



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

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE  
BIOCOMBUSTÍVEIS PARA PRODUÇÃO DE POLI(3-  
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha***

**KELLEN ZANFONATO**

**FLORIANÓPOLIS  
2016**



Kellen Zanfonato

APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE  
BIOCOMBUSTÍVEIS PARA PRODUÇÃO DE POLI(3-  
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do título de doutor em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão

Coorientador: Prof. Dr. Willibaldo Schmidell Netto

Florianópolis  
2016



**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA DE  
BIOCOMBUSTÍVEIS PARA PRODUÇÃO DE POLI(3-  
HIDROXIBUTIRATO) POR *Ralstonia eutropha***

Por

**Kellen Zanfonato**

Tese julgada para a obtenção do Título de Doutor em Engenharia de Alimentos, área de concentração de Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão  
**Orientadora**

Prof. Dr. Willibaldo Schmidt Netto  
**Coorientador**

Prof. Dr. Marco Di Luccio  
**Coordenador**

**Banca Examinadora:**

Prof. Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof. Dr. Leo Serpa

Prof. Dra. Andréa Lima dos Santos  
Schneider

Dra. Luci Kelm Menezes Quines

Prof. Dr. Boris Juan Carlos Ugarte  
Stambuk

Florianópolis, 31 de março de 2016.





*Dedico este trabalho à querida nona  
Zelinda, pela saudade presente e nosso  
adeus não dito; à minha amada mãe  
Nilva, pela sua fé em mim e em Deus; e à  
minha irmã Arlete, pelo melhor presente  
que alguém poderia ter me dado.*





## AGRADECIMENTOS

Ao longo do doutorado, eu pude contar com a ajuda, carinho e ensinamentos de muitas pessoas. Algumas dessas pessoas estão ao meu lado há longa data e outras surgiram no meu caminho no decorrer desses quatro anos, mas independente disso, sou muito grata a todas elas e deixo aqui registrado o meu muito obrigada. Antes de mais nada, agradeço a Deus pela vida e pela saúde, para correr atrás dos meus sonhos.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora Gláucia, que além de desempenhar com muito amor o seu papel de professora, me auxiliando nas discussões e possibilitando a realização deste trabalho, sempre me encorajou, em outros momentos me desafiou e me fez crescer como pessoa e como profissional. Obrigada por todas as oportunidades que tive em nosso grupo e pela confiança em mim depositada.

Obrigada ao meu coorientador Willibaldo, grande exemplo de pesquisador, por dividir o seu conhecimento e algumas de suas histórias comigo, por possibilitar trabalhar ao lado de alguém tão apaixonado pelo que faz. Sou grata pelos ensinamentos e pelas discussões.

Professor Anthony Sinskey, I'm so thankful for the opportunity to study at MIT and had he as my advisor. Tony was always kind and encouraged me to learn about molecular biology.

Agradeço aos professores e pesquisadores que aceitaram ler e avaliar esta tese como membros da banca examinadora: Prof. Andrea Schneider, Prof. Leo Serpa, Prof. Bóris Stambuk, Prof. Débora Oliveira e Luci Kelin Quines; e à relatora dessa tese: Jaciane Ienczak. Também sou grata aos professores Débora Oliveira e Luismar Porto, pelo suporte e empréstimo de equipamentos para a realização da parte experimental.

Ao “Grupo PHB” que muito além de um grupo de pesquisa, em muitos momentos foi minha família. Trabalhar em grupo torna os desafios mais leves, as tomadas de decisões boas discussões e o aprendizado é compartilhado por todos. Kelin, Méloidi, Pamela, Willian, Francielle, Eduardo, Thaís, Caetano, Hélia e Nathália, a ajuda de cada uma dessas pessoas foi essencial para a conclusão deste trabalho e todas elas têm um lugar muito especial em meu coração.

Aos colegas de Engebio na UFSC agradeço o companheirismo, o bom humor nas horas de descontração e as palavras de carinho, obrigada a todos, mas em especial à Denise, Seu Zé, Ana Paula, Morgana, Mara e Cláudia. Obrigada também aos professores e colegas do LTBR da UFSC, que nos receberam enquanto o nosso laboratório estava passando por reformas.

To the Sinskey Lab members that helped and supported me during the year that we're lab mates: Fen, Christian, Charlie, John, Justin, Eric, Angela, Sophia, Niklas, Jens and especially to Kazuhiko and Leo, who had a lot of patience and taught me countless things at MIT.

À minha família o meu muito obrigada, meus pais Nilva e Orildo, que sentiram saudades e que nem sempre entenderam, mas apoiaram todas as minhas decisões, a força e amor que vem de vocês é o que faz tudo valer a pena. Minha querida irmã Arlete, que me encoraja, que está sempre ao meu lado para tudo e me presenteou com o meu sobrinho Vitor, ele que traz felicidade e luz para as nossas vidas. Eu amo vocês.

Minhas amigas de infância, que por muitas vezes me questionaram o porquê de eu querer estudar “tanto”, não posso deixar de agradecer por existirem e alegrarem a minha vida. A cada encontro eu voltava renovada, obrigada Manila G, Greice, Eliane, Manila C, Cris, Aline e Ângela.

Sou imensamente grata por ter tido a alegria de conviver diariamente com minha amiga Kelin, que além de colega de laboratório, se tornou essencial em minha vida, que me aconselhou nos mais diversos momentos e é a pessoa que me traz calma e sabedoria.

O meu muito obrigada à companheira de grupo que com o seu jeito único de ser, ganhou um lugar especial em minha vida, Mel. Eu agradeço por todas as respostas que me ajudou a encontrar e por compartilhar comigo um pouco do seu conhecimento.

À Jana, a companheira com quem tive a felicidade de dividir o apartamento, as conquistas e as angústias por duas vezes, obrigada amiga.

À minha amigona Déia, que mesmo de longe, esteve sempre disposta a conversar, a me aconselhar e a me fazer sorrir.

Aos queridos amigos que me receberam por diversas vezes em Campinas: Jaciane, Meiri, Mariano e Susan, obrigada pelo carinho e disponibilidade.

Além dos amigos ligados a mim durante os quatro anos de doutorado, tive o prazer de conviver com pessoas que animaram os meus dias e hoje me trazem boas lembranças. Obrigada Luna, Bianca, Andrea, Jean, Willzinho, Gabrielli, Daniela e Manoela.

Muitas pessoas me engrandeceram e me receberam de braços abertos no período que morei nos Estados Unidos, obrigada ao Thiago e à Jackie, com quem tive o prazer de dividir a casa e ter experiências culturais incríveis. Aos companheiros de aventuras Ernesto e Elton, agradeço por terem sido tão gentis e animados. Obrigada àquela que se tornou uma valiosa amiga: Vilásia, que esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins, me deu apoio e compartilhou comigo experiências

maravilhosas. Agradeço ao carinho e à companhia sempre animada da Gabi, com quem morei e me diverti muito.

Aos demais familiares e amigos que me ajudaram de alguma forma, obrigada.

E por fim, agradeço ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC, à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.



*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”*

*Cora Coralina*



## RESUMO

Os poli(hidroxialcanoatos) (PHAs) são compostos biodegradáveis, produzidos por microrganismos como reserva de energia, que despertam interesse industrial por serem termoplásticos biodegradáveis. O desenvolvimento de processos de produção desses biopolímeros de forma eficiente, tem sido foco de diversas linhas de pesquisa. *Ralstonia eutropha* é um dos microrganismos mais estudados para a produção de Poli(3-hidroxibutirato) (P(3HB)), que é o PHA mais comumente estudado. A utilização de substratos de baixo custo, como os resíduos, pode ser uma alternativa na redução dos custos de produção desses materiais. A vinhaça é o principal subproduto da indústria sucroenergética, sendo produzida em grandes volumes. A valorização da vinhaça, pelo desenvolvimento de um processo para obtenção de um produto com valor agregado, como o P(3HB), contribui com valor adicional à produção de etanol. O glicerol é uma das principais fontes de carbono presentes na vinhaça. O objetivo deste trabalho foi utilizar a vinhaça como substrato para o crescimento e a produção de P(3HB) pela bactéria *R. eutropha* DSM 545. Diferentes diluições de vinhaça foram estudadas e em nenhuma delas a bactéria sofreu inibição em seu crescimento, mesmo quando a vinhaça (sem diluição) foi apenas adicionada de sais. Visto que a bactéria alcançou a fase estacionária de crescimento quando havia substratos disponíveis no meio, como o glicerol, foi proposto realizar o melhoramento de *R. eutropha* DSM 545 para o consumo mais eficiente dessa fonte de carbono. Assim, dois dos genes responsáveis pelo consumo do glicerol em *Escherichia coli*: *glpF* e *glpK*, que codificam uma aquaporina e a glicerol quinase (atua na fosforilação do glicerol a glicerol 3-fosfato), respectivamente, foram expressos em *R. eutropha* DSM 545 (parental) e assim foi construída a cepa *R. eutropha\_glpFK* (recombinante). Ao se analisar comparativamente o crescimento de *R. eutropha\_glpFK* com *R. eutropha* DSM 545, em meio contendo glicose, os resultados mostraram que a expressão dos genes *glpFK* não interferiu no desempenho desse microrganismo. Cultivos em modo batelada em biorreator foram conduzidos para comparar o desempenho das cepas parental e recombinante, em glicerol, em vinhaça em meio contendo vinhaça adicionada de glicerol. Em vinhaça, a recombinante foi capaz de crescer com  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,41 \text{ h}^{-1}$ , enquanto *R. eutropha* foi de  $0,18 \text{ h}^{-1}$ . Nesses experimentos, não houve praticamente produção de biopolímero pois não ocorreu a limitação de um nutriente essencial. Nos ensaios conduzidos



em vinhaça com adição de glicerol, a recombinante foi capaz de crescer com  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0,33 \text{ h}^{-1}$  e acumulou 34% de P(3HB), enquanto *R. eutropha* foi de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  e 15% de P(3HB). Ao comparar o crescimento das duas cepas, nos cultivos contendo glicerol como fonte de carbono, ambas foram capazes de acumular aproximadamente 35% de biopolímero. Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que a vinhaça é um substrato com potencial para ser utilizado por *R. eutropha*, com velocidades específicas máximas de crescimento superiores às encontradas em outros substratos, porém há a necessidade de uma fonte de carbono adicional para aumentar os percentuais de acúmulo de biopolímero. Uma dessas alternativas é o glicerol que quando adicionado à vinhaça a produção de P(3HB) aumentou. O glicerol foi mais rapidamente consumido e com rendimentos maiores por *R. eutropha\_glpFK* que por *R. eutropha* DSM 545. Assim, pode-se dizer que, *R. eutropha* é capaz de crescer e produzir P(3HB) a partir de vinhaça e glicerol.

*Palavras-chave: cepa recombinante, glicerol, PHA, Ralstonia eutropha, vinhaça.*

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHA), a biodegradable energy store of microbes, is an alternative to petroleum-derived thermoplastics. Researches had been focussed to develop efficient production process with low costs. The bacteria *Ralstonia eutropha* is one of the most studied microorganisms for P(3HB) production, a widely studied PHA. Vinasse is the main liquid waste from ethanol industry and its valorization by a process that use this waste as substrate for an added value product, like P(3HB), contributes to ethanol production, besides try to solve an environment problem related to this waste. Glycerol is one of the main carbon source present in vinasse. In this study, vinasse was used as substrate for P(3HB) production by *R. eutropha* DSM 545. Different vinasse concentrations were evaluated, and no inhibitory effect were observed. Batch cultivation was performed in bioreactor using vinasse (undiluted) plus the mineral medium salts and *R. eutropha* could growth until 5 g/L final cell concentration. Once the bacteria reached the stationary growth fase while residual substrates were available, like glycerol, this study examined the enhancement of glycerol assimilation ability of *R. eutropha* DSM 545 by introduction of the genes of aquaglyceroporin (*glpF*), able to facilitate the glycerol transport, and glycerol kinase (*glpK*), able to phosphorylated glycerol to yield glycerol 3-phosphate, from *Escherichia coli*. The growth behavior of the recombinant strain was compared to the parental strain on glucose and results showed that the *glpFK* expression didn't affect *R. eutropha* DSM 545 behavior. Batch cultivations in bioreactor were performed to compare the parental and the engineered strains, on vinasse, vinasse plus glycerol and glycerol, as culture medium. On cultivations using vinasse, the recombinant strain grow with a  $\mu_{\text{máx}}$  of 0,41 h<sup>-1</sup>, while *R. eutropha* was 0,18 h<sup>-1</sup> and no P(3HB) production was observed, since the nitrogen limitation did not occurred. When vinasse plus glycerol was used as culture medium, aimed to increase the carbon source, *R. eutropha\_glpFK* was able to growth with  $\mu_{\text{máx}}$  0,33 h<sup>-1</sup> and produced 34% of P(3HB), while the wild type grow with  $\mu_{\text{máx}}$  0,19 h<sup>-1</sup> and produced 15% of P(3HB). In the cultivations using only glycerol as substrate, without considering the difference in pre culture time, both strains showed the same behavior and produced about 35% of P(3HB). In conclusion, vinasse is a potential substrate for *R. eutropha*, showing maximum specific growth rates higher when compared to others substrates, but it requires an extra carbon source to increase the P(3HB) accumulation. In this context, glycerol is a good alternative, since when it was used with vinasse the biopolymer

accumulation was higher and it was efficiently consumed by the engineered strain expressing *glpFK* genes.

*Keywords: glycerol, PHA, Ralstonia eutropha, recombinant strain, vinasse*

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 2.1 Estrutura química geral dos poli(hidroxicanoatos): ( $R1/R2$ ) são os grupamentos alquila, podendo variar de C1 a C13; $n$ pode variar de 100 – 30.000 e $x$ de 1 a 4 (LEONG et al., 2014). .....  | 43 |
| Figura 2.2 Estrutura química do poli(3-hidroxi butirato). O $n$ representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero. ....   | 45 |
| Figura 2.3 Biossíntese microbiana de PHAs (Figura adaptada de Aldor e Keasling, 2003). Onde PhaA: $\beta$ -cetotiolase; PhaB: 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de P(3HB) esta enzima é acetoacil-CoA redutase); PhaC: PHA sintase; PhaG - (R)-3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R)-específica. PhaC é específica para monômeros na configuração (R). ..... | 48 |
| Figura 2.4 Via metabólica para a utilização de glicerol por <i>R. eutropha</i> . (Tanadchangsang e Yu (2012)). .....  | 55 |
| Figura 3.1 Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 1. ....   | 62 |
| Figura 3.2 Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> DSM 545 em MM contendo vinhaça nas concentrações (v/v) 25% (V1), 50% (V2) e 100% (V3); MM contendo glicose 20 g/L (G) e vinhaça pura (V). ....   | 72 |
| Figura 3.3 Curvas de crescimento de <i>R. eutropha</i> DSM 545 em MM contendo vinhaça nas concentrações (v/v) 25% (V1G), 50% (V2G) e 100% (V3G) com adição de glicose 20 g/L; MM contendo glicose 20 g/L (G) e vinhaça pura (V). .....  | 72 |
| Figura 3.4 (a) Evolução da biomassa total ( $X_t$ ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$ ( $x$ )) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para <i>R. eutropha</i> DSM 545 e (b) Concentração de nitrogênio ( $\square$ ) e de DQO ( $\bullet$ ) ao longo do cultivo em agitador orbital, inicialmente em vinhaça em meio mineral, com pulso de vinhaça (indicado pela seta). .....                      | 75 |
| Figura 3.5 (a) Evolução da biomassa total ( $X_t$ ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$ ( $x$ )) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para <i>R. eutropha</i> DSM 545 e (b) Concentração de nitrogênio ( $\square$ ) e de DQO ( $\bullet$ ) ao longo do cultivo em agitador orbital, inicialmente em vinhaça em meio mineral, com pulso de glicose (indicado pela seta). .....                      | 76 |
| Figura 3.6 Evolução de biomassa total ( $X_t$ ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$ ( $x$ )) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para <i>R. eutropha</i> DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça pura. ....   | 78 |
| Figura 3.7 (a) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\bullet$ ) e (b) Concentração de glicerol ( $\blacklozenge$ ) e de açúcares redutores (ART) ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha</i> DSM 545, em biorreator em vinhaça pura. .   | 78 |

|             |  |     |
|-------------|--|-----|
| Figura 3.8  | Evolução de biomassa total ( $X_t$ (▲)), biomassa residual ( $X_r$ (x)) e P(3HB) (◇) para <i>R. eutropha</i> DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça com adição de fonte de nitrogênio.....   | 80  |
| Figura 3.9  | (a) Concentração de nitrogênio (N (□)) e de DQO (●) e (b) Concentração de glicerol (◆) e de açúcares redutores (ART) (○) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha</i> DSM 545, em biorreator em vinhaça com adição de fonte de nitrogênio. ....   | 80  |
| Figura 3.10 | Evolução de biomassa total ( $X_t$ (▲)), biomassa residual ( $X_r$ (x)) e P(3HB) (◇) para <i>R. eutropha</i> DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça em meio mineral.....   | 81  |
| Figura 3.11 | (a) Concentração de nitrogênio (N (□)) e de DQO (●) e (b) Concentração de glicerol (◆) e de açúcares redutores (ART) (○) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha</i> DSM 545, em biorreator em vinhaça em meio mineral.....  | 82  |
| Figura 4.1  | Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 2. ....   | 86  |
| Figura 4.2  | Representação do Passo 1 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 93  |
| Figura 4.3  | Representação do Passo 2 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 94  |
| Figura 4.4  | Representação do Passo 3 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 94  |
| Figura 4.5  | Representação do Passo 4 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 95  |
| Figura 4.6  | Representação do Passo 5 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 95  |
| Figura 4.7  | Representação do Passo 6 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 96  |
| Figura 4.8  | Ilustração da visão geral sobre o método de “Gibson Assembly”.....   | 97  |
| Figura 4.9  | Representação do Passo 7 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 98  |
| Figura 4.10 | Representação do Passo 8 para a obtenção de <i>R. eutropha</i> recombinante.....   | 100 |
| Figura 4.11 | Biorreator utilizado para realização dos cultivos da Etapa 2 deste trabalho. ....  | 101 |
| Figura 4.12 | Perfil de migração em gel de agarose (1 % - m/v) dos fragmentos obtidos. <b>a-</b> produto de PCR de <i>R. eutropha</i> DSM 545; <b>b-</b> produto de ligação de pk18mobsacB e o gene A2858; <b>c-</b> produto de PCR de <i>E. coli</i> contendo os genes de interesse <i>glpFK</i> ; <b>d-</b> produto de PCR de pk18_A2858_ <i>glpFK</i> . O lado direito das imagens mostra o perfil de |     |

|   |     |
|---|-----|
| migração do controle, com os respectivos tamanhos mostrados em kpb e o lado esquerdo mostra o perfil de migração dos resultados obtidos..   | 104 |
| Figura 4.13 Mapa representativo do plasmídeo pk18-A2858-glpFK, desenvolvido neste trabalho, contendo os genes clonados ( <i>glpF</i> e <i>glpK</i> ), o gene resistência ao antibiótico canamicina ( <i>Km</i> ), os genes estão indicados na figura por setas. Para a criação do mapa foi utilizado o programa <i>SnapGene</i> (Versão 2.8.3 - GSL Biotech LLC). O gene <i>sacB</i> foi modificado para eliminar os locais <i>HindIII</i> e <i>EcoRI</i> na região de codificação..... | 104 |
| Figura 4.14 Crescimento de <i>R. eutropha</i> DSM 545 (lado direito da placa) e <i>R. eutropha_glpFK</i> (lado esquerdo da placa) em meio mineral sólido contendo glicerol como fonte de carbono (10 mg/ml de gentamicina), após 72 h a 30 °C. ....   | 105 |
| Figura 4.15 Curvas de crescimento de <i>R. eutropha_glpFK</i> , em meio mineral contendo 5 g/L de glicerol (○) e 5 g/L de glicose (Δ) e <i>R. eutropha</i> DSM 545 em meio mineral contendo 5 g/L de glicerol (◆) e 5 g/L de glicose (■) expressas em densidade ótica (600 nm) ao longo do cultivo em agitador orbital. ....  | 106 |
| Figura 4.16 Evolução da biomassa total ( $X_t$ (○, ●)), biomassa residual ( $X_r$ (-, x)) e P(3HB) (◇, ◆) de <i>R. eutropha_glpFK</i> , respectivamente para glicerol e glicose como fontes de carbono em biorreator, ao longo do cultivo conduzido em modo batelada.....   | 108 |
| Figura 4.17 Concentração de glicose (Δ) e glicerol (◇) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha_glpFK</i> em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio contendo glicose (25 g/L) e glicerol (25 g/L), como fontes de carbono. ....   | 109 |
| Figura 5.1 Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 3.....  | 112 |
| Figura 5.2 Curvas de crescimento de <i>R. eutropha_glpFK</i> (○) e <i>R. eutropha</i> DSM 545 (◆) em meio mineral com glicerol como fonte de carbono, em agitador orbital, para análise do crescimento da biomassa durante o tempo de pré-cultura. ....   | 116 |
| Figura 5.3 Evolução da biomassa total ( $X_t$ (○, ●)), biomassa residual ( $X_r$ (-, x)), e P(3HB) (◇, ◆), respectivamente, para <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com glicerol como única fonte de carbono. ....   | 117 |
| Figura 5.4 Concentração de glicerol (◇) e concentração de nitrogênio (N (□)) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com glicerol. ....   | 118 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 5.5 Fator de conversão de glicerol em $X_r$ (durante a fase de crescimento) para os cultivos contendo glicerol, para <i>R. eutropha</i> DSM 545 (a) e <i>R. eutropha_glpFK</i> (b). .....   | 119 |
| Figura 5.6 Evolução da biomassa total ( $X_t$ ( $\circ$ , $\bullet$ )), biomassa residual ( $X_r$ ( $--$ , $x$ )), e P(3HB) ( $\diamond$ , $\blacklozenge$ ), respectivamente, para <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com vinhaça. ....  | 120 |
| Figura 5.7 (a) Concentração de glicerol ( $\diamond$ ) e de açúcares redutores (ART ( $\Delta$ )) e (b) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com vinhaça. ....                        | 121 |
| Figura 5.8 Evolução da biomassa total ( $X_t$ ( $\circ$ , $\bullet$ )), biomassa residual ( $X_r$ ( $--$ , $x$ )), e P(3HB) ( $\diamond$ , $\blacklozenge$ ), respectivamente, para <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com vinhaça adicionada de glicerol. ....                           | 122 |
| Figura 5.9 (a) Concentração de glicerol ( $\diamond$ ) e de açúcares redutores (ART ( $\Delta$ )) e (b) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com vinhaça adicionada de glicerol. .... | 124 |
| Figura 5.10 Fator de conversão de glicerol em $X_r$ (durante a fase de crescimento) para os cultivos contendo vinhaça e glicerol para <i>R. eutropha</i> DSM 545 (a) e <i>R. eutropha_glpFK</i> (b). ....  | 125 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 2.1 Propriedades térmicas e mecânicas dos PHAs e polímeros petroquímicos (Adaptado de BRIGHAM et al., 2011). .....  | 43  |
| Tabela 2.2 Composição química da vinhaça de melaço de cana-de-açúcar. ....   | 58  |
| Tabela 2.3 Resumo das principais características de vinhaças geradas a partir de diferentes matérias-primas.....   | 58  |
| Tabela 3.1 Composição química da vinhaça utilizada neste trabalho. .   | 70  |
| Tabela 3.2 Resumos dos dados obtidos nos cultivos em biorreator em modo batelada, com <i>R. eutropha</i> DSM 545 utilizando vinhaça pura, vinhaça com adição de nitrogênio e vinhaça em meio mineral.....                                      | 83  |
| Tabela 4.1 Bactérias e plasmídios utilizados neste trabalho. ....  | 87  |
| Tabela 4.2 <i>Primers</i> utilizados para a clonagem dos genes <i>glpF</i> e <i>glpK</i> de <i>E. coli</i> JM109, em <i>R. eutropha</i> DSM 545 (A parte em itálico da sequência é o local de sobreposição para a reação Gibson Assembly)..... | 89  |
| Tabela 5.1 Resumo dos dados obtidos nos cultivos em biorreator, conduzidos em modo batelada, com <i>R. eutropha_glpFK</i> e <i>R. eutropha</i> DSM 545, utilizando glicerol, vinhaça e vinhaça adicionada de glicerol. ....                    | 126 |





## NOMENCLATURA E ABREVIACÕES

|                   |  |
|-------------------|--|
| 3HV               | 3-hidroxicvalerato   |
| Acil-CoA          | Acil-coenzima A  |
| ART               | Açúcares redutores   |
| ATP               | Adenosina trifosfato   |
| Ca                | Concentração de cálcio total (mg/L)                                  |
| Cam               | Antibiótico canamicina   |
| CoA               | Coenzima A   |
| CoASH             | Coenzima A não ligada a um grupo acil                                |
| Cu                | Concentração de cobre total (mg/L)                                   |
| <i>deoR</i>       | Gene que permite a inserção de grandes plasmídios                    |
| $\Delta lacX74$   | Gene que confere a não deleção do gene <i><math>\beta gal</math></i> |
| DNA               | Ácido desoxirribonucleico  |
| DNS               | Dinitrosalicílico  |
| DO <sub>600</sub> | Densidade óptica a 600 nm  |
| DQO               | Demanda química de oxigênio (mg/L)                                   |
| DBO               | Demanda bioquímica de oxigênio (mg/L)                                |
| ED                | Entner-Doudoroff   |
| EDTA              | Ácido etilenodiamino tetra-acético                                   |
| EMP               | Via <i>Emden Meyerhof Parnas</i>                                     |
| F <sup>-</sup>    | Não possui o plasmídio F   |
| FAD               | Flavina adenina dinucleotídeo (forma oxidada)                        |
| FADH              | Flavina adenina dinucleotídeo (forma reduzida)                       |
| Fe                | Concentração de ferro total (mg/L)                                   |
| G                 | Cultivo com glicose em agitador orbital                              |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <i>galK</i>     | Mutantes que não podem metabolizar galactose e são resistentes a 2-desoxiglucose       |
| <i>galU</i>     | Mutantes que não podem metabolizar galactose   |
| Gen             | Antibiótico gentamicina  |
| GlpD            | Enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase  |
| <i>glpD</i>     | Gene codificando a enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase                             |
| GlpF            | Enzima aquaporina  |
| <i>glpF</i>     | Gene codificando a enzima aquaporina   |
| GlpK            | Enzima glicerol quinase  |
| <i>glpK</i>     | Gene codificando a enzima glicerol quinase   |
| <i>hsdR</i>     | Gene para eficiente transformação de clones de DNA e para amplificação a partir de PCR |
| HPLC            | Cromatografia líquida de alta pressão  |
| K               | Concentração de potássio total (g/L)   |
| <i>lacZAM15</i> | Gene requerido para seleção em placas com XGal   |
| LB              | Meio de cultura <i>Luria Broth</i>   |
| <i>mcl</i> -PHA | Poli(hidroxialcanoato) de cadeia média   |
| Mg              | Concentração de magnésio total (mg/L)  |
| MM              | Meio mineral   |
| Mn              | Concentração de manganês total (mg/L)  |
| N               | Concentração de nitrogênio (mg/L ou g/L)   |
| Na              | Concentração de sódio total (mg/L)   |
| NAD             | Nicotinamida adenina dinucleotídeo   |
| NADP            | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato   |
| NB              | Meio de cultura <i>Nutrient broth</i>  |
| OD              | Oxigênio dissolvido  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Ori                     | Região de origem de replicação de um plasmídio                    |
| PB                      | Pares de bases  |
| Pb                      | Concentração de chumbo total (mg/L)                               |
| PCR                     | <i>Polymerase Chain Reaction</i>                                  |
| PEP                     | Fosfoenolpiruvato   |
| PhaA                    | Enzima $\beta$ -cetotiolase                                       |
| <i>phaA</i>             | Gene codificando para $\beta$ -cetotiolase                        |
| PhaB                    | Enzima NAD(P)H-dependente acetoacetil-CoA-redutase                |
| <i>phaB</i>             | Gene codificando para NAD(P)H-dependente acetoacetil-CoA-redutase |
| PhaC                    | Enzima $\beta$ -cetotiolase                                       |
| <i>phaC</i>             | Gene codificando para $\beta$ -cetotiolase                        |
| PhaJ                    | Enzima enoil-CoA hidratase (R)-específica                         |
| <i>phaJ</i>             | Gene codificando para enoil-CoA hidratase (R)-específica          |
| PhaP                    | Enzima fasina   |
| <i>phaP</i>             | Gene codificando para fasina                                      |
| PhaZ                    | Enzima despolimerase  |
| <i>phaZ</i>             | Gene codificando para despolimerase                               |
| PHA                     | Poli(hidroxiálcanoato)  |
| P(3HB)                  | Poli(3-hidroxiбутирато)   |
| P(3HB- <i>co</i> -4HB)  | Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -4-hidroxiбутирато)             |
| P(3HB- <i>co</i> -3HHx) | Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -3-hidroxihexanoato)            |
| P(3HB- <i>co</i> -3HV)  | Poli(3-hidroxiбутирато- <i>co</i> -3-hidroxi valerato)            |
| P(3HHx)                 | Poli(3-hidroxihexanoato)  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| P(3HO)          | Poli(3-hidroxiocetanoato)   |
| P(3HHx-co-3HO)  | Poli(3-hidroxihexanoato-co-3-hidroxiocetanoato)                                 |
| P(3HP)          | Poli(3-hidroxiopropionato)  |
| P <sub>r</sub>  | Produtividade de P(3HB) (g/L.h)   |
| <i>proA</i>     | Gene que requer prolina   |
| <i>recA</i>     | Gene para redução de ocorrência de recombinações indesejadas em clonagem de DNA |
| RPM             | Rotações por minuto   |
| <i>rpsL</i>     | Mutação que transmite resistência à estreptomicina                              |
| RV1             | Cultivo com vinhaça pura em biorreator  |
| RV2             | Cultivo com vinhaça adicionada de nitrogênio em biorreator                      |
| RV3             | Cultivo com vinhaça adicionada de nitrogênio e sais em biorreator               |
| <i>scl</i> -PHA | Poli(hidroxiálcanoato) de cadeia curta  |
| <i>supE</i>     | <i>glnV</i>   |
| TAE             | Tampão Tris-Acetato-EDTA  |
| <i>thi_1</i>    | Gene que requer tiamina   |
| TSB             | Meio de cultura <i>Tryptic Soy Broth</i>  |
| UV              | Ultra violeta   |
| V               | Cultivo com vinhaça pura em agitador orbital                                    |
| V1              | Cultivo com vinhaça (25%) em agitador orbital                                   |
| V2              | Cultivo com vinhaça (50%) em agitador orbital                                   |
| V3              | Cultivo com vinhaça (100%) em agitador orbital                                  |
| VG              | Cultivo com pulso de glicose em agitador orbital                                |
| VG1             | Cultivo com vinhaça (25%) e glicose em agitador orbital                         |

|             |  |
|-------------|--|
| VG2         | Cultivo com vinhaça (50%) e glicose em agitador orbital          |
| VG3         | Cultivo com vinhaça (100%) e glicose em agitador orbital         |
| VV          | Cultivo com pulso de vinhaça em agitador orbital                 |
| VVM         | Volume de ar por volume de meio por minuto                       |
| XGal        | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo               |
| Xr          | Concentração de biomassa residual (g/L)                          |
| $Y_{X/S}$   | Fator de conversão de substrato em células (g/g)                 |
| Zn          | Concentração de zinco total (mg/L)                               |
| $\mu_{Xr}$  | Velocidade específica de crescimento celular ( $h^{-1}$ )        |
| $\mu_{máx}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular ( $h^{-1}$ ) |



## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO .....   | 36 |
| 1.1 OBJETIVO GERAL .....  | 38 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 38 |
| 1.3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO.....  | 40 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....  | 42 |
| 2.1 POLI(HIDROXIALCANOATOS) .....   | 42 |
| 2.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P(3HB)).....   | 45 |
| 2.3 SÍNTESE DE PHAS .....   | 46 |
| 2.3.1 Principais enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB): $\beta$ -<br>cetotiolase, acetoacetil-CoA redutase e PHA sintase.....                                       | 48 |
| 2.3.2 Outras enzimas envolvidas no metabolismo de P(3HB).....   | 50 |
| 2.4 PRODUÇÃO DE PHAs POR BACTÉRIAS RECOMBINANTES  | 51 |
| 2.5 SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE<br>P(3HB) A PARTIR DE <i>R. eutropha</i> .....   | 53 |
| 2.5.1 Metabolismo do glicerol em <i>R. eutropha</i> .....   | 53 |
| 2.5.2 Vinhaça .....   | 56 |
| 2.5.2.1 Alternativas para o uso da vinhaça.....   | 58 |
| 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 60 |
| 3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES<br>CONCENTRAÇÕES DE VINHAÇA SOBRE O CRESCIMENTO<br>CELULAR E PRODUÇÃO DE P(3HB) POR <i>R. eutropha</i> DSM 545 –<br>ETAPA 1..... | 62 |
| 3.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 1 .....  | 63 |
| 3.1.1 Vinhaça .....   | 63 |
| 3.1.1.1 Determinação da composição da vinhaça .....   | 63 |
| 3.1.1.2 Preparo da vinhaça.....   | 63 |
| 3.1.2 Microrganismo.....  | 63 |
| 3.1.3 Meios e condições de cultivo .....  | 64 |
| 3.1.3.1 Pré-cultura.....  | 64 |



|  |    |
|--|----|
| 3.1.3.2 Estudo do crescimento de <i>R. eutropha</i> DSM 545 em meio contendo vinhaça.....  | 64 |
| 3.1.3.3 Estudo cinético do crescimento e produção de P(3HB) por <i>R. eutropha</i> DSM 545 em meio contendo vinhaça.....                         | 65 |
| 3.1.3.3.1 Cultivos em agitador orbital.....  | 65 |
| 3.1.3.3.2 Cultivos em biorreator.....  | 66 |
| 3.1.4 Determinações analíticas.....  | 67 |
| 3.1.4.1 Amostragem.....  | 67 |
| 3.1.4.2 Determinação da concentração da biomassa.....  | 67 |
| 3.1.4.3 Determinação das concentrações de açúcares redutores, glicerol e nitrogênio.....   | 68 |
| 3.1.4.4 Determinação da concentração de P(3HB).....  | 68 |
| 3.1.4.5 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO).....   | 68 |
| 3.1.5 Tratamento dos dados.....  | 68 |
| 3.1.5.1 Velocidade específica de crescimento celular.....  | 69 |
| 3.1.5.2 Fator de Conversão.....  | 69 |
| 3.1.5.3 Percentual de P(3HB).....  | 69 |
| 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 1.....  | 70 |
| 3.2.1 Caracterização da vinhaça.....   | 70 |
| 3.2.2 Estudo do crescimento de <i>R. eutropha</i> DSM545 em meio contendo vinhaça.....   | 71 |
| 3.2.3 Estudo cinético do crescimento e produção de P(3HB) por <i>R. eutropha</i> DSM 545 em meio contendo vinhaça.....                           | 74 |
| 3.2.3.1 Cultivos em agitador orbital.....  | 74 |
| 3.2.3.2 Cultivos em biorreator.....  | 77 |
| 3.3 CONCLUSÕES – ETAPA 1.....  | 84 |
| 4. CONSTRUÇÃO DA CEPA RECOMBINANTE, COM CAPACIDADE DE ASSIMILAR O GLICEROL DE FORMA MAIS EFICIENTE QUE <i>R. eutropha</i> DSM 545 - ETAPA 2..... | 85 |
| 4.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 2.....  | 87 |
| 4.1.1 Microrganismos e genes.....  | 87 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.1.2 Principais técnicas utilizadas na construção da linhagem recombinante de <i>R. eutropha</i> .....  | 88  |
| 4.1.2.1 <i>Design</i> e preparo da suspensão de <i>primers</i> .....   | 88  |
| 4.1.2.2 Reações de PCR.....  | 89  |
| 4.1.2.3 Análise em gel de agarose.....   | 90  |
| 4.1.2.4 Purificação e confirmação.....   | 90  |
| 4.1.2.5 Digestão e ligação .....   | 90  |
| 4.1.2.6 Transferência de plasmídios pelo método do choque térmico ...  | 92  |
| 4.1.3 Construção da linhagem recombinante de <i>R. eutropha</i> .....  | 93  |
| 4.1.4 Meios e condições de cultivo para estudo do crescimento de <i>R. eutropha_glpFK</i> .....  | 100 |
| 4.1.4.1 Pré-culturas .....   | 100 |
| 4.1.4.2 Cultivos em agitador orbital.....  | 100 |
| 4.1.4.3 Cultivos em biorreator .....   | 100 |
| 4.1.5 Determinações analíticas.....  | 101 |
| 4.1.5.1 Amostragem.....  | 101 |
| 4.1.5.2 Determinação da concentração da biomassa.....  | 101 |
| 4.1.5.3 Determinação das concentrações de glicerol e glicose .....   | 102 |
| 4.1.5.4 Determinação da concentração de P(3HB) .....   | 102 |
| 4.1.6 Tratamento dos dados .....   | 102 |
| 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 2 .....   | 103 |
| 4.2.1 Obtenção da linhagem recombinante de <i>R. eutropha</i> .....  | 103 |
| 4.2.2 Avaliação do crescimento e produção de P(3HB) por <i>R. eutropha_glpFK</i> .....   | 106 |
| 4.3 CONCLUSÕES – ETAPA 2.....  | 111 |
| 5. ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO DESEMPENHO DA <i>R. eutropha</i> RECOMBINANTE COM <i>R. eutropha</i> DSM 545, QUANTO AO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) EM GLICEROL E VINHAÇA – ETAPA 3 ..... | 112 |
| 5.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 3 .....   | 113 |
| 5.1.1 Vinhaça .....  | 113 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 5.1.2   | Microorganismos.....  | 113 |
| 5.1.3   | Meios e condições de cultivo .....  | 113 |
| 5.1.3.1 | Pré-cultura .....   | 113 |
| 5.1.3.2 | Cultivos em biorreator.....   | 113 |
| 5.1.4   | Determinações analíticas.....   | 114 |
| 5.1.4.1 | Amostragem .....  | 114 |
| 5.1.4.2 | Determinação da concentração da biomassa .....  | 114 |
| 5.1.4.3 | Determinação das concentrações de açúcares redutores, glicerol e nitrogênio .....   | 114 |
| 5.1.4.4 | Determinação da concentração de P(3HB).....   | 115 |
| 5.1.4.5 | Determinação da demanda química de oxigênio (DQO).....  | 115 |
| 5.1.5   | Tratamento dos dados.....   | 115 |
| 5.1.5.1 | Produtividade de P(3HB) .....   | 115 |
| 5.2     | RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 3.....   | 116 |
| 5.2.1   | Cultivos em glicerol .....  | 116 |
| 5.2.2   | Cultivos em vinhaça.....  | 119 |
| 5.2.3   | Cultivos em vinhaça adicionada de glicerol.....   | 122 |
| 5.2.4   | Resumo comparativo dos cultivos em biorreator, com <i>R. eutropha</i> DSM 545 e <i>R. eutropha_glpFK</i> , utilizando glicerol, vinhaça e vinhaça adicionada de glicerol..... | 126 |
| 5.3     | CONCLUSÕES – ETAPA 3.....   | 128 |
| 6.      | CONCLUSÕES FINAIS .....   | 129 |
| 7.      | PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....   | 130 |
| 8.      | REFERÊNCIAS .....   | 131 |
|         | APÊNDICE I.....   | 147 |
|         | APÊNDICE II .....   | 149 |

## 1. INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da preocupação acerca da diminuição dos recursos naturais e da questão ambiental relacionada à utilização e descarte de materiais de origem petroquímica, os biopolímeros biodegradáveis, produzidos a partir de fontes renováveis, como os poli(hidroxicarboxilatos) (PHAs), polissacarídeos, polilactatos, poli( $\epsilon$ -caprolactona), poliésteres alifáticos, poli( $p$ -dioxanona), poli(óxido etileno), poli(sucianato butileno) e blendas ou copolímeros destes, têm ganhado atenção como alternativa aos plásticos convencionais (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010; MUMTAZ et al., 2010; OJUMU; YU; SOLOMON, 2004)

Dentre os biopolímeros, os PHAs são amplamente estudados, pois são biocompatíveis, em razão de não produzirem efeitos sobre os tecidos biológicos, e biodegradáveis, sendo o mais conhecido o poli(3-hidroxiбутирато) (P(3HB)). Estes polímeros são poliésteres microbianos, produzidos por um grande número de microrganismos, como reserva de carbono e energia.

Pesquisas tanto na área acadêmica quanto na indústria, têm tido como objetivo o desenvolvimento de processos eficientes de produção de PHA, em plantas piloto ou em escala industrial. Mas o custo desses biopolímeros ainda é alto, quando comparado aos plásticos de origem petroquímica. Em muitos desses casos, *Ralstonia eutropha*, o microrganismo mais estudado para biossíntese de PHAs, ou linhagens de *Escherichia coli* recombinantes são utilizados (BRIGHAM et al., 2011).

A escolha do microrganismo a ser utilizado na produção de PHAs depende de vários fatores, tais como: a habilidade da célula em utilizar fontes de carbono de baixo custo (atenção vem sendo dada aos subprodutos industriais), baixo custo dos demais constituintes do meio, elevadas velocidades de crescimento e de produção de polímero, a qualidade e a quantidade de PHA sintetizado, assim como dos processos de recuperação do produto (LEE; CHOI; WONG, 1999). Dentre os mais de 300 diferentes microrganismos capazes de sintetizar PHAs (HAZER; STEINBUCHER, 2007; STEINBUCHER; STEINBUCHER, 1995), destaca-se a bactéria *R. eutropha* por produzir elevados percentuais de PHAs, por apresentar alta velocidade de conversão do substrato em células e ser capaz de utilizar fontes renováveis de carbono, além de poder acumular até 80% de sua massa seca em polímero (LYND, 1996; SUDESH; ABE; DOI, 2000).

Um dos maiores desafios para a produção de PHAs é a redução dos custos de produção. O custo biopolímeros é 2,5 – 7,5 vezes maior que os

sintéticos à base de petróleo. Há alguns anos atrás, entretanto, esta diferença era de ordem de grandeza ainda maior (VOLOVA et al., 2013).

Uma das possibilidades de redução desses custos é a utilização de substratos de baixo custo, que pode representar cerca de 40% de economia no processo de produção de PHAs (DU et al., 2012; THIRUMALA; VISHNUVARDHAN REDDY; MAHMOOD, 2009). Ganhos de escala de produção, rotas tecnológicas otimizadas e a intensificação do uso de fontes renováveis de matérias-primas e energia de baixo custo também têm atraído a atenção no desenvolvimento dos biopolímeros.

Durante o processo de destilação do etanol, o corpo de fundo da coluna recebe o nome de vinhaça. A vinhaça representa a principal água residuária do setor sucroenergético, uma vez que é produzida na proporção de aproximadamente 12 litros para cada litro de etanol, pelos processos convencionais de fermentação utilizados no Brasil (UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar). A valorização da vinhaça, pelo desenvolvimento de um processo que utilize este resíduo como substrato para um produto com valor agregado, como os PHAs, contribui com um valor adicional à produção de etanol.

A vinhaça é um substrato com potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos. Informações presentes na literatura indicam que os principais componentes orgânicos presentes na vinhaça de cana-de-açúcar são o glicerol, ácido láctico, etanol e ácido acético (PARNAUDEAU et al., 2008). Porém há relatos de inibição no crescimento de microrganismos ao utilizarem este subproduto como substrato (BHATTACHARYYA et al., 2012).

Embora diversificada, a concentração de carbono na vinhaça é considerada baixa para alguns processos como o de produção de PHAs. Desta forma, a associação de substratos à vinhaça parece ser uma alternativa que permitiria a sua utilização em vários processos biotecnológicos. O glicerol, além de ser um dos principais componentes da vinhaça, é também um importante subproduto da produção de biodiesel. Para cada 1 kg de biodiesel produzido, são obtidos aproximadamente 0,1 kg de glicerol (THOMPSON; HE, 2006). O aumento da produção de biodiesel tem resultado em excessos de glicerol com significativa parcela na diminuição do custo do glicerol bruto. A utilização desse glicerol pode servir como matéria-prima para processos fermentativos incluindo a produção de butanol, ácido propiônico e P(3HB), entre outros (CAVALHEIRO et al., 2009; DOBSON; GRAY; RUMBOLD, 2012).

*R. eutropha* é capaz de assimilar glicerol de forma muito lenta quando comparada a outros substratos como a glicose, por exemplo. O

metabolismo aeróbio do glicerol tem sido muito bem estudado em *Escherichia coli* (DURNIN et al., 2009). Nesta bactéria, o transporte do glicerol para o interior da célula é realizado por uma aquaporina (GlpF), sendo então fosforilado pela glicerol quinase (GlpK) a glicerol 3-fosfato, que é oxidada pela FAD-dependente glicerol 3-fosfato desidrogenase (GlpD) a dihidroxiacetona fosfato para em seguida ser metabolizada através da glicólise (WEISSENBORN; WITTEKINDTN; LARSONSII, 1992).

O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante introduziu uma nova dimensão à manipulação das vias metabólicas, oferecendo a capacidade de modificação de reações enzimáticas específicas, para criar ou melhorar o metabolismo celular (KOFFAS; JUNG; STEPHANOPOULOS, 2003). Grande parte do foco da biologia molecular com *R. eutropha* é a otimização em rendimentos e produtividades de compostos que o organismo pode sintetizar; direções futuras incluem a otimização e utilização/conversão de diferentes fontes de carbono para a síntese de produtos com maior valor agregado.

Neste contexto, o projeto “Produção de biopolímero a partir de vinhaça utilizando *Ralstonia eutropha* geneticamente modificada” foi aprovado na chamada de cooperação entre o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) e estabeleceu a parceria entre o grupo de pesquisa do Professor Anthony Sinskey, do MIT, que vem desenvolvendo ferramentas genéticas para a manipulação de *R. eutropha*, e o grupo da UFSC, coordenado pela Professora Gláucia M. F. Aragão, que possui experiência na produção e extração de PHAs. O presente trabalho fez parte desta parceria, sendo que uma parte da tese foi desenvolvida na UFSC e outra no MIT.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a utilização de vinhaça e de glicerol, subprodutos da indústria de biocombustíveis, como substratos para o crescimento celular e para a produção de Poli(3-hidroxi butirato), com *Ralstonia eutropha*.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Verificar a capacidade de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça e estudar a influência de diferentes concentrações de vinhaça sobre o crescimento celular e a produção de P(3HB), por esta bactéria;

b) Construir uma cepa recombinante, a partir de *R. eutropha* DSM 545, com capacidade de assimilar de forma eficiente os componentes presentes na vinhaça;

c) Realizar o estudo cinético para comparar o desempenho da *R. eutropha* recombinante com *R. eutropha* DSM 545, quanto ao seu crescimento e à produção de P(3HB), em vinhaça.

### 1.3 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

#### **Aproveitamento de subprodutos da indústria de biocombustíveis para produção de Poli(3-hidroxiбутирато) por *Ralstonia eutropha***

##### **Por que? Para que?**

- *R. eutropha* é capaz de metabolizar diversas fontes de carbono e é um excelente microrganismo para a produção de compostos com valor agregado, como os PHAs;
- A vinhaça é um subproduto produzido em grandes volumes no Brasil e pode ser utilizada como substrato por microrganismos;
- Técnicas de biologia molecular são amplamente exploradas para a introdução de novas rotas metabólicas em microrganismos, bem como para o aprimoramento dessas rotas sob condições específicas de crescimento ou com a finalidade de produzir algum composto em particular.

##### **Quem já fez?**

- Até o momento, não existem relatos na literatura desta bactéria utilizando vinhaça, um resíduo abundante e de baixo custo, como substrato;
- Fukui e colaboradores (2014) investigaram a expressão de genes responsáveis pelo consumo de glicerol, uma das principais fontes de carbono presentes na vinhaça, em *R. eutropha* H16 e concluíram que a inserção dos genes *glpF* e *glpK* de *E. coli* foram suficientes para melhor assimilação de glicerol e também para mais eficiente produção de P(3HB), a partir deste substrato.

##### **Hipóteses**

- A utilização de vinhaça pode ser viável para a produção de P(3HB) a partir da bactéria *R. eutropha*, porém o desempenho deste microrganismo em vinhaça pode ser aprimorado, uma vez que este subproduto possui baixas concentrações de carbono e seu principal componente, o glicerol, é consumido muito lentamente por *R. eutropha*.

##### **Metodologia**

- Avaliar o comportamento *R. eutropha* DSM 545 em diferentes diluições de vinhaça e realizar o estudo cinético de seu crescimento e produção de P(3HB);
- Com o emprego de técnicas de biologia molecular, expressar os genes responsáveis por melhorar o consumo de componentes da vinhaça em *R. eutropha* DSM 545;



- Comparar o desempenho de *R. eutropha* DSM 545 e da recombinante (construída neste trabalho), quanto ao crescimento e produção de P(3HB), em meio de cultivo contendo glicerol, vinhaça e vinhaça e glicerol associados.

### **Respostas**

- Crescimento de *R. eutropha* e capacidade de produzir P(3HB) sem que haja inibição pelos componentes presentes na vinhaça;

- Obtenção de uma cepa recombinante de *R. eutropha* com melhor capacidade e eficiência no consumo de componentes presentes na vinhaça, quando comparada à cepa parental;

- Melhor desempenho tanto em vinhaça, glicerol, como nos dois associados da cepa recombinante, quando comparado à cepa parental.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo aborda a definição e as características do subproduto utilizado neste trabalho, a vinhaça. Os aspectos gerais e propriedades dos PHAs, com ênfase na biossíntese do P(3HB) por *R. eutropha* também são apresentados. O emprego de microrganismos recombinantes e a utilização de substratos alternativos para produção de P(3HB), como o glicerol, são também abordados.

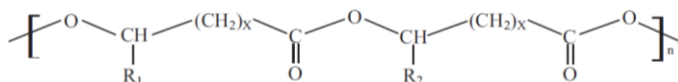
### 2.1 POLI(HIDROXIALCANOATOS)

Os PHAs são sintetizados intracelularmente como inclusões citoplasmáticas insolúveis de reserva de carbono e energia. Estes materiais poliméricos podem ser estocados em elevadas concentrações no interior das células uma vez que não alteram substancialmente o estado osmótico das mesmas (ANDERSON; DAWES, 1990). São termoplásticos biocompatíveis, enantiomericamente puros, não tóxicos, insolúveis em água, inertes, estáveis no ar e possuem elevada diversidade estrutural (RAI et al., 2011; REDDY et al., 2003). Além disso, são completamente biodegradáveis (LAYCOCK et al., 2012), sendo este um aspecto de muita importância em termos ambientais.

Com base no número de átomos de carbono nas unidades monoméricas, PHAs podem ser classificados em dois grupos principais. O primeiro grupo são os PHAs de monômeros de cadeia curta “*short-chain-length*” (*scl*), ou seja, aqueles que possuem cadeia carbônica constituída de 3 a 5 átomos de carbono ( $C_3 - C_5$ ) produzidos por bactérias como *Alcaligenes latus* e *R. eutropha* (também conhecida como *Wautersia eutropha* e *Cupriavidus necator*) (VANDAMME; COENYE, 2004). Exemplos dessa classe incluem P(3HB) e P(4HB). Por outro lado, PHAs constituídos de 6 a 14 átomos de carbono ( $C_6 - C_{14}$ ) de cadeia média “*medium-chain-length*” (*mcl*), são acumulados por bactérias como *Aeromonas caviae* e *Pseudomonas putida* (LAYCOCK et al., 2012). Exemplos incluem os homopolímeros poli(3-hidroxihexanoato) (P(3HHx)) e poli(3-hidroxioctanoato) (P(3HO)). Existem também os copolímeros de PHAs de cadeia curta: poli(3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato) (P(3HB-*co*-4HB)), poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato) (P(3HB-*co*-3HV)); de cadeia média: poli(3-hidroxihexanoato-*co*-3-hidroxioctanoato) (P(3HHx-*co*-3HO)), e de cadeia curta e média compostos por ambos os monômeros (*scl* e *mcl*): poli(3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato) (P(3HB-*co*-3HHx)) (AKARAONYE; KESHAVARZ; ROY, 2010).

A estrutura básica desses polímeros está representada na Figura 2.1. O número de átomos de carbono que compõe o grupo funcional  $R$  e o valor de  $n$ , representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero que podem variar de 100 a 30.000, dão origem às diferentes unidades monoméricas que constituem a estrutura dos PHAs (MADISON; HUISMAN, 1999).

Figura 2.1 Estrutura química geral dos poli(hidroxicanoatos): ( $R_1/R_2$ ) são os grupamentos alquila, podendo variar de C1 a C13;  $n$  pode variar de 100 – 30.000 e  $x$  de 1 a 4 (LEONG et al., 2014).



Diversos tipos de PHAs possuem algumas propriedades térmicas e mecânicas que se assemelham aos polímeros à base de petróleo. Um resumo das propriedades de alguns PHAs é mostrado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 Propriedades térmicas e mecânicas dos PHAs e polímeros petroquímicos (Adaptado de BRIGHAM et al., 2011).

| Polímero                                | T de fusão cristalina (°C) | T de transição vítrea (°C) | Elasticidade (GPa) | Resistência à tração (MPa) | Along. à ruptura (%) |
|---|----------------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|----------------------|
| P(3HB)                                  | 177                        | 4                          | 3,5                | 43                         | 5                    |
| P(HB-<br><i>co</i> -<br>10 mol%<br>HHx) | 127                        | -1                         | nd <sup>a</sup>    | 21                         | 400                  |
| P(HB-<br><i>co</i> -<br>12 mol%<br>HHx) | 103                        | -2                         | 0.5                | 10                         | 130                  |
| P(HB-<br><i>co</i> -<br>15 mol%<br>HHx) | 115                        | 0                          | nd <sup>a</sup>    | 23                         | 760                  |
| P(4HB)                                  | 53                         | -48                        | 0,15               | 104                        | 1000                 |

|                   |     |     |                 |                 |                 |
|-------------------|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|
| P(3HB-co-12% 4HB) | 124 | -4  | 0,54            | 25              | 630             |
| Polipropileno     | 176 | -10 | 1,7             | 38              | 400             |
| Poliestireno      | 240 | 100 | nd <sup>a</sup> | nd <sup>a</sup> | nd <sup>a</sup> |
| LDPE <sup>b</sup> | 130 | -30 | 0,2             | 10              | 620             |

<sup>a</sup>nd = não determinado no estudo indicado

<sup>b</sup>Polietileno de baixa densidade

Em função dessas propriedades, os PHAs têm elevado potencial em aplicações na área médica, como por exemplo, ortopedia, dispositivos de sistema cardiovascular, suturas, nano e microsferas para liberação controlada de medicamentos, entre outros (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009; KESHAVARZ; ROY, 2010). Geralmente, a massa molar dos PHAs está entre  $2.10^5 - 3.10^6$  Da, dependendo do microrganismo utilizado, da composição do substrato, condições de cultivo e das técnicas de *downstream* aplicadas (RAI et al., 2011).

Talvez uma das maiores vantagens que os PHAs possuem sobre os demais polímeros biodegradáveis é a habilidade de serem degradados sob condições aeróbias e anaeróbias. Eles também podem ser degradados termicamente ou por hidrólise enzimática (GOGOLEWSKI et al., 1990).

Estes biopolímeros podem ser produzidos a partir de uma ampla variedade de substratos, a citar: fontes renováveis (sacarose, amido, celulose, triacilgliceróis), fontes fósseis (metano, óleo mineral), bioprodutos (melaço, soro de leite, glicerol), químicos (ácido propiônico, ácido 4-hidroxibutírico) e dióxido de carbono (REDDY et al., 2003). Embora eles venham sendo reconhecidos como possíveis candidatos para competir, em algumas aplicações, com os plásticos convencionais, o elevado custo de produção tem limitado seu uso em uma grande variedade de aplicações (VERLINDEN et al., 2007). Segundo Choi e Lee (1997), 40 a 48% do custo total da produção desses biopolímeros é proveniente da matéria-prima utilizada, e a fonte de carbono pode representar 40 a 80% do total dos custos com substratos. Por isso, é importante o desenvolvimento de um processo de produção baseado em fontes de carbono de baixo custo, como os resíduos.

Mesmo alguns biopolímeros possuindo características ambientais preferíveis aos polímeros convencionais, muito ainda precisa ser feito para redução dos custos. Em apenas algumas específicas aplicações, como em biomedicina, os relativamente elevados custos dos biopolímeros

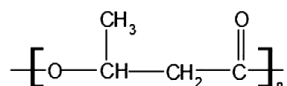
não impedem o crescimento do mercado. Estes obstáculos técnicos e econômicos, bem como a sua natureza interdisciplinar do campo dos biopolímeros, são desafios para pesquisadores, administradores públicos e indústrias (RAI et al., 2011).

Os PHAs mais comuns e mais amplamente estudados são o P(3HB) e o seu copolímero P(3HB-co-3HV), estes possuem algumas propriedades mecânicas comparáveis às do polipropileno e polietileno, embora sejam menos resistentes ao alongamento e mais quebradiços.

## 2.2 POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (P(3HB))

O Poli(3-hidroxiбутирато) é o mais simples e comum membro da família dos PHAs, primeiramente descoberto por Lemoigne (1926). É um homopolímero composto por unidades monoméricas de quatro átomos de carbono, sendo um poliéster natural e biodegradável, sintetizado e acumulado no interior de diferentes bactérias como grânulos intracelulares (inclusões insolúveis em água), com diâmetro de 100 a 800 nm (AKIYAMA; TSUGE; DOI, 2003; ANDERSON; DAWES, 1990; BRAUNEGG; LEFEBVRE; GENSER, 1998), o qual pode ser obtido dentro de uma ampla faixa de massa molar, podendo variar de 200 a 20.000 kDa (SUDESH; ABE; DOI, 2000). Como é sintetizado por uma ampla gama de bactérias na natureza, várias estratégias de cultivo têm sido estudadas para sua produção (HIROE et al., 2012). A estrutura química do P(3HB) está apresentada na Figura 2.2.

Figura 2.2 Estrutura química do poli(3-hidroxiбутирато). O  $n$  representa o número de monômeros presentes na estrutura do polímero.



O P(3HB) é um polímero semi cristalino, caracterizado por cristalização polimórfica, capacidade de cristalizar em duas formas,  $\alpha$  e  $\beta$ . A forma  $\alpha$  consiste em cristais laminados, sendo a conformação mais comum dos cristais de P(3HB) e a forma  $\beta$ , caracterizada como uma conformação “zig-zag” plana, que vem sendo reportada em filmes e fibras com alta resistência à tração (PAN; INOUE, 2009).

As propriedades termoplásticas e de cristalização do P(3HB) são dependentes de sua massa molar. P(3HB) de baixa massa molar ( $< 1.10^3$  kDa) são caracterizados por elevada fragilidade (HONG; HSU;

YE, 2012). Este comportamento vem sendo explicado como resultado de sua cristalização na forma  $\alpha$  (KABE et al., 2012); entretanto, um aumento na massa molar possibilita a obtenção de um polímero com melhores propriedades mecânicas, promovendo cristalização na forma  $\beta$ .

Este PHA foi o primeiro a ser utilizado para a fabricação de materiais compostos principalmente devido à sua disponibilidade comercial e suas propriedades mecânicas, químicas e de degradabilidade, além de possuir algumas propriedades desejáveis como: insolubilidade em água, resistência à umidade, pureza ótica e boa impermeabilidade ao oxigênio (WILLIAMS et al., 1999). No entanto, ainda apresentam algumas características que reduzem suas aplicações, tais como: alto custo de produção, elevada cristalinidade e rigidez. Isto torna seu processamento de moldagem por injeção um desafio devido à baixa estabilidade térmica (LEONG et al., 2014). Para contornar esse aspecto, destaca-se a mistura física de polímeros denominada de blenda, que possibilita a obtenção de polímeros com propriedades físicas melhoradas e com custo de produção mais baixo (BELTRAMI; SCIENZA; ZATTERA, 2014).

### 2.3 SÍNTESE DE PHAS

A capacidade de sintetizar PHAs como um material de reserva de energia é difundida entre os organismos procariotos. As bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (mais de 300 espécies) que podem acumular PHAs como inclusões intracelulares são dos gêneros *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Enterobacter* e *Rhodobacter* bem como algumas cianobactérias e organismos halofílicos (GUMEL; ANNUAR; CHISTI, 2013; RAI et al., 2011).

O acúmulo de PHAs, na forma de grânulos, no citoplasma desses gêneros de bactérias, geralmente ocorre quando há excesso da fonte carbono e limitação de algum nutriente essencial à multiplicação celular (como nitrogênio, magnésio, fósforo ou oxigênio) e, assim, a síntese ocorre em duas etapas. Durante a primeira etapa, as células são supridas com todos os nutrientes necessários, para favorecer ao máximo o crescimento celular. Enquanto, na segunda etapa, uma limitação nutricional que não a fonte de carbono é aplicada para induzir à produção mais acentuada de PHAs nas células. De outro lado, *A. latus*, *Azotobacter vinelandii* e *Escherichia coli* recombinante não requerem a limitação nutricional, ou dois estágios de produção, uma vez que a produção de biopolímero é associada ao crescimento. Desses grupos os

microrganismos mais amplamente estudados são *R. eutropha* e *A. latus* (HAHN; CHANG; LEE, 1995).

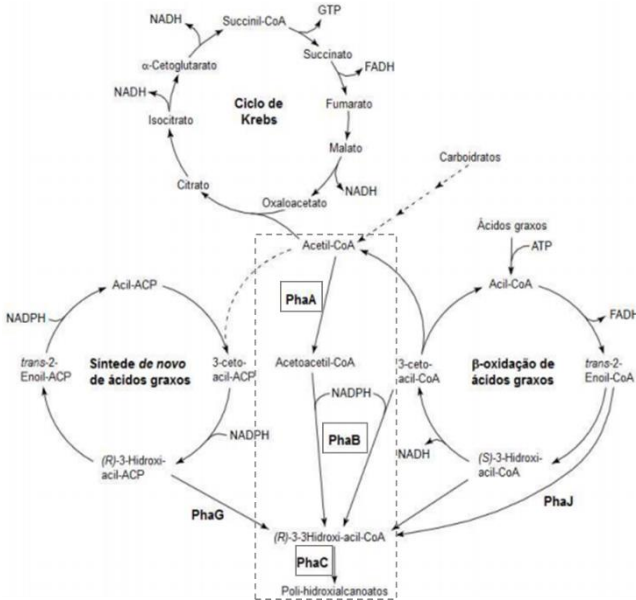
A linhagem selvagem de *R. eutropha* H16 é um dos microrganismos mais estudados, pois pode crescer e utilizar, frutose, gluconato e diferentes ácidos graxos como fonte de carbono, porém não é capaz de metabolizar glicose. Há muitos estudos com esta cepa, com foco na bioquímica e em biologia molecular para a síntese de PHAs, uma vez que, todo o genoma de *R. eutropha* H16 foi sequenciado (POHLMANN et al., 2006). Diversos mutantes (por indução UV ou espontâneos) capazes de utilizar glicose foram obtidos a partir de linhagens selvagens de *R. eutropha* H16, incluindo a *R. eutropha* DSM 545 (ORITA et al., 2012).

*R. eutropha* DSM 545 é uma bactéria representante dos produtores de PHAs que também é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, incluindo CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>, frutose, glicose, glicerol, óleos vegetais e ácido levulínico para o crescimento celular e síntese de biopolímeros (BUDDE et al., 2011; CAVALHEIRO et al., 2009; KIM et al., 1994; TANADCHANGSAENG; YU, 2012; WANG et al., 2010). A limitação nutricional no meio de crescimento induz a produção de P(3HB), dentre as diversas condições de limitação nutricional incluindo N, P, Mg e S, a limitação em nitrogênio é uma estratégia bastante utilizada (WANG; LEE; WANG, 1997).

O metabolismo para a produção de biomassa durante crescimento balanceado em *R. eutropha* cataboliza carboidratos pela via Entner-Doudoroff (ED) a piruvato, que pode ser convertido a acetil-CoA por desidrogenação. Durante o crescimento celular, o acetil-CoA entra no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), liberando CoASH e é oxidado a CO<sub>2</sub> gerando energia na forma de ATP e precursores biossintéticos. Após a limitação nutricional, a síntese de proteínas cessa, levando a elevadas concentrações de NADH e NADPH resultando assim, na redução do ciclo TCA e consequente direcionamento do acetil-CoA à via de biossíntese mais acentuada de P(3HB) (IENCZAK et al., 2011).

A composição monomérica do biopolímero depende da linhagem hospedeira da PHAsintase e do precursor de hidroxiacil-CoA tioéster fornecido para a enzima. As vias biossintéticas para a formação dos monômeros de PHAs competem com e/ou dependem com vias importantes, como o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), degradação de ácidos graxos ( $\beta$ -oxidação) e precursores da síntese de ácidos graxos e metabólitos envolvidos como acetil CoA e co-fatores como NADPH (Figura 2.3) (ALDOR; KEASLING, 2003).

Figura 2.3 Biossíntese microbiana de PHAs (Figura adaptada de Aldor e Keasling, 2003). Onde PhaA:  $\beta$ -cetotiolase; PhaB: 3-cetoacil-CoA redutase (para biossíntese de P(3HB) esta enzima é acetoacil-CoA redutase); PhaC: PHA sintase; PhaG - (R)-3-hidroxiacil-CoA:ACP transacilase; PhaJ – enoil-CoA hidratase (R)-específica. PhaC é específica para monômeros na configuração (R).



O acúmulo de PHA é controlado por genes que codificam uma variedade de enzimas que são direta ou indiretamente envolvidas com a síntese desses polímeros (MADISON; HUISMAN, 1999; REHM, 2010). A via mais estudada e utilizada pelo microrganismo *R. eutropha* (indicada na Figura 2.3 com contorno em linha tracejada) envolve três enzimas chave e que estão indicadas na Figura 2.3 com contorno quadricular:  $\beta$ -cetotiolase (NADPH-dependente), acetoacil-CoA redutase e PHA sintase, codificadas pelos genes *phaA*, *phaB* e *phaC*, respectivamente. Estes três genes são encontrados juntos em um operon cuja expressão é relativamente constante durante de produção de PHA (PEOPLES; SINSKEY, 1989; YORK et al., 2003).

### 2.3.1 Principais enzimas envolvidas na biossíntese de P(3HB): $\beta$ -cetotiolase, acetoacil-CoA redutase e PHA sintase

A enzima  $\beta$ -cetotiolase (codificada pelo gene *phaA*), desempenha papel fundamental no acionamento da síntese de polímero, pois alta



concentração celular de CoA e acetil-CoA, inibem e ativam respectivamente, a reação catalisada pela  $\beta$ -cetotiolase em organismos produtores de PHAs. (SLATER et al., 1998). Em *R. eutropha*, a enzima  $\beta$ -cetotiolase ocorre de duas formas diferentes, chamadas A e B, que possuem diferentes especificidades pelo substrato. A enzima do tipo A somente é ativada com C<sub>4</sub> e C<sub>5</sub>, e o espectro de substrato da enzima B é maior, pois esta é ativada com substratos de C<sub>4</sub> a C<sub>10</sub>. A enzima A parece ser a principal enzima envolvida na via de síntese de P(3HB), enquanto a enzima B possui função catabólica no metabolismo de ácidos graxos. (HAYWOOD; ANDERSON; DAWES, 1989).

A segunda reação é uma redução do acetoacetil-CoA a hidroxibutiril-CoA, catalisada pela acetoacetil-CoA redutase (codificada pelo gene *phbB*), a velocidade de síntese de PHA é determinada por esta enzima, cuja atividade é regulada por NADPH ou uma grande razão NADPH/NADP (LYND, 1996) e em seguida, hidroxibutiril-CoA é então convertido pela PHA sintase a P(3HB) (REHM; STEINBÜCHEL, 2002).

E por fim, as PHAs sintases são as enzimas-chave para a biossíntese de P(3HB). Elas usam coenzima A (CoA) e tioésteres de ácidos hidroxialcanóicos (HA) como substratos e catalisam a polimerização dos HAs, com a concomitante liberação de CoA.

Esta enzima (codificada pelo gene *phbC*) em *R. eutropha* reage com uma gama de substratos, com comprimento de cadeia de C<sub>3</sub> – C<sub>5</sub>, com preferência para substratos com C<sub>4</sub>. Além do P(3HB), bactérias também podem sintetizar uma ampla variedade de PHAs. PHAs com monômeros diferentes de C<sub>3</sub> a C<sub>5</sub> vêm sendo produzidos em diferentes bactérias, incluindo *R. eutropha* através de alterações no tipo e relativa quantidade da fonte de carbono presente no meio, bem como a utilização de técnicas de biologia molecular (DIAS et al., 2006; STEINBÜCHEL; SCHLEGEL, 1991).

Ao menos 88 PHA sintases já foram sequenciadas, com quatro classes principais identificadas (REHM, 2003). A classe I utiliza ácidos graxos com 3 a 5 átomos de carbono; a classe II usa aqueles com 6 a 14 átomos de carbono, a classe III e IV sintetizam scl-PHA. Na classe II é associada à utilização de ácidos graxos por microrganismos e pode ser utilizada para a síntese de *mcl*-PHA. A via metabólica III envolve 3-hidroxiacil-ACP-CoA transferase (codificada por *phaG*) e manonil-CoA-ACP transacilase (FabD); os substratos são convertidos a 3-hidroxiacil-ACP que podem então formar 3-hidroxiacil-CoA e depois PHA. A via metabólica IV utiliza NADPH-dependente acetoacetil-CoA redutase para oxidar (S)-(+)-3-hidroxibutiril-CoA.

A síntese *in vivo* de PHA inicia tão logo quanto o substrato, os tioésteres de 3-hidroxiacil-CoA são fornecidos intracelularmente. A PHA sintase é constitutivamente produzida, embora em menores níveis e dependendo da disponibilidade de substrato, inicia-se a catálise de um poliéster de massa molar elevada ( $n > 1000$ ). Essas pequenas inclusões insolúveis em água são formadas com um núcleo de poliéster amorfo e a PHA sintase covalentemente ligada à superfície (GERNGROSS et al., 1994). Estes grânulos de PHA aumentam o tamanho, enquanto a PHA sintase ligada continuamente incorpora os precursores a partir do citoplasma para a cadeia crescente de poliéster. Os grânulos de PHA são envolvidos por uma membrana fosfolipídica composta por proteínas associadas que consistem as PHA sintases (GERNGROSS et al., 1994), as PHA despolimerase (GAO et al., 2001), proteínas fasinas (YORK; STUBBE; SINSKEY, 2002), proteínas específicas de regulação (PÖTTER et al., 2002).

### **2.3.2 Outras enzimas envolvidas no metabolismo de P(3HB)**

Proteínas associadas aos grânulos de P(3HB) podem ser divididas em quatro grupos (PÖTTER; MÜLLER; STEINBÜCHEL, 2005): as PHA sintases, PHA despolimerases, proteínas de regulação como a PhaR, fator de transcrição que negativamente regula a expressão das fasinas e as fasinas (PhaP).

A formação do polímero é um processo complexo determinado não somente pelas enzimas envolvidas na via sintética do PHA, mas também por outros importantes aspectos do metabolismo do polímero. Já foi demonstrado que as fasinas são proteínas especificamente ligadas aos grânulos do polímero, afetam a síntese de PHA e o tamanho dos grânulos (PÖTTER et al., 2002).

As fasinas são as proteínas mais abundantes na superfície do grânulo. Três mecanismos diferentes para as funções das fasinas na síntese de PHAs já foram sugeridos. O primeiro, que as fasinas podem melhorar a produção de PHA vinculadas aos grânulos, aumentando a superfície/volume dos mesmos. Um outro mecanismo indica que as fasinas podem ativar a velocidade de síntese dos PHAs pela interação direta com a PHA sintase. E o terceiro sugere que fasinas podem promover a síntese de PHA indiretamente, através da prevenção de defeitos de formação associados com outras proteínas celulares (WIECZOREK et al., 1995). Na ausência das fasinas, as células acumulam apenas um grande grânulo, ocupando todo espaço disponível na célula.

As enzimas da despolimerização do ciclo do PHAs também desenvolvem um papel importante na produção de PHAs, pois elas regulam tanto a massa molar como o rendimento final. Existe uma evidência indireta de que a síntese e a degradação de PHA são sincronizadas (TAIDI; MANSFIELD; ANDERSON, 1995). Os resultados de várias medidas diretas da atividade em células contradizem esses dados pois a atividade da PHA despolimerase não é expressa durante o acúmulo ativo do polímero. Entretanto, essa aumenta quando uma célula rica em polímero é exposta em condições que facilitem a mobilização de PHA. A degradação intracelular consiste na degradação enzimática do polímero em monômeros, que então são convertidos pela D-hidroxitubirato dehidrogenase (HB dehidrogenase) a acetoacetato. Como resultado da reação de dehidrogenação, este último é transferido a CoA, que nesta forma serve como substrato para a cetotiolase, que o converte a acetil-CoA (SAEGUSA; SHIRAKI; KANAI, 2001).

## 2.4 PRODUÇÃO DE PHAS POR BACTÉRIAS RECOMBINANTES

Com a utilização de técnicas de engenharia metabólica, esforços multidisciplinares têm-se voltado para o desenvolvimento de organismos com metabolismos para fins específicos. Neste contexto, muitas bactérias estão sendo desenvolvidas para aumentar a capacidade de sintetizar PHAs, ampliar a gama de substratos utilizáveis e também para produzir novos tipos de PHAs, para isto, tanto genes homólogos quanto heterólogos das enzimas da biossíntese de PHAs vêm sendo estudados em diferentes organismos. As bactérias mais comumente usadas como hospedeiras para a produção de PHAs e no desenvolvimento de estratégias de cultivo são *R. eutropha*, *P. putida*, *P. oleovorans* e *E. coli* (ALDOR; KEASLING, 2003; REDDY et al., 2003).

Dos microrganismos conhecidos e mais estudados produtores de PHAs, *R. eutropha*, bactéria naturalmente produtora, possui vantagens para a produção eficiente desses biopolímeros, pois pode sintetizar PHAs a partir de fontes de carbono de baixo custo, açúcares e óleos vegetais e sua produção por cepas recombinantes é estável e ainda pode ser utilizada para cultivos de alta densidade celular. A clonagem de genes associados à biossíntese de PHAs, em particular de PHA sintases, tem aberto a possibilidade de construção de linhagens recombinantes capazes de sintetizar PHAs ainda não detectados em linhagens naturalmente produtoras.

Genes de espécies de *Aeromonas* têm sido utilizados na construção de recombinantes, geralmente de *R. eutropha*. O uso de óleos vegetais,

por uma linhagem recombinante de *R. eutropha* abrigando o gene da PHA sintase de *Aeromonas caviae*, foi estudado por Fukui e Doi (1997), tendo obtido o copolímero P(3HB-co-3HHx), correspondendo a aproximadamente 80% de sua massa seca celular. Com o uso do gene da PHA sintase de *Pseudomonas* sp. 61-3, *R. eutropha* recombinante foi capaz de sintetizar copoliésteres de forma randômica, consistindo em 3HB e 3HAs unidades de cadeia média (MATSUMOTO et al., 2001).

Por outro lado, há as bactérias como *E. coli* que são incapazes de sintetizar ou degradar PHAs naturalmente. Entretanto, podem crescer com velocidade específica mais elevada, que *R. eutropha* por exemplo, são de fácil lise e têm sido amplamente pesquisadas para a produção heteróloga desses biopolímeros. Alterações genéticas em bactérias como a *E. coli* podem levar, por exemplo, à síntese de poli(3-hidroxiopropionato) (P(3HP)), que não é sintetizado por nenhum microrganismo selvagem conhecido. A incorporação de monômeros 3HP em outros PHAs tem efeitos benéficos como menor cristalinidade e fragilidade do copolímero resultante. A síntese de P(3HP) foi demonstrada por Andreesse e colaboradores (2010), em que estabeleceu-se uma via metabólica não natural em *E. coli* para sintetizá-lo a partir de glicerol. Heinrich e colaboradores (2013) engenheiraram uma via para a conversão de glicerol a P(3HP) na bactéria *Shimwellia blattae*, esta que não é uma produtora natural de PHAs.

O método do proton suicida foi utilizado com sucesso para gerar um mutante de *E. coli* CML3-1, com reduzida produção de ácidos orgânicos e concomitante maior capacidade de produção de P(3HB) comparada à cepa recombinante inicial, ambas ancorando os genes de produção de biopolímero de *R. eutropha*. A cepa modificada foi capaz de utilizar soro de queijo como fonte de carbono para a síntese de P(3HB) (PAIS et al., 2014).

Uma técnica que também pode ser utilizada é a expressão de genes de diferentes organismos para a produção de copolímeros, como no estudo desenvolvido por Phithakrotchanakoon e colaboradores (2013), em que glicerol bruto (proveniente de biodiesel a partir de óleo de palma) e ácidos graxos foram utilizados como fontes de carbono por *E. coli* recombinante, ancorando os genes *phaA* e *phaB* de *R. eutropha* em conjunto com *phaC* e *phaJ* de diferentes fontes com diferentes especificidades pelo substrato: *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas putida*.

## 2.5 SUBSTRATOS ALTERNATIVOS PARA A PRODUÇÃO DE P(3HB) A PARTIR DE *R. eutropha*

*R. eutropha* se tornou um microrganismo modelo para a biossíntese de PHAs por apresentar grande quantidade de informações acerca de sua genética (BRIGHAM et al., 2010; YORK et al., 2003) e elevados índices de acúmulo intracelular de PHA (até 80% de sua massa seca) (ANDERSON; DAWES, 1990). Dada à facilidade de sua manipulação genética e à sua habilidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono, esta bactéria é um organismo que apresenta grande potencial para aplicação industrial na produção de PHAs (LUENGO et al., 2003).

*R. eutropha* é capaz de metabolizar fontes de carbono como ácidos orgânicos, resíduos agroindustriais e de biodiesel, óleos vegetais e dióxido de carbono, convertendo essas fontes a biopolímeros (AKIYAMA; TSUGE; DOI, 2003). Dentre os substratos de baixo custo metabolizados por *R. eutropha* na produção de P(3HB), podem-se destacar a cana-de-açúcar (KULPREECHA et al., 2009), soro de leite (MARANGONI; FURIGO; DE ARAGÃO, 2002), hidrolisado de amido (DALCANTON et al., 2010), melão cítrico (ARAGÃO et al., 2009), glicerol (CAVALHEIRO et al., 2009), entre outros. O substrato utilizado é decisivo para definir a velocidade específica de crescimento do microrganismo, a produtividade em polímero e os fatores de conversão de substrato em P(3HB) (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011).

Um substrato que pode ser atrativo comercialmente, devido à sua grande disponibilidade e aos seus componentes, como sacarose, frutose, glicerol e ácidos orgânicos, é a vinhaça, uma vez que *R. eutropha* pode metabolizar as principais fontes de carbono presentes nesse subproduto. A utilização deste subproduto como substrato envolve vários desafios, mas o principal deles é sua baixa concentração de carbono. A maior parte dos componentes presentes na vinhaça pode ser utilizada por *R. eutropha* (FRIEDRICH; HOGREFE; SCHLEGEL, 1981), porém a sacarose não é metabolizada por esta bactéria, e o glicerol é assimilado mais lentamente quando comparado a outras fontes de carbono, como a glicose, por exemplo.

### 2.5.1 Metabolismo do glicerol em *R. eutropha*

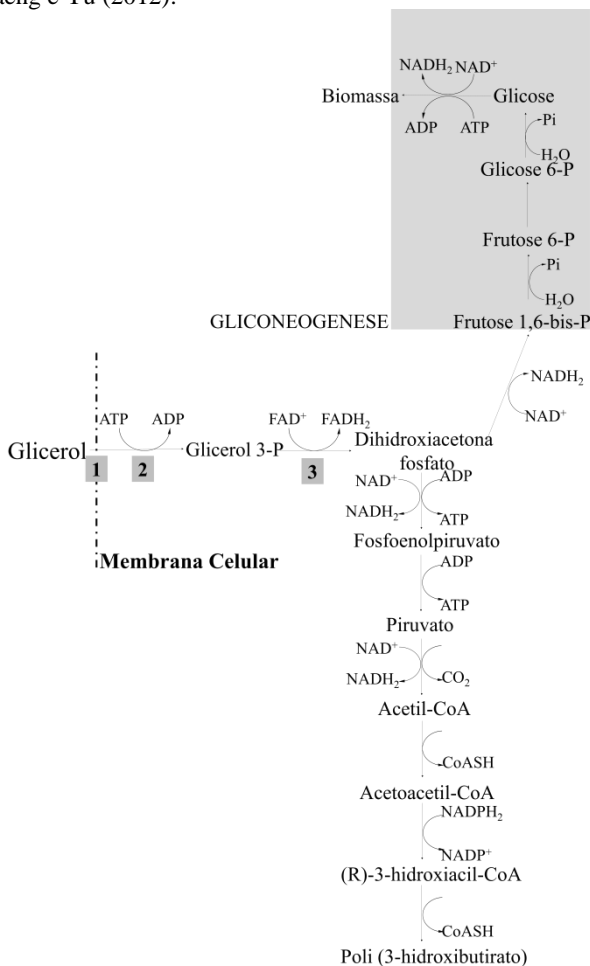
O glicerol é uma fonte de carbono que pode ser metabolizada pelos microrganismos através das vias de degradação de açúcares, mas precisa ser fosforilado e oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Já foi sugerido que o glicerol é uma fonte pobre de carbono como substrato e

que a expressão das proteínas que representam a principal via metabólica não é muito diferente em células autotróficas em  $\text{CO}_2/\text{H}_2$  ou heterotróficas crescendo em glicerol. As produtividades e fatores de conversão de glicerol em PHA são significativamente menores do que em glicose (VRANA ŠPOLJARIĆ et al., 2013). Cavalheiro e colaboradores (2009) reportaram fator de conversão de glicerol em P(3HB) próximo a 0,35 g/g. Ao passo que, Yamane (1993) reportou fator de conversão de glicose em P(3HB) de 0,48 g/g.

Já foi publicado que P(3HB) pode ser produzido por *R. eutropha* DSM 545 a partir de glicerol como única fonte de carbono (CAVALHEIRO et al., 2009). Porém, a velocidade específica de crescimento de *R. eutropha* é menor em glicerol (valores máximos de  $0,30 \text{ h}^{-1}$ ), que em glicose (valores máximos de  $0,55 \text{ h}^{-1}$ ), e o crescimento em glicerol usualmente ocorre muito lentamente (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011; ŠPOLJARIĆ et al., 2013).

Uma representação da via metabólica para a utilização de glicerol por *R. eutropha* foi sugerida por Tanadchangsang e Yu (2012) e ela é apresentada na Figura 2.4. A gliconeogênese (mostrada na Figura 2.4 em cor cinza) é uma parte essencial para a principal via metabólica de utilização de glicerol por microrganismos, mas também acarreta menor eficiência da velocidade de crescimento e nos fatores de conversão para esse substrato. Duas enzimas, a glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase, estão envolvidas na fosforilação do glicerol intracelular a glicerol-3-fosfato e a subsequente conversão a dihidroxiacetona fosfato (VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993), o último é então introduzido à gliconeogênese.

Figura 2.4 Via metabólica para a utilização de glicerol por *R. eutropha*. (Tanadchangsang e Yu (2012)).



Tanadchangsang e Yu (2012) estudaram algumas das limitações de cultivos em glicerol com a bactéria *R. eutropha* e como contornar essas limitações. A gliconeogênese é a formação de glicose a partir de precursores como por exemplo, acetato, lactato, malato e o glicerol. Este processo fornece os carboidratos necessários para biossintetizar ácidos nucleicos e outros compostos celulares. O glicerol é convertido a um intermediário glicolítico dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que é convertido primeiramente a fosfoenolpiruvato (PEP) e então a piruvato

via enzimas glicolíticas. Estes passos completam a via EMP (Embden Meyerhof-Parnas) para sintetizar P(3HB). Em adição a isso, parte do DHAP entra na via da gliconeogênese para produzir precursores com 4 a 6 átomos de carbono, incluindo glicose (ROMEO, 2005).

Lopar e colaboradores (2014) realizaram estudos *in silico* para analisar o metabolismo de glicerol por *R. eutropha* e de acordo com o modelo matemático aplicado por esses autores, resultados similares aos obtidos experimentalmente com glicose podem ser alcançados em glicerol, desde que não haja limitações no transporte do glicerol (Reação 1 indicada na Figura 2.4), na fosforilação do glicerol (Reação 2 indicada na Figura 2.4) e dehidrogenação do glicerol 3-fosfato (Reação 3). E esses autores concluíram que esforços em engenharia metabólica devem estar concentrados na melhora do sistema de transporte do glicerol para o interior da célula (GlpF), somado à constitutividade das enzimas glicerol quinase (GlpK) e glicerol 3-fosfato dehidrogenase (GlpD), bem como na minimização dos efeitos inibitórios dos substratos da via EMP a estas três enzimas.

Assim como para *R. eutropha*, essas três reações estão envolvidas no metabolismo aeróbio do glicerol em *Escherichia coli* (DURNIN et al., 2009). Em *E. coli*: o glicerol é transportado por uma aquaporina GlpF (WANG; SCHULTEN; TAJKHORSHID, 2005), é fosforilado pela glicerol quinase (GlpK) a glicerol 3-fosfato, que é oxidado pela FAD-dependente glicerol 3-fosfato dehidrogenase (GlpD) a dihidroxiacetona fosfato (WEISSENBORN; WITTEKINDTN; LARSONSII, 1992).

FUKUI e colaboradores (2014) transformaram *R. eutropha* H16 com os genes envolvidos no metabolismo aeróbio de glicerol encontrados em *E. coli*. Os genes incluíram *glpF*, glicerol quinase (*glpK*) e glicerol 3-fosfato dehidrogenase (*glpD*); estes genes foram inseridos tanto separadamente (*glpF* ou *glpK*) como juntos (*glpFK*). Em cultura conduzida em frascos agitados, com limitação em nitrogênio, suplementada com 5 g/L de glicerol como única fonte de carbono, ambos cresceram mais rápido que a cepa selvagem H16 e o acúmulo de P(3HB) foi observado para a cepa derivada de *R. eutropha* H16 ancorando os genes *glpF* e *glpK* ou apenas *glpK*.

### 2.5.2 Vinhaça

O Brasil tem importante destaque internacional na produção de biocombustíveis, com um dos marcos em 1975, quando o Programa Nacional do Alcool Combustível (ProAlcool) teve início. Com substanciais intervenções do governo para aumentar a demanda por etanol, o país criou e desenvolveu capacidades institucionais e



tecnológicas para utilizar energia renovável em larga escala. O amadurecimento da indústria sucroalcooleira, combinado com a disponibilidade dos veículos *flex* e os crescentes preços da gasolina, levou a um aumento na produção de bioetanol e, conseqüente, da cana-de-açúcar desde 2000 (KLINE et al., 2008).

O maior produtor mundial de etanol, com produção de cerca de 54 milhões de litros de etanol de milho é os Estados Unidos. O Brasil é o maior produtor mundial de etanol de cana-de-açúcar, e produziu cerca de 24 milhões de litros em 2014, sendo responsável por cerca de 25% da produção mundial, seguido pela União Europeia com 6% (<http://www.ethanolrfa.org>, acesso em 23 de setembro de 2015).

Em uma usina, há etapas que são comuns para a destilaria de etanol e para a fábrica de açúcar, que basicamente são as seguintes: recepção e preparação da cana-de-açúcar e extração do caldo de cana. O caldo extraído é enviado para um sistema de tratamento, no qual as impurezas são removidas. Para a produção de etanol, o caldo de cana é misturado ao melaço, fermentado com a utilização de leveduras e o produto da fermentação é enviado para destilação (DIAS et al., 2015). O corpo de fundo das colunas de destilação, gerado da destilação da mistura alcoólica obtida na fermentação, é chamado de vinhaça ou vinhoto.

A vinhaça de cana-de-açúcar representa a principal água residuária, com maior caráter poluente, do setor produtivo de etanol considerando que, para produção de cada litro de álcool, aproximadamente 10 a 16 L de vinhaça são gerados (SALOMON; SILVA LORA, 2009). A vinhaça possui coloração marrom escura e pH baixo, em torno de 4,5 (MOHANA; ACHARYA; MADAMWAR, 2009), e pode ser considerada uma suspensão de sólidos orgânicos e minerais (visualmente homogênea), composta pelos componentes não arrastados na etapa de destilação. Sua composição química depende da natureza da matéria-prima, espécie da levedura utilizada na fermentação e do processo utilizado para a produção de etanol.

A Tabela 2.2 apresenta a composição química de vinhaça oriunda da fermentação a partir de melaço de cana-de-açúcar e a Tabela 2.3 apresenta um resumo das principais características de vinhaças obtidas de diferentes matérias-primas.

Tabela 2.2 Composição química da vinhaça de melação de cana-de-açúcar.

| <b>Grandeza</b>                                    | <b>Valores médios</b> |
|--|-----------------------|
| pH   | 3,8 – 4,5             |
| Demanda química de oxigênio (DQO) – g/L            | 10 – 89               |
| Demanda bioquímica de oxigênio (DBO) – g/L         | 17 – 40               |
| Sólidos suspensos – g/L                            | 3 – 25                |
| Sólidos voláteis – g/L                             | 2,5 – 9               |
| Sólidos totais – g/L                               | 63 – 79               |
| Polifenóis – mg/L                                  | 470                   |
| Etanol – g/L                                       | 0,01 – 78             |
| Glicerol – g/L                                     | 3,2 – 31              |
| Ác. org. voláteis totais (base ác. acético) – mg/L | 8500                  |
| N <sub>total</sub> - mg/L                          | 21 – 1200             |
| P – mg/L   | 30 - 60               |
| Na – mg/L  | 51                    |
| K – mg/L   | 203                   |
| Ca – mg/L  | 515                   |
| Mg – mg/L  | 225                   |
| Fe – mg/L  | 12 – 150              |
| Cu – mg/L  | 0,27 – 1,71           |
| Pb – mg/L  | 0,02 – 0,48           |
| Zn – mg/L  | 1,70                  |

(ESPANA-GAMBOA et al., 2011; ROBLES-GONZÁLEZ et al., 2012).

Tabela 2.3 Resumo das principais características de vinhaças geradas a partir de diferentes matérias-primas.

| <b>Matéria-prima</b> | <b>Vinhaça<br/>(L)/(L de<br/>etanol)(L)</b> | <b>DBO<br/>(g/L)</b> | <b>DQO<br/>(g/L)</b> | <b>N<br/>(mg/L)</b> | <b>pH</b> |
|----------------------|---|----------------------|----------------------|---------------------|-----------|
| Melaço de beterraba  | 12  | 44,9                 | 91,1                 | 3569                | 5,3       |
| Caldo de cana        | 16  | 16,9                 | 30,4                 | 628                 | 4,0       |
| Melaço de cana       | 14  | 39                   | 85,0                 | 1229                | 4,4       |
| Material celulósico  | 11  | 27,6                 | 61,3                 | 2787                | 5,3       |

Valores médios\* (WILKIE; RIEDESEL; OWENS, 2000)

### 2.5.2.1 Alternativas para o uso da vinhaça

As características da vinhaça que contribuem para o seu potencial poluente são os elevados valores de DQO e DBO e seu pH ácido (LAIME et al., 2011). A preocupação quanto aos impactos do uso da vinhaça no

meio ambiente e a contínua mortandade de peixes, como consequência da sua disposição nos rios, gerou o Decreto-Lei nº 303, de 28 de fevereiro de 1967, que proibiu definitivamente a disposição de vinhaça nos rios, lagos e cursos de água no Brasil. Com essa interdição, a questão sobre o destino da vinhaça, a partir de então, passou a fazer parte de pautas de pesquisa e esta passou a ser utilizada para a irrigação dos próprios canais, atividade conhecida como fertirrigação.

A fertirrigação consiste na infiltração de vinhaça *in natura* no solo dos campos de cana-de-açúcar por irrigação. Quando aplicada desta maneira, a vinhaça pode fertilizar o solo, reduzindo os custos com fertilizantes químicos (LAIME et al., 2011). Porém, em muitos casos, a disposição da vinhaça nos campos ocorre sem critérios definidos, causando impactos na qualidade do solo e das águas subterrâneas.

Segundo Santana, Fernandes e Machado (2008), a fertirrigação do solo, pode oferecer uma falsa impressão para resolver eficientemente o problema da utilização da vinhaça, uma vez que, embora pesquisas demonstrem que esta técnica é benéfica, sua aplicação descontrolada pode causar problemas como a saturação da capacidade de troca catiônica do solo culminando na contaminação de águas superficiais e subterrâneas próximas às plantações. Por isso, certos parâmetros ambientais precisam ser levados em conta, como tipo de solo, distância de corpos de água, capacidade de campo do solo (retenção de água) e porcentagem de sais no solo (LAIME et al., 2011).

Além do uso da vinhaça como fertilizante agrícola, outras soluções foram sugeridas para este efluente como, por exemplo, a concentração da vinhaça por evaporação ou secagem, para produção de alimentos para o gado bovino (VACCARINO et al., 1993). Porém, a elevada demanda de energia é provavelmente a principal restrição desta aplicação. Alguns métodos têm sido descritos na literatura para o tratamento e a concentração de vinhaça (DE GOMES; EÇA; VIOTTO, 2011). Além disso, é sugerido ainda: biodigestão anaeróbia da vinhaça (LALOV et al., 2000) para a produção de energia na forma de biogás (metano); o tratamento biológico aeróbio (BELTRAN; GARCIA-ARAYA; ALVAREZ, 1999a, 1999b) e a fermentação aeróbia para a produção de proteínas unicelulares (SELIM; ELSHAFEI; EL-DIWANY, 1991).

A vinhaça pode também ser um atraente substrato para uso biotecnológico, devido à valorização de um resíduo agroindustrial rico em matéria orgânica. Pesquisas propuseram a utilização de compostos orgânicos da vinhaça como substrato para a produção de hidrogênio via fermentação (KAPDAN; KARGI, 2006), para a produção de biossurfactante, através do cultivo de *Bacillus pumilus* (OLIVEIRA;

GARCIA-CRUZ, 2013) e para produção de biomassa microbiana de *Geotricum candidum*, *Candida krusei* e *Hansenula anamola* (BARKER; QUINN; MARCHANT, 1982). Coca e colaboradores (2015) cultivaram a microalga *Spirulina platensis* utilizando meio mineral suplementado com vinhaça de beterraba em concentrações de 1 a 2 g/L e observaram considerável aumento na biomassa e produtividade de proteína em comparação ao meio sem a adição desse resíduo.

A valorização da vinhaça, como substrato para a produção de PHAs, é reportada na literatura devido principalmente à presença de ácidos orgânicos, glicerol e sais minerais (PARNAUDEAU et al., 2008). Entretanto nos relatos encontrados com utilização de vinhaça, microrganismos halofílicos são empregados, como por exemplo, nos estudos publicados por Flieger e colaboradores (2003) e Pramanik e colaboradores (2012) que objetivaram, a partir da utilização da vinhaça como substrato, produzir P(3HB) e Bhattacharyya e colaboradores (2012) para produção do copolímero P(3HB-co-HV).

## 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os temas relevantes para esta tese foram abordados neste capítulo. Entre eles as principais características e aplicações mais comuns dadas à vinhaça, sendo que estas ainda podem ser melhor exploradas, visto o grande volume produzido deste subproduto no Brasil.

A vinhaça é um substrato derivado de uma matéria-prima renovável (cana-de-açúcar) e possui fontes de carbono que podem ser utilizadas por *R. eutropha*, uma bactéria naturalmente produtora do biopolímero P(3HB). Estudos que envolvam estes dois temas, com foco na capacidade de utilização de vinhaça por esse microrganismo e quais os problemas que podem ser encontrados neste processo, são imprescindíveis.

A utilização de linhagens recombinantes tem sido voltada para produção de biopolímeros que não são produzidos naturalmente pelos microrganismos produtores ou para a produção de biopolímeros com propriedades físicas e mecânicas diferentes das encontradas nos produzidos naturalmente. Além disso, microrganismos geneticamente modificados ainda podem ser construídos para a introdução ou aprimoramento de vias de utilização de diferentes substratos, principalmente os substratos de baixo custo, visando a redução dos custos de produção dos biopolímeros.

Frente às colocações apresentadas neste capítulo, estudos que envolvam diferentes áreas de pesquisa para o melhor aproveitamento de

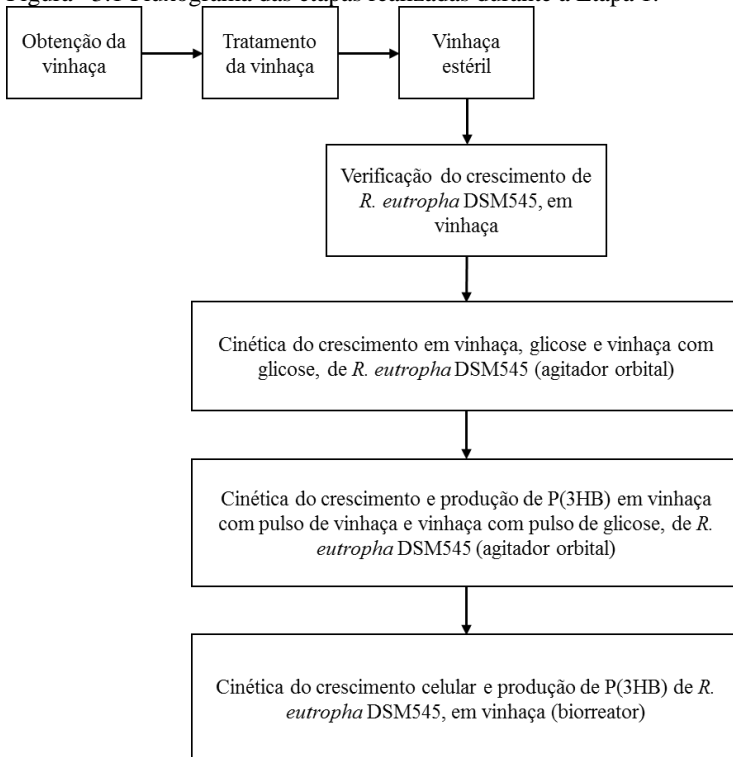
um subproduto abundante, como a vinhaça, são necessários. Neste contexto, o melhor aproveitamento da vinhaça pode ser voltado para a produção de materiais, como P(3HB), uma potencial alternativa aos plásticos convencionais de origem petroquímica, por ser termoplástico e biodegradável.

### 3. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE VINHAÇA SOBRE O CRESCIMENTO CELULAR E PRODUÇÃO DE P(3HB) POR *R. eutropha* DSM 545 – ETAPA 1

A primeira etapa deste trabalho consistiu em avaliar a influência de diferentes concentrações de vinhaça sobre o crescimento de *R. eutropha* DSM 545 e realizar o estudo cinético do crescimento celular e da produção de P(3HB).

A Figura 3.1 mostra o fluxograma das etapas desenvolvidas na Etapa 1 do presente trabalho.

Figura 3.1 Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 1.



### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 1

#### 3.1.1 Vinhaça

A vinhaça utilizada neste trabalho foi gentilmente doada pela Usina Iracema (produtora de etanol e açúcar), localizada no município de Iracemápolis, SP. A vinhaça foi coletada, em maio de 2013, diretamente das colunas de destilação e acondicionada em recipientes plásticos de 5 L e, em seguida transportada para a Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, onde permaneceu congelada (-20 °C) até o momento da sua utilização.

##### 3.1.1.1 Determinação da composição da vinhaça

As quantificações de cloretos (realizada por eletrodo de íon seletivo); sulfatos (realizada por gravimetria); Ca, Fe, Mn, Mg, Cu, Zn (realizada por absorção atômica); K (realizada por emissão atômica) e Na (realizada por fotometria de chama) foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

As análises de nitrogênio total, açúcares redutores, demanda química de oxigênio (DQO) e glicerol foram feitas conforme metodologias analíticas descritas nas seções a seguir, uma vez que essas quantificações também foram realizadas para as análises dos cultivos.

##### 3.1.1.2 Preparo da vinhaça

Anteriormente a cada experimento, a vinhaça passou por tratamentos que incluíram o ajuste do pH para 7,0 (através da adição de NaOH 2,5 N) e a esterilização por filtração em sistema com membrana tubular capilar, de polipropileno, autoclavável (modelo MD020 CP 2N Mycrodin Nadir, FRINGS DO BRASIL Engenharia e Comércio Ltda), com diâmetro médio de poro igual a 0,2 µm, área de filtração de 0,1 m<sup>2</sup>, pressão máxima de 3 bar e vazão de 1,5 L/h. O sistema de filtração foi autoclavado por 15 min a 121 °C. A vinhaça preparada dessa forma, apresentava coloração castanha escura e aparência translúcida, e assim, pronta para ser utilizada.

#### 3.1.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Ralstonia eutropha* DSM 545 (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Alemanha*), mutante espontâneo para a utilização da glicose. O microrganismo foi mantido congelado em caldo nutriente (contendo peptona de carne (5 g/L) e extrato de carne (3 g/L)) e glicerol (1:1 (v/v)) a -80 °C.

### 3.1.3 Meios e condições de cultivo

#### 3.1.3.1 Pré-cultura

Em todos os cultivos realizados nesta etapa, utilizou-se caldo nutriente para a reativação da cepa descongelada e também como pré-cultura. Nestes casos, as células foram cultivadas em agitador orbital, em frasco *erlenmeyer* aletado de 500 mL, contendo 150 mL de meio, durante 18 horas a 35 °C e 150 rpm.

#### 3.1.3.2 Estudo do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em meio contendo vinhaça

Para investigar se haveria inibição do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 na presença de vinhaça, optou-se por testar diferentes diluições de vinhaça que variaram de 0,5; 5; 10 e 100% (v/v) em meio mineral (MM) descrito por Aragão et al. (1996) com modificações, sem limitação em nitrogênio.

A composição do meio mineral utilizado foi (em g/L):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1, citrato de amônio e ferro III 0,06,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,5, ureia 2, ácido nitrilotriacético 0,19 e elementos traço 1 mL/L. A solução de elementos traço conteve a seguinte composição (em g/L)  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,3,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,1,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,03,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02 e  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01.

A pré-cultura em caldo nutriente foi utilizada como inóculo (10% v/v) para os testes em diferentes diluições de vinhaça em meio mineral. Estes foram realizados em agitador orbital, em frascos *erlenmeyers* aletados de 250 mL contendo 100 mL de meio, mantidos a 35 °C e 150 rpm, por aproximadamente 24 horas.

Com o objetivo de avaliar o crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em diferentes concentrações de vinhaça, suplementadas ou não de outra fonte de carbono, neste caso a glicose, em meio mineral sem limitação em nitrogênio, foram conduzidos oito experimentos empregando combinações desses substratos conforme o Quadro 3.1. A glicose foi escolhida como substrato adicional e como substrato para o cultivo controle, nesta etapa do estudo, pois ela é uma fonte de carbono muito difundida na literatura para este microrganismo.

A pré-cultura em caldo nutriente foi utilizada como inóculo (10% v/v) para esses cultivos. Eles foram realizados em agitador orbital, em frascos *erlenmeyers* aletados de 1000 mL contendo 400 mL de meio, a 35 °C e 150 rpm.



Quadro 3.1 Composição dos meios dos cultivos em agitador orbital, com diferentes concentrações de vinhaça (V) e/ou glicose (G) para o crescimento de *R. eutropha* DSM 545.

| <b>Cultivo</b> | <b>Vinhaça (%) (v/v)</b> | <b>Glicose (g/L)</b> | <b>Meio adicional</b> |
|----------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|
| G              | 0                        | 20                   | MM                    |
| V1G            | 25                       | 20                   | MM                    |
| V2G            | 50                       | 20                   | MM                    |
| V3G            | 100                      | 20                   | MM                    |
| V1             | 25                       | 0                    | MM                    |
| V2             | 50                       | 0                    | MM                    |
| V3             | 100                      | 0                    | MM                    |
| V              | 100                      | 0                    | -                     |

3.1.3.3 Estudo cinético do crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 em meio contendo vinhaça

#### 3.1.3.3.1 Cultivos em agitador orbital

Visto que as concentrações das fontes de carbono presentes na vinhaça são baixas, optou-se pela realização de experimentos em batelada alimentada (na forma de pulso), propondo essa estratégia para o crescimento celular e o acúmulo de P(3HB) em vinhaça ou em vinhaça adicionada de glicose. Para isso, foram realizados dois cultivos em agitador orbital e eles estão descritos no Quadro 3.2.

Quadro 3.2 Composição dos meios dos cultivos em agitador orbital para o estudo cinético do crescimento e da produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545.

| <b>Cultivo</b>        | <b>Conc. inicial de N (g/L)</b> | <b>Meio adicional</b> |
|-----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| Vinhaça pulso vinhaça | 0,20                            | MM                    |
| Vinhaça pulso glicose | 0,80                            | MM                    |

Os experimentos em agitador orbital apresentados no Quadro 3.2 foram realizados a partir de duas pré-culturas, a primeira (pré-inóculo) em caldo nutriente (18 horas a 35 °C/150 rpm) e a segunda (inóculo) em vinhaça com a adição dos nutrientes do meio mineral, conduzida em frascos *erlenmeyers* aletados de 1 L, com 400 mL meio de cultivo, sob as mesmas condições de agitação e temperatura que a primeira, durante 7 horas. O tempo de incubação de 7 horas foi estabelecido com base em cinéticas de crescimento celular, em vinhaça e meio mineral, em que *R. eutropha* encontrava-se no final da fase exponencial de crescimento (dados não mostrados).

Esta segunda pré-cultura foi utilizada a uma concentração de 10% (v/v) como inóculo para os dois cultivos em agitador orbital. Para o cultivo com pulso de vinhaça, a concentração inicial de nitrogênio foi de 0,20 g/L e para o cultivo com pulso de glicose, essa concentração foi de 0,80 g/L.

O volume útil inicial do cultivo com pulso de vinhaça foi de 200 mL em *erlenmeyer* aletado de 1000 mL e após 7 horas, 200 mL de vinhaça pura foram adicionados ao frasco. O volume útil do cultivo com pulso de glicose foi de 400 mL em *erlenmeyer* aletado de 1000 mL, e passadas 7 horas de cultivo, um volume (16 mL) de solução concentrada de glicose (500 g/L) foi adicionado ao meio para que a concentração final deste substrato, no meio fosse de 20 g/L.

### 3.1.3.3.2 Cultivos em biorreator

Para melhor entendimento da cinética de crescimento e de produção de P(3HB), em meio contendo vinhaça por *R. eutropha* DSM 545, três cultivos em biorreator (Quadro 3.3) foram realizados nesta etapa do trabalho.

Quadro 3.3 Composição dos meios dos cultivos em biorreator para o estudo cinético do crescimento e da produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545.

| <b>Cultivo</b>  | <b>Conc. inicial de N (g/L)</b> | <b>Meio adicional</b> |
|-----------------|---------------------------------|-----------------------|
| Vinhaça pura    | -                               | -                     |
| Vinhaça + N     | 0,80                            | -                     |
| Vinhaça + N+ MM | 0,80                            | MM                    |

Os experimentos em biorreator apresentados no Quadro 3.3 foram realizados a partir de duas pré-culturas, a primeira em caldo nutriente (18 horas a 35 °C/150 rpm) e a segunda em vinhaça com a adição dos nutrientes do meio mineral, conduzida em frascos *erlenmeyers* aletados de 1 L, com 400 mL meio de cultivo, sob as mesmas condições de agitação e temperatura que a primeira, durante 7 horas. Esta segunda pré-cultura foi utilizada a uma concentração de 10% (v/v) como inóculo para os três cultivos em biorreator.

Após o preparo do inóculo, ele foi transferido para biorreator, previamente autoclavado, (BIOFLO III, *New Brunswick Scientific*) de 5 L, com volume útil de 4 L, contendo vinhaça e nutrientes conforme mostrado no Quadro 3.3. A temperatura foi mantida em 35 °C e o pH em 7,0 com adição de soluções de NaOH 2,5 N ou HCl 2,7 N, com condições iniciais de agitação e aeração de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente. As condições de agitação e aeração foram monitoradas e controladas para

que a concentração de oxigênio dissolvido no meio não fosse inferior a 40%, em relação à saturação com ar atmosférico.

### **3.1.4 Determinações analíticas**

#### **3.1.4.1 Amostragem**

Nos experimentos conduzidos para verificar possível inibição do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 pela vinhaça, as amostras foram retiradas nos instantes inicial e final dos cultivos.

Nos cultivos realizados para o estudo cinético do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em meio de contendo vinhaça, amostras foram retiradas em intervalos de aproximadamente 2 horas.

Nos cultivos para o estudo cinético do crescimento e produção de P(3HB), em agitador orbital e biorreator, o intervalo de amostragem foi de 2 horas e as amostras de 2 mL de meio cultivado foram coletados em microtubos de plástico e centrifugados a 10956 *xg* por 3 min. Em seguida, os precipitados foram lavados com 1 mL de água destilada, centrifugados novamente, sendo congelados os sobrenadantes e os precipitados. O sobrenadante foi posteriormente utilizado para a análise do consumo de substrato e o precipitado para a determinação de P(3HB).

#### **3.1.4.2 Determinação da concentração da biomassa**

Nos experimentos com o objetivo de analisar apenas o crescimento do microrganismo, a biomassa foi determinada, durante os cultivos, através da determinação da densidade ótica em espectrofotômetro (modelo SF325NM, Tecnal Equipamentos para laboratórios, Piracicaba, São Paulo) a 600 nm (DO600).

Para a determinação da concentração da biomassa durante os cultivos em que além do crescimento celular, a produção de P(3HB) também foi avaliada, a biomassa foi determinada pela densidade ótica e por gravimetria.

A concentração da biomassa foi determinada por análise gravimétrica após filtração, em membrana com poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , de um volume conhecido (5 mL) de cultura e por análise gravimétrica do precipitado, obtido após a centrifugação (10956 *xg*/3 min) de 2 mL da amostra. Em ambos os casos, submetidos à secagem em estufa (100 °C), durante 24 horas. Decorrido esse tempo, as membranas foram colocadas em dessecador, por 20 min e pesadas (até peso constante).

Devido ao fato da vinhaça ser utilizada como meio de cultura e ter coloração marrom, realizou-se leitura da densidade ótica da vinhaça pura (600 nm) e este valor foi então subtraído na leitura das amostras. Ao longo dos cultivos em biorreator, observou-se que, com a adição da solução de

NaOH para a correção do pH, um precipitado era formado e este foi quantificado e sua massa descontada dos resultados da gravimetria.

#### 3.1.4.3 Determinação das concentrações de açúcares redutores, glicerol e nitrogênio

A determinação de açúcares redutores (ART) foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As determinações de glicerol foram realizadas por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em um equipamento Jasco (LC-2000Plus Series). Os picos analisados foram detectados com um detector de índice de refração (RI-2031 – Jasco). O nitrogênio foi quantificado utilizando-se o *kit* Uréia ES (Gold Analisa), que determina a concentração de ureia pelo método enzimático-colorimétrico.

#### 3.1.4.4 Determinação da concentração de P(3HB)

A concentração de P(3HB) foi determinada por HPLC, segundo Karr, Waters e Emerich (1983), com modificações. Após descongelamento das amostras, as células foram então ressuspensas em 1 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$  PA), transferidas para tubos de vidro com tampa e tratadas termicamente a 100 °C durante 30 minutos. Os tubos foram então resfriados, a solução diluída 1:10 em ácido sulfúrico 5mM, filtrados (0,2 mm) e 10  $\mu$ L da solução diluída foram utilizados para análise. Esta análise foi realizada em equipamento Jasco (LC-2000 Plus Series). A concentração foi detectada a  $A_{210nm}$  (Jasco UV-2077).

#### 3.1.4.5 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Esta análise foi realizada segundo o procedimento do *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA; AWWA; WEF, 1995). Resumidamente, a DQO foi determinada colorimetricamente pela oxidação da matéria orgânica com o dicromato de potássio em meio ácido, utilizando sulfato de prata como catalisador. A quantificação foi feita pela determinação colorimétrica do  $Cr^{3+}$ , gerado pela redução do dicromato ao oxidar a matéria orgânica.

### 3.1.5 Tratamento dos dados

Visto que o acúmulo de P(3HB) é intracelular, a biomassa total (Xt) representa a soma da quantidade de biomassa residual (Xr) e da quantidade de P(3HB) ( $Xt = Xr + P(3HB)$ ). Foi feito o ajuste polinomial aos dados experimentais de concentração de Xt e P(3HB) com o auxílio do *software* Lissage (desenvolvido por Simões, Arroyo e Uribelarrea, *Institut National des Sciences Appliquées* - Toulouse, França) e do

Microsoft Office Excel 2007. A concentração de  $X_r$  foi determinada pela diferença entre os ajustes das concentrações  $X_t$  e  $P(3HB)$ .

A partir dos perfis de concentração de biomassa residual foi possível determinar as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_{X_r}$ ) e os fatores de conversão de substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ).

### 3.1.5.1 Velocidade específica de crescimento celular

A partir dos ajustes da concentração de  $X_r$  em função do tempo, foi possível determinar, em cada instante, a velocidade de crescimento ( $dX_r/dt$ ). Ao se dividir a velocidade instantânea pela concentração celular (no instante  $t$ ), foi possível obter a velocidade específica de crescimento, representada pela Equação 3.1.

$$\mu_{X_r} = \frac{1}{X_r} \cdot \frac{dX_r}{dt} \quad (3.1)$$

Ao se integrar a Equação 3.1 de  $t = 0$  a  $t$ , foi possível obter uma equação de primeiro grau (Equação 3.2), onde  $X_{r0}$  é a concentração inicial de  $X_r$ . O valor de  $\mu_{X_{rmax}}$  foi obtido pelo ajuste da Equação 3.2 aos dados de  $X_r$  da fase exponencial de crescimento.

$$\ln X_r = \ln (X_{r0}) + \mu_{max} \cdot t \quad (3.2)$$

### 3.1.5.2 Fator de Conversão

O fator de conversão de substrato em célula ( $Y_{X_r/S}$ ) foi calculado a partir do coeficiente angular da reta obtida ao relacionar a concentração de biomassa ( $X_r$ ) com a concentração de substrato consumido, ao longo do tempo.

### 3.1.5.3 Percentual de P(3HB)

O percentual de P(3HB) acumulado foi calculado ao se dividir a concentração de P(3HB) (g/L) pela concentração de biomassa total ( $X_t$  (g/L)). Para esse cálculo, considerou-se o mesmo tempo de fase de produção (depois da limitação em nitrogênio).

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 1

### 3.2.1 Caracterização da vinhaça

Na Tabela 3.1 está apresentada a composição química da vinhaça utilizada neste estudo, coletada em maio de 2013 na Usina Iracema, localizada no Município de Iracemápolis, SP.

Tabela 3.1 Composição química da vinhaça utilizada neste trabalho.

| Grandeza            | Valor |
|---------------------|-------|
| pH inicial          | 4,4   |
| DQO (mg/L)          | 22700 |
| Nitrogênio (g/L)    | 0,06  |
| Ácido láctico (g/L) | 2,5   |
| Ácido acético (g/L) | 0,6   |
| Frutose (g/L)       | 3,3   |
| Sacarose (g/L)      | 7,2   |
| Glicerol (g/L)      | 4,5   |
| Cloretos (%)        | 0,158 |
| Sulfatos (%)        | 0,096 |
| Ca total (mg/L)     | 578   |
| Fe total (mg/L)     | 23,2  |
| Mn total (mg/L)     | 3,21  |
| Mg total (mg/L)     | 138,8 |
| Cu total (mg/L)     | 0,66  |
| Zn total (mg/L)     | 0,43  |
| K total (g/L)       | 1,2   |
| Na total (mg/L)     | 75    |
| Etanol (g/L)        | 1,2   |

Ao comparar os dados da composição da vinhaça utilizada no presente trabalho (Tabela 3.1), com os dados encontrados na literatura (apresentados na Tabela 2.1), nota-se que o resultado é próximo aos valores médios reportados. A composição química da vinhaça é bastante variável e depende, principalmente, de fatores como a natureza e a composição da matéria prima, do sistema usado no preparo do mosto, do método de fermentação adotado e do sistema de condução da fermentação alcoólica, do tipo de levedura utilizada, do tipo de destilador empregado e do processo de destilação (GLORIA; ORLANDO FILHO, 1984).

Os principais componentes quantificados na vinhaça usada neste estudo, que podem ser utilizados como substrato pela bactéria *R. eutropha* DSM 545 são os ácidos orgânicos, a frutose e o glicerol.

### **3.2.2 Estudo do crescimento de *R. eutropha* DSM545 em meio contendo vinhaça**

O crescimento de *R. eutropha* DSM 545, em meio de cultura contendo vinhaça, foi investigado nesta etapa do trabalho com objetivo de verificar uma possível inibição no crescimento desta bactéria que pudesse ser causada pelos componentes deste subproduto.

A literatura apresenta contradições quanto ao poder inibitório dos compostos presentes na vinhaça sobre o crescimento microbiano. Conforme Silva e colaboradores (2011), uma das vantagens da utilização da vinhaça em processos biotecnológicos é o fato da mesma ser livre de toxinas e inibidores de fermentação. Por outro lado, Martín Santos e colaboradores (2003) afirmaram que a presença de alguns compostos, como os fenólicos, podem ser tóxicos e/ou inibir o crescimento de microrganismos. Em função dessas contradições, diferentes diluições de vinhaça foram avaliadas e o estudo do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 foi investigado. Nas condições testadas, foi verificado crescimento celular nas diluições de vinhaça de 0,5; 5; 10 e 100% (v/v) com adição dos sais do meio mineral (descrito no item 3.1.3).

Os resultados mostraram que *R. eutropha* DSM 545 foi capaz de crescer em meio contendo vinhaça, mesmo sem diluição (100%). Cabe ressaltar ainda, que não há relatos na literatura consultada para a utilização de vinhaça por *R. eutropha*.

Como esses resultados tiveram caráter qualitativo (se houve crescimento), eles foram pouco conclusivos. A análise cinética do crescimento de um microrganismo é indispensável para a melhor análise e discussão de processos biotecnológicos.

Após a constatação do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça, foram realizados oito experimentos, com a finalidade de avaliar a cinética do crescimento da bactéria em meio de cultura com diferentes diluições de vinhaça, adicionadas ou não de glicose, em meio mineral sem limitação em nitrogênio, empregando combinações desses substratos. As curvas de crescimento, expressas em densidade ótica (DO<sub>600</sub>) no decorrer do tempo de cultivo, estão mostradas nas Figuras 3.2 e 3.3 para diferentes concentrações de vinhaça e para diferentes concentrações de vinhaça adicionadas de glicose, respectivamente. Nas duas figuras, os dados referentes aos ensaios “vinhaça pura (V)” e “glicose (G)” estão apresentados para facilitar a análise visual dos resultados obtidos. As

linhas que aparecem nas duas figuras abaixo não representam ajuste aos dados, elas foram colocadas nos gráficos apenas com a finalidade de facilitar a comparação visual entre os cultivos.

Figura 3.2 Curvas de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em MM contendo vinhaça nas concentrações (v/v) 25% (V1), 50% (V2) e 100% (V3); MM contendo glicose 20 g/L (G) e vinhaça pura (V).

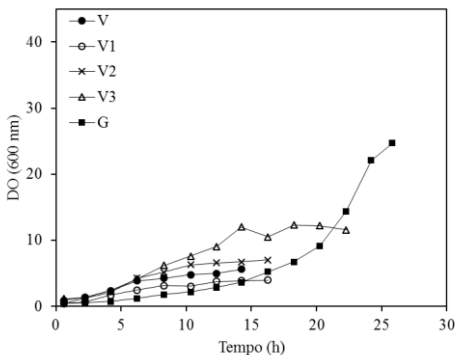
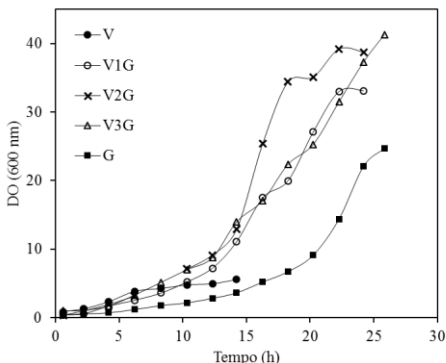


Figura 3.3 Curvas de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em MM contendo vinhaça nas concentrações (v/v) 25% (V1G), 50% (V2G) e 100% (V3G) com adição de glicose 20 g/L; MM contendo glicose 20 g/L (G) e vinhaça pura (V).



Com os dados de crescimento mostrados na Figura 3.2, relativos aos ensaios sem adição de glicose, o microrganismo cresceu de forma mais rápida em vinhaça, mas houve uma parada no crescimento, provavelmente devido à baixa disponibilidade de substrato e por isso, no cultivo “Glicose” obteve-se maior concentração celular. Nos cultivos com vinhaça (25, 50 e 100% em meio mineral), pode-se verificar que, quanto



maior a quantidade desta, maior também foi a concentração final de biomassa obtida. No ensaio com vinhaça pura (V), a biomassa final só foi maior que no ensaio com a menor concentração de vinhaça, o “V1”. Lembrando que, os cultivos “vinhaça 100%”, foram cultivos realizados com a adição dos nutrientes do meio mineral em vinhaça.

Na Figura 3.3 são mostradas as curvas de crescimento de *R. eutropha* DSM 545 para os ensaios contendo vinhaça e glicose, bem como o ensaio “vinhaça pura” e o controle “glicose”. A curva de crescimento em vinhaça pura foi a que apresentou a menor concentração final de biomassa, uma vez que, além da menor disponibilidade da fonte de carbono, ainda pode ter ocorrido a falta de algum micronutriente presente no meio mineral. Nas três concentrações de vinhaça analisadas, a biomassa final foi maior que no ensaio contendo apenas glicose.

Trabalhos reportados na literatura que verificaram o crescimento de microrganismos, normalmente leveduras, como *Candida lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida parapsilosis*, utilizaram concentrações de vinhaça até 75% (v/v), ou seja, inferior à abordada neste estudo (100%) e ainda utilizaram outros nutrientes como peptona, extrato de levedura, melão, além de glicose (SILVA et al., 2011; CAZETTA; CELLIGOI, 2006).

Ao tratar-se de pré-tratamento em vinhaça, para que ela possa ser utilizada por microrganismo, Pramanik e colaboradores (2012) estudaram o crescimento de *Haloarcula marismortui* em vinhaça, com pré-tratamento com carvão ativado e correção de pH e sem tratamento, em meio quimicamente definido, nas concentrações de 1, 10, 20, 25, 50, 75 e 100% (v/v) de vinhaça. Nas concentrações testadas para a *in natura* (sem nenhum tipo de tratamento) acima de 10% não se verificou crescimento celular, ao passo que a vinhaça pré-tratada permitiu o crescimento em até 100%, assim como foi verificado no presente trabalho, em que o pré-tratamento da vinhaça incluiu o ajuste do pH para 7,0.

Ao plotar os dados do logaritmo neperiano da  $DO_{600}$  em função do tempo de cultivo (esses dados estão mostrados no Apêndice I), na fase exponencial de crescimento tem-se uma relação linear, cujo coeficiente angular da regressão é a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ). *R. eutropha* DSM 545 cresceu com diferentes  $\mu_{m\acute{a}x}$ : 0,26 h<sup>-1</sup>; 0,28 h<sup>-1</sup>; 0,32 h<sup>-1</sup>; 0,23 h<sup>-1</sup>, para vinhaça pura, vinhaça 25%, 50% e 100% em meio mineral, respectivamente. O maior valor de  $\mu_{m\acute{a}x}$  foi para o ensaio com 50% de vinhaça, levando-se em consideração apenas os valores de densidade óptica para a obtenção desses valores.

Para os cultivos com vinhaça e glicose, *R. eutropha* DSM 545 cresceu com velocidades específicas máximas de crescimento de 0,23 h<sup>-1</sup>

(V1G),  $0,24 \text{ h}^{-1}$  (V2G) e de  $0,19 \text{ h}^{-1}$  (V3G), enquanto que no meio sem adição de vinhaça, ou seja, somente em glicose o  $\mu_{\text{máx}}$  foi de  $0,16 \text{ h}^{-1}$ , valor que está de acordo com os reportados na literatura para esta bactéria crescendo em glicose nessas concentrações ( $20 \text{ g/L}$ ), que se encontram em torno de  $0,20 \text{ h}^{-1}$  (MOZUMDER et al., 2014). A presença de vinhaça no meio parece ter influenciado positivamente no valor de  $\mu_{\text{máx}}$ , e isto pode ser justificado pela presença de ácidos orgânicos na vinhaça. Grousseau (2012) e Aragão (1996), ao utilizarem ácidos orgânicos como fonte de carbono para a bactéria *R. eutropha* DSM 545, demonstraram que os valores de velocidade específica máxima de crescimento a partir de ácidos orgânicos são superiores quando comparado ao  $\mu_{\text{máx}}$  a partir da glicose.

O estudo cinético até aqui apresentado serviu também para determinar o tempo de incubação da segunda pré-cultura, ou seja, a que posteriormente foi utilizada como inóculo para os demais cultivos em agitador orbital e biorreator. O tempo desta pré-cultura foi de aproximadamente 7 horas (como pode ser observado no Apêndice I), sem limitação de nitrogênio e sem a adição de glicose, pois neste momento a biomassa celular se encontrava com velocidade específica máxima de crescimento e maior concentração celular desta fase.

### **3.2.3 Estudo cinético do crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 em meio contendo vinhaça**

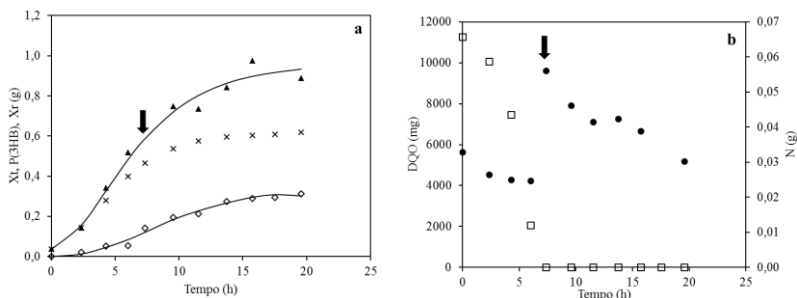
Os resultados anteriormente apresentados foram importantes para verificar que *R. eutropha* DSM 545 foi capaz de crescer em meio contendo vinhaça. Para melhor compreensão do crescimento e produção de biopolímero a partir desse substrato, a análise cinética em meio contendo vinhaça foi realizada, através de dois cultivos em agitador orbital e três cultivos em biorreator.

#### **3.2.3.1 Cultivos em agitador orbital**

Um dos cultivos, realizado em agitador orbital, foi conduzido em meio com vinhaça e meio mineral com adição extra de vinhaça pura na forma de pulso (após 7 horas) para aumentar o teor de carbono do meio. As curvas de crescimento de biomassa total, acúmulo de P(3HB) e biomassa residual são mostradas na Figura 3.4 (a). A seta mostrada na figura representa o momento da adição de vinhaça pura. Estes dados estão expressos em massa (g) e não em concentração, em função da variação de volume do experimento. Na Figura 3.4(b) são apresentados os dados referentes às concentrações de nitrogênio e DQO. As linhas contínuas

representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 3.4 (a) Evolução da biomassa total ( $X_t$  ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$  (x)) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para *R. eutropha* DSM 545 e (b) Concentração de nitrogênio ( $\square$ ) e de DQO ( $\bullet$ ) ao longo do cultivo em agitador orbital, inicialmente em vinhaça em meio mineral, com pulso de vinhaça (indicado pela seta).



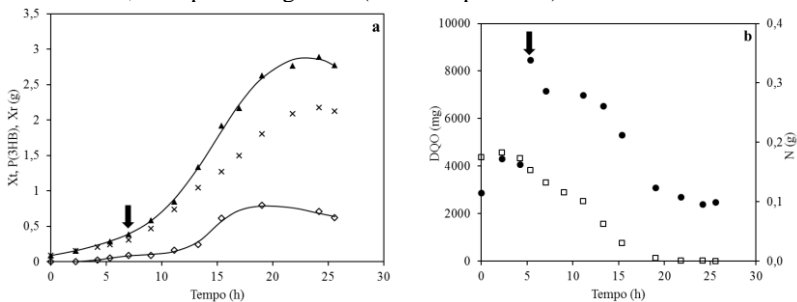
A biomassa celular total final foi de aproximadamente 1 g e a biomassa residual praticamente cessou o crescimento no instante 7 horas, momento em que a concentração de nitrogênio encontrava-se em zero, uma vez que esse nutriente é essencial para o crescimento de *R. eutropha* DSM 545, a interrupção do crescimento era esperada. A velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) neste cultivo foi de  $0,35 \text{ h}^{-1}$ , valor superior ao encontrado por Schmidt (2011) que foi de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ . O referido autor avaliou a produção de P(3HB) com o mesmo microrganismo em cultivos (também em frascos agitados) utilizando como fonte de carbono glicose e frutose (40 g/L). Estes resultados mostraram que *R. eutropha* DSM 545 foi capaz de crescer com  $\mu_{\text{máx}}$  mais elevado com vinhaça presente no meio de cultivo.

O acúmulo de P(3HB) para este cultivo foi de 30%. O nitrogênio foi exaurido do meio ligeiramente antes do momento do pulso de vinhaça, indicando que, o P(3HB) acumulado após este momento foi a partir dos substratos presentes na vinhaça. A produção de biopolímero cessou em 16 horas de ensaio, apesar da disponibilidade de substrato (matéria orgânica), como demonstrado na quantificação da DQO. A DQO presente no meio foi consumida até em torno de 5000 mg (por volta de 12000 mg/L).

A segunda estratégia de cultivo adotada foi a adição de glicose ao invés de vinhaça. Assim, no segundo cultivo para avaliar o crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça (com adição de sais) e acúmulo de biopolímero, optou-se pela adição de uma solução concentrada de glicose

(500 g/L), para elevar esta concentração a aproximadamente 20 g/L. As curvas de crescimento de biomassa total, acúmulo de P(3HB) e biomassa residual são mostradas na Figura 3.5 (a). A seta mostrada na figura representa o momento da adição da solução de glicose. Estes dados estão expressos em massa (g) e não em concentração, em função da variação de volume do frasco. Na Figura 3.5 (b), são apresentados os dados referentes às concentrações de nitrogênio e DQO.

Figura 3.5 (a) Evolução da biomassa total ( $X_t$  ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$  (x)) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para *R. eutropha* DSM 545 e (b) Concentração de nitrogênio ( $\square$ ) e de DQO ( $\bullet$ ) ao longo do cultivo em agitador orbital, inicialmente em vinhaça em meio mineral, com pulso de glicose (indicado pela seta).



Neste cultivo o acúmulo de P(3HB) aumentou após 12 horas de cultivo e o percentual de biopolímero acumulado foi de 24%. Pramanik e Mitra (2012) utilizaram vinhaça para a produção de P(3HB) a partir de *Haloarcula marismortui*, um microrganismo halofílico (capaz de crescer em elevadas concentrações de sais) e o acúmulo final de P(3HB) em meio contendo 10% de vinhaça foi de 30% com  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $0,086 \text{ h}^{-1}$ . É importante ressaltar que, apesar do acúmulo de P(3HB) destes dois cultivos com estratégia de pulso e limitação em nitrogênio assim como para os autores citados, ter sido de 30%, neste trabalho foi utilizado um microrganismo não halofílico e as concentrações de vinhaça ensaiadas foram superiores, chegando a 100%.

A velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para o cultivo mostrado na Figura 3.5 foi de  $0,17 \text{ h}^{-1}$ . Foi observada uma diferença nos valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$ , apesar dos dois cultivos apresentados nesta seção terem iniciado sob as mesmas condições ambientais (composição do meio de cultivo, temperatura, agitação). A única diferença entre eles foi a concentração inicial de nitrogênio (0,20 g/L para o com pulso de vinhaça e 0,80 g/L para o com pulso de glicose), esta variação foi aplicada

para que no cultivo com o pulso de vinhaça fosse possível ocorrer a limitação, visto a menor concentração de carbono.

O nutriente utilizado como limitante neste estudo, para o processo de síntese de P(3HB) foi o nitrogênio e sua exaustão ocorreu em aproximadamente 18 horas. O nitrogênio foi consumido gradativamente, o que pode ser também em função da velocidade específica máxima de crescimento da biomassa residual menor que a encontrado no cultivo discutido anteriormente (com pulso de vinhaça), sendo que neste cultivo (com pulso de glicose) foi de  $0,17 \text{ h}^{-1}$ , valor este típico para ensaios com *R. eutropha* DSM 545 em glicose (IENCZAK et al., 2011).

Em função da maior disponibilidade de substrato, a concentração final de biomassa residual foi maior que a encontrada no cultivo com pulso de vinhaça. Antes da adição do pulso de glicose, este nutriente se encontrava disponível no meio em concentrações baixas, indicando que até o momento do pulso, o microrganismo pode ter assimilado outras fontes de carbono presentes na vinhaça. Ao final do cultivo, a DQO se encontrava em aproximadamente  $12 \text{ g/L}$  e a biomassa total estava entrando em fase de decaimento, sugerindo que, da DQO disponível na vinhaça, determinados compostos não são capazes de serem consumidos pelo microrganismo estudado.

Apesar de se poder tirar conclusões parciais nos ensaios em agitador orbital, como *R. eutropha* DSM 545 foi capaz de crescer e produzir P(3HB) a partir de vinhaça, estas são pouco definitivas, uma vez que não há controle adequado de pH, bem como da concentração de oxigênio dissolvido.

### 3.2.3.2 Cultivos em biorreator

Com o objetivo de se estudar a cinética de crescimento celular e produção de P(3HB) em vinhaça, foram realizadas três cultivos em batelada simples, em biorreator. Nestes experimentos buscou-se estudar o comportamento cinético de *R. eutropha* DSM 545, sob as seguintes condições: vinhaça pura, vinhaça pura com adição da fonte de nitrogênio e vinhaça adicionada dos nutrientes presentes no meio mineral (sais e nitrogênio).

Na Figura 3.6 estão apresentados os resultados de concentração de biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ) e P(3HB) ao longo do tempo. Na Figura 3.7 (a) encontram-se os dados da concentração de DQO e do nitrogênio, enquanto que na Figura 3.7 (b) são mostrados os dados de substratos residuais (açúcares redutores e glicerol), para o cultivo em biorreator contendo apenas vinhaça como substrato. As linhas contínuas

representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 3.6 Evolução de biomassa total ( $X_t$  ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$  (x)) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para *R. eutropha* DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça pura.

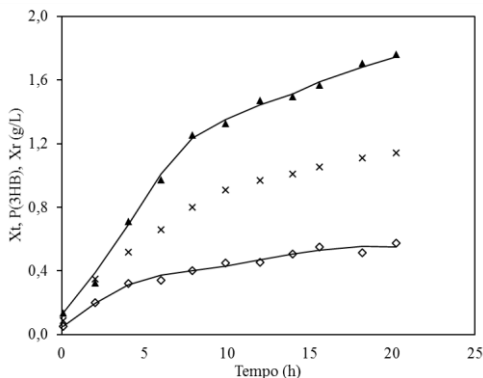
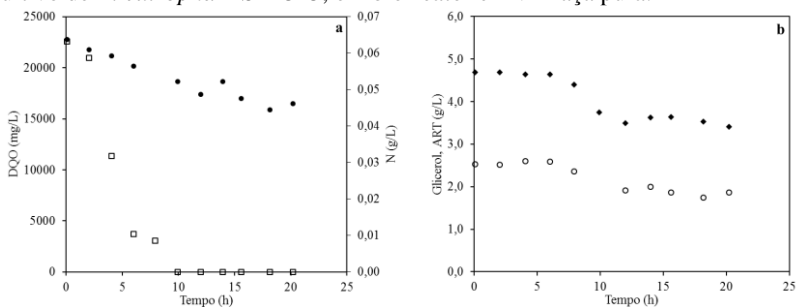


Figura 3.7 (a) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\bullet$ ) e (b) Concentração de glicerol ( $\blacklozenge$ ) e de açúcares redutores (ART) ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de *R. eutropha* DSM 545, em biorreator em vinhaça pura.



No cultivo em biorreator contendo vinhaça pura, a concentração  $X_t$  ao final do cultivo foi de 1,8 g/L, mostrando que, sob condições controladas de pH e oxigênio dissolvido, *R. eutropha* DSM 545 foi capaz de crescer a partir dos compostos presentes na vinhaça, sem adição de outros nutrientes. Na composição da vinhaça encontram-se alguns ácidos orgânicos, e sabe-se que estes podem ser tóxicos ou inibitórios para células microbianas, incluindo *R. eutropha*, particularmente em elevadas concentrações (YU; STAHL, 2008), porém no presente estudo não foi

observada esta inibição para esta bactéria. O  $\mu_{\text{máx}}$  de *R. eutropha* DSM 545 neste cultivo foi de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ .

Como a quantidade de nitrogênio disponível na vinhaça pura é baixa (inferior a  $0,1 \text{ g/L}$ ), é possível que o cultivo tenha permanecido sob limitação deste nutriente desde o início e o percentual de acúmulo de P(3HB) foi 29%. Como pode ser observado na Figura 3.7 (b), o glicerol presente na vinhaça não foi completamente consumido ao longo do cultivo. O consumo da DQO foi em torno de  $8000 \text{ mg/L}$ , restando um residual de aproximadamente  $15000 \text{ mg/L}$ .

Spoljaric e colaboradores (2013) investigaram as possibilidades de produção de PHAs com *R. eutropha* DSM 545, em meio mineral contendo glicerol adicionado na forma de pulsos ( $10 \text{ g/L}$ ). Esses autores afirmaram que períodos durante os cultivos em que a concentração de glicerol esteve menor do que  $5 \text{ g/L}$  causaram reduções na velocidade específica de crescimento, especialmente se a concentração de fonte de nitrogênio estivesse simultaneamente baixa. O mesmo comportamento não foi observado neste trabalho, pois mesmo com concentração inicial de glicerol abaixo de  $5 \text{ g/L}$ , não houve redução significativa no valor de  $\mu_{\text{máx}}$ , justificando-se essa diferença na presença dos demais nutrientes presentes na vinhaça.

Como a concentração de nitrogênio presente na vinhaça é baixa, foi realizado um cultivo em biorreator em vinhaça pura apenas com adição de nitrogênio (ureia), para verificar se a presença de nitrogênio no meio poderia influenciar positivamente nos resultados encontrados em vinhaça pura. Na Figura 3.8 estão apresentados os resultados de concentração de biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ), P(3HB) ao longo do tempo, para o cultivo em biorreator contendo vinhaça com adição de fonte de nitrogênio. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Na Figura 3.9 (a) e (b) são mostrados os dados de substratos residuais (ART, nitrogênio e glicerol) ao longo do tempo, para *R. eutropha* DSM 545 para o cultivo em biorreator com vinhaça e nitrogênio.

Figura 3.8 Evolução de biomassa total ( $X_t$  ( $\blacktriangle$ )), biomassa residual ( $X_r$  (x)) e P(3HB) ( $\diamond$ ) para *R. eutropha* DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça com adição de fonte de nitrogênio.

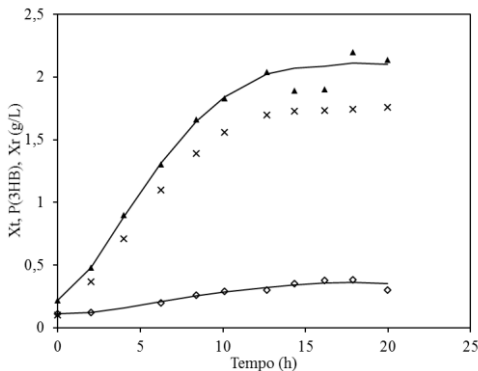
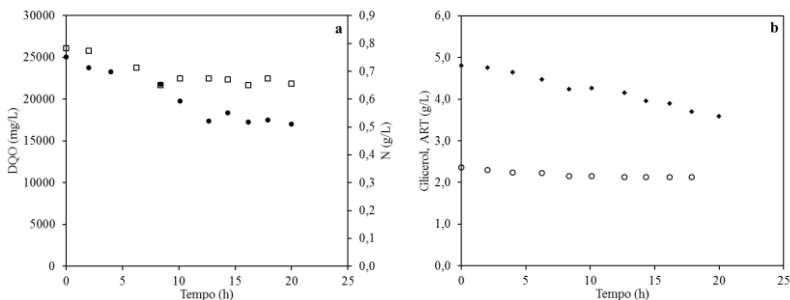


Figura 3.9 (a) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\bullet$ ) e (b) Concentração de glicerol ( $\blacklozenge$ ) e de açúcares redutores (ART) ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de *R. eutropha* DSM 545, em biorreator em vinhaça com adição de fonte de nitrogênio.



A diferença do cultivo com vinhaça pura em biorreator, como mostrado nas Figuras 3.8 e 3.9 foi a adição de nitrogênio, para concentração inicial de 0,8 g/L. Com a adição deste nutriente, a biomassa total final aumentou de 1,8 para 2,3 g/L, indicando que a quantidade de nitrogênio presente na vinhaça não foi suficiente para o crescimento de *R. eutropha* DSM 545, em biorreator. A velocidade específica máxima de crescimento da biomassa residual foi 0,29 h<sup>-1</sup>, sendo ligeiramente maior que a encontrada no primeiro cultivo em biorreator, discutido anteriormente (Figura 3.6).



O percentual de acúmulo de P(3HB) obtido neste cultivo foi de 15%. Este resultado já era esperado, dada a não limitação nutricional em nitrogênio, que é necessária para que a bactéria abordada neste trabalho entre em fase de produção de biopolímero (LYND, 1996).

O consumo de substratos, disponíveis no meio contendo vinhaça, foi semelhante ao observado no cultivo em biorreator contendo vinhaça pura, ou seja, apesar de carga orgânica disponível (DQO residual) e de alguns gramas de açúcares e glicerol residuais, o cultivo cessou em aproximadamente 15 horas.

Na Figura 3.10 estão apresentadas as curvas de concentração de biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ), P(3HB) ao longo do tempo, para o cultivo em biorreator contendo vinhaça adicionada do meio mineral sem limitação em nitrogênio (composição do meio descrita no item 3.3.2). As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage. Na Figura 3.11 (a) e (b) são mostrados os dados de substratos residuais (ART e glicerol) ao longo do tempo, para *R. eutropha* DSM 545 para o mesmo cultivo.

Figura 3.10 Evolução de biomassa total ( $X_t$  (▲)), biomassa residual ( $X_r$  (x)) e P(3HB) (◇) para *R. eutropha* DSM 545 ao longo do cultivo em biorreator em vinhaça em meio mineral.

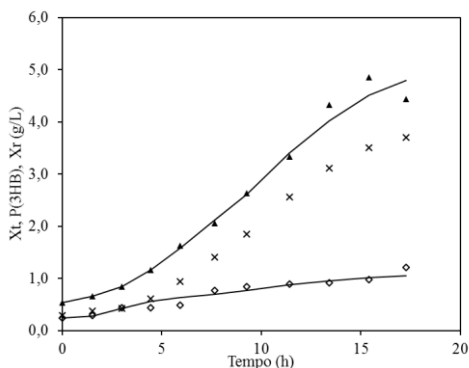
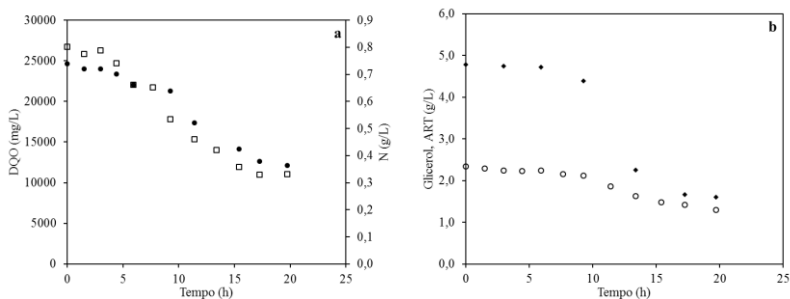


Figura 3.11 (a) Concentração de nitrogênio (N (□)) e de DQO (●) e (b) Concentração de glicerol (◆) e de açúcares redutores (ART) (○) ao longo do cultivo de *R. eutropha* DSM 545, em biorreator em vinhaça em meio mineral.



No cultivo apresentado na Figura 3.10, o diferencial do meio de cultura dos dois discutidos anteriormente, foi a adição de nutrientes componentes do meio mineral. Com a adição destes sais, a biomassa total aumentou para 5 g/L, demonstrando que os nutrientes presentes na vinhaça pura não foram suficientes para o bom desempenho do crescimento de *R. eutropha* DSM 545. A velocidade específica máxima de crescimento deste cultivo foi de  $0,21 \text{ h}^{-1}$ , valor que foi inferior aos encontrados nos dois cultivos em biorreator anteriormente mostrados. O que também pode ser observado nos dados dos substratos residuais (Figura 3.11), ao comparar com os cultivos em biorreator em vinhaça pura e vinhaça com nitrogênio, o consumo foi maior neste último e o percentual máximo de acúmulo de P(3HB) obtido neste cultivo foi em torno de 20%. Esse percentual de acúmulo era esperado, pois não ocorreu a limitação de nitrogênio.

Myshkina e colaboradores (2008), com o objetivo de produzir P(3HB) a partir de vinhaça (25% v/v) e outros resíduos, obtiveram acúmulo de 73% com o microrganismo *Azotobacter charoococcum*. O referido trabalho é um dos poucos encontrados contendo relatos de produção de P(3HB) a partir de vinhaça.

A Tabela 3.2 apresenta os principais dados obtidos nos experimentos conduzidos em biorreator durante a Etapa 1.

Tabela 3.2 Resumos dos dados obtidos nos cultivos em biorreator em modo batelada, com *R. eutropha* DSM 545 utilizando vinhaça pura, vinhaça com adição de nitrogênio e vinhaça em meio mineral.

| <b>Cultivo</b>                               | <b>Tempo<br/>(h)</b> | <b>Xt<br/>(g/L)</b> | <b>P(3HB)<br/>(g/L)</b> | <b><math>\mu_{\text{máx}}</math><br/>(h<sup>-1</sup>)</b> | <b>Glicerol<br/>consumido<br/>(g/L)</b> |
|--|----------------------|---------------------|-------------------------|---|---|
| Vinhaça pura                                 | 20                   | 1,8                 | 0,57                    | 0,26  | 1,3                                     |
| Vinhaça +<br>N <sub>(0,80 g/L)</sub>         | 20                   | 2,3                 | 0,35                    | 0,29  | 1,2                                     |
| Vinhaça +<br>N <sub>(0,80 g/L)</sub> +<br>MM | 17                   | 4,9                 | 1,2                     | 0,21  | 3,1                                     |

De forma geral, nos cultivos realizados durante esta Etapa 1, ficou evidente que, para que maiores concentrações de biomassa e de P(3HB) pudessem ser alcançados, a utilização de fonte de carbono adicional nos cultivos de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça, poderia ser considerada.

### 3.3 CONCLUSÕES – ETAPA 1

Os experimentos realizados com o objetivo de verificar uma possível inibição no crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça permitem dizer que esta bactéria é capaz de crescer utilizando este substrato nas concentrações estudadas, podendo utilizar até 100% (v/v), em meio mineral.

Os resultados observados com o estudo cinético do crescimento de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça mostraram que esta bactéria cresce com velocidades específicas máximas de crescimento maiores que às obtidas quando glicose é utilizada como substrato.

Os dados obtidos permitem concluir que *R. eutropha* DSM 545 é capaz de produzir P(3HB) a partir de vinhaça.

Em todos os cultivos realizados, foi observado que o crescimento da bactéria parou quando ainda havia disponibilidade de substratos. A análise dos substratos residuais que ainda estavam disponíveis para o crescimento, mostram uma concentração de glicerol (em torno de 3 g/L) que poderia ter sido utilizado por *R. eutropha* DSM 545.

Com a análise conjunta dos resultados obtidos durante esta etapa do trabalho, conclui-se que *R. eutropha* DSM 545 é capaz de crescer e produzir P(3HB) a partir de um resíduo abundante e poluente, a vinhaça, porém o desempenho desse microrganismo a partir deste substrato ainda poderia ser melhorado. Esse melhor desempenho pode ser alcançado através de técnicas de biologia molecular e/ou com diferentes estratégias de cultivo.

#### 4. CONSTRUÇÃO DA CEPA RECOMBINANTE, COM CAPACIDADE DE ASSIMILAR O GLICEROL DE FORMA MAIS EFICIENTE QUE *R. eutropha* DSM 545 - ETAPA 2

O glicerol é um dos principais constituintes da vinhaça e resultados anteriores indicaram limitações no consumo deste substrato por *R. eutropha* DSM 545. A segunda etapa deste trabalho visou a construção de uma cepa recombinante de *R. eutropha* DSM 545, através da inserção dos genes responsáveis pelo consumo de glicerol de *Escherichia coli* (*glpKF*), para obter uma cepa com capacidade de assimilar de forma mais eficiente o glicerol. Esta etapa foi desenvolvida no *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) – Cambridge/USA, durante o período de um ano, sob orientação do Professor Anthony J. Sinskey.

A partir resultados obtidos na Etapa 1 deste trabalho, que teve como objetivo principal realizar estudo do crescimento, produção de P(3HB) e análise de consumo dos substratos por *R. eutropha* DSM 545 em meio contendo vinhaça (em diluições que chegaram a 100% v/v), observou-se que esta bactéria foi capaz de crescer neste substrato, sem apresentar inibição. Porém, a produção de biomassa e de biopolímero foram relativamente baixas, quando comparadas a outros substratos, e o crescimento celular cessou quando matéria orgânica (verificada através de medidas da DQO) e glicerol ainda estavam disponíveis no meio (Figuras 3.8; 3.10; 3.12).

O glicerol também é um subproduto da indústria do biodiesel em crescente produção, sendo considerado um substrato abundante e de baixo custo. Portanto, para aprimorar o consumo do glicerol presente na vinhaça e/ou do glicerol, durante a segunda etapa deste trabalho, buscou-se aprimorar o consumo de glicerol em *R. eutropha* DSM 545, através da inserção dos genes de assimilação de *E. coli*.

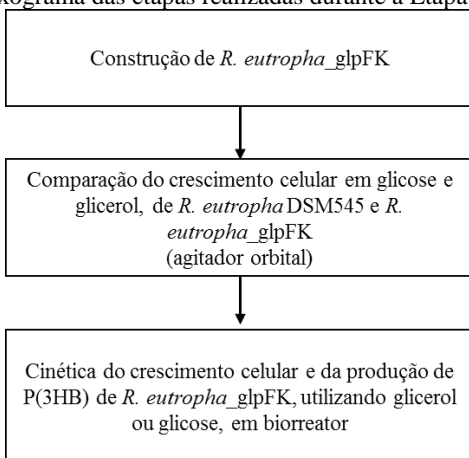
A escolha do microrganismo e a seleção dos genes que foram clonados foi realizada com base em trabalhos anteriores (FUKUI et al., 2014; RITTMANN; LINDNER; WENDISCH, 2008) que conferiram ou melhoraram a habilidade de assimilação do glicerol em bactérias, através da introdução dos genes *glpF* (aquaporina), *glpK* (glicerol quinase) e/ou *glpD* (glicerol 3-fosfato dehidrogenase) de *E. coli*.

Assim como *R. eutropha* DSM 545, a linhagem selvagem *R. eutropha* H16 também apresenta crescimento mais lento e menor produção de P(3HB) em glicerol que em glicose e frutose, respectivamente. Para tentar solucionar este problema, Fukui e colaboradores (2014) introduziram os genes *glpK*, *glpF* e *glpFK* (*glpK* + *glpF*) de *E. coli* em *R. eutropha* H16. Melhor habilidade de utilização de

glicerol foi atingida com a inserção dos genes *glpFK* e *glpK*. No trabalho desenvolvido por esses autores, análises das atividades enzimáticas foram conduzidas e a partir desses resultados, concluiu-se que a expressão de *glpFK<sub>Ec</sub>* (*glpF* + *glpK* de *E. coli*) foi mais favorável que a expressão única de *glpK*, para o crescimento em glicerol. Com base no trabalho desses autores, optou-se por expressar esses dois genes: *glpF* e *glpK* em *R. eutropha* DSM 545. Ainda baseado no trabalho citado, utilizou-se o gene A2858 de *R. eutropha*, como região alvo para a inserção dos genes.

A Figura 4.1 mostra o fluxograma das etapas desenvolvidas na Etapa 2 do presente trabalho.

Figura 4.1 Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 2.



## 4.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 2

### 4.1.1 Microrganismos e genes

Os microrganismos e os plasmídios utilizados nesta etapa do trabalho estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Bactérias e plasmídios utilizados neste trabalho.

| <b>Bactéria/Plasmídio</b>            | <b>Características</b>   | <b>Referência</b>                      |
|--------------------------------------|--|--|
| <i>Ralstonia eutropha</i><br>DSM 545 | Mutante espontânea para a utilização da glicose, resistente à gentamicina (Gen <sup>l</sup> )  | Schlegel; Trüper (1966)                |
| <i>Escherichia coli</i><br>JM109     | Cepa hospedeira dos genes clonados ( <i>glpFK</i> )  | Yanisch-Perron; Vieira; Messing (1985) |
| <i>Escherichia coli</i><br>S17-1     | Portadora dos genes: <i>recA</i> , <i>pro A</i> , <i>thi -1 hsdR</i> . Cepa utilizada para a transferência do plasmídio para <i>R. eutropha</i> via conjugação | Simon; Prierer; Pühler (1983)          |
| <i>Escherichia coli</i><br>TOP10     | Portadora dos genes: <i>F</i> , <i>araD139 D(ara, leu)7697</i> , <i>ΔlacX74</i> , <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>deoR</i> , <i>Φ80dlacZΔM15</i>  | Invitrogen                             |
| pk18mobSacB                          | pMB1 ori, Can <sup>r</sup> , <i>sacB</i>   | Schäfer et al. (1994)                  |
| pk18_A2858_glpFK                     | pK18mobsacB portando <i>glpFK</i> <i>Ec_A2858</i>  | Este trabalho                          |
| <i>Ralstonia eutropha</i> _glpFK     | Derivada de DSM 545. Portadora dos genes: <i>glpFK</i> <i>Ec</i>   | Este trabalho                          |

\*nomenclatura dos genes e das características descrita na lista “Nomenclatura e Abreviações”

As linhagens de *R. eutropha* foram estocadas em freezer a - 80 °C em suspensão no meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) contendo triptona (17 g/L), hidrolisado de soja (3 g/L), glicose (2,5 g/L), NaCl (5 g/L) e

$K_2HPO_4$  (2,5 g/L) e glicerol (1:1 v/v) e mantidas para utilização em placas de Petri contendo mesmo meio sólido (adicionado de 1,5% de ágar m/v) e com adição de gentamicina (10 mg/mL) a 4 °C. Para a reativação, essas linhagens foram incubadas em tubos de ensaio (18 mL) contendo 4 mL de meio TSB, sob agitação, em tambor rotatório, a 30 °C por 24 horas.

As linhagens de *E. coli* foram mantidas congelados (-80 °C) em meio LB (*Luria Broth*) que contém triptona (1 g/L), NaCl (1 g/L) e extrato de levedura (0,50 g/L) e glicerol (1:1 v/v) e em placas de Petri contendo o mesmo meio sólido, a 4 °C. Para reativação, as cepas foram inoculadas em 4 mL de meio LB (em tubos de ensaio de 18 mL) e as culturas foram mantidas sob agitação em tambor rotatório, a 37 °C por 24 horas.

#### **4.1.2 Principais técnicas utilizadas na construção da linhagem recombinante de *R. eutropha***

Na realização de todas as manipulações de DNA presentes neste trabalho, foram utilizadas técnicas padrão de biologia molecular ou seguindo-se as instruções dos fornecedores do material usado (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989; SAMBROOK, RUSSELL, 2001).

Os procedimentos comuns de várias etapas para obtenção da cepa recombinante estão descritos a seguir.

##### **4.1.2.1 *Design* e preparo da suspensão de *primers***

As informações acerca das sequências, para o *design* dos *primers*, foram retiradas de bases de dados disponíveis *on line*, como o *BacMap* (*An Interactive Atlas for Exploring Bacterial Genomes*) e o *Kegg* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). O *design* dos *primers* utilizados neste trabalho foi realizado pelo grupo de pesquisa do Laboratório do Professor Sinsky.

As suspensões estoque de cada *primer* foram preparadas com adição de água deionizada, para uma concentração final de 0,1 mM e mantidas congeladas. Os *primers* utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 6.2.



Tabela 4.2 *Primers* utilizados para a clonagem dos genes *glpF* e *glpK* de *E. coli* JM109, em *R. eutropha* DSM 545 (A parte em itálico da sequência é o local de sobreposição para a reação Gibson Assembly).

| <i>Primer</i> | Sequência  |
|---------------|--|
| A2858_int1    | <b>GCTTACCTCCATCCGTTGCCCGCTTC</b>                                |
| A2858_3b      | CTGCAGTCGACCCTGCGCGCCACGCC<br><b>G</b>                           |
| A2858_int2    | <b>ATGAGCGGTTGGAAAACCCTTCAT</b>                                  |
| A2858_5       | ATACCGTCGACGGTGCTGGCTCCGGAA<br><b>G</b>                          |
| <i>glp</i> _2 | <i>ATGAAGGGTTTTCCAACCGTCATTTATTC</i><br><b>GTCGTGTTCTTCCCAC</b>  |
| <i>glp</i> _1 | <i>GAAGCGGGCAACGGATGGAGGTAAGCATG</i><br><b>AGTCAAACATCAACCTT</b> |

#### 4.1.2.2 Reações de PCR

As reações de PCR foram utilizadas para amplificação e clonagem dos genes. As amplificações das sequências de DNA foram alcançadas utilizando as enzimas *Phusion DNA Polimerase* (New England Biolabs, Ipswich, MA), DNA polimerase *Phusion High Fidelity* (New England Biolabs) e os equipamentos de PCR *BioRad C1000 Touch ThermalCycler's* ou *Eppendorf MasterCycler ProS*.

Os componentes das reações de amplificação das sequências estão mostrados no Quadro 4.1.

Quadro 4.1 Relação dos componentes utilizados nas reações de PCR.

| <b>Componente</b>                        | <b>Volume (µL)</b> |
|--|--------------------|
| Água ( <i>nuclease free</i> )            | para 50            |
| 5X <i>Phusion HF</i> ou <i>GC Buffer</i> | 10                 |
| 10 mM dNTPs                              | 1                  |
| 10 µM <i>Forward primer</i>              | 2,5                |
| 10 µM <i>Reverse primer</i>              | 2,5                |
| DNA                                      | variável*          |
| Solução de DMSO                          | 1,5                |
| DNA polimerase                           | 0,5                |

\*para DNA genômico de 50 a 250 ng e para DNA plasmidial de 1 pg a 10 ng

As condições usadas nas reações de PCR foram estabelecidas de acordo com o fabricante da enzima: desnaturação inicial a 98 °C/30 s; 35 ciclos para desnaturação (98 °C por 5 a 10 s), anelamento (45 a 72 °C por

10 a 30 s) e extensão (72 °C por 15 a 30 s/pb), extensão final a 72 °C (5 min) e manutenção a 4 °C. O tempo de permanência em cada temperatura dependeu do tamanho do fragmento de interesse (número de pb).

A efetividade da amplificação foi verificada através da aplicação das amostras em gel de agarose (item 4.1.2.3).

#### 4.1.2.3 Análise em gel de agarose

Com a finalidade de visualizar os fragmentos de DNA de interesse e a efetividade das amplificações ou das transformações, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1% m/v). As corridas eletroforéticas foram realizadas em cuba de eletroforese horizontal (modelos Owl D2 e Owl B2, *Thermo Scientific*), a 110 V por 35 min (fonte *Power Pac 200*, *Bio Rad*) em solução tampão TAE 1x (Tris-base; EDTA 2mM, ácido acético glacial). Os fragmentos obtidos foram observados em coloração em gel com brometo de etídeo (0,1 mg/100 mL de TAE) e visualizados sob luz UV (254 nm). A aquisição das imagens a partir dos géis foi realizada com o auxílio do *software Lab Works* versão 4.6 (*Media Cybernetics*).

#### 4.1.2.4 Purificação e confirmação

As purificações foram realizadas para obtenção de material genético após a corrida em gel de agarose, para extração de DNA e também quando as purificações plasmidiais foram necessárias.

As extrações de DNA (genômico ou plasmidial) foram executadas utilizando-se o *kit QIA prep spin miniprep kit* (Qiagen, Valencia, CA), para as purificações de gel de agarose utilizou-se o *QIA quick gel extraction kit* (Qiagen, Valencia, CA) e para as purificações plasmidiais o *QIA purification PCR kit* (Qiagen, Valencia, CA). Após a purificação com a utilização do *kit*, o material genético permanecia em suspensão em aproximadamente 50 µL de solução tampão (proveniente do *kit*).

A quantificação da concentração de ácidos nucleicos (ng/µL) dessa suspensão foi realizada com o auxílio de equipamento *NanoDrop 1000* (*Thermo Scientific*), utilizando-se uma alíquota de 2 µL. Após essa quantificação, a suspensão foi mantida congelada (-18 °C).

#### 4.1.2.5 Digestão e ligação

Para que os genes possam ser clonados em um determinado vetor (plasmídeo), é necessário que o material genético de interesse seja digerido em fragmentos em tamanho compatível com o vetor em questão. Usam-se para este fim, as denominadas enzimas de restrição.

Para as digestões dos fragmentos de interesse deste trabalho (produtos de reações de PCR) e do vetor pk18mobsacB, foram preparadas reações contendo o material genético, a enzima de restrição SalI (*New England Biolabs*), seu respectivo tampão (solução concentrada 10 x), albumina (solução concentrada 100 x) como suplemento e água. A reação foi incubada a 37 °C durante 3 horas, em seguida a temperatura foi elevada a 80 °C e mantida assim por 20 min, finalizando o procedimento de digestão.

Os componentes das reações de digestão dos vetores estão mostrados no Quadro 4.2.

Quadro 4.2 Relação dos componentes utilizados nas reações de digestão de vetores.

| <b>Componente</b>             | <b>Volume (µL)</b> |
|-------------------------------|--------------------|
| Enzima SalI (20 U/µL)         | 1                  |
| Tampão NEBuffer 3             | 3                  |
| Albumina                      | 0,3                |
| Vetor                         | 10 - 20            |
| Água ( <i>nuclease free</i> ) | para 30            |

Os componentes das reações de digestão dos fragmentos estão mostrados no Quadro 4.3.

Quadro 4.3 Relação dos componentes utilizados nas reações de digestão dos fragmentos.

| <b>Componente</b>             | <b>Volume (µL)</b> |
|-------------------------------|--------------------|
| Enzima SalI (20 U/µL)         | 1                  |
| Tampão NEBuffer 3             | 5                  |
| Albumina                      | 0,5                |
| Fragmento                     | 20 - 40            |
| Água ( <i>nuclease free</i> ) | para 50            |

Após a digestão, é necessário realizar a ligação dos fragmentos obtidos. Para este fim foram utilizadas enzimas DNA ligase. Para as reações de ligação realizadas neste trabalho, utilizou-se uma proporção de aproximadamente 8:1 (fragmento:vetor). As suspensões para as ligações foram preparadas contendo o plasmídio e o fragmento a ser inserido (previamente digeridos), a enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*), seu respectivo tampão e água, estas reações foram incubadas *overnight* a 16 °C. Os componentes das reações de ligação estão mostrados no Quadro 4.4.

Quadro 4.4 Relação dos componentes utilizados nas reações de ligação.

| <b>Componente</b>             | <b>Volume*</b> |
|-------------------------------|----------------|
| Vetor                         | 150 ng         |
| Fragmento                     | 800 ng         |
| Tampão T4 ligase              | 8 µL           |
| T4 DNA ligase                 | 1 µL           |
| Água ( <i>nuclease free</i> ) | para 80 µL     |

\* quantidade utilizada de acordo com a concentração da suspensão estoque (ng/µL)

#### 4.1.2.6 Transferência de plasmídios pelo método do choque térmico

O método do choque térmico foi aplicado à linhagem *E. coli* Top10 para a inserção do plasmídio contendo os genes de interesse.

A um volume de 150 µL de células competentes de *E. coli* Top10 (armazenadas a -80 °C e preparadas conforme protocolo presente no Apêndice II), foram adicionados 60 µL de material genético. Este volume de reação foi mantido em banho de gelo durante 1 hora, seguido de banho de água a 42 °C durante 90 segundos e novamente banho de gelo por 5 min. Em seguida, 900 µL de meio SOC (*super optimal broth*, contendo em g/L: 20 de triptona, 5 de extrato de levedura, 0,5 de NaCl, 0,186 de KCl, 0,952 de MgCl<sub>2</sub> e 3,6 de glicose) foram adicionados e o sistema foi incubado por 1 hora a 37 °C, sob agitação. Decorrido o tempo de incubação, as células foram separadas do meio e plaqueadas em meio seletivo (LB + Cam). As colônias que cresceram no meio seletivo foram selecionadas e submetidas ao procedimento PCR de colônia. Uma vez dada a confirmação através de corrida no gel de agarose (item 4.1.2.3) de uma colônia correta (com tamanho esperado) esta foi purificada com uso do QIA quick *gel extraction kit* (item 4.1.2.4). Em seguida, as amostras foram enviadas para análise para confirmação da sequência.

Para a obtenção do sequenciamento, as amostras foram preparadas (suspensão contendo o material genético a ser analisado, o respectivo par de *primers* e água) e enviadas para a empresa *Quintara Biosciences* (Boston, EUA). Assim que os dados eram obtidos, estes eram verificados com o auxílio do *software SnapGene*.

Os componentes das reações PCR de colônia estão mostrados no Quadro 4.5.

Quadro 4.5 Relação dos componentes utilizados nas reações de PCR de colônia.

| <b>Componente</b>                      | <b>Volume (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|--|--|
| Água ( <i>nuclease free</i> )          | para 50                                  |
| Tampão <i>One Taq</i>                  | 10                                       |
| 10 mM dNTPs                            | 1  |
| 10 $\mu\text{M}$ <i>Forward primer</i> | 1  |
| 10 $\mu\text{M}$ <i>Reverse primer</i> | 1  |
| DNA                                    | 1 colônia                                |
| Solução de DMSO                        | 1,5                                      |
| <i>One Taq</i> DNA polimerase          | 0,5                                      |

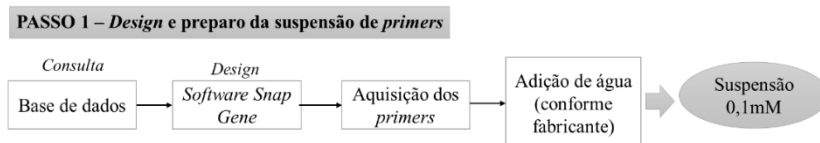
#### 4.1.3 Construção da linhagem recombinante de *R. eutropha*

Os passos necessários para obtenção da *R. eutropha* recombinante são detalhados a seguir.

##### Passo 1 – Design e preparo da suspensão de primers:

A obtenção da suspensão dos primers utilizados neste trabalho foi realizada conforme o item 4.1.2.1 e está representada na Figura 4.2.

Figura 4.2 Representação do Passo 1 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.

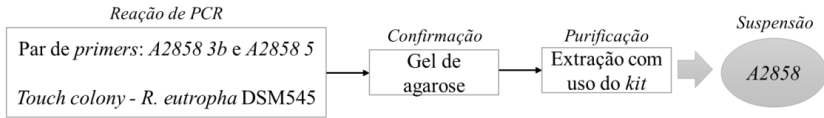


##### Passo 2 – Amplificação e obtenção de suspensão contendo o gene A2858:

A amplificação e obtenção do gene A2858 (Figura 4.3) se iniciou com uma reação de PCR, conforme descrito no item 4.1.2.2. Para esta reação, utilizou-se uma porção de colônia de *R. eutropha* DSM 545 (*touch colony*). A etapa de confirmação foi realizada como descrito no item 4.1.2.3. A purificação e obtenção da suspensão do gene A2858 foram realizadas conforme item 4.1.2.4, utilizando-se o QIA quick *gel extraction kit*. O gene A2858 foi selecionado como local alvo para a inserção dos genes heterólogos, pois esse gene foi monocistônico e os níveis de transcrição são elevados durante o crescimento em frutose (FUKUI, et al., 2014).

Figura 4.3 Representação do Passo 2 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.

**PASSO 2 – Amplificação e obtenção de suspensão contendo o gene A2858**



**Passo 3 – Obtenção do plasmídeo pk18\_A2858:**

Para a obtenção do plasmídeo pk18\_A2858 (Figura 4.4), o fragmento de DNA obtido no Passo 2 (A2858) e o vetor pk18mobsacB foram digeridos separadamente (conforme método descrito no item 4.1.2.5).

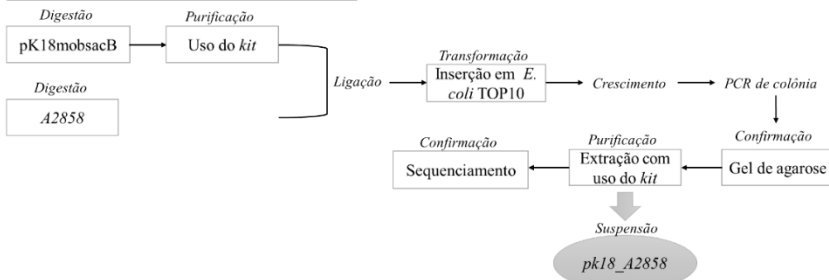
Após a digestão, o plasmídeo foi purificado conforme item 4.1.2.4 (QIA *purification PCR kit*) e com o fragmento de DNA de *R. eutropha* (A2858) foi então ligado (conforme método descrito no item 4.1.2.5) a 16 °C/*overnight*.

Para confirmar se a ligação do fragmento com o vetor foi bem sucedida, é necessário inserir o plasmídeo resultante em células competentes para propagação do mesmo, o que permite o posterior sequenciamento.

As células competentes de *E. coli* Top10 (aquelas que se encontram em um estado fisiológico que as torna capazes de receberem DNA exógeno), foram previamente preparadas, por método padrão de biologia molecular. Para inserção do plasmídeo nessas células, fez-se uso do método do choque térmico (item 4.1.2.6). O plasmídeo resultante pk18\_A2858 foi purificado (item 4.1.2.4) e armazenado congelado.

Figura 4.4 Representação do Passo 3 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.

**PASSO 3 – Obtenção do plasmídeo pk18\_A2858**



#### Passo 4 - Amplificação e obtenção de suspensão contendo os genes *glpFK*:

Para a obtenção dos genes responsáveis pelo consumo de glicerol de *E. coli* JM109, o fragmento *glpFK<sub>Ec</sub>* (2,6 kbp) foi amplificado através de reação de PCR (item 4.1.2.2) com o par de *primers glp1* e *glp2*. Após a reação de PCR, o produto foi confirmado através de corrida em gel de agarose (item 4.1.2.3) e purificado conforme item 4.1.2.4 e armazenado congelado, como representado na Figura 4.5.

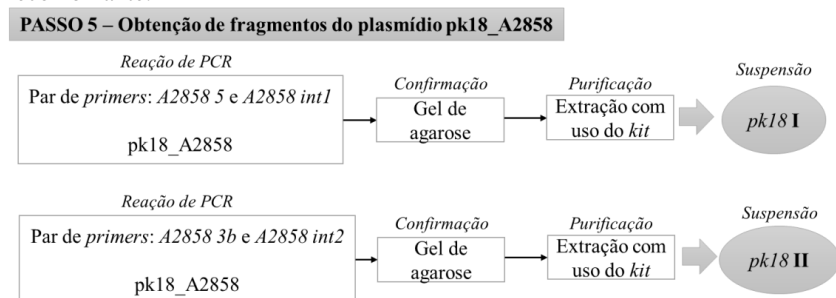
Figura 4.5 Representação do Passo 4 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.



#### Passo 5 – Obtenção de fragmentos do plasmídio pk18\_A2858

Para a obtenção de dois fragmentos do plasmídio contruído no Passo 3, o plasmídio obtido (pk18\_A2858) foi submetido à reação de PCR (conforme item 4.1.2.2) com os pares de *primers: A2858-5 + A2858\_int1* e *A2858-3b + A2858\_int2*. Após as reações de PCR, os produtos foram confirmados através de corrida em gel de agarose (item 4.1.2.3) e purificados conforme item 4.1.2.4 e mantidos congelados. A representação do Passo 5 está mostrada na Figura 4.6.

Figura 4.6 Representação do Passo 5 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.



### Passo 6 – Reação de Gibson-Assembly

Os três fragmentos resultantes: *glpFK<sub>Ec</sub>* (obtido no Passo 4) e *pk18I* e *pk18II* (obtidos no Passo 5) foram submetidos a uma reação de “*Phusion PCR Gibson Assembly*” para a ligação dos mesmos, como mostra a Figura 4.7.

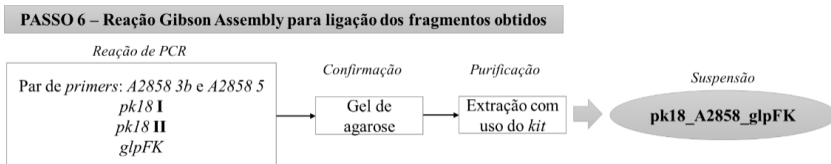
A reação de Gibson Assembly permite a “ligação” de diferentes fragmentos de DNA, independente do tamanho. A reação inclui diferentes enzimas que trabalham juntas na mesma solução: uma exonuclease, uma polimerase e uma DNA ligase. Os componentes da reação de Gibson Assembly estão mostrados no Quadro 4.6. Após a reação, o produto foi confirmado através de corrida em gel de agarose (item 4.1.2.3) e purificado conforme item 4.1.2.4 e armazenado congelado.

Quadro 4.6 Relação dos componentes utilizados na reação de Gibson Assembly.

| <b>Componente</b>                  | <b>Volume (µL)</b> |
|------------------------------------|--------------------|
| Água ( <i>nuclease free</i> )      | para 20            |
| Solução master mix Gibson Assembly | 10                 |
| 10 µM <i>Forward primer</i>        | 2,5                |
| 10 µM <i>Reverse primer</i>        | 2,5                |
| Razão de DNA (vetor: fragmento)    | (1:2)*             |

\*dependendo das concentrações das suspensões estoque, em ng/µL

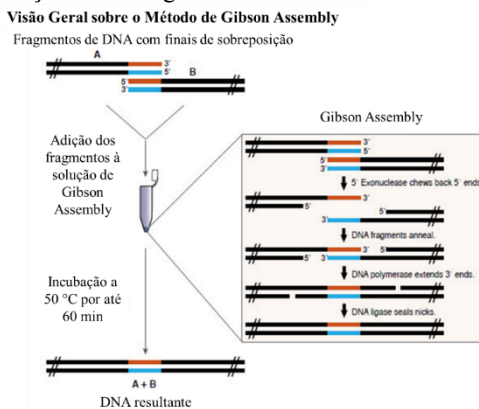
Figura 4.7 Representação do Passo 6 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante





A Figura 4.8 mostra uma ilustração deste método, para a ligação de 2 a 3 fragmentos de DNA.

Figura 4.8 Ilustração da visão geral sobre o método de “Gibson Assembly”.



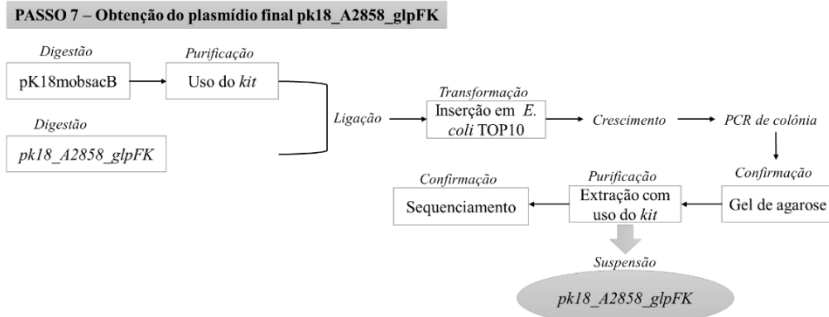
Fonte: <https://www.neb.com/protocols/2012/09/25/gibson-assembly-master-mix-assembly>

### Passo 7 – Obtenção do plasmídeo final: pk18\_A2858\_glpFK

Para a obtenção do plasmídeo final, o produto da reação de Gibson Assembly (Passo 6) e o plasmídeo pk18mobsacB foram digeridos com a enzima de restrição Sall, a 37 °C durante 2 horas, conforme item 4.1.2.5.

Concluído o processo de digestão, o plasmídeo foi purificado (item 4.1.2.4) e em seguida foi realizado o processo de ligação (item 4.1.2.5) (16 °C/*overnight*). Após este processo, deu-se a transformação em células competentes de *E. coli* Top10, conforme item 4.1.2.6. A representação do Passo 7 está mostrada na Figura 4.9.

Figura 4.9 Representação do Passo 7 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.



### Passo 8 – Inserção do plasmídio final em *R. eutropha*

No último passo para a obtenção de *R. eutropha* recombinante (Figura 4.10), o plasmídio resultante (pk18\_A2858\_glpFK) foi purificado e então transformado em células eletrocompetentes de *E. coli* S17-1 (preparadas conforme o protocolo presente no Apêndice II) que foram utilizadas como doadoras para a transferência à *R. eutropha* DSM 545. Utilizaram-se células eletrocompetentes de *E. coli* S17-1, devidamente preparadas e armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

A eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos curtos de alta voltagem que aumentam o potencial de transporte de membrana, promovendo uma formação transitória de poros aquosos na bicamada lipídica, permitindo que macromoléculas migrem através desses poros.

Para a transformação por eletroporação, alíquotas (de 1 a 3  $\mu\text{L}$ ) do material genético foram adicionadas ao microtubo contendo as células eletrocompetentes de *E. coli* S17-1 e estes colocados em banho gelo por 5 min, em seguida transferidas para cubetas específicas, a mesma foi fechada e acoplada ao equipamento.

As condições para a eletroporação foram capacitância de 25  $\mu\text{F}$ ; resistência mínima de 200 ohms e voltagem de 2,5 kV no equipamento *Gene Pulser (BioRad)*. Após esse procedimento, um volume de 300  $\mu\text{L}$  de meio LB foi adicionado à cubeta, o conteúdo foi transferido para microtubo plástico e este permaneceu a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, sob agitação. Decorrido esse tempo, as células foram separadas do meio por centrifugação, ressuspensas em 200  $\mu\text{L}$  de meio LB e então plaqueadas em meio seletivo (LB + Cam) e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas.

Após a seleção das cepas de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídio com os genes de interesse, realizou-se conjugação com *R. eutropha*

DSM 545 utilizando-se metodologia padrão (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983). A conjugação consiste em um procedimento de transferência genética que requer contato célula-célula (receptora: *R. eutropha* DSM 545 e doadora: *E. coli* S1-1).

É importante lembrar que *R. eutropha* é naturalmente resistente ao antibiótico gentamicina.

As linhagens de *E. coli* e de *R. eutropha* cresceram até atingirem a fase exponencial de crescimento em meio de cultivo apropriado. *R. eutropha* cresceu em meio TSB/Gen10 por 48 horas e *E. coli* em meio LB/Cam durante 24 horas. Decorrido tempo de incubação, 1 mL de cada cultura foi centrifugado em microtubo de plástico e ressuspensão em água salina 0,85%, este processo foi repetido por 2 vezes. Em seguida, combinaram-se volumes das culturas para que a concentração celular final fosse equivalente (aproximadamente 20 µL de *R. eutropha* e 30 µL de *E. coli*). Este volume de “células combinadas” foi colocado diretamente em placas de Petri (contendo meio LB sólido + 0,2% de frutose) sobre um filtro de nitrocelulose (0,45 µm) localizado no centro da placa e as placas foram incubadas a 30 °C/48 horas.

Aproximadamente metade das células que cresceram sobre o filtro foram removidas com auxílio de um palito de madeira estéril e ressuspensas em 100 µL de água salina 0,85%, este volume foi transferido para placas contendo LB + 0,2% frutose + Gen10 + Cam300 (gentamicina para excluir as células de *E. coli* S17-1 e canamicina para selecionar em quais o plasmídeo foi integrado) e estas permaneceram por 48 horas a 30 °C. As colônias que cresceram nesta etapa foram transferidas para crescerem por 18 horas em meio TSB + Gen10.

Em seguida, 1 mL dessa cultura foi centrifugado e ressuspensão em água salina 0,85% (m/v) e diluições em série desta mesma foram realizadas, 100 µL de cada diluição (10, 100 e 1000) foram transferidos para placas contendo meio LB + 0,2% de frutose + 5% de sacarose + Gen10 (meio LB sem NaCl), as placas foram incubadas a 30 °C por mais 48 horas. As colônias que cresceram foram transferidas para 2 placas contendo meios seletivos (TSB + Gen10 e LB + 0,2% frutose + Gen10 + Cam300) e mantidas a 30 °C por 24 horas. Dessas colônias, as que cresceram em meio TSB contendo Gen10 e não cresceram em meio LB + 0,2% frutose + Gen10 + Cam300.

As colônias que cresceram no meio seletivo foram selecionadas diversas vezes e submetidas ao procedimento PCR de colônia, com os pares de *primers* A2858-3b e A2858-5. Uma vez dada a confirmação através de corrida no gel de agarose de uma colônia correta (com tamanho

esperado) esta foi purificada com uso do *kit* (item 4.1.2.4). Em seguida, as amostras eram enviadas para sequenciamento para confirmação.

Figura 4.10 Representação do Passo 8 para a obtenção de *R. eutropha* recombinante.

**PASSO 8— Inserção do plasmídio final em *R. eutropha* DSM545**



#### 4.1.4 Meios e condições de cultivo para estudo do crescimento de *R. eutropha\_glpFK*

##### 4.1.4.1 Pré-culturas

Os cultivos realizados nesta Etapa 2 tiveram início a partir da transferência de uma colônia isolada, estocada em meio sólido (4 °C), para 4 mL de meio TSB contendo gentamicina (10 mg/mL) em tubos de ensaio (18 mL). A cultura foi conduzida *overnight* em tambor rotatório (*roller*) a 30 °C.

##### 4.1.4.2 Cultivos em agitador orbital

Para investigar o crescimento da cepa de *R. eutropha* recombinante obtida frente à *R. eutropha* DSM 545, foram realizados cultivos em agitador orbital, utilizando 5 g/L de glicerol e glicose, separadamente (para efeito comparativo), em meio mineral. A composição do meio mineral, sem limitação de nitrogênio, foi a mesma utilizada na Etapa 1 deste trabalho (item 3.1.3).

A pré-cultura obtida em meio TSB serviu como inóculo (10% v/v) para esses cultivos. Esses foram conduzidos em frascos *erlenmeyer* de 250 mL, com volume útil de 25 mL, a 30 °C/200 rpm, durante o tempo necessário para que cepas alcançassem a fase estacionária de crescimento.

##### 4.1.4.3 Cultivos em biorreator

Com o intuito de analisar o crescimento e a produção de P(3HB) por *R. eutropha\_glpFK*, foram realizados dois experimentos em biorreator, um deles em glicerol e outro em glicose, para efeito comparativo. As concentrações iniciais da fonte de carbono foram 25 g/L e da fonte de nitrogênio 0,5 g/L.

A primeira pré-cultura foi conduzida como descrita no item 4.1.3.1 e a segunda em meio mineral contendo 25 g/L de glicerol ou 25 g/L de glicose, cultivada a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, durante 24 horas para glicose e 36 horas para o glicerol.

As células obtidas na segunda pré-cultura serviram como inóculo para biorreator de 500 mL, com volume útil de 400 mL, com concentração da fonte de nitrogênio de 0,5 g/L, para permitir o acúmulo de P(3HB). A Figura 4.11 mostra o biorreator utilizado.

Figura 4.11 Biorreator utilizado para realização dos cultivos da Etapa 2 deste trabalho.



## 4.1.5 Determinações analíticas

### 4.1.5.1 Amostragem

Nos cultivos realizados em agitador orbital, amostras de aproximadamente 2 mL, foram retiradas para a determinação do crescimento celular através da leitura da densidade ótica (em triplicata) a 600 nm.

Alíquotas de aproximadamente 10 mL foram retiradas dos cultivos realizados em biorreator e coletadas em tubos de polipropileno de 15 mL, previamente pesados. As amostras foram centrifugadas durante 10 min a 6500 g e 5 mL do sobrenadante foi congelado para posteriores análises de consumo de substrato.

### 4.1.5.2 Determinação da concentração da biomassa

Os *pellets* obtidos durante as amostragens do biorreator foram lavados com 10 ml de água destilada, estas células foram então ressuspensas em 2 mL de água, congeladas a -80 °C, liofilizadas e a biomassa total foi determinada por gravimetria.

#### 4.1.5.3 Determinação das concentrações de glicerol e glicose

Os sobrenadantes das culturas foram filtrados (poro de 0,2  $\mu\text{m}$ ) e analisados por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em um equipamento Hewlett-Packard series 1050, para a determinação de glicerol e glicose residual. O HPLC estava equipado com uma coluna (Hewlett-Packard modelo 1047A) com detector de índice de refração.

#### 4.1.5.4 Determinação da concentração de P(3HB)

O conteúdo de P(3HB) a partir das células secas foi quantificado por cromatografia gasosa (Agilent GC 6850) utilizando um protocolo de metanólise descrito por Budde e colaboradores (2011). Neste procedimento, padrão puro de P(3HB) (Sigma) foi utilizado para gerar a curva de calibração.

Como o P(3HB) é intracelular, a concentração de biomassa residual foi definida como a concentração de biomassa total menos a concentração de P(3HB).

### **4.1.6 Tratamento dos dados**

A metodologia para o tratamento dos dados desta etapa foi a mesma utilizada na Etapa 1 deste trabalho (ver item 3.1.5).

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 2

### 4.2.1 Obtenção da linhagem recombinante de *R. eutropha*

Os perfis de migração em eletroforese dos fragmentos amplificados (utilizando os *primers* mencionados na metodologia da Etapa 2) estão mostrados na Figura 4.12.

A primeira parte da Etapa 2, consistiu em obter um fragmento *R. eutropha* DSM 545 que foi selecionado como região alvo para a inserção dos genes, com base nos seus elevados níveis de transcrição em crescimento em frutose (SHIMIZU et al., 2013). A Figura 4.12 (a) apresenta o perfil de migração em gel de agarose do fragmento de aproximadamente 1,5 kpb. Uma vez obtivo este fragmento, ele foi inserido no vetor de clonagem pk18mobsacB (5,6 kpb) resultando em um vetor com aproximadamente 7 kpb (Figura 4.12 (b)).

Paralelo a esse procedimento, um fragmento de 2,6 kpb, contendo os genes que codificam as enzimas responsáveis pelo consumo de glicerol em *E. coli glpF* (aquaporina) e *glpK* (glicerol quinase) foi obtido (Figura 4.12 (c)). Por fim, através de uma reação de PCR – Gibson Assembly, fragmentos do plasmídeo obtido primeiramente pk18\_A2858 e o fragmento contendo os genes de interesse (*glpFK*) foram ligados para a construção do plasmídeo final: pk18\_A2858\_glpFK (Figura 4.12 (d)). O mapa do plasmídeo construído está mostrado na Figura 4.13.

Figura 4.12 Perfil de migração em gel de agarose (1 % - m/v) dos fragmentos obtidos. **a-** produto de PCR de *R. eutropha* DSM 545; **b-** produto de ligação de pk18mobsab e o gene A2858; **c-** produto de PCR de *E. coli* contendo os genes de interesse *glpFK*; **d-** produto de PCR de pk18\_A2858\_glpFK. O lado direito das imagens mostra o perfil de migração do controle, com os respectivos tamanhos mostrados em kpb e o lado esquerdo mostra o perfil de migração dos resultados obtidos.

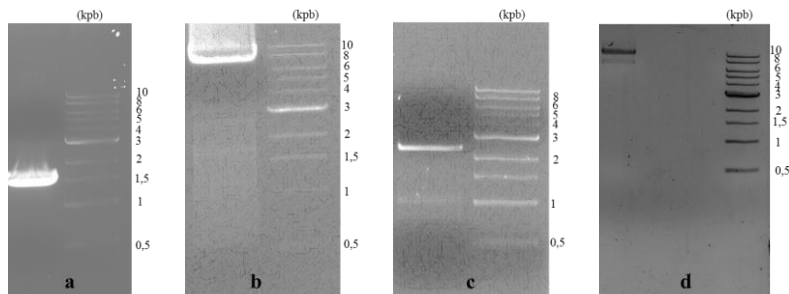
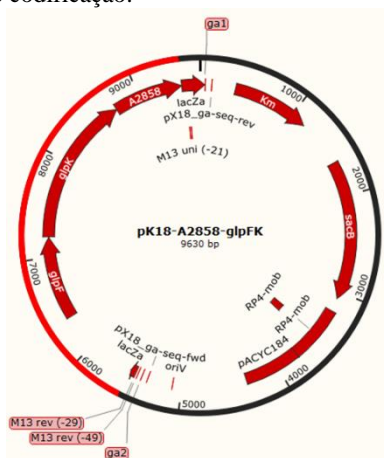


Figura 4.13 Mapa representativo do plasmídeo pk18-A2858-glpFK, desenvolvido neste trabalho, contendo os genes clonados (*glpF* e *glpK*), o gene resistência ao antibiótico canamicina (*Km*), os genes estão indicados na figura por setas. Para a criação do mapa foi utilizado o programa *SnapGene* (Versão 2.8.3 - GSL Biotech LLC). O gene *sacB* foi modificado para eliminar os locais *HindIII* e *EcoRI* na região de codificação.



O plasmídeo resultante (pk18\_A2858\_glpFK) foi clonado primeiramente em *E. coli* TOP10, e selecionado pela resistência ao

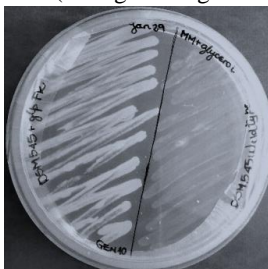


antibiótico canamicina que é promovida pelo vetor (pk18mobsacB). Após avaliação visual do crescimento em placas, os clones positivos foram submetidos à triagem por PCR (PCR de colônia); seguida de corrida em gel de agarose, com o objetivo de selecionar os clones corretos, com tamanho de 9,7 kpb. Em seguida, realizou-se a transformação em *E. coli* S17-1, para posterior transferência do plasmídio resultante para *R. eutropha* DSM 545. A linhagem de *E. coli* S17-1 foi utilizada pois contém os genes que permitem a transferência de plasmídios por conjugação (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983).

Como a conjugação de *E. coli* S17 para *R. eutropha* DSM 545 possui diversas etapas, isto pode levar a mutações indesejadas. Cabe citar que foram obtidos clones “falso positivos” durante a conjugação e o processo precisou ser repetido até a obtenção de uma cepa capaz de expressar os genes inseridos de forma eficiente. Para efeito comparativo com a cepa selvagem *R. eutropha* H16, o plasmídio construído neste trabalho também foi inserido nesta bactéria e seu comportamento foi similar ao obtido à *R. eutropha* DSM 545 (dados não mostrados).

Uma vez obtida a cepa recombinante, esta foi submetida à análise do crescimento e comparação do comportamento com *R. eutropha* DSM 545. Em meio mineral sólido contendo glicerol como única fonte de carbono, os crescimentos da cepa recombinante e da cepa parental foram avaliados visualmente. Após aproximadamente 72 horas a 30 °C, a cepa parental quase não apresentou crescimento, em contraste a *R. eutropha\_glpFK* que apresentou crescimento mais pronunciado em glicerol, como mostra a Figura 4.14.

Figura 4.14 Crescimento de *R. eutropha* DSM 545 (lado direito da placa) e *R. eutropha\_glpFK* (lado esquerdo da placa) em meio mineral sólido contendo glicerol como fonte de carbono (10 mg/ml de gentamicina), após 72 h a 30 °C.



O crescimento de *R. eutropha* recombinante, construída neste trabalho, foi semelhante ao observado em *R. eutropha* H16 quando foi geneticamente modificada para mais eficiente utilização de glicerol

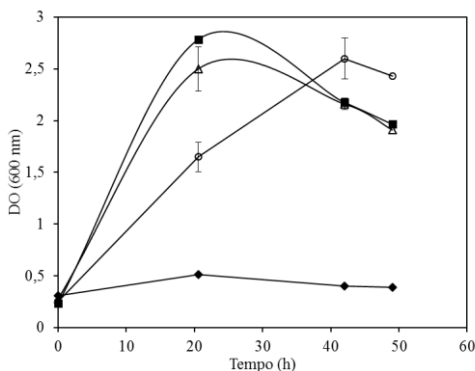
(FUKUI et al., 2014). Em meio sólido, *R. eutropha* H16 e *R. eutropha* H16\_glpF praticamente não apresentaram crescimento após 72 h de cultivo e cresceram ligeiramente após 144 h de incubação. Em contraste, *R. eutropha* H16\_glpFK e *R. eutropha* H16\_glpK conseguiram crescer bem em glicerol após 72 h.

#### 4.2.2 Avaliação do crescimento e produção de P(3HB) por *R. eutropha*\_glpFK

O crescimento celular e a produção de P(3HB) da cepa recombinante foi investigado em meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e glicose (para efeito comparativo).

Primeiramente, *R. eutropha* recombinante foi avaliada em comparação à *R. eutropha* DSM 545 em meio mineral contendo glicerol (5 g/L) ou glicose (5 g/L), em cultura conduzida em agitador orbital. Esses valores foram empregados em função de ser a concentração aproximada de glicerol presente na vinhaça. As curvas de crescimento, expressas em densidade ótica (600 nm), estão mostradas na Figura 4.15.

Figura 4.15 Curvas de crescimento de *R. eutropha*\_glpFK, em meio mineral contendo 5 g/L de glicerol (○) e 5 g/L de glicose (Δ) e *R. eutropha* DSM 545 em meio mineral contendo 5 g/L de glicerol (◆) e 5 g/L de glicose (■) expressas em densidade ótica (600 nm) ao longo do cultivos em agitador orbital.



Como previamente observado em meio sólido, *R. eutropha*\_glpFK e *R. eutropha* DSM 545 apresentaram crescimentos diferentes em meio líquido contendo glicerol como substrato. Decorridas aproximadamente 50 h, a recombinante foi capaz de crescer (DO de 2,5) em glicerol, enquanto *R. eutropha* DSM 545 praticamente não apresentou crescimento. As duas cepas mostraram ainda crescimento similar em

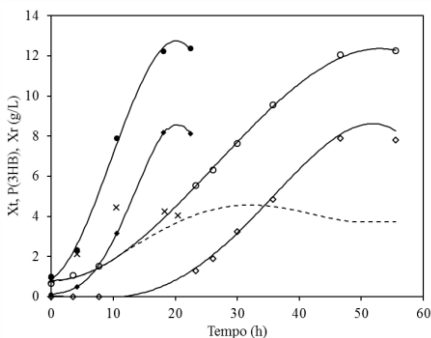
glicose, indicando que a expressão dos genes *glpFK<sub>Ec</sub>* não afetou o metabolismo de *R. eutropha* recombinante.

Diferentemente de *R. eutropha*, a bactéria *Corynebacterium glutamicum* não é capaz de utilizar glicerol, mesmo após tempo de incubação prolongado (CAVALHEIRO et al., 2009). Rittmann, Lindner e Wendish (2008) descreveram como alterar geneticamente *C. glutamicum* para crescer em glicerol e sua aplicação para produção de amino ácidos. Para isso, construíram 6 plasmídios contendo os genes de assimilação do glicerol de *E. coli* combinados ou individualmente: *glpF*, *glpK*, *glpD*, *glpFK*, *glpFD* e *glpFKD*. Experimentos de crescimento (através do acompanhamento da densidade ótica) com as recombinantes foram conduzidos em glicose ou glicerol, ao passo que todas as cepas cresceram da mesma maneira e concentrações similares ao final dos cultivos com glicose, assim como o observado no presente trabalho, enquanto que apenas as recombinantes contendo os genes *glpKD* e *glpFKD* foram capazes de crescer em glicerol. Ficou assim demonstrado, que a expressão heteróloga dos genes responsáveis por glicerol quinase (*glpK*) e glicerol 3-fosfato dehidrogenase (*glpD*) de *E. coli* foi suficiente para estabelecer a utilização de glicerol em *C. glutamicum*. A recombinante contendo *glpFKD* cresceu mais rapidamente que *glpKD*, indicando assim, que a expressão da aquaporina também foi vantajosa para esta bactéria, assim como para *R. eutropha*.

A fim de avaliar o crescimento e a produção de P(3HB) a partir de *R. eutropha\_glpFK* construída neste trabalho, utilizando glicerol ou glicose (para efeito comparativo) como fontes de carbono, dois cultivos em biorreator foram realizados em meio mineral com concentração inicial de 25 g/L da fonte de carbono. Os cultivos em biorreator foram analisados quanto à biomassa total ( $X_t$ ), biomassa residual ( $X_r$ ) e P(3HB).

A Figura 4.16 mostra o dados obtidos para o cultivo de *R. eutropha\_glpFK* em biorreator, em meio mineral contendo glicose ou glicerol como fontes de carbono. Como o objetivo foi comparar o crescimento e a produção de P(3HB) a concentração inicial de N foi 0,5 g/L. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software Microsoft Excel*.

Figura 4.16 Evolução da biomassa total ( $X_t$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ )), biomassa residual ( $X_r$  (---,  $\times$ )) e P(3HB) ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ) de *R. eutropha\_glpFK*, respectivamente para glicerol e glicose como fontes de carbono em biorreator, ao longo do cultivo conduzido em modo batelada.



Ao final dos cultivos, a concentração final de biomassa total foi similar e próxima a 12 g/L para ambos os substratos. Mas a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) foi de 0,14 h<sup>-1</sup> (22 h para atingir a fase estacionária) e de 0,11 h<sup>-1</sup> (50 h para atingir a fase estacionária) para os meios com glicose e glicerol, respectivamente. Cabe ressaltar que nos dois cultivos mostrados na Figura 4.16, *R. eutropha* recombinante não apresentou fase de adaptação ao meio (dados não mostrados, observados em gráfico do logaritmo neperiano da biomassa residual em função do tempo).

A velocidade específica de crescimento observada para esta bactéria, no cultivo em glicose, foi inferior aos dados encontrados na literatura para a *R. eutropha*, que é em torno de 0,20 h<sup>-1</sup> (IENCZAK et al., 2011). Comportamento similar foi observado na publicação que utilizou a cepa de *R. eutropha* H16\_glpFK, em que esta recombinante cresceu com velocidade específica máxima de crescimento em glicerol de 0,15 h<sup>-1</sup>, ligeiramente superior à encontrada no presente trabalho (FUKUI et al., 2014).

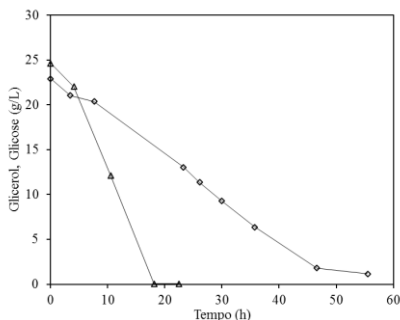
Dependendo das condições experimentais, a velocidade específica máxima de crescimento é normalmente menor em glicerol (aproximadamente 0,11 h<sup>-1</sup>) do que em glicose (0,20 h<sup>-1</sup>) (LOPAR et al., 2014; REINECKE; STEINBUCHER, 2009; TANADCHANGSAENG; YU, 2012). Glicerol é a fonte típica de carbono que pode ser metabolizada por microrganismos através das vias metabólicas de degradação de açúcares, mas antes ele precisa ser fosforilado e oxidado a

dihidroxiacetona fosfato (como mostrado na Figura 2.4). Assim, a gluconeogênese é uma via essencial.

Apesar da diferença no comportamento do crescimento em meio de cultura contendo glicose ou glicerol, o acúmulo final de P(3HB) por *R. eutropha\_glpFK* foi em torno de 60% nos dois cultivos realizados (Figura 4.16). Este percentual de biopolímero acumulado foi próximo ao publicado para *R. eutropha* H16\_glpFK construída no trabalho de Fukui e colaboradores (2014), que após 72 h de cultivo em meio mineral contendo frutose como substrato, foi capaz de acumular 63% de P(3HB). Mostrando assim, o potencial da cepa recombinante construída neste trabalho em produzir P(3HB) a partir de glicerol.

A Figura 4.17 mostra os dados referentes às concentrações de glicose e de glicerol residual ao longo dos cultivos com *R. eutropha* recombinante, conduzidos em modo batelada em biorreator.

Figura 4.17 Concentração de glicose ( $\Delta$ ) e glicerol ( $\diamond$ ) ao longo do cultivo de *R. eutropha\_glpFK* em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio contendo glicose (25 g/L) e glicerol (25 g/L), como fontes de carbono.



Ao analisar as concentrações residuais dos substratos através da Figura 4.17, nota-se que a glicose foi consumida mais rapidamente que o glicerol, sendo exaurida do meio em pouco menos de 20 horas, enquanto o glicerol chegou a concentrações próximas a zero, com o dobro do tempo de cultivo.

O fator de conversão de substrato em biomassa residual foi calculado plotando-se a concentração residual de glicose ou glicerol, em função da concentração da biomassa residual. O  $Y_{X/S}$  em glicose para *R. eutropha\_glpFK* foi de 0,30 g/g e em glicerol foi de 0,32 g/g. O fator de conversão de substrato em biomassa total em glicerol foi calculado similarmente e foi de 0,55 g/g. Os fatores de conversão estão de acordo com trabalhos de outros autores para conversão de glicose em biomassa

residual, na ordem de 0,27 g/g (SCHMIDT, 2015) e 0,48 g/g para a conversão de glicerol em biomassa total (MOZUMDER et al., 2014).

Deve-se mencionar que, quando glicose é utilizada como fonte de carbono, ela é metabolizada a piruvato pela via Entner-Doudoroff (ED). O piruvato pode ser convertido por uma desidrogenase a acetil-CoA, o intermediário central do metabolismo celular e o composto de início da síntese de P(3HB). Por outro lado, o glicerol pode ser metabolizado a piruvato também, mas via o composto intermediário gliceraldeído 3-fosfato.

Com a análise dos dados obtidos na etapa 2 do trabalho, pode-se dizer que, através da inserção dos genes *glpFK* em *R. eutropha* DSM 545, esta bactéria teve seu crescimento e consumo de glicerol aprimorado e que essa transformação não afetou o seu comportamento em glicose. Os resultados encontrados, ainda possibilitaram a obtenção de desempenho, em termos de produção de P(3HB) e crescimento celular em glicerol similar ou próximos aos encontrados na literatura para esse microrganismo.

### 4.3 CONCLUSÕES – ETAPA 2

Foi possível construir uma cepa recombinante de *R. eutropha* DSM 545 através da inserção dos genes de assimilação do glicerol de *E. coli*: *glpF* e *glpK*, codificando respectivamente a aquaporina e a glicerol quinase. A cepa construída cresce melhor em glicerol que a cepa parental de *R. eutropha* e possui potencial para a produção de P(3HB).

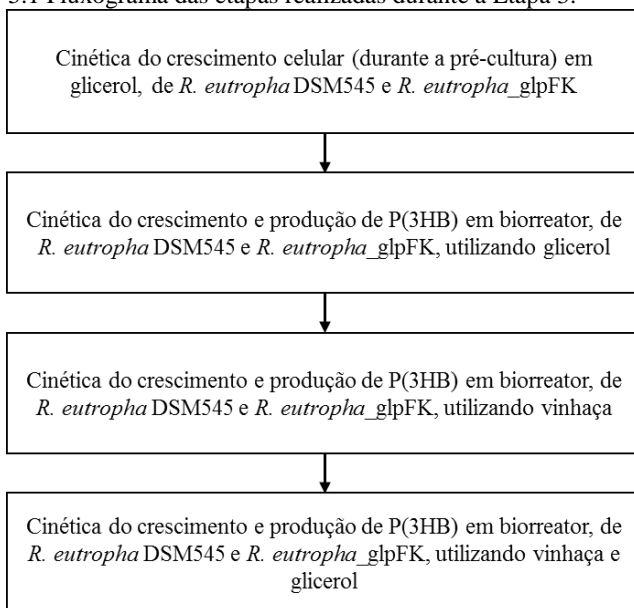
Ao avaliar o crescimento celular, a utilização de glicerol como substrato e a produção de P(3HB) por *R. eutropha\_glpFK*, é possível perceber que esta cepa apresentou comportamento semelhante ao observado em glicose quanto aos percentuais finais de acúmulo de biopolímero em torno de 60%, porém com comportamento cinético de crescimento e de produção distintos.

## 5. ESTUDO CINÉTICO COMPARATIVO DO DESEMPENHO DA *R. eutropha* RECOMBINANTE COM *R. eutropha* DSM 545, QUANTO AO CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE P(3HB) EM GLICEROL E VINHAÇA – ETAPA 3

Os resultados anteriores mostraram que *R. eutropha\_glpFK* foi capaz de utilizar glicerol para crescer e produzir P(3HB). A terceira etapa deste trabalho consistiu em comparar o comportamento cinético do crescimento e da produção de P(3HB) de *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK*, ao utilizarem como substratos glicerol e vinhaça.

A Figura 5.1 mostra o fluxograma das etapas desenvolvidas na Etapa 2 do presente trabalho.

Figura 5.1 Fluxograma das etapas realizadas durante a Etapa 3.





## 5.1 MATERIAL E MÉTODOS – ETAPA 3

### 5.1.1 Vinhaça

A vinhaça utilizada nesta etapa do trabalho foi a mesma da Etapa 1 (item 3.1.1).

### 5.1.2 Microrganismos

Os microrganismos utilizados foram as bactérias *Ralstonia eutropha* DSM 545 e *Ralstonia eutropha\_glpFK*. As cepas foram mantidas congeladas em caldo nutriente e glicerol (1:1 - v/v) a 80 °C. Para a reativação das cepas, foram conduzidas culturas em caldo nutriente conduzidas em agitador orbital a 150 rpm, 30 °C por 24 horas.

### 5.1.3 Meios e condições de cultivo

#### 5.1.3.1 Pré-cultura

Em todos os cultivos realizados nesta Etapa 3, utilizou-se caldo nutriente para a reativação da cepa e como primeira pré-cultura. Esta cultura foi conduzida em agitador orbital, em frasco *erlenmeyer* aletado de 250 mL, contendo 75 mL de meio, durante 24 horas, a 30 °C e 150 rpm.

Na segunda pré-cultura foi utilizado meio mineral (MM - descrito na Seção 3) com glicerol (30 g/L), em vinhaça (100% v/v) e em vinhaça com adição de glicerol (PA) até atingir 30 g/L, dependendo dos respectivos substratos utilizados nos cultivos em biorreator. Essas pré-culturas foram conduzidas em agitador orbital, em frasco *erlenmeyer* aletado de 1000 mL, contendo 400 mL de meio, a 30 °C e 150 rpm. O tempo de incubação foi diferente para cada caso, ou seja, o tempo necessário para que a densidade ótica (600 nm) atingisse aproximadamente 8, pois é a concentração máxima em que as células ainda se encontram na fase exponencial de crescimento (resultados não apresentados).

#### 5.1.3.2 Cultivos em biorreator

As cepas parental e recombinante de *R. eutropha* foram cultivadas em biorreator, em modo batelada, com diferentes substratos em meio mineral: glicerol (30 g/L), vinhaça (100% v/v) e glicerol (30 g/L) + vinhaça (100% v/v).

Após o preparo do inóculo, ele foi transferido para biorreator (BIOFLO III, *New Brunswick Scientific*) de 5 L, com volume útil de 4 L. A temperatura foi mantida em 30 °C e o pH em 7,0 com adição de soluções de NaOH 2,5 N ou HCl 2,7 N, com condições iniciais de agitação e aeração de 450 rpm e 0,1 vvm, respectivamente. As condições de agitação e aeração foram monitoradas e controladas para que a

concentração de oxigênio dissolvido no meio não fosse inferior a 40%, em relação à saturação com ar atmosférico.

### **5.1.4 Determinações analíticas**

#### **5.1.4.1 Amostragem**

Volumes de amostra de 2 mL de meio cultivado foram coletados em micro tubos de plástico e centrifugados a 10956 *xg* por 3 min. Em seguida, os precipitados foram lavados com 1 mL de água destilada, centrifugados novamente, sendo congelados os sobrenadantes e os precipitados. O sobrenadante foi posteriormente utilizado para a análise do consumo de substrato e o precipitado para a determinação de P(3HB).

#### **5.1.4.2 Determinação da concentração da biomassa**

Durante os cultivos determinou-se a concentração da biomassa pela leitura de densidade ótica e por gravimetria. Na análise gravimétrica, o precipitado, obtido após a centrifugação de 2 mL da amostra, foi submetido à secagem em estufa a 100 °C por 24 h. Após este tempo, as amostras foram colocadas em dessecador por 20 min e, por fim, pesadas.

Quando a vinhaça foi utilizada como meio de cultura em alguns dos cultivos em biorreator, como sua coloração é marrom, realizou-se leitura da absorbância da vinhaça pura e este valor foi então subtraído da leitura das amostras. Nos cultivos em biorreator, observou-se que, com a adição da solução de NaOH para a correção do pH, um precipitado era formado e este foi quantificado e sua massa foi descontada dos resultados da gravimetria.

#### **5.1.4.3 Determinação das concentrações de açúcares redutores, glicerol e nitrogênio**

A determinação de açúcares redutores (ART) foi realizada pelo método do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959). O nitrogênio foi determinado utilizando-se o *kit* Uréia ES (Gold Analisa), que determina a concentração de ureia pelo método enzimático-colorimétrico. O glicerol foi determinado com o uso de um *kit* Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica), um método com sistema para a determinação enzimático-colorimétrica de triglicérides, onde o glicerol é um intermediário das reações enzimáticas envolvidas. Para a quantificação das amostras estabeleceu-se uma curva padrão através de concentrações conhecidas de glicerol e os respectivos valores de absorbância a 505 nm.

#### 5.1.4.4 Determinação da concentração de P(3HB)

A concentração de PHA foi determinada por cromatografia gasosa, conforme o método de metanólise baseado em Brandl e colaboradores (1988). Após descongelamento das amostras, o precipitado foi ressuspenso em um volume de 2 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol acidificado. A suspensão foi aquecida a 100 °C durante 140 min, em banho-maria. Ao término, adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram agitadas durante 30 s. A fase orgânica (inferior) foi retirada e armazenada sob refrigeração para posterior análise em cromatografia gasosa.

Para isso utilizou-se uma coluna capilar com sílica fundida Rtx®-Wax (Crossbond® polyethylene glycol - 30m x 0,25mm x 0,25 µm), para a dosagem de P(3HB). O cromatógrafo foi um SHIMADZU GC-14B equipado com detector de ionização de chama (FID ar-hidrogênio). O gás de arraste foi o nitrogênio com vazão constante de 40 mL.min<sup>-1</sup>. As temperaturas de injeção, detecção e coluna foram 250, 250 e 120 °C, respectivamente.

#### 5.1.4.5 Determinação da demanda química de oxigênio (DQO)

Esta análise foi realizada segundo o procedimento descrito no item 3.1.4.5 deste manuscrito.

### 5.1.5 Tratamento dos dados

#### 5.1.5.1 Produtividade de P(3HB)

A produtividade em P(3HB) foi determinada pela Equação 5.1, onde  $P_r$  é a produtividade em P(3HB) (g/L.h);  $C_m$  é a concentração máxima de P(3HB) no instante  $t$  (g/L);  $C_0$  é a concentração de P(3HB) (g/L) no instante inicial,  $t$  é o tempo para atingir a concentração máxima (h).

$$P_r = \frac{C_m - C_0}{t} \quad (5.1)$$

Para o tratamento dos demais dados obtidos durante a Etapa 3, utilizou-se metodologia igual à aplicada na Etapa 1 (item 3.1.5).

## 5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ETAPA 3

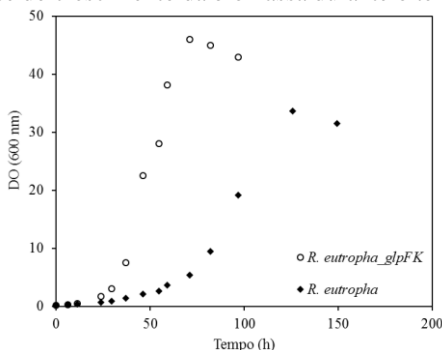
O primeiro conjunto de experimentos foi realizado com objetivo de comparar o crescimento e a produção de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK* em glicerol. Na sequência, foram realizados os experimentos em vinhaça.

### 5.2.1 Cultivos em glicerol

Os resultados obtidos mostraram diferença entre a cepa parental e a recombinante desde a pré-cultura. O tempo decorrido na pré-cultura para *R. eutropha* DSM 545, em meio de cultivo com apenas glicerol como fonte de carbono, foi de 72 horas e o tempo de pré-cultura para *R. eutropha\_glpFK*, foi de 36 horas.

Em função dessa diferença no comportamento do crescimento na pré-cultura, optou-se por acompanhar o crescimento das bactérias também na pré-cultura em meio mineral, contendo glicerol (30 g/L) como fonte de carbono. Os dados estão expressos em densidade ótica (600 nm) e podem ser visualizados na Figura 5.2.

Figura 5.2 Curvas de crescimento de *R. eutropha\_glpFK* (○) e *R. eutropha* DSM 545 (◆) em meio mineral com glicerol como fonte de carbono, em agitador orbital, para análise do crescimento da biomassa durante o tempo de pré-cultura.

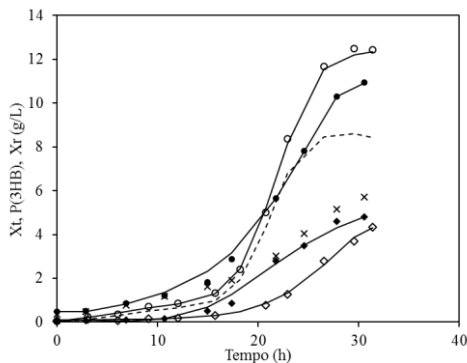


Em trabalhos reportados na literatura em que glicerol foi utilizado como principal substrato, o tempo de pré-cultura não foi mencionado. Os autores se referem a “crescimento suficiente” das células (LOPAR et al., 2014; ŠPOLJARIĆ et al., 2013). Há também relatos em que a pré-cultura foi repassada para meio de crescimento em glicerol a cada dia, de 4 a 5 cinco dias, sugerindo assim, uma adaptação das células ao meio mineral contendo glicerol, através de sucessivas pré-culturas (CAVALHEIRO et

al., 2009; MOZUMDER et al., 2014). Essa adaptação foi realizada também em meio sólido para *R. eutropha* H16 e o tempo dispendido nessa etapa não foi reportado. Seguida essa adaptação em meio sólido, o pré-cultivo foi conduzido duas vezes para se obter elevada atividade das células em glicerol, para então servirem de inóculo para o fermentador (TANADCHANGSAENG; YU, 2012). No presente trabalho essa fase de ‘adaptação’ não foi necessária.

Na Figura 5.3 estão mostrados os dados relativos à biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para os cultivos realizados em biorreator e conduzidos em modo batelada, em meio mineral com glicerol como única fonte de carbono, para *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK*, em função do tempo. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 5.3 Evolução da biomassa total ( $X_t$  (○, ●)), biomassa residual ( $X_r$  (—, x)), e P(3HB) (◇, ◆), respectivamente, para *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com glicerol como única fonte de carbono.

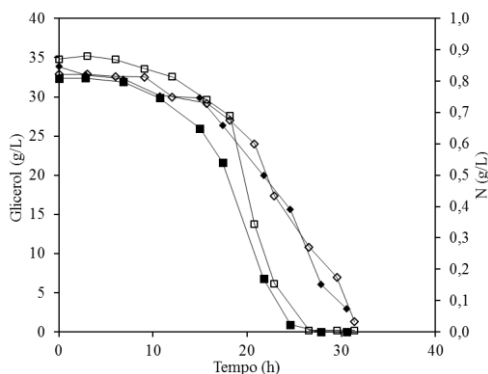


A velocidade específica máxima obtida nos cultivos com glicerol como única fonte de carbono, obtida para a *R. eutropha* DSM 545 foi de  $0,10 \text{ h}^{-1}$ , e da recombinante foi de  $0,17 \text{ h}^{-1}$ . O acúmulo de P(3HB), nos cultivos mostrados na Figura 5.3, foi de aproximadamente 35% tanto para *R. eutropha* DSM 545, como para a *R. eutropha\_glpFK*. Assim como o percentual de biopolímero acumulado, as produtividades de P(3HB), para os cultivos em glicerol, também foram iguais para as cepas parental e recombinante, de  $0,15 \text{ g/L.h}$ . Em cultivos conduzidos com alta concentração celular de *R. eutropha*, as produtividades em P(3HB) a partir de glicerol, podem ser maiores que as encontradas no presente trabalho, entre  $0,6$  e  $1,5 \text{ g/L.h}$  (CAVALHEIRO et al., 2009).

Além do percentual de acúmulo ter sido próximo para as duas cepas, pode-se observar ainda, que a limitação em nitrogênio durante esses dois cultivos ocorreu quando a fonte de carbono encontrava-se em concentrações baixas, o que não favorece maiores acúmulos de biopolímero neste microrganismo. Uma possível alternativa para aumentar a produção em cultivos como estes, seria a adição de uma fonte de carbono adicional que aumentasse a concentração desta no meio de cultura.

Os dados de concentração de glicerol e de N, ao longo do tempo para o cultivo de *R. eutropha* recombinante e *R. eutropha* DSM 545 em biorreator, para o cultivo conduzido em modo batelada em meio contendo glicerol como substrato, estão mostrados na Figura 5.4. As linhas presentes nestas figuras foram graficadas apenas com o intuito de facilitar a visualização dos dados.

Figura 5.4 Concentração de glicerol ( $\diamond$ ) e concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) ao longo do cultivo de *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com glicerol.

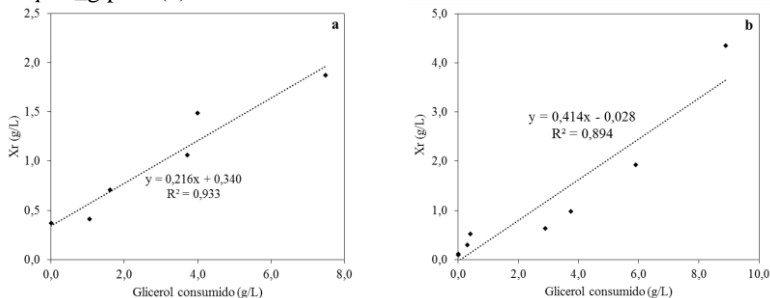


O consumo do glicerol foi muito próximo para as duas cepas estudadas, como é possível notar, através da representação gráfica da Figura 5.4.

No trabalho desenvolvido por Tanadchangsang e Yu (2012), em cultivo com *R. eutropha* H16 em meio contendo 20 g/L de glicerol (a cepa passou por fase de adaptação ao meio antes de servir como inóculo para o cultivo), a velocidade específica máxima de crescimento em glicerol foi de  $0,11 \text{ h}^{-1}$ , valor este que está de acordo com o encontrado no presente trabalho, enquanto o fator de conversão de glicerol em células para a selvagem foi de 0,41 g/g (TANADCHANGSAENG; YU, 2012), este

valor foi superior ao obtido para *R. eutropha* neste estudo. Os valores de concentração de biomassa residual em função do glicerol consumido, que permitiu calcular os fatores de conversão, estão mostrados na Figura 5.5.

Figura 5.5 Fator de conversão de glicerol em  $X_r$  (durante a fase de crescimento) para os cultivos contendo glicerol, para *R. eutropha* DSM 545 (a) e *R. eutropha\_glpFK* (b).



De acordo Tanadchangsang and Yu (2012), a produção de biomassa e o fator de conversão são menores em glicerol que em glicose. Além disso, as funções como grupo terminal na biossíntese de P(3HB) durante longa exposição ao longo do cultivo, podem resultar em redução da massa molar. No trabalho dos referidos autores, a liberação de metabólitos intermediários de *R. eutropha* crescendo em glicerol foi estudada e os produtos identificados nos estágios iniciais dos cultivos foram: ácido acético, ácido málico, ácido fórmico e glicose, indicando que *R. eutropha* possui a capacidade de sintetizar glicose, a partir de glicerol para em seguida, metabolizá-la.

Povolo e colaboradores (2012) analisaram a produção de PHA, por bactérias isoladas do solo, a partir de resíduos graxos, incluindo o glicerol. Os cultivos foram conduzidos em glicerol (20 g/L) sem a adição da fonte de nitrogênio, e com utilização de glicose na pré-cultura, após 72 h de cultura, obtendo biomassa final de 6,4 g/L, com 73% de PHA. A produção de biopolímero encontrado pelos referidos autores foi mais expressiva, que a encontrada no presente trabalho. Isto pode ser devido à limitação nutricional desde o início dos cultivos.

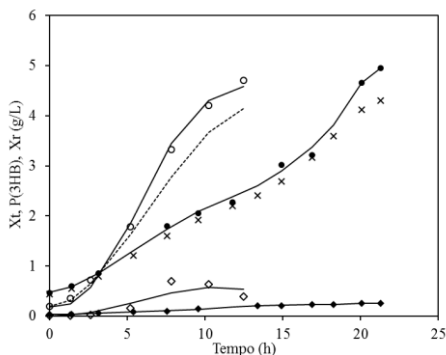
### 5.2.2 Cultivos em vinhaça

No primeiro conjunto de experimentos, utilizou-se o glicerol como substrato, visto que ele é uma das principais fontes de carbono presentes na vinhaça. Estes resultados serviram de base para atingir um dos principais objetivos desta tese que foi estudar o crescimento e produção

de P(3HB) em vinhaça, Assim, experimentos comparativos entre *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK* foram realizados em vinhaça.

A Figura 5.6 mostra os dados de biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para os cultivos realizados em biorreator e conduzidos em modo batelada, em vinhaça em meio mineral, para *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK*. Em meio contendo vinhaça, a pré-cultura de *R. eutropha* DSM 545 precisou de 8 horas para chegar à densidade óptica desejada e *R. eutropha\_glpFK* de 12 horas. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 5.6 Evolução da biomassa total ( $X_t$  (○, ●)), biomassa residual ( $X_r$  (--, x)), e P(3HB) (◇, ◆), respectivamente, para *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com vinhaça.



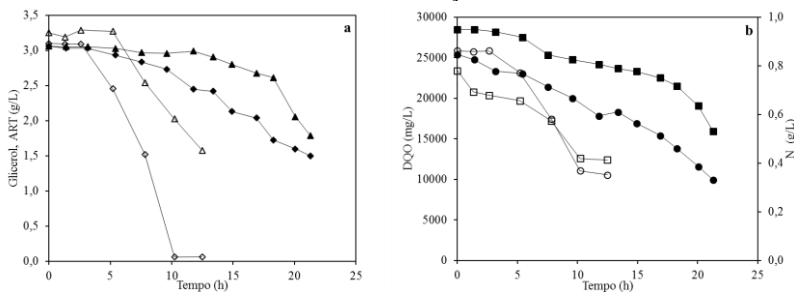
*R. eutropha* recombinante cresceu mais rapidamente que a cepa parental, como pode ser observado pelo tempo necessário para que as cepas atingissem a fase de desaceleração do crescimento, 12 horas para *R. eutropha\_glpFK* e 20 horas para *R. eutropha* DSM 545, mostrando assim, maior eficiência na utilização da vinhaça como substrato pela cepa recombinante.

A diferença no desempenho das cepas durante o cultivo em vinhaça pode ser observada também pelos valores de velocidade específica máxima de crescimento, o  $\mu_{\text{máx}}$  de *R. eutropha* DSM 545 em vinhaça foi de  $0,18 \text{ h}^{-1}$  com biomassa residual final de  $4,5 \text{ g/L}$  e o  $\mu_{\text{máx}}$  da recombinante foi de  $0,41 \text{ h}^{-1}$ , com  $X_r$  final similar, de  $4,3 \text{ g/L}$ . Nos dois experimentos a concentração de P(3HB) não foi expressiva, uma vez que, não ocorreu a limitação de nitrogênio, como pode ser observado pelos dados de concentração desse nutriente, mostrados na Figura 5.7.



Os dados referentes à concentração de glicerol, de açúcares redutores (naturalmente presentes na vinhaça), de nitrogênio e da DQO para os cultivos realizados em vinhaça estão mostrados na Figura 5.7. As linhas presentes nestas figuras foram graficadas apenas com o intuito de facilitar a visualização dos dados.

Figura 5.7 (a) Concentração de glicerol ( $\diamond$ ) e de açúcares redutores (ART ( $\Delta$ )) e (b) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com vinhaça.



Como é possível verificar, *R. eutropha\_glpFK* (dados experimentais representados pelos símbolos abertos) foi capaz de consumir o glicerol presente no meio mais rapidamente, sendo este consumido totalmente em aproximadamente 10 horas de cultivo. Comportamento diferente ocorreu com *R. eutropha* DSM 545 nesse cultivo, pois além de o consumo de glicerol ter sido mais lento, ao final do experimento, ainda havia glicerol residual disponível para ser consumido, indicando que a expressão dos genes *glpFK<sub>Ec</sub>* aprimorou o consumo deste substrato presente na vinhaça pela cepa recombinante.

Diferentemente do glicerol, a concentração final de ART foi praticamente a mesma para as duas cepas, em torno de 1,5 g/L ao final dos dois cultivos. Porém o consumo de ART não foi similar, pois foram consumidos mais rapidamente por *R. eutropha\_glpFK*. Ainda na Figura 5.7 (a) é possível observar que durante as primeiras horas desses cultivos, praticamente não houve consumo de glicerol e ART, indicando que as cepas consumiram outros substratos presentes na vinhaça. Uma hipótese é o consumo de ácidos orgânicos, não quantificados neste trabalho.

Durante os cultivos em vinhaça mostrados na Figura 5.6, foram consumidos aproximadamente 0,4 g/L de nitrogênio, resultando em fatores de conversão de nitrogênio em biomassa residual de 10,5 g/g para *R. eutropha* DSM 545 e 11,1 g/g para *R. eutropha\_glpFK*. Estes valores

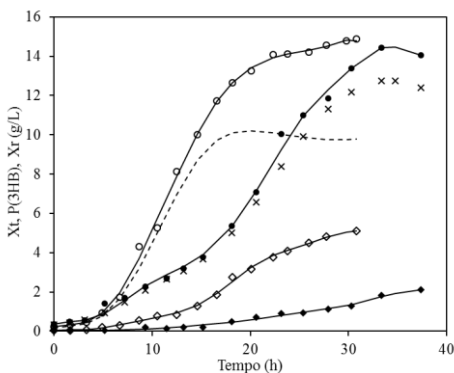
foram superiores aos normalmente encontrados para *R. eutropha*, quando ureia é utilizada como fonte de nitrogênio, de 8 g/g (IENCZAK, 2011).

Como observado, *R. eutropha* foi capaz de crescer em meio contendo vinhaça e tem capacidade de acumular pequenas quantidades de biopolímero, a partir desse subproduto. Para possibilitar que os percentuais de acúmulo de P(3HB) possam ser maiores, uma fonte adicional de carbono se fez necessária. Como o aprimoramento da utilização do glicerol foi abordada na construção da cepa recombinante de *R. eutropha*, optou-se por utilizá-lo como substrato adicional à vinhaça.

### 5.2.3 Cultivos em vinhaça adicionada de glicerol

A Figura 5.8 mostra os dados relativos à biomassa total, biomassa residual e P(3HB) para os cultivos realizados em biorreator conduzidos em modo batelada, em meio mineral adicionado de vinhaça e glicerol (30 g/L), para *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK*. Para esses cultivos, a pré-cultura de *R. eutropha* DSM 545 precisou de 8 horas para chegar à densidade óptica desejada e a de *R. eutropha\_glpFK* de 12 horas. As linhas contínuas representam os ajustes polinomiais aos dados experimentais realizados com o auxílio do *software* Lissage.

Figura 5.8 Evolução da biomassa total ( $X_t$  (○, ●)), biomassa residual ( $X_r$  (—, x)), e P(3HB) (◇, ◆), respectivamente, para *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545 em biorreator, ao longo do cultivo em modo batelada em meio com vinhaça adicionada de glicerol.



Ao final desses experimentos, obteve-se em torno de 15 g/L de biomassa total para as duas cepas, 5 g/L de P(3HB), o que representa 34% de biopolímero para a cepa recombinante e 2 g/L de P(3HB), o que

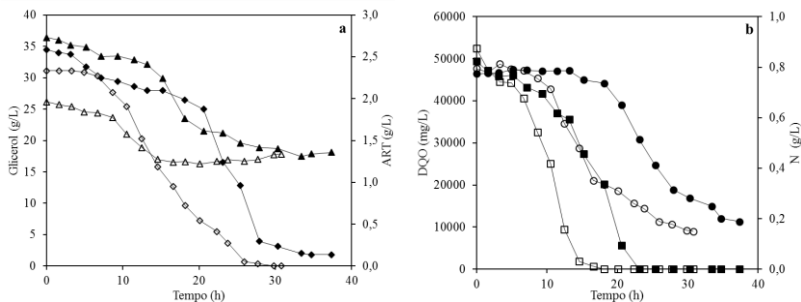
representa 15% de biopolímero para *R. eutropha* DSM 545. Tanto a produção de biomassa total, como a produção de P(3HB) obtidos neste cultivo foram mais expressivos que aqueles obtidos nos cultivos contendo apenas vinhaça. Este aumento nas concentrações é devido à maior disponibilidade de substrato neste caso.

A produtividade de P(3HB) por *R. eutropha* DSM 545 durante o cultivo em vinhaça adicionada de glicerol foi de 0,05 g/L.h, este valor foi menor que a produtividade obtida com *R. eutropha\_glpFK* de 0,18 g/L.h. Em termos de produtividade, a cepa recombinante obteve valores similares em glicerol e vinhaça adicionada de glicerol, diferentemente da cepa parental que em glicerol (0,15 g/L.h) foi maior que a obtida quando os dois substratos foram utilizados.

Com os dados obtidos nesses cultivos, foi possível calcular a velocidade específica máxima de crescimento das cepas abordadas neste estudo. O  $\mu_{\text{máx}}$  de *R. eutropha* DSM 545 nesse cultivo foi de 0,19 h<sup>-1</sup>, e o  $\mu_{\text{máx}}$  da recombinante foi de 0,33 h<sup>-1</sup>. A diferença nos valores dessa velocidade específica de crescimento, foi menor que a observada nos cultivos conduzidos em meio com vinhaça, porém com a adição de glicerol, a recombinante ainda apresentou velocidade específica de crescimento maior. A utilização do glicerol em conjunto com a vinhaça, diminuiu o  $\mu_{\text{máx}}$  da recombinante (que foi de 0,41 h<sup>-1</sup>) mas parece não ter interferido no da cepa parental (que foi 0,18 h<sup>-1</sup>) quando comparados aos valores obtidos nos cultivos em vinhaça (Figura 5.6). Cabe ressaltar que em nenhum dos cultivos mostrados na Figura 5.8 houve fase de adaptação ao meio, esse comportamento foi observado ao plotar os dados do logaritmo neperiano da biomassa residual em função do tempo (dados não mostrados).

Os dados de concentração de glicerol, ART, N e DQO, ao longo do tempo para o cultivo de *R. eutropha* recombinante e *R. eutropha* DSM 545 em biorreator, para o cultivo conduzido em modo batelada em meio contendo vinhaça e glicerol estão mostrados na Figura 5.9.

Figura 5.9 (a) Concentração de glicerol ( $\diamond$ ) e de açúcares redutores (ART ( $\Delta$ )) e (b) Concentração de nitrogênio (N ( $\square$ )) e de DQO ( $\circ$ ) ao longo do cultivo de *R. etrophia\_glpFK* e *R. etrophia* DSM 545 (símbolos fechados) em biorreator, para cultivo em modo batelada em meio com vinhaça adicionada de glicerol.

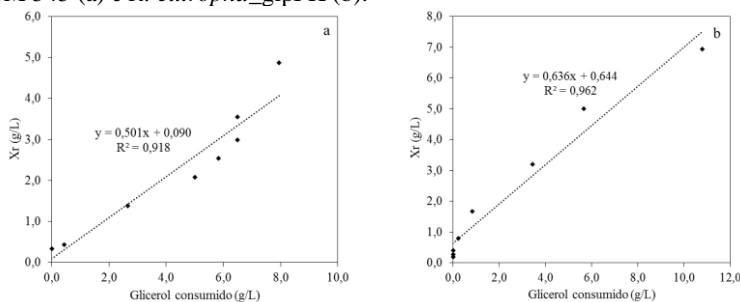


Assim como nos cultivos com vinhaça, a biomassa cessou o crescimento enquanto restava aproximadamente de 1,5 g/L de ART, e um residual da DQO em torno de 10000 mg/L, para as duas cepas.

Dado que a cepa recombinante cresceu com velocidade específica de crescimento maior, o consumo de substratos também foi mais acentuado. O glicerol, por exemplo, além de ter sido mais rapidamente consumido, não apresentou residual no final do cultivo, diferentemente de *R. etrophia* DSM 545 que parou de crescer, quando ainda havia glicerol disponível.

Apesar dos outros componentes presentes na vinhaça, a concentração de glicerol nesses cultivos foi mais elevada, permitindo calcular o fator de conversão de substrato em células (biomassa residual) durante a fase de crescimento (anterior da limitação em nitrogênio). O  $Y_{X/S}$  foi de 0,64 g/g para a recombinante e de 0,50 para *R. etrophia* DSM 545. As representações gráficas da biomassa residual em função da concentração de glicerol consumido, que permitiu calcular os fatores de conversão, estão mostradas na Figura 5.10.

Figura 5.10 Fator de conversão de glicerol em Xr (durante a fase de crescimento) para os cultivos contendo vinhaça e glicerol para *R. eutropha* DSM 545 (a) e *R. eutropha\_glpFK* (b).



Os fatores de conversão encontrados nos cultivos contendo glicerol em conjunto com vinhaça foram superiores aos encontrados na literatura para *R. eutropha* DSM 545 em cultivo com glicerol como única fonte de carbono, que foi de 0,39 g/g, durante a fase de crescimento (LOPAR et al., 2014).

Em meio contendo glicerol (5 g/L) como fonte de carbono, *R. eutropha* H16\_glpFK construída no trabalho de Fukui e colaboradores (2014), foi capaz de produzir 1,44 g/L de P(3HB), após 72 horas de cultivo, enquanto que a cepa selvagem *R. eutropha* H16 produziu 1,08 g/L de P(3HB), somente após 270 horas de cultivo. Esses resultados mostraram que, como observado no presente trabalho, a cepa parental foi capaz de produzir P(3HB) a partir de glicerol, embora isso tenha requerido muito tempo de cultivo em função de sua baixa habilidade de crescer em glicerol. Para a *R. eutropha* H16, a expressão única de *glpK<sub>Ec</sub>* estabilizou a via metabólica para melhor assimilação do glicerol, e a expressão de *glpF<sub>Ec</sub>* não foi essencial. Os resultados indicaram que *R. eutropha* H16 possui o potencial para captar o glicerol extracelular por transportadores nativos como PEP-PTS, como reportado anteriormente (KADDOR; STEINBÜCHEL, 2011).

### 5.2.4 Resumo comparativo dos cultivos em biorreator, com *R. eutropha* DSM 545 e *R. eutropha\_glpFK*, utilizando glicerol, vinhaça e vinhaça adicionada de glicerol

A Tabela 5.1 apresenta os principais resultados obtidos a partir dos cultivos realizados na Etapa 3 deste trabalho.

Tabela 5.1 Resumo dos dados obtidos nos cultivos em biorreator, conduzidos em modo batelada, com *R. eutropha\_glpFK* e *R. eutropha* DSM 545, utilizando glicerol, vinhaça e vinhaça adicionada de glicerol.

| Substrato          | Cepa                       | Tempo (h) | Xt (g/L) | P(3HB) (g/L) | $\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> ) | Pr (g/L.h) | Fator de conversão glicerol em X <sub>r</sub> (g/g) |
|--------------------|----------------------------|-----------|----------|--------------|---------------------------------------|------------|---|
| Glicerol           | <i>R. eutropha</i> DSM 545 | 30,5      | 11,3     | 4,8          | 0,10                                  | 0,14       | 0,22  |
|                    | <i>R. eutropha_glpFK</i>   | 31,4      | 12,3     | 4,5          | 0,17                                  | 0,15       | 0,41  |
| Vinhaça            | <i>R. eutropha</i> DSM 545 | 21        | 4,9      | -            | 0,18                                  | -          | -   |
|                    | <i>R. eutropha_glpFK</i>   | 12,5      | 4,6      | -            | 0,41                                  | -          | -   |
| Vinhaça e glicerol | <i>R. eutropha</i> DSM 545 | 37,3      | 14       | 2,2          | 0,19                                  | 0,05       | 0,50  |
|                    | <i>R. eutropha_glpFK</i>   | 31        | 14,8     | 5,1          | 0,33                                  | 0,18       | 0,64  |

Ressalta-se ao analisar a Tabela 5.1 que, das condições abordadas neste trabalho, a que melhor favoreceu o acúmulo de P(3HB), com melhores parâmetros cinéticos tanto de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}$ ), como de produção, foi a empregada nos cultivos com vinhaça adicionada de glicerol. Mostando assim, a importância da utilização em conjunto desses dois subprodutos.

Dos cultivos conduzidos em vinhaça com glicerol, a cepa recombinante construída neste trabalho: *R. eutropha\_glpFK* teve desempenho superior quando comparada com a cepa parental *R. eutropha* DSM 545.

De forma geral, a expressão dos genes responsáveis pelo consumo do glicerol (*de E. coli*) em *R. eutropha* DSM 545 mostrou-se eficiente quando vinhaça foi utilizada com substrato ou cosubstrato e no menor tempo de cultura necessário em glicerol, mesmo que na cultura final em

glicerol o desempenho desta quando comparada à cepa parental não foi muito pronunciado.

Nesse contexto, cabe lembrar que, o custo com a fonte de carbono em um processo de produção de P(3HB) pode variar de 25–45% (NATH et al., 2008), isto pode levar à busca por fontes baratas de substrato, para tentar reduzir os custos totais de produção desses biopolímeros. Os subprodutos agroindustriais são possíveis substratos, pois possuem características desejáveis, normalmente baixo custo e grande disponibilidade, como a vinhaça e o glicerol.

Para que aumentos em produtividade e produção de P(3HB) possam ser alcançados, em estudos futuros, diferentes estratégias de cultivo podem ser utilizadas, com base nos resultados obtidos neste trabalho.

### 5.3 CONCLUSÕES – ETAPA 3

Quando o glicerol é usado como único substrato, *R. eutropha\_glpFK* cresce mais rapidamente do que *R. eutropha* DSM 545 na pré-cultura. Após este período, a cepa recombinante apresenta  $\mu_{\text{máx}}$ :  $0,17 \text{ h}^{-1}$ , fator de conversão de glicerol em células:  $0,41 \text{ g/g}$ , melhores que a cepa parental, de  $0,10 \text{ h}^{-1}$  e  $0,22 \text{ g/g}$ , respectivamente.

*R. eutropha\_glpFK* é capaz de crescer em vinhaça com velocidade específica máxima de crescimento superior à encontrada para *R. eutropha* DSM 545, de  $0,41 \text{ h}^{-1}$  frente a  $0,18 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente. Ao utilizar apenas vinhaça como fonte de carbono, com adição de nitrogênio no meio de cultivo, não há fonte de carbono suficiente para permitir o acúmulo de P(3HB).

Ao utilizar vinhaça em conjunto com glicerol, o  $\mu_{\text{máx}}$  de *R. eutropha\_glpFK* é de  $0,33 \text{ h}^{-1}$  e o de *R. eutropha* DSM 545 de  $0,19 \text{ h}^{-1}$ . As produtividades em biopolímero são de  $0,18 \text{ g/L.h}$  e de  $0,05 \text{ g/L.h}$  para a recombinante e a cepa parental, respectivamente. O fator de conversão de glicerol em células, durante a fase de crescimento, também é maior para a recombinante:  $0,64 \text{ g/g}$  e o seu acúmulo de P(3HB) é o dobro do encontrado para *R. eutropha* DSM 545, 34% e 15%, respectivamente.

A utilização de glicerol como cosubstrato da vinhaça parece ser promissora para a produção por *R. eutropha\_glpFK* nesses substratos.



## 6. CONCLUSÕES FINAIS

A vinhaça é um subproduto produzido em grandes volumes no Brasil e apresenta potencial para ser utilizada como meio de cultura para *R. eutropha* DSM 545, sem que haja inibição em seu crescimento. As velocidades específicas de crescimento obtidas neste substrato são maiores que as encontradas em substratos comumente utilizados para esta bactéria, como a glicose, por exemplo. Porém, ao cessar seu crescimento, *R. eutropha* DSM 545 não consome todo o glicerol disponível na vinhaça.

A inserção dos genes *glpFK* de *E. coli* em *R. eutropha* DSM 545, permite que a cepa recombinante obtida (*R. eutropha\_glpFK*) seja capaz de consumir glicerol (uma das principais fontes de carbono presentes na vinhaça) para crescer e produzir P(3HB), sem que haja a necessidade de longos períodos de adaptação.

*R. eutropha\_glpFK* apresenta maior capacidade de utilização de vinhaça e vinhaça adicionada de glicerol em relação à *R. eutropha* DSM 545, para crescer e produzir P(3HB). Das condições de meio de cultivo abordadas neste trabalho, a vinhaça adicionada de glicerol é a melhor condição para *R. eutropha\_glpFK*.

Os resultados obtidos nesta tese são importantes, pois mostram a possibilidade de valorização de substratos como a vinhaça e o glicerol, pela produção de um biopolímero de valor agregado.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Utilizar outros substratos associados à vinhaça, como por exemplo, glicose, frutose, sacarose, melação para a produção de P(3HB) a partir de *R. eutropha*;
- Estudar o crescimento e a produção de P(3HB) a partir de glicerol bruto, subproduto da indústria do biodiesel, por *R. eutropha\_glpFK*;
- Otimizar o processo de produção de P(3HB), a partir de *R. eutropha\_glpFK*, com diferentes estratégias de cultivo, como batelada alimentada e reciclo de células, por exemplo;
- Caracterizar o biopolímero obtido nas condições abordadas nessa tese, visando as possíveis futuras aplicações;
- Inserir na cepa recombinante de *R. eutropha* obtida neste trabalho os genes responsáveis pelo consumo de sacarose, visto que este açúcar também é encontrado na vinhaça.

## 8. REFERÊNCIAS

- AKARAONYE, E.; KESHAVARZ, T.; ROY, I. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732–743, 2010.
- AKIYAMA, M.; TSUGE, T.; DOI, Y. Environmental life cycle comparison of polyhydroxyalkanoates produced from renewable carbon resources by bacterial fermentation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, p. 183–194, 2003.
- ALDOR, I. S.; KEASLING, J. D. Process design for microbial plastic factories: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 475–483, 2003.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 4, p. 450–472, 1990.
- ANDREESSE, B. et al. Conversion of glycerol to poly(3-hydroxypropionate) in recombinant *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 622–626, 2010.
- APHA, AWWA, WEF. Standard methods for the examination of water and wastewater 19<sup>th</sup>. American public health association. Washington, DC. 1995.
- ARAGÃO, G.M.F.; LINDLEY, N.D.; URIBELARREA, J.L.; PAREILLEUX, A. Maintaining a controlled residual growth capacity increases the production of polyhydroxyalkanoate copolymers by *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, v. 18, p. 937-942. 1996.
- BARKER, T. W.; QUINN, J. P.; MARCHANT, R. The Use of a mixed culture of *Geotrichum candidum*, *Candida krusei* and *Hansenula anomala* for Microbial Protein Production from Whiskey Distillery Spent Wash. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 247–253, 1982.
- BELTRAMI, L. V. R.; SCIENZA, L. C.; ZATTERA, A. J. Efeito do

tratamento alcalino de fibras de curauá sobre as propriedades de compósitos de matriz biodegradável. **Polímeros**, v. 24, p. 388-394, 2014.

BELTRAN, F. J.; GARCIA-ARAYA, J. F.; ALVAREZ, P. M. Wine distillery wastewater degradation. Improvement of aerobic biodegradation by means of an integrated chemical (ozone)-biological treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3919–3924, 1999a.

BELTRAN, F. J.; GARCIA-ARAYA, J. F.; ALVAREZ, P. M. Wine distillery wastewater degradation. Oxidative treatment using ozone and its effect on the wastewater biodegradability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3911–3918, 1999b.

BHATTACHARYYA, A. et al. Utilization of vinasse for production of poly-3-(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Haloferax mediterranei*. **AMB Express**, v. 2, n. 1, p. 34, 2012.

BRANDL, H. et al. Pseudomonas oleovorans as a source of poly(3-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 1977–1982, 1988.

BRAUNEGG, G.; LEFEBVRE, G.; GENSER, K. F. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2-3, p. 127–161, 1998.

BRIGHAM, C. J. et al. Elucidation of  $\beta$ -oxidation pathways in *Ralstonia eutropha* H16 by examination of global gene expression. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 20, p. 5454–5464, 2010.

BRIGHAM, C. J. et al. Bacterial carbon storage to value added products. **Microbial & Biochemical Technology**, 2011.

BUDDE, C. F. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) from plant oil by engineered *Ralstonia eutropha* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2847–2854, 2011.

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.

CAVALHEIRO, J. M. B. T. et al. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Cupriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 509–515, 2009.

CAZETTA, M.L.; CELLIGOI, M.A.P.C. Study of molasses/vinasse waste ratio for single cell protein and total lipids production by microorganisms. **Seminário: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 27, p. 03-10. 2006.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate ) production by fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 17, 1997.

COCA, M. et al. Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, n. April, p. 306–312, 2015.

DALCANTON, F. et al. Production of poly(3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in hydrolyzed rice starch medium with soybean oil supplementation at different temperatures. **Quimica Nova**, v. 33, n. 3, p. 552–556, 2010.

DE GOMES, M. T. D. M. S.; EÇA, K. S.; VIOTTO, L. A. Concentração da vinhaça por microfiltração seguida de nanofiltração com membranas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 633–638, 2011.

DIAS, J. M. L. et al. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by mixed aerobic cultures: From the substrate to the final product. **Macromolecular Bioscience**, v. 6, n. 11, p. 885–906, 2006.

DIAS, M. O. D. S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.

DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **Journal of**

**Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 217–226, 2012.

DU, C. et al. Polyhydroxyalkanoates Production From Low-cost Sustainable Raw Materials. **Current Chemical Biology**, v. 6, n. 1, p. 14–25, 2012.

DURNIN, G. et al. Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 148–161, 2009.

ESPANA-GAMBOA, E. et al. Vinasses: characterization and treatments. **Waste Management & Research**, v. 29, n. 12, p. 1235–1250, 2011.

FLIEGER, M. et al. Biodegradable plastics from renewable sources. **Folia microbiologica**, v. 48, n. 1, p. 27–44, 2003.

FRIEDRICH, B.; HOGREFE, C.; SCHLEGEL, H. G. Naturally occurring genetic transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 147, n. 1, p. 198–205, 1981.

FUKUI, T. et al. Enhancement of glycerol utilization ability of *Ralstonia eutropha* H16 for production of polyhydroxyalkanoates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2014.

FUKUI, T.; DOI, Y. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 15, p. 4821–4830, 1997.

GAO, D. et al. Identification of the intracellular polyhydroxyalkanoate depolymerase gene of *Paracoccus denitrificans* and some properties of the gene product. **FEMS Microbiology Letters**, v. 196, n. 2, p. 159–164, 2001.

GERNGROSS, T. U. et al. Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalkanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: evidence for a required posttranslational modification for catalytic

activity. **Biochemistry**, v. 33, n. 31, p. 9311–9320, 1994.

GLORIA, N. A.; ORLANDO FILHO, J. Aplicação de vinhaça: um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v. 4, n. 15, p. 22 – 31. 1984.

GOGOLEWSKI, S.; JAVANOVIC, M.; PERREN, S. M.; HUGHES, M. K. Tissue response and in vivo degradation of selected poly-hydroxyacids: polylactides (PLA), poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHB/PHV). **Biomaterials**, v. 11, p. 679-685, 1990.

GROUSSEAU, E. **Potentialités de production de Poly-Hydroxy-Alcanoates chez *Cupriavidus necator* sur substrats de type acides gras volatils: études cinétiques et métaboliques**. Toulouse. Tese de doutorado (Engenharia Enzimática e Microbiana). Instituto Nacional de Ciências aplicadas de Toulouse - FR, 2012.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. Recent advances in the production, recovery and applications of polyhydroxyalkanoates. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 580–605, 2013.

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*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 1, p. 34–39, 1995.

HAYWOOD, G. W.; ANDERSON, A J.; DAWES, E. A. The Importance of phb-synthase substrate-specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 57, n. 1, p. 1–6, 1989.

HAZER, B.; STEINBÜCHEL, A. Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 1, p. 1–12, 2007.

HEINRICH, D. et al. From waste to plastic: Synthesis of poly(3-hydroxypropionate) in: *Shimwellia blattae*. **Applied and**

**Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 3582–3589, 2013.

HIROE, A. et al. Rearrangement of gene order in the phaCAB operon leads to effective production of ultrahigh-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] in genetically engineered *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3177–3184, 2012.

HONG, S.-G.; HSU, H.-W.; YE, M.-T. Thermal properties and applications of low molecular weight polyhydroxybutyrate. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, p. 1243–1250, 2012.

IENCZAK, J. L.; ARAGÃO, G. M. F. Biotechnologically Produced Biodegradable polyesters, *In: Handbook of biodegradable polymers*, LENDLEIN, A. E. SISSON, A. (eds.) WILEY – VCH VERLAG GMBH & Co. KGaA. Weinheim, Alemanha, v. 1, p. 23-38, 2011.

IENCZAK, J. L. et al. High cell density strategy for poly ( 3-hydroxybutyrate ) production by *Cupriavidus necator*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 04, p. 585–596, 2011.

KABE, T. et al. Physical and Structural Effects of Adding Ultrahigh-Molecular-Weight Poly[( R)-3-hydroxybutyrate] to Wild-Type Poly[( R)-3-hydroxybutyrate]. **Macromolecules**, v. 45, p. 1858–1865, 2012.

KADDOR, C.; STEINBÜCHEL, A. Implications of various phosphoenolpyruvate-carbohydrate phosphotransferase system mutations on glycerol utilization and poly(3-hydroxybutyrate) accumulation in *Ralstonia eutropha* H16. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 16, 2011.

KAPDAN, I. K.; KARGI, F. Bio-hydrogen production from waste materials. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 569–582, 2006.

KARR, D. B.; WATERS, J. K.; EMERICH, D. W. Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid chromatography and UV detection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 1339–1344, 1983.

KESHAVARZ, T.; ROY, I. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 321–



326, 2010.

KIM. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 6, p. 732–743, 2010.

KIM, B. S. et al. Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. **Biotechnology and bioengineering**, v. 43, n. 9, p. 892–898, 1994.

KLINE, K. L.; OLADOSU, G. A.; WOLFE, A. K.; PERLACK, R. D.; DALE, V. H.; MCMAHON, M. Biofuel feedstock assessment for selected countries. Oak Ridge National Laboratory Report, ORNL/TM-2007/224, Oak Ridge, Tennessee; February 2008.

KOFFAS, M. A. G.; JUNG, G. Y.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering metabolism and product formation in *Corynebacterium glutamicum* by coordinated gene overexpression. **Metabolic Engineering**, v. 5, n. 1, p. 32–41, 2003.

KULPREECHA, S. et al. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 3, p. 240–245, 2009.

LAIME, E. M. O. et al. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça : uma revisão. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 16–29, 2011.

LALOV, I. G. et al. Treatment of waste water from distilleries with chitosan. **Water Research**, v. 34, n. 5, p. 1503–1506, 2000.

LAYCOCK, B. et al. The chemomechanical properties of microbial polyhydroxyalkanoates. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 2, p. 397–442, 2014.

LEE, S. Y.; CHOI, J. IL; WONG, H. H. Recent advances in polyhydroxyalkanoate production by bacterial fermentation: Mini-review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 31–36, 1999.

LEONG, Y. K. et al. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 180, n. 2014, p. 52–65, 2014.

LIMA, U. A. **Tecnologia das fermentações**, v. 1. São Paulo: E. Blucher, p. 285. 1987.

LOPAR, M. et al. Study of metabolic network of *Cupriavidus necator* DSM 545 growing on glycerol by applying elementary flux modes and yield space analysis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 913–930, 2014.

LUENGO, J. M. et al. Bioplastics from microorganisms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 251–260, 2003.

LYND, L. R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, n. 1, p. 403–465, 1996.

MADISON, L. L.; HUISMAN, G. W. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 63, n. 1, p. 21–53, 1999.

MARANGONI, C.; FURIGO, A.; DE ARAGÃO, G. M. F. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* in whey and inverted sugar with propionic acid feeding. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 137–141, 2002.

MARTÍN SANTOS, M. A. et al. Ozonation of vinasse in acid and alkaline media. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 11, p. 1121–1127, 2003.

MATSUMOTO, K. et al. Cloning and characterization of the *Pseudomonas* sp. 61-3 phaG gene involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 1, p. 142–7, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428. 1959.

MOHANA, S.; ACHARYA, B. K.; MADAMWAR, D. Distillery spent

wash: Treatment technologies and potential applications. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 12–25, 2009.

MOZUMDER, M. S. I. et al. A robust fed-batch feeding strategy independent of the carbon source for optimal polyhydroxybutyrate production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 365–373, 2014.

MUMTAZ, T. et al. Turning waste to wealth-biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates from palm oil mill effluent-a Malaysian perspective. **Journal of Cleaner Production**, v. 18, n. 14, p. 1393–1402, 2010.

MYSHKINA, V. L. et al. Effect of growth conditions on the molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia**, v. 44, n. 5, p. 533–538, 2008.

NATH, A. et al. Enhanced PHB production and scale up studies using cheese whey in fed batch culture of *Methylobacterium* sp. ZP24. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5749–5755, 2008.

OJUMU, T.; YU, J.; SOLOMON, B. Production of Polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymers. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 18–24, 2004.

OLIVEIRA, J. G. DE; GARCIA-CRUZ, C. H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, n. 1, p. 155–160, 2013.

ORITA, I. et al. Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 1, p. 63–69, 2012.

PAIS, J. et al. Improvement on the yield of polyhydroxyalkanoates production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 151–158, 2014.

PAN, P.; INOUE, Y. Polymorphism and isomorphism in biodegradable

polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 7, p. 605–640, 2009.

PARNAUDEAU, V. et al. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1553–1562, 2008.

PEÑA, C. et al. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 278–293, 2014.

PEOPLES, O. P.; SINSKEY, A. J. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phbC). **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 26, p. 15298–15303, 1989.

PHITHAKROTCHANAKOON, C. et al. Engineered *Escherichia coli* for Short-chain-length medium-chain-length polyhydroxyalkanoate copolymer biosynthesis from glycerol and dodecanoate. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 77, n. 6, p. 1262–1268, 2013.

POHLMANN, A. et al. Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1257–1262, 2006.

PÖTTER, M. et al. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 148, n. 8, p. 2413–2426, 2002.

PÖTTER, M.; MÜLLER, H.; STEINBÜCHEL, A. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 825–833, 2005.

POVOLO, S. et al. Production of Polyhydroxyalkanoates from Fatty Wastes. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 20, n. 4, p. 944–949, 2012.

PRAMANIK, A. et al. Utilization of vinasse for the production of polyhydroxybutyrate by *Haloarcula marismortui*. **Folia**

**Microbiologica**, v. 57, n. 1, p. 71–79, 2012.

RAI, R. et al. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. **Materials Science and Engineering R: Reports**, v. 72, n. 3, p. 29–47, 2011.

REDDY, C. S. K. et al. Polyhydroxyalkanoates: An overview. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 2, p. 137–146, 2003.

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

REHM, B. H. A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 578–592, 2010.

REHM, B.; STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthases: the key enzymes of PHA synthesis. **Biopolymers Online**, p. 173–180, 2002.

REINECKE, F.; STEINBUCHER, A. *Ralstonia eutropha* strain H16 as model organism for PHA metabolism and for biotechnological production of technically interesting biopolymers. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 91–108. 2009.

RITTMANN, D.; LINDNER, S. N.; WENDISCH, V. F. Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6216–6222, 2008.

ROBLES-GONZÁLEZ, V. et al. Treatment of mezcal vinasses: A review. **Journal of Biotechnology**, v. 157, n. 4, p. 524–546, 2012.

ROMEO, T. **Glycolysis and flux control in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology**. 2nd edn. Washington DC: ASM Press, 2005

SAEGUSA, H.; SHIRAKI, M.; KANAI, C. Cloning of an intracellular poly [ d ( x ) -3-hydroxybutyrate ] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 94–100, 2001.

SALOMON, K. R.; SILVA LORA, E. E. Estimate of the electric energy generating potential for different sources of biogas in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, n. 9, p. 1101–1107, 2009.

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

SAMBROOK, J., RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SANTANA, V. S.; FERNANDES MACHADO, N. R. C. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. **Catalysis Today**, v. 133-135, n. 1-4, p. 606–610, 2008.

SCHÄFER, A. et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum. **Gene**, v. 145, n. 1, p. 69–73, 1994.

SCHMIDT, M. **Produção de polihidroxicarboxilatos por *Cupriavidus necator*, em batelada sequencial com reciclo externo de células, e modelagem do processo a partir da análise de fluxos metabólicos**. Florianópolis. Tese de Doutorado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2015.

SCHMIDT, M. **Produção de poli(3-hidroxibutirato) por *Cupriavidus necator* DSM 545 em meio suplementado com óleo de soja miniemulsionado**. Florianópolis. Dissertação de Mestrado (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

SCHLEGEL, H. G.; TRÜPER, H. G. Repression of enzyme formation in Hydrogenomonas strain H16G+ by molecular hydrogen and by fructose. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 32, n. 1, p. 277–292, 1966.

SELIM, M. H.; ELSHAFEI, A. M.; EL-DIWANY, A. I. Production of single cell protein from yeast strains grown in Egyptian vinasse. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 2, p. 157–160, 1991.

SHIMIZU, R. et al. Detection of phase-dependent transcriptomic

- changes and Rubisco-mediated CO<sub>2</sub> fixation into poly (3-hydroxybutyrate) under heterotrophic condition in *Ralstonia eutropha* H16 based on RNA-seq and gene deletion analyses. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 169, 2013.
- SILVA, C. F. et al. Using the residue of spirit production and bio-ethanol for protein production by yeasts. **Waste Management**, v. 31, n. 1, p. 108–114, 2011.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. a broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.
- SLATER, S. et al. Multiple beta-ketothiolases mediate poly(beta-hydroxyalkanoate) copolymer synthesis in *Ralstonia eutropha*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 8, p. 1979–1987, 1998.
- ŠPOLJARIĆ, I. V. et al. In silico optimization and low structured kinetic model of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 by fed-batch cultivation on glycerol. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 625–635, 2013.
- STEINBIICHEL, A.; STEINBIICHEL, A. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 219–228, 1995.
- STEINBÜCHEL, A.; SCHLEGEL, H. G. Physiology and molecular genetics of poly(β-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 535–542, 1991.
- SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 10, p. 1503–1555, 2000.
- TAIDI, B.; MANSFIELD, D. A; ANDERSON, A. J. Turnover of poly (3-hydroxybutyrate ) ( PHB ) and its influence on the molecular mass of the polymer accumulated by *Alcaligenes eutrophus* during batch culture. v. 129, p. 201–205, 1995.
- TANADCHANGSAENG, N.; YU, J. Microbial synthesis of

polyhydroxybutyrate from glycerol: Gluconeogenesis, molecular weight and material properties of biopolyester. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 11, p. 2808–2818, 2012.

THIRUMALA, M.; VISHNUVARDHAN REDDY, S.; MAHMOOD, S. K. Production of Poly-3-hydroxybutyrate from inexpensive substrates. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 735–738, 2009.

THOMPSON, J. C.; HE, B. B. Characterization of crude glycerol from biodiesel production from multiple feedstocks. **Applied Engineering in Agriculture**, v. 22, n. 2, p. 261–265, 2006.

VACCARINO, C. et al. The effects of NaOH treatments of grape-marc, vinasse, and wheat-straw mixtures on their degradability in vitro. **Bioresource Technology**, v. 44, n. 1993, p. 197–202, 1993.

VANDAMME, P.; COENYE, T. Taxonomy of the genus *Cupriavidus*: A tale of lost and found. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2285–2289, 2004.

VERLINDEN, R. A. J. et al. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 6, p. 1437–1449, 2007.

VOEGELE, R. T.; SWEET, G. D.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 4, p. 1087–1094, 1993.

VOLOVA, T. G. et al. Effects of intracellular poly(3-hydroxybutyrate) reserves on physiological-biochemical properties and growth of *Ralstonia eutropha*. **Research in Microbiology**, v. 164, n. 2, p. 164–171, 2013.

VRANA ŠPOLJARIĆ, I. et al. Mathematical modeling of poly[(R)-3-hydroxyalkanoate] synthesis by *Cupriavidus necator* DSM 545 on substrates stemming from biodiesel production. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 482–494, 2013.

WANG, F.; LEE, S. Y.; WANG, F. Poly(3-Hydroxybutyrate) production with high productivity and high polymer content by a fed-



batch culture of *Alcaligenes latus* under nitrogen limitation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3703-3706, 1997.

WANG, J. et al. Kinetic analysis on the production of polyhydroxyalkanoates from volatile fatty acids by *Cupriavidus necator* with a consideration of substrate inhibition, cell growth, maintenance, and product formation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 422-428, 2010.

WANG, Y.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF. **Structure**, v. 13, n. 8, p. 1107-1118, 2005.

WEISSENBORN, D. L.; WITTEKINDTN, N.; LARSONSII, T. J. Structure and Regulation of the gZpFK Operon Encoding Glycerol. **Biochemistry**, v. 267, n. 9, p. 6122-6131, 1992.

WIECZOREK, R. et al. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2425-2435, 1995.

WILKIE, A. C.; RIEDESEL, K. J.; OWENS, J. M. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 2, p. 63-102, 2000.

WILLIAMS, S. F. et al. PHA applications: Addressing the price performance issue I. Tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 25, n. 1-3, p. 111-121, 1999.

YORK, G. M. et al. The *Ralstonia eutropha* Phap protein couples synthesis of the Phap phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 59-66, 2002.

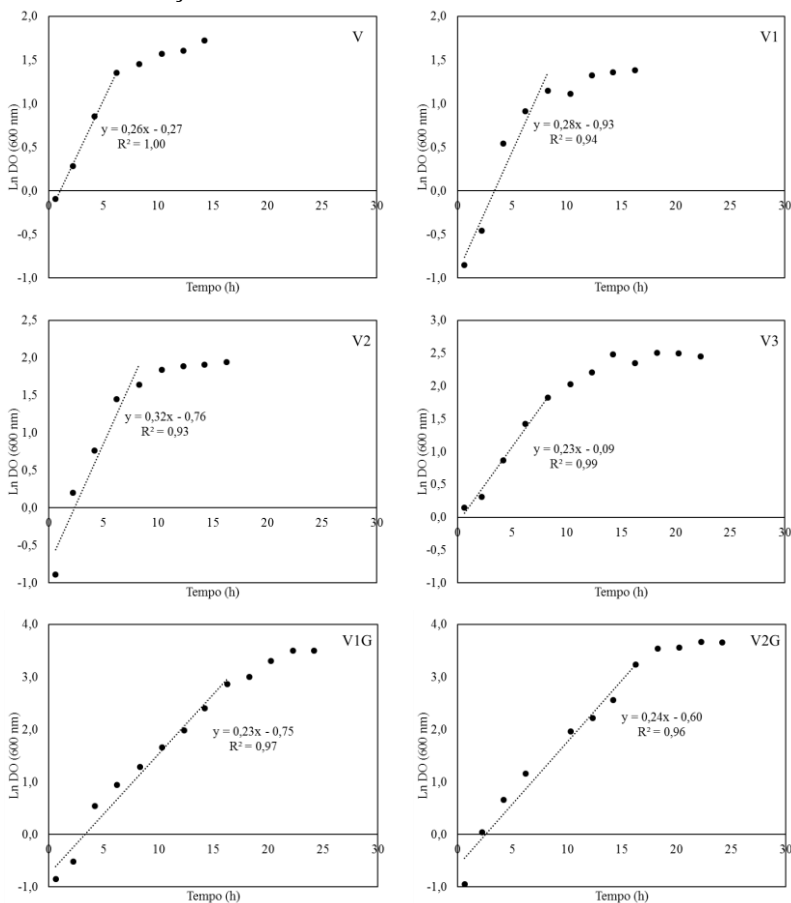
YAMANE, T. Yield of poly-d-3-hydroxybutyrate from various carbon sources: a theoretical study. **Biotechnology Bioenergy**. v. 41, p. 165-170, 1993.

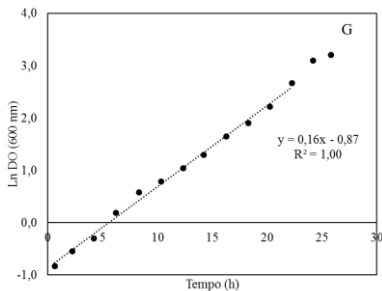
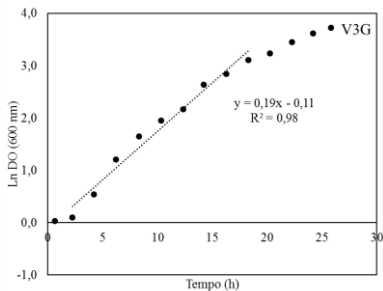
YANISCH-PERRON, C., J. VIEIRA, J. MESSING. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequencing of the M13mp18 and pUC9 vectors. **Gene**, v. 33, p. 103-119, 1985.

YU, J.; STAHL, H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8042–8048, 2008.

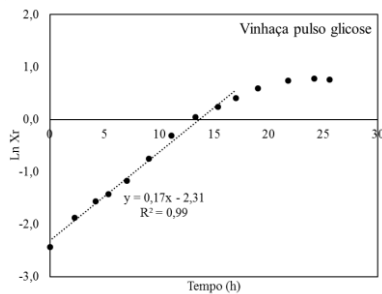
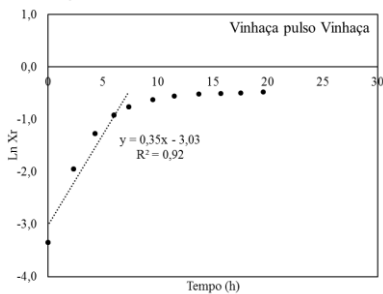
## APÊNDICE I

Gráficos da representação logarítmica da biomassa (medida através da densidade ótica) com o tempo de cultivo, para a obtenção dos cálculos das velocidades específicas máximas de crescimento para os cultivos em vinhaça, vinhaça em diferentes concentrações e glicose, discutidos na Seção 3.2 deste trabalho.





Gráficos do neperiano da biomassa residual que foram utilizados para os cálculos das velocidades específicas máximas de crescimento para o acompanhamento do crescimento em vinhaça com pulso de glicose e vinhaça com pulso de vinhaça. Os dados experimentais referentes a estas duas figuras estão discutidos na Seção 3.2.3.



## APÊNDICE II

### Protocolo para preparo de células competentes de *Escherichia coli* TOP10.

O processo inicia-se com o plaqueamento da cultura de *E. coli* TOP10 em meio LB, por 12 a 16 horas por 37 °C. Decorrido esse tempo, selecionar uma colônia isolada da placa e transferir para 5 mL de meio LB e incubar sob agitação por 12 a 16 horas. Transferir 2,5 mL dessa cultura para 250 mL de meio LB (frasco *erlenmeyer* de 1 L) e incubar a 37 °C e 200 rpm até que a densidade ótica (600 nm) atinja 0,4.

Transferir o volume de células para cinco tubos de 50 mL (previamente gelados) e deixar em banho de gelo por 20 min. Centrifugar a 3000 *g* (4 °C) durante 10 min. Ressuspender as células em 15 mL de CaCl<sub>2</sub> (0,1 M) gelado (3 mL em cada tudo e em seguida transferir pra um único tubo) e deixar em banho de gelo por 30 min. Centrifugar a 3000 *g* (4 °C) durante 10 min e em seguida, remover o meio. Ressuspender as células em 4 mL de uma solução de CaCl<sub>2</sub>(0,1 M) e glicerol (15%) gelada. Transferir 100 mL para micro tubos de plástico gelados, congelar em nitrogênio líquido e manter em freezer (-80 °C).

### Protocolo para preparo de células eletrocompetentes de *Escherichia coli* S17.

Cultivar *E. coli* S17 em meio LB *overnight* a 37 °C. Transferir de 0,2 mL a 1 mL dessa cultura para 500 mL de meio LB em frascos de 1 L e incubar sob agitação, a 37 °C até que a densidade ótica (600 nm) seja aproximadamente 1,0. Retirar os frascos do agitador orbital e deixá-los em banho de gelo por 15 min. Centrifugar as células a 5000 *g* por 15 min e 4 °C e remover o sobrenadante. Estocar as células em glicerol (10%) a 4 °C por dois dias. Ressuspender as células em água gelada estéril, centrifugar sob as mesmas condições, ressuspender mais uma vez em água gelada e centrifugar novamente, remover o sobrenadante. Ressuspender em 20 mL de solução glicerol (10%) gelada, centrifugar mais uma vez e remover o sobrenadante cuidadosamente. Ressuspender as células em 3 mL de solução glicerol (10%) gelada. Por fim, fracionar as células em alíquotas de 150 µL e armazenar em microtubos de plástico em freezer (-80 °C).