rendimento do produto em função do substrato gasto entre outros.

Do ponto de vista econômico, o custo do substrato (principalmente fonte de carbono) contribui mais significativamente com os custos de gastos de produção totais de PHAs (CHOI; LEE, 1997, 1999a, 1999b; LEE; CHOI, 1998). Uma avaliação econômica do processo de produção de P(3HB) indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global da produção, podendo representar mais de 38%, segundo Choi e Lee (1999b).

Amido de milho é disponível no Brasil como substrato de baixo custo, sendo que bons resultados têm sido obtidos utilizando-se esta fonte de carbono (GOMEZ *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1994). Soro de queijo é o principal subproduto na manufatura de queijo ou caseína de leite, representando entre 80-90% do volume de leite transformado (YANG *et al.*, 1994). Foram reportados uma série de artigos sobre a produção de PHAs em meio contendo soro de queijo como substrato (JANES *et al.*, 1990; FIDLER; DENNIS, 1992; LEE *et al.*, 1997; CHOI *et al.*, 1998; WONG; LEE, 1998; KIM *et al.*, 2000; AHN *et al.*, 2000, 2001). Óleos e gorduras são co-produtos renováveis e de baixo custo provenientes da agricultura, havendo ainda poucas publicações sobre o uso destes na produção de PHAs (FUKUI; DOI, 1998).

Para reduzir o custo do substrato, linhagens recombinantes que utilizam fontes de carbono de baixo custo e correspondentes estratégias de cultivo vêm sendo desenvolvidas (Lee, 1996) em substituição aos organismos produtores naturais de PHAs, que apresentam longos tempos de replicação, temperaturas de cultivo limitadas, resistência a lise e vias de degradação do produto formado, além exigirem condições limitantes de nutrientes, para produção. Bactérias, tais como *Escherichia coli*, não possuem a capacidade de sintetizar ou degradar PHAs em quantidades significativas destes polímeros. No entanto, *E. coli* cresce rapidamente e sob temperaturas elevadas (37°C) e são fáceis de lisar, o que facilita a extração dos polímeros, além de serem ótimos carregadores de genes heterólogos. Deste modo, a disponibilidade de genes, já clonados, envolvidos na biossíntese de PHAs facilita a construção de *E. coli* recombinantes, carregando os genes, dos produtores naturais, necessários para a produção de PHAs.

Por este motivo, microrganismos recombinantes estão cada vez mais sendo utilizados para a produção de biopolímeros e para a expressão de genes de outros produtos ou rotas metabólicas de interesse industrial. Mais comumente, genes recombinantes são clonados em plasmídios, embora novas tecnologias de inserção gênica em sítios cromossomais têm sido testadas com sucesso variável.

*E. coli* é comumente utilizada como bactéria hospedeira de vetores de clonagem, principalmente porque se trata de um sistema muito bem caracterizado. Apresenta as vantagens de possuir alto nível de expressão, podendo acumular mais de 80% de sua massa celular seca em polihidroxialcanoatos, o que disponibiliza a produção comercial; utiliza várias fontes de carbono, tais como sacarose, lactose e xilose, possibilitando a utilização de substratos de baixo custo, como melão, amido hidrolisado, soro de queijo, hemicelulose hidrolisada, gorduras e óleos vegetais; não possuem despolimerases intracelulares que degradam o PHA acumulado; produzem PHA desde o início do cultivo e necessita de menor controle durante o processo, pois não exigem limitação de nutrientes para induzir sua produção. E há ainda a possibilidade de produzirem novos biopolímeros, com propriedades plásticas interessantes, através da do emprego de técnicas de bioengenharia genética (FIDLER; DENNIS, 1992; LEE; CHANG, 1993; LEE, 1996b, 1996d; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998; MADISON; HUISMAN, 1999).

Por outro lado, o nível de expressão gênica influencia, obviamente, o diferencial da taxa de crescimento específico das células recombinantes e não-recombinantes, afetando profundamente a dinâmica da população de microrganismos e os níveis de produtividade, pois as células recombinantes são metabolicamente sobrecarregadas, quando comparadas às células não-recombinantes (AYUB, 2000).

Considerando o custo industrial e alto valor agregado dos produtos obtidos por cultivo de microrganismos recombinantes, o estudo dos mecanismos da instabilidade gênica também se torna de fundamental importância.

No presente estudo utilizou-se como ferramenta planejamentos experimentais, que consistem num conjunto de técnicas freqüentemente utilizado em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (parâmetros) sobre variáveis de saída (respostas). Por meio do planejamento experimental, a análise de um determinado processo é realizada utilizando-se um número menor de experimentos quando comparado a metodologias convencionais, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação, com redução de tempo e custos (BOX *et al.*, 1978; KHURI; CHORNELL, 1987;).

Assim, de acordo com as estratégias de cultivo e o número de fatores que se julgou relevante o estudo da influência, diferentes planejamentos experimentais foram executados, variando do 2<sup>3</sup> (amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja), 2<sup>4</sup> (amido de milho hidrolisado, soro de queijo, óleo de soja, concentração de ácido acrílico) e 2<sup>5</sup> (concentrações de inóculo, IPTG e ácido acrílico e tempo e temperatura de cultivo).

Desta forma, o presente trabalho apresentou como objetivo geral:

- Avaliar a produção de polidroxialcanoatos por *Escherichia coli* recombinante utilizando substratos e suplementos de baixo custo;

E teve como objetivos específicos:

- Avaliar a produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo os genes estruturais das PHA sintases de *R. eutropha* e *P. aeruginosa*, utilizando substratos (óleo de soja, amido de milho hidrolisado) e suplemento (soro de queijo) de baixo custo.

- Estudar os efeitos de temperatura, tempo de cultivo, adição de inibidor da beta oxidação de ácidos graxos (ácido acrílico), adição de indutor da expressão gênica (IPTG) e concentração de inóculo sobre a produção de PHB por *E. coli* recombinante, ancorando os genes estruturais para a biossíntese de PHAs de *R. eutropha*.

- Avaliar a produção de PHAs de cadeia média por *E. coli* recombinante ancorando genes para a PHA sintase de *P. aeruginosa*, utilizando diferentes óleos vegetais como substrato.

- Avaliar a estabilidade dos plasmídios utilizados neste estudo nas linhagens de *E. coli* empregadas.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Polihidroxicanoatos (PHAs)

Polihidroxicanoatos (PHAs) são poliésteres sintetizados por várias bactérias e armazenados na forma de inclusões citoplasmáticas como reserva energética e poder redutor. Estes polímeros têm atraído recentemente muita atenção por causa de seu uso potencial como termoplásticos biodegradáveis e elastômeros, além de poderem ser produzidos a partir de substratos renováveis (BIROM 1987; ANDERSON; DAWES 1990; DOI 1990; HOLMES 1985; STEINBÜCHEL 1991; LEE 1996a, 1996b, 1996c; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH 1998; LEE; CHOI 1999a).

#### 2.1.1. Histórico

De todos os PHAs conhecidos, o polidroxibutirato (PHB) é o mais estudado e caracterizado, uma vez que foi o primeiro a ser descoberto e também é mais amplamente encontrado em bactérias (LEMOIGNE, 1929).

Processos biotecnológicos fermentativos para a produção de poli(3HB) e poli(3HB-co-3HV) usando linhagens de *Alcaligenes latus* e *Ralstonia eutropha* (anteriormente classificada como *Alcaligenes eutrophus*) foram estabelecidos desde o fim da década de 1970 e forneceram materiais para a manufatura de vários produtos. Atualmente, processos fermentativos para a produção de alguns outros tipos de PHAs têm sido desenvolvidos. Em vista disto, considerável progresso tem sido alcançado na análise bioquímica e molecular das rotas metabólicas de PHAs em diferentes bactérias. O conhecimento obtido destes estudos tem sido usado para estabelecer novos processos para a produção fermentativa de PHAs através de bactérias recombinantes e também para estabelecer rotas biossintéticas de PHA em organismos eucariotos (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

A primeira produção industrial de PHAs ocorreu em 1982 pela Imperial Chemical Industries (ICI), que os comercializou sob o nome industrial de Biopol. O Biopol foi utilizado desde 1990 na Alemanha para manufaturar frascos de xampu para a indústria de cosméticos Wella. Atualmente, a produção da ICI é comercializada pela Monsanto (BRAUNEGG *et al.* 1998).

A produção de PHAs no Brasil começou a ser estudada em 1990. Um projeto de pesquisa reuniu o Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), a Universidade de São Paulo (USP) e a Copersucar, para iniciar os estudos de PHA no Brasil, visando a produção de plásticos biodegradáveis a partir da cana-de-açúcar por via

biotecnológica. Como resultado, a Copersucar está produzindo o homopolímero P(3HB) e o copolímero P(3HB-co-3HV) em escala piloto, utilizando a linhagem *R. eutropha* DSMZ 545 (RODRIGUES, 2002).

### 2.1.1. Propriedades e características

As propriedades e características do ácido poli(3-hidroxibutírico), P(3HB), em alguns aspectos, assemelham-se às das do polipropileno: termoplástico, biodegradável, pode ser produzido a partir de recursos renováveis, não tóxico, biocompatível, grau elevado de polimerização, insolúvel em água, altamente cristalino se extraído de seu ambiente natural, oticamente ativo, isotático (i.e. regularidade estereoquímica em suas unidades repetidas) e piezoelétrico (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

A repetição das unidades na estrutura dos PHAs depende das espécies bacterianas e o comprimento da cadeia da fonte de carbono alimentada durante a síntese. Contudo, muitos dos precursores usados para crescimento celular e síntese do polímero podem conter uma ampla variedade de grupos funcionais que, quando inseridos à cadeia polimérica, geram um polímero quimicamente funcional, permitindo modificar as propriedades do material (FULLER, 1999).

A facilidade de purificação e preparo, sem a presença e contaminação por resíduos de metal que funcionam como catalisadores, caracteriza o P(3HB) como um potencial substituto de materiais como gelatina, proteínas e polímeros de ácido lático nos processos de microencapsulação (LU *et al.*, 2001).

A resistência à água, à radiação ultravioleta e a impermeabilidade ao oxigênio tornam o P(3HB) adequado para ser usado na confecção de embalagens alimentícias (WEINER, 1997; GROTHE *et al.*, 1999).

O PHA é um tipo promissor de material termoplástico que pode substituir polímeros sintéticos tais como policarbonato, polipropileno, polietileno e poliestireno para aplicações em materiais com vida curta devido às suas propriedades mecânicas muito similares, e à real biodegradabilidade do PHA no ambiente (WEINER, 1997; YU, 2001) e as suas propriedades podem ser alteradas e aumentadas pela manipulação ou modificação de sua composição química (WEINER, 1997; SIM *et al.*; 1997).

O P(3HB) apresenta boa processabilidade em equipamentos comumente usados para processamento de poliolefinas e outros plásticos sintéticos, tornando-se adequado para moldagem por injeção, extrusão, indicando que PHAs podem ser adequados para aplicações em várias áreas como um substituto parcial dos plásticos sintéticos não biodegradáveis (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998). Contudo, o P(3HB-co-3HV) apresenta maior

utilidade que o P(3HB) devido às suas propriedades termomecânicas. As unidades repetidas de 3HV na cadeia polimérica reduzem a dureza, a cristalinidade e o ponto de fusão do polímero, aumentando, dessa forma, a flexibilidade e elasticidade e, conseqüentemente, sua resistência ao impacto e melhorando sua processabilidade (BYROM, 1987; WEINER, 1997).

### **2.1.2. Aplicações**

Os polihidroxicanoatos foram inicialmente utilizados para a produção de garrafas, filmes e fibras para embalagens biodegradáveis e como filmes envoltórios de adubo para agricultura (BYROM, 1987; STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998; SCOTT, 2000).

Todavia, sendo biomateriais, podem ser usados de forma direta, como suplemento, ou de modo a substituir as funções dos tecidos vivos do corpo humano, uma vez determinada a sua biocompatibilidade com o hospedeiro. Combinados a outros biomateriais podem ser utilizados em enxerto de ossos para preencher os defeitos ou substituir os ossos fraturados (RAMAKRISHNA *et al.*, 2001). Também podem ser usados como material osteossintético, em placas de ligação (GROTHER *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2001) e suturas cirúrgicas (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

Podem ser aplicados como matriz em materiais retardantes para a liberação controlada de drogas, hormônios, herbicidas, inseticidas, flavorizantes e fragrâncias na medicina, agricultura, indústria farmacêutica e indústria de alimentos (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998) ou atuarem como matéria-prima para a síntese de enantiômeros químicos puros e na produção de tintas (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

Os polihidroxicanoatos apresentam ainda potencial para aplicações terapêuticas. Polímeros contendo monômeros na forma 4-hidroxibutirato, P(4HB), são empregados na forma de sais de sódio como anestésico (SUDESH *et al.*, 2000).

### **2.1.3. Biodegradação**

Uma importante característica dos PHAs é sua biodegradabilidade. Na natureza, vários microrganismos são hábeis para degradar PHAs pelo uso de PHA hidrolases e PHA despolimerases. As atividades destas enzimas podem variar e dependem da composição do polímero, sua forma física (amorfa ou cristalina), as dimensões das amostras e das condições ambientais (MADISON; HUISMAN, 1999).

P(3HB) e outros PHAs podem ser completamente degradados a dióxido de carbono e água (e metano sob condições anaeróbicas) pelos microrganismos no ambiente, sendo facilmente degradado no solo (GROTHER *et al.*, 1999). A degradação enzimática de P(3HB) é afetada por sua estereocomposição e tacticidade. Os P(3HB)s com conformação R sofrem degradação enquanto que aqueles com unidades repetidas da conformação S não são degradáveis (GRODZINSKI, 1999). O tempo de degradação do produto formado por P(3HB) é da ordem de poucos meses (digestão anaeróbica) a anos (água do mar) (MADISON; HUISMAN, 1999).

A biodegradação dos polímeros ocorre por dois mecanismos distintos, dependendo da natureza do polímero e do ambiente. O primeiro é a hidrólise biótica ou abiótica seguida por bioassimilação (hidrobiodegradação), que é o processo primário envolvido na biodegradação das heterocadeias poliméricas tais como celulose, amido e polésteres alifáticos, dos quais polímeros de ácido láctico (PLA) e polihidroxialcanoatos (PHAs) são típicos. O segundo é a peroxidação seguida por bioassimilação de produtos de baixa massa molar (oxobiodegradação), que é aplicada particularmente à cadeia de carbono dos polímeros (SCOTT, 2000).

## 2.2. Biossíntese de PHAs

Os poliésteres podem ser obtidos por quatro diferentes métodos: i) produção química; ii) produção biotecnológica (culturas com vários tipos de bactérias; culturas com linhagens de bactérias mutantes; culturas com bactérias e leveduras recombinantes; plantas transgênicas; síntese *in vitro* com enzimas isoladas); iii) combinação da produção biotecnológica e química (polimerização química de ácido láctico produzido por fermentação) e, iv) isolamento de fontes naturais como, por exemplo, isolar cutina de plantas. (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

Assim, para a produção biotecnológica, deve-se associar as rotas metabólicas centrais com as PHA sintases, a fim de se utilizar as rotas anabólicas e catabólicas para a síntese de tioésteres de HA-CoA e direcionar o fluxo metabólico dos tioésteres (REHM; STEINBÜCHEL, 1999), sendo que o metabolismo de aminoácidos, o ciclo do ácido cítrico, a rota da síntese *de novo* de ácidos graxos e as rotas de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos devem ser usados com este propósito (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUCH, 1998). A engenharia metabólica das rotas de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos em *Escherichia coli* empregando mutantes *fad* ancorando genes de PHA<sub>MCL</sub> sintases e inibidores da  $\beta$ -oxidação conduzem a um acúmulo de PHA<sub>MCL</sub> (LANGENBACH *et al.*, 1997; QI *et al.*, 1997; QI *et al.*, 1998).

### 2.2.1. Biossíntese de PHAs por *R. eutropha*

*R. eutropha* cataboliza os carboidratos pela via Entner-Doudoroff a piruvato, que pode então ser convertido através de desidrogenação a acetil-CoA (BRAUNEGG *et al.*, 1998), que segue para via de produção de PHA, gerando tanto homopolímeros P(3HB) quanto heteropolímeros P(3HB-co-3HV) (HOLMES, 1985).

As bactérias apresentam várias vias metabólicas para a síntese e decomposição de PHAs (LEE; CHOI, 1999). Estas estão ligadas ao estado metabólico da célula e ao fluxo de carbono através do metabolismo intermediário (BYROM *et al.*, 1987).

*R. eutropha* sintetiza o P(3HB) a partir de acetil coenzima-A por três reações sequenciais catalizadas por 3-cetotiolase (acetil-CoA-acetiltransferase; EC 2.3.1.9); acetoacetil-CoA redutase (hidroxibutiril-CoA desidrogenase; EC 1.1.1.36) e poli(D-(-)-3-hidroxibutiril-CoA) sintase (PHB polimerase) (DAWES; SENIOR, 1973).

A primeira enzima na via de biossíntese de P(3HB), a  $\beta$ -cetotiolase, compete por acetil-CoA com várias outras vias metabólicas incluindo formação de acetato, formação de citrato e síntese de ácidos graxos. Essa enzima é inibida por moléculas de CoASH livres. Acetoacetil-CoA redutase, a segunda enzima na via de síntese de P(3HB), requer NADPH como cofator. Então, a atividade de acetoacetil-CoA redutase, bem como a quantidade e a razão de nicotinamida nucleotídeo, oxidada e reduzida, parece ser importante na regulação da síntese de P(3HB). Citrato sintase, a primeira enzima no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, não somente compete com  $\beta$ -cetotiolase por acetil-CoA mas também libera moléculas de CoA livres, o que afeta negativamente a síntese de P(3HB) (LEE *et al.*, 1995).

Sob condições balanceadas de crescimento, os níveis de CoASH são elevados. Em limitação de nutrientes essenciais ao crescimento, mas excesso de carbono, a formação de NADH inibe a citrato sintase, e níveis de acetil-CoA sobem ao ponto em que a inibição pela CoASH é superada. A reação de condensação a acetoacetil-CoA é possível e P(3HB) é sintetizado. A degradação do polímero é controlada através da oxidação de monômeros de 3-hidroxibutirato pela enzima 3-hidroxibutirato desidrogenase. Esta enzima está sujeita a inibição pelo acetato e NADH (BYROM, 1987).

O cofator  $\text{NAD}^+$  é usado para oxidações catabólicas que geram energia, enquanto que NADPH serve como fonte de poder redutor para biossíntese (FOSTER e MOAT, 1980).

Na via de produção de P(3HB), a acetoacetil-CoA-redutase é NADPH dependente, isto é, necessita de um agente redutor (NADPH) para catalizar a seguinte reação:



Visto que o metabolismo de carboidratos em *R. eutropha* ocorre pela via Entner-Doudoroff, o NADPH será derivado, principalmente, da ação de glicose-6-fosfato-desidrogenase (HAYWOOD *et al.*, 1998).

Embora NAD<sup>+</sup> e ATP não sejam requeridos nas três reações seqüenciais, é necessário considerar as regenerações de NAD<sup>+</sup>/NADH e ATP/ADP nas vias incluídas na biossíntese de P(3HB). Em condições aeróbicas, a reciclagem de NAD<sup>+</sup>/NADH é obtida, principalmente, pela cadeia respiratória, que é acompanhada pela produção de vários moles ATP.mol<sup>-1</sup> NADH oxidados (SHI *et al.*, 1997; YAMANE, 1993).

LEE *et al.* (1995) mostraram que as relações NADH/NAD<sup>+</sup> e NADPH/NADP<sup>+</sup> sob condições de limitação de nitrogênio foram superiores àsquelas sob condições suficientes de nitrogênio. Isso pode ser explicado pela análise da via metabólica de *Ralstonia eutropha* na Figura 1. Um fluxo aproximadamente constante para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e o bloqueio na via biossintética de aminoácidos, especialmente a reação de  $\alpha$ -cetoglutarato a glutamato que assimila o íon amônio no interior da célula, resultando em maior produção de NADPH. A maior concentração de NADPH acelera a biossíntese de P(3HB) uma vez que P(3HB) pode fornecer uma diminuição do excesso de equivalentes redutores.

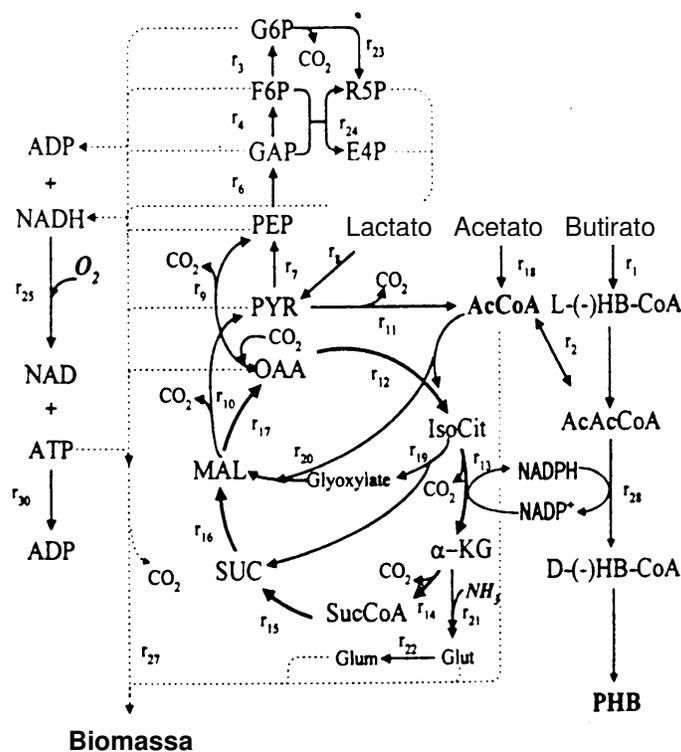


Figura 1. Via metabólica de *R. eutropha* a partir de diferentes substratos (LEE *et al.*, 1995)

Segundo KESSLER e WITHOLT (2001), a regulação do metabolismo de PHA pode ocorrer de formas diferentes:

- por ativação da expressão do cluster *phaCAB* devido ao sinal específico do ambiente, tal como limitação de nutriente;
- por ativação das enzimas para síntese de PHA por componentes específicos da célula ou intermediários metabólicos;
- por inibição de enzimas metabólicas das vias competitivas e aumento de intermediários requeridos para a síntese de PHA;
- por combinação dos fatores anteriores.

A regulação da biossíntese de PHA tem sido estudada em detalhes em diferentes bactérias. A síntese de PHA em *Ralstonia eutropha* é promovida quando o crescimento celular é restringido pela limitação ou carência de N, P ou O<sub>2</sub>. OEDING e SCHLEGEL (1973), mostraram que acetil-CoA é o metabólito regulador chave neste organismo, uma vez que esse pode participar do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou pode servir como um substrato para biossíntese de PHA. Estes autores mostraram também que a razão NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> é importante na regulação metabólica da biossíntese de PHA. Quando a razão NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> aumenta, sob limitação de nitrogênio, as enzimas citrato sintase e isocitrato desidrogenase são inibidas por NADH. Dessa forma, o fluxo de acetil-CoA dentro do ciclo TCA é diminuído e mais acetil-CoA é convertido a acetoacetil-CoA pela β-cetotiolase. Quando a concentração de nitrogênio é suficiente, a concentração de CoA, que é liberada como acetil-CoA dentro do TCA, é alta. A β-cetotiolase é inibida pela alta concentração de CoA, e, subsequentemente, a biossíntese de PHA é inibida.

SENIOR e DAWES (1971) propuseram que a síntese de P(3HB) não funciona apenas como reserva de carbono e energia, mas também para a diminuição do poder redutor, podendo ser considerado como regulador do poder de óxido-redução da célula. DAWES e SENIOR (1973) observaram que a síntese de P(3HB) foi acompanhada por um pronunciado aumento no poder redutor da cultura com concomitante queda nas taxas de utilização de oxigênio e evolução do gás carbônico concluindo, com isto que, durante a limitação de oxigênio, as células ajustam-se ao novo meio pela reoxidação do poder redutor, através da síntese de P(3HB).

### 2.2.2. Biossíntese de PHAs por *Pseudomonas*

A composição dos PHA<sub>SCL</sub> e sua relação direta com a estrutura de crescimento do substrato sugerem que a via metabólica para a biossíntese de PHA<sub>SCL</sub> é uma ramificação direta da via de oxidação de ácidos graxos, conforme pode se observar na Figura 2. Nesta via ácidos graxos são degradados para a remoção das unidades de C2, como acetil-CoA. O restante da via oxida acil-CoAs a 3-quetoacil-CoAs via intermediários de 3-hidroxiacil-CoA. A especificidade do substrato varia de C6 a C14 (R)-3-hidroxiacil-CoAs, com preferência à monômeros de C8 à C10. Todavia, devido ao intermediário (S)-3-hidroxiacil-CoA da  $\beta$ -oxidação, um passo adicional à biossíntese é requerido para a síntese do monômero (R)-3-hidroxiacil-CoA. De qualquer forma este precursor de PHA é o produto da reação catalisada por uma hidratase pela atividade da epimerase do complexo de  $\beta$ -oxidação, ou por uma 3-quetoacil-CoA redutase específica, sobre a qual se tem incerteza (HUISMAN *et al.*, 1989 LAGEVEEN *et al.* 1998).

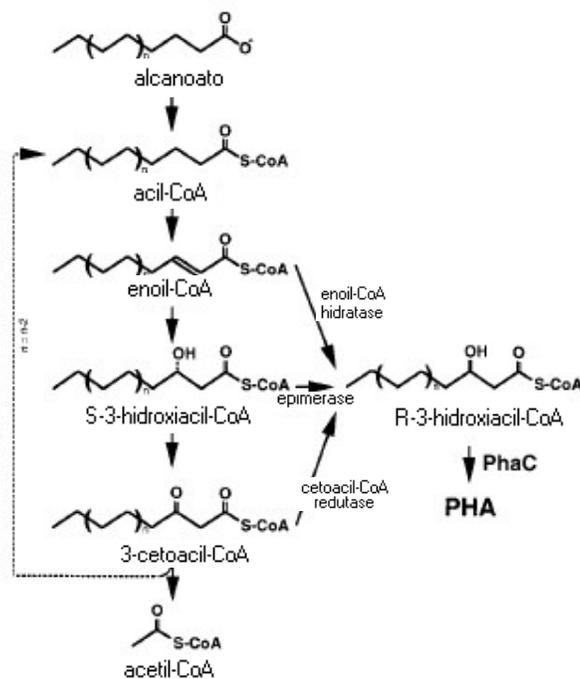


Figura 2. Via metabólica de para a biossíntese de PHAs por *Pseudomonas* (MADISON; HUISMAN,1999)

Em *Pseudomonas putida*, ao menos três diferentes rotas metabólicas ocorrem para a síntese de tioésteres de 3-hidroxiacil coenzimaA, os quais são substrato para a PHA sintase (HUIJBERTS *et al.*, 1994), (i)  $\beta$ -oxidação é a principal via metabólica quando ácidos graxos são utilizados como fonte de carbono (ii) biosíntese *de novo* de ácidos graxos é a principal via metabólica quando em fontes de carbono que não são metabolizadas à acetil-CoA, como gluconato, acetato ou etanol (iii) reações de alongamento de cadeia nas quais acetil-CoA moieties são condensadas em 3-hidroxiacil coenzimaA estão envolvidas na síntese de PHA durante o crescimento em hexanoato.

### 2.3. Clonagem e expressão de genes

A via bioquímica para a síntese de polihidroxiacanoatos tem sido estudada em nível molecular. Um interesse particular tem sido dado a enzima da via de biossíntese de PHAs, a polidroxialcanoato sintase (PHA sintase). Esta enzima catalisa um passo fundamental desta via, que é a polimerização, propriamente dita, utilizando como substratos os monômeros HA-CoAs. Os genes envolvidos na biossíntese de PHAs de várias bactérias foram clonados e analisados a nível molecular (STEINBÜCHEL, 1991; STEINBÜCHEL, *et al.* 1992; REHM; STEINBÜCHEL, 1999), sendo que a Tabela 1 apresenta uma lista contendo algumas das bactérias que tiveram suas PHA sintases clonadas e caracterizadas.

Tabela 1. Bactérias que tiveram suas PHA sintases clonadas e caracterizadas

Bactéria	Nº acesso Gene Bank	Referência
<i>Acinetobacter</i> sp.	L37761	SCHEMBRI <i>et al.</i> , 1994
<i>Aeromonas caviae</i>	D88825	FUKUI; DOI, 1997
<i>Alcaligenes latus</i>	Af078795	CHOI <i>et al.</i> , 1998
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	Aj006237	MANDON <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus megaterium</i>		MCCOOL; CANNON, 1996
<i>Burkholderia cepacia</i>		RODRIGUES <i>et al.</i> , 2000
<i>Chromatium vinosum</i>	L01112	LIEBERGESELL; STEINBÜCHEL, 1992
<i>Comamonas acidovorans</i>	Ab009273	SUDESH <i>et al.</i> , 1998
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i> N1		LIEBERGESELL <i>et al.</i> , 1993
<i>Lamprocystis roseopersicina</i> 3112		LIEBERGESELL <i>et al.</i> , 1993

(continuação)

Bactéria	Nº acesso Gene Bank	Referência
<i>Methylobacterium extorquens</i> IBT6	L07893	VALENTIN; STEINBÜCHEL, 1993
<i>Paracoccus denitrificans</i>	D43764	UEDA <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas ácidophila</i>		UMEDA <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X66592	TIMM; STEINBÜCHEL, 1992
<i>Pseudomonas citronellolis</i>	25	TIMM <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas mendocina</i>		TIMM <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	M58445	HUISMAN <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas putida</i> KT2442		HUISMAN <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas</i> sp. DSMZ1650		TIMM <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas</i> sp. GP4BH1		TIMM <i>et al.</i> , 1995
<i>Pseudomonas</i> sp. 61-3	Ab014757/AB014758	MATSUSAKI <i>et al.</i> , 1998 SLATER <i>et al.</i> , 1988;
<i>Ralstonia eutropha</i> H16	M64341	SCHUBERT <i>et al.</i> , 1988; PEOPLES; SINSKEY, 1989
<i>Rhizobium etli</i>	U30612	CEVALLOS <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhodobacter capsulatus</i>		KRANZ <i>et al.</i> , 1997
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	L17049	HUSTEDE; STEINBÜCHEL, 1993
<i>Rhodococcus ruber</i> PP2	X66407	PIPER; STEINBÜCHEL, 1992
<i>Rhodospirillum rubrum</i>		CLEMENTE <i>et al.</i> , 1998
<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC25903		CLEMENTE <i>et al.</i> , 1998
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 41	X93358	TOMBOLINI <i>et al.</i> , 1994
<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Slr1830/29	KANEKO <i>et al.</i> , 1996; HEIN <i>et al.</i> , 1998
<i>Syntrophomonas wolfei</i>		MCINERNEY <i>et al.</i> , 1992
<i>Thiocystis violacea</i> 2311	L01113	LIEBERGESELL; STEINBÜCHEL, 1993
<i>Thiocapsa pfennigli</i> 9111		LIEBERGESELL <i>et al.</i> , 1993

REHM; STEINBÜCHEL, 1999

Em *Ralstonia eutropha*, os genes estruturais *phaC*, *phaA* e *phbB* codificando, respectivamente, para a PHB sintase (polidroxibutirato sintase), a  $\beta$ -cetotiolase e a acetoacetyl-CoA redutase, estão organizados em um único operon (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SCHUBERT *et al.*, 1991; SLATER *et al.*, 1988). Para converter intermediários da via central do metabolismo em tioésteres de hidroxialcyl-CoA (HA-CoA), os quais são substratos de todas as PHAs sintases, as bactérias utilizam diferentes vias. Os PHAs constituídos de 3-hidroxialcanoatos de cadeia média (6 a 14 átomos de carbono) são sintetizados e acumulados em grande quantidade por várias *Pseudomonas sensu stricto* a partir de intermediários da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992). A composição dos co-monômeros de PHAs depende principalmente da fonte de carbono, das condições de cultivo e das vias metabólicas que levam à sua formação.

A via de biossíntese de PHB mais estudada e conhecida é a apresentada pela bactéria gram negativa *Ralstonia eutropha*. Além de seus genes já conhecidos para a biossíntese de PHAs, identificou-se a aproximadamente 4 kbp abaixo de seu operon um segundo gene codificando uma  $\beta$ -cetotiolase (*bktB*). Diferente da primeira  $\beta$ -cetotiolase, a segunda é capaz da síntese de 3-cetovaleril-CoA. Enquanto em algumas bactérias estudadas (*Alcaligenes latus*, *Burkholderia cepacia*) a organização do operon parece ser muito semelhante a de *R. eutropha*, em outras (*Acinetobacter* sp, *Pseudomonas* sp.) estes genes, embora agrupados, organizam-se de uma outra maneira. *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas* sp. 61-3 possuem dois genes *phaC* diferentes, em seus genomas, os quais encontram-se separados por um gene codificando uma PHA despolimerase.

Com relação à estrutura primária deduzida a partir destas seqüências e com respeito a especificidade pelo substrato, três diferentes tipos de PHA sintases puderam ser destacadas: (a) PHA sintases do tipo I, as quais utilizam como substrato 3HA-CoA, chamados de cadeia curta, contendo de 3 a 5 átomos de carbono, sendo que *R. eutropha* é o mais estudado representante deste grupo, produzindo homopolímero PHB (polidroxibutirato) ou o copolímero PHB-co-HV (polidroxibutirato-co-valerato). A estrutura primária das sintases deste grupo exibe 36,8 a 39,0 % de identidade entre seus resíduos de aminoácidos (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992); (b) PHA sintases do tipo II, as quais utilizam como substrato, 3HA-CoA de 6 a 14 átomos de carbono, sendo *Pseudomonas aeruginosa*, um dos representantes deste grupo, produzindo PHA<sub>MCL</sub> (polidroxialcanoatos de cadeia média). A similaridade entre as estruturas primárias das PHA<sub>MCL</sub> sintases está entre 53,7 e 79,6% de resíduos de aminoácidos idênticos (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992); (c) PHA sintases do tipo III, tais como as que ocorrem *Chromatium vinosum*, que diferem das do primeiro tipo quanto ao peso molecular (35 a 40% menores) e por de apresentarem somente 21 a 27 % de similaridade entre os resíduos de

aminoácidos das sintases pertencentes a este grupo. É importante ressaltar que as similaridades entre as sintases do tipo I e do tipo II estão na faixa de 34,4 a 39,9% (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

Embora as PHA sintases do tipo I sejam capazes de catalisar a biossíntese de copolímeros, contendo HA<sub>SCL</sub>-co-HA<sub>SLC</sub> e as PHA sintases do tipo II, copolímeros contendo HA<sub>MCL</sub>-co-HA<sub>MCL</sub>, nunca foi relatada a síntese de copolímeros contendo HA<sub>SCL</sub>-co-HA<sub>MCL</sub>, apesar da grande homologia existente entre as PHAs sintases dos dois grupos (STEINBÜCHEL *et al.*, 1992).

O conhecimento das estruturas primárias destas sintases, deduzidas a partir do sequenciamento dos genes estruturais de diferentes microrganismos, tem permitido uma comparação direta entre estas enzimas. Estudos têm sido realizados a fim de determinar que domínios protéicos, além do sítio ativo, estariam envolvidos na especificidade das enzimas pelos substratos. Ou seja, que resíduos de aminoácidos, próximos ou não do sítio ativo, tomam parte no reconhecimento de substratos HA<sub>SCL</sub> e HA<sub>MCL</sub>, pelas PHA sintases dos tipos I e II. A manipulação dos genes que codificam estas proteínas propiciará a síntese de copolímeros constituídos de monômeros de cadeia curta e média, os quais seriam polímeros totalmente novos com propriedades plásticas interessantes (ANTÔNIO, 2000).

O peso molecular dos PHAs é uma propriedade importante e depende de alguns fatores: (1) fisiologia, que é propriamente mais importante com respeito à provisão de HA-CoA tioesteres e, portanto, para a concentração de substratos para as PHA sintases, e também com respeito à disponibilidade de enzimas que hidrolizem PHAs, como as PHAs despolimerases (JENDROSSEK *et al.*, 1996) ou estereases inespecíficas e lipases (MUKAI *et al.*, 1993, JAEGER *et al.*, 1995). Se estas enzimas não forem providas, então PHAs de alto peso molecular podem ser produzidos. (2) nível de expressão da PHA sintase nas células, que também é muito importante, indicando que o aumento de concentração de PHA sintases acarreta na diminuição do peso molecular do polímero acumulado (SIM *et al.*, 1997; KRAAK *et al.*, 1997).

PHAs sintases do tipo I sintetizam PHAs de alto peso molecular (de aproximadamente 500.000 a alguns milhões de kDa), PHA sintases do tipo II, de aproximadamente 50.000 a 500.000 kDa, enquanto as PHA sintases do tipo III parecem sintetizar PHAs de peso molecular intermediário (REHM; STEINBÜCHEL, 1999).

## 2.4. Microrganismos produtores de PHAs

Os microrganismos capazes de acumular PHAs são geralmente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BYROM, 1987). Os microrganismos produtores de PHAs são divididos em dois grupos. O primeiro grupo requer a limitação de um dos nutrientes para a produção de PHAs, ao qual se tem como representantes, entre outros, *Ralstonia eutropha* e *Pseudomonas oleovorans*. O segundo grupo acumula PHAs já durante a fase de crescimento, sendo que a este grupo são pertencentes *Escherichia coli* e *Alcaligenes latus* (LEE, 1996b).

### 2.4.1. Produtores naturais

Outros gêneros bacterianos que apresentam ocorrência de P(3HB) são: *Acromonas*, *Actinomycetes*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Chlorogloea*, *Chromatium*, *Dexia*, *Ferrobacillus*, *Hyphomicrobium*, *Lampropaedia*, *Methylobacterium*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Sphaerotilus*, *Spirillum*, *Streptomyces*, *Vibrio* e *Zoogloea* (BYROM, 1987).

#### 2.4.1.1. Aeromonas

Foi mostrado que a PHA sintase de *Aeromonas caviae* foi apta a incorporar (R)-3HB-CoA, (R)-3HV-CoA, (R)-3HHx-CoA e (R)-3-hidroxiheptanoil-CoA [(R)-3HHp-CoA] em PHA (FUKUI; DOI, 1997; FUKUI *et al.*, 1997)

#### 2.4.1.2. Ralstonia

*R. eutropha* é uma das bactérias produtoras com maior potencial para produção desses biopolímeros devido ao alto conteúdo de polímero acumulado em suas células (DU *et al.*, 2001a).

#### 2.4.1.3. Azobacter

*Azotobacter* sp foi a primeira bactéria escolhida para a síntese industrial de P(3HB) por se capaz de utilizar sacarose e glicose como substrato. Entretanto foi rejeitada por produzir paralelamente um polissacarídeo, tornando o processo de difícil controle (BYROM, 1987).

#### 2.4.1.4. *Methylobacterium*

BOURQUE *et al.* (1992) usaram *Methylobacterium extorquens* para produzir P(3HB) a partir de metanol e P(3HB-co-3HV) a partir de metanol e valerato. Os autores consideraram o metanol um substrato interessante já que este tem relativo baixo custo, é de fácil manuseio, é completamente solúvel em água e possui baixa viscosidade. Entretanto, de acordo com BYROM (1992), o processo de produção é lento, gera uma baixa quantidade de polímero, que tem baixo peso molecular e extração difícil.

#### 2.4.1.5. *Pseudomonas*

*Pseudomonas* podem produzir tanto polihidroxialcanoatos de cadeia média quanto de cadeia longa (DE SMET *et al.*, 1983; FULLER *et al.*, 1988; PREUSTING *et al.*, 1991).

Relatou-se que PHAs de cadeia média (MCL) de C6 a C14, podem ser sintetizados por *Pseudomonas oleovorans* quando cultivado em alcenoatos, álcoois, alcanóis, alcanos ou alcenos como fontes do carbono, e o tipo e composição dos monômeros variará dependendo da fonte do carbono empregada (ANDERSON; DAWES, 1990; BRANDL *et al.*, 1988; LAGEVEEN *et al.*, 1988; LEE, 1996b).

#### 2.4.2. Produtores recombinantes

Após a clonagem dos genes da biossíntese de PHA de *R. eutropha* em *E. coli*, *E. coli* recombinante tem sido investigada para a produção de P(3HB) porque tem diversas vantagens sobre outras bactérias (FIDLER; DENNIS, 1992; LEE, 1997). Houve uma série de artigos que descreveram o desenvolvimento de sistemas utilizando plasmídios como vetores de clonagem e das estratégias para produzir uma concentração elevada de P(3HB) com produtividade elevada (LEE, 1994; LEE; CHANG, 1994; 1995b; LEE *et al.*, 1994; WANG; LEE, 1998).

Mesmo que uma concentração elevada de P(3HB) pudesse ser obtida por *E. coli* recombinante, a produtividade de P(3HB) era mais baixa do que aquela em *A. latus*. Pensou-se que o *A. latus* pudesse ter um mecanismo biosintético mais eficiente para a produção de PHA, e a *E. coli* recombinante ancorando os genes do biosíntese de *A. latus* pudesse produzir P(3HB) com produtividade mais elevada. Recentemente, CHOI *et al.* (1998) clonaram os genes do biosíntese de PHA de *A. latus* em *E. coli* selecionando os transformantes que mostram o fenótipo turbido no meio de produção de P(3HB). Diversos plasmídios foram construídos usando os genes da biosíntese de PHA de *A. latus* PHA para a produção eficiente de P(3HB) por *E. coli*. As linhagens recombinantes de *E. coli* que abrigam o fragmento inicialmente

clonado de DNA de 6,4-kb de *A. latus* produziram um conteúdo de P(3HB) de 50% da massa celular seca. Uma maior concentração P(3HB) e conteúdo de P(3HB) podiam ser obtidos suprimindo os fragmentos desnecessários do DNA acima do operon de biosíntese de PHA.

#### **2.4.2.1. Recombinantes naturais**

Considerando-se que produtores naturais de PHA têm acumulado PHA durante a evolução, eles geralmente têm um tempo de geração longo e uma temperatura ótima de crescimento relativamente baixa, são geralmente difíceis de serem lisados e contêm rotas para a degradação de PHA. Bactérias como *E. coli* não tem a capacidade de sintetizar ou degradar PHA, todavia *E. coli* cresce rapidamente a uma temperatura maior e é fácil de lisar. O mais rápido crescimento permite um tempo de ciclo menor para o processo de produção, enquanto a temperatura de crescimento mais elevada fornece uma economia de custos associada ao resfriamento do bioreator. A lise mais fácil das células proporciona economia de custos durante a purificação dos grânulos de PHA. Os efeitos da alteração dos níveis de expressão dos *pha* genes durante a formação de PHA têm sido estudados em produtores naturais de PHA (MADISON; HUISMAN, 1999).

#### **2.4.2.2. *E. coli* recombinante**

*E. coli* recombinante é capaz de acumular grandes quantidades de polímero, representando mais de 80% da massa celular seca (FIDLER; DENNIS, 1992; LEE, 1997). Além disso, *E. coli* pode utilizar várias fontes de carbono, incluindo sacarose, lactose e xilose, o que permite a produção de P(3HB) a partir de matéria-prima de baixo custo, tais como melão, soro de leite e hemicelulose hidrolisada (LEE, 1997; LEE; CHANG, 1993).

A disponibilidade de um grande número de genes biossintéticos de PHA facilita a construção de organismos recombinantes para a produção de P(3HB). Embora *R. eutropha* seja um excelente produtor de P(3HB), esta bactéria tem certas limitações que restringem sua utilização para a produção comercial de P(3HB). Por exemplo, cresce lentamente e é de difícil lise. Além disso, não é bem caracterizada geneticamente, o que não favorece sua manipulação adicional para melhorar seu desempenho industrial.

A produção de P(3HB) com sistemas recombinantes pode ser capaz de superar estas obstruções. *E. coli* recombinante pode ser potencialmente usada para dirigir-se a estes problemas, desde que é geneticamente bem caracterizada. A produção de P(3HB) em *E. coli* deve ser projetada porque este organismo não sintetiza naturalmente grânulos de P(3HB).

Desde que os primeiros genes do *phb* foram expressos em *E. coli*, uma variedade de outros polímeros, tais como P(3HB-3HV), P(3HB-4HB), P(4HB), e P(3HO-3HH) têm sido sintetizados por *E. coli*, seguindo as técnicas de DNA recombinante (MADISON; HUISMAN, 1999).

### **2.4.3. Produtores transgênicos**

#### **2.4.3.1. Insetos**

O gene *phaC* de *R. eutropha* foi expresso pela primeira vez em insetos na espécie *Trichoplusia ni*, por um sistema de infecção bacterioplasmal. A expressão foi tida como um sucesso, uma vez que após 60h, 50% do total de proteína era P(3HB) polimerase. Em contraste a outros sistemas recombinantes, a expressão do gene *phaC* em insetos permite uma rápida purificação da forma solúvel da P(3HB) polimerase (WILLIAMS *et al.*, 1996).

#### **2.4.3.2. Plantas**

Relatou-se o uso da planta *Arabidopsis thaliana* ancorando genes de biossíntese de PHA de *R. eutropha*. PORIER *et al.* (1992) obtiveram sucesso na expressão dos genes relacionados com a aceto-acetil-Coa redutase e PHA sintase no citoplasma de *A. thaliana*. Este experimento resultou na síntese de P(3HB) no citoplasma, núcleo e vacúolos de todo o tecido da planta, mas em pequenas quantidades e à custa de um crescimento retardado da planta. Em compensação, quando os três genes relacionados à síntese de PHA de *R. eutropha* foram expressos nos cloroplastos de *A. thaliana*, a planta transgênica exibiu um crescimento normal e teve um conteúdo de P(3HB) de aproximadamente 14% de sua massa celular seca (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998).

### **2.5. PHA produzido por linhagens recombinantes**

Morfologicamente, o número dos grânulos em *E. coli* e *R. eutropha* e seus tamanhos não são iguais, mesmo sendo sintetizados pelas mesmas enzimas (MIDDELBERG *et al.*, 1995). Usando-se calorimetria de exploração diferencial, análise termogravimétrica e ressonância magnética nuclear, mostrou-se que os grânulos em *E. coli* estão em uma forma mais cristalina do que os grânulos em *R. eutropha* (HAHN *et al.*, 1995). Isto pode ser porque *E. coli* recombinante produz P(3HB) de peso molecular mais elevado (KUSAKA *et al.*, 1997) ou por causa da ausência de proteínas específicas de aglomeração de P(3HB), tais como PhaP.

A diferença na cristalinidade foi atribuída a contribuir nas diferenças na degradação do polímero durante a purificação (HAHN *et al.*, 1995). Sugeriu-se que o aumento da cristalinidade deste P(3HB) de alto peso molecular impediu a ruptura vista para P(3HB) de produtores naturais, tais como *R. eutropha* (KUSAKA *et al.*, 1998). Desta forma, P(3HB) recombinante pode conseqüentemente ter aplicações para as quais P(3HB) natural não é qualificado.

Como descrito, a incorporação de outros monômeros no crescimento das cadeias de P(3HB) resulta em polímeros com propriedades mecânicas drasticamente alteradas e melhoradas. Conseqüentemente, os sistemas de produção recombinantes terão que poder facilitar a produção de uma variedade dos copolímeros (MADISON; HUISMAN, 1999).

FUKUI *et al.*, 1997 mostraram que a incorporação de uma pequena fração de 3-HHp em P(3HB-co-3HV-co-3HHp) reduz o ponto de fusão do PHA comparado aos de P(3HB-co-3HV). PARK (2001b) conclui que polímeros com diferentes propriedades materiais podem ser produzidos pela suplementação com diferentes ácidos graxos.

## **2.6. Produção de PHAs em *E. coli* recombinante**

Segundo WANG e LEE (1997b) o processo de fermentação em batelada com *E. coli* recombinante pode ser dividido em duas fases: (i) uma fase de crescimento ativa, na qual o conteúdo de PHB é mantido relativamente constante a um baixo nível e (ii) uma fase ativa de síntese de PHB, na qual PHB é ativamente acumulado com concomitante aumento do conteúdo de PHB. Quando o oxigênio é limitado durante a fase de crescimento ativo, o crescimento celular pára e não há aumento aparente no nível de PHB acumulado. Todavia, crescimento celular e acúmulo de PHB não são impedidos quando a limitação de oxigênio é aplicada durante a fase ativa de síntese de PHB. Explicam que isto se deve ao fato de que o acúmulo de acetato, que na fase inicial leva a concentrações críticas que inibem o crescimento, enquanto que na segunda fase, devido ao maior acúmulo de células e polímero, a quantidade de acetato no meio não é limitante.

### **2.6.1. Produção visando monômeros e copolímeros específicos**

#### **2.6.1.1. Produção de P(3HB)**

A primeira indicação que P(3HB) poderiam ser sintetizado em hospedeiros heterólogos foi obtida quando os genes de *phb* de *R. eutropha* foram clonados em *E. coli* e resultam na formação de grânulos de P(3HB) (PEOPLES; SINSKEY, 1989; SCHUBERT *et al.*, 1991; SLATER *et al.*, 1988). Os trabalhos subseqüentes na clonagem de genes de *phb* de outros

procariotos incluíram freqüentemente estudos similares da expressão heterológa. Entretanto, mesmo que *E. coli* recombinante possa sintetizar grânulos de P(3HB), falta a esta bactéria a habilidade de acumular os níveis equivalentes aos produtores naturais em meios definidos.

Um dos desafios de se produzir P(3HB) em organismos recombinantes é a expressão estável e constante dos genes durante o cultivo. A produção de P(3HB) por organismos recombinantes é freqüentemente retardada pela perda de plasmídio da maioria da população bacteriana (LEE *et al.*, 1993). Tais problemas da estabilidade podem ser atribuídos à carga metabólica exercida pela necessidade de replicar o plasmídio e sintetizar P(3HB), que desvia acetil-CoA a P(3HB) melhor que à biomassa. Além disso, o número de cópias dos plasmídios diminuem freqüentemente sobre cultivos contínuos porque somente algumas cópias fornecem a resistência antibiótica requerida ou impedem a morte celular mantendo o gene *parB* (MADISON e HUISMAN, 1999).

Por estas razões, KIDWELL *et al.* (1995) projetaram um plasmídio "*runaway*" para suprimir o número de cópias do plasmídio a 30°C e induzir a replicação do plasmídio deslocando a temperatura a 38°C (KIDWELL *et al.*, 1995). Usando este sistema, foram produzidos P(3HB) na ordem de 43% da massa celular seca, em 15h após a indução. Embora a produtividade encontrada fosse da mesma ordem de valor que dos produtores naturais de P(3HB), as linhagens que ancoram estes replicons "*runaway*" *parB*-estabilizados, perdem a capacidade de acumular P(3HB) durante cultivos prolongados.

Em uma comparação detalhada de linhagens recombinantes de *E. coli* produtoras de P(3HB), LEE *et al.* estudaram 10 linhagens diferentes equipadas com o um plasmídio *phbCAB parB*-estabilizado (LEE *et al.*, 1994b). Entre as linhagens do tipo selvagem, a *E. coli* B acumulou 76% de sua massa celular seca como PHB em meio LB com 2% glicose, enquanto *E. coli* W, K-12, e EC3132 formaram P(3HB) até somente 15 a 33% de sua massa celular seca. Linhagens típicas de clonagem, como XL1-Blue, JM109 e HB101, por outro lado, acumularam P(3HB) em níveis que variam de 75 a 85% da massa celular seca. Usando-se plasmídios estabilizados derivados de um outro meio ou plasmídios de elevado número de cópias, mostrou-se que somente os vetores de elevado número de cópias suportam o acúmulo substancial de P(3HB) em *E. coli* XL1-Blue (LEE *et al.*, 1994a). Pela suplementação de diferentes aminoácidos separadamente, foi aparente que a formação de P(3HB) em XL1-Blue recombinante é limitada pela disponibilidade de NADPH. A adição de outros aminoácidos ou oleato, ambos requerentes de uma substancial redução de equivalentes para sua síntese, geralmente aumentam os níveis celulares de P(3HB) (LEE *et al.*, 1995).

Embora *E. coli* recombinante XL1-Blue possa sintetizar níveis substanciais de P(3HB), seu crescimento é prejudicado pela filamentação dramática das células, especialmente em meio definido (LEE, 1994a; LEE *et al.*, 1997; WONG; LEE, 1997). Pela superexpressão de *FtsZ* nesta linhagem, a produção do biomassa foi melhorada em 20% e os níveis de P(3HB) foram dobrados (LEE; LEE, 1996).

ANTÔNIO *et al.* (2000) analisaram a especificidade da PHA sintase (tipo I) de *Ralstonia eutropha* e PHA sintase (tipo II) de *Pseudomonas aeruginosa*, em mutantes de *E. coli* afetados pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e em linhagem selvagem. A PHA sintase de *R. eutropha* foi expressa sozinha (pBHR70) ou acompanhada da  $\beta$ -cetotiolase e acetoacetil-CoA redutase (pBHR68) de *R. eutropha*. A PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa* foi expressa em combinação com o operon completo de *R. eutropha* (pBHR77).

Os cultivos foram realizados em meio LB contendo diversas fontes de carbono (1% (p/v) de glicose, 0,2% (p/v) de octanoato, 0,25% (p/v) de decanoato ou 0,25% (p/v) de dodecanoato), 0,5mM de IPTG e, em algumas situações, 0,24mg.mL<sup>-1</sup> de ácido acrílico, em frascos erlenmeyer de 300mL com 50mL de meio, a 37°C durante 48h.

Em *E. coli* JM109 ancorando pBHR70, na presença de glicose, obteve-se o máximo de 1,5% de PHA (100% 3HB, em mol). Para o plasmídeo pBHR68 obtiveram 80% de PHA (100% 3HB, em mol) a partir de glicose, e apenas 7% de PHA a partir de dodecanoato com ácido acrílico, sem a presença de outros monômeros além de 3HB. Para o plasmídeo pBHR77, 65% de PHA (100% 3HB, em mol) foi obtido a partir de glicose. Em *E. coli* LS1298 (*fadB*) ancorando pBHR70 obteve-se menos de 1% de PHA para as fontes de carbono estudadas. Para o plasmídeo pBHR68 acumulou-se 67% de PHA (100% 3HB, em mol) a partir de glicose. Nas outras fontes de carbono acumulou-se, em média, 15% de PHA, mas foi detectado 3HO a partir de octanoato e decanoato, e 3HO e 3HDD a partir de dodecanoato. Em dodecanoato contendo ácido acrílico, o acúmulo foi reduzido a 1,2% de PHA, sem a presença de outros compostos. Para o plasmídeo pBHR77 acumulou-se, em média, 53% de PHA nesta linhagem (100% 3HB, em mol) a partir de glicose e (21,4% 3HB, 6,2% 3HO, 51% 3HD e 21,4% 3HDD, em mol) para dodecanoato. Para a última linhagem estudada, RS3097 (*fadR*), os acúmulos foram mais baixos, sendo que a única condição em que se conseguiram outros monômeros, além de 3HB, foi para o plasmídeo pBHR77 em meio contendo dodecanoato mais ácido acrílico, onde dos 27% de PHA acumulados, 20%, em mol, foi referente a 3HB, 5,4% 3HO, 51% 3HD e 23,6% 3HDD. Em nenhuma das situações estudadas foi detectada a presença de 3HHx (ANTÔNIO *et al.*, 2000).

### 2.6.1.2. Produção de P(3HB-co-3HV)

A aplicação de engenharia genética em *E. coli* envolvendo a alteração do metabolismo endógeno para a produção de P(3HB-co-3HV) é preferível do que a introdução de genes especializados. A suplementação com propionato tem sido usada geralmente para a formação de P(3HB-co-3HV) em *R. eutropha*, e a estratégia inicial para a formação de P(3HB-co-3HV) em recombinantes foi conseqüentemente similar. Devido *E. coli* não metabolizar prontamente ácido propiônico, as culturas foram adaptadas em acetato, e então uma mistura de glicose-propionato foi adicionada (SLATER *et al.*, 1992). Este sistema foi melhorado usando linhagens de *E. coli* que têm a expressão constitutiva do operon *ato* regulon *fad* para expressar intensamente as enzimas da utilização do ácido graxos (FIDLER; DENNIS, 1992; SLATER *et al.* 1992).

O sistema *ato* transporta acetoacetato para a célula, e este é inicialmente ativado à acetoacetil-CoA por AtoAD. AtoAD é também capaz de transportar propionato à célula (CLARK; CRONAN JR., 1996). O regulon *fad* codifica enzimas para a completa degradação de ácidos graxos, incluindo uma tiolase de larga especificidade (CLARK; CRONAN JR., 1996). Esperava-se que a tiolase FadA fosse benéfica na via de formação de 3HV comparada a *phbA*. A fração 3HV no copolímero foi dependente da porcentagem de propionato usada durante a fermentação, mas nunca excedeu 40%. Tendo em vista que *E. coli* é resistente a 100mM de propionato (SLATER *et al.*, 1992) e que 30mM já são tóxicos para *R. eutropha* (RAMSAY *et al.*, 1990), sugeriram que cultivos para a formação de P(3HB-co-3HV) podem ser mais eficientes com linhagens de *E. coli* (SLATER *et al.*, 1992).

Em estudos subseqüentes, a formação do propionil-CoA foi estudada em linhagens com mutações no *ackA* e no *pta* ou em linhagens que superexpresssem Ack. Para a incorporação eficiente de 3HV em P(3HB-3HV), *E. coli* requer as atividades de Pta e de Ack, embora a indução da acetato acetil-CoA sintase possa também estar envolvida (RHIE; DENNIS, 1995). O produto do *prpE* é um homólogo recentemente descoberto da acetil-CoA sintase que realmente pode ser mais específico ao propionato (HORSWILL; ESCALANTE, 1997). Os sistemas de produção recombinantes para P(3HB-3HV) exemplificam a necessidade de alterar o metabolismo de *E. coli*, assim como o ajuste de estratégias de alimentação, a fim de produzir os copolímeros desejados. Como em *E. coli*, a mutação do *fadR* também permite *Klebsiella oxitoca* produzir P(3HB-3HV) quando crescida em glicose e propionato (ZHANG *et al.*, 1994).

YIM *et al.* (1996) relataram que estas *E. coli* recombinantes produtoras de P(3HB-co-3HV) são incapazes de vir a crescer a uma densidade elevada e conseqüentemente são inviáveis para os processos comerciais. Na tentativa de melhorar a produção de P(3HB-co-3HV) em recombinantes, quatro linhagens de *E. coli* (XL1-Blue, JM109, HB101, e DH $\alpha$ ) foram testadas. Todas as quatro linhagens recombinantes de *E. coli* sintetizaram P(3HB-co-3HV) quando crescidas em glicose e propionato, com frações de 3HV de 7%.

Ao contrário das linhagens previamente estudadas (SLATER *et al.*, 1992), XL1-Blue recombinante incorporou menos de 10% de 3HV quando a concentração de ácido propiônico foi variada entre 0 e 80 mM. A incorporação de 3HV e a formação de PHA foram aumentadas pelo pré-cultivo das células em acetato, seguido da adição do glicose-propionato em uma densidade celular ao redor de  $10^8$  células.mL<sup>-1</sup>. A suplementação com oleato também estimulou a incorporação de HV. Esta linhagem XL1-Blue recombinante, quando pré-crescida em acetato e com suplementação de oleato, alcançou uma massa celular de 8g.L<sup>-1</sup>, dos quais 75% eram P(3HB-3HV), com a fração de HV de 0,16 (YIM *et al.*, 1996).

CHOI e LEE (1999) estudaram estratégias de cultivo para a produção de P(3HB-co-3HV), com diferentes frações de 3HV, por *Escherichia coli* XL1-Blue recombinante, ancorando os genes para a biosíntese de polihidroxialcanoatos de *Alcaligenes latus* (pJC4), construído por CHOI *et al.*, em 1998. O cultivo foi realizado em frascos erlenmeyer de 250mL contendo 100mL de meio MR suplementado com 20g.L<sup>-1</sup> de glicose mais 20mM de ácido propiônico para a indução da fração 3HV a 30°C durante 60h. Testou-se ainda a indução por ácido acético, ácido oléico e a combinação de ambos, além da glicose e do ácido propiônico. As massas celulares secas obtidas variaram de 4,6 a 7,9g.L<sup>-1</sup> e a concentração de PHA entre 2,6 e 5,9g.L<sup>-1</sup>. As maiores frações de 3HV foram obtidas pela suplementação com ácido oléico (19,5%, em mol) e na combinação de ácido acético e ácido oléico (18,1%, em mol).

### 2.6.1.3. Produção de P(3HB-co-4HB) e P(4HB)

P(4HB) é produzido em *E. coli* pela introdução de genes de uma rota metabólica não relatada em um produtor de P(3HB). O gene *hbcT* de do *Clostridium kluyveri* codifica uma 4-hidroxibutírica acil-CoA transferase (HUISMAN; MADISON, 1999).

HEIN *et al.* (1997) cultivaram *E. coli* XL1-Blue ancorando plasmídios a PHA sintase (*phaC*) de *Ralstonia eutropha* e a *orfZ* de *Clostridium kluyveri*, que codifica uma 4-hidroxibutirato coenzimaA transferase (nas posições linear e anti-linear) em meio LB com glicose e 4-hidroxibutirato, produzindo homopolíéster de P(4HB). Na ausência de glicose, copolímero de P(3HB-4HB) foi sintetizado. Em meio mineral M9 (SAMBROOK *et al.*, 1989)

contendo 0,5% (p/v) de glicose e 0,4% (p/v) de 4-hidroxi-butirato como fontes de carbono, obtiveram o melhor resultado, consistindo num acúmulo de 58,5% de P(4HB) sobre a massa celular seca, quando o cultivo foi realizado em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 100mL de meio, por 96h à 37°C. O valor obtido foi aumentado para aproximadamente 80% de P(4HB) sobre a massa celular de 2,5g quando o cultivo foi realizado em frascos erlenmeyers de 2L contendo 1,7L de meio suplementado com 0,4 (p/v) de 4-hidroxi-butirato adicionado de 2% de glicose, nas mesmas condições de tempo e temperatura anteriormente descritas. Interessante notar que o homopolímero P(4HB) foi sintetizado na presença de glicose. Na ausência de glicose, um copolímero de P(3HB-4HB) foi acumulado com até 72% de 3HB, mesmo na ausência dos genes *phbA* e o *phbB*. Isto sugere que *E. coli* contém uma rota metabólica desconhecida que permite a conversão de 4HB em 3HB (HEIN *et al.*, 1997).

VALENTIN e DENNIS (1997) produziram P(3HB-co-4HB) diretamente de glicose. Isto foi realizado pela introdução da rota de degradação do succinato de *C. kluyveri* em um plasmídeo separado em uma linhagem de *E. coli*, ancorando um plasmídeo que abriga o gene da *phb* de *R. eutropha*. Este copolímero foi sintetizado pelo redirecionamento de succinil-CoA do ciclo do TCA para a 4-hidroxi-butiril-CoA via o semialdeído succínico e 4HB. P(3HB-co-4HB) foi acumulado em 46% da massa celular seca com 1,5% de 4HB.

#### **2.6.1.4. Produção de P(3HB-co-3HHx) e P(3HB-co-3HV-co-3HHx)**

PARK *et al.* (2001a) clonaram os genes da biossíntese de PHA de (*Aeromonas salmonicida achromogenes* (*phaJ*), a enoil-coA hidratase de *Aeromonas hydrophila* (*phaJ*), a redutase de *R. eutropha* (*phaB*) e o gene *orf1* de *A. hydrophila* em diversas linhagens de *E. coli* recombinantes para a produção de P(3HB-co-HHx). Em *E. coli* recombinante LS5218 foi obtida a maior fração molar de 3HHx, 18,9% sobre 10% de PHA e massa celular seca de 2,9g.L<sup>-1</sup> em meio MR (LEE *et al.*, 2000) contendo 5g.L<sup>-1</sup> de ácido dodecanóico e 0,5mM de IPTG, após 96h de cultivo em frascos erlenmeyer, à 37°C.

PARK *et al.* (2001b) em estudo posterior, reportam que a linhagem de *E. coli* recombinante LS5218 equipada com estes genes pode produzir terpolímeros de 3HB, 3HV e 3HHx, P(3HB-co-3HV-co-3HHx), em ácido dodecanóico adicionado de outros ácidos graxos com diferentes números de carbonos (ácidos valérico, heptanóico ou eneanóico), com o gene *orf1* desempenhando papel crítico na assimilação do monômero 3HV ao polímero.

A fração de 3HV no polímero foi altamente dependente da concentração do ácido graxo suplemento. À medida que as concentrações dos ácidos heptanóico e nonanóico foram elevadas, o conteúdo da fração de 3HV foi aumentado. Alcançou-se o valor máximo de 30,8%

em mol na concentração de 20mM de ácido nonanóico. Quando se acrescentou ácido valérico como suplemento, o aumento da sua concentração não teve o mesmo efeito no aumento da fração 3HV, sendo que a maior fração foi obtida na concentração de 10mM e diminuiu quando esta foi elevada, resultado da inibição do crescimento celular devido ao seu efeito tóxico à célula. Os demais ácidos graxos não apresentaram tal comportamento inibitório, que se deu devido à ativação pela rota metabólica do ácido valérico. A maior concentração de PHA obtida foi 0,49g.L<sup>-1</sup> para o meio suplementado com 10mM de ácido eleanóico.

TAGUCHI *et al.* (1999) reportaram o acúmulo de 3HB-*co*-3HHx através da clonagem do gene da 3-cetoacil-ACP redutase de *Eschechia coli* (*fabG<sub>Ec</sub>*) e da poli-3-hidroxiacanoato sintase de *Aeromonas caviae* (*phaC<sub>Ac</sub>*) em *Eschechia coli* recombinante, sugerindo que a superexpressão do gene conduz ao suprimento de (R)-3-hidroxiacil-CoA para a síntese de PHA via degradação de ácidos graxos.

#### 2.6.1.5. Produção de P(3HO-*co*-3HD)

Uma linhagem de *E. coli* foi projetada para produzir PHAs de cadeia média pela introdução dos genes *phaC1* e *phaC2* de *P. aeruginosa* em um mutante *fadB::Kan* (LANGENBACH *et al.*, 1997; QI *et al.*, 1997). Presumiu-se que este mutante acumulou intermediários da via de  $\beta$ -oxidação que poderiam ser incorporados pelas PHA polimerases. A linhagem de *E. coli* recombinante acumulou PHA até 21% da massa celular seca quando crescida em meio LB contendo decanoato. O polímero acumulou primeiramente 3-hidroxi-decanoato (73%) e 3-hidroxi-octanoato (19%) (LANGENBACH *et al.*, 1997). Os autores notaram que a mutação do *fadB* nesta linhagem foi uma mutação de inserção e não uma mutação pontual e notou-se ter uma atividade não detectável de FadAB. Se FadAB fosse o único complexo da  $\beta$ -oxidação em *E. coli*, se esperaria que esta linhagem não fosse capaz de degradar ácidos graxos para o acúmulo de monômeros de PHA.

O gene *phaC1* de *P. oleovorans* também dirige a formação de PHA em *E. coli*. As linhagens com mutação *fadA* ou *fadB* acumularam PHA até 12% da massa celular seca, quando crescidas em ácidos graxos composição entre C8 e C18 átomos de carbono. Substituindo o promotor selvagem de *phaC1* pelo promotor do lac, os níveis da polimerase foram induzidos, conduzindo a formação de 20 a 30% de PHA<sub>MCL</sub>, com PHA polimerase 1 ou 2. Este experimentos mostraram que a PHA polimerase é a única enzima dedicada para a biosíntese de PHA nas *Pseudomonas* e que atividades de enzima adicionais podem ser fornecidas por enzimas subordinadas (REN *et al.*, 1996).

## 2.6.2. Produção a partir substratos de baixo custo

Um dos problemas que impedem a aplicação comercial de P(3HB) é seu alto custo de produção. Do ponto de vista econômico, o custo do substrato (principalmente fonte de carbono) contribui mais significativamente com os custos de gastos de produção totais de P(3HB) (CHOI; LEE, 1997, 1999a, 1999b; LEE; CHOI, 1998). Para reduzir o custo do substrato, as linhagens recombinantes que utilizam fontes de carbono de baixo custo e correspondentes estratégias de cultivo vêm sendo desenvolvidas (LEE, 1996b).

Entre os substratos requeridos, a fonte de carbono assume primordial significância uma vez que os PHAs são compostos apenas de átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (SHI *et al.*, 1997; IAMANE, 1993). Alguns substratos relevantes para a produção de PHAs são: dióxido de carbono, recursos fósseis (metano, óleo mineral, lignita), recursos renováveis (amido hidrolisado, soro de queijo, glicerol) e algumas substâncias químicas (ácido propiônico, ácido 4-hidroxibutírico) (STEINBÜCHEL; FÜCHTENBUSCH, 1998). Segundo REHM e STEINBÜCHEL (1999) a produção de PHAs deve ser centrada na utilização de fontes de carbono de baixo custo: preferencialmente fontes renováveis, como hidratos de carbono e lipídios, produzidos pela agricultura.

Existem diversos estudos sobre a produção de P(3HB) através de fontes de carbono de baixo custo por produtores naturais de P(3HB) (KIM; CHANG, 1995, 1998). Todavia, a concentração de P(3HB) e o conteúdo de P(3HB) obtidos são consideravelmente mais baixos do que aquelas obtidas usando substratos purificados de carbono. Conseqüentemente, mais estratégias eficientes de cultivo devem ser desenvolvidas para uma produção eficiente de P(3HB) a partir de fontes de carbono de baixo custo. Diversas linhagens bacterianas podem produzir P(3HB) utilizando resíduos (SON *et al.*, 1996; CHOI *et al.* 1997). Se rejeitos industriais puderem ser usados como substratos para a produção de P(3HB), vantagens combinadas para a redução de custos e obtenção de produtos de valor agregado podem ser alcançados. Entretanto, até agora, somente baixos conteúdos de P(3HB) e produtividade foram conseguidos a partir de resíduos.

### 2.6.2.1. Amiláceos

Visando reduzir os custos de produção de PHAs, a utilização de alguns substratos alternativos faz-se importante. Resíduos orgânicos, tais como resíduos amiláceos, podem reduzir significativamente o custo de produção devido ao baixo custo da matéria-prima (YU, 2001).

ZHANG *et al.* (1994) examinaram linhagens de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* para a formação de P(3HB) em melaço, que custa de 33 a 50% menos do que glicose. A principal fonte de carbono no melaço é a sacarose. As linhagens de *E. coli* e *Klebsiella aerogenes* recombinantes, carregando o locus de *phb* em um plasmídio, crescido em meio mínimo com 6% de melaço de cana-de-açúcar acumularam P(3HB) a aproximadamente  $3\text{g.L}^{-1}$ , correspondendo a 45% da massa celular seca.

### 2.6.2.2. Soro de queijo

O soro de queijo é o principal subproduto da indústria de laticínios, representando de 80-90% do volume de leite transformado. A lactose é o principal componente do soro de queijo e muitas linhagens do *E. coli* podem utilizar a lactose para seu crescimento.

Foi reportado que PHB pode ter um acúmulo de acima de 90% da massa celular seca em *E. coli* recombinante, cultivadas em frascos erlenmeyer, em meio contendo soro de queijo como substrato (JANES *et al.*, 1990).

Diversas linhagens de *E. coli* recombinantes que abrigam os genes do biossintese de PHA de *R. eutropha* foram projetadas metabolicamente para a utilização de lactose e produção de P(3HB). LEE *et al.* (1997), através de estudos em frascos erlenmeyer, concluíram que *E. coli* recombinante, linhagem GCSC6576, alcançava os maiores conteúdos de P(3HB) (85% sobre a massa celular seca) entre outras linhagens, examinadas em meio definido contendo soro de queijo concentrado.

WANG e LEE (1998), dando continuação ao estudo anterior, avaliaram a produção de PHB em soro de queijo concentrado por *E. coli* recombinante GCSC6576, ancorando um plasmídio contendo o operon de *R. eutropha* para a síntese de PHA e o gene *ftsZ* de *E. coli* (LEE, 1994). Os cultivos foram realizados em fermentadores de 2,5L contendo meio mineral acrescido de  $35\text{g.L}^{-1}$  de solução de soro de queijo ( $700\text{g.L}^{-1}$ ). Obteve-se um acúmulo de 45,9% de PHB, em um total de 410g de solução de soro de queijo adicionada em 47h, a  $30^{\circ}\text{C}$  e 80% de PHB, quando soro de queijo, evaporado até a concentração de  $210\text{g.L}^{-1}$  de lactose foi utilizado, em 49h de cultivo, à  $30^{\circ}\text{C}$ . Segundo WANG e LEE (1998), a produção econômica de P(3HB) pode ser possível quando este processo é incorporado à indústria de laticínios. Através do controle da velocidade de agitação, KIM *et al.* (2000) conseguiram aumentar o acúmulo de PHB por recombinante *E. coli* em soro de queijo.

AHN *et al.* (2000) testaram cinco linhagens de *E. coli*, ancorando um plasmídio contendo os genes da biossintese de PHA de *Alcaligenes latus* (pJC4), descrito por CHOI *et al.*, em 1998. Os cultivos foram realizados em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 100mL

de meio MR, suplementado com 40g.L<sup>-1</sup> de soro de queijo (solução aquosa de 700g.L<sup>-1</sup>) a 30°C durante 96h. As concentrações de PHB obtidas variaram de 0,57 a 5g.L<sup>-1</sup>, sendo este último valor atingido pela linhagem CGSC4401, com o acúmulo de 76% de PHB sobre a massa celular seca.

A partir da seleção da linhagem CGSC4401 de *E. coli* recombinante, testaram-na através de cultivo em batelada alimentada, com pH controlado, em fermentadores de 6,6L, com o plasmídio que contem os genes da biossíntese de PHA de *Alcaligenes latus* (CHOI *et al.*, 1998). Os experimentos foram realizados em meio definido contendo uma solução de soro de queijo concentrado, correspondendo a 210 e 280g.L<sup>-1</sup> de lactose, respectivamente, sendo que para a última obteve-se um acúmulo de 80,5% em 37,5h de cultivo, a 30°C (AHN *et al.*, 2000).

Em estudo posterior, AHN *et al.* (2001) desenvolveram uma nova estratégia de fermentação usando um sistema de membranas de reciclo celular, mantida a mesma linhagem, plasmídio, meio e condições de cultivo e, ao final de 36,5h obtiveram uma produtividade 1,8 vez maior, com o acúmulo de 87% de PHB.

### 2.6.2.3. Óleos vegetais

A bibliografia não reporta trabalhos sobre a produção de polihidroxialcanoatos a partir de óleos vegetais por *E. coli* recombinante. ASHBY e FOGLIA (1998) investigaram a biossíntese de PHA por *Pseudomonas resinovorans* em meio E (BRANDL *et al.*, 1988) contendo 1% de diversas fontes de triglicerídios. Obtiveram uma massa celular média de 3,3g.L<sup>-1</sup> e um acúmulo de aproximadamente 45% de PHA. Entre os óleos vegetais estudados, o maior acúmulo de PHA deu-se em óleo de coco (1,9g.L<sup>-1</sup>), seguido por oliva (1,5g.L<sup>-1</sup>) e girassol e soja (1,3g.L<sup>-1</sup>). A composição média do polímero foi a seguinte: 0,5%, 8%, 34%, 32,5%, 15,5% e 9,5% de metil hidroxialcanoatos com 4, 6, 8, 10, 12 e 14 carbonos, respectivamente.

FUKUI e DOI (1998) estudaram a produção de PHA através do uso de óleos vegetais (milho, palma e oliva) por *R. eutropha* e um mutante contendo a PHA sintase de *Aeromonas caviae*. O cultivo foi realizado em meio mineral (DOI *et al.* 1995) acrescido de 1% de óleo, durante 72h. Os resultados foram bastante parecidos para os diversos óleos, sendo obtida uma massa celular seca média de 4g.L<sup>-1</sup> quando utilizada *Ralstonia eutropha* e 3,5 g.L<sup>-1</sup> para o mutante. A média de PHA acumulado foi de 80 e 78%, respectivamente, sendo que a não recombinante acumulou somente 3HB e o mutante 4%, em mol, de 3HHx.

MARANGONI *et al.* (2002), em resultados não publicados, estudaram sete óleos vegetais (algodão, canola, dendê, girassol, milho, oliva e soja) como suplemento (1%) em culturas de *R. eutropha* em meio mineral (MM) (ARAGÃO, 1996), acrescido de açúcar invertido, mantido na concentração de 30g.L<sup>-1</sup>, para o acúmulo de P(3HB-co-3HV). A biomassa e o acúmulo em massa médios de polímero obtidos foram de 0,5 e 0,15g.g<sup>-1</sup> de açúcar invertido, o que representa um acúmulo médio de 30% de polímero (92%HB, 8%HV, em mol), sendo que os melhores resultados foram obtidos, utilizando-se com óleo de girassol, a partir do qual obteve-se uma conversão de 0,84 e 0,31g.g<sup>-1</sup> de açúcar invertido, de massa celular seca e polímero, respectivamente.

#### **2.6.2.4. Xilose**

A xilose é um componente significativo da hemicelulose da madeira dura e dos resíduos da colheita, que tem sido estudada extensivamente na área da pesquisa de álcool combustível. Desenvolveram-se alguns estudos na produção de P(3HB) a partir de xilose, por *Burkholderia cepacia* (RAMSAY *et al.*, 1989; YOUNG *et al.*, 1994), mas a eficiência foi particularmente baixa.

Recentemente foi desenvolvida uma linhagem de *E. coli* recombinante que abriga os genes do biosíntese de PHA de *R. eutropha* que pode produzir P(3HB) a partir xilose (LEE, 1998). Em um meio quimicamente definido suplementado com xilose, a concentração de P(3HB) e o conteúdo de P(3HB) obtidos foram de 1,7g.L<sup>-1</sup> e 35,8%, respectivamente, cultivado em frascos erlenmeyers. A suplementação por uma fonte complexa de nitrogênio, tal como hidrolisado de feijão, melhorou a produção de P(3HB) para um nível de 74% da massa celular seca. Devido *E. coli* recombinante poder crescer facilmente a uma elevada densidade celular, é preferida em relação às outras bactérias que utilizam xilose. Assim, *E. coli* recombinante pode ser útil para a produção de P(3HB) a partir de hidrolisado de xilose ou hemicelulose (LEE, 1996b, 1998).

#### **2.6.3. Indutores e suplementos**

##### **2.6.3.1. IPTG**

Um dos primeiros requerimentos para a expressão de um gene estrutural em *E. coli* é que este seja colocado sob controle de um promotor. Idealmente este promotor deve ser um que atue sobre as linhagens nativas de *E. coli*. Isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosídeo (IPTG) é um composto utilizado na indução de genes sob regulação através do operon lac.

Sua atuação baseia-se na ligação da estrutura do repressor lac ao indutor isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG), que se sobrepõe na estrutura do repressor lac, ligada ao DNA. Esta ligação do IPTG induz mudanças estruturais que alteram a relação entre os domínios de ligação do DNA, que então passam a não mais poderem interagir efetivamente com o DNA (BERG *et al.*, 2001).

### 2.6.3.2. Ácido acético

YIM *et al.* (1995) estudaram o efeito sobre ácido acético na síntese de P(3HB-co-3HV) em *E. coli* (*fadR*, *atoC*), ancorando os genes para a biosíntese de PHA de *Ralstonia eutropha*. Eles reportaram que o ácido acético tem um efeito negativo sobre o crescimento celular e ainda reduz o fluxo de acetil-CoA na via de biosíntese do copolímero. Apesar disso, afirmam que a concentração inicial de 50mM de ácido acético, em meio contendo 20g.L<sup>-1</sup> e 20mM de ácido valérico é o melhor valor para o acúmulo do copolímero P(3HB-co-3HV).

### 2.6.3.3. Ácido acrílico

QI *et al.* (1998) avaliaram pela primeira vez a aplicação de ácido acrílico como inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, demonstrando que o mesmo pode ser usado para conduzir intermediários da  $\beta$ -oxidação em direção à síntese de PHA de cadeia média em *E. coli* recombinante. O cultivo de *E. coli* JM109 (pBHR71) em meio LB contendo decanoato 0,4% (v/v) e várias concentrações de ácido acrílico (1-4mM) resultaram no acúmulo de PHA de cadeia média. A concentração de 0,2mg.mL de ácido acrílico (2,8mM) foi o ótimo, em vista do acúmulo de PHA obtido em 29,9% (w/w). Em contraste, em *E. coli* JM109 (pBHR71) cultivada sem ácido acrílico, o conteúdo de PHA foi de apenas 1,1% da massa celular seca. Em *E. coli* RS3097, um mutante *fadR41(ts)* com  $\beta$ -oxidação não regulada, permitiu-se que com a repressão da  $\beta$ -oxidação o acúmulo de muito maiores quantidades de PHA. Desta maneira obteve-se um conteúdo de PHA de 48,1% em 3,95g.L<sup>-1</sup> de massa celular seca (em moles, 2,5% 3HH, 20% 3HO, 72% 3HD, 5,5% 3HDx), utilizando-se meio LB contendo decanoato 0,4% suplementado com 0,5% de glicose e ácido acrílico 2,8mM.

O ácido acrílico inibe a 3-cetoacil-CoA tiolase, que catalisa o passo final da  $\beta$ -oxidação da acetil-CoA da 3-cetoacil-CoA. O acil-Coa resultante reentra na rota de  $\beta$ -oxidação. A inibição da 3-cetoacil-CoA tiolase pode resultar no acúmulo de intermediários da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos.

#### 2.6.3.4. Ácido propiônico

O alto custo do ácido propiônico (aproximadamente US\$ 1.Kg<sup>-1</sup>), baixo conteúdo de polímero e baixa produtividade tem sido identificados como os maiores fatores no alto custo de produção do copolímero P(3HB-co-3HV) (DU *et al.*, 2001a).

O ácido propiônico é, contudo, muito tóxico às células, particularmente a altas concentrações. O baixo conteúdo de P(3HB-co-3HV) e produtividade são atribuídos ao efeito tóxico do ácido devido a uma estratégia imprópria de alimentação de ácido propiônico (DU *et al.*, 2001b).

#### 2.6.4. Custos

O uso de PHAs como substituto de plásticos derivados de petróleo depende da capacidade de se produzir poliésteres a custos competitivos (SIM, *et al.* 1997). Para a implementação bem sucedida de sistemas de produção comerciais de PHA tem-se como pré-requisito a otimização de todos aspectos das condições de cultivo. O preço de um produto obtido de PHA dependerá finalmente de parâmetros como custo do substrato, rendimento de PHA e eficiência da formulação do produto no processo de purificação Isto significa que altos níveis de PHA e um conteúdo de massa de célula seca elevado são desejáveis, assim como uma alta produtividade em termos de gramas do produto por unidade de volume e tempo (de KONING *et al.*, 1997a, 1997b).

Para que isto ocorra, é necessário a seleção adequada do microrganismo. É desejável que as cepas tenham velocidade específica de crescimento e de produção de PHA elevados, que possam utilizar substratos de baixo custo, que apresentem uma porcentagem elevada de PHA em relação a massa total seca e finalmente, é importante que haja um fator de conversão de substrato em PHA bastante elevado (RAMSAY, 1991).

O elevado custo de produção de PHA se deve, em grande parte, ao processo de extração do polímero. Para que este seja rentável, é necessário que a cepa produtora seja capaz de acumular pelo menos 60% de sua massa celular em polímero (RAMSAY *et al.*, 1990). Além disso, uma avaliação econômica do processo de produção de P(3HB) indica que o custo do substrato também tem uma contribuição importante no custo global da produção, podendo representar mais de 38%, segundo CHOI e LEE (1999b).

Um demonstrativo de que o P(3HB) de grau comercial ainda apresenta um preço muito elevado está no seu custo, aproximadamente 15 vezes maior que plásticos sintéticos similares, o que limita seu uso a nichos específicos. Biopol<sup>R</sup>, um copolímero de ácido  $\beta$ -hidroxibutírico e ácido  $\beta$ -hidroxivalérico produzido por *Ralstonia eutropha*, é vendido por aproximadamente 17 vezes o preço de um plástico sintético (DU *et al.*, 2001b; GROTHE *et al.*, 1999).

Desta forma, estudos têm sido realizados para tentar minimizar os custos de produção através da utilização de fontes de carbono de baixo custo, desenvolvimento de novas linhagens e técnicas mais eficientes para recuperação de polímeros (MARANGONI *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2001a; DU *et al.*, 2001b), além de uma melhor compreensão do metabolismo dos microrganismos produtores (BRAUNEGG *et al.*, 1998) a fim de alcançar melhores valores de velocidade específica de produção, produtividade e a obtenção de melhores fatores de conversão de substrato em produto, através do aperfeiçoamento dos sistemas de controle e desenvolvimento de novas técnicas de produção (SIM, *et al.* 1997; BRAUNEGG *et al.*, 1998).

## **2.7. Estabilidade de microrganismos recombinantes transformados com plasmídios**

Com o desenvolvimento das técnicas de genética e biologia molecular, cada vez mais microrganismos transformados estão sendo utilizados pela indústria para a produção de substâncias desejáveis, que são produzidos por genes clonados nos vetores de expressão (AYUB, 2000). Esses vetores de expressão (ou plasmídios) são elementos genéticos semi-autônomos que se replicam em paralelo ao cromossomo da célula hospedeira (BINGLE; THOMAS, 2001).

Um dos mais importantes fatores que determinam a habilidade de uma célula recombinante de expressar seus genes é a capacidade desta de manter os plasmídios, a qual se chama estabilidade plasmidial. Esta estabilidade pode ser afetada por diversos fatores tais como:

- velocidade específica de crescimento das células hospedeiras e das células sem plasmídio;
- características genéticas da cepa;
- características estruturais do plasmídio;
- estresse do meio provocado nas células;
- condições ambientais pré-existentes.

Devido a estes fatores leva-se a considerar uma certa probabilidade (p) de perda do vetor a cada geração (duplicação celular).

Existem dois tipos básicos de instabilidade dos plasmídios:

i) instabilidade de segregação, que é a perda do plasmídio durante a divisão celular devida a uma má distribuição dos plasmídios entre célula mãe e filha durante a divisão. Técnicas empregadas para evitar este tipo de instabilidade gênica tem sido o uso de seqüências de partição nos vetores, além do uso de vetores de alto número de cópias. Paradoxalmente, plasmídios de alto número de cópias podem gerar instabilidade na cultura devido aos efeitos da superexpressão gênica. A melhor forma de evitar este efeito, consiste em utilizar-se vetores com promotores indutíveis, concomitante com o uso de cultura a alta densidade celular em batelada alimentada.

ii) instabilidade estrutural, que é a perda causada por mudanças estruturais do plasmídio, devido a deleções ou rearranjos do DNA, o que pode acarretar a perda das funções genéticas desejadas. Geralmente, plasmídios de grande tamanho, tendem a ser muito mais instáveis do que plasmídios pequenos.

Outro fator importante a ser levado em consideração é que vetores cujos genes de interesse estão sob controle de promotores de alta expressão, geralmente apresentam efeito adverso na estabilidade de vetores recombinantes, devido à dois fatores: a) um aumento da freqüência de transcrição induzida pelos promotores fortes podem reduzir a eficiência da replicação plasmidial; b) elevada expressão do gene clonado perturba o metabolismo celular, reduzindo as taxas de crescimento celular das células com plasmídio (ZHANG *et al.*, 1996; AYUB, 2000)

### **2.7.1. Cinética da perda de plasmídios em culturas com microrganismos recombinantes**

O estudo da estabilidade de plasmídios muitas vezes requer o acompanhamento da cinética de crescimento celular por mais de 100 gerações, durante o qual as condições de cultura necessitam ser mantidas constantes.

Desde que na prática até hoje, células transformadas com plasmídios têm se mostrado muito menos estáveis do que o desejável, diversos métodos para suas estabilizações têm sido propostos e muitos modelos matemáticos que analisam a instabilidade de plasmídios em bactéria têm sido descritos. A técnica até aqui mais utilizada no controle de células sem plasmídio é o uso de meios seletivos (pressão seletiva ambiental), o que nem sempre é eficaz.

O desenvolvimento de modelos matemáticos para descrever a instabilidade de plasmídios em culturas microbianas é uma ferramenta que tem ajudado em muito o entendimento deste processo e a otimização das condições de operação de biorreatores com vistas a maximizar a produção celular e a expressão de genes clonados (ZABRISKIE; ARCURI, 1986; SATYAGAL; AGRAWAL, 1989; IMANAKA; AIBA, 1981, COOPER *et al.*, 1987).

Culturas mistas de células com plasmídio ( $X^+$ ) e sem plasmídio ( $X^-$ ) podem ser representados pelas seguintes equações estequiométricas:



onde S é a concentração de substrato e p é a probabilidade da célula perder o plasmídio durante a divisão celular.

Em um sistema de cultivo em batelada, a taxa de formação de células com e sem plasmídio é dada respectivamente pelas equações:

$$r_{X^+} = (1 - p) \cdot \mu^+ \cdot X^+ \quad (3)$$

$$r_{X^-} = p \cdot \mu^+ \cdot X^+ + \mu^- \cdot X^- \quad (4)$$

E a fração de células F com plasmídio em um determinado tempo, após n gerações pode ser calculado da seguinte forma:

$$F = (1 - \alpha - p) / (1 - \alpha - 2^{n(\alpha + p - 1)} \cdot p) \quad (5)$$

Onde  $\alpha$  é a relação entre as taxas específicas de crescimento e é dado por:

$$\alpha = \mu^- / \mu^+ \quad (6)$$

e n, número de gerações é dado por:

$$n = (\mu^+ \cdot t) / \ln 2 \quad (7)$$

Tipicamente,  $\alpha$  varia entre 1 e 2. Sob pressão seletiva,  $\alpha$  tenderá a valores próximos de zero e, se sob estas condições, a velocidade específica de células sem plasmídios ( $\mu^-$ ) for nula (casos em que o vetor codifica enzimas essenciais à biossíntese de nutrientes, por exemplo), então tem-se que  $F$  é aproximadamente 1.  $F$  também é dependente da probabilidade  $p$  de perda de plasmídio, que pode chegar a valores tão grandes como 0,1. Entretanto, se a única causa para instabilidade plasmidial são as mutações, inserções ou deleções aleatórias, então  $p$  é muito menor, cerca de  $1 \times 10^{-6}$  por geração.

A teoria para o estudo da instabilidade de plasmídios (IMANAKA; AIBA, 1981) é resumida a seguir. A expressão que calcula a taxa (relação) entre células recombinantes ( $X^+$ ) e células que perderam o vetor ( $X^-$ ), é dada por:

$$\frac{X^-}{X^+} = \left[ \frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]^n \frac{X_0^-}{X_0^+} + \left[ \frac{\sigma}{2 - \sigma} \right] \frac{1 - \left[ \frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]^n}{1 - \left[ \frac{\mu^- / \mu^+}{2 - \sigma} \right]} \quad (8)$$

Onde  $\sigma$  é o número de células sem plasmídio originadas das células com plasmídio por geração (coeficiente de segregação).

Qualquer modelo matemático que descreve a instabilidade de plasmídios deverá considerar principalmente dois fatores:

- taxas de perda do plasmídio causada pela segregação durante a divisão celular;
- diferenças entre as velocidades específicas de crescimento entre células recombinantes e mutantes (sem plasmídio).

Estes parâmetros foram observados por MOSER (1958) quando do desenvolvimento dos primeiros modelos matemáticos para a descrição da instabilidade genética de bactérias. Os estudos atuais da cinética de instabilidade de plasmídios ainda levam em consideração àqueles modelos, mas têm sido continuamente refinados.

## 2.8. Planejamento experimental e análise estatística

Planejamento experimental, ou fatorial, é um conjunto de técnicas freqüentemente utilizado em estudos de processos para investigações qualitativas ou quantitativas, explorando os efeitos e relações de variáveis de entrada (parâmetros) sobre variáveis de saída (respostas). Este processo pode atingir diferentes áreas, como a engenharia química, biotecnologia, pesquisas na área agrícola, melhoria de processos industriais novos e antigos, bem como em

processos que utilizam simulação computacional (BOX *et al.*, 1978; KHURI; CHORNELL, 1987; KALIL, 2000).

Por meio do planejamento experimental, a análise de um determinado processo é realizada utilizando-se um número menor de experimentos quando comparado a metodologias convencionais, permitindo a investigação do processo em uma faixa ampla de variação, com redução de tempo e custos.

Um dos métodos de avaliação do planejamento experimental é a análise e otimização através de superfícies e curvas de resposta. Obtêm-se assim relações empíricas entre uma ou mais respostas de interesse, que são medidas analíticas, e um determinado número de fatores, que são controlados e influenciam a resposta do processo. Desta forma, este estudo permite que se verifique, quantifique e otimize esta influência, sendo possível a obtenção das melhores condições para a realização de determinado processo e/ou para a obtenção de um produto com as características desejadas.

Para que o método de superfície de resposta seja aplicado, é necessário, primeiramente programar ensaios através de um planejamento experimental. Para tal, é preciso selecionar um número fixo de níveis (valores) para cada uma das variáveis de entrada (fatores) a serem investigadas, ou seja, especificar a faixa de análise do processo. A seguir executam-se experimentos com todas as combinações possíveis destes níveis e fatores.

Para que se tenha conhecimento de quais fatores realmente influenciam a resposta, é usual a utilização de planejamentos fatoriais com 2 níveis (nível -1 e nível +1). Assim para  $k$  variáveis envolvidas no estudo, são necessários  $2^k$  ensaios, capazes de investigar todas as combinações possíveis de experimentos (BOX *et al.*, 1978; BARROS NETO *et al.*, 1995).

Desta forma, um planejamento fatorial  $2^3$  consiste em realizar experimentos e registrar as respostas observadas, através de todas as combinações possíveis com as três variáveis em dois níveis, formando uma matriz de planejamento resultando em 8 experimentos, em que  $X_1$ ,  $X_2$ , e  $X_3$  são as variáveis escolhidas e os valores (-1) e (+1) referem-se aos níveis inferior e superior de cada, respectivamente.

De posse dos resultados obtidos no planejamento é possível calcular os efeitos principais e de interação das variáveis sobre as respostas, especificar os efeitos mais significativos e ajustar empiricamente um modelo linear, ou de primeira ordem, que correlaciona as variáveis de entrada e as respostas.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Materiais

##### 3.1.1. Microrganismo e plasmídios

O microrganismo utilizado foi a espécie bacteriana *Escherichia coli*, nas linhagens DH10B e JM101. Estas, enquanto sem plasmídio, foram preservadas em solução 0,9% NaCl à temperatura ambiente. Mas, quando ancorando plasmídeo, foram mantidas em meio ágar nutriente sólido (NA) sob refrigeração a 4°C e periodicamente repicadas, conforme o interesse. A composição deste meio é de 10g.L<sup>-1</sup> de peptona de carne, 5g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura e 20g.L<sup>-1</sup> de agar-ágar.

Excetuando-se a presença do gene *thi-1*, em JM101, que torna tiamina necessária para o crescimento em meio mínimo, nenhuma outra característica de genotipicidade é relevante para ambas cepas.

Em função de cada estratégia, proposta para a produção de diversos tipos de PHAs, dois diferentes plasmídios foram utilizados para tais fins, representados pelas Figuras 3 e 4. A Tabela 2 mostra as características genotípicas relevantes dos plasmídios e linhagens de *E. coli* utilizadas neste estudo.

Tabela 2. Características genotípicas relevantes dos plasmídios e linhagens de *E. coli*

Genótipos relevantes		Referência
Plasmídios		
pBHR68	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>phaA</i> , <i>phaB</i> e <i>phaC</i> de <i>R. eutropha</i>	SPIEKERMANN <i>et al.</i> , 1999
pBHR71 <i>E. coli</i>	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>phaC1</i> de <i>P. aeruginosa</i>	LANGENBACH <i>et al.</i> , 1997
DH10B	-	STRATAGENE, 1997
JM101	<i>thi-1</i>	STRATAGENE, 1997

*phaA*, *phaB* e *phaC*: genes codificando, respectivamente, para acetoacetil-CoA redutase, β-cetotiolase e PHA<sub>SCL</sub> sintase de *R. eutropha*

*phaC1*: gene codificando para a PHA<sub>MCL</sub> sintase de *P. aeruginosa*

*Amp<sup>r</sup>*: gene conferindo resistência a ampicilina

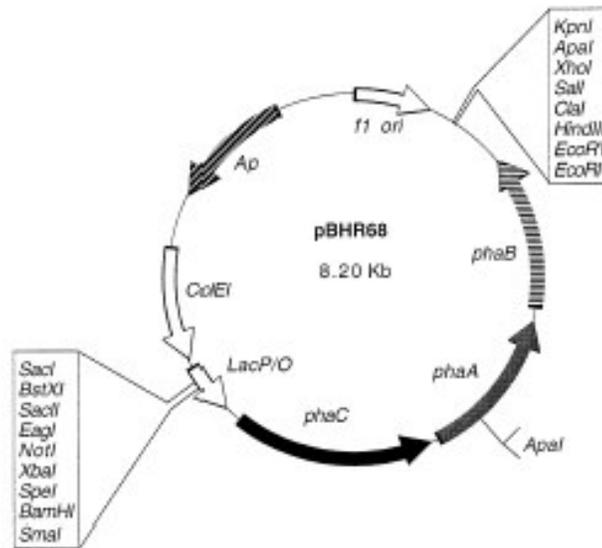


Figura 3. Plasmídeo pBHR68, ancorando os genes *Amp<sup>r</sup>* e *phaA*, *phaB* e *phaC* de *R. eutropha*

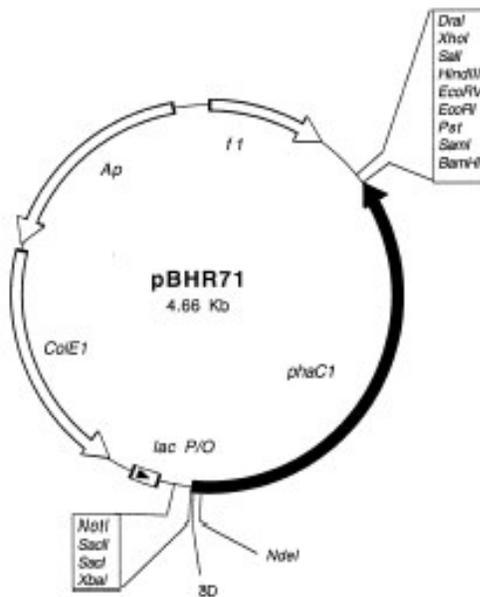


Figura 4. Plasmídeo pBHR71, ancorando os genes *Amp<sup>r</sup>* e *phaC1* de *P. aeruginosa*

Os plasmídios foram cedidos pelo Dr. Alexander Steinbüchel, do Instituto de Microbiologia da Westfälische Wilhelms Universität Münster, Münster, Alemanha. Com relação à manutenção dos plasmídios, esta foi feita sob refrigeração a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.2. Meios de cultura

Três meios de cultura líquidos foram utilizados nas etapas de pré-cultivo e cultivo, cujas composições são dadas a seguir. Um maior detalhamento quanto à sua etapa de utilização será fornecido quando forem relatadas as condições e estratégias de cultivo.

#### 3.1.2.1. Meio caldo nutriente (NB)

Foi utilizado nas etapas de pré-cultura, possui a seguinte composição:  $10\text{g.L}^{-1}$  de peptona de carne,  $5\text{g.L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $5\text{g.L}^{-1}$  de NaCl.

#### 3.1.2.2. Meio Luria-Bertani (LB)

Foi utilizado tanto nas etapas de pré-cultura quanto de cultura propriamente dita. Neste último caso, foi usado quando não era o objetivo principal a redução dos custos de produção pela utilização de substratos de baixo custo. Possui a seguinte composição:  $10\text{g.L}^{-1}$  de triptona,  $5\text{g.L}^{-1}$  de extrato de levedura e  $5\text{g.L}^{-1}$  de NaCl (BERTANI, 1951).

#### 3.1.2.3. Meio mineral (MR)

As linhagens de *E. coli* recombinante foram cultivadas em meio MR, quimicamente definido (LEE; CHOI, 2001), nos experimentos que visavam o uso substratos de baixo custo. Este meio contém (por litro): 6,67g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 4g de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0,8g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,8g ácido cítrico, 0,01g de tiamina,  $50\text{mg.L}^{-1}$  de ampicilina e 0,5mL de solução de metais traço.

A solução de metais traço contém, por litro de 5M HCl: 10g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2g de  $\text{CaCl}_2$ , 2,2g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,1g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e 0,02g de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ .

### 3.1.3. Substratos de baixo custo

Fez-se uso do amido de milho hidrolisado (Karo<sup>®</sup>) e óleo de soja (Primor<sup>®</sup>), como fontes de carbono, e soro de queijo como suplemento. Para outros experimentos fez-se o uso de oito tipos de óleos vegetais (algodão, arroz, canola, dendê, girassol, oliva, soja e milho) suplementados com soro de queijo, a fim de se avaliar a influência de cada um deles sobre a massa celular seca, acúmulo percentual, massa e tipo de PHA acumulado em cada situação.

O amido de milho hidrolisado foi preparado através da diluição da marca comercial a uma concentração de 60%, a fim de se alcançar 1% de glicose, conforme a composição do produto. O tratamento térmico foi realizado, em separado, através de esterilização a 121°C durante 15min

O soro de queijo utilizado foi cedido pela usina de beneficiamento de leite Papenborg - Laticínios Ltda, na localidade de Areias de Baixo, no município de Biguaçu, na grande Florianópolis, SC. A composição percentual, conforme o fornecedor, é de 94-95% de umidade, 4,2-5% de lactose, 0,8-1% de proteína, 0,1% de lipídios e 0,7-0,8% de sais minerais. O soro de queijo obtido foi separado em alíquotas e mantido congelado à -20°C até o momento de sua utilização.

O preparo deste substrato consistiu na homogeneização, recolhimento da quantidade (v/v) indicada pelo experimento e esterilização, junto ao meio mineral, a 121°C durante 15min. Os óleos vegetais receberam o mesmo tratamento térmico, sendo sua esterilização realizada também em conjunto com o restante do meio líquido.

#### **3.1.4. Soluções e tampões empregados**

##### **3.1.4.1. Tampão Tris-EDTA (TE)**

Adicionou-se 1mL Tris-HCl 1M (pH 7,4 - 8,0 à 25°C) a 200µL EDTA 0,5M (pH 8) e completou-se com H<sub>2</sub>O até 100mL.

##### **3.1.4.2. Tampão de lise (TENS)**

Em 94mL de TE adicionou-se 1mL NaOH 10N e 5mL SDS 10%.

##### **3.1.4.3. Tampão de neutralização (HSS)**

Em 7,85g de acetato de potássio adicionou-se 50mL de H<sub>2</sub>O, ajustou-se o pH em 4,5 com ácido fórmico e completou-se com H<sub>2</sub>O até 100mL.

##### **3.1.4.4. Solução de metanólise**

Misturou-se 15 mL de ácido sulfúrico concentrado a 85 mL de metanol p.a.

### 3.1.4.5. Solução de ampicilina

Utilizou-se uma solução estoque de ampicilina a  $100\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que foi filtrada com auxílio de filtro Millipore® de  $0,2\mu\text{m}$  e mantida em condições estéreis sob refrigeração.

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Preparo de células competentes para transformação

Baseado no método descrito por HANAHAN (1983). A partir de uma placa de petri transferiu-se uma única colônia da cepa a ser transformada para 25mL de meio LB. Incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 150rpm até que a absorbância do caldo de cultivo estivesse entre 0,5 e 0,6 (aproximadamente 3h). Coletou-se 1,5mL num microtubo plástico esterilizado e centrifugou-se por 10 min a 10.000rpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ) em microcentrifuga (Sigma, modelo 2K15). Por último, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com  $150\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  0,1M gelado.

### 3.2.2. Transformação de células competentes e seleção dos transformantes

Baseado no método descrito por SAMBROOK *et al.* (1989). A  $150\mu\text{L}$  de suspensão de células competentes, preparadas como descrito no item anterior, adicionou-se  $2\mu\text{L}$  de uma solução de DNA plasmidial (5 a  $10\mu\text{M}$ ) em tampão TE. Incubou-se a mistura em banho de gelo por 30min Após este período foi feita a transferência para um banho a exatamente  $42^{\circ}\text{C}$  por 45 segundos, seguida por resfriamento em banho de gelo por 5min Adicionou-se, então,  $850\mu\text{L}$  de meio LB e incubou-se por 1h a  $37^{\circ}\text{C}$  para recuperação das células. Após este período, centrifugou-se a suspensão celular por 5min a 4.500rpm ( $4^{\circ}\text{C}$ ), descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se com  $100\mu\text{L}$  de meio LB. Alíquotas de  $50\mu\text{L}$  desta suspensão foram transferidas e espalhadas em placas, contendo ampicilina  $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos transformantes de interesse. Incubou-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 a 18 horas. Uma vez selecionadas e isoladas, as colônias de interesse foram transferidas para meio LB e cultivadas de um dia para outro.

### **3.2.3. Seleção de colônias para a extração de DNA plasmidial**

Coletou-se uma das colônias das placas contendo os transformantes (item 3.2.3), com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, manipulado pelo uso uma pinça (flambada ao rubro), transferiu-se tubo de vidro com tampa rosqueada contendo 10mL de meio LB e incubou-se a 37°C sob agitação de 150rpm durante o período de aproximadamente 12-18h. Este caldo foi utilizado ao para extração de DNA plasmidial ou pré-inóculo para os cultivos realizados neste estudo.

### **3.2.4. Extração de DNA plasmidial**

A extração de DNA plasmidial foi realizada pelo método descrito por BIRNBOIM e DOLY (1979). Uma alíquota de 1,5mL do caldo de cultura obtido como descrito no item 5.2.4 cada tubo foi transferido para um microtubo plástico estéril, centrifugado por 5min a 10.000 rpm (4°C). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 50µL de tampão TE. Adicionou-se 300µL de solução TENS, tendo o cuidado de prepará-la somente no momento do uso. Após a homogeneização por inversão, foram adicionados 150µL de solução HSS e novamente homogeneizado por inversão. Centrifugou-se por 5min a 10.000rpm (4°C) e transferiu-se o sobrenadante para um microtubo plástico. Ao sobrenadante foram adicionados 900µL de etanol 95% (gelado), homogeneizado, com “vortex” por 5 segundos, centrifugação por 5min a 10.000 rpm (4°C) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspendido em 700µL de etanol 70% (gelado), centrifugação por 5min a 10.000rpm (4°C) e o sobrenadante descartado novamente. Finalmente o precipitado foi seco em estufa (37°C, por 30min) e guardado sob refrigeração à -20°C ou ressuspendido em tampão TE.

### **3.2.5. Culturas em frascos erlenmeyer**

O preparo do pré-inóculo consistiu em recolher uma única colônia de uma placa de Petri contendo a linhagem desejada e transferi-la para um frasco erlenmeyer de 125mL, contendo 25mL de meio LB ou NB, mais o antibiótico ampicilina na concentração de 50mg.L<sup>-1</sup>. Os cultivos foram realizados sob agitação (150rpm), à temperatura de 37°C, durante 24h.

A etapa seguinte consistiu no recolhimento de uma concentração definida da etapa anterior e transferi-la para um frasco erlenmeyer aletado de 500mL, contendo 100mL de meio, entre meio mineral e complementos, de acordo com a matriz de planejamento. Os cultivos

foram realizados em agitador orbital (B. Braum Biotech International Certomat<sup>®</sup>, modelo BS-1) a 150rpm, às temperaturas de 30 ou 37°C, durante 48 ou 96h, conforme o estudo.

### **3.2.6. Determinações analíticas**

#### **3.2.6.1. Amostragem**

A amostragem de ensaios em frascos erlenmeyers foi realizada após o término dos cultivos, nos tempos de 48 ou 96 horas, sendo coletada, então, de uma só vez. Amostragens de curvas de crescimento foram realizadas a cada hora para avaliar a fase exponencial (até aproximadamente 6-9h), quando exigido, e para a curva total, a cada 6, 12 ou 24h até 96 horas de cultivo.

As amostras, quando não imediatamente tratadas, foram mantidas congeladas em duplicata a -20°C, para posterior análise. Amostras de massa celular também foram congeladas para que não sofressem qualquer tipo de alteração até o momento do preparo dos ensaios cromatográficos.

#### **3.2.6.2. Concentração de biomassa**

A concentração celular foi determinada por dois métodos: espectrometria (para averiguar níveis apropriados de absorbância para a determinação da concentração inicial de biomassa do cultivo e avaliação de curvas de crescimento) e gravimetria (para avaliar a massa celular seca).

A concentração de biomassa por espectrometria foi avaliada em um espectrofotômetro (Pharmacia, modelo LKB - Ultrospec III) medindo-se a absorbância à 600nm.

A concentração celular seca foi medida por gravimetria a partir de um volume conhecido de cultura, realizada em centrífuga Hitachi, modelo himac CR20B2 (10.000rpm, 4°C, 15min). Descartou-se os sobrenadantes e deixou-se os precipitados secarem em estufa a 50°C por 24h.

#### **3.2.6.3. Análise dos PHAs**

Baseado no método descrito por TIMM, BYROM e STEINBÜCHEL (1990), analisou-se quantitativamente e qualitativamente a síntese de PHA através de cromatografia gasosa. Utilizou-se cromatógrafo a gás (Shimadzu - CGMS ou Varian - CGMS). Após vários testes,

adotou-se as seguintes condições: temperatura inicial de 80°C durante 6min, com uma taxa de 8°C.min<sup>-1</sup> até 152°C, onde permaneceu por 1min, seguida de uma taxa de 12°C.min<sup>-1</sup> até atingir-se a temperatura de 200°C. A seguir esperava-se o resfriamento da coluna até 80°C para poder efetuar-se nova injeção de amostra ou padrão.

À 10mg de massa celular seca, obtida conforme item 3.2.6.2, adicionou-se 1mL de solução contendo 15% de ácido sulfúrico e 85% de metanol e 1mL de clorofórmio e levada a banho de óleo a 100°C por 4 horas.

Depois de resfriada a solução, adicionou-se 0,5mL de água, agitou-se vigorosamente por 20 segundos e deixou-se decantar a fase contendo o metil ester formado dissolvido em clorofórmio. A fase inferior foi recolhida e levada para análise por cromatografia gasosa.

Para qualificação e quantificação dos PHAs produzidos em culturas neste estudo, preparou-se padrões a partir de ácidos hidroxialcanóicos 1mg.mL<sup>-1</sup>, dissolvidos em clorofórmio. Os padrões utilizados foram ácidos 3-hidroxi-butírico (3HB), 3-hidroxi-valérico (3HV), 3-hexanóico (3HHx), 3-hidroxi-octanóico (3HO), 3-hidroxi-decanóico (3HD) e 3-hidroxi-dodecanóico (3HDD), obtidos comercialmente (Aldrich Chem. Co.), ou extraídos de culturas de *Pseudomonas oleovorans*, como descrito no item 3.2.6.4. As áreas e os tempos de retenção obtidos por cromatografia gasosa, para cada padrão nas concentrações definidas foram utilizados para cálculo e determinações nas amostras.

#### **3.2.6.4. Extração de PHAs**

PHAs foram extraídos, com clorofórmio das células secas, usando-se um extrator Soxhlet. Após um período de refluxo de 24h, a solução de clorofórmio foi concentrada com um evaporador giratório e o polímero precipitado pela adição de metanol p.a., sob agitação. A suspensão contendo polímero foi centrifugada, 10.000rpm, por 15min, à temperatura ambiente. O precipitado foi redissolvido em clorofórmio e precipitado pela adição de etanol.

#### **3.2.6.5. Estabilidade plasmidial**

A estabilidade plasmidial (segregacional) foi estimada em triplicata pela comparação entre o número de colônias que cresceram em placas contendo ágar LB com ou sem o antibiótico ampicilina.

Para este propósito, a partir de culturas líquidas recolheram-se alíquotas do caldo de cultivo, em intervalos de 6 horas até 36 horas e de 24 horas de 48 até 96 horas, e diluiu-se apropriadamente, em solução salina esterilizada. Uma alíquota da suspensão diluída foi transferida para uma placa contendo meio ágar LB + ampicilina ( $50\text{mg.L}^{-1}$ ) e outra sem antibiótico. Incubou-se por 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Analisou-se a relação entre o número de células totais (placa sem ampicilina) e o número de células contendo plasmídeo (as únicas capazes de crescer no meio com antibiótico), em função do tempo de cultivo de *E. coli* recombinante.

### 3.2.6.6. Planejamento experimental e análise estatística

As análises estatísticas para todos os planejamentos propostos foram realizadas utilizando-se o software Statistica 5.0<sup>®</sup> (STATISTICA, 1995).

Com relação à análise estatística (BARROS NETO, 1995), o ajuste aos resultados do planejamento experimental foi feito através de modelos lineares com interações e para a avaliação do modelo foram analisados os desvios das observações com relação à média global, através da soma quadrática total ( $SQ_T$ ), que é expressa segundo a Equação 9.

$$SQ_T = \sum (\text{valor observado} - \text{valor médio})^2 \quad (9)$$

A  $SQ_R$  compreende a soma quadrática devido à regressão ( $SQ_R$ ) e ao resíduo ( $SQ_r$ ), conforme a Equação 10.

$$SQ_T = SQ_R + SQ_r \quad (10)$$

Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, utilizou-se o teste F de significância. Neste teste comparam-se os valores de F estimados a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência  $F_{v_1, v_2}$ , no nível de significância desejado. O fundamento deste teste consiste em verificar se a hipótese nula é válida, isto é, se as modificações introduzidas nas condições experimentais não possuem efeito sobre os resultados obtidos e se as variações destes resultados são devidos exclusivamente a fatores aleatórios. A Equação 11 representa o teste F para a regressão.

$$\text{Teste } F_{\delta; p-1; n-p} = \frac{MQ_R}{MQ_r} \quad (11)$$

Onde  $\delta$  representa o nível de significância desejado,  $p$  o número de parâmetros do modelo e  $n$  o número total de observações (ensaios).  $MQ_R$  e  $MQ_r$  são as médias quadráticas da regressão e dos resíduos, respectivamente.

### 3.2.7. Etapas da produção de polihidroxicanoatos por *E. coli* recombinantes

A Figura 5 ilustra o fluxograma das etapas desde o preparo dos meios de cultivo até a quantificação dos PHAs.

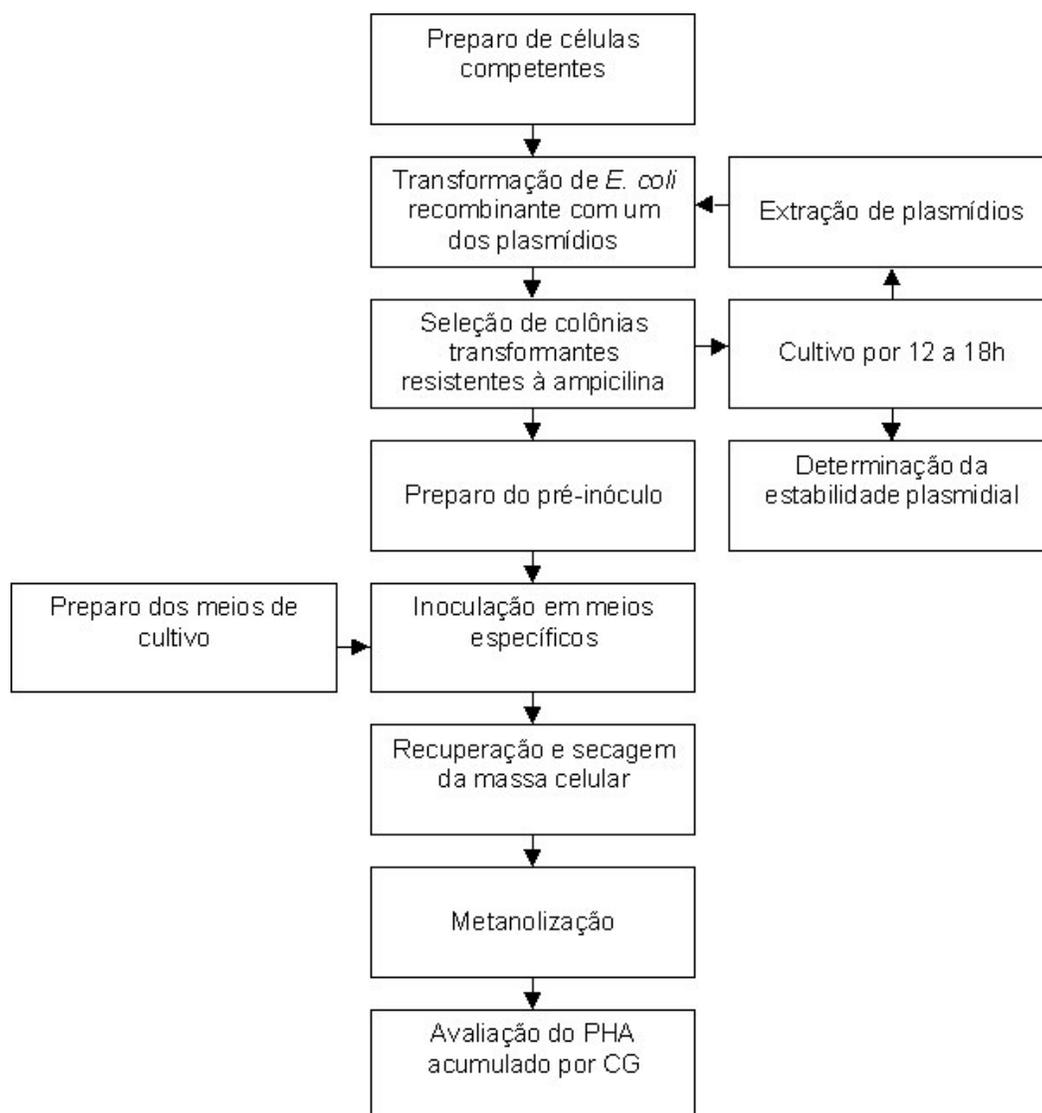


Figura 5. Fluxograma das etapas de produção de polihidroxicanoatos

### 3.2.8. Estratégias de cultivo

#### 3.2.8.1. Produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo os genes estruturais das PHAs sintases de *R. eutropha* (pBHR68) utilizando substratos e suplemento de baixo custo

Duas linhagens de *E. coli* DH10B e JM101 foram transformadas utilizando-se o plasmídeo pBHR68. Estudou-se a produção de PHAs pelas *E. coli* transformantes, ancorando o plasmídeo pBHR68 que contém o operon completo de *R. eutropha* para a síntese de PHAs. Aplicou-se um planejamento experimental  $2^3$  para avaliar a influência de: i) amido de milho hidrolisado, ii) soro de queijo e iii) óleo de soja, conforme mostra a Tabela 3, em seus respectivos níveis reais.

A etapa de pré-cultivo foi realizada em frascos erlenmeyers de 125mL, contendo 25mL meio LB e ampicilina na concentração de  $50\text{mg.L}^{-1}$  de meio, sob agitação a 150rpm, em agitador orbital à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , durante 24h.

A partir de 2% (v/v) de inóculo, proveniente da pré-cultura, a etapa de cultivo foi realizada em frascos erlenmeyers aletados de 500mL, contendo 100mL de meio mineral (MR) e ampicilina na concentração de  $50\text{mg.L}^{-1}$  de meio, com os demais substratos e suplemento nas concentrações definidas de acordo com a matriz de planejamento, sob agitação de 150rpm, em agitador orbital à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , durante 48h. A massa celular seca (MCS) foi determinada pela pesagem da massa celular seca obtida pela centrifugação do caldo de cultivo e secagem (item 3.2.6.2). O conteúdo de PHA na MCS foi determinado por cromatografia gasosa, como descrito no item 3.2.6.3.

A matriz de planejamento com variáveis codificadas é mostrada na Tabela 4 e com as variáveis reais na Tabela 5.

Tabela 3. Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo  $2^3$

Fator	Nível inferior	Nível superior
Amido de milho hidrolisado (%)	0	5
Soro de queijo (%)	0	5
Óleo de soja (%)	0	5

Tabela 4. Matriz de planejamento fatorial completo  $2^3$  com variáveis codificadas

Experimento	Variáveis		
	Amido de milho hidrolisado	Soro de queijo	Óleo de soja
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Tabela 5. Matriz de planejamento fatorial completo  $2^3$  com variáveis reais

Experimento	Variáveis		
	Amido de milho hidrolisado (%)	Soro de queijo (%)	Óleo de soja (%)
1	0	0	0
2	5	0	0
3	0	5	0
4	5	5	0
5	0	0	5
6	5	0	5
7	0	5	5
8	5	5	5

### 3.2.8.2. Otimização da produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo os genes estruturais das PHAs sintases de *R. eutropha* (pBHR68)

A melhor resposta experimental para o meio de cultivo foi obtida baseada nos resultados do primeiro planejamento fatorial e usada em um segundo, preparado para testar outros fatores, a fim de otimizar a produção de PHAs por *E. coli* JM101, ancorando o plasmídio pBHR68. Desta vez, um planejamento fatorial completo  $2^5$  foi realizado para estudar a concentração de inóculo, adição de IPTG e ácido acrílico e tempo e temperaturas de cultivo.

A etapa de pré-cultivo foi realizada conforme o experimento anterior (item 3.2.8.1.), bem como a etapa de cultivo, onde se utilizou um meio contendo os percentuais de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja de acordo com as respostas fornecidas pelo melhor modelo linear gerado pela combinação destas variáveis. As demais condições foram executadas respeitando-se as variações impostas pelo novo planejamento.

As novas variáveis em estudo são mostradas na Tabela 6, em seus respectivos níveis reais. As matrizes de planejamento com variáveis codificadas e reais são mostradas nas Tabelas 7 e 8, respectivamente.

Tabela 6: Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo  $2^5$

Fator	Nível inferior	Nível superior
Inóculo (%)	2	5
IPTG (mM)	0	1
Ácido acrílico (mM)	0	1
Tempo (h)	48	96
Temperatura (°C)	30	37

Tabela 7: Matriz de planejamento fatorial completo  $2^5$  com variáveis codificadas

Experimento	Inóculo	IPTG	Ácido acrílico	Tempo	Temperatura
1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	-1
6	+1	-1	+1	-1	-1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+	+1	+1	-1
17	-1	-1	-1	-1	+1
18	+1	-1	-1	-1	+1
19	-1	+1	-1	-1	+1
20	+1	+1	-1	-1	+1
21	-1	-1	+1	-1	+1
22	+1	-1	+1	-1	+1
23	-1	+1	+1	-1	+1
24	+1	+1	+1	-1	+1
25	-1	-1	-1	+1	+1
26	+1	-1	-1	+1	+1
27	-1	+1	-1	+1	+1
28	+1	+1	-1	+1	+1
29	-1	-1	+1	+1	+1
30	+1	-1	+1	+1	+1
31	-1	+1	+1	+1	+1
32	+1	+1	+1	+1	+1

Tabela 8: Matriz de planejamento fatorial completo  $2^5$  com variáveis reais

Experimento	Inóculo (%)	IPTG (mM)	Ácido acrílico (mM)	Tempo (h)	Temperatura (°C)
1	2	0	0	48	30
2	5	0	0	48	30
3	2	1	0	48	30
4	5	1	0	48	30
5	2	0	1	48	30
6	5	0	1	48	30
7	2	1	1	48	30
8	5	1	1	48	30
9	2	0	0	96	30
10	5	0	0	96	30
11	2	1	0	96	30
12	5	1	0	96	30
13	2	0	1	96	30
14	5	0	1	96	30
15	2	1	1	96	30
16	5	1	1	96	30
17	2	0	0	48	37
18	5	0	0	48	37
19	2	1	0	48	37
20	5	1	0	48	37
21	2	0	1	48	37
22	5	0	1	48	37
23	2	1	1	48	37
24	5	1	1	48	37
25	2	0	0	96	37
26	5	0	0	96	37
27	2	1	0	96	37
28	5	1	0	96	37
29	2	0	1	96	37
30	5	0	1	96	37
31	2	1	1	96	37
32	5	1	1	96	37

### 3.2.8.3. Produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo o gene estrutural da PHA sintases de *P. aeruginosa* (pBHR71)

Estudou-se a produção de PHAs por *E. coli* DH10B e JM101, ancorando o plasmídio pBHR71, que contém o gene estrutural da PHA sintases de *P. aeruginosa*.

Da mesma forma que no item 3.2.8.1, foram avaliadas a influência de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja, nos mesmos níveis.

As variáveis deste estudo são mostradas na Tabela 9, em seus respectivos níveis reais. As matrizes de planejamento com variáveis codificadas e reais são mostradas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

As etapas de pré-cultivo e cultivo, bem como as análises de massa celular seca, percentual de PHA e massa de PHA acumulada procederam da mesma forma que no item 3.2.8.1.

Tabela 9. Níveis reais das variáveis para planejamento experimental fatorial completo 2<sup>4</sup>

Fator	Nível inferior	Nível superior
Amido de milho hidrolisado (%)	0	5
Soro de queijo (%)	0	5
Óleo de soja (%)	0	5
Ácido acrílico (mM)	0	1

Tabela 10. Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com variáveis codificadas

Experimento	Variáveis			
	Amido de milho hidrolisado	Soro de queijo	Óleo de soja	Ácido acrílico
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1

Tabela 11. Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>4</sup> com variáveis reais

Experimento	Variáveis			
	Amido de milho hidrolisado (%)	Soro de queijo (%)	Óleo de soja (%)	Ácido acrílico (mM)
1	0	0	0	0
2	5	0	0	0
3	0	5	0	0
4	5	5	0	0
5	0	0	5	0
6	5	0	5	0
7	0	5	5	0
8	5	5	5	0
9	0	0	0	1
10	5	0	0	1
11	0	5	0	1
12	5	5	0	1
13	0	0	5	1
14	5	0	5	1
15	0	5	5	1
16	5	5	5	1

#### **3.2.8.4. Utilização de óleos vegetais como substrato para a produção de PHAs de cadeia média por *E. coli* recombinante**

Neste estudo utilizou-se *E. coli* JM101, ancorando o plasmídio pBHR71 para avaliar a influência de diferentes óleos vegetais sobre o acúmulo de PHAs de cadeia média.

A etapa de pré-cultivo, bem como as análises de massa celular seca, percentual de PHA e massa de PHA acumulada procederam da mesma forma que no item 3.2.8.1.

A etapa de cultivo foi realizada em frascos erlenmeyers aletados de 500mL, contendo 100mL de meio, destes, 5% (v/v) foram preenchidos com soro de queijo e 1% (v/v) com o respectivo óleo vegetal em avaliação. O inóculo foi utilizado na concentração de 2% (v/v) e o restante do volume (92mL) preenchido com meio mineral (MR). As demais condições de cultivo foram realizadas conforme item 3.2.8.1.

#### **3.2.9. Avaliação da estabilidade plasmidial em *E. coli* recombinante**

A estabilidade plasmidial (segregacional) foi estimada em triplicata pela comparação entre o número de colônias que apareceram nas placas que continham antibiótico com aquelas sem antibiótico, conforme detalhado no item 3.2.6.5. O crescimento foi monitorado pela medida da absorbância à 600nm ( $Abs_{600}$ ).

## 4. Resultados

Neste capítulo são mostradas as respostas experimentais obtidas e é feita uma análise estatística, de acordo com a necessidade ou relevância requerida, dentro dos diversos tipos de estudo efetuados.

### 4.1. Produção de PHAs por *E. coli* (DH10B e JM101) recombinante contendo o operon completo de *R. eutropha* para a síntese de polihidroxicanoatos (pBHR68)

O operon completo para a biossíntese de PHA em *R. eutropha* está constituído por três genes estruturais, *phaA*, *phaB* e *phaC*, as quais codificam as enzimas  $\beta$ -cetotilase, acetoacetyl-CoA redutase dependente de NAD(P)H e PHA sintase. O plasmídeo pBHR68, além do gene *amp*, que confere resistência a ampicilina, ancora também o operon completo para a biossíntese de PHA de *R. eutropha*. Deste modo, foi possível a transformação e seleção de *E. coli* recombinantes, com os genes necessários à biossíntese e acúmulo de PHA em *E. coli* em quantidades significativas, para o estudo do potencial de produção de PHAs pelas linhagens transformantes, utilizando substratos de baixo custo, como fonte de carbono, bem como suplemento.

Para este estudo, duas linhagens de *E. coli*, DH10B e JM101, foram transformadas utilizando o plasmídeo pBHR68, como descrito em Materiais e Métodos. Os transformantes que carregam o plasmídeo foram utilizados para o estudo do efeito de substratos de baixo custo, sobre a produção de polihidroxicanoatos através de um planejamento experimental 2<sup>3</sup> para avaliar a influência de: i) de amido de milho hidrolisado, ii) soro de queijo e iii) óleo de soja, conforme mostra a Tabela 3, em seus respectivos níveis reais.

#### 4.1.1. Produção de PHAs por *E. coli* (DH10B) recombinante ancorando o plasmídeo pBHR68

A Tabela 12 mostra a matriz de planejamento com as variáveis codificadas, bem como as respostas experimentais obtidas para massa celular seca e conteúdo de PHB acumulado para a linhagem DH10B, enquanto a Tabela 13 ilustra os efeitos obtidos através da análise estatística para cada uma das respostas observadas.

Tabela 12. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHB de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  para *E. coli* DH10B (pBHR 68)

Experimento	Amido de milho	Soro de queijo	Óleo de soja	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHB (%)
1	-1	-1	-1	0,19	1,04
2	+1	-1	-1	0,29	53,21
3	-1	+1	-1	0,49	0,87
4	+1	+1	-1	1,94	43,63
5	-1	-1	+1	0,25	2,60
6	+1	-1	+1	0,99	41,82
7	-1	+1	+1	1,25	2,37
8	+1	+1	+1	4,60	7,36

MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato; mPHB: massa de polihidroxibutirato

Tabela 13. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de polihidroxibutirato e massa de polihidroxibutirato de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  para *E. coli* DH10B (pBHR 68)

Resposta	MCS	%PHB	mPHB
	Efeito	Efeito	Efeito
Média/Interação	1,25	19,11	0,22
(X <sub>1</sub> ) Amido	1,41	34,78	0,43
(X <sub>2</sub> ) Soro	1,64	-11,11	0,16
(X <sub>3</sub> ) Óleo	1,04	-11,15	-0,05
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> )	0,99	-10,91	0,15
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,63	-12,68	-0,07
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,66	-6,23	-0,19

MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato; mPHB: massa de polihidroxibutirato

De acordo com a Tabela 12 percebe-se que a maior massa celular seca (4,60g.L<sup>-1</sup>) foi conseguida no experimento 8, cujo meio cultivo apresenta as três variáveis em estudo em seus níveis máximos. Por outro lado, este meio não proporcionou o maior acúmulo percentual de PHB, o qual foi alcançado no experimento 2, onde 53,21% foi acumulado em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, mas com uma massa celular seca bastante inferior (0,29g.L<sup>-1</sup>).

Outras respostas interessantes para o acúmulo de PHB foram obtidas em meio contendo amido de milho hidrolisado + soro de queijo (exp.4) e amido de milho hidrolisado + óleo de soja (exp.6), onde detectou-se 43,63 e 41,21% de PHB sobre a massa celular seca, respectivamente.

A análise dos efeitos mostra que, os principais, correspondem a média dos efeitos, nas respectivas respostas, quando as variáveis passam do nível -1 ao +1. Se ao passar-se do nível inferior da variável para o nível superior houver um aumento no valor da resposta obtida, a variável tem influência aditiva. O efeito tem sinal positivo. Ao contrário, se ao passar-se do nível inferior da variável para o nível superior ocorrer uma diminuição sobre a resposta obtida, a variável tem influência restritiva. O efeito tem sinal negativo.

A Tabela 13 indica que, entre os efeitos principais, para a massa celular seca, todas as variáveis tiveram efeito positivo, sendo o soro de queijo o parâmetro de maior influência sobre esta resposta. Assim, ao passar-se do nível inferior ao nível superior houve um aumento de  $1,64\text{g.L}^{-1}$  na massa celular seca. Os efeitos de segunda ordem também mostram efeito positivo sobre esta resposta, apesar desta influência ter sido menor que a dos efeitos de primeira ordem.

Para o percentual de PHB acumulado, o amido de milho hidrolisado foi a variável que mais interferiu, tendo refletido positivamente sobre esta resposta. Assim, a passagem do nível inferior ao nível superior representou um aumento de 34,78% no percentual de PHB acumulado. Soro de queijo e óleo de soja tiveram efeito negativo, o que indica que ao mudar-se a concentração de 0 para 5%, reduziu-se o acúmulo em 11,11 e 11,15%, para o soro e o óleo, respectivamente. Os efeitos de interação também se mostraram bastante significativos, sendo que o efeito combinado de amido de milho hidrolisado + soro indicou uma redução de 10,91% e de amido de milho hidrolisado + óleo, 12,68%.

Para a massa de PHB acumulado, por sua vez, a variável amido teve o maior efeito, representando um aumento de  $0,43\text{g.L}^{-1}$  ao variar-se a concentração de seu nível inferior ao superior. Soro de queijo e óleo de soja tiveram efeitos de 0,16 e  $-0,05\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente.

A partir do planejamento experimental  $2^3$  fornecido, obteve-se superfícies de resposta para cada um dos fatores de interesse estudados. Para tal, foram graficadas curvas de nível correspondentes à superfície de resposta geradas pelo modelo linear obtido. Em cada uma delas, duas das variáveis solicitadas foram levadas em consideração (eixos x e y), enquanto a terceira variável foi estabelecida como parâmetro fixo. Através da combinação das três variáveis, duas a duas, foram obtidas 6 curvas de nível (A x S, O(-1); A x S, O(+1); A x O, S(-1); A x O, S(+1); S x O, A(-1); S x O, A(+1)) para cada uma das respostas analisadas, totalizando 18 curvas de nível. Os parâmetros foram testados nos níveis -1 e +1.

Através da sobreposição das curvas de nível das três respostas, em cada uma das situações, foi possível escolher aquela em que se obteve os melhores resultados. É importante ressaltar que não necessariamente devem coincidir as respostas, ou seja, que no nível superior de uma determinada variável fossem registrados os melhores índices de massa celular seca, de acúmulo percentual de PHB e de massa de PHB acumulada. Isto, inclusive, pode ser notado pela observação da Tabela 12, onde o máximo de massa celular seca não implicou num máximo de acúmulo de PHB. Por tudo isso, tornou-se mais difícil a escolha das melhores superfícies.

Além disso, não se pode determinar as melhores condições apenas pela observação das curvas de nível correspondentes a massa de PHB acumulada, apesar desta ser dependente das outras duas respostas. A explicação para tal fato é que, muitas vezes, um grande acúmulo de massa de PHB é obtido, mas o percentual de PHB é muito pequeno, o que torna esta situação não muito interessante sob o ponto de vista econômico, devido aos maiores custos para extrair-se o polímero. Desta forma, levou-se em consideração o bom senso.

Assim, comparou-se os resultados obtidos para cada um dos modelos, escolhendo-se aqueles que forneceram a melhor combinação das respostas, ou seja,  $4,208\text{g.L}^{-1}$  para massa celular seca e 49,042% para o acúmulo de PHB e  $0,784\text{g.L}^{-1}$  de massa de PHB, como mostrado nas Figuras 6, 7 e 8.

Observando-se a Figura 6, nota-se que a produção de massa celular seca tende ao máximo próximo ao nível superior de soro de queijo e óleo de soja, quando se fixa amido de milho hidrolisado no seu nível superior (5%).

Como mostrado na Figura 7, referente ao acúmulo de PHB, um comportamento oposto ao da massa celular seca foi observado. Neste caso o maior acúmulo de polímero foi obtido na faixa equivalente aos níveis inferiores de soro de queijo e óleo de soja, quando se fixa amido de milho hidrolisado no seu nível superior (5%).

A Figura 8 mostra que a melhor resposta para o acúmulo de massa de PHB foi obtido no nível superior de soro de queijo (5%) e nível inferior de óleo de soja (0%), quando se fixa amido de milho hidrolisado no seu nível superior (5%).

A Figura 9 mostra a sobreposição das curvas de nível referentes às Figuras 6, 7 e 8, para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68. Através desta figura, observa-se o efeito contrário exercido pelo aumento dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja, sobre o acúmulo percentual de PHB (áreas), a massa celular seca (linhas tracejadas) e a variação da massa de PHB (linhas inteiras).

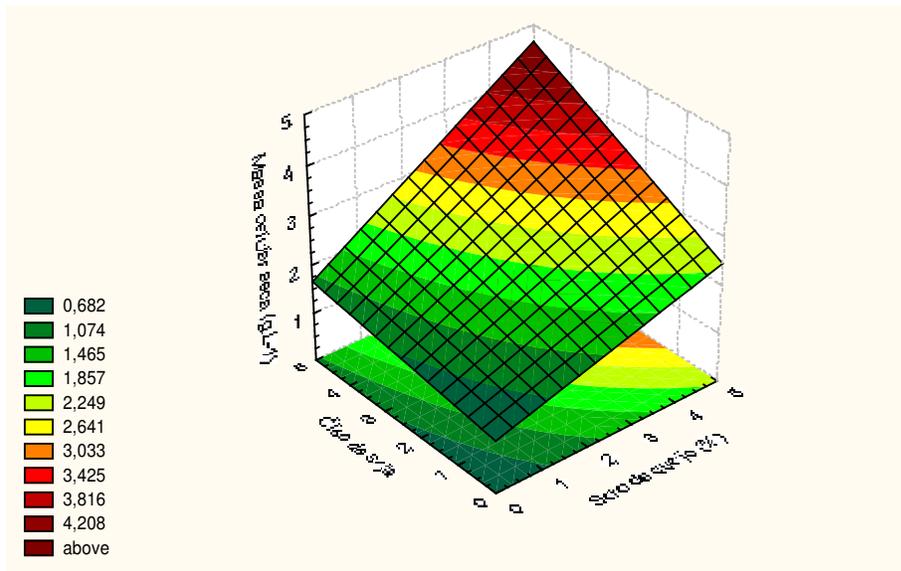


Figura 6. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

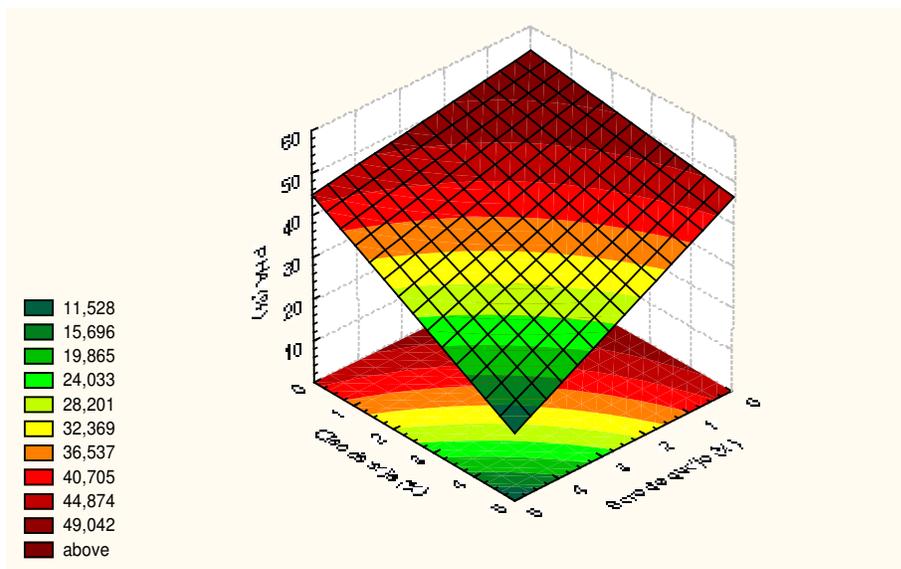


Figura 7. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

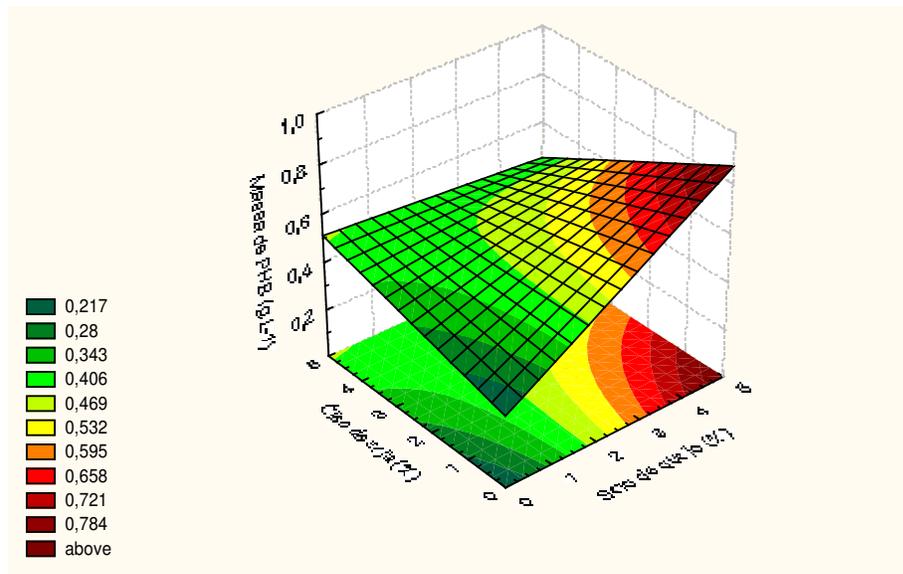


Figura 8. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

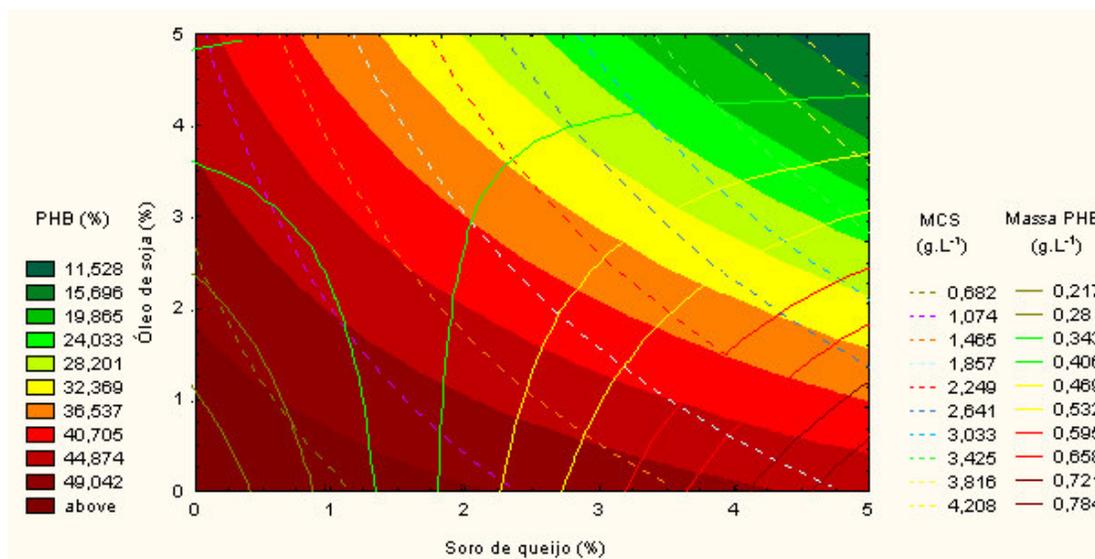


Figura 9. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

A combinação das respostas obtidas indica como sendo a melhor resposta os valores obtidos com 5% de soro de queijo e 0% de óleo de soja, além dos 5% fixos de amido de milho hidrolisado, que fornecem uma massa celular seca em torno de  $2\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 45% e o acúmulo massa de PHB  $0,8\text{ g.L}^{-1}$ .

Com relação ao tratamento estatístico dos dados obtidos, as Tabelas 14, 15 e 16 apresentam as análises de variância obtidas para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, modificadas a partir dos dados gerados pelo programa computacional Statistica® (STATISTICA, 1995).

Tabela 14. ANOVA modificada para massa celular seca para *Escherichia coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	15,19	5 ( <i>p</i> -1)	3,038	43,4	9,01
Resíduos	0,20	3 ( <i>n</i> - <i>p</i> )	0,07	—	—
Total	15,39	7 ( <i>n</i> -1)	—	—	—

% variação explicada: 0,9871

Tabela 15. ANOVA modificada para percentual de PHB acumulado para *Escherichia coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	3552,88	5	710,58	27,68	9,01
Resíduos	77,00	3	25,67	—	—
Total	3629,88	7	—	—	—

% variação explicada: 0,9788

Tabela 16. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada para *Escherichia coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	0,55	5	0,11	5,50	9,01
Resíduos	0,07	3	0,02	—	—
Total	0,62	7	—	—	—

% variação explicada: 0,8755

O exame dos resíduos indica que os modelos obtidos estão bem ajustados, pois a soma quadrática referente aos resíduos foi pequena, quando comparada aos valores de regressão. A regressão bastante significativa mostra que o modelo é bom. Assim, pode-se afirmar que os modelos descrevem adequadamente os resultados experimentais.

Para verificar se o modelo explica uma quantidade significativa da variação dos dados experimentais, utilizou-se o teste F de significância. Neste teste, comparou-se os valores de F estimados a partir dos dados experimentais com o valor tabelado de uma distribuição de frequência de referência  $F_{v1, v2}$ , ao nível de significância de 5% ( $\delta = 0,05$ ).

Para que o modelo encontrado não seja apenas estatisticamente significativo, mas que também seja útil para fazer previsões o valor calculado do teste F para a regressão deve ser de 4 a 5 vezes maior que o valor tabelado (BARROS NETO, 1996)

Para a massa celular seca, o F calculado para a regressão foi 4,8 vezes maior que o tabelado, o que mostra que o modelo, além de bem ajustado, é estatisticamente significativo e preditivo, pois a condição de ser, no mínimo, de 4 a 5 vezes maior que o tabelado, foi satisfeita. Para o percentual de PHB acumulado, o F calculado para a regressão foi 3,1 vezes maior que o tabelado, mostrando que o modelo, apesar de bem ajustado e estatisticamente significativo, não pode ser utilizado para fins preditivos. Para a massa de PHB, o F calculado para a regressão foi menor que o tabelado, mostrando que não é estatisticamente significativo, apesar de ter apresentado um ajuste considerável.

A variação do modelo em relação aos dados experimentais pode ser explicada por um coeficiente de correlação de 0,9871 para a massa celular seca, 0,9788 para o percentual de PHB acumulado e 0,8755 para a massa de PHB acumulada. Os modelos obtidos para cada uma dessas respostas são representados, respectivamente, pelas Equações 12, 13 e 14.

$$\text{MCS} = 0,347 - 0,043.X_1 - 0,003.X_2 - 0,051.X_3 + 0,079.X_1.X_2 + 0,051.X_1.X_3 + 0,053.X_2.X_3 \quad (12)$$

$$\% \text{PHB} = -2,06 + 11,67.X_1 + 1,20.X_2 + 1,55.X_3 - 0,87.X_1.X_2 - 1,01.X_1.X_3 - 0,50.X_2.X_3 \quad (13)$$

$$\text{mPHB} = -0,096 + 0,077.X_1 + 0,040.X_2 + 0,040.X_3 + 0,012.X_1.X_2 - 0,005.X_1.X_3 - 0,015.X_2.X_3 \quad (14)$$

#### 4.1.2. Produção de PHAs por *E. coli* (JM101) recombinante ancorando o plasmídeo pBHR68

A Tabela 17 indica a matriz de planejamento com as variáveis codificadas e as respostas experimentais obtidas para massa celular seca e conteúdo de PHB acumulado para a *E. coli* linhagem JM101, enquanto a Tabela 18 mostra os efeitos obtidos através da análise estatística para cada uma das respostas observadas.

Tabela 17. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHB de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  para *E. coli* JM101 (pBHR 68)

Experimento	Amido de milho	Soro de queijo	Óleo de soja	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHB (%)
1	-1	-1	-1	0,17	2,13
2	+1	-1	-1	0,42	68,30
3	-1	+1	-1	0,48	3,04
4	+1	+1	-1	1,90	39,47
5	-1	-1	+1	0,21	3,32
6	+1	-1	+1	0,93	5,34
7	-1	+1	+1	0,44	1,01
8	+1	+1	+1	2,42	55,14

MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato

De acordo com a Tabela 17 a maior massa celular seca (2,42g.L<sup>-1</sup>) foi obtida no experimento 8, cujo meio cultivo apresenta as três variáveis em estudo em seus níveis máximos. Nesta condição observou-se um grande acúmulo percentual de PHB, de 55,14%, que só foi inferior ao obtido em meio mineral contendo apenas amido de milho hidrolisado (68,30%). Este comportamento foi semelhante ao observado para linhagem DH10B.

Outra resposta relevante com respeito ao acúmulo de PHB e de massa celular seca, foi a obtida em meio contendo amido de milho hidrolisado + soro de queijo (exp.4), onde detectou-se 39,47% de PHB acumulado e 1,90g.L<sup>-1</sup> de MCS.

Tabela 18. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de polihidroxibutirato (%PHB) e massa de polihidroxibutirato (mPHB) de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  para *Escherichia coli* JM101 (pBHR 68)

Resposta	MCS	%PHB	mPHB
	Efeito	Efeito	Efeito
Média/Interação	0,87	22,22	0,31
(X <sub>1</sub> ) Amido	1,09	39,69	0,60
(X <sub>2</sub> ) Soro	0,88	4,89	0,44
(X <sub>3</sub> ) Óleo	0,26	-12,03	0,08
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> )	0,61	5,59	0,43
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,26	-11,61	0,09
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,01	18,85	0,20

MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato; mPHB: massa de polihidroxibutirato

Com relação à análise dos efeitos, indicados na Tabela 18, entre os efeitos principais, para a massa celular seca, todas as variáveis tiveram efeito positivo, sendo o amido de milho hidrolisado o parâmetro de maior influência sobre esta resposta, seguido por soro de queijo e óleo de soja, correspondendo a 1,09, 0,88 e 0,26g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, ao passar-se do nível inferior ao nível superior houve um aumento na massa celular seca. O maior efeito de segunda ordem foi obtido pela combinação das variáveis amido de milho hidrolisado + soro de queijo, elevando em 0,61g.L<sup>-1</sup> a massa celular seca ao passar-se do nível inferior ao nível superior.

Para o percentual de PHB acumulado, o amido de milho hidrolisado foi a variável que mais interferiu, tendo refletido positivamente sobre esta resposta. Assim, a passagem do nível inferior ao nível superior representou um incremento de 39,69% no percentual de PHB acumulado. Soro de queijo apresentou efeito positivo de 4,89%, sobre percentual de PHB acumulado. Enquanto, o óleo de soja teve efeito negativo, o que foi indicado pela redução em 12,03% no percentual de PHB acumulado, ao mudar-se sua concentração de 0 para 5%. A interação de amido de milho hidrolisado com óleo de soja também apresentou efeito negativo, apesar do efeito positivo do amido de milho hidrolisado, representando um decréscimo de 11,61% sobre o acúmulo de PHB. Outro dado interessante foi o efeito positivo de 18,85% pela combinação de soro de queijo + óleo de soja, apesar do óleo de soja ter mostrado efeito negativo.

Para a massa de PHB acumulada, por sua vez, a variável amido de milho hidrolisado, soro de queijo e a combinação destas duas apresentaram os maiores efeitos sobre esta resposta, representando aumentos de 0,60, 0,44 e 0,43g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, ao mudar-se do nível inferior para superior.

Pela análise das curvas de nível correspondentes as superfícies de resposta geradas pelos modelos lineares obtidos, determinou-se as melhores superfícies de resposta para massa celular seca, percentual de PHB e massa de PHB, conforme as Figura 10, 11 e 12, respectivamente. A combinação das respostas experimentais é mostrada na Figura 13, sob a forma de curvas de nível.

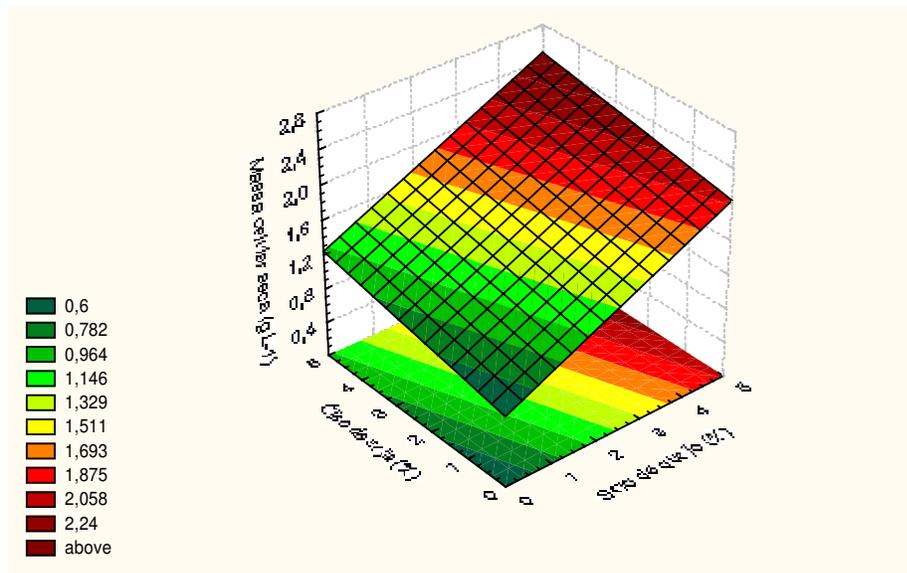


Figura 10. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

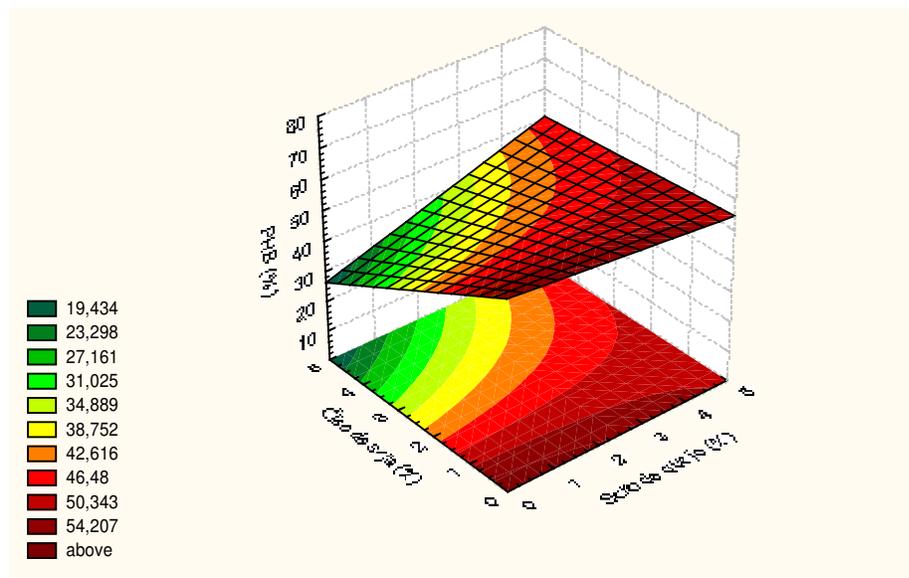


Figura 11. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

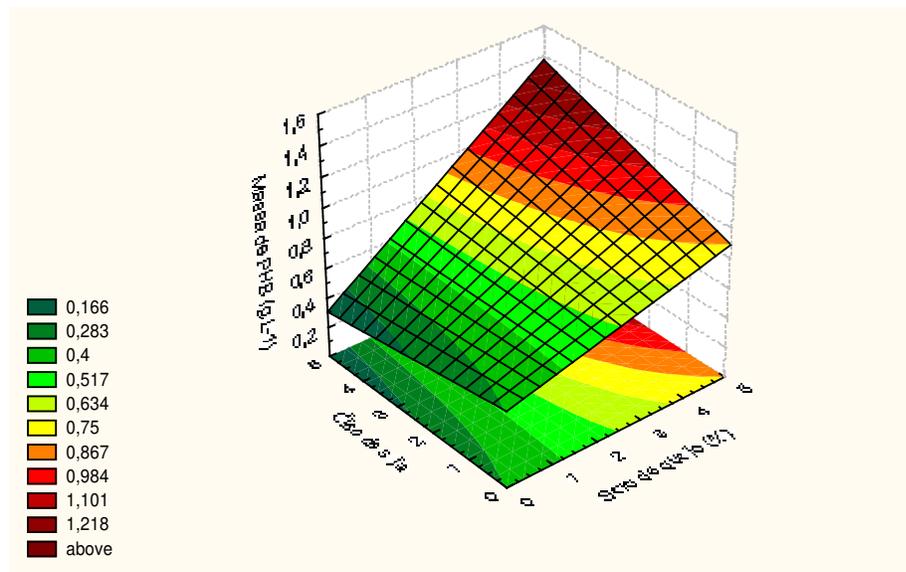


Figura 12 . Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

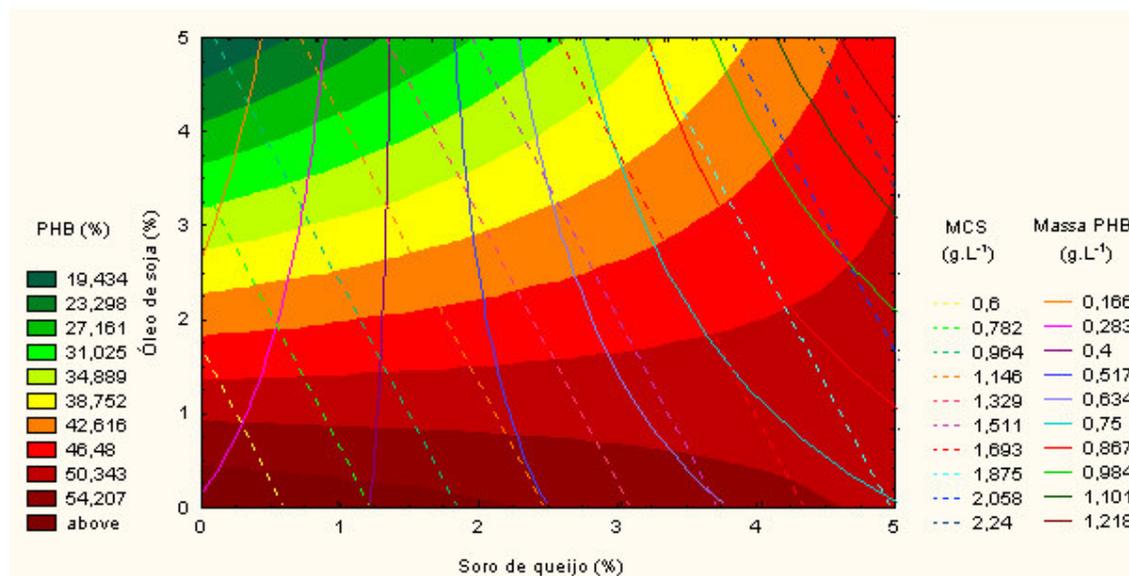


Figura 13. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixado em 5%), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

A Figura 10 mostra que a medida em que se aumenta a concentração de soro de queijo, maior o acúmulo de massa celular seca. O mesmo acontece com o óleo de soja, só que em menor intensidade devido ao menor efeito apresentado sobre esta resposta. A Figura 11 revela que, quanto menor o conteúdo de óleo de soja, maior o acúmulo de PHB. A Figura 12 indica que, quanto maiores os valores de soro de queijo, maior a concentração mássica de PHB obtida. Amido de milho hidrolisado, que se mostrou a variável de maior efeito em todas as situações, foi fixado em seu nível superior de 5%.

Através da Figura 13, pode-se observar o comportamento negativo da variável óleo de soja sobre o acúmulo percentual de PHB (áreas), a evolução positiva das variáveis soro de queijo e óleo de soja sobre a massa celular seca (linhas tracejadas), e o comportamento da massa de PHB (linhas inteiras), em função dos níveis de soro de queijo e óleo de soja (amido de milho hidrolisado fixo em 5%). A combinação das respostas obtida indica que para os valores 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja, quando a concentração de amido de milho hidrolisado é igual a 5%, fornecem uma massa celular seca teórica em torno de  $1,9\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 50% e o acúmulo massa de PHB de  $0,9\text{g.L}^{-1}$ .

Devido ao maior acúmulo massa celular seca e o maior percentual de PHB acumulado, decidiu-se continuar fazendo uso de *E. coli* JM101 nos experimentos posteriores (resultados mostrados no item 4.2), visando testar novas variáveis que pudessem incrementar os valores obtidos.

O tratamento estatístico dos dados experimentais é mostrado nas Tabelas 19, 20 e 21, que apresentam, respectivamente, as análises de variância obtidas para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, modificadas a partir dos dados gerados pelo programa computacional Statistica.

Tabela 19. ANOVA modificada para massa celular seca para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR 68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	4,9403	5	0,99	3300	9,03
Resíduos	0,0008	3	0,0003	—	—
Total	4,9411	7	—	—	—

% variação explicada: 0,9998

Tabela 20. ANOVA modificada para percentual de PHB acumulado para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	4530,64	5	906,13	3,25	9,01
Resíduos	837,24	3	279,08	—	—
Total	5367,88	7	—	—	—

% variação explicada: 0,8440

Tabela 21. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada para *Escherichia coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	1,59	5	0,318	10,6	9,01
Resíduos	0,09	3	0,03	—	—
Total	1,68	7	—	—	—

% variação explicada: 0,9480

Assim como para a linhagem DH10B, o exame dos resíduos indicou que os modelos obtidos estão bem ajustados, pois a soma quadrática referente aos resíduos foi pequena, quando comparada aos valores de regressão. A regressão mostra que os modelos são bons. Assim, pode-se afirmar que os mesmos descrevem adequadamente os resultados experimentais. Estes resultados são confirmados através variação do modelo em relação aos dados experimentais, que pode ser explicada por um coeficiente de correlação de 0,9998 para a massa celular seca, 0,8440 para o percentual de PHB acumulado e 0,9480 para a massa de PHB acumulada.

Para a massa celular seca, o F calculado para a regressão foi muito maior que o tabelado, mostrando que o modelo, além de bem ajustado, é estatisticamente significativo e preditivo. Para o percentual de PHB acumulado, o F calculado para a regressão foi menor que o tabelado, o que indica que o modelo apesar do bom ajuste, não pode ser considerado estatisticamente significativo nem preditivo. Para a massa de PHB, o F calculado para a regressão foi um pouco maior que o tabelado, o que revela que, apesar do ajuste e significado estatístico, não apresenta total confiabilidade preditiva.

Os modelos obtidos para cada uma dessas respostas são representados, respectivamente, pelas Equações 15, 16 e 17.

$$\text{MCS} = 0,183 + 0,045.X_1 + 0,056.X_2 + 0,003.X_3 + 0,049.X_1.X_2 + 0,021.X_1.X_3 - 0,001.X_2.X_3 \quad (15)$$

$$\% \text{PHB} = 12,36 + 9,14.X_1 - 3,91.X_2 - 3,85.X_3 + 0,44.X_1.X_2 - 0,93.X_1.X_3 + 1,51.X_2.X_3 \quad (16)$$

$$\text{mPHB} = 0,108 + 0,015.X_1 - 0,039.X_2 - 0,041.X_3 + 0,035.X_1.X_2 + 0,007.X_1.X_3 + 0,016.X_2.X_3 \quad (17)$$

#### **4.2. Estudo do efeito de outros parâmetros sobre a produção de PHB por *E. coli* JM101 recombinante ancorando o plasmídio pBHR68.**

Desde que, a combinação das respostas obtidas (Figura 9) indicou que para os valores 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja, quando a concentração de amido de milho hidrolisado é igual a 5%, fornecem uma massa celular seca teórica em torno de  $1,9\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 50% e o acúmulo massa celular seca de  $0,9\text{g.L}^{-1}$ , para a linhagem *E. coli* JM101, sendo estas as melhores respostas obtidas a partir da análise dos experimentos anteriores, efetuou-se um novo planejamento, para estudar o efeito de outros parâmetros, capazes de incrementar a produção de PHB, nestas condições.

Desta vez, um planejamento experimental fatorial  $2^5$  foi executado para estudar o efeito i) da concentração de inóculo, ii) adição do indutor da expressão gênica, IPTG, iii) adição do inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, ácido acrílico, iv) tempo de cultivo e v) temperatura de cultivo, sobre o acúmulo de PHB. Estas variáveis são mostradas na Tabela 7 em seus níveis codificados e na Tabela 8 em seus níveis reais. A Tabela 22 mostra as variáveis em seus respectivos níveis codificados e as respostas experimentais obtidas, em função da massa celular seca percentual de PHB e massa de PHB acumulados.

De acordo com a Tabela 22, a massa celular seca referente a cada experimento foi representada através da média de duplicatas. O percentual de PHB acumulado foi avaliado utilizando-se as massas celulares secas, escolhidas ao acaso entre as duplicatas, de cada ensaio, uma vez que não foi possível realizar esta determinação em duplicata. A massa de PHB, por sua vez, também foi obtida em função da quantidade de polímero acumulado nas massas celulares analisadas por cromatografia. Contudo, para obter coerência entre as respostas, estes dados foram expressos em função da média das duplicatas de massa celular seca e não em função das massas analisadas por cromatografia.

Tabela 22. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, de acordo com o planejamento 2<sup>5</sup> para *E. coli* JM101 (pBHR 68)

Exp.	Inóc.	IPTG	ÁA	Tempo	Temp.	MCS <sup>(1)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )	PHB (%)	PHB <sup>(2)</sup> (g.L <sup>-1</sup> )
1	-1	-1	-1	-1	-1	2,00	60,02	1,20
2	+1	-1	-1	-1	-1	2,51	63,27	1,59
3	-1	+1	-1	-1	-1	3,07	59,37	1,82
4	+1	+1	-1	-1	-1	1,92	66,71	1,28
5	-1	-1	+1	-1	-1	0,33	61,20	0,20
6	+1	-1	+1	-1	-1	2,34	59,18	1,38
7	-1	+1	+1	-1	-1	2,11	55,86	1,18
8	+1	+1	+1	-1	-1	2,17	58,24	1,26
9	-1	-1	-1	+1	-1	3,13	69,58	2,18
10	+1	-1	-1	+1	-1	2,39	82,31	1,97
11	-1	+1	-1	+1	-1	3,17	66,29	2,10
12	+1	+1	-1	+1	-1	2,19	64,93	1,42
13	-1	-1	+1	+1	-1	2,67	68,06	1,82
14	+1	-1	+1	+1	-1	2,39	75,43	1,80
15	-1	+1	+1	+1	-1	1,68	57,97	0,97
16	+1	+1	+1	+1	-1	2,86	56,36	1,61
17	-1	-1	-1	-1	+1	2,01	58,14	1,17
18	+1	-1	-1	-1	+1	2,47	56,95	1,41
19	-1	+1	-1	-1	+1	2,62	53,14	1,39
20	+1	+1	-1	-1	+1	2,96	69,82	2,06
21	-1	-1	+1	-1	+1	2,23	58,82	1,31
22	+1	-1	+1	-1	+1	2,71	60,63	1,64
23	-1	+1	+1	-1	+1	0,25	48,85	0,12
24	+1	+1	+1	-1	+1	1,37	52,62	0,72
25	-1	-1	-1	+1	+1	3,56	64,82	2,31
26	+1	-1	-1	+1	+1	3,55	78,72	2,79
27	-1	+1	-1	+1	+1	3,58	64,16	2,30
28	+1	+1	-1	+1	+1	4,39	60,73	2,67
29	-1	-1	+1	+1	+1	2,99	65,36	1,95
30	+1	-1	+1	+1	+1	4,53	49,21	2,23
31	-1	+1	+1	+1	+1	3,20	62,51	2,00
32	+1	+1	+1	+1	+1	2,38	48,33	1,15

(1) Média de duplicatas; (2) Calculado pela média das duplicatas de MCS; Exp.: experimento; Inóc.: inoculo; AA: ácido acrílico; MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato; mPHB: massa de polihidroxibutirato

A Tabela 23 apresenta a análise dos efeitos para as respostas massa celular seca, percentual e massa de polihidroxibutirato, em função de seu erro padrão e nível de significância ( $\delta$ ).

Tabela 23. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual e massa de polihidroxibutirato em função de seu erro padrão e nível de significância ( $\delta$ )

Resposta	MCS (g.L <sup>-1</sup> )		PHB (%)		mPHB (g.L <sup>-1</sup> )	
	Efeito/Erro	$\delta$	Efeito/Erro	$\delta$	Efeito/Erro	$\delta$
Média/Interações	2,55* $\pm$ 0,06	0,0	61,80* $\pm$ 0,94	0,0	1,55* $\pm$ 0,08	0,0
(X <sub>1</sub> ) Inóculo	0,28* $\pm$ 0,11	0,02	1,83 $\pm$ 1,87	0,36	0,12 $\pm$ 0,17	0,49
(X <sub>2</sub> ) IPTG	-0,11 $\pm$ 0,11	0,32	-5,36* $\pm$ 1,87	0,03	-0,16 $\pm$ 0,17	0,37
(X <sub>3</sub> ) Ácido Acrílico	-0,58* $\pm$ 0,11	0,0	-6,27* $\pm$ 1,87	0,01	-0,46* $\pm$ 0,17	0,03
(X <sub>4</sub> ) Tempo	0,97* $\pm$ 0,11	0,0	5,74* $\pm$ 1,87	0,02	0,72* $\pm$ 0,17	0,0
(X <sub>5</sub> ) Temperatura	0,49* $\pm$ 0,11	0,0	-4,49 $\pm$ 1,87	0,05	0,25 $\pm$ 0,17	0,18
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> )	-0,21 $\pm$ 0,11	0,08	-0,63 $\pm$ 1,87	0,74	-0,15 $\pm$ 0,17	0,40
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,37* $\pm$ 0,11	0,0	-4,16 $\pm$ 1,87	0,07	0,13 $\pm$ 0,17	0,48
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,19 $\pm$ 0,11	0,10	-2,17 $\pm$ 1,87	0,29	-0,21 $\pm$ 0,17	0,27
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	0,20 $\pm$ 0,11	0,09	-1,68 $\pm$ 1,87	0,40	0,10 $\pm$ 0,17	0,56
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,40* $\pm$ 0,11	0,0	-1,78 $\pm$ 1,87	0,38	-0,27 $\pm$ 0,17	0,16
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,10 $\pm$ 0,11	0,39	-3,66 $\pm$ 1,87	0,09	-0,12 $\pm$ 0,17	0,50
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	-0,29* $\pm$ 0,11	0,02	1,30 $\pm$ 1,87	0,51	-0,16 $\pm$ 0,17	0,37
(X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,17 $\pm$ 0,11	0,14	-2,26 $\pm$ 1,87	0,27	0,02 $\pm$ 0,17	0,91
(X <sub>3</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	-0,10 $\pm$ 0,11	0,38	-1,24 $\pm$ 1,87	0,53	-0,17 $\pm$ 0,17	0,36
(X <sub>4</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	0,47* $\pm$ 0,11	0,0	-1,39 $\pm$ 1,87	0,49	0,26 $\pm$ 0,17	0,17
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,06 $\pm$ 0,11	0,60	0,55 $\pm$ 1,87	0,77	-0,03 $\pm$ 0,17	0,86
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,17 $\pm$ 0,11	0,15	-4,17 $\pm$ 1,87	0,06	0,08 $\pm$ 0,17	0,63
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	0,08 $\pm$ 0,11	0,47	1,19 $\pm$ 1,87	0,55	0,05 $\pm$ 0,17	0,77
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,06 $\pm$ 0,11	0,60	-1,64 $\pm$ 1,87	0,41	-0,03 $\pm$ 0,17	0,83
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	-0,28* $\pm$ 0,11	0,02	-2,18 $\pm$ 1,87	0,29	-0,32 $\pm$ 0,17	0,11
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>4</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	0,08 $\pm$ 0,11	0,47	-2,94 $\pm$ 1,87	0,16	0,04 $\pm$ 0,17	0,81
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,01 $\pm$ 0,11	0,94	2,58 $\pm$ 1,87	0,22	0,04 $\pm$ 0,17	0,80
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>5</sub> )	-0,50* $\pm$ 0,11	0,0	0,41 $\pm$ 1,87	0,83	-0,23 $\pm$ 0,17	0,23

MCS: massa celular seca; PHB: polihidroxibutirato; mPHB: massa de polihidroxibutirato

\*Efeito significativo num intervalo de 95% de confiança

De acordo com a Tabela 22, observa-se que a utilização das condições de cultivo, exatamente como proposto pelo planejamento anterior, permitiram um acúmulo de MCS de  $2,01\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de 58,14% e uma massa de PHB de  $1,17\text{g.L}^{-1}$  (exp. 17), representando valores muito próximos aos estimados por esta análise, demonstrando a confiabilidade preditiva do planejamento como ferramenta experimental. Além disso, observa-se que os acúmulos de PHB obtidos encontram-se no intervalo de 48 a 82%, e que o maior acúmulo de massa de PHB foi de  $2,79\text{g.L}^{-1}$ , alcançado no experimento 26, com os parâmetros em seus níveis máximos, exceto IPTG e ácido acrílico, ausentes.

De acordo com a Tabela 23, os valores que apresentam efeitos significativos estão assinalados com asteriscos. Neste estudo, optou-se adicionalmente pela avaliação dos resultados pelo nível de significância, devido ao maior número de graus de liberdade obtidos, em função do maior número de valores observados.

Através da comparação dos valores dos efeitos estimados para cada variável com o erro padrão associado a ela é possível prever quais variáveis não contribuem de maneira significativa na resposta estudada.

Entre os efeitos principais, para a resposta massa celular seca, apenas a concentração de IPTG não teve efeito significativo ao nível de significância de 5%, enquanto que para o percentual acumulado de PHB, as variáveis concentração de inóculo e temperatura não foram significativas, neste nível de significância. Para a massa de PHB acumulada, todos os efeitos principais foram significativos, no intervalo de confiança assumido.

O tempo foi a variável com maior efeito sobre o aumento da massa celular, pois apresentou o maior valor numérico, a um nível de significância menor que 5%. Isto significa que aumentando-se o tempo de cultivo de 48 para 96h faz com que a massa celular seja aumentada em  $0,97\text{g.L}^{-1}$ . A concentração do inóculo foi a variável significativa com menor influência sobre a massa celular seca entre os efeitos principais, promovendo um aumento de  $0,28\text{g.L}^{-1}$ , ao passar-se da concentração de 2 para 5%. Entre os efeitos significativos, a adição ácido acrílico foi o único que apresentou efeito negativo sobre a MCS, ocasionando um decréscimo de  $0,58\text{g.L}^{-1}$  ao passar-se da concentração mínima (0) ao valor máximo (1mM) estudado. Em termos numéricos, a temperatura teve a metade da influência demonstrada pelo tempo, promovendo um aumento em  $0,49\text{g.L}^{-1}$  ao passar-se de 30 para 37°C.

O mesmo aumento de tempo provocou um acréscimo em 5,74% no percentual de PHB acumulado, sendo este o maior efeito positivo sobre esta resposta. Entre os demais parâmetros, ácido acrílico, IPTG e temperatura tiveram efeitos negativos de 6,27, 5,36 e 4,49%, respectivamente.

Com relação à massa de PHB acumulada, pode-se afirmar que o tempo, mais uma vez, foi a variável de maior influência, promovendo um acréscimo de  $0,72\text{g.L}^{-1}$  ao aumentar-se o tempo de cultivo de 48 para 96h, o que era de se esperar, tendo em vista os maiores efeitos apresentados também sobre as outras respostas. Ácido acrílico apresentou efeito negativo sobre o acúmulo de PHB, diminuindo em  $0,46\text{g.L}^{-1}$  a massa acumulada.

Obtiveram-se efeitos significativos de segunda ordem nas combinações de IPTG com ácido acrílico e IPTG com tempo, diminuindo a MCS e inóculo com ácido acrílico e tempo com temperatura, aumentando a MCS.

Os efeitos de interação de terceira ordem foram significativos quando envolvendo inóculo, ácido acrílico e temperatura e IPTG, ácido acrílico e temperatura, atuando no decréscimo da MCS. A interação de IPTG, tempo e temperatura influiu no aumento da MCS.

O percentual de PHB acumulado não apresentou efeitos de interação significativos. Apesar disso, o efeito de interação do inóculo com ácido acrílico, bem como o de IPTG com o tempo e de IPTG, tempo e inóculo também devem ser levados em consideração, ainda que seus níveis de significância tenham ficado um pouco acima do limite estipulado (0,05). Tais interações influíram negativamente sobre a resposta acúmulo percentual de PHB.

A partir do planejamento experimental  $2^5$ , foram geradas superfícies da resposta, a partir das equações lineares determinadas em função das variáveis concentração de inóculo, adição de IPTG, adição de ácido acrílico, temperatura e tempo de cultivo. Para tal, foram graficadas curvas de nível correspondentes à superfície de resposta geradas pelo modelo linear obtido. Em cada uma delas, duas das variáveis solicitadas foram levadas em consideração (eixos x e y), enquanto as demais estabelecidas como parâmetros fixos. Escolheu-se a variável tempo para ser relacionada com os demais parâmetros, por ter apresentado o maior efeito sobre todas as variáveis. Assim, através da combinação das cinco variáveis, duas a duas, foram obtidas 32 curvas de nível, conforme podem ser observadas no item ANEXOS, para cada uma das respostas analisadas, totalizando 96 curvas de nível. Os parâmetros foram testados nos níveis -1 e +1.

A Figura 14 mostra a superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR 68. Na figura, observa-se que, nestas condições, a medida que se aumenta o tempo e temperatura de cultivo há uma elevação do conteúdo de biomassa, atingindo-se uma massa celular seca de  $3,45\text{g.L}^{-1}$  em 96h à  $37^\circ\text{C}$ .

Com relação ao percentual de PHB acumulado, observa-se, através da Figura 15, que, com o incremento no tempo de cultivo, o conteúdo de PHB também se eleva. Esta influência foi bastante linear de 48 até 72h e, após este tempo, as áreas passaram a sofrer certa inclinação, indicando uma participação mais efetiva da variável temperatura sobre a resposta, apesar do valor máximo, 82,30%, ter sido alcançado a 30°C. Este parâmetro, por sua vez, para a faixa estudada, não mostrou influência sobre o acúmulo de PHB até 72 horas de cultivo, dentro das condições especificadas.

Para a massa de PHB acumulada, representada pela Figura 16, o comportamento do tempo e temperatura indica que ambas variáveis contribuem para esta resposta, pois a medida em que se aproxima de seus níveis superiores, maior é o valor de massa de PHB acumulado. O valor máximo obtido nestas condições foi de  $2,52\text{g.L}^{-1}$ .

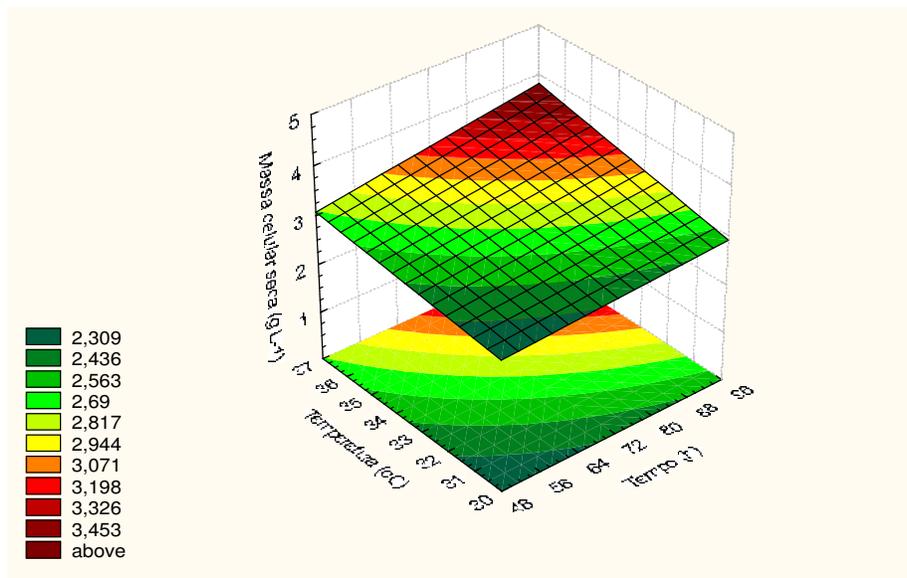


Figura 14. Superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR 68

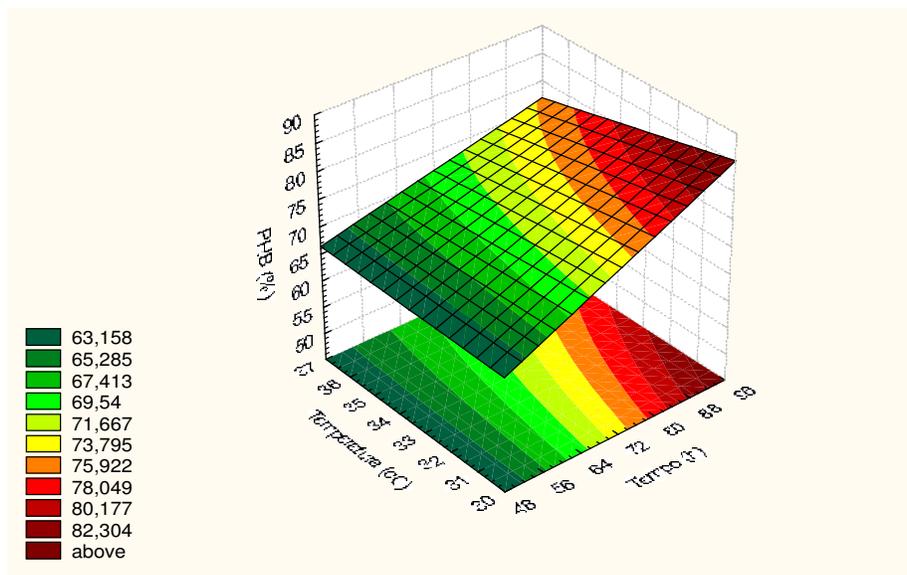


Figura 15. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função do tempo e temperatura (concentração de inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

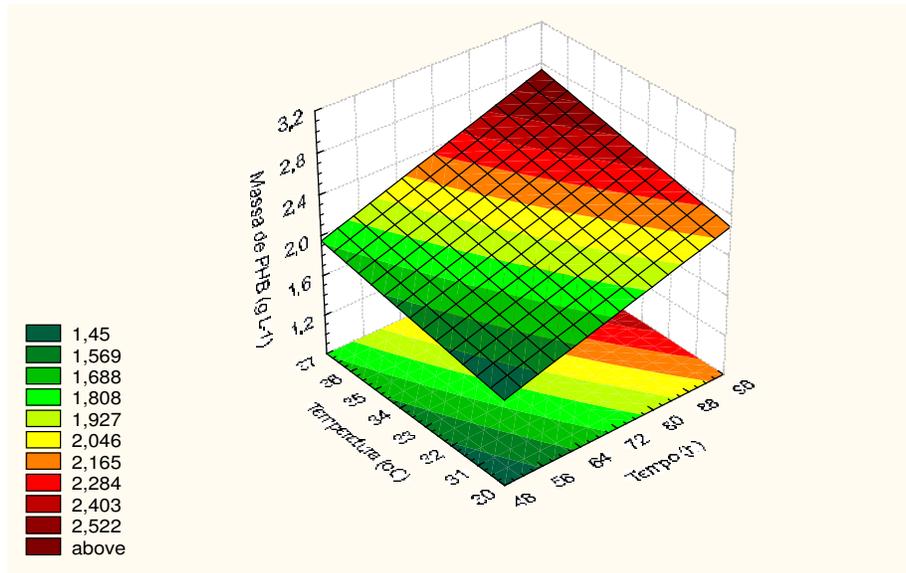


Figura 16. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídio pBHR68

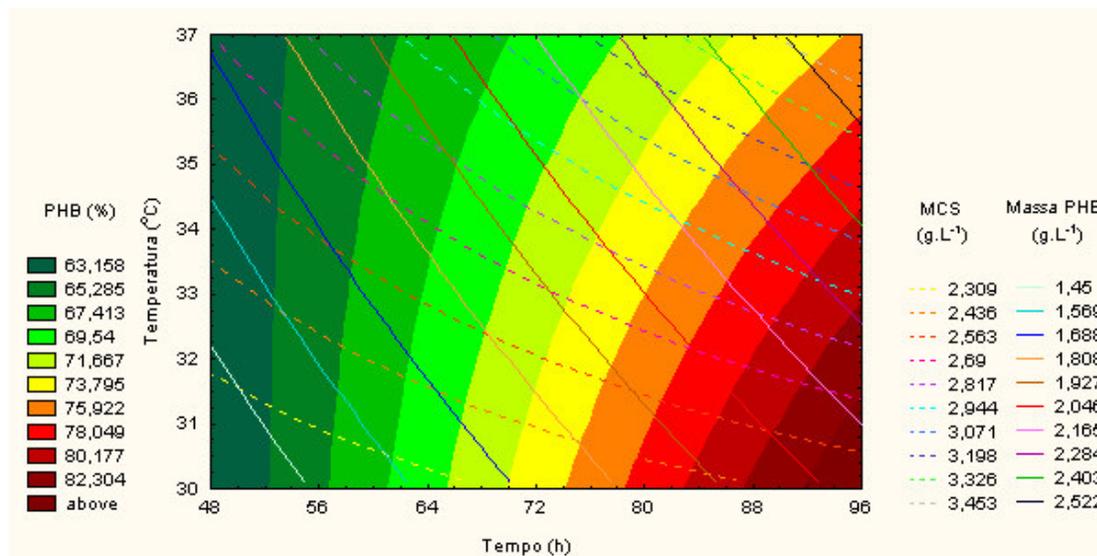


Figura 17. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídio pBHR68

A Figura 17 mostra o comportamento das três respostas através da sobreposição de acúmulo percentual de PHB (áreas), massa celular seca (linhas tracejadas) e massa de PHB (linhas inteiras), em função de tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico). A observação das respostas revela que o cultivo a 37°C por 96h, com concentração de inóculo de 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico fornecem uma massa celular seca em torno de  $3,5\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 75% e o acúmulo massa celular seca de  $2,5\text{g.L}^{-1}$ .

Para melhor ilustrar os resultados obtidos, achou-se interessante mostrar outra situação que também apresentou ótimas respostas, desta vez envolvendo o tempo de cultivo e a concentração de IPTG, com temperatura e inóculo fixos em 37°C e 5%, respectivamente, sem a adição de ácido acrílico. A Figura 18 mostra a superfície de resposta da massa celular seca para estas condições.

Observa-se que, para o máximo de massa celular seca obtido, tempo e IPTG encontram-se em seus níveis superiores. Apesar disso, o uso ou não de IPTG teve praticamente uma mesma influência sobre o acúmulo de massa celular seca, até cerca de 72h, pois a medida em que se passam os intervalos de tempos, a área que varre a faixa de concentrações de IPTG permanece a mesma para toda a extensão, indicando assim que sua influência sobre esta resposta é a mesma para todo intervalo. A partir de 72h, a concentração de IPTG passa a ter maior influência, haja vista que mais de uma área percorre a mesma indicação de tempo. Outra informação que pode ser obtida pela análise da Figura 18 é que quando não utilizado IPTG, a massa celular seca alcançada é de aproximadamente  $3,7\text{g.L}^{-1}$ , cujo valor é bastante próximo ao que se obtém com IPTG em sua concentração máxima, que foi de  $4,164\text{g.L}^{-1}$ .

A Figura 19 refere-se à superfície de resposta do acúmulo percentual de PHB sob as mesmas condições anteriores (temperatura fixa em 37°C, inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico). Observa-se que o máximo de PHB (72,977%) foi obtido quando a variável tempo está em seu nível superior e IPTG no nível inferior.

A superfície de resposta do acúmulo mássico de PHB é representada pela Figura 20, onde, da mesma forma que nas situações anteriores, temperatura e inóculo estão fixos em seus níveis superiores e ácido acrílico em seus nível inferior. Alcançou-se  $2,631\text{g.L}^{-1}$  em 96h e na ausência de IPTG. As áreas correspondentes à massa de PHB deslocaram-se praticamente paralelas ao eixo das concentrações de IPTG, ao longo da superfície, demonstrando ter pouco efeito sobre esta resposta.

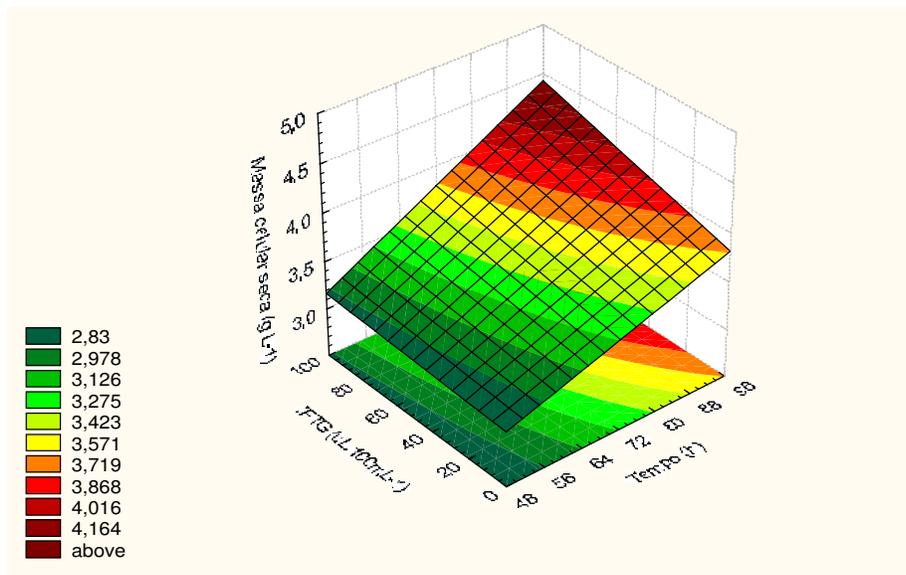


Figura 18. Superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

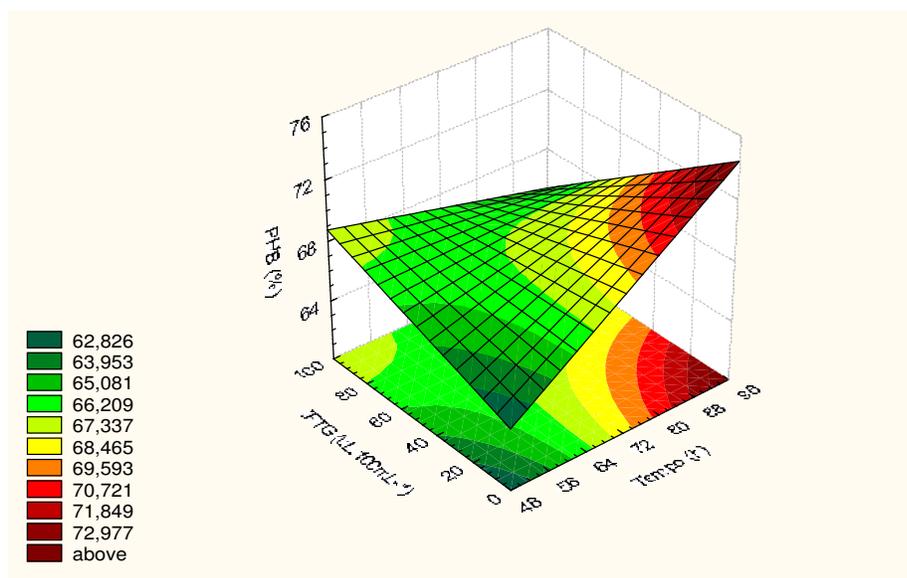


Figura 19. Superfície de resposta do percentual de PHB acumulado, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

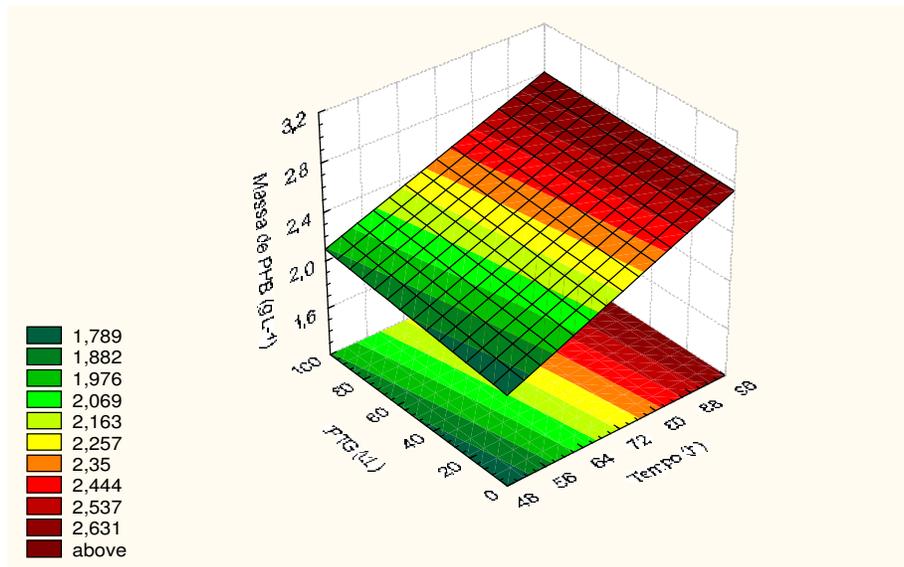


Figura 20. Superfície de resposta da massa de PHB acumulada, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

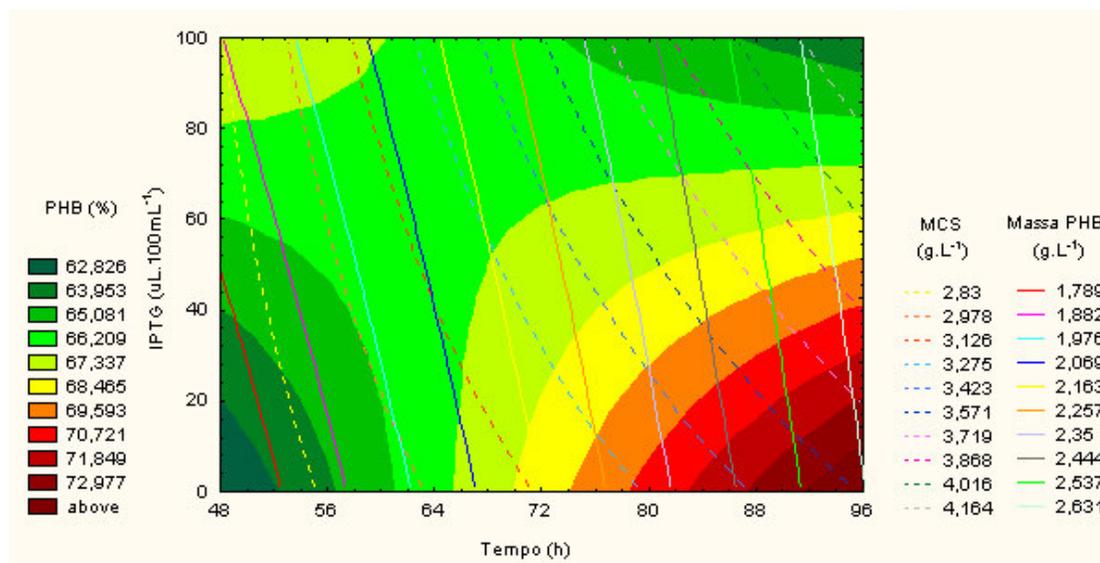


Figura 21. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR68

A Figura 21 mostra a sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, em função do tempo e IPTG (temperatura fixa em 37°C e inóculo fixo em 5%, sem ácido acrílico). A observação das respostas revela praticamente as mesmas respostas obtidas pela análise anterior: massa celular seca em torno de 3,5g.L<sup>-1</sup>, um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 73% e o acúmulo de massa celular seca 2,6g.L<sup>-1</sup>.

A análise do gráfico de tempo x temperatura, mantendo-se fixas, no nível superior, as demais variáveis, mostrou que a temperatura na faixa estudada não teve influência sobre o acúmulo de massa celular, ao contrário do tempo que teve um efeito bastante significativo sobre esta resposta (Fig. 36A). Quando fixado o nível maior de concentração de inóculo (5%) (Fig. 36B), obteve-se um ligeiro aumento da massa celular, e o acúmulo de PHB foi de 82,304%, um valor 13,608% maior do que no caso anterior e, conseqüentemente, com uma massa de PHB acumulada de 2,522g.L<sup>-1</sup>. Nesta situação teve-se uma influência diretamente proporcional entre as variáveis tempo e temperatura.

Através do gráfico de tempo x adição de IPTG obteve-se os valores máximos de massa celular seca (Anexo - Fig. 38D) e de massa de PHB (Anexo - Fig. 46D), nas concentrações de 4,164 g.L<sup>-1</sup> e 2,631 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, com tempo e IPTG direcionados aos seus limites superiores, enquanto as demais variáveis fixadas em seus limites superiores, excetuando-se o ácido acrílico, estipulado para ambas situações em seu limite inferior.

As Tabelas 24, 25 e 26 apresentam as análises de variância obtidas para massa celular seca, percentual e massa de PHB acumulados, modificadas a partir dos dados gerados pelo programa computacional Statistica.

Tabela 24. ANOVA modificada para massa celular seca

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	45,77	25	1,83	8,32	1,78
Resíduos	8,54	38	0,22	—	—
Total	54,31	63	—	—	—

% variação explicada: 0,8426

Tabela 25. ANOVA modificada para percentual acumulado de PHB

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	1795,50	25	71,82	2,5	3,84
Resíduos	169,39	6	28,23	—	—
Total	1964,89	31	—	—	—

% variação explicada: 0,9138

Tabela 26. ANOVA modificada para massa de PHB acumulada

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F <sub>v1, v2</sub> calculado	F <sub>v1, v2</sub> tabelado
Regressão	10,85	25	0,43	1,86	3,84
Resíduos	1,43	6	0,23	—	—
Total	12,28	31	—	—	—

% variação explicada: 0,8829

O exame dos resíduos indica que os modelos obtidos estão bem ajustados, pois a soma quadrática referente aos resíduos foi pequena, quando comparada aos valores de regressão. A regressão bastante significativa mostra que o modelo é bom. Assim, pode-se afirmar que os modelos descrevem adequadamente os resultados experimentais.

Para a massa celular seca, o F calculado para a regressão foi 4,7 vezes maior que o tabelado, o que mostra que o modelo, além de bem ajustado, é estatisticamente significativo e preditivo, pois a condição de ser, no mínimo, de 4 a 5 vezes maior que o tabelado, foi satisfeita. Para o percentual e massa de PHB acumulados, o F calculado para a regressão foi menor que o tabelado, mostrando que não é estatisticamente significativo, apesar de ter apresentado um ajuste considerável.

A variação do modelo em relação aos dados experimentais pode ser explicada por um coeficiente de correlação de 0,8426 para a massa celular seca, 0,9138 para o percentual de PHB acumulado e 0,8829 para a massa de PHB acumulada.

Após a análise dos coeficientes de regressão através do programa computacional Statistica, utilizando-se todas respostas experimentais, apresentadas em seus valores médios na Tabela 22, foi possível obter-se os modelos lineares relacionados às respostas massa celular seca, percentual de polihidroxibutirato e massa de polihidroxibutirato, mostrados nas

Equações 18, 19, 20, respectivamente. Para tal, foram considerados todos os efeitos principais, além dos efeitos de segunda ordem que se mostraram significativos.

$$\text{MCS} = 3,06 - 0,15.X_1 + 0,09.X_2 - 0,12.X_3 + 0,03.X_4 - 0,08.X_5 + 0,02.X_1.X_3 + - 0,001.X_2.X_4 + 0,003.X_3.X_5 \quad (18)$$

$$\% \text{PHB} = 123,85 - 27,24.X_1 + 0,68.X_2 - 0,51.X_3 - 0,74.X_4 - 2,21.X_5 \quad (19)$$

$$\text{mPHB} = 3,02 - 0,51.X_1 + 0,06.X_2 - 0,10.X_3 + 0,01.X_4 - 0,11.X_5 \quad (20)$$

### **4.3. Produção de PHAs por *E. coli* recombinante contendo o gene estrutural da PHA sintase de *P. aeruginosa* (pBHR71)**

Estudos semelhantes aos anteriores foram feitos para avaliar a produção de PHAs de cadeia média por *E. coli* recombinante ancorando os genes estruturais para a biossíntese de PHAs de *P. aeruginosa*. Para isto as linhagens de *E. coli* DH10B e JM101 foram transformadas pelo plasmídeo pBHR71, que além do gene que confere resistência ampicilina, também contém o gene *phaC1*, codificando para umas das PHAs sintases de *P. aeruginosa*. Os transformantes que carregam o plasmídeo foram utilizados para o estudo do efeito de substratos de baixo custo, sobre a produção de polihidroxialcanoatos através um planejamento experimental  $2^3$  para avaliar a influência de: i) amido de milho hidrolisado, ii) soro de queijo, iii) óleo de soja e iv) adição de ácido acrílico, conforme mostra a Tabela 11, em seus respectivos níveis reais.

#### **4.3.1. Produção de PHAs por *E. coli* (DH10B) recombinante contendo o plasmídeo pBHR71**

A Tabela 27 mostra a matriz de planejamento e as respostas experimentais obtidas para massa celular seca, conteúdo e a composição dos PHAs acumulados para a linhagem DH10B, ancorando o plasmídeo pBHR71, enquanto a Tabela 28 ilustra os efeitos obtidos através da análise estatística para cada uma das respostas observadas.

Tabela 27. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHA de acordo com o planejamento experimental 2<sup>4</sup> para *E. coli* DH10B (pBHR 71)

Exp.	AMH	SQ	OS	AA	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (%)	3HB (%)	3HHx (%)	3HO (%)	3HD (%)	3HDD (%)
1	-1	-1	-1	-1	0,09	0,15	0,15	nd	nd	nd	nd
2	+1	-1	-1	-1	0,23	0,11	0,11	nd	nd	nd	nd
3	-1	+1	-1	-1	0,39	1,55	1,55	nd	nd	nd	nd
4	+1	+1	-1	-1	0,80	0,6	nd	nd	nd	0,6	nd
5	-1	-1	+1	-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	+1	-1	+1	-1	1,37	0,51	0,51	nd	nd	nd	nd
7	-1	+1	+1	-1	1,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	+1	+1	+1	-1	0,83	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	-1	-1	-1	+1	0,32	0,09	0,09	nd	nd	nd	nd
10	+1	-1	-1	+1	0,42	0,04	0,04	nd	nd	nd	nd
11	-1	+1	-1	+1	0,73	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12	+1	+1	-1	+1	1,05	0,50	nd	nd	nd	0,50	nd
13	-1	-1	+1	+1	0,23	1,26	0,60	nd	nd	0,26	0,40
14	+1	-1	+1	+1	0,85	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	-1	+1	+1	+1	0,87	1,99	1,16	nd	nd	0,65	0,18
16	+1	+1	+1	+1	1,02	22,99	2,06	nd	1,04	7,06	12,83

Exp.: experimento; AMH: amido de milho hidrolisado; SQ: soro de queijo; OS: óleo de soja; AA ácido acrílico; MCS: massa celular seca; PHA: polihidroxialcanoato; 3HB: 3-hidroxi-butirato; 3HHx: 3-hidroxi-hexanoato; 3HO: 3-hidroxi-octanoato; 3HD: 3-hidroxi-decanoato; 3HDD: 3-hidroxi-dodecanoato, nd: não detectado

Tabela 28. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca, percentual de PHA de acordo com o planejamento experimental  $2^3$  para *Escherichia coli* DH10B (pBHR 71)

	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (%)
Média/Interação	0,64	1,86
(X <sub>1</sub> ) Amido	0,36	2,46
(X <sub>2</sub> ) Soro	0,40	3,18
(X <sub>3</sub> ) Óleo	0,27	2,96
(X <sub>4</sub> ) Ácido acrílico	0,09	2,99
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> )	-0,20	2,67
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,12	2,60
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,06	2,58
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,07	2,62
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,06	2,84
(X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,16	3,44
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,32	2,76
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,13	3,03
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,03	2,22
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,01	3,22

MCS: massa celular seca; PHA: polihidroxialcanoato

Para a linhagem DH10B (pBHR71), a resposta MCS foi influenciada principalmente pela adição de soro e de amido de milho hidrolisado, que contribuíram em 0,40 e 0,36g.L<sup>-1</sup> ao passar-se do nível inferior ao superior. Todavia a combinação destas variáveis apresentou um efeito de redução em 0,20g.L<sup>-1</sup> na MCS. Para o percentual de PHA acumulado, a melhor resposta, entre os efeitos principais, foi obtida com a utilização de soro de queijo, propiciando um aumento na ordem de 3,18%. Soro de queijo e ácido acrílico e também foram relevantes, melhorando em 2,96 e 2,99% o acúmulo de PHA. Inclusive, a combinação destas variáveis teve um efeito ainda maior que cada uma delas isoladamente, sendo este valor, 3,44% o maior entre todos os demais efeitos. Para o acúmulo de massa de PHA, a análise do efeito das variáveis sobre este resposta torna-se mais difícil, em virtude dos valores obtidos terem sido muito baixos, mas, entre os efeitos principais, verifica-se que a adição de soro incrementou em 0,032g.L<sup>-1</sup> o acúmulo de massa de PHA.

O exame dos resíduos indica que os modelos obtidos estão bem ajustados, pois a soma quadrática referente aos resíduos foi pequena (dado não mostrado), quando comparada aos valores de regressão. A regressão bastante significativa mostra que o modelo é bom. Assim, pode-se afirmar que os modelos descrevem adequadamente os resultados experimentais. A variação do modelo em relação aos dados experimentais pode ser explicada por um coeficiente de correlação de 0,9649 para a massa celular seca e 0,9411 para o percentual de PHB acumulado.

As superfícies de respostas da massa celular seca acumulada, percentual e massa de PHB acumulados são representadas em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acrílico (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%) são apresentadas nas Figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

A observação da Figura 18 mostra que houve uma pequena variação entre o mínimo e máximo de massa celular seca obtidos em função das condições estudadas. Entretanto, o valor máximo de  $1,261\text{g.L}^{-1}$  foi atingido nos níveis inferiores de soro de queijo e ácido acrílico. Observa-se ainda que, para qualquer concentração de soro + ácido acrílico (1 mM), a massa celular seca obtida foi praticamente a mesma, o que indica que, neste nível, a combinação das duas variáveis praticamente não tem efeito algum sobre a resposta. O mesmo ocorreu com o soro de queijo em seu nível superior. Isto porque, em ambos os casos, além da área em questão ser a mesma, a inclinação da superfície é praticamente nula.

O acúmulo percentual de PHA, conforme mostra a Figura 19, apresentou uma grande diferença ao passar-se do nível inferior ao nível superior das duas variáveis, mostrando bem a influência positiva destas duas variáveis sobre a resposta. Desta forma, obteve-se 19,689% de acúmulo de PHA em 5% de soro de queijo e 1mM de ácido acrílico ( $0,1\text{mg.L}^{-1}$ ).

De acordo com a Figura 20, para o acúmulo de PHA, em massa, o comportamento revelado pela superfície de resposta é bastante semelhante ao do percentual de PHA, sendo que  $0,197\text{g.L}^{-1}$  de massa de PHA são obtidos nos níveis superiores de soro de queijo e ácido acrílico.

A Figura 21 mostra a sobreposição das três respostas, sendo o percentual de PHA representado por áreas, massa celular seca por linhas tracejadas e massa de PHA por linhas cheias. Percebe-se que em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja, além de  $100\mu\text{L}$  de ácido acrílico ( $0,1\text{mg.L}^{-1}$ ), ou seja, todas os parâmetros em seus níveis superiores, é possível acumular-se em torno de 20% de PHA,  $0,95\text{g.L}^{-1}$  de massa celular seca e  $0,2\text{g.L}^{-1}$  de massa de PHA.

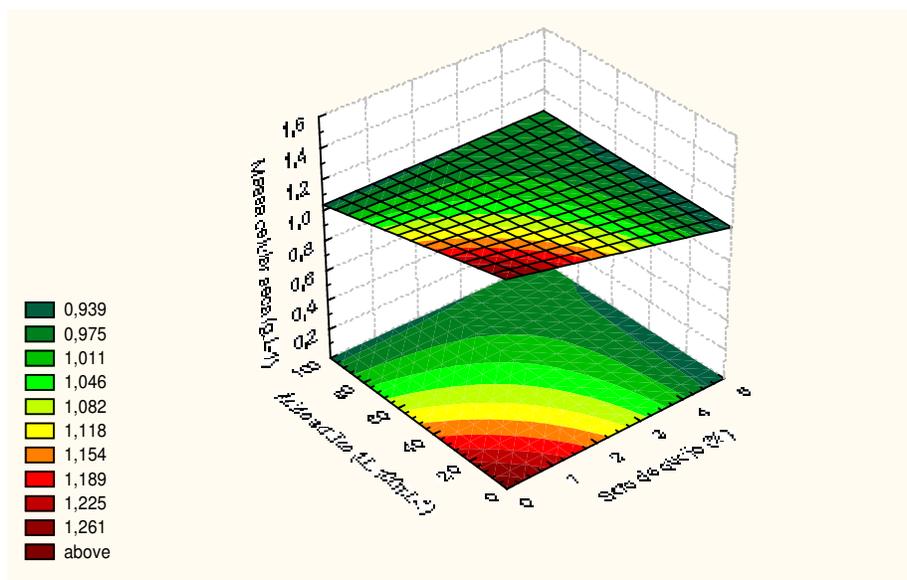


Figura 22. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acético (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR71

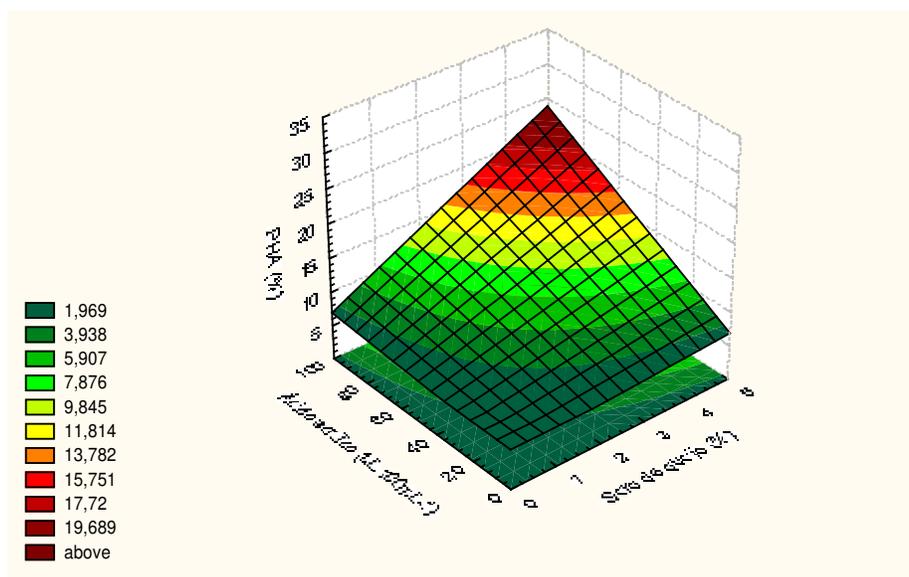


Figura 23. Superfície de resposta do percentual de PHA acumulado, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acético (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR71

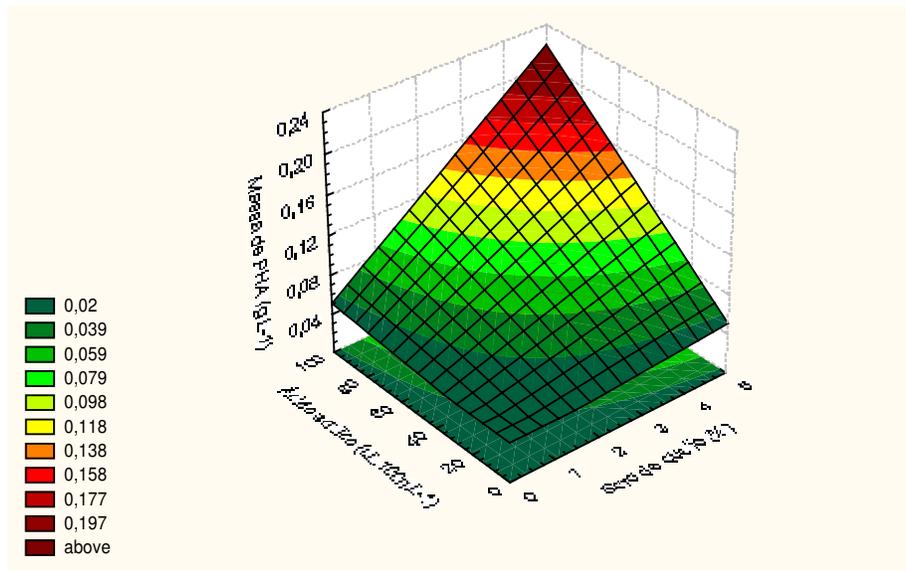


Figura 24. Superfície de resposta da massa de PHA acumulada, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acético (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR71

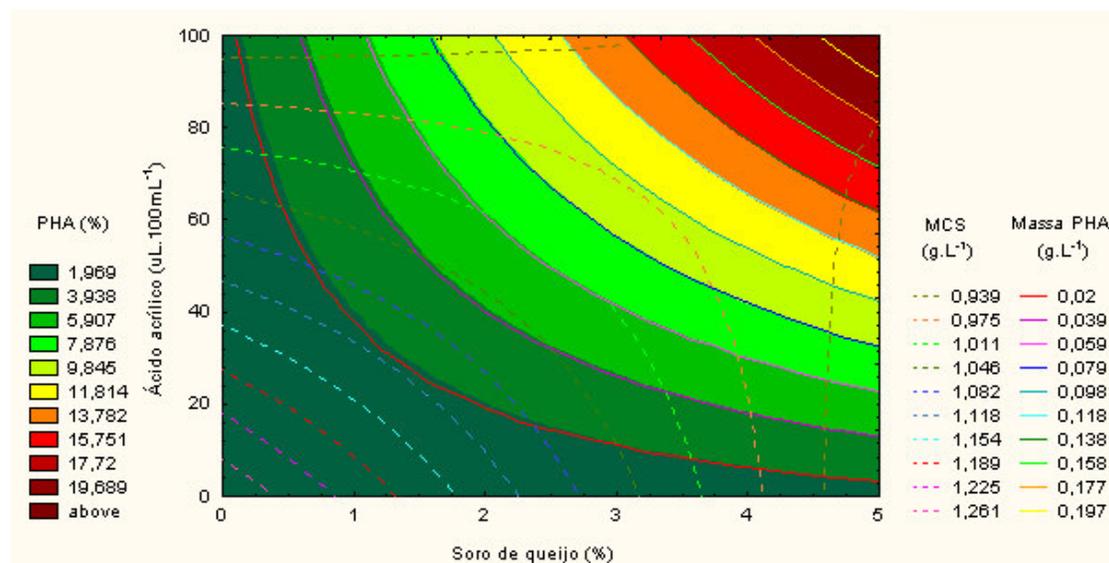


Figura 25. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHA acumulados, em função dos conteúdos de soro de queijo e ácido acético (amido de milho hidrolisado e óleo de soja fixados em 5%), para *E. coli* DH10B ancorando o plasmídeo pBHR71

#### 4.3.2. Produção de PHAs por *E. coli* (JM101) recombinante contendo o plasmídio pBHR71

A Tabela 29 mostra a matriz de planejamento com as variáveis codificadas, bem como as respostas experimentais obtidas para massa celular seca e conteúdo de PHA acumulado para a linhagem JM101, ancorando o plasmídio pBHR71, enquanto a Tabela 30 ilustra os efeitos obtidos através da análise estatística para cada uma das respostas observadas.

Tabela 29. Variáveis codificadas e valores obtidos para a massa celular seca e acúmulo de PHA de acordo com o planejamento experimental 2<sup>4</sup> para *E. coli* JM101 (pBHR 71)

Exp.	AMH	SQ	OS	AA	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (%)	3HB (%)	3HHx (%)	3HO (%)	3HD (%)	3HDD (%)
1	-1	-1	-1	-1	0,17	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	+1	-1	-1	-1	1,20	1,30	nd	nd	nd	1,30	nd
3	-1	+1	-1	-1	0,48	3,31	3,31	nd	nd	nd	nd
4	+1	+1	-1	-1	1,53	0,25	nd	nd	nd	0,25	nd
5	-1	-1	+1	-1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	+1	-1	+1	-1	3,63	0,40	0,40	nd	nd	nd	nd
7	-1	+1	+1	-1	2,19	0,34	0,34	nd	nd	nd	nd
8	+1	+1	+1	-1	0,86	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	-1	-1	-1	+1	0,04	0,55	0,38	nd	nd	nd	0,17
10	+1	-1	-1	+1	0,02	0,93	0,48	nd	nd	0,23	0,22
11	-1	+1	-1	+1	0,14	1,49	0,44	nd	0,18	0,65	0,22
12	+1	+1	-1	+1	0,15	0,82	0,34	nd	nd	nd	0,48
13	-1	-1	+1	+1	0,08	nd	nd	nd	nd	nd	nd
14	+1	-1	+1	+1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
15	-1	+1	+1	+1	0,08	0,28	0,28	nd	nd	nd	nd
16	+1	+1	+1	+1	0,17	0,82	0,82	nd	nd	nd	nd

Exp.: experimento; AMH: amido de milho hidrolisado; SQ: soro de queijo; OS: óleo de soja; AA ácido acrílico; MCS: massa celular seca; PHA: polihidroxialcanoato; 3HB: 3-hidroxiobutirato; 3HHx: 3-hidroxihexanoato; 3HO: 3-hidroxi-octanoato; 3HD: 3-hidroxi-decanoato; 3HDD: 3-hidroxi-dodecanoato, nd: não detectado

Tabela 30. Efeitos das variáveis sobre as respostas massa celular seca e percentual de PHA para a *E. coli* JM101 (pBHR71)

	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (%)
Média/Interação	0,67	0,66
(X <sub>1</sub> ) Amido	0,54	-0,18
(X <sub>2</sub> ) Soro	0,06	0,52
(X <sub>3</sub> ) Óleo	0,41	-0,85
(X <sub>4</sub> ) Ácido acrílico	-1,17	-0,09
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> )	-0,59	-0,70
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	0,03	0,33
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,55	0,24
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,16	-0,26
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,04	-0,03
(X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,41	0,18
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> )	-0,60	0,65
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>2</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,64	0,57
(X <sub>1</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	-0,02	-0,12
(X <sub>2</sub> ) x (X <sub>3</sub> ) x (X <sub>4</sub> )	0,14	0,32

MCS: massa celular seca; PHA: polihidroxialcanoato

Para a linhagem JM101 (pBHR71), a resposta MCS foi influenciada principalmente pela adição de amido de milho hidrolisado e óleo, que contribuíram em 0,54 e 0,41g.L<sup>-1</sup> ao passar-se do nível inferior ao superior. Para o percentual de PHA acumulado, a melhor resposta foi obtida com a utilização de soro de queijo, mas a combinação com amido de milho hidrolisado ou óleo teve efeito negativo. O acúmulo de massa de PHA teve seus maiores efeitos negativos em presença de ácido acrílico, devido a menor MCS produzida e em amido de milho hidrolisado + soro de queijo, uma vez que este efeito mostrou-se negativo tanto para o acúmulo de MCS quanto de polímero.

O exame dos resíduos indica que os modelos obtidos estão bem ajustados, pois a soma quadrática referente aos resíduos foi pequena, quando comparada aos valores de regressão. A regressão bastante significativa mostra que o modelo é bom. Assim, pode-se afirmar que os modelos descrevem adequadamente os resultados experimentais. A variação do modelo em relação aos dados experimentais pode ser explicada por um coeficiente de correlação de 0,8952 para a massa celular seca e 0,9764 para o percentual de PHA acumulado.

As superfícies de respostas da massa celular seca acumulada, percentual e massa de PHA acumulados são representadas em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR71, pelas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente.

De acordo com a Figura 22, óleo de soja no nível superior e ácido acrílico no nível inferior fornecem a melhor resposta para massa celular seca acumulada, obtendo-se o valor de  $1,7\text{g.L}^{-1}$  nesta região. É indicada, então, a influência negativa do parâmetro ácido acrílico sobre esta resposta.

Como ilustra a Figura 23, óleo de soja e ácido acrílico em seus níveis inferiores fornecem a melhor resposta (2,908%) para o percentual de PHA acumulado. Observa-se ainda que a influência do ácido acrílico foi maior em baixos teores de óleo de soja, como uma maior variação de acúmulo, em função da concentração utilizada. Porém, nas maiores concentrações de óleo de soja foi mostrado que a concentração de ácido acrílico usada não teve influência sobre o acúmulo de PHA.

A Figura 24 indica que os melhores valores para a resposta massa de PHA tende aos níveis inferiores de óleo de soja e ácido acrílico, variando numa faixa de 0 a 1,5% para o óleo de soja e 0 à 0,3 mM para o ácido acrílico. Nesta região atingiu-se o acúmulo de  $0,014\text{g.L}^{-1}$  de PHA.

A Figura 25 mostra a sobreposição das três respostas, sendo o percentual de PHA representado por áreas, massa celular seca por linhas tracejadas e massa de PHA por linhas cheias. Observa-se que em meio mineral contendo 5% de soro de queijo, ausente de amido de milho hidrolisado, óleo de soja e ácido acrílico, pode-se acumular por volta de 3% de PHA,  $0,85\text{g.L}^{-1}$  de massa celular seca e  $0,015\text{g.L}^{-1}$  de massa de PHA.

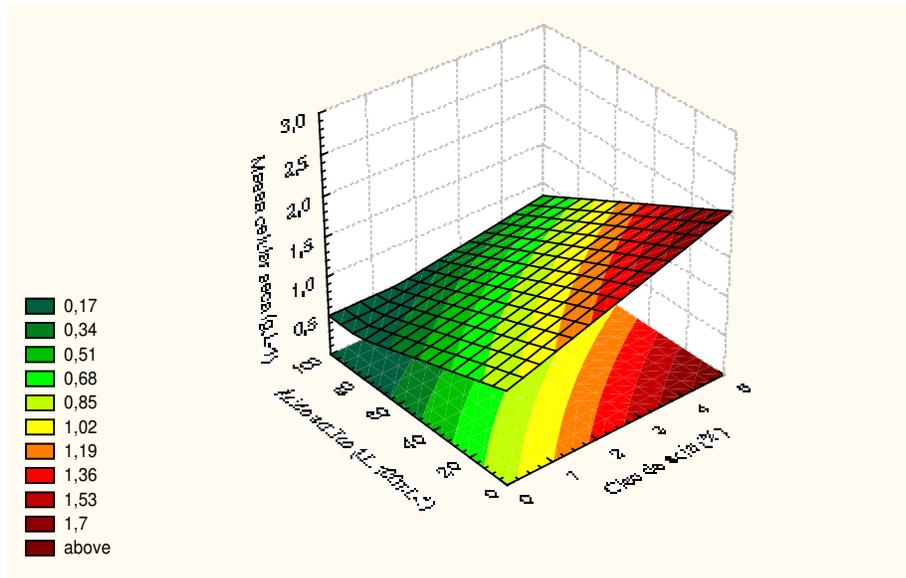


Figura 26. Superfície de resposta da massa celular seca, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR71

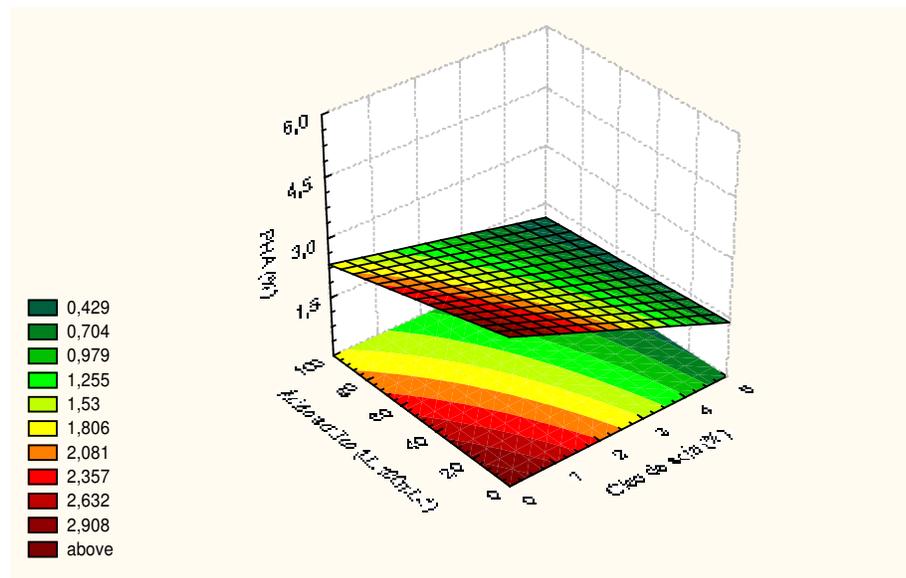


Figura 27. Superfície de resposta do percentual de PHA acumulado, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR71

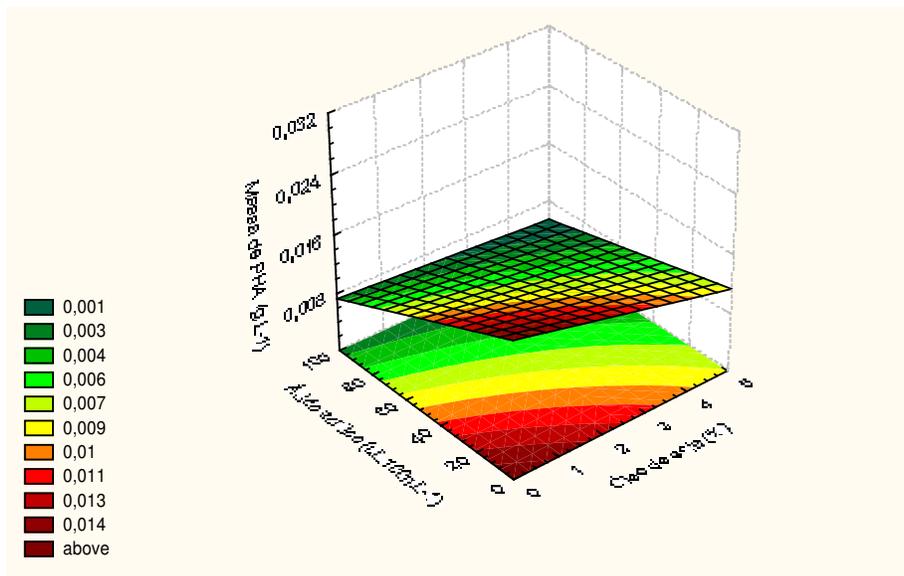


Figura 28. Superfície de resposta da massa de PHA acumulada, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídio pBHR71

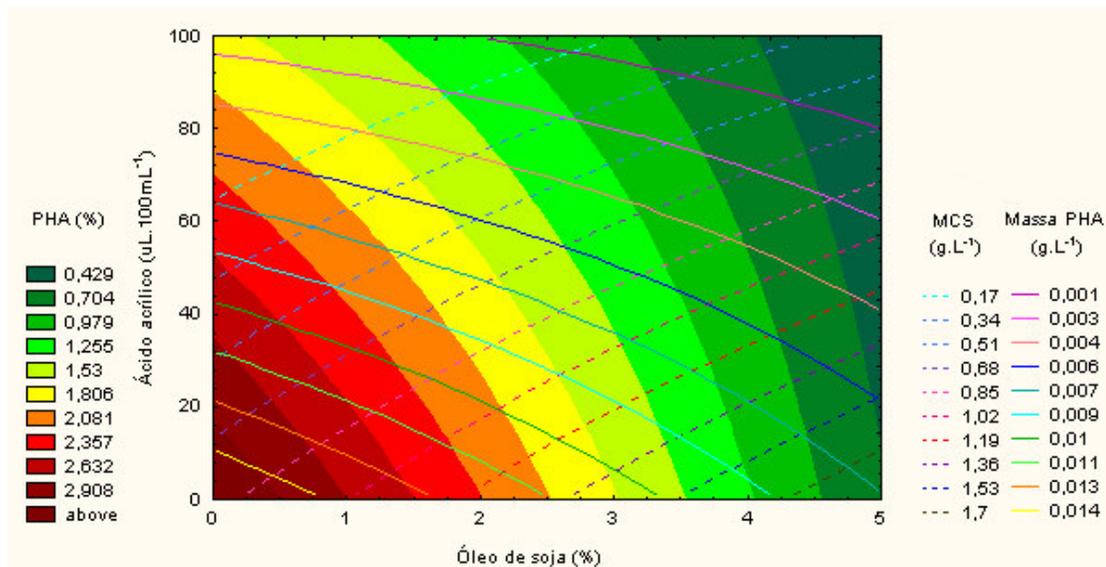


Figura 29. Sobreposição das curvas de nível para massa celular seca, percentual e massa de PHA acumulados, em função dos conteúdos de óleo de soja e ácido acrílico (soro de queijo fixado em 5%, sem amido de milho hidrolisado), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídio pBHR71

#### 4.4. Utilização de óleos vegetais como substrato para a produção de PHAs de cadeia média por *E. coli* recombinante

A fim de se estudar a influência de diversos óleos vegetais sobre o acúmulo de polihidroxialcanoatos de cadeia média, cultivou-se *Escherichia coli* JM101, ancorando o plasmídeo pBHR71, que contém os genes da PHA sintase de *Pseudomonas aeruginosa* em meio mineral contendo 1% (v/v) do óleo em estudo, além de 5% (v/v) de soro de queijo, conforme o item 3.2.9.4.

A Tabela 35 mostra os resultados obtidos para massa celular seca, percentual de PHB e massa de PHB acumulados em função de cada óleo estudado. Conseguiu-se avaliar a composição em função de 3HB, 3HHx, 3HO, 3HD e 3HDD, mesmo sabendo-se que é possível acumular polímeros contendo até dezesseis carbonos (FUKUI; DOI, 1998). Embora a PHA sintase de *P. aeruginosa* não acumule polímero de cadeia curta, 3HB foi detectado em algumas amostras. Os valores para este componente encontraram-se na faixa de 1,5 a 2,5%, e foram desconsiderados para fins de análise, uma vez que estes podem ser resíduos do metabolismo bacteriano não relacionado ao polímero.

Tabela 31. Valores de massa celular seca, percentual de PHB e massa de PHB acumulados para *Escherichia coli* JM101 (pBHR 71) em função de diversos tipos de óleos vegetais

Óleo vegetal	MCS (g.L <sup>-1</sup> )	PHA (%)	3HHx (%)	3HO (%)	3HD (%)	3HDD (%)	mPHA (g.L <sup>-1</sup> )
algodão	0,53	11,46	nd	1,48	7,03	2,95	0,061
arroz	0,43	3,19	0,80	1,03	0,76	0,60	0,014
canola	0,33	6,01	nd	1,03	3,92	1,06	0,020
dendê	0,58	11,64	2,36	1,15	2,80	5,33	0,068
girassol	0,57	6,94	0,92	1,00	3,84	1,18	0,040
milho	0,50	1,7	nd	0,72	0,98	nd	0,009
oliva	0,61	6,31	nd	1,01	3,64	1,66	0,038
soja	0,46	10,31	nd	1,08	2,71	6,52	0,047

Exp.: experimento; MCS: massa celular seca; PHA: polihidroxialcanoato; mPHA: massa de polihidroxialcanoato 3HB: 3-hidroxi butirato; 3HHx: 3-hidroxi hexanoato; 3HO: 3-hidroxi octanoato; 3HD: 3-hidroxi decanoato; 3HDD: 3-hidroxi dodecanoato, nd: não detectado

Com relação à massa celular seca, os valores, obtidos pela média de duplicatas, foram bastante próximos, variando de 0,33 a 0,61g.L<sup>-1</sup>, para óleo de canola e oliva, respectivamente. O percentual de PHA foi maior para óleo de dendê, seguido por algodão e soja, que foram os únicos em que se obteve mais de 10% de acúmulo. Os maiores acúmulos mássicos de PHA também ficaram atrelados ao óleo de dedê, seguido por algodão.

De acordo com os resultados alcançados, percebe-se que óleo de dendê apresenta o maior potencial para utilização em fins biotecnológicos, pois foi aquele em que se atingiu o maior percentual e massa de PHA acumulados, 11,64% e 0,068g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, foi um dos três óleos que se mostraram capazes de acumular todos os tipos de polímero que puderam ser avaliados, juntamente com girassol e arroz.

#### **4.5. Avaliação da estabilidade plasmidial em *E. coli* recombinante**

Alguns autores descrevem como um dos problemas ao se trabalhar com linhagens recombinantes é a perda do plasmídio ancorando os genes de interesse e os que conferem seletividade (resistência a antibióticos) durante o processo de cultivo. Por esta razão foi testada a estabilidade dos plasmídios utilizados neste estudo, com o objetivo de avaliar sua influência sobre a produção de massa celular bem como na produção de PHAs, quando ancorados nas as linhagens empregadas.

Embora neste estudo tenha sido empregado basicamente meio mineral e substratos de baixo custo, este estudo serviu para avaliar o comportamento geral dos plasmídios em função das linhagens em meio complexo (o que nunca havia sido realizado anteriormente pelos seus construtores), para que, mais adiante, possa-se avaliar aqueles que realmente tiverem seu uso justificado em substratos de baixo custo, de acordo com os demais resultados obtidos.

Assim, a Tabelas 32 mostra a concentração de biomassa obtida pelo acompanhamento da absorbância (600nm) Da mesma forma, a Figura 30 fornece a concentração de biomassa, medida pela absorbância, enquanto que as Figuras 33 e 34 mostra a variação da concentração de células com e sem plasmídio, em função do tempo, respectivamente.

Tabela 32. Concentração adimensional de biomassa estimada pela absorvância do caldo de cultivo em 600nm ( $Abs_{600}$ ) para *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

Tempo (h)	$Abs_{600}$		
	JM101 (pBHR68)	JM101 (pBHR71)	DH10B (pBHR71)
0	0	0	0
6	1,0	1,50	1,15
12	1,15	1,59	1,55
18	1,25	1,65	2,10
24	1,43	1,83	2,14
30	1,47	1,90	2,69
36	1,60	1,95	2,75
48	2,53	3,05	2,84
72	3,36	4,07	3,72
96	6,73	7,57	6,04

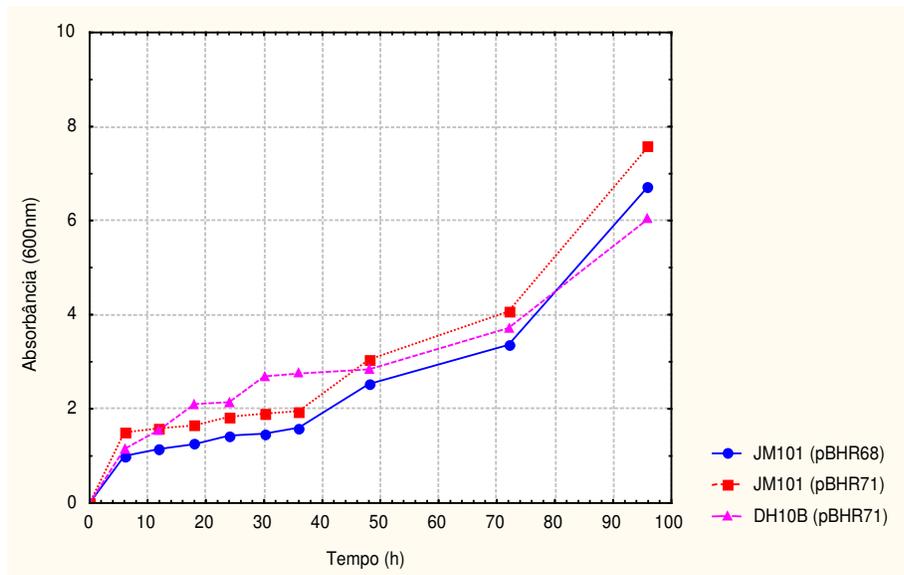


Figura 30. Concentração adimensional de biomassa ( $Abs_{600}$ ) para *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

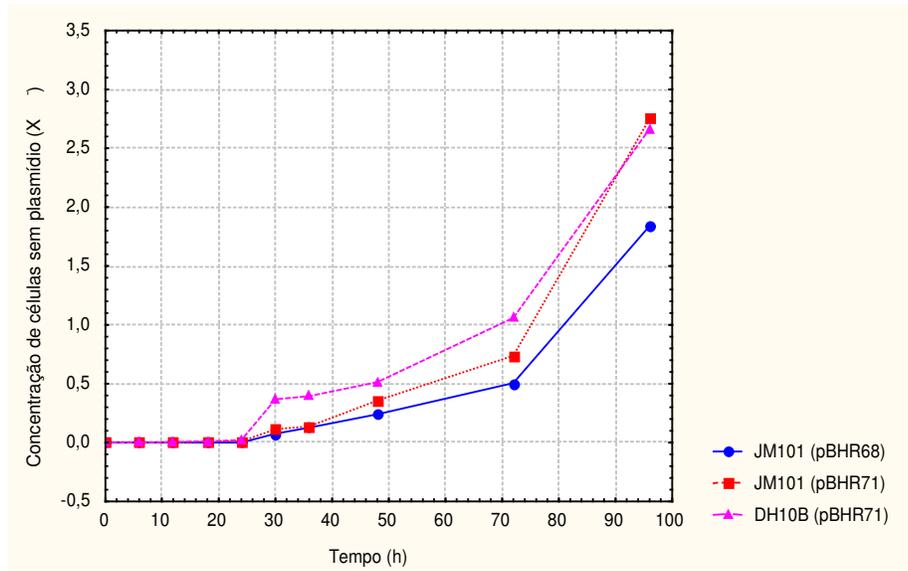


Figura 31. Concentração adimensional de células sem plasmídeo em função do tempo

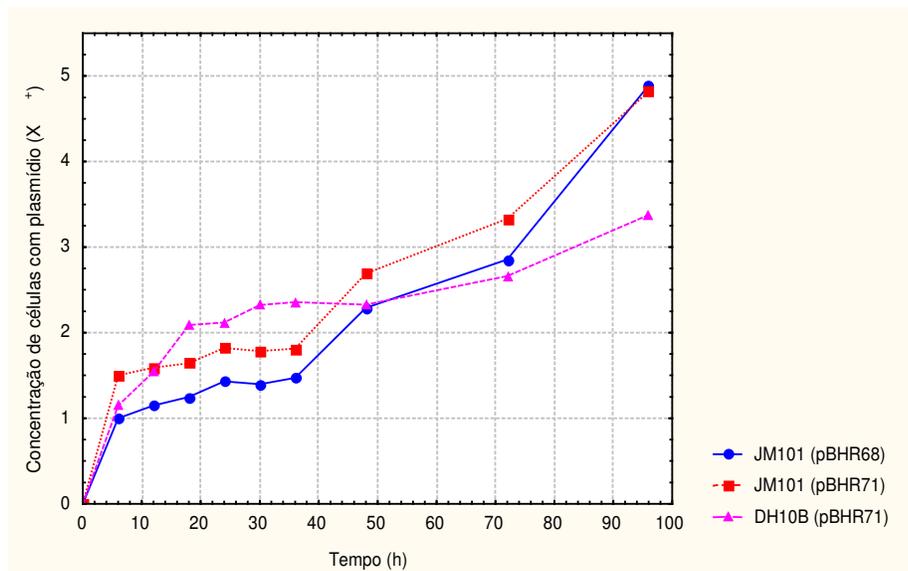


Figura 32. Concentração adimensional de células com plasmídeo em função do tempo

A Tabela 33 e a Figura 33 mostram a contagem do número de unidades formadoras de colônias, ambas em função do tempo de cultivo.

Tabela 33. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

Tempo (h)	UFC		
	JM101 (pBHR68)	JM101 (pBHR71)	DH10B (pBHR71)
0	0	0	0
6	$6,8 \times 10^{12}$	$4,5 \times 10^{12}$	$2,9 \times 10^{12}$
12	$1,8 \times 10^{11}$	$1,2 \times 10^{12}$	$5,0 \times 10^{11}$
18	$1,4 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^9$
24	$6,9 \times 10^8$	$6,4 \times 10^8$	$7,5 \times 10^8$
30	$6,3 \times 10^8$	$3,3 \times 10^8$	$5,8 \times 10^7$
36	$3,8 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
48	$1,7 \times 10^8$	$1,2 \times 10^7$	$7,9 \times 10^7$
72	$3,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
96	$1,4 \times 10^7$	$9,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$

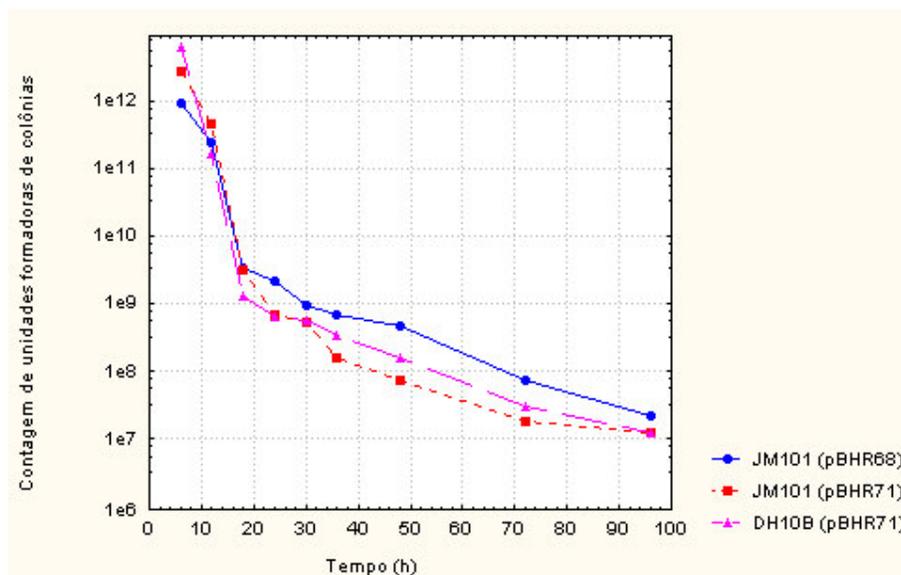


Figura 33. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

A Tabela 34 mostra os percentuais do número de células ancorando plasmídios em função do tempo de cultivo, enquanto a Figura 34 fornece a estabilidade em virtude do número de gerações do microrganismo e tempo de cultivo.

Tabela 34. Percentual de estabilidade plasmidial em *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

Tempo (h)	Estabilidade plasmidial (%)		
	JM101 (pBHR68)	JM101 (pBHR71)	DH10B (pBHR71)
0	100	100	100
6	100	100	100
12	100	100	99,63
18	100	99,50	99,50
24	100	99,50	99,00
30	95,00	94,00	86,34
36	92,07	93,00	85,64
48	90,56	88,30	81,97
72	85,00	81,89	71,52
96	72,64	63,65	55,88

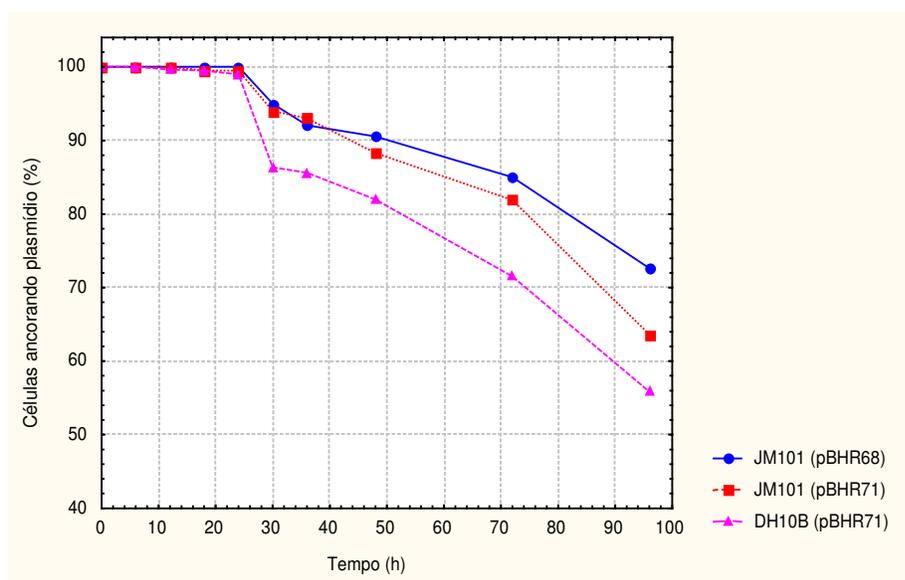


Figura 34. Percentual de estabilidade plasmidial em *Escherichia coli* DH10B e JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 em função do tempo de cultivo

Analisando-se todos estes resultados obtidos percebe-se que as células não tiveram grande crescimento celular, haja vista a baixa concentração celular mostrada pelo gráfico da absorbância em função do tempo (Figura 30) e valores numéricos da Tabela 32. Observa-se o crescimento exponencial (referente às células com plasmídeo), até aproximadamente 6h (apenas o último valor é mostrado), uma fase estacionária que se prolonga até 48h e uma nova retomada do aumento da concentração celular após 72h (principalmente devido às células sem plasmídeo).

A Figura 31 mostra a concentração de células sem plasmídios estagnada em zero até 24h, quando começa realmente a ocorrer a perda de plasmídios e um aumento abrupto após 72h de cultivo. A Figura 32 mostra bem a fase exponencial, indicando que termina após 6h de cultivo.

De acordo com a Tabela 33 e Figura 33, percebe-se o decréscimo das unidades formadoras de colônia, carregando plasmídeo, em função do tempo, cuja diminuição indica que a medida que as células começam a acumular polímero deixam de formar colônias.

Verificou-se ainda que os plasmídios são praticamente 100% estáveis até 24h (Figura 34 e Tabela 34), o que representou 30-35 gerações, de acordo com o crescimento de biomassa medido. Em 48h, que é o tempo normalmente adotado pelos autores para a realização de cultivos, a estabilidade apresentada foi ainda bastante elevada, tendo sido, em média, de 89% para *E. coli* JM101 e de 82% para *E. coli* DH10B. E ainda, em 96h detectou-se uma estabilidade mínima de 56% na linhagem DH10B, ancorando o plasmídeo pBHR71, quando comparados entre eles. A Tabela 35 velocidades específicas máximas de crescimento, a velocidade específica durante todo o crescimento, a probabilidade (p) da célula perder o plasmídeo durante a divisão celular e o coeficiente de segregação ( $\alpha$ ).

Tabela 35. Velocidades específicas máxima e de crescimento, a probabilidade (p) da célula perder o plasmídeo durante a divisão celular e coeficiente de segregação ( $\alpha$ )

Linhagem/plasmídeo	$\mu_{MAX}$ (h <sup>-1</sup> )	$\mu_{CRESCIMENTO}$ (h <sup>-1</sup> )	(p)/geração	$\alpha$
JM101 (pBHR68)	0,167	0,068	0,0010	1,64
JM101 (pBHR71)	0,250	0,069	0,0013	1,86
DH10B (pBHR71)	0,192	0,060	0,0017	1,99

Para o cálculo do número de gerações, apesar de haver uma equação específica (Equação 7), decidiu-se adotar a Equação 5, do qual todos os parâmetros puderam ser obtidos através de dados experimentais, inclusive a fração F de células com plasmídio em cada determinado tempo (Tabela 34 e Figura 34). Assim, através do isolamento do termo n e a substituição dos demais parâmetros, pode-se calcular, para cada intervalo, o número de gerações, como é mostrado na Figura 35, em função da fração F, que foi obtida até 96h e estimada nos valores de 0,5, 0,25 e 0,10, afim de se poder estimar o provável comportamento de estabilidade ate valores críticos, em função do número de gerações.

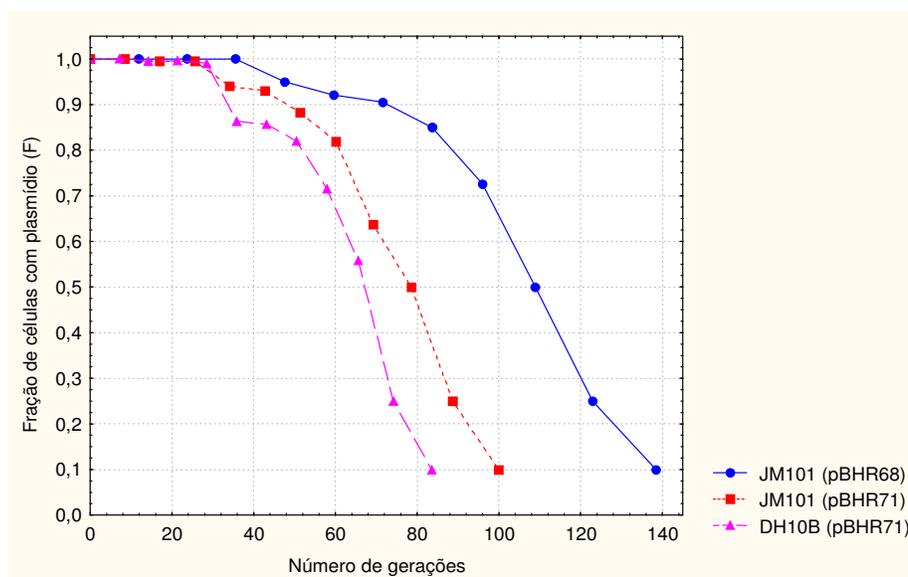


Figura 35. Relação entre F e o número de gerações n

Desta forma, percebe-se que as linhagens e plasmídios estudados atingem uma estabilidade de 50% quando entre 60-80 gerações, exceto para *E. coli* JM101, ancorando o plasmídio pBHR68, que atinge este valor após 110 gerações. O mínimo de 10% de estabilidade deve ser atingido quando entre 75-100 gerações, menos para *E. coli* JM101 (pBHR68), que deve alcançar este valor em torno de 140 gerações após o começo do cultivo.

Com relação aos valores de  $\alpha$  obtidos, percebe-se que a relação entre as velocidades específicas de células sem plasmídio com aquelas que os contém tende aquelas que não ancoram plasmídios, devido aos valores apresentados terem sido maiores que 1. Apesar disso, quase todos os valores obtidos encontram-se dentro do intervalo típico de variação, que encontra-se entre 1 e 2.

## 5. Discussão

### 5.1. Estudos com a PHA sintase de *R. eutropha*

Através deste estudo pode-se avaliar os efeitos de substratos e suplementos sobre a produção de PHAs por *E. coli* recombinante. Com este propósito, duas linhagens de *E. coli* (DH10B e JM101) foram transformadas utilizando-se dois plasmídios contendo PHAs sintases, com diferentes especificidades pelo substrato.

O primeiro plasmídio estudado, pBHR68, acorando o operon completo para a biossíntese de PHB de *R. eutropha*, contém além de outros genes o que codifica para a PHB sintase com especificidade para os substratos 3-hidroxiacil-CoA (HA-CoA) de cadeia curta (C3 a C5). *E. coli* (DH10B) carregando pBHR68, mostrou-se capaz de acumular uma massa celular seca em torno de  $2\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 45% e o acúmulo massa de PHB de  $0,8\text{g.L}^{-1}$ , quando se combinam 5% de soro de queijo, 5% de amido de milho hidrolisado e 1% de óleo de soja.

Ainda para a linhagem DH10B, carregando pBHR68, observou-se que o efeito principal positivo sobre a massa celular foi a suplementação da cultura com soro de queijo. É provável que o soro de queijo suplemente a cultura com as vitaminas, ou cofatores necessários ao crescimento celular. Contudo, o principal efeito positivo sobre a produção de PHB, foi o amido de milho hidrolisado, demonstrando que nem sempre o aumento da massa celular se reflete no aumento da produção de PHB e que uma análise que leve em conta também produtividade e custos é necessária para uma tomada de decisão quanto à definição da estratégia de cultivo.

Ao analisar-se o comportamento da linhagem JM101, carregando pBHR68, observam-se efeitos muito similares aos apresentados pela outra linhagem. As respostas obtidas indicam que para os valores 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja, quando a concentração de amido de milho hidrolisado é igual a 5%, fornecem uma massa celular seca teórica em torno de  $1,9\text{g.L}^{-1}$ , um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 50% e o acúmulo massa PHB de  $0,9\text{g.L}^{-1}$ . Neste caso é interessante notar que a variável que exerceu maior efeito positivo sobre a massa celular foi o amido de milho hidrolisado, seguido de soro de queijo e óleo de soja. Embora a linhagem JM101 seja capaz de crescer em meio mínimo acrescido de uma fonte de carbono, sem necessidade da adição de cofatores, a adição de soro de queijo, parece favorecer fortemente o crescimento celular, por fornecer suplementação destes nutrientes, sem a necessidade de que o metabolismo celular seja desviado para a sua síntese e conseqüente retardamento do crescimento celular.

Desde que a linhagem JM101 foi a que apresentou maior percentual de acúmulo de PHB, com o objetivo de incrementar a produção de PHB, obtida pela linhagem JM101, ancorando pBHR68, foram testadas as adições de outros suplementos (IPTG e ácido acrílico), os efeitos de temperatura e tempo de cultivo, bem como a concentração de inóculo, sobre a produção de massa celular e de PHB. Observou-se ainda que a utilização das condições de cultivo (5% de amido de milho hidrolisado, 1,5% de óleo de soja e 5% de soro de queijo), exatamente como proposto pelo planejamento anterior, permitiram um acúmulo percentual de PHB e uma massa de PHB com valores muito próximos aos estimados por esta análise, demonstrando a confiabilidade preditiva do planejamento como ferramenta experimental, conforme pode ser observado na Tabela 22.

Uma vez que o plasmídeo pBHR68 foi construído de maneira que os genes *phaA*, *phaB* e *phaC* encontram-se situados após o operon *lac*, esta construção permite que quando o operon *lac* seja induzido, os genes de interesse, sejam transcritos e expressos. Um indutor conhecido do operon *lac* é análogo da galactose, isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (IPTG). Assim, pode-se dizer que com a adição de IPTG há um aumento da regulação, pois, sendo análogo de lactose, se liga e inibe o repressor *lac*, além de poder induzir a síntese de  $\beta$ -galactosidase em muitas bactérias (STRATAGENE, 1997).

Surpreendentemente, IPTG, não exerceu o efeito esperado de incremento á produção de PHB. Porém este resultado torna-se positivo se levarmos em consideração o custo da adição deste indutor num processo fermentativo. Deve-se levar em consideração também o fato de que IPTG induz a expressão dos genes sob regulação do operon *lac*, porém isto não garante a estabilidade das proteínas, ou atividade de enzimas produzidas. Sabe-se que um dos problemas na expressão heteróloga é ativação de proteases das células hospedeiras, o que proporciona muitas vezes a inativação de enzimas expressas.

Além disso, há estudos como o de KOSINSKI *et al.* (1992) afirmando que o IPTG pode, ao invés de atuar como indutor, complicar o metabolismo de *E. coli*. Todavia, como relatam WONG *et al.* (1998), a adição de IPTG em uma fase pós-indução, pode ser uma boa solução para a produção eficiente de proteínas recombinantes.

Alguns estudos relatam que a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, cujo produto é o acetil-CoA, produz intermediários, hidroxiacil-CoA (HA-CoA), que são substratos para a PHA sintase, favorecendo, assim, a biossíntese de PHAs (TAGUCHI *et al.* 1999). Contudo, se esta via for rápida demais, uma grande quantidade de acetil-CoA, será produzida e levada para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), favorecendo deste modo, o crescimento celular, mais que a biossíntese de PHAs. Porém se a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos estiver inibida, a um ponto que se acumulem HA-CoA, intermediários da via, estes poderão servir como substratos da PHA

sintase. Por esta razão, a adição do inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, ácido acrílico, foi testada quanto ao seu efeito sobre a produção de massa celular e de PHB, em *E. coli* JM101, contendo pBHR68.

No presente estudo, a estratégia de utilização do ácido acrílico como inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (LANGENBACH *et al.*, 1997; QI *et al.*, 1997, 1998) não repercutiu nos resultados esperados quando utilizado o plasmídeo pBHR68 em *E. coli* JM101. Percebeu-se que a concentração utilizada foi limitante, pois inibiu o crescimento de biomassa, o que não permitiu o acúmulo de PHB desejado. Acredita-se que, com a adição de concentrações menores de ácido acrílico, seja possível a inibição da  $\beta$ -oxidação, sem que haja a limitação do crescimento celular.

Através deste estudo verifica-se ainda, pela análise da Tabela 23, que entre os efeitos principais sobre para a resposta massa celular seca, a adição de ácido acrílico foi o que teve efeito mais negativo, enquanto o aumento do tempo de cultivo de 48 para 96 horas foi o que influenciou mais positivamente a resposta. A adição de IPTG não teve efeito significativo sobre a produção de biomassa. Enquanto que para o percentual acumulado de PHB, as variáveis tempo e adição de ácido acrílico foram as que mais influenciaram, positiva e negativamente, respectivamente. Para a massa de PHB acumulada, todos os efeitos principais foram significativos, no intervalo de confiança assumido. Através da análise da Figura 13, na qual é mostrada a superfície de resposta da massa celular seca, em função do tempo e temperatura (inóculo fixo em 5%, sem IPTG e sem ácido acrílico), para *E. coli* JM101 ancorando o plasmídeo pBHR 68, verifica-se que, sob estas condições, podem ser produzidos uma massa celular seca em torno de  $3,5\text{g.L}^{-1}$ , com um acúmulo percentual de PHB de aproximadamente 75% e o acúmulo de massa de PHB de  $2,5\text{g.L}^{-1}$ , 96h a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Cabe ressaltar que o valor máximo obtido de massa de PHB acumulada, quando apenas sob influência do IPTG subiu para  $2,332\text{g.L}^{-1}$ , enquanto que sob influência do ácido acrílico diminuiu para  $2,083\text{g.L}^{-1}$ . Em ambos os casos quando comparados ao valor de  $2,163\text{g.L}^{-1}$ , onde as variáveis concentração de inóculo, IPTG e ácido acrílico foram mantidas no nível inferior.

É importante notar que a combinação da concentração de inóculo e adição de IPTG nos níveis superiores e ausência de ácido acrílico (nível inferior) promoveu um dos maiores crescimentos celulares ( $4,083\text{g.L}^{-1}$ ) e acúmulos de massa de PHB ( $2,603\text{g.L}^{-1}$ ). Ainda, em todos os experimentos em que se combinou a adição de ácido acrílico, mantendo-se as demais variáveis fixas (inóculo, IPTG ou ambas) a massa de PHB obtida foi menor, inclusive do que o valor obtido pela ação única de ácido acrílico.

Com relação ao acúmulo de massa celular seca e percentual de PHB acumulado percebe-se que estes foram condizentes com a literatura, principalmente quando se compara os resultados obtidos aos de ANTONIO *et al.* 2000, que fez uso do mesmo plasmídio que ancora os genes da biosíntese de PHA de *R. eutropha*. Es autores obtiveram como melhor resultado o acúmulo de 80% de PHB através do cultivo em meio complexo, enquanto os neste estudo alcançou-se o mesmo patamar com meio mineral, adicionado de fontes de carbono de baixo custo.

Os resultados obtidos por diversos autores (LEE *et al.*, 1997; WONG; LEE, 1998; AHN *et al.*, 2000, 2001) justificam o potencial de soro de queijo concentrado como substrato para o acúmulo de PHB. Levando-se em conta os resultados obtidos no presente estudo, onde se utilizou soro de queijo apenas como suplemento, e não como fonte principal de carbono, como os demais autores, pode-se avaliar em quais situações (combinação com outras fontes de carbono, plasmídios, linhagens) o mesmo teve influência positiva sobre o acúmulo de PHA. Assim, nas estratégias onde os melhores resultados foram obtidos no nível superior de soro de queijo, ou seja, 5% (v/v), acredita-se que os resultados podem ser melhorados pela concentração dos mesmos, haja vista a grande disponibilidade desta matéria-prima.

## **5.2. Estudos com a PHA sintase de *P. aeruginosa***

O ácido acrílico apresentou um grande efeito negativo sobre o acúmulo de massa celular seca, principalmente para linhagem JM101 carregando o plasmídio pBHR71, tendo diminuído em  $1,17\text{g.L}^{-1}$ , ao passar-se do nível inferior ao nível superior. Para o mesmo plasmídio na linhagem DH10B, a influência do ácido acrílico foi praticamente nula. Estes resultados sugerem que ácido acrílico tem um efeito tóxico, principalmente sobre a linhagem JM101, provocando uma inibição do crescimento celular.

Por outro lado, a adição de óleo apresentou efeito positivo, sobre a massa celular seca, para as duas linhagens estudadas ( $2,23\text{g.L}^{-1}$  para DH10B e  $2,11\text{g.L}^{-1}$  para JM101), carregando o plasmídio pBHR71. Porém, a combinação de óleo e ácido acrílico forneceu um efeito negativo idêntico ao do óleo (positivo) em termos numéricos (Tabela 30). Isto mostra que em meios contendo óleo e ácido acrílico prevalece o efeito negativo deste último, influenciado negativamente o crescimento do microrganismo. O ácido acrílico apresentou efeito positivo no acúmulo de PHA, na linhagem DH10B ancorando pBHR71, aumentando em 2,99 o percentual de PHA acumulado. A linhagem JM101, por ter sido mais afetada pelo ácido acrílico no acúmulo de massa celular seca, conforme pode ser observado na Tabela 29, teve sua massa de PHA acumulada bastante reduzida.

QI *et al.* (1998) avaliaram pela primeira vez a aplicação de ácido acrílico como inibidor da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, de modo que seja possível conduzir intermediários da via de  $\beta$ -oxidação para a síntese de polihidroxialcanoatos. Em *E. coli* JM109, ancorando o plasmídeo pBHR71, puderam avaliar o efeito do ácido acrílico sobre o acúmulo de PHA de cadeia média. O cultivo em meio LB contendo decanoato (0,4% v/v) e ácido acrílico (na concentração ótima de 0,2mg.mL<sup>-1</sup>) promoveu o acúmulo de 29,9% de PHA, enquanto que sem ácido acrílico o acúmulo obtido foi de apenas 1,1% da massa celular seca. Comparando-se os resultados obtidos neste estudo aos de QI e colaboradores, percebe-se que na melhor situação de cultivo alcançada, o percentual de PHA atingido em *E. coli* DH10B (pBHR71) não foi muito distante. Considerando-se ainda as diferenças de complexidade entre os meios, acredita-se que os percentuais de PHA acumulados nesta linhagem podem ser melhorados. Apesar de QI *et al.* (1998) terem obtido seus melhores resultados com 2mM de ácido acrílico, optou-se por utilizar a concentração de 1mM, tendo em vista a grande quantidade de reagente necessário à neutralização do meio (NaOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Apesar disso houve um grande efeito de limitação de crescimento sobre a linhagem JM101, e um pouco menos acentuado sobre a linhagem DH10B. Sobre a variável crescimento celular não se obteve parâmetro para comparações, uma vez que o referido autor não fez este tipo de avaliação.

### 5.3. Utilização de diversos óleos vegetais para o acúmulo de PHA<sub>SCL</sub>

A bibliografia não reporta trabalhos sobre a produção de polihidroxialcanoatos a partir de óleos vegetais por *E. coli* recombinante. ASHBY e FOGLIA (1998) investigaram a biosíntese de PHA por *Pseudomonas resinovorans* em meio mineral (BRANDL *et al.*, 1988) contendo 1% de diversas fontes de triglicerídios. Obtiveram uma massa celular média de 3,3g.L<sup>-1</sup> e um acúmulo de aproximadamente 45% de PHA. Entre os óleos vegetais estudados, o maior acúmulo de PHA deu-se em óleo de coco (1,9g.L<sup>-1</sup>), seguido por oliva (1,5g.L<sup>-1</sup>) e girassol e soja (1,3g.L<sup>-1</sup>). A composição média do polímero foi a seguinte: 0,5%HB, 8%HHx, 34%C8, 32,5%HD, 15,5%HDD e 9,5%C14.

FUKUI e DOI (1998) estudaram a produção de PHA através do uso de óleos vegetais (milho, palma e oliva) por *R. eutropha* e um mutante contendo a PHA sintase de *Aeromonas caviae*. O cultivo foi realizado em meio mineral (DOI *et al.* 1995) acrescido de 1% de óleo, durante 72h. Os resultados foram bastante parecidos para os diversos óleos, sendo obtida uma massa celular seca média de 4g.L<sup>-1</sup> quando utilizada *R. eutropha* e 3,5 g.L<sup>-1</sup> para o mutante. A média de PHA acumulado foi de 80 e 78%, respectivamente, sendo que a não recombinante acumulou somente 3HB e o mutante 4%, em mol, de 3HHx.

MARANGONI *et al.* (2002), em resultados não publicados, estudaram sete óleos vegetais (algodão, canola, dendê, girassol, milho, oliva e soja) como suplemento (1%) em culturas de *Ralstonia eutropha* em meio mineral (MM) (ARAGÃO *et al.*, 1996), acrescido de açúcar invertido, mantido na concentração de  $30\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , para o acúmulo de poli(3HB-co-3HV). A biomassa e o acúmulo mássico médios de polímero obtidos foram de 0,5 e  $0,15\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de açúcar invertido, o que representa um acúmulo médio de 30% de polímero (92%HB, 8%HV, em mol), sendo que os melhores resultados foram conseguidos com óleo de girassol ( $0,84$  e  $0,31\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de açúcar invertido, de massa celular seca e polímero, respectivamente).

CROMWICK *et al.* (1996) e FUKUI e DOI (1998) sugerem que *R. eutropha* secreta lipase quando na presença de óleo, hidrolisando os triglicerídios do meio, e que os ácidos graxos resultantes sejam incorporados nas células e metabolizados a acetil-CoA pela  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Desta forma, fez-se uso de óleo de soja com o objetivo de que *Eschechia coli* também o hidrolise pela ação de lipases, permitindo que os ácidos graxos fossem utilizados para a síntese de PHA.

TAGUCHI *et al.* (1999) reportaram o acúmulo de 3HB-co-3HHx através da clonagem do gene da 3-cetoacil-ACP redutase de *Eschechia coli* ( $fabG_{Ec}$ ) e da poli-3-hidroxiacanoato sintase de *Aeromonas caviae* ( $phaC_{Ac}$ ) em *Eschechia coli* recombinante, sugerindo que a superexpressão do gene conduz ao suprimento de (R)-3-hidroxiacil-CoA para a síntese de PHA via degradação de ácidos graxos.

Partindo-se da idéia de que os ácidos graxos saturados são mais susceptíveis às vias metabólicas de  $\beta$ -oxidação e síntese de polímeros, ao compararmos os resultados obtidos observa-se uma boa coerência. Óleo de dendê, que apresenta 51% de ácidos graxos saturados, foi aquele que mais acumulou PHA (11,64%), seguido por óleo de algodão que, com 27% de ácidos graxos saturados, atingiu um acúmulo de 11,46% de PHA (praticamente o mesmo). Óleo de soja apresentou o terceiro maior percentual de ácidos graxos saturados e o terceiro maior nível de PHA acumulado.

Além disso, os resultados obtidos por ASHBY e FOGLIA (1998) vêm ao encontro dos resultados alcançados no presente estudo, uma vez que obtiveram o maior acúmulo a partir de óleo de coco, que é o óleo vegetal com maior concentração de ácidos graxos saturados. Por outro lado, os resultados obtidos por FUKUI e DOI (1998) e MARANGONI *et al.* (2000) não sustentam a teoria proposta. O primeiro grupo apresentou resultados bastante parecidos enquanto o segundo não definiu claramente o porquê das diferenças apresentadas entre os diferentes óleos vegetais sobre o acúmulo de PHA.

Acredita-se que o óleo de dendê, apesar de ter apresentado praticamente o dobro do percentual de ácidos graxos que em óleo de algodão, não resultou em maior incorporação de PHA<sub>MCL</sub> devido ao seu grau de saturação ser excessivamente elevado, de maneira que, à temperatura de 37°C, correspondente ao cultivo, não permite uma total dissolução do óleo no meio, tendendo este a se agregar. Assim, leva-se a crer que as trocas metabólicas entre as membranas celulares e o meio foram prejudicadas por este motivo, impossibilitando um maior acúmulo em óleo de dendê.

Para que o óleo vegetal tenha uma maior influência sobre o acúmulo de PHA<sub>SCL</sub>, além da importância que teve sobre o aumento da massa celular, acredita-se que melhores resultados sejam obtidos com óleos que além de apresentarem elevado grau de saturação, tenham ainda os menores tamanhos de cadeia de carbono possíveis. Assim, a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos até acetil-CoA requisitará menor gasto de energia e tempo, propiciando um maior aproveitamento do substrato para o acúmulo de PHA.

#### 5.4. Estabilidade plasmidial

A primeira observação que se faz a respeito da estabilidade plasmidial, ainda no planejamento experimental 2<sup>5</sup>, é que, ao avaliar-se a influência da variável temperatura sobre o acúmulo de massa celular seca e percentual de PHB, os efeitos obtidos foram contrários, indicando um aumento da MCS em 0,48g.L<sup>-1</sup> e um decréscimo de 4,49% de PHA ao variar-se a temperatura de 30 a 37°C. Isto indiretamente pode indicar que a 30°C a estabilidade plasmidial foi maior devido a maior expressão gênica, refletida no acúmulo de PHA.

O maior acúmulo de PHB a 30°C pode ter sido em função de que estes genes têm seu maior nível de expressão, em seu produtor natural, *Ralstonia eutropha*, a esta temperatura, tendo em vista que esta é a temperatura usualmente utilizada nos experimentos referentes a esta bactéria (WIECZOREK *et al.* 1996; RAJE; SRIVASTAVA, 1997; LÜTKE; STEINBÜCHEL, 1999; WANG; YU, 2000). Por outro lado, o maior crescimento celular de *Escherichia coli* dá-se à temperatura de 37°C, que é a adotada conforme a grande maioria das referências citadas neste trabalho. Assim, leva-se a crer que quando o plasmídio não está sob a influência de um promotor temperatura-dependente, o mecanismo de expressão leva em consideração a proveniência da carga gênica.

Segundo EMERICK *et al.* (1984) a temperatura afeta as vias biossintéticas, direções e sistemas regulatórios e que este efeito é particularmente significativo em fermentações de recombinantes. Num desses casos, a temperatura ótima para a produção de proteínas recombinantes (interferon e insulina) em *E. coli* foi reduzida para apenas 30°C, enquanto a temperatura ótima de crescimento para a linhagem selvagem é de 37°C.

Deve-se ainda analisar as taxas de crescimento, que são menores em temperaturas mais baixas. Assim, a probabilidade de perda segregacional diminui, uma vez que esta pode ocorrer em virtude da alta velocidade de replicação que impede uma cópia adequada e divisão ordenada dos plasmídios entre células mãe e filha.

GUPTA *et al.* (1995), em seu estudo de estabilidade plasmidial em *E. coli* recombinante observaram que uma maior estabilidade foi obtida em meio mineral, que suporta menores taxas de crescimento, enquanto que menor estabilidade foi obtida em meios LB e Terrific, confirmando o raciocínio sobre a perda segregacional em função da velocidade de crescimento. Assim, através de cultivos em frascos erlenmeyers por 24h a 37°C, estes autores obtiveram uma taxa de crescimento máxima de 0,246h<sup>-1</sup> e estabilidade de 98% em meio mineral M9 adicionado de glicose, enquanto valores de 0,419 e 0,658h<sup>-1</sup> para velocidades específicas máximas e 80 e 38% de estabilidade foram obtidos para os meios LB e Terrific, respectivamente. Por outro lado, quando avaliando a estabilidade plasmidial em função da temperatura de crescimento, obtiveram 88% de estabilidade em temperaturas entre 37 e 40°C, que foi o melhor valor obtido ao avaliar-se a faixa de 25 a 40°C.

Além disso, não há consenso quanto o efeito da temperatura sobre a estabilidade plasmidial. GUPTA *et al.* (1995) e OSCAM *et al.* (1992) compartilham resultados que indicam que o incremento da estabilidade é atribuído ao aumento do número de cópias de plasmídios a altas temperaturas, enquanto AIBA e KOIZUMI (1984) e SON *et al.* (1987) reportam o decréscimo da estabilidade plasmidial com a elevação das temperaturas de cultivo. Estes resultados conflitantes indicam que o perfil da estabilidade plasmidial em função da temperatura é variável em função dos diferentes sistemas vetor-veículo de clonagem.

A fim de obterem melhores resultados, KIDWELL *et al.* (1995) desenvolveram um sistema de produção de polihidroxibutirato no qual o nível de expressão e dosagem gênica do operon da biossíntese de PHA em *Ralstonia eutropha* foram efetivamente regulados pela temperatura de cultivo de *E. coli* recombinante. Neste sistema o operon foi fundido ao promotor *tac* e clonado em um vetor em que o número de cópias é dependente da temperatura. Assim, um processo de duas fases foi empregado durante o cultivo, sendo que inicialmente (fase de crescimento) a temperatura foi mantida a 30°C para que o maior número de proteínas *Lacl*, em relação ao número de cópias de plasmídios, pudesse reprimir a transcrição de *tac::pha* e após

(fase de produção), a temperatura foi elevada à 37°C para que o número de plasmídios superasse o número de repressores LacI, resultando numa rápida indução da transcrição de *tac::pha*, culminando numa mais rápida síntese de proteínas específicas a produção de PHB e do próprio polímero, em si.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a estratégia apresentada por KIDWELL *et al.* (1995), que emprega um sistema de produção de polihidroxiacetato regulado por duas temperaturas de cultivo seja interessante. Isto porque foi verificado que a relação de crescimento x acúmulo de polihidroxiacetato tendeu para o crescimento, a 37°C, nas primeiras 48h e que, de 48 a 96h, houve um maior acúmulo de PHA, mantida a temperatura de 30°C. Mas, no caso deste estudo, a ordem é inversa porque os plasmídios não sofrem influência de promotores de transcrição dependentes da temperatura. O que se leva a crer neste tipo de comportamento é que, até 48h (nível inferior da variável tempo) as condições de células mais jovens, com menor acúmulo de PHA e a imersão em um meio com maior quantidade de nutrientes, levam a replicação das células (neste momento é mais importante para a célula garantir a perpetuação da espécie). Após este período, as células sendo mais antigas e tendo acumulado um maior percentual de polímero, segundo LEE *et al.* (1994), passam a apresentar dificuldade de replicação. Além disso, as condições ambientais tornam-se mais adversas, devido ao empobrecimento do meio, resultante da utilização dos recursos, levando ao maior acúmulo de PHB (neste momento é mais importante para a célula garantir sua própria sobrevivência).

Avaliou-se a estabilidade plasmidial de *E. coli* JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 e *E. coli* DH10B, ancorando o plasmídio pBHR71. Estes ensaios foram realizados em meio LB à temperatura de 37°C.

Quando se analisa a Figura 30, observa-se que para as duas linhagens e plasmídios estudados, o crescimento celular alcançou uma fase estacionária de crescimento em aproximadamente 6 horas, a qual se prolongou até 48 horas de cultivo. Surpreendentemente após este período o crescimento foi retomado. Estes resultados sugerem uma diminuição da concentração de ampicilina no meio, permitindo a recuperação das bactérias que não continham os plasmídios. Note-se que pBHR68 e pBHR71 carregam o gene para a biossíntese de penicilina. A expressão destes genes leva a produção da enzima que degrada a ampicilina adicionada ao meio. Acredita-se que as células livres de plasmídios presentes no meio recuperem a habilidade de crescimento após o esgotamento da ampicilina do meio. Isto ainda é agravado pelo fato que células sem plasmídio crescerem mais rápido que células recombinantes (com plasmídio).

Além disso, pela observação das Figuras 31 e 32, referentes à evolução das concentrações de células sem plasmídios e com plasmídios fica nítida a fase exponencial das células com plasmídio (Figura 32) e o aumento abrupto da concentração de células sem plasmídio, principalmente após 72h de cultivo (Figura 31). Além disso, percebe-se que a concentração de células com plasmídio também é aumentada nas últimas 24 horas de cultivo, apesar de não tão intensamente quanto para as células que não carregam plasmídio. Este comportamento também foi observado por LEE *et al.* 1994. Segundo estes autores o aumento da concentração não se deve ao aumento do número de células ancorando plasmídio, mas sim ao acúmulo intenso de polímero destas células, que é detectado pelo espectrofotômetro concentração celular.

Com relação à estabilidade plasmidial, obteve-se valores muito bons em função do tempo de cultivo em que se realizaram os experimentos. Isto porque enquanto os demais autores avaliam a estabilidade por 24 ou 48h, pode-se traçar um perfil até 96h de cultivo. Além disso, os resultados alcançados foram melhores que os de GUPTA *et al.* (1995), que após 24h de cultivo de *E. coli* recombinante alcançaram 80% de estabilidade em meio LB a 37°C enquanto manteve-se praticamente 100% de estabilidade nas mesmas 24h. Por outro lado, as velocidades específicas máximas foram menores do que as encontradas por estes autores, o que vem a confirmar que em menores taxas de crescimento a probabilidade de perda segregacional do plasmídio diminua.

A fim de verificar se a estabilidade permite a aplicação para fins industriais, avaliou-se a mesma em função do número de gerações. IMANAKA e AIBA (1981) reportam que é necessário que o plasmídio seja estável por mais que 25 gerações, desde o pré-inóculo até escalas comerciais. Desta forma, percebe-se que as linhagens e plasmídios estudados atingem valores entre 25 e 40 gerações com 100% de estabilidade, sem considerar o pré-cultivo. Além disso, acredita-se que os 50% de estabilidade atingidos quando entre 60-80 gerações para o plasmídio pBHR71 e após 110 gerações para *E. coli* JM101, ancorando o plasmídio pBHR68, tenham sido muito bons, principalmente para esta última. LEE *et al.* (1994), testando diversos plasmídios em variações de meio LB com e sem glicose, atingiram após 110 gerações estabilidades entre 5 e 50%, e pela construção de plasmídios contendo o gene *parB* locus, alcançaram 100% de estabilidade.

A análise dos valores de  $\alpha$  (coeficiente de segregação) obtidos mostra que, além de estarem na faixa normal, variando de 1 a 2, ainda são comparáveis aos valores descritos por IMANAKA e AIBA (1981), como por exemplo para *E. coli* K2 IR713, ancorando o plasmídio TP120, com  $\alpha$  variando entre 1,5 e 2,31 e *E. coli* JC7632, ancorando o plasmídio ColE1 com

inserção TnA ou ColE1 mutante, com valores variando nos intervalos de 1,15 a 1,54 e 1,06 a 1,65, respectivamente.

Com relação às diferenças apresentadas entre as linhagens, onde *E. coli* JM101 mostrou-se mais estável, leva-se a crer que seja função exclusiva das condições de adaptabilidade ao meio em que estão inseridas e que esta pode, em função da linhagem, variar com ou aumento ou diminuição da complexidade do meio, uma vez que os autores se dividem sobre esta questão.

Quanto aos plasmídios, pBHR68 foi aquele que se manteve mais estável, atingindo aproximadamente 72% após 96h de cultivo. Alguns autores (WARNES; STEPHENSON, 1986) relatam que a inserção de grandes pedaços de material genético estranho ao hospedeiro reduzem a estabilidade de plasmídios bacterianos, o que não foi observado, uma vez que o plasmídio pBHR68 (8,20Kb) é bem maior que o pBHR71 (4,66Kb). Acredita-se que a manutenção do sistema de expressão na sua forma original (operon completo) tenha tido influência positiva sobre a estabilidade alcançada pelo plasmídio pBHR68, uma vez que ancora o operon completo para a síntese de PHB de *R. eutropha*.

## 6. Conclusões

Visando-se testar a composição de amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja em meio mineral para o cultivo de *E. coli* DH10B e JM101, ancorando o plasmídio pBHR68, os resultados deste trabalho permitiram concluir que as melhores respostas segundo o planejamento experimental 2<sup>3</sup> foram:

- Para *E. coli* DH10 (pBHR68): MCS em torno de 2g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente 45% de PHB, com o acúmulo de 0,8g.L<sup>-1</sup> de PHB, em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado e 5% de soro de queijo;

- Para *E. coli* JM101 (pBHR68): MCS em torno de 1,9g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente 50% de PHB, com o acúmulo de 0,9g.L<sup>-1</sup> de PHB, em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado e 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja.

E que, para ambas linhagens:

- amido de milho hidrolisado foi utilizado preferencialmente para o acúmulo de PHB;
- óleo de soja promoveu principalmente o acúmulo de massa celular.

*E. coli* JM101 (pBHR68) apresentou maiores acúmulos percentuais e de massa de PHB, sendo a linhagem adequada para continuar os estudos e avaliar a influência de novos parâmetros sobre o cultivo.

Visando-se testar as concentrações de inóculo, IPTG e ácido acrílico, tempo e temperatura de cultivo em *E. coli* JM101, ancorando o plasmídio pBHR68, em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado e 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja, os resultados deste trabalho permitiram concluir que as melhores respostas segundo o planejamento experimental 2<sup>5</sup> foram:

- MCS em torno de 3,5g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente 75% de PHB, com o acúmulo de 2,5g.L<sup>-1</sup> de PHB, quando inóculo foi fixado em 5% (Abs = 1,2), sem a adição de IPTG e ácido acrílico durante 96h a 37°C.

Pode-se ainda concluir que:

- a utilização das condições do planejamento anterior (5% de amido de milho hidrolisado e 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja) permitiu acúmulos de MCS e PHB conforme o previsto pelo planejamento, e um acúmulo percentual de PHB em torno de 8% maior do que o esperado, demonstrando sua confiabilidade preditiva como ferramenta experimental;

- maiores concentrações de inóculo possibilitam a obtenção de melhores respostas;
- IPTG teve influência negativa sobre as respostas;
- a adição de ácido acrílico na concentração testada não atendeu ao objetivo de permitir a incorporação do monômero HHx ao polímero, e teve influência bastante negativa sobre as respostas;
- a temperatura de 30°C favoreceu preferencialmente o acúmulo de PHB e 37°C o acúmulo de massa celular;
- maiores tempos de cultivo favoreceram melhores respostas, tendo sido esta a variável de maior influência sobre o processo.

Visando testar a composição do meio com amido de milho hidrolisado, soro de queijo e óleo de soja em meio mineral e a adição de ácido acrílico, para o cultivo de *E. coli* DH10B e JM101, ancorando o plasmídeo pBHR71, os resultados deste trabalho permitiram concluir que as melhores respostas segundo o planejamento experimental 2<sup>4</sup> foram:

- Para *E. coli* DH10 (pBHR71): MCS em torno de 0,95g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente 20% de PHA, com o acúmulo de 0,2g.L<sup>-1</sup> de PHA, em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado, 5% de soro de queijo e 5% de óleo de soja, além de 100µL de ácido acrílico (0,1mg.L<sup>-1</sup>);

- Para *E. coli* JM101 (pBHR71): MCS em torno de 0,85g.L<sup>-1</sup>, aproximadamente 3% de PHA, com o acúmulo de 0,015g.L<sup>-1</sup> de PHA, em meio mineral contendo 5% de amido de milho hidrolisado e 5% de soro de queijo e 1,5% de óleo de soja.

Concluiu-se que o ácido acrílico na concentração de 0,1mg.L<sup>-1</sup> teve um efeito ainda mais tóxico sobre o crescimento de biomassa em *E. coli* JM101 (pBHR71), refletido no seu baixo acúmulo de PHA.

Com relação à utilização de óleos vegetais para o acúmulo de PHA<sub>MCL</sub> por *E. coli* JM101 (pBHR71) em meio mineral contendo 5% de soro de queijo e 1% do respectivo óleo vegetal, concluiu-se que:

- ácidos graxos saturados são mais susceptíveis às vias metabólicas de β-oxidação e síntese de polímeros;
- óleo de dendê (que contém a maior composição de ácidos graxos saturados entre os óleos vegetais estudados) permitiu o maior acúmulo de PHA (11,64%);

- os diversos óleos vegetais acumularam praticamente o mesmo conteúdo de biomassa, que ficou em torno de  $0,5\text{g.L}^{-1}$ .

- houve um limite de saturação que pode ser incorporado, de acordo com as condições de cultivo estudadas, e que valores acima deste não implicam em maiores acúmulos de PHA.

A avaliação da estabilidade plasmidial em função da temperatura e taxa de crescimento permitiu a obtenção de várias conclusões:

- a  $30^{\circ}\text{C}$  obteve-se maior estabilidade plasmidial devido ao maior nível de expressão gênica, refletido na maior quantidade de PHA acumulado;

- a temperatura afetou as vias metabólicas em *E. coli*, deslocando a temperatura ótima de  $37$  para  $30^{\circ}\text{C}$  para a síntese de PHA;

- velocidades específicas de crescimento baixas evitaram a instabilidade plasmidial, permitindo uma cópia adequada do plasmídio durante a replicação celular;

De acordo com o estudo da avaliação da estabilidade plasmidial em *E. coli* JM101, ancorando os plasmídios pBHR68 e pBHR71 e *E. coli* DH10B, ancorando o plasmídio pBHR71 em meio LB a  $37^{\circ}\text{C}$ , concluiu-se que:

- após 48h de cultivo o crescimento celular foi retomado devido a uma diminuição da concentração de ampicilina no meio, permitindo a recuperação de bactérias que não continham plasmídio;

- células mais antigas, com maior acúmulo de polímero, tendem a não se replicar na mesma velocidade que aquelas sem plasmídio, provocando um desequilíbrio entre as populações, que tende ao aumento de células sem plasmídio;

- até 24h de cultivo manteve-se praticamente 100% de estabilidade plasmidial em todas as condições estudadas, com o número de gerações variando de 25 a 40, sem considerar o pré-cultivo, o que é importante para fermentações industriais;

- os percentuais de 50% de estabilidade plasmidial atingidos entre 60-80 gerações para o plasmídio pBHR71 (*E. coli* DH10B e JM101) e após 110 gerações para *E. coli* JM101 (pBHR68) foram muito bons quando comparados a outros plasmídios citados pela literatura;

- as diferenças de estabilidade plasmidiais encontradas entre as linhagens está relacionada à adaptabilidade encontrada pela célula ao meio em que está inserida, sendo que *E. coli* JM101 mostrou-se mais hábil na manutenção de seus plasmídios;

- a maior estabilidade do plasmídio pBHR68 foi devido as seu sistema de expressão ter sido mantido sob a forma de operon completo, conforme se apresenta em *R. eutropha*.

## 7. Sugestões

Com base nos resultados e conclusões apresentados sugerem-se algumas propostas de estudos futuros:

- Avaliar o crescimento de biomassa, acúmulo percentual e de massa de PHB em função do tempo, através da utilização de biorreatores em escala piloto, pH controlado, visando a melhoria da produtividade do sistema, em função das melhores condições de cultivo obtidas pela aplicação dos planejamentos experimentais, para *E. coli* JM101.

- Aplicação de novos planejamentos experimentais para *E. coli* JM101 e *E. coli* DH10B, aproveitando as conclusões sobre as variáveis estudadas, obtidas neste trabalho, através da apuração e reavaliação dos níveis dos parâmetros que se apresentaram mais significativos, além de testar novos substratos de baixo custo.

- Emprego de um sistema de produção de PHB regulado por duas temperaturas de cultivo, mantendo-se a mesma a 37°C durante as primeiras 48h e a 30°C nas outras 48h de cultivo.

- Avaliar os efeitos do antibiótico ampicilina sobre a estabilidade plasmidial, curvas e velocidades específicas de crescimento através de duas técnicas: adição do dobro da concentração de ampicilina atualmente utilizada nos cultivos e a execução de uma pós-indução do antibiótico ao término de 48h de cultivo (meio da fermentação). Desta forma, os resultados poderão ser comparados com os resultados discutidos no presente trabalho.

- Emprego de diferentes linhagens e plasmídios para o crescimento em diferentes substratos, combinados ou não, para que se possa verificar o efeito destes meios sobre a estabilidade plasmidial.

- Adição de soro de queijo concentrado em meio mineral combinado ou não com os demais parâmetros que se mostraram significativos, em função das respostas experimentais obtidas em cada estudo.

## 8. Referências bibliográficas

- AHN, W. S.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66(8), p. 3624-3627, 2000.
- AHN, W. S.; PARK, S. J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) from whey by cell recycle fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 23 p. 235-240, 2001.
- AIBA, S.; KOIZUMI, J. Effect of temperature on plasmid stability and penicillinase productivity in a transformant of *B. stearothermophilus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 26, p. 1026-1031, 1984.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ASHBY, R. D.; FOGLIA, T. A. Poly(hydroxyalkanoate) biosynthesis from triglyceride substrates. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 431-437, 1998.
- ANTONIO, R. V. Mutação de genes estruturais da polihidroxialcanoato sintase de bactérias e seleção de mutantes capazes da síntese de novos polihidroxialcanoatos. 1998. 26f. **Relatório de atividades (Pós-doutorado)**. Westfaliche Wilhelms Universiät Münster, Münster, Alemanha.
- ANTONIO, R. V.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182(1), p. 111-117, 2000.
- ARAGÃO, G. M. F. Production de polyhydroxyalcanoates par *Alcaligenes eutrophus*: caractérisation cinétique et contribution à l'optimization de la mise en oeuvre cultures. 1996. 162f. **These (Doctorat spécialité: Biologie et génétique moléculaires et cellulaires - Biotechnologie)**. L'institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, França.

- AYUB, M. A. Z. Aspectos do uso de microrganismos recombinantes em tecnologia de bioprocesso. In: **Microrganismos recombinantes em biotecnologia**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000. p. 1-16.
- BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Unicamp, 1996. 299p.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**, Nova Iorque: W. H. Freeman and Company, 2001. 974 p.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 62 p. 293-300, 1951.
- BINGLE, L. E. H.; THOMAS, C. M. Regulatory circuits for plasmid survival. **Current opinion in Microbiology**, v. 4, p.194-200, 2001.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucl. Acids Research**, v. 7, p.1513-1523, 1979.
- BOURQUE, D.; OUELLETE, B.; ANDRÉ, G.; GROLEAU, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate from methanol: characterization of a new isolate of *Methylobacterium extorquens*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 37, p. 7-12, 1992.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building**. John Wiley & sons, Inc, 1978.
- BRANDL H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54(8) p. 1977-1982, 1988.
- BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from and for bacteria: poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 77-93, 1990.

- BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, p. 127-161, 1998.
- BYROM, D. Polymer synthesis by microorganisms: technology and economies. **Trends in Biotechnology**, v. 5, p. 246-250, 1987.
- BYROM, D. Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate:poly- $\beta$ -hydroxyvalerate copolymers. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 103, p. 247-250, 1992.
- CEVALLOS, M. A.; ENCARNACION, S.; LEIJA, A.; MORA, Y.; MORA, J. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesise poly- $\beta$ -polyhydroxybutyrate. **J. Bacteriol.**, v.178, p. 1646-1654, 1996.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for poly(3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Eng.**, v. 17(6), p. 335-342, 1997.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Efficient and economical recovery of poly(3-hydroxybutyrate) from recombinant *Escherichia coli* by simple digestion with chemicals. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 62, p. 546-553, 1999a.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Factors affecting the economics of polyhydroxyalkanoates production by bacterial fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 13-21, 1999b.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate) with high P(3HB) content by recombinant *Escherichia coli* harboring the *Alcaligenes latus* P(3HB) biosynthesis genes and the *Escherichia coli* *ftsZ* gene. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9(6), p. 722-725, 1999c.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. Development of recombinant *Alcaligenes eutrophus* for the production of poly(3-hydroxybutyrate). **Hwahak Konghak**, v. 35(5), p. 684-689, 1997.
- CHOI, J.; LEE, S. Y. High level production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 4363-4368, 1999.

- CHOI, J.; LEE, S. Y. Economic consideration on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by bacterial fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 53, p. 646-649, 2000.
- CHOI, J.; LEE, S. Y.; HAN, K. Cloning of the *Alcaligenes latus* polyhydroxyalkanoate biosynthesis genes and use of these genes for the enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64(12), p. 4897-4903, 1998.
- CLARK, D. P.; CRONAN Jr, J. E. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. In: ***Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology.***, 2. ed. ASM Press, Washington, D.C. 1996. v. 1, p. 343–357.
- CLEMENTE, T.; SFAH, D.; TRAN, M.; STARK, D.; PADGETTE, S.; DENNIS, D.; BRÜCKENER, K.; STEINBÜCHEL, A., MITSKY, T. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 1998, submetido.
- COOPER, N. S.; BROWN, M. E.; CAULCOTT, C. A. A mathematical method for analysing plasmid stability in microorganisms. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, p.1871-1880, 1987.
- CROMWICK, A. M.; FOGLIA, T.; LENZ, R. W. The microbial production of poly(hydroxyalkanoates) from tallow. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 464-469, 1996.
- DAWES, E. A.; SENIOR, P. J. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. **Advances in Microbiology and Physiology.**, v.10, p.135-266, 1973.
- de KONING, G. J. M.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 1. Solubilization. **Bioprocess Eng.**, v.17, p. 7-13, 1997a.
- de KONING, G. J. M.; KELLERHALS, M.; van MEURS, C.; WITHOLT, B. A process for the recovery of poly(3-hydroxyalkanoates) from pseudomonads. 2. Process development and economic evaluation. **Bioprocess Eng.**, v. 17, p. 15-21, 1997b.

- DENNIS, D.; SLATER, S. GALAGHER, T. Production of poly(3-hydroxybutirate-co-hydroxyvalerate) in recombinant *Escherichia coli* strain. **Appl. and Environ Microbiol.**, v. 58, p.1089-1094, 1992.
- de SMET, M. J.; EGGINK, G.; WITHOLT, B.; DAWES, E. A. Characterization of intracellular inclusions formed by *Pseudomonas oleovorans* during growth on octane. **J. Bacteriol.**, v. 56, p. 3354-3359, 1983.
- DOI, Y. M.; KITAMURA, S.; ABE, H. Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, v.28, p. 4822-4828, 1995.
- EMERICK, A. W.; BERTOLAM, B. L.; BEM-BASSAT, A.; WHITE, T. J.; KONRAD, M. W. Expression of a  $\beta$ -lactamase preproinsulin fusion protein in *E. coli*. **Biotechnol.**, v. 2, p. 165-168, 1984.
- FIDLER, S.: DENNIS, D. Polyhydroxyalkanoate production in recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol.**, v. 103, p. 231-236, 1992.
- FIEDLER, M.; SKERRA, A. proBA complementation of an auxotrophic *E. coli* strain improves plasmid stability and expression yield during fermenter production of a recombinant antibody fragment. **Gene**, v. 274, p. 111-118, 2001.
- FOSTER, J. W.; MOAT, A. G. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. **Microbiological Reviews**, v. 44(1), p. 83-105, 1980.
- FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutirate-co-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4821, 1997.
- FUKUI, T.; DOI, Y. Efficient production of from plant oils by polyhydroxyalkanoates from *Alcaligenes eutrophus* and its recombinant strain. **Short contribution. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 49, p. 333-336, 1998.

- FUKUI, T.; KICHISE, T.; YOSHIDA, Y.; DOI, Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxy-heptanoate) terpolymers by recombinant *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 19(11), p. 1093-1097, 1997.
- FULLER, R. C. Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, p. 21-29, 1999.
- GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; TORRES, B. B.; BUENO NETTO, C. L.; OLIVEIRA, M. S.; SILVA, L. F. Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid. **Applied Microbiol. and Biotechnol.**, v. 45, p. 785-791, 1996.
- GREEN, P. R.; KEMPER, J.; SCHECHTMAN, L.; GUO, L.; SATKOWSKI, M.; FIEDLER, S.; STEINBUCHER, A.; REHM, B. H. A. Formation of short chain length/medium chain length polyhydroxyalkanoate copolymers by fatty acid  $\beta$ -oxidation inhibited *Ralstonia eutropha*. **Biomacromolecules**, v. 3(1), p. 208-213, 2002.
- GRODZINSKI, J. J. Biomedical application of functional polymers. **Reactive & Functional Polymers**, v. 39, p. 99-138, 1999.
- GROTHER, E. MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Fermentation optimization for the production of poly(b-hydroxybutyric acid) microbial thermoplastic. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 132-141, 1999.
- GUPTA, R.; SHARMA, P.; VYAS, V. V. Effect of growth environment on the stability of a recombinant shuttle plasmid, pCPPS-31, in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**, v. 41, p. 29-37, 1995.
- HAHN, S. K.; CHANG, Y. K.; LEE, S. Y. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 34-39, 1995.

- HAN, M. J.; YOON, S. S.; LEE, S. Y. Proteome analysis of metabolically engineered *Escherichia coli* cells producing poly(3-hydroxybutyrate). **J. Bacteriol.**, v. 183(1), p.301-308, 2001.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, p. 557-580, 1983.
- HASIRCI, V.; LEWANDROWSKI, K.; GRESSER, J. D.; WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. Versatility of biodegradable biopolymers: degradability and an in vivo application. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 135-150, 2001.
- HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A. J.; CHU, L.; DAWES, E. A. The role of NAD- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 52, p. 259-264, 1988.
- HEIN, S.; SÖHLING, B.; GOTTSCHALK, G.; STEINBÜCHEL, A. Biosynthesis of poly(4-hydroxybutyric acid) by recombinant strains of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153(2), p. 411-418, 1997.
- HEIN, S.; TRAN, H.; STEINBÜCHEL, A. *Synechocystis* sp. PCC6803 possesses a two component polyhydroxyalkanoic acid synthase similar to that anoxygenic purple sulfur bacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 170, p. 162-170, 1998.
- HOFFMANN, N.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B.H.A. The *Pseudomonas aeruginosa phaG* gene product is involved in the synthesis of polyhydroxyalkanoic acid consisting of medium-chain-length constituents from non-related carbon sources. **FEMS Microbiology Letters** v. 184, p. 253-259, 2000.
- HOLMES, P.A. Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. **Physical Technology**, v. 16, p. 32-36, 1985.
- HORSWILL, A. R.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Propionate catabolism in *Salmonella typhimurium* LT2: two divergently transcribed units comprise the *prp* locus at 8.5 centisomes, *prpR* encodes a member of the sigma-54 family of activators, and the *prpBCDE* genes constitute an operon. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 928-940, 1997.

- HUIJBERTS, G. N. M.; de RIJK, T. C.; de WAARD, P.; EGGINK, G.  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 1661-1666, 1994.
- HUISMAN, G. W. O.; WONINK, E.; de KONING, G.; PREUSTING, H.; WITHOLD, B. Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fluorescent pseudomonads. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p. 1949-1954, 1989.
- HUSTEDE, E.; STEINBÜCHEL, A. Characterization of the polyhydroxyalkanoate synthase gene locus of *Rhodobacter sphaeroides*. **Biotechnology Letters**, v. 15, p. 709-714, 1993.
- IMANAKA, T.; AIBA, S. A perspective on the application of genetic engineering: stability of recombinant plasmid. **Ann. N.Y. Acad. of Sci.**, v. 369, p. 1-14, 1981.
- JAEGER, K. E.; STEINBÜCHEL, A.; JENDROSSEK, D. Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerases and lipases: bacterial lipases hydrolyse poly( $\omega$ -hydroxyalkanoates). **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 311-318, 1995
- JANES, B; HOLLAR, J; DENNIS, D. Molecular characterisation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic pathway of *Alcaligenes eutrophus* H16. In: **Novel biodegradable microbial polymers**. Kluwer Academic, Dordrecht, p. 175-190, 1990.
- JENDROSSEK, D.; SCHIRMER, A.; SCHLEGEL, H. G. Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids. Minireview. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 46, p. 451-463, 1996.
- JOSSEK, R.; STEINBÜCHEL, A. In vitro synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using an enzymatic coenzyme A recycling system. **FEMS Microbiology Letters**, v. 168, p. 319-324, 1998.
- KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 539-550, 2000.

- KANEKO, T.; SATO, S.; KOTANI, H.; TANAKA, A.; ASAMIZU, E.; NAKAMURA, Y.; MIYAJIMA, N.; HIROSAWA, M.; SUGIURA, M.; SASAMOTO, S.; KIMURA, T.; HOSOUCHI, T.; MATSUNO, A.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; NARUO, K.; OKUMURA, S.; SHIMPO, S.; TAKEUCHI, C.; WADA, T.; WATANABE, A.; YAMADA, M.; YASUDA, M.; TABATA, S. **DNA Res.**, v. 3, p. 109, 1996.
- KESSLER, B.; WITHOLT, B. Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 97-104, 2001.
- KHURI, A. I.; CORNELL, J. A. **Response surfaces. Design and analyses.** Marcel Dekker, Inc., 1987.
- KIDWELL, J.; VALENTIN, H. E.; DENNIS, D. Regulated expression of the *Alcaligenes eutrophus pha* biosynthesis genes in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61(4), p. 1391-1398, 1995.
- KIM, B.S.; CHANG, H. N. Control of glucose feeding using exit gas data and its application to the production of PHB from tapioca hydrolysates by *Alcaligenes latus*. **Biotechnol Tech.**, v. 9, p. 311-314, 1995.
- KIM, Y. C.; KWON, S.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of pLysS on the production of bioadhesive precursor protein by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 20(8), p. 799-803, 1998.
- KIM, B. S.; O'NEILL, B. K.; LEE, S. Y. Increasing poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in recombinant *Escherichia coli* from whey by agitation speed control. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 10(5), p. 628-631, 2000.
- KOSINSKI, M. J.; RINAS, U.; BAILEY, J. E. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside influences the metabolism of *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, p. 782-784, 1992.
- KRAAK, M. N.; SMITS, T. H. M.; KESSLER, B.; WITHOLT, B. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 4985-4991, 1997.

- KRANZ, R. G.; GABBERT, K.K.; LOCKE, T. A.; MADIGAN, M. T. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 63, p. 3003, 1997.
- KUSAKA, S.; ABE, H.; LEE, S.Y.; DOI, Y. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 47, p. 140-143, 1997.
- KUSAKA, S.; IWATA, T.; DOI, Y. Microbial synthesis and physical properties of ultra-high-molecular weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate]. **Pure Appl. Chem.**, v. 35, p.319-335, 1998.
- LAGEVEEN, R. G.; HUISMAN, G. W.; PREUSTING, H.; KETELAAR, P.; EGGINK, G.; WITHOLT, B. Formation of polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: effect of substrates on formation and composition of poly(R)-3-hydroxyalkanoates and poly(R)-3-hydroxyalkenoates. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 54, p. 2924-2932, 1988.
- LANGENBACH, S.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 150(2), p. 303-309, 1997.
- LEE, S. Y. Suppression of filamentation in recombinant *Escherichia coli* by amplified FtsZ activity. **Biotechnol. Lett.**, v. 16, p. 1247-1252, 1994.
- LEE, S. Y. Bacterial polyhydroxyalkanoates. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 49, p. 1-14, 1996a.
- LEE, S. Y. Plastic bacteria?: Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. **Trends Biotechnol.**, v. 14, p. 431-438, 1996b.
- LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) extrusion by cells of recombinant *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 6, p. 147-149, 1996c.
- LEE, S. Y. High cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v. 14, p. 98-105, 1996d.
- LEE, S. Y. *E. coli* moves into the plastic age. **Nature Biotechnol.**, v. 15, p. 17-18, 1997.

- LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutylate) production from xylose by recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess Eng.**, v. 18, p. 397-399, 1998.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of complex nitrogen source on the synthesis and accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli* in flask and fed-batch cultures. **J. Environ. Polymer Degrad.**, v. 2, p. 169-176, 1994.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. High cell density cultivation of poly(hydroxyalkanoic acid). **Advances in Bioch. Eng./Biotechnol.**, v. 52, p. 27-58, 1995a.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*: genetic and fermentation studies. **Can. J. Microbiol.**, v. 41(1), p. 207-215, 1995b.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Characteristics of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 782, p. 133-142, 1996.
- LEE, S. Y.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 721, p. 43-53, 1994a.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L. Effect of fermentation of performance on the economics of poly(3-hydroxybutylate) production by *Alcaligenes latus*. **Polymer Degrad. Stabil.**, v. 59, p. 387-393, 1998.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L. Production and degradation of polyhydroxyalkanoate in waste environment. **Waste Management**, v. 19, p. 133-139, 1999.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L. Production of microbial polyester by fermentation of recombinant microorganisms. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 71, p. 183-207, 2001.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L.; LEE, S. H. Production of polyhydroxyalkanoates by fermentation of bacteria. **Macromol. Symp.**, v. 159, p. 259-266, 2000.
- LEE, S. Y.; CHOI, J. L.; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 25(1-3), p. 31-36, 1999.

- LEE, S. Y.; LEE, K. M.; CHANG, H. N.; STEINBUCHER, A. Comparison of *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(3-hydroxybutyric acid) and morphological changes. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 44, p. 1337-1347, 1994b.
- LEE, S. Y.; LEE, Y. K.; CHANG, H. N. Stimulatory effects of amino acids and oleic acid on poly(3-hydroxybutyric acid) synthesis by recombinant *Escherichia coli*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 79, p. 177-180, 1995.
- LEE, S. Y.; LEE, Y.; WANG, F. Chiral compounds from bacterial polyesters: sugars to plastics to fine chemicals. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 65, p. 363-368, 1999.
- LEE, S. Y.; MERMELSTEIN, L. D.; PAPOUTSAKIS, E. T. Determination of plasmid copy number and stability in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, p. 319-324, 1993.
- LEE, S. Y.; MIDDELBERG, A. P. J.; LEE, Y. K. Poly(3-hydroxybutyrate) production from whey using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 19, p. 1033-1035, 1997.
- LEE, S. Y.; YIM, K. S.; CHANG H. N.; CHANG, Y. K. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*. **J Biotechnol.**, v.32(2), p. 203-211, 1994c.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S. Fed-batch culture of *Escherichia coli* W by exponential feeding of sucrose as a carbon source. **Biotechnol. Techniques**, v. 11(1), p. 59-62, 1997b.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A.P.J. Control of fed-batch fermentation. **Biotechnol. Adv.**, v. 17(1), p. 29-48, 1999.
- LEE, Y.; LEE, S. Y. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate) by filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli* in a defined medium. **J. Environ. Polymer Degrad.**, v. 4, p. 131-134, 1996.
- LIEBERGESELL, M.; MAYER, F.; STEINBÜCHER, A. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 292, 1993.

- LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and nucleotide sequences of genes relevant for biosynthesis of poly(3-hydroxybutiric acid) in *Cromatium vinosum* strain D. **Eur J Biochem.**, v. 209, p. 135, 1992.
- LIEBERGESELL, M.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutiric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, p. 493-501, 1993.
- LU, Z. H.; HE, C. B.; CHUNG, N. T. S. Composites of multifunctional benzylamino-fullerene with low-density polyethylene. **Polymer**, v. 42, p. 5233-5237, 2001.
- LÜBKE, C.; BOIDOL, W.; PETRI, T. Analysis and optimization of recombinant protein production in *Escherichia coli* using the inducible pho A promoter of the *E. coli* alkaline phosphatase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 923-928, 1995.
- LÜTKE-EVERSLOH, T.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and molecular characterization of a succinate semialdehyde dehydrogenase involved in the catabolism of 4-hydroxybutyric acid in *Ralstonia eutropha*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 181, p. 63-71, 1999.
- LUZIER, W. D. Materials derived from biomass biodegradable materials. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 839-842, 1992.
- McCOOL, G. J.; CANNON M. C. **Abstract 97<sup>th</sup> General ASM meeting**, 1996
- MADDEN, L. A.; ANDERSON, A. J.; ASRAR, J.; BERGER, P.; GARRETT, P. Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures. **Polymer**, v. 41, p. 3499-3505, 2000.
- MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63(1), p. 21-53, 1999.
- MANDON, K. MICHEL-REYDELLET, N.; ENCARNATION, S.; KAMINSKI, P. A.; LEIJA, A.; CEVALLOS, M. A.; ELMERICH, C; MORA, J. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 5070, 1998.

- MARANGONI, C. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxibutirato-3-hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** 2000. 191f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- MARANGONI, C.; FURIGO JR., A.; ARAGÃO, G. M. F. The influence of substrate source on the growth of *Ralstonia eutropha* aiming at the production of polyhydroxyalkanoate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18(2), p.175-180, 2001.
- MARANGONI, C.; ANTÔNIO, R. V.; ARAGÃO, G. M. F. Enhancement of growth and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) production in *Ralstonia eutropha* by the use of vegetable oils as nutritional supplement. (2002) 6p. (trabalho em vias de publicação)
- MATSUSAKI, H.; MANJI, S.; TAGUCHI, K.; KATO, M.; FUKUI, T.; DOI, Y. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 6459, 1998.
- McINERNEY, M. J.; AMOS, D. A.; KEALY, K. S.; PALMER, J. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 103, p. 195, 1992.
- MIDDELBERG, A. P. J.; LEE, S. Y.; MARTIN, J.; WILLIAMS, D. R. G.; CHANG, H. N. Size analysis of poly(3-hydroxybutyric acid) granules produced in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Lett.**, v. 17, p. 205-210, 1995.
- MOORE, G. F.; SAUNDERS, S. M. Advances in biodegradable polymers. **Rapra Review Repor.**, v. 98, 1997.
- MOSER, H. The Dynamics of Bacterial Populations Maintained in the Chemostat. **Carnegie Inst. of Washington Publications**, USA, 1958.
- MUKAI, K.; DOI, Y.; SEMA, Y.; TOMITA, K. Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases. **Biotechnology Letters**, v. 15, p.601-604 (1993)

- OEDING, V.; SCHLEGEL, H. G.  $\beta$ -ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. **Biochemistry Journal**, v. 134, p. 239-248, 1973.
- OSCAM, L.; VENENA, G.; BRON, S. Plasmid pTB-913 derivatives are segregationally stable in *B. subtilis* at elevated temperatures. **Plasmid**, v. 28, p. 70-79, 1992.
- PAGE, W. J. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 103, p. 149-158, 1992.
- PARK, S. J.; AHN, W. S.; GREEN, P.; LEE, S. Y. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74(1), p. 81-86, 2001a.
- PARK, S. J.; AHN, W. S.; GREEN, P. R.; LEE, S. Y. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) by metabolically engineered *Escherichia coli* strains **Biomacromolecules**, v. 2, p. 248-254, 2001b.
- PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 15293-15297, 1989.
- PIEPER, U.; STEINBÜCHEL, A. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 96, p. 73, 1992.
- POIRIER, Y.; DENNIS, D. E.; KLOMPARENS, K.; SOMEVILLE, C. Polyhydroxyalkanoates, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. **Science**, v. 256, p. 520-523, 1992.
- PREUSTING, H.; KINGMA, J.; WITHOLT, B. Physiology and polyester formation of *Pseudomonas oleovorans* in continuous two-liquid-phase cultures. **Enzyme Microbiol. Technol.**, v. 14, p. 770-780, 1991
- QI, Q.; REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Escherichia coli* expressing the PHA synthase gene *phaC2* from *Pseudomonas aeruginosa*:

- comparison of PhaC1 and PhaC2. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157(1), p. 155-162, 1997.
- QI, Q.; STEINBÜCHEL, A.; REHM, B. H. A. Metabolic routing towards polyhydroxyalkanoic acid synthesis in recombinant *Escherichia coli* (*fadR*): inhibition of fatty acid L-oxidation by acrylic acid. **FEMS Microbiology Letters**, v. 167, p. 89-94, 1998.
- RAJC, P.; SRIVASTAVA, A.K. Updated mathematical model and feed-batch strategies for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production by *Alcaligenes eutrophus*. **Bioresource Tecnology**, v. 64, p. 185-192, 1998.
- RAMAKRISHNA, S; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.
- RAMSAY, B. A. Physiological factors effecting PHA production. In: **Physiology, kinetics, production and use of biopolymers (proceedings)**, p. 9-17, 1994. Schloss Seggau, Austria.
- RAMSAY, B. A.; RAMSAY, COOPER, D. J. Production of poly- $\beta$ -hydroxyalkanoic acid by *Pseudomonas cepacia*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 55, p. 584-589, 1989.
- RAMSAY, B. A.; LOMALIZA, K.; CHAVARIE, C.; DUBE, B.; BATAILLE, P; RAMSAY, J. A. Production of poly-( $\beta$ -hydroxybutyric-co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2093-2098, 1990.
- RAMSAY, B. A.; SARACOVAN, I.; RAMSAY, J. A.; MARCHESSAULT, R. H. Continuous production of long-side-chain poly-3-hydroxyalcanoates by *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58(2), p. 744-746, 1991.
- REHM, B. H. A.; KRÜGER, N.; STEINBUCHER, A. A new metabolic link between fatty acid *de novo* synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273(37), p. 24044-24051, 1998.

- REHM B. H. A.; MITSKY, T. A.; STEINBÜCHEL, A. Role of fatty acid de novo biosynthesis in polyhydroxyalkanoic acid (PHA) and rhamnolipid synthesis by pseudomonads: establishment of the transacylase (PhaG)-mediated pathway for PHA biosynthesis in *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67(7), p. 3102-3109, 2001.
- REHM, B. H. A.; STEINBÜCHEL, A. Biochemical and genetic analysis of PHA synthases and other proteins required for PHA synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25(1-3), p. 3-19, 1999.
- REN, Q.; KESSLER, B.; WITHOLD, B. Production of medium chain length poly-3-hydroxyalkanoates: from *Pseudomonas* to *Escherichia coli*. In: **Abstracts of the 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates**, p. 2-3. 1996. Davos, Suíça
- RHIE, H. G.; DENNIS, D. The function of *ackA* and *pta* genes is necessary for poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *pha*<sup>+</sup> *Escherichia coli*. **Can. J. Microbiol.**, v. 41(1), p. 200-206, 1995.
- RODRIGUES, M. F. A.; VICENTE, E. J. STEINBÜCHEL, A. Studies on polyhydroxyalkanoate (PHA) accumulation in a PHA synthase I-negative mutant of *Burkholderia cepacia* generated by homogenotization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 193, p. 179-185, 2000.
- RODRIGUES, M. F. A. Uso de biopolímeros bacterianos para liberação controlada de princípios ativos com atividade farmacêutica. **Proposta de projeto** (FAPESP), 2000. 20 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2. ed., Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989.
- SATYAGAL, V. N.; AGRAWAL, P. A generalized model of plasmid replication. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 33, p. 1135, 1989.
- SCHEMBRI, M. A.; BAYLY, R. C.; DAVIES, J. K. Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid chromosomally located. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 118, p. 145-152, 1994.

- SCHUBERT, A.; STEINBÜCHEL, A.; SCHELEGEL, H. G. Cloning of *Alcaligenes eutrophus* genes for synthesis of poly-hydroxybutyric acid (PHB) and synthesis of PHB in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 5837-5847, 1988.
- SCOTT, G. Green Polymers. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p. 1-7, 2000.
- SENIOR, P. J.; DAWES, E. A. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. **Biochemical Journal**, v. 125, p. 55-66, 1971.
- SHI, H.; SHIRAISHI, M.; SHIMIZU, K. Metabolic flux analysis for biosynthesis of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) in *Alcaligenes eutrophus* from various carbon sources. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84(6), p. 579-587, 1997.
- SIM, S. J.; SNELL, K. D.; HOGAN, S. A.; STUBBE, J.; RHA, C.; SINSKEY, A. J. PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 63-67, 1997.
- SLATER, S. C.; VOIGE, W. H.; DENNIS, D. E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 4431-4436, 1988.
- SON, K. H.; JANG, H. J.; KIM, H. J. Effect of temperature on plasmid stability and expression of cloned cellulose gene in a recombinant *B. megaterium*. **Biotechnol. Lett.**, v. 9(12), p. 821-824, 1987.
- SPIEKERMANN, P.; REHM, B. H. A.; KALSCHUEUR, R.; BAUMEISTER, D.; STEINBÜCHEL, A. A sensitive, viable-colony staining method using Nile red for direct screening of bacteria that accumulate polyhydroxyalcanoic acids and other lipid storage compounds. **Arch. Microbiol.**, v. 171, p. 73-80, 1999.
- STATISTICA. version 5,0: Microsoft Corporation, 1995. 1 CD-ROM.
- STEINBÜCHEL, A. **Polyhydroxyalcanoic acids**. In: Biomaterials from biological sources. MacMillan Publishers Ltd., 1991. p. 123-213. Basingstoke, United Kingdom.

- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. Bacterial and other biological systems for polyester production. **Trends in Biotechnology**, v. 16(10), p. 419-427, 1998.
- STEINBÜCHEL, A.; FÜCHTENBUSCH B. GORENFLO, V.; HEIN, S.; JOSSEK, R.; LANGENBACH, S.; REHM, B. H. A. Biosynthesis of polyesters in bacteria and recombinant organisms. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59(1-3), p. 177-182, 1998.
- STEINBÜCHEL, A.; HUSTED, E.; LIEBERGESELL, M.; PIEPER, U.; TIMM, A.; VALENTIN, H. Molecular basis for biosynthesis and accumulation for polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 103, p. 217-230, 1992.
- STEINBÜCHEL, A.; LIEBERGESELL, M.; VALENTIN, H.; PRIES, A. Bacterial polyhydroxylic fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8(3), p. 96, 1997.
- STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128(3), p. 219-228, 1995.
- STEWART, M. R. J.; VENABLES, W. A.; MANCHEE, R. J. Stability of single-stranded DNA plasmids during continuous culture of bacillus subtilis, and the effects of host chemostat-experience. **FEMS Microbiology Letters**, v. 136, p. 317-323, 1996.
- STRATAGENE. **La Jolla, California**: catálogo, 1997, 336 p.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.
- SUDESH, K.; FUKUI, T.; DOI, Y. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, p. 3437, 1998.
- TAGUCHI, K.; AOYAGI, Y.; MATSUSAKI, H.; FUKUI, T.; DOI, Y. Co-expression of 3-ketoacyl-ACP reductase and polyhydroxyalkanoate synthase genes induces PHA production in *Escherichia coli* HB101 strain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 176, p. 183-190, 1999.

- TIMM, A.; BYROM, D.; STEINBÜCHEL, A. Formation of blends of various poly(3-hydroxyalkanoic acids) by a recombinant strain of *Pseudomonas oleovorans*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 33, p. 296-301, 1990.
- TIMM, A.; STEINBÜCHEL, A. Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) genes locus of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Eur. J. Biochem.**, v. 209, p. 15-30, 1992.
- TIMM, A.; WIESE, S.; STEINBÜCHEL, A. A general method for identification of polyhydroxyalkanoic acid synthase genes from pseudomonads belonging to the rRNA homology group I. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 669, 1994.
- TOMBOLINI R., POVOLO S., BUSON A., LATERZA G., MOREA A., SQUARTINI A., CASELLA S., NUTI, M.P. In: **Abstracts of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates**. Abstract 37, 1994. Montreal, Quebec.
- UEDA S, YABUTANI T, MAEHARA A, YAMANE T. Molecular analysis of the poly(3-hydroxyalkanoate) synthase gene from a methylotrophic bacterium, *Paracoccus denitrificans*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 774, 1996.
- UMEDA, F.; KITANO, Y.; MURAKAMI, Y.; YAGI, K.; MIURA, Y.; MIZOGUCHI, T. Cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthesis genes of *Pseudomonas acidophila*. **Appl Biochem Biotechnol.**, v. 70, p. 341, 1998.
- VALENTIN, H. E.; DENNIS 1997 **J. Biotechnol.**, v. 58, p. 33-38
- VALENTIN, H.E., STEINBÜCHEL, A. Cloning and characterization of the Methylobacterium extorquens polyhydroxyalkanoic acid synthase structural gene. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 39, p. 309, 1993.
- VAN WEGEN, R. J.; LEE, S. Y.; MIDDELBERG, A. Metabolic and kinetic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 74(1), p. 70-81, 2001.

- YAMANE, T. Yield of poly-D-(-)-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, p. 165-170, 1993.
- YIM, K. S.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of acetic acid on poly-(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) synthesis in recombinant *Escherichia coli*. **Korean J. of Chem. Eng.**, v.12(2), p. 264-268, 1995.
- YIM, K. S.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 49, p. 495-503, 1996.
- YOUNG, F. K.; KASTNER, J. R.; MAY, S. W. Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid from D-xylose and lactose by *Pseudomonas cepacia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60(11), p. 4195-4198, 1994.
- YU, J. Production of PHA from starchy wastewater via organic acids. **Journal of Biotechnology**, v. 86, p. 105-112, 2001.
- WANG, F.; LEE, S. Y. Poly(3-hydroxybutyrate) production with high polymer content by fed-batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63(9), p. 3703-3706, 1997a.
- WANG, F.; LEE, S. Y. Production of poly(3-Hydroxybutyrate) by fed-batch culture of filamentation-suppressed recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63(12), p. 4765-4769, 1997b.
- WANG, F.; LEE, S. Y. High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of poly(3-hydroxybutyrate) in a defined medium. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 58(2), p. 325-328, 1998.
- WANG, J.; YU, J. Kinetic analysis on inhibited growth and poly(3-hydroxybutyrate) formation of *Alcaligenes eutrophus* on acetate under nutrient-rich conditions. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 201-207, 2000.

- WARNES, A.; STEPHENSON, J. R. The insertion of large pieces of foreign genetic material reduces the stability of bacterial plasmids. **Plasmid**, v.16, p. 116-123, 1986.
- WEINER, R. M. Biopolymer from marine prokaryotes. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 390-394, 1997.
- WIECZOREK, R.; STEINBÜCHEL, A.; SCHIMIDT, B. Occurrence polyhydroxyalkanoic granule-associated proteins related to the *Alcaligenes eutrophus* H16GA24 protein in other bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 135, p. 23-30, 1996.
- WILLIAMS, M. D.; FIENO, A. M. ; GRANT, R. A.; SHERMAN., D. H. Expression and analysis of a bacterial poly(hydroxyalkanoate) synthase in insect cells using baculovirus system. **Protein Expression Purif.**, v. 7, p. 203–211, 1996.
- WONG, H. H.; KIM, Y. C.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 60, p. 271-276, 1998.
- WONG, H. H.; VAN WEGEN, R. J.; CHOI, J.; LEE, S. Y. , MIDDELBERG, A. P. J. Metabolic analysis of poly(3-hydroxybutyrate) production by recombinant *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 9(5), p. 593-603, 1999.
- WONG, H. H, LEE, S. Y. Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50(1), p. 30-33, 1998.
- ZABRISKIE, D. W.; ARCURI, E. J. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. **Enz. Microb. Technol.**, v. 8, p. 706, 1986.
- ZHANG, H.; OBIAS, V.; GONYER, K.; DENNIS, D. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60(4), p. 1198-1250, 1994.
- ZHANG, Z.; MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y. Plasmid stability in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Advances**, v. 14(4), p. 401-435, 1996.

# ANEXOS

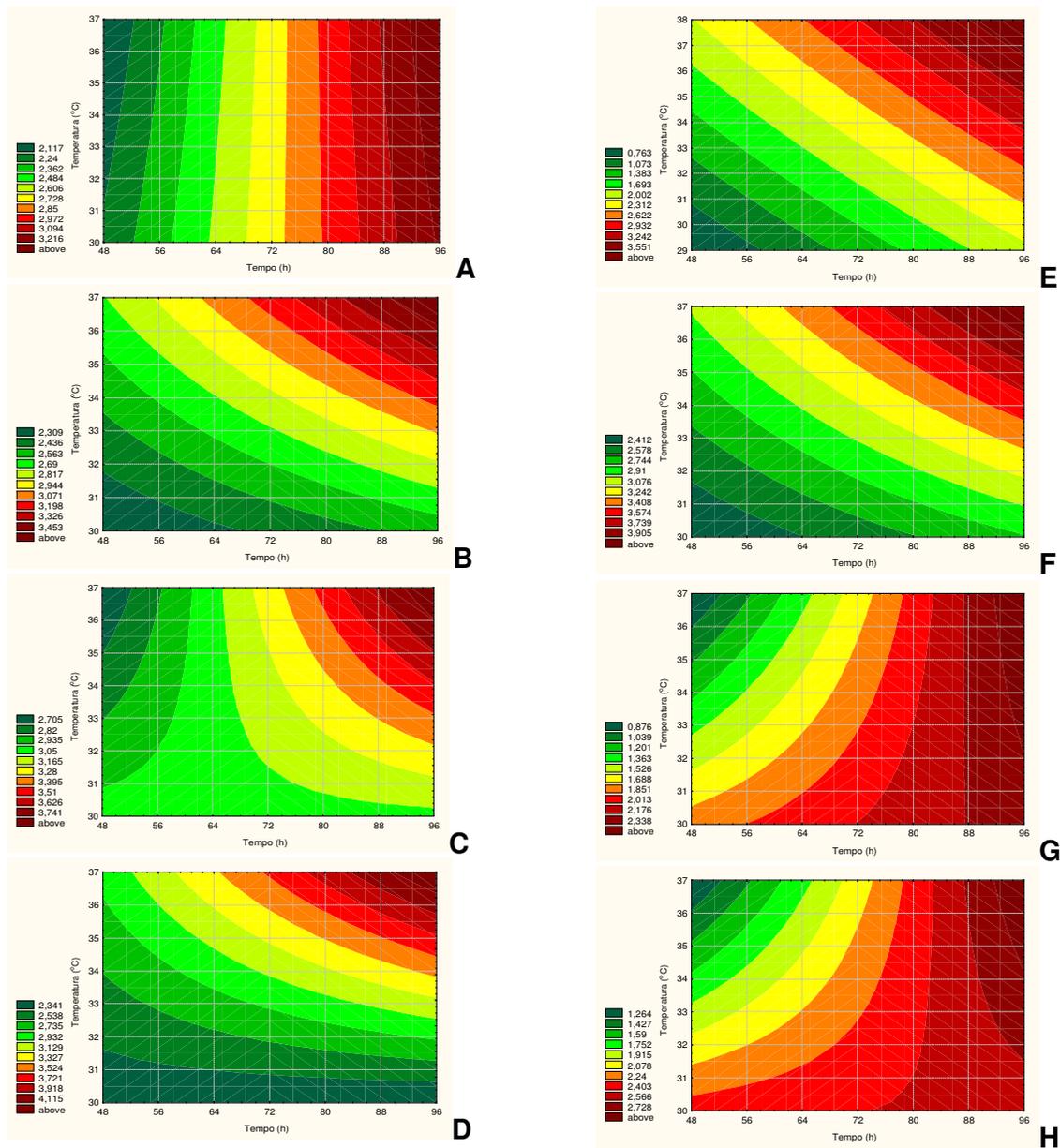


Figura 36. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1)

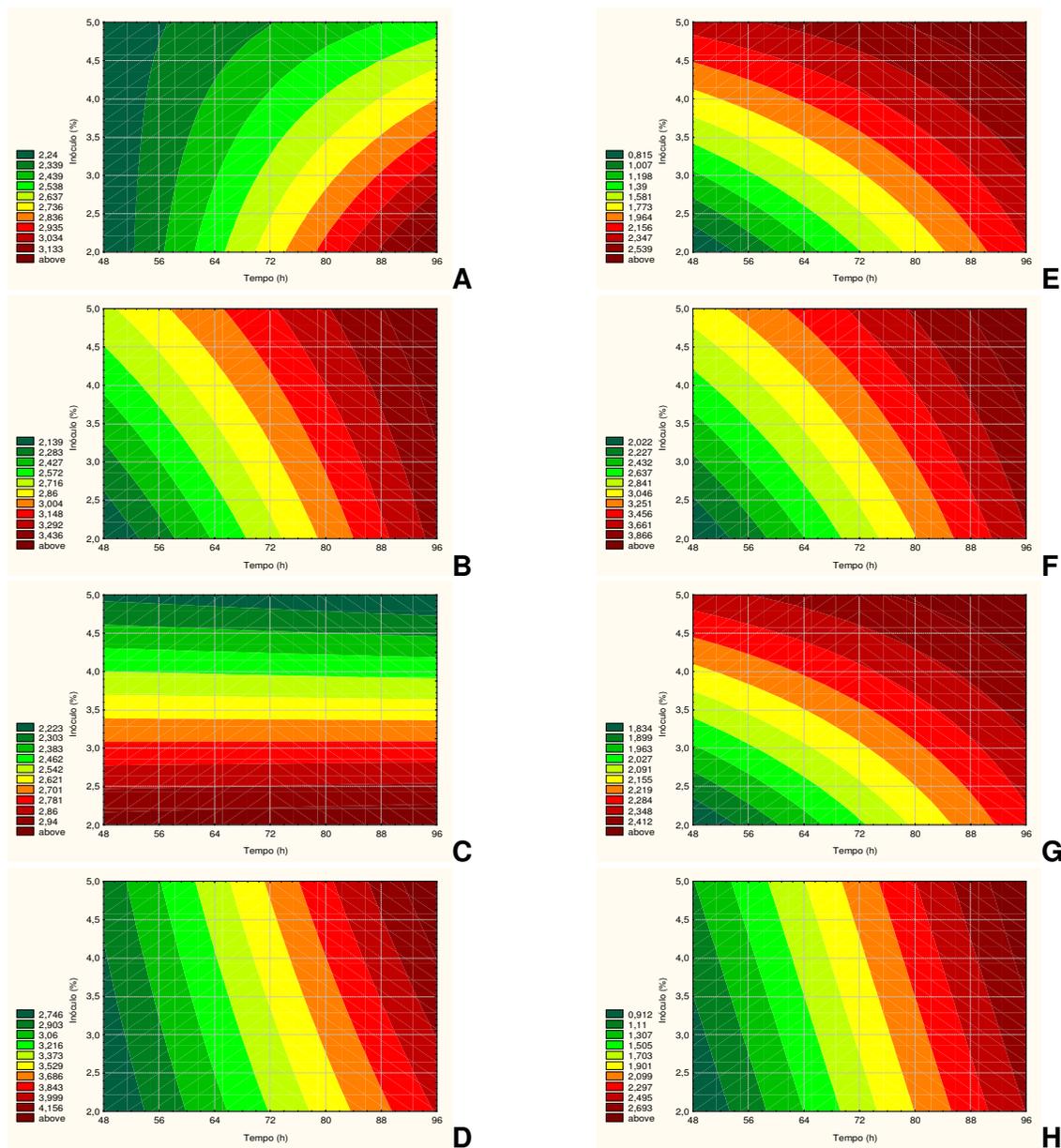


Figura 37 Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1)

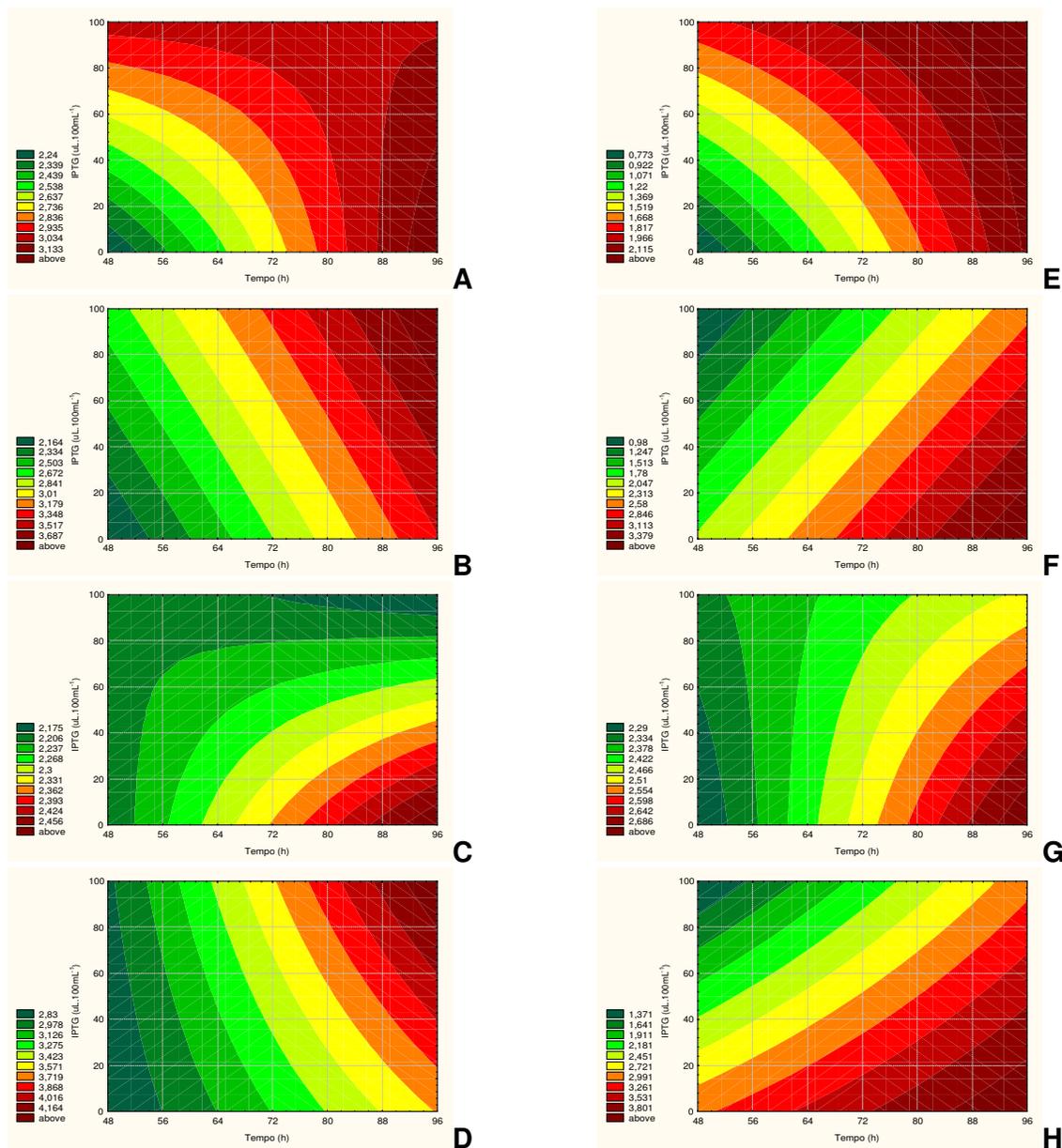


Figura 38. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental 2<sup>5</sup> com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1)

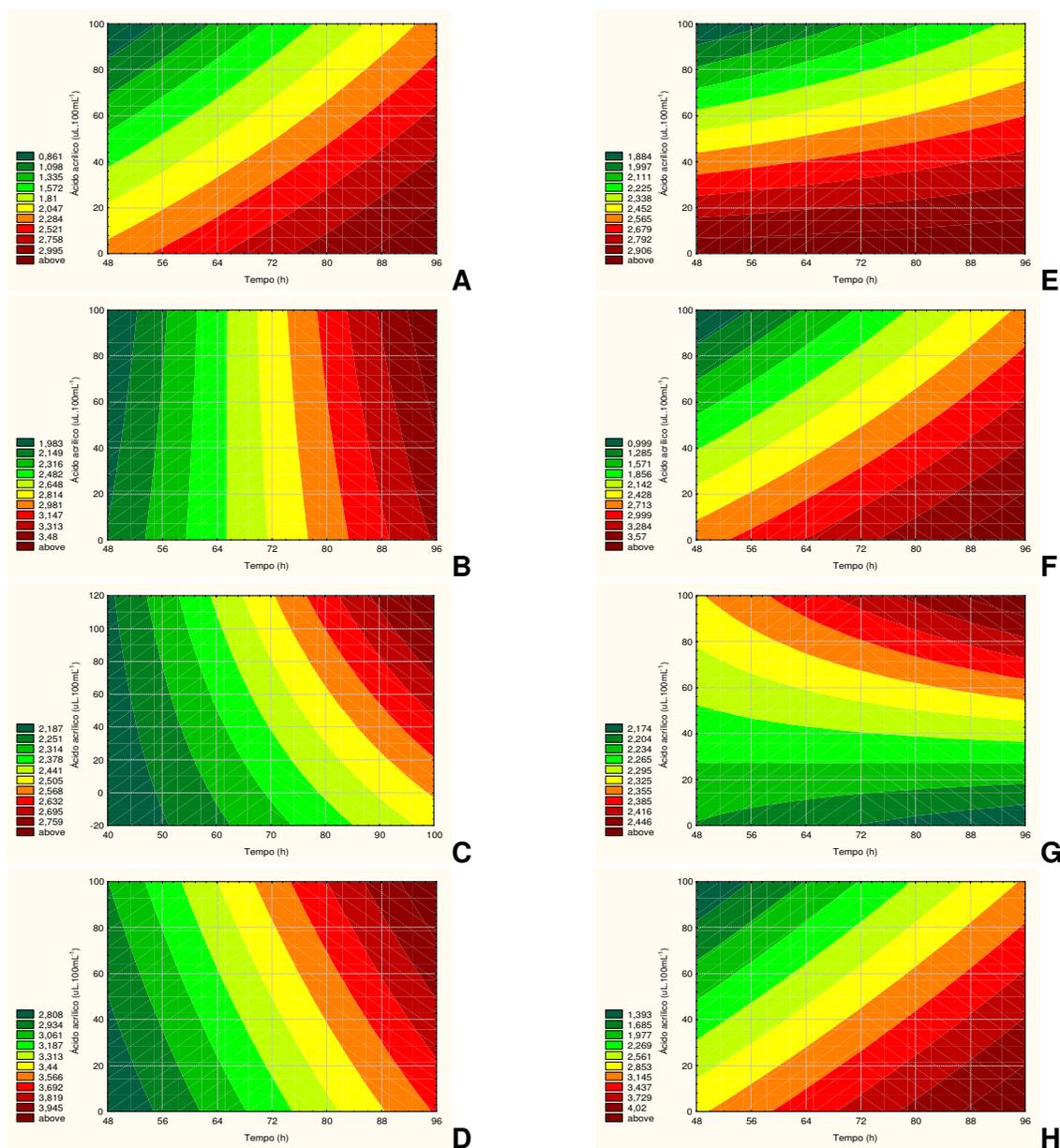


Figura 39. Curvas de nível da resposta massa celular seca geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental 2<sup>5</sup> com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÒC. e IPTG (-); (B) TEMP. (+1), INÒC. e IPTG (-); (C) TEMP. e IPTG (-) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1)

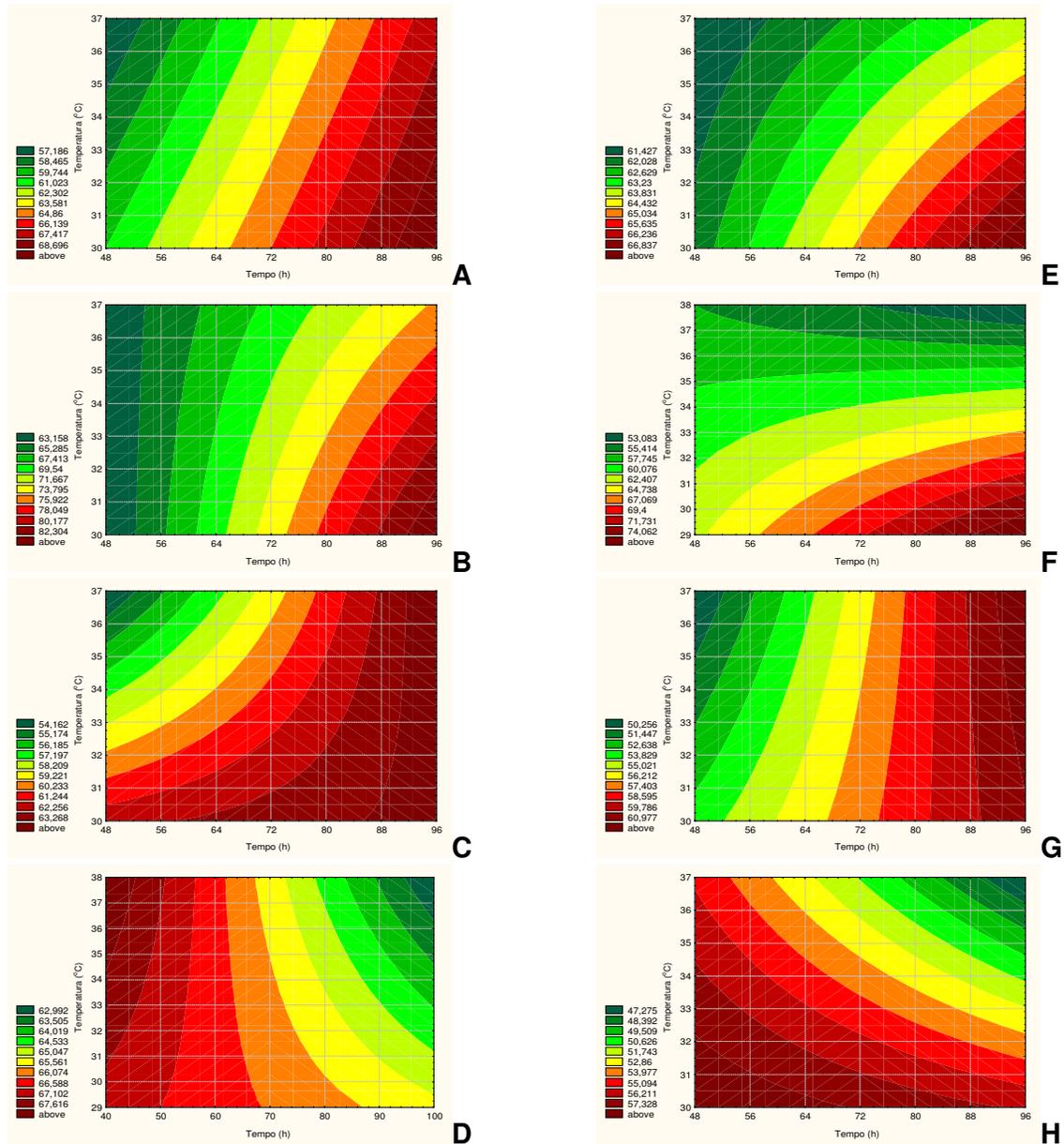


Figura 40. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1)

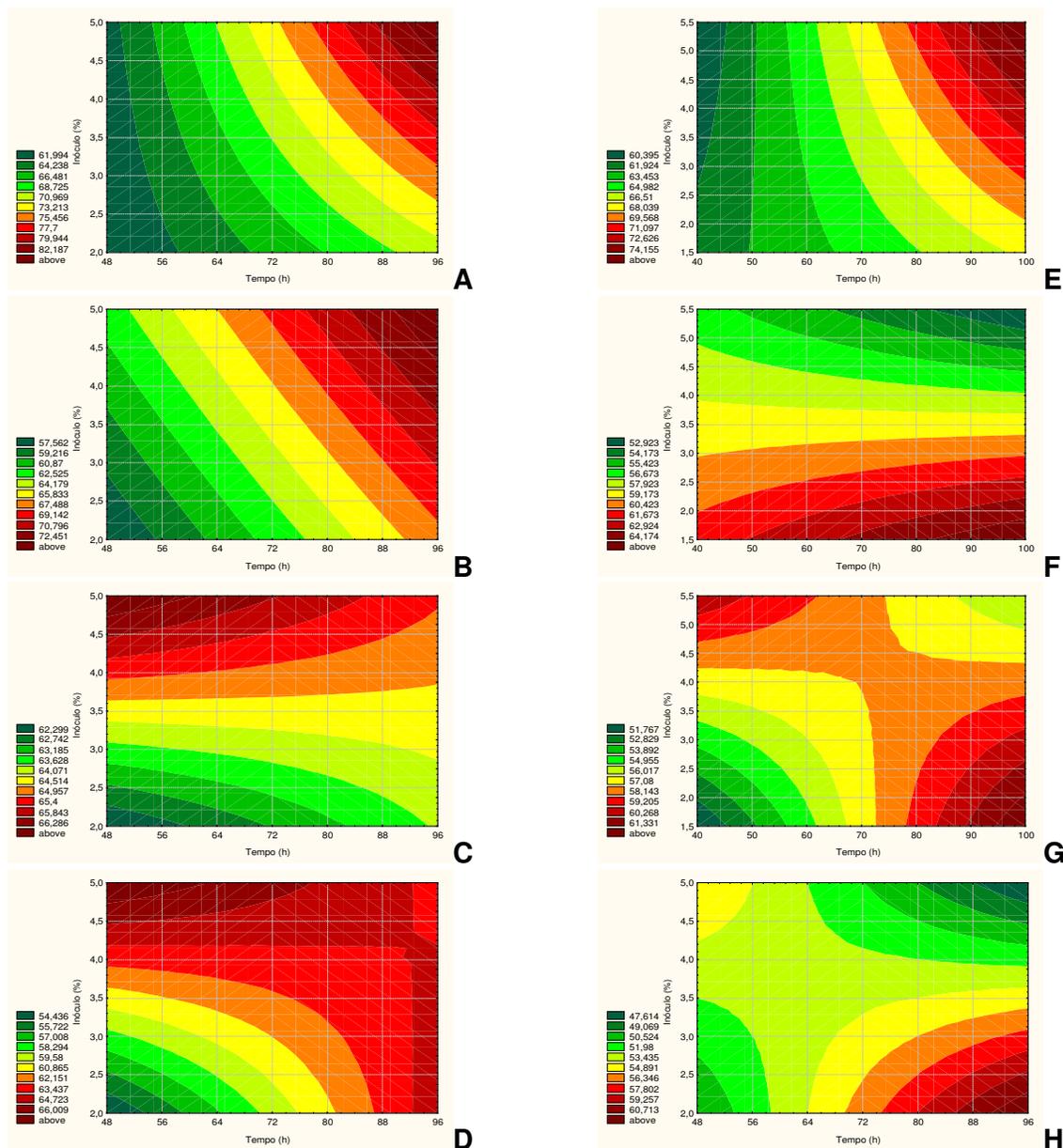


Figura 41. Curvas de nível da resposta acúmulo de PHB, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1)

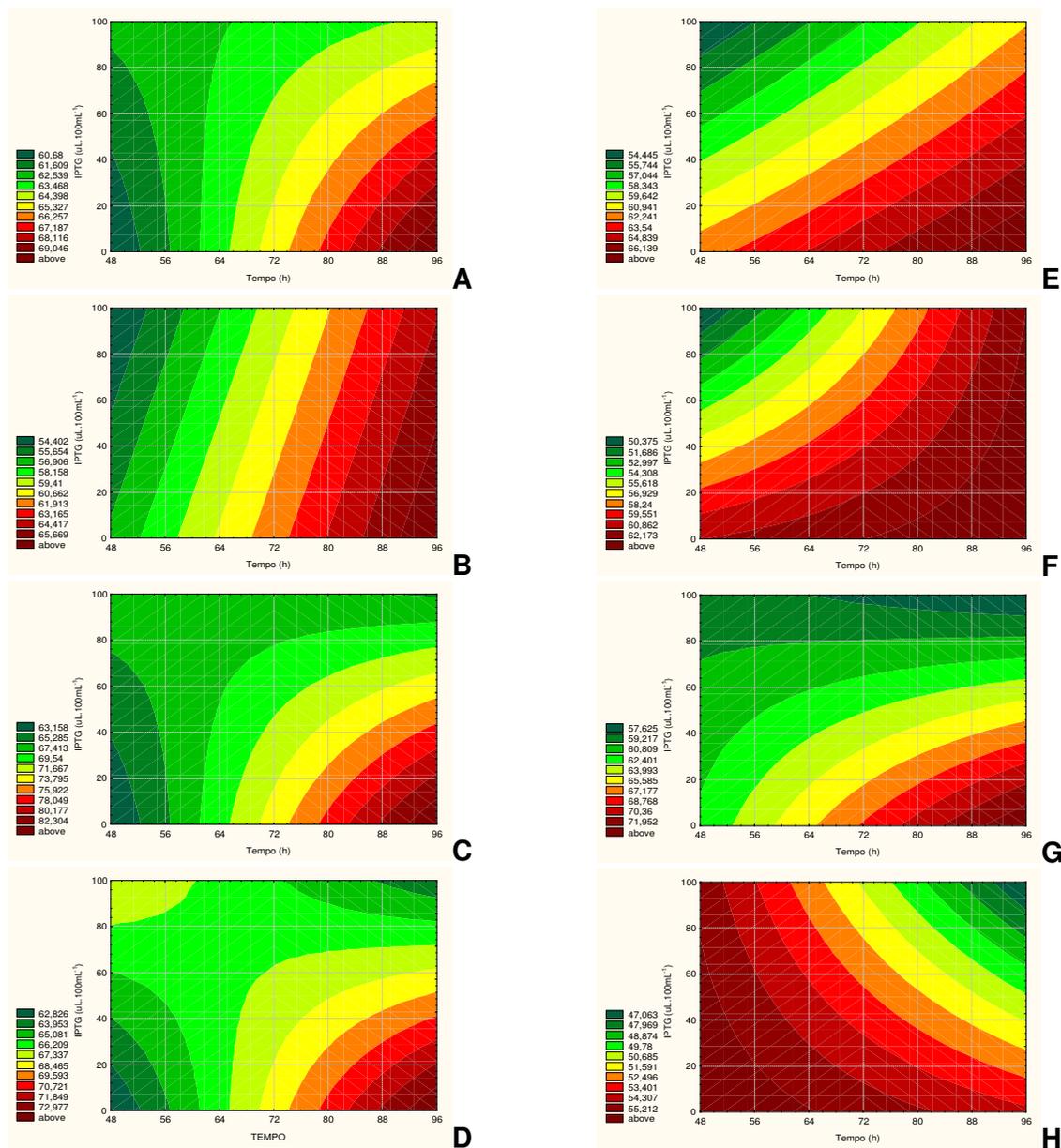


Figura 42. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1)

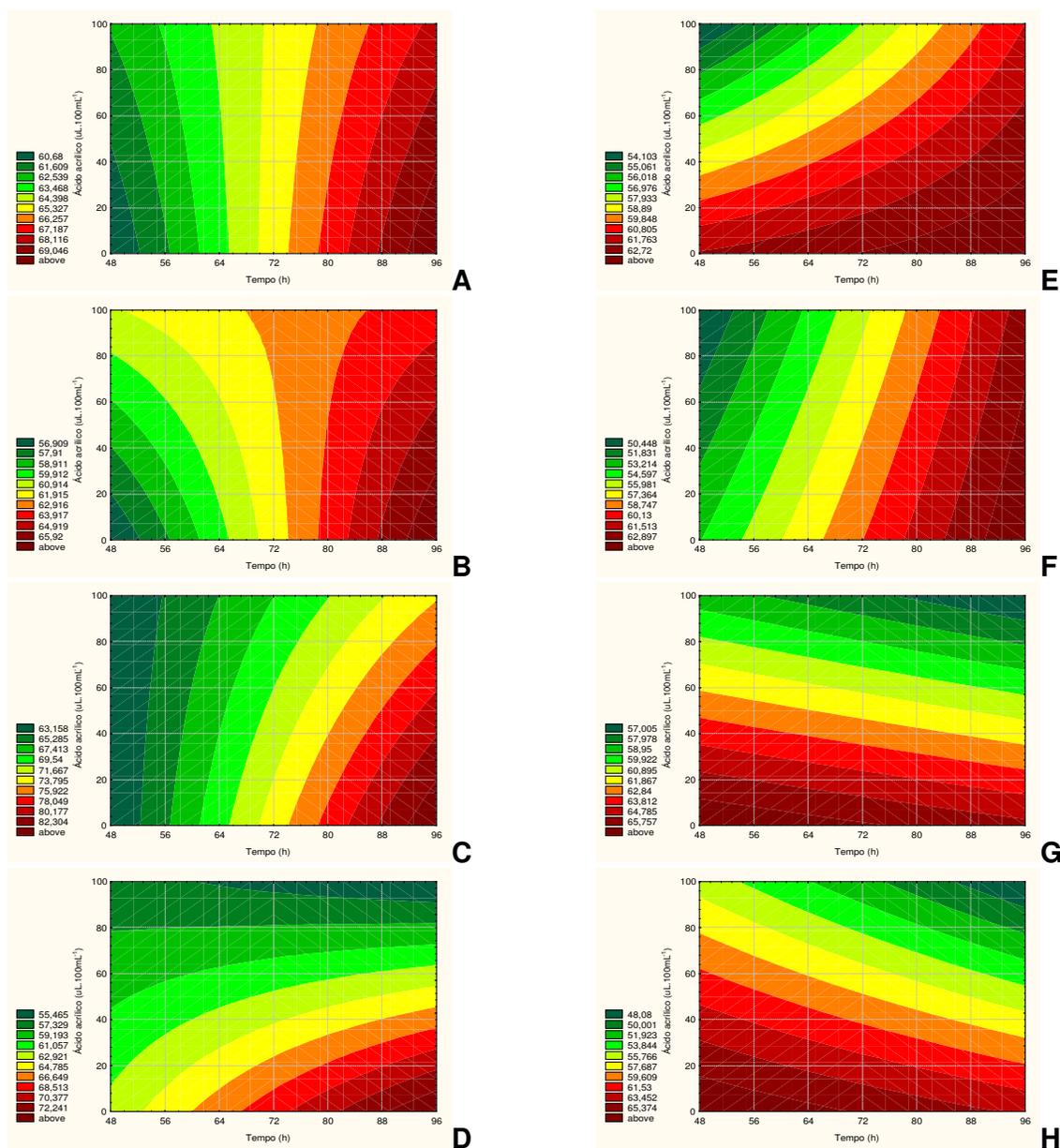


Figura 43. Curvas de nível da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e IPTG (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e IPTG (-1); (C) TEMP. e IPTG (-1) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1)

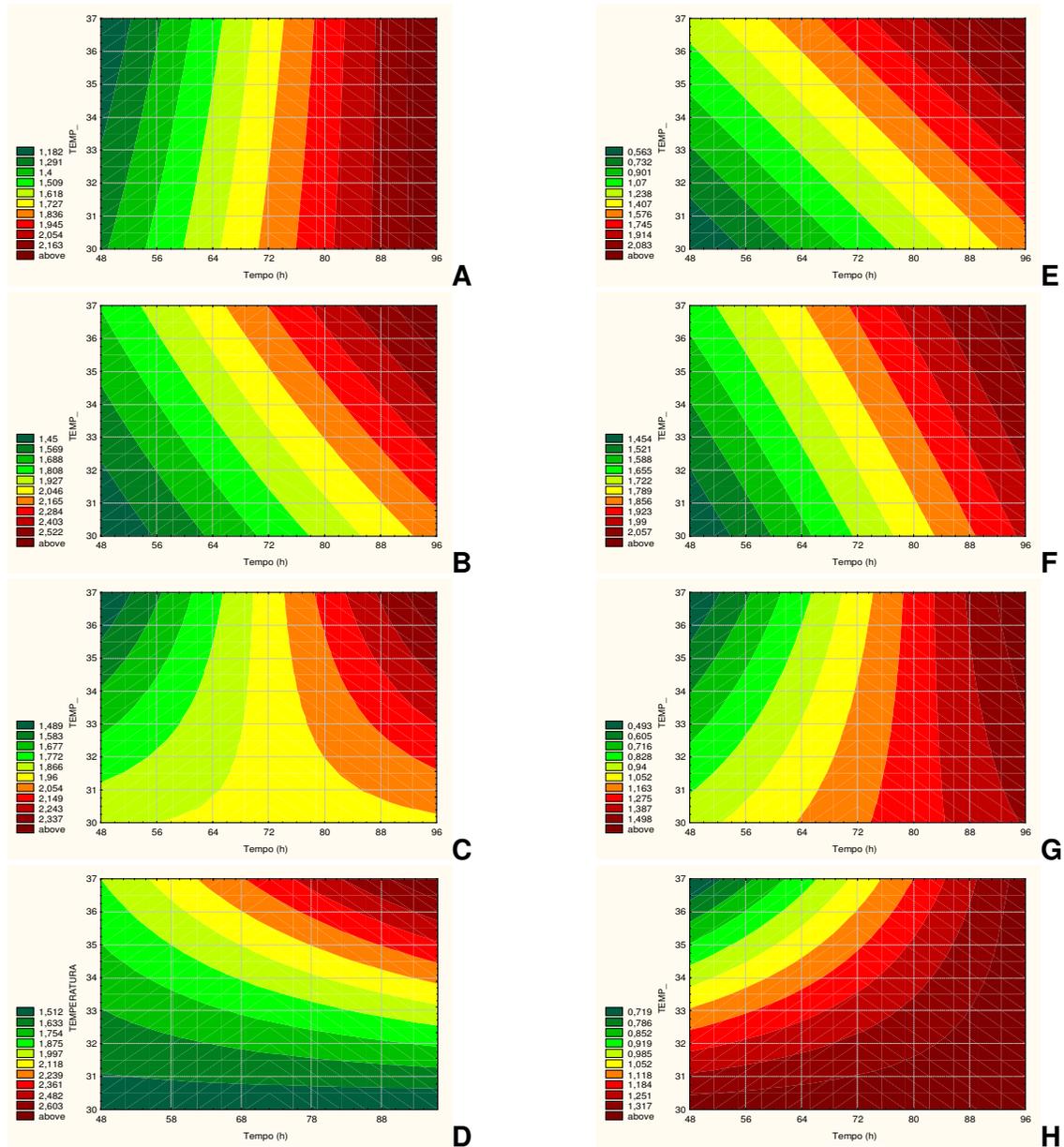


Figura 44. Curvas de nível da resposta massa de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x temperatura e as demais variáveis fixas em: (A) INÓC., IPTG e AA (-1); (B) INOC. (+1), IPTG e AA (-1); (C) INOC. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) INÓC. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) INÓC e IPTG (-1) e AA (+1); (F) INOC. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) INÓC. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) INÓC., IPTG e AA (+1)

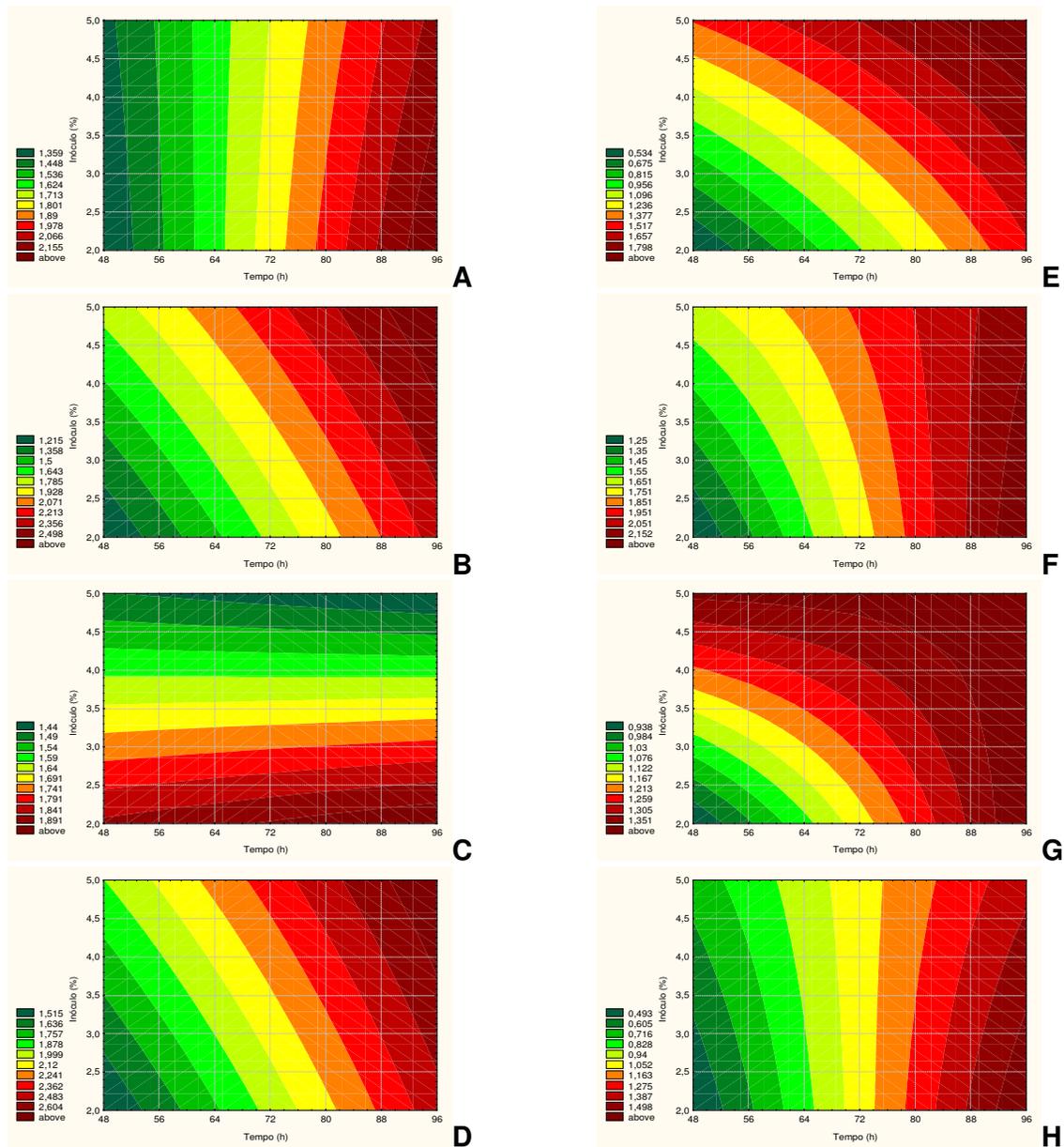


Figura 45 Curvas de nível resposta massa de PHB, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x inóculo e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., IPTG e AA (-1); (B) TEMP. (+1), IPTG e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e IPTG (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e IPTG (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e IPTG (-1); (G) TEMP. (-1) e IPTG e AA (+1) e (H) TEMP., IPTG e AA (+1)

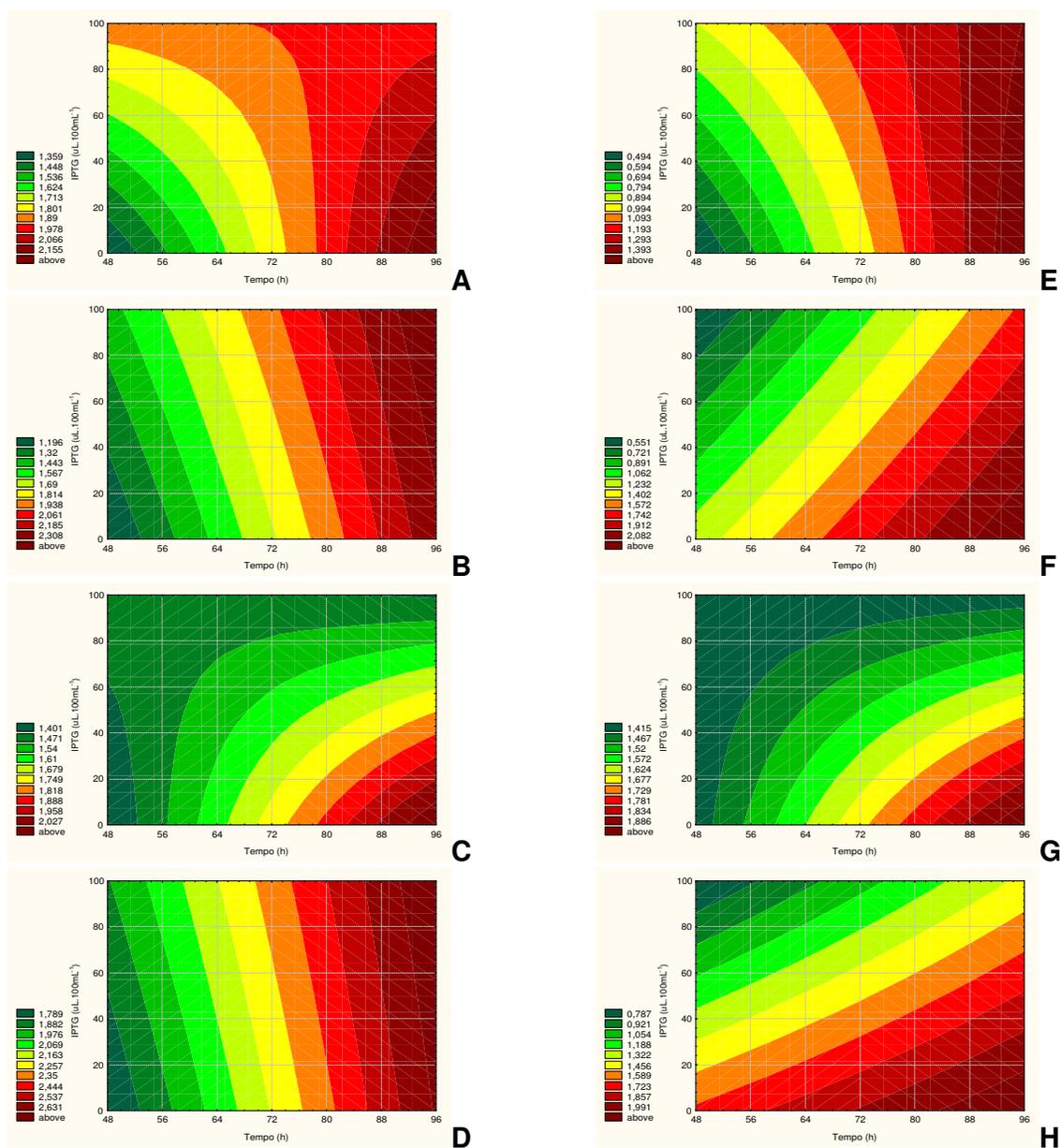


Figura 46. Superfícies da resposta percentual de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x IPTG e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÓC. e AA (-1); (B) TEMP. (+1), INÓC. e AA (-1); (C) TEMP. e AA (-1) e IPTG (+1), (D) TEMP. e INÓC. (+1) e AA (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e AA (+1); (F) TEMP. e AA (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e AA (+1) e (H) TEMP., INÓC. e AA (+1)

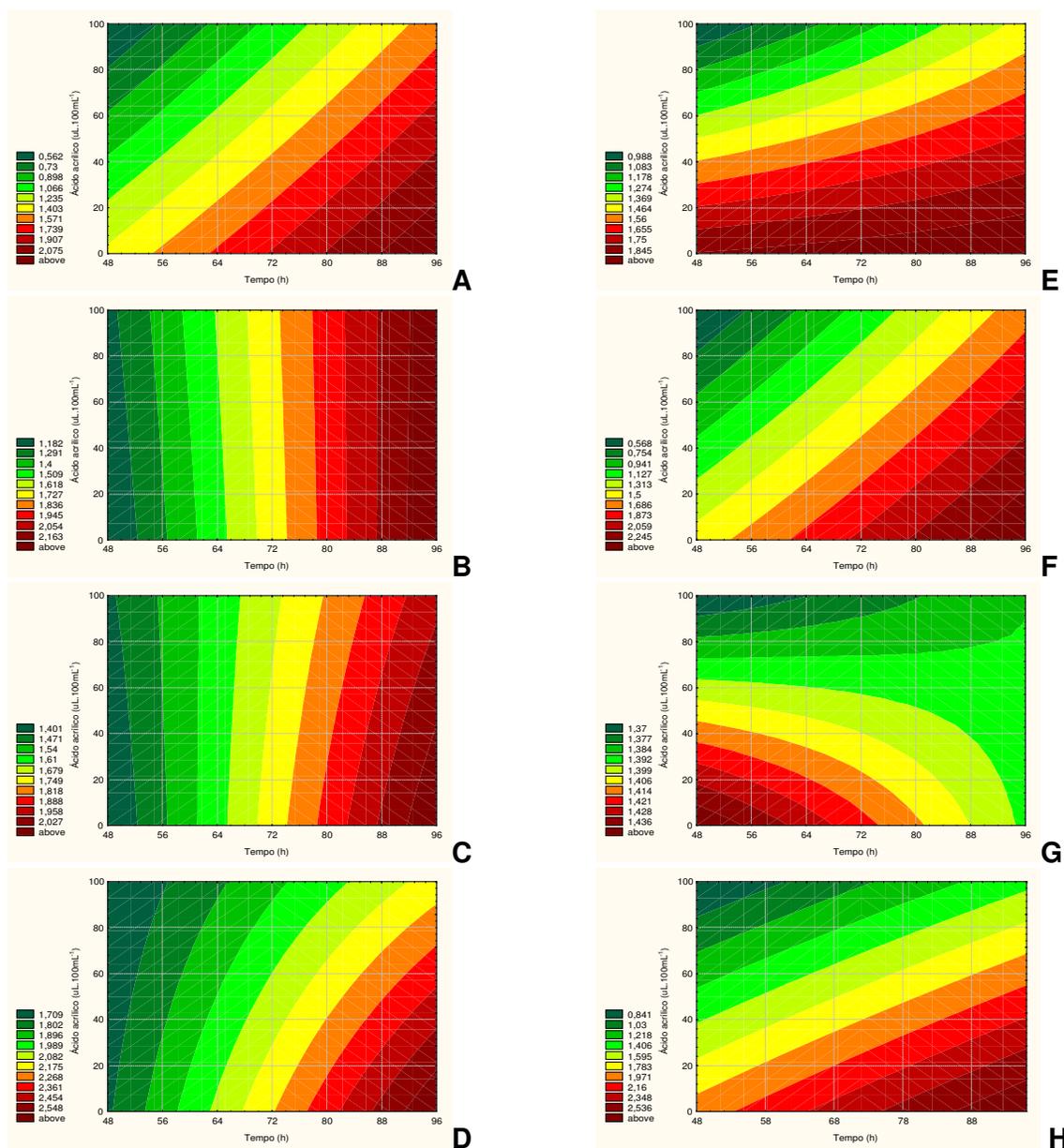


Figura 47. Curvas de nível da resposta massa de PHB acumulado, geradas a partir das equações lineares determinadas através do planejamento experimental  $2^5$  com dois níveis em função das variáveis inóculo, IPTG, ácido acrílico, temperatura e tempo para *E. coli* JM101 (pBHR68), tendo sido graficado tempo x ácido acrílico e as demais variáveis fixas em: (A) TEMP., INÒC. e IPTG (-1); (B) TEMP. (+1), INÒC. e IPTG (-1); (C) TEMP. e IPTG (-1) e INÓC. (+1), (D) TEMP. e INÓC (+1) e IPTG (-1); (E) TEMP. e INÓC. (-1) e IPTG (+1); (F) TEMP. e IPTG (+1) e INÓC. (-1); (G) TEMP. (-1) e INÓC. e IPTG (+1) e (H) TEMP., INÓC. e IPTG (+1)