

GISELLE EMIKO OMOKAWA GOTO

ISABELA RUPP KAVANAGH

DESENVOLVIMENTO DE *E. COLI* GENETICAMENTE MODIFICADA  
PARA A UTILIZAÇÃO DE SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO,  
VISANDO À APLICAÇÃO NA EXPRESSÃO DE HIDROLASES PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

São Paulo

2012

GISELLE EMIKO OMOKAWA GOTO  
ISABELA RUPP KAVANAGH

DESENVOLVIMENTO DE *E. COLI* GENETICAMENTE MODIFICADA  
PARA A UTILIZAÇÃO DE SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO,  
VISANDO À APLICAÇÃO NA EXPRESSÃO DE HIDROLASES PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
à Escola Politécnica da Universidade de São  
Paulo

São Paulo  
2012

GISELLE EMIKO OMOKAWA GOTO  
ISABELA RUPP KAVANAGH

DESENVOLVIMENTO DE *E. COLI* GENETICAMENTE MODIFICADA  
PARA A UTILIZAÇÃO DE SACAROSE COMO FONTE DE CARBONO,  
VISANDO À APLICAÇÃO NA EXPRESSÃO DE HIDROLASES PARA  
PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
à Escola Politécnica da Universidade de São  
Paulo

Área de concentração: Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Adriano R. Azzoni

São Paulo  
2012

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Adriano R. Azzoni, pela orientação e pelo constante estímulo transmitido durante todo o trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE pelo fornecimento das linhagens celulares utilizadas neste trabalho, e em especial à Dra. Sindélia F. Azzoni, pelo acompanhamento e auxílio constante durante sua execução.

Aos nossos familiares, colegas de turma e a todos que colaboraram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

## RESUMO

A produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica é uma forma promissora de obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis de energia. Entretanto, a tecnologia disponível atualmente não garante a conversão eficiente deste tipo de biomassa em açúcares fermentáveis. Uma alternativa para contornar este problema envolve a hidrólise enzimática da celulose e hemicelulose em açúcares fermentáveis. Contudo, para que esta alternativa se torne economicamente viável, é necessário que haja redução dos custos de produção das enzimas utilizadas neste processo. Consideráveis avanços nesse sentido têm sido realizados através da produção de enzimas heterólogas por microorganismos geneticamente modificados, dentre os quais a bactéria *Escherichia coli*.

Originalmente, a *Escherichia coli* é incapaz de metabolizar sacarose eficientemente. Entretanto, o uso de sacarose representaria uma grande vantagem, pois a sacarose é um açúcar abundante e de baixo custo. Estudos indicam que é possível tornar a *E. coli* apta a metabolizar sacarose, através da transferência para esta bactéria do operon sacarose de microorganismos naturalmente aptos a utilizar este açúcar.

Neste projeto, foram realizados ensaios de cinética com o objetivo de acompanhar e comparar o crescimento em sacarose de três linhagens de *Escherichia coli* geneticamente modificadas para o consumo de sacarose, sendo tais linhagens denominadas de BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC e BL21(DE3)SacC. As linhagens Lpp<sup>-</sup> não expressam uma proteína da parede celular. As linhagens SacC possuem o gene SacC que codifica uma enzima capaz de decompor a sacarose em meio extracelular. Observou-se que nos ensaios com glicose a linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> apresentou velocidade específica de crescimento mais alta do que a linhagem original. Nos ensaios com sacarose, entretanto, todas as linhagens apresentaram crescimento lento, mesmo aquelas contendo o gene SacC.

Palavras-chave: Cinética de crescimento; *Escherichia coli*; Sacarose; Hidrolases recombinantes;  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. Succiniciproducens*.

## ABSTRACT

The production of second generation ethanol from lignocellulosic biomass is a promising way of obtaining fuels from renewable energy sources. However, the technology currently available does not guarantee the efficient conversion of this type of biomass into fermentable sugars. An alternative to solve this problem involves the enzymatic hydrolysis of cellulose and hemicellulose into fermentable sugars. However, for this alternative to become economically viable, it is necessary to reduce the production costs of enzymes used in this process. Considerable advances have been made in this direction through the production of heterologous enzymes by genetically modified microorganisms, among which the bacterium *Escherichia coli*.

Originally, *Escherichia coli* is not capable of metabolizing sucrose efficiently. However, the use of sucrose would be a great advantage because sucrose is a low cost and abundant sugar. Studies indicate that it is possible to make *E. coli* able to metabolize sucrose by transferring to the bacteria the sucrose operon from microorganisms naturally able to utilize this sugar.

In this project, kinetic assays were performed in order to monitor and compare growth in sucrose of three strains of *Escherichia coli* genetically modified for the consumption of sucrose. These strains are called BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC and BL21(DE3)SacC. The Lpp<sup>-</sup> strains do not express a protein of the cell wall. The Sacc strains have gene SacC, which encodes an enzyme capable of decomposing sucrose in the extracellular medium. It was observed that in tests with glucose the strain BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> presented a higher specific growth rate than the original strain. In tests with sucrose, however, all strains had very slow growing, even those containing the gene Sacc.

Keywords: Growth kinetics; *Escherichia coli*; Sucrose; Recombinant hydrolases;  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) from *M. Succiniciproducens*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de amplificação de DNA pelo método da PCR. (Fonte: <a href="http://www.e-escola.pt/">http://www.e-escola.pt/</a> , acessado em 22/11/2011).....	22
Figura 2 – Perfis típicos de concentração de biomassa, substrato e produto em função do tempo. (Fonte: SCHMIDELL, W. et al.).....	23
Figura 3 – Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo. (Fonte: SCHMIDELL, W. et al.) .....	25
Figura 4 – Representação esquemática dos primers utilizados na PCR.....	30
Figura 5 – Representação esquemática do cassete de recombinação. ....	31
Figura 6 – (a) Localização dos sítios H1 e H2 reconhecidos pela recombinase do fago <i>lambda Red</i> . (b) Resultado da recombinação gênica.....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curvas de crescimento células das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> em meio contendo glicose como única fonte de carbono. No gráfico inferior são apresentados os pontos utilizados para o cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ . ....	40
Gráfico 2 – Concentrações de glicose e ácido acético em função do tempo de cultivo da BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> . ....	41
Gráfico 3 – Curvas de crescimento celular das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> em meio M9 com sacarose única fonte de crescimento .....	42
Gráfico 4 – Curvas de crescimento da BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> SacC com indução por IPTG em 0h e 4h. ....	43
Gráfico 5 - Pontos utilizados para o cálculo do $\mu_{\text{máx}}$ . ....	44
Gráfico 6 – Curvas de crescimento da BL21(DE3)SacC em sacarose com indução por IPTG em 0h e 4h. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Seqüência de nucleotídeos contendo o gene SacC.....	33
Tabela 2 – Composição do meio M9.....	36

## SUMÁRIO

<b>Introdução</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Objetivo do Projeto</b> .....	<b>13</b>
1.1. Objetivo geral.....	13
1.2. Objetivos específicos.....	13
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>14</b>
2.1. Produção de etanol de segunda geração.....	14
2.2. A sacarose como fonte de carbono.....	15
2.3. Adaptando a <i>Escherichia coli</i> ao consumo de sacarose.....	16
<b>3. Aspectos teóricos</b> .....	<b>17</b>
3.1. Expressão de genes mediada por plasmídeos .....	17
3.2. Modificação genética por recombinação homóloga .....	19
3.2.1. Recombinase $\lambda$ Red .....	20
3.3. Modificação genética por recombinação sítio-específica.....	20
3.4. Amplificação de DNA .....	21
3.5. Cinética de crescimento microbiano .....	22
3.5.1. Velocidades específicas .....	23
3.5.2. Fator de conversão global .....	24
3.5.3. A curva de crescimento microbiano.....	24
3.5.4. Cálculos da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) .....	26
<b>4. Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas</b> .....	<b>28</b>

	10
<b>4.1. BL21(DE3)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup></b> .....	<b>29</b>
4.2.1. Preparação do cassete de recombinação.....	30
4.2.2. Preparação das células competentes .....	31
4.2.3. Eletroporação .....	31
<b>4.3. BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC</b> .....	<b>33</b>
<b>4.4. BL21(DE3)SacC</b> .....	<b>35</b>
<b>5. Metodologia</b> .....	<b>36</b>
<b>5.1. Estudos da cinética de crescimento celular</b> .....	<b>36</b>
5.1.1. Cultivo das linhagens de E. coli .....	36
5.1.2. Medida de concentração celular .....	37
5.1.3. Medida das concentrações de substrato .....	38
<b>6. Resultados e discussões</b> .....	<b>39</b>
<b>6.1. Ensaio de cultivo</b> .....	<b>39</b>
6.1.1. Cultivo das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> em meio M9 com glicose como única fonte de carbono 39	
6.1.2. Cultivo das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono 41	
6.1.3. Cultivo das linhagens modificadas BL21(DE3)Lpp <sup>-</sup> SacC em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono.....	43
6.1.4. Cultivo das linhagens modificadas BL21(DE3)SacC em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono 45	
<b>7. Perspectivas</b> .....	<b>46</b>
<b>8. Conclusão</b> .....	<b>47</b>
<b>Referências</b> .....	<b>48</b>

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se observado um grande aumento na demanda mundial de energia. A maior parte desta energia ainda provém de combustíveis produzidos a partir de fontes energéticas não-renováveis, em especial, os derivados de petróleo, o que é motivo de preocupação pela elevada emissão de gases estufa e pela questão da sustentabilidade, tema de muita preocupação na atualidade. Juntos, os derivados de petróleo representam 55% do consumo mundial de energia (<http://www.bioetanol.org.br>). Infelizmente, a disponibilidade de petróleo deve diminuir nas próximas décadas e a sua complexidade de extração deve aumentar.

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos economicamente viáveis para a produção de biocombustíveis, a partir de fontes renováveis de energia, tornou-se um dos focos mais importantes de pesquisadores em todo o mundo. No Brasil, houve um grande progresso em torno da produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, como uma alternativa economicamente viável ao uso de combustíveis fósseis.

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é tradicionalmente feita a partir da fermentação do caldo de cana, via ação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, permanecem pouco aproveitados o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, fontes de carbono (celulose) que respondem por dois terços da energia da planta, mas que não são facilmente convertidos a bioetanol. A eficiente conversão destes resíduos ligno-celulósicos em açúcares fermentáveis, passíveis de utilização em processos de produção de biocombustíveis, ainda se apresenta como o maior obstáculo para a competitividade e utilização em larga escala dessa fonte de energia renovável. O método mais promissor para se realizar esta conversão é através da hidrólise enzimática da celulose e da hemicelulose em açúcares fermentáveis (pentoses e hexoses), que podem, então, ser utilizados como fonte de carbono no processo de fermentação por microorganismos para etanol. No entanto, a produção das enzimas aplicadas ao processo ainda é custosa, o que inviabiliza economicamente o aproveitamento integral da biomassa da cana-de-açúcar.

Estas enzimas podem ser produzidas industrialmente a partir de fungos filamentosos e leveduras, e também utilizando-se a bactéria *Escherichia coli* submetida à devida modificação genética. Entretanto, o alto custo de produção destas enzimas tem até hoje limitado a viabilidade do etanol de segunda geração, o que tem levado a esforços consideráveis no sentido de buscar formas de redução destes custos de produção. Originalmente, a *E. coli* utiliza glicose e outros açúcares como fonte de carbono, mas não metaboliza eficientemente sacarose. Entretanto, há um grande interesse na utilização de sacarose como fonte de carbono, pois seu custo é significativamente inferior ao custo dos açúcares utilizados atualmente e seu consumo como fonte de carbono significaria uma considerável redução nos custos de produção industrial das enzimas. Estudos publicados recentemente indicam que é possível tornar a *E. coli* apta a consumir sacarose como fonte de carbono, através da simples inclusão em seu material genético do gene que codifica para a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase, responsável pela hidrólise da molécula de sacarose no meio extracelular (Lee et. al, 2010).

Este trabalho tem por objetivo promover o desenvolvimento e caracterização inicial de uma linhagem de *Escherichia coli* geneticamente modificada capaz de metabolizar sacarose, que poderá ser utilizada na expressão de diferentes enzimas industriais. Para isso, será realizada a inserção na *E. coli* de um plasmídeo contendo o gene que codifica a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. succiniciproducens*. Esta modificação genética será feita com o apoio de pesquisadores do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE (Campinas, SP). As linhagens de *E. coli* modificadas serão a BL21(DE3) e a BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, esta última recentemente desenvolvida naquele Laboratório para a expressão de hidrolases recombinantes. Finalmente, será feito o cultivo em pequena escala das linhagens modificadas e será avaliada a capacidade de crescimento das mesmas em um meio de cultura que tenha sacarose como única fonte de carbono. Serão obtidos parâmetros importantes para a avaliação da viabilidade da nova linhagem, como velocidade específica de crescimento ( $\mu_{max}$ ). As atividades mencionadas serão realizadas no Grupo de Engenharia de Bioprocessos do Departamento de Engenharia Química da EPUSP.

## 1. OBJETIVO DO PROJETO

### 1.1. Objetivo geral

- Desenvolvimento de uma linhagem de *E. coli* adaptada ao consumo de sacarose como fonte de carbono, através da inserção de plasmídeos contendo o gene que codifica a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. Succiniciproducens*, na *E. coli* BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>.

### 1.2. Objetivos específicos

- Fazer um levantamento bibliográfico de estudos que busquem tornar a *E. coli* adaptada ao consumo de sacarose via modificações genéticas, bem como das metodologias utilizadas nestes estudos.
- Obter, no banco de dados EMBL-Bank (EBI), a seqüência de nucleotídeos do gene SacC que será comercialmente sintetizado para ser inserido na bactéria, etapa a ser realizada com o apoio dos técnicos do CTBE.
- Fazer o cultivo em pequena escala (bateladas em erlenmeyers agitados) desta nova linhagem e de duas linhagens de controle, a BL21(DE3) e a BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, avaliando sua capacidade de crescimento em um meio de cultura contendo sacarose como única fonte de carbono.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Produção de etanol de segunda geração

O etanol de segunda geração é aquele produzido através da utilização integral da biomassa da cana-de-açúcar, a partir da fermentação inclusive do material lignocelulósico. Para a obtenção do etanol de segunda geração, são necessários, basicamente, dois processos: a hidrólise dos polissacarídeos, em principal a celulose e a hemicelulose, em açúcares (pentoses e hexoses) e a fermentação destes em etanol. A fermentação é uma técnica já bem conhecida e dominada, no entanto, a hidrólise ainda apresenta dificuldades para a sua aplicação industrial. (<http://www.bioetanol.org.br>)

Atualmente, os processos industriais de hidrólise da biomassa são caros e pouco eficientes, envolvendo temperaturas altíssimas e a utilização de ácidos. A hidrólise enzimática é uma alternativa que tem sido amplamente estudada nos últimos anos, devido o seu potencial em proporcionar maiores rendimentos e não formar subprodutos indesejáveis. Porém, fatores como o alto custo das enzimas, a baixa produtividade e a dificuldade atual em se atingir os rendimentos esperados têm se mostrado como importantes desafios científicos para o sucesso comercial da técnica. Faz-se, portanto, imprescindível para a viabilidade do processo enzimático, a disponibilidade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas de elevada eficiência e baixo custo.

Uma variada gama de microorganismos tem sido descritos como produtores com potencial de utilização na produção de celulasas e hemicelulasas. Entre eles, há desde bactérias, leveduras e fungos filamentosos que naturalmente utilizam o material celulósico como substrato e, portanto, possuem vias selvagens para a produção das enzimas em questão, até a produção de enzimas recombinantes via manipulação genética de *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* e fungos filamentosos (Azzoni S.F., 2009).

Dando especial atenção à *E. coli*, microorganismo em enfoque neste estudo, esta bactéria é um dos hospedeiros mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes em larga escala, sendo muito bem caracterizado do ponto de vista genético, fisiológico e de expressão. Sabe-se que a grande maioria das linhagens dessa bactéria não consegue metabolizar sacarose (mais de 50%), tendo como principal fonte de carbono a glicose. No entanto, a glicose tem um custo elevado e é mais interessante a utilização de sacarose no meio de cultura como fonte de carbono, pois ele é altamente disponível no mercado por um preço inferior. (*Eliot et al, 2011*)

## **2.2. A sacarose como fonte de carbono**

No meio ambiente, existe uma grande variedade de carboidratos disponíveis como fonte de carbono para bactérias e outros microorganismos. Algumas espécies bacterianas produzem enzimas que facilitam o consumo desses açúcares. Algumas dessas enzimas são extracelulares e quebram os carboidratos em partes menores que podem ser absorvidas e metabolizadas pelas bactérias. (*Reid & Abratt, 2005*)

A sacarose é um dissacarídeo extremamente abundante no meio ambiente, sendo composto pela ligação entre os monossacarídeos glicose e frutose e obtida principalmente a partir da cana-de-açúcar e da beterraba. A facilidade em extrair sacarose torna o seu custo inferior ao de outros açúcares usados como fonte de carbono por microorganismos, como a glicose, por exemplo. Além disso, estudos mostram que a sacarose exerce influência positiva na preservação de estruturas protéicas, protegendo as células contra oxidação, calor, desidratação e estresse devido a meio ácido. (*Molina-Hoppner et al, 2004*)

Assim, é funcional e economicamente interessante utilizar a sacarose como fonte de carbono em meios de cultura de bactérias e outros microorganismos, na produção industrial de produtos celulares, como enzimas e outras proteínas.

### 2.3. Adaptando a *Escherichia coli* ao consumo de sacarose

As vantagens mencionadas acima fizeram com que muitos pesquisadores tentassem desenvolver uma linhagem de *E. coli* capaz de metabolizar sacarose. A maior parte dos estudos realizados tem por foco a transferência do operon sacarose para a bactéria, utilizando para isso diferentes fontes de genes.

*Garcia (1985)* utilizou um plasmídeo proveniente de uma linhagem de *Salmonella* capaz de realizar fermentação a partir de sacarose. *Sprenger and Lengeler (1988)* basearam-se em um sistema de fosforilação de sacarose presente em uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae*.

Recentemente, observou-se que a superexpressão da enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. Succiniciproducens* resultou em hidrólise de sacarose em meio extracelular. A partir desta observação, surgiu a hipótese de que tal enzima também poderia ser utilizada para conferir a outros microorganismos a capacidade de utilizar sacarose como fonte de carbono. Um estudo realizado por *Lee et al (2010)* obteve resultados animadores, a partir da simples transferência do gene que codifica enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) da *M. Succiniciproducens* para a *E. coli* linhagem K-12 modificada geneticamente para a produção do aminoácido treonina. Este estudo serviu de base para a realização deste projeto.

### 3. ASPECTOS TEÓRICOS

#### 3.1. Expressão de genes mediada por plasmídeos

Até a década de 70, o DNA era o componente celular mais difícil de ser analisado. A partir desta década, novas tecnologias foram desenvolvidas, permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos, obtê-los em grandes quantidades e determinar rapidamente a sua seqüência. A tecnologia do DNA recombinante, como se convencionou chamar este conjunto de técnicas, tem uma ampla aplicação. Dentre elas, destaca-se o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis ao ser humano.

A tecnologia do DNA recombinante consiste na criação de novas combinações de material genético a partir de moléculas de DNA que podem, eventualmente, ser de origens diferentes. Estas moléculas quiméricas são introduzidas em organismos hospedeiros adequados, onde poderão ser expressas e multiplicadas (Lima e Mota, 2003).

A obtenção de uma rProteína envolve vários passos. O primeiro deles consiste na ligação de um fragmento de DNA, cuja seqüência de bases codifica a proteína que se quer produzir, a um veículo de DNA denominado “vetor de clonagem”. Este vetor serve de veículo para a introdução e transmissão às novas gerações da nova mensagem genética a ele ligada. Os vetores de clonagem para bactérias são construídos com base em plasmídeos naturais dessas bactérias. Plasmídeos são pequenas moléculas de DNA de fita dupla, contendo os elementos necessários para a sua replicação e pelo menos um gene que confere resistência a antibiótico.

Uma vez construído o vetor de clonagem, este deve ser introduzido numa célula hospedeira para ser multiplicado. Para isso, é necessário desenvolver a capacidade (competência) das bactérias para receber o DNA presente no meio circundante. A introdução de plasmídeos em *E. coli* é possível após indução artificial da sua

competência por incubação das células a 4°C com cloreto de cálcio e posterior exposição a um choque térmico de curta duração (2 minutos a 42°C). Esta técnica pode apresentar variações. Em seguida, as bactérias são transformadas, isto é, recebem o plasmídeo, pelas técnicas de eletrotransformação ou transformação química (Lima e Mota, 2003).

Após a clonagem, os clones de interesse são selecionados com base no fato de as células com o plasmídeo recombinado exibirem resistência a um antibiótico. Em seguida, o gene recombinante é introduzido no hospedeiro alvo para ser expresso.

O sistema mais comumente utilizado para expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza *E. coli* como célula hospedeira. Este sistema é amplamente utilizado devido à facilidade e baixo custo de se cultivar *E. coli* e pela reprodutibilidade e abundância de proteína que produz. Frequentemente, utiliza-se como vetor de expressão em *E. coli* um plasmídeo de expressão. O plasmídeo de expressão deve conter alguns elementos genéticos especiais para que possa desempenhar com eficiência sua função, tais como: origem de replicação, marcador para seleção, promotor para transcrição, sinal de terminação da transcrição e seqüências para controle da tradução.

A origem de replicação permite a transmissão do vetor à descendência da bactéria hospedeira. O marcador para seleção confere resistência a antibióticos como ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, entre outros. O promotor, posicionado a montante do local de ligação do ribossomo (RBS, *ribosome binding site*), deve conter um repressor para manter os níveis basais de expressão do gene insignificantes até a indução. Quando induzido, o promotor deve ser forte, promovendo uma transcrição rápida da seqüência codificante. Desta forma, evita-se que a síntese de elevada concentração de uma rProteína, que possa ser tóxica para as células, ocorra antes de serem atingidas densidades celulares elevadas. Neste trabalho, foi utilizado o promotor *tac*, induzido por isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido (IPTG), o qual se associa ao repressor e inibe-o, deixando o promotor livre para a interação com a RNA polimerase e a conseqüente transcrição do gene. O sinal de terminação, localizado a jusante da seqüência codificante, evita a síntese de transcritos desnecessariamente longos. As seqüências para controle da tradução

consistem em um sítio para ligação ao ribossomo para iniciação da tradução, um ATG iniciador e um códon de terminação (Lima e Mota, 2003).

Uma vez construído, o vetor de expressão contendo a seqüência codificadora da proteína de interesse é introduzido em *E. coli* por transformação. Em seguida, graças ao marcador de seleção, faz-se a seleção das células que efetivamente receberam o plasmídeo. As células que recebem o plasmídeo de expressão estão prontas para expressar a proteína de interesse quando for adicionado o indutor adequado.

A técnica de expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* através de plasmídeos de expressão foi utilizada na obtenção da linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC. Esta linhagem foi transformada com plasmídeos contendo o gene SacC que codifica a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase, responsável pela hidrólise de sacarose em meio extracelular.

### **3.2. Modificação genética por recombinação homóloga**

Uma das maneiras de se obter a expressão de um gene de interesse na bactéria *E. coli* é por meio da inserção deste gene no genoma da bactéria. Isto pode ser feito por meio da técnica de recombinação homóloga, a qual foi utilizada na obtenção da linhagem de *E. coli* BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>.

Na recombinação homóloga, a troca genética envolve seqüências de DNA homólogas, isto é, complementares.

### **3.2.1. Recombinase $\lambda$ Red**

A recombinação homóloga em *Escherichia coli* a partir de fragmentos lineares de DNA é dificultada pela presença nesta célula de enzimas exonucleases que degradam este tipo de molécula (Lorenz, 1994). Muitos vírus bacteriófagos possuem seus próprios sistemas de recombinação homóloga. A recombinase  $\lambda$  Red é um destes sistemas, sendo constituída pelos genes  $\alpha$ ,  $\beta$  e *exo*. O gene  $\alpha$  codifica para uma proteína que inibe a exonuclease da *E. coli*, permitindo que ocorra a recombinação desejada (Datsenko e Wanner, 2000).

A recombinase  $\lambda$  Red oferece uma alternativa para a recombinação homóloga em *E. coli*, contanto que esta seja modificada recebendo um plasmídeo que contenha os genes  $\alpha$ ,  $\beta$  e *exo*.

A recombinação homóloga mediada pelo sistema  $\lambda$  Red pode ser utilizada para substituição de genes em *E. coli*, contanto que sejam construídos cassetes de recombinação com seqüências flanqueadoras homólogas às seqüências flanqueadoras do gene que se deseja substituir. Este método requer seqüências flanqueadoras curtas (40 nt) e não exige enzimas de restrição (Datsenko e Wanner, 2000).

A técnica descrita acima foi utilizada na obtenção da linhagem de *E. coli* BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, através da substituição do gene *lpp* pelo gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

### **3.3. Modificação genética por recombinação sítio-específica**

A recombinação sítio-específica é um mecanismo de recombinação gênica encontrado em alguns bacteriófagos que permite a troca de fragmentos de DNA que

se encontrem entre sítios-específicos de excisão. A recombinação sítio-específica, ao contrário da recombinação homóloga, é orientada por proteínas que reconhecem seqüências particulares do DNA e não por homologia de seqüências, logo, os fragmentos trocados podem ser homólogos ou não. O sítio-específico de recombinação é formado por seqüências palindrômicas de nucleotídeos que flanqueiam de ambos os lados o DNA a ser excisado (*Almeida, 2011*). O processo é catalisado pelas enzimas integrase e excisionase, podendo resultar em troca ou remoção do segmento de DNA (*Cho et al., 2002*).

Existem alguns sistemas de recombinação sítio-específica amplamente estudados e utilizados. Um deles é o sistema Cre/loxP encontrado no bacteriófago P1, em que a recombinação ocorre em sítios chamados loxP e dependem da ação de uma proteína codificada pelo gene Cre (*Sternberg e Hamilton, 1981*). Outro sistema é o chamado R/RS, que tem sua origem em *Zygosaccharomyces rouxii*. Neste sistema, a enzima recombinase (R) atua nos sítios de recombinação (RS) (*Matsuzaki et al., 1990*). Finalmente, há o sistema FLP/FRP, proveniente de *Sacharomyces cerevisiae*, que requer a enzima recombinase FLP e o sítio de recombinação FRP. Este sistema mostra-se eficiente na recombinação sítio-específica utilizando DNA exógeno em *Escherichia coli* (*Huang et al., 1991*).

### **3.4. Amplificação de DNA**

A quantidade de DNA de uma amostra pode ser aumentada por clonagem em bactéria (à medida que a bactéria se multiplica, o DNA alvo multiplica-se também) ou por meio de uma reação chamada de Polymerase Chain Reaction - PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que ocorre fora de um ser vivo, em um equipamento chamado Termociclador (*Bonneti A.M. et al., 2007*). A técnica de PCR é uma ferramenta muito utilizada para amplificar seletivamente regiões específicas da

molécula de DNA, disponibilizando grande quantidade de material genético (Carvalho, L. R. et al, 2008).

O processo envolve ciclos de variação da temperatura, de forma que, por aquecimento, as fitas de DNA são separadas em duas cadeias simples, como indica a Figura 1. Em seguida, a temperatura é abaixada para que os oligonucleotídeos iniciadores (primers) se liguem às cadeias simples. Estes primers são cadeias simples de nucleotídeos obtidas por síntese química. Para amplificar uma determinada região, são necessários dois iniciadores complementares das seqüências que flanqueiam o fragmento de DNA a amplificar nos terminais 3'. A temperatura é, então, novamente elevada para que a enzima DNA polimerase, na presença de outros fatores e dos dNTPs (nucleotídeos trifosfatados), faça a síntese da cadeia complementar, usando como molde cada uma das duas cadeias simples constituintes do DNA que se deseja amplificar.



Figura 1 – Esquema de amplificação de DNA pelo método da PCR. (Fonte: <http://www.e-escola.pt/>, acessado em 22/11/2011)

### 3.5. Cinética de crescimento microbiano

O estudo da cinética de crescimento microbiano consiste na análise da evolução dos valores de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação (SCHMIDELL, W. et al.). Tais componentes são a biomassa, os produtos metabólicos e os substratos que compõem o meio de cultura.

Os perfis típicos de concentração celular ( $X$ ), concentração de substrato no meio ( $S$ ) e de produto ( $P$ ), em função do tempo, são dados pela figura 1.

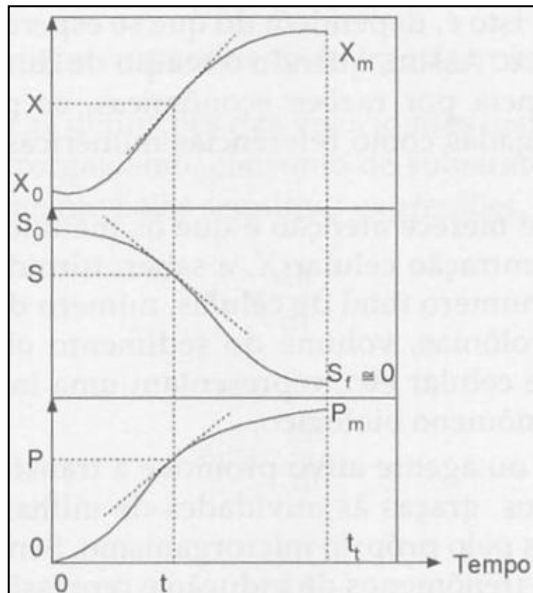


Figura 2 – Perfis típicos de concentração de biomassa, substrato e produto em função do tempo. (Fonte: SCHMIDELL, W. et al.)

### 3.5.1. Velocidades específicas

Por meio dos valores das inclinações das tangentes às curvas dadas acima, obtêm-se as velocidades instantâneas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto. Dado que o consumo de substrato e a formação de produto e biomassa estão intimamente ligados à concentração celular  $X$ , é interessante analisar as velocidades instantâneas especificando-as ao valor de  $X$  em um dado instante. As velocidades específicas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto podem ser escritas das seguintes maneiras:

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

$$\mu_S = \frac{1}{X} \left( -\frac{dS}{dt} \right)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

### 3.5.2. Fator de conversão global

Um fator importante de ser obtido é o fator de conversão global de substrato a células, que é basicamente o rendimento global do cultivo celular, ou seja, a quantidade de células produzidas dividida pela quantidade de substrato consumido:

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

### 3.5.3. A curva de crescimento microbiano

Após a inoculação do microrganismo de estudo em um meio de cultura favorável ao seu desenvolvimento, sob temperatura controlada e agitação adequada, observa-se um comportamento nos valores da concentração celular no decorrer do tempo, conforme indica a figura 2.

A curva superior ilustra a concentração celular (X) em função do tempo. Outra maneira de representar o crescimento é pelo gráfico de logaritmo da concentração celular em função do tempo, mostrada na curva inferior da figura 2. Este último tipo de gráfico representa melhor as diferentes fases de crescimento, sendo elas:

**Fase 1:** Conhecida como fase “Lag”, fase de adaptação, ou fase de latência. Durante este período de tempo, as células passam por um período em que precisam se adaptar ao meio de cultura. A multiplicação celular é muito baixa, ou nula, e verifica-se, por exemplo, a síntese das enzimas necessárias à produção de compostos essenciais ao crescimento da célula e que não se encontrem presentes no meio de cultura, ou ao metabolismo dos compostos presentes.

A duração dessa fase varia principalmente com a concentração do inóculo, com a idade do microrganismo (tempo de pré-cultivo) e com o seu estado fisiológico. Assim, se as células foram pré-cultivadas em um meio de composição muito diferentes, o tempo de duração da fase “Lag” pode ser apreciável. Caso contrário, é possível que essa fase não exista.

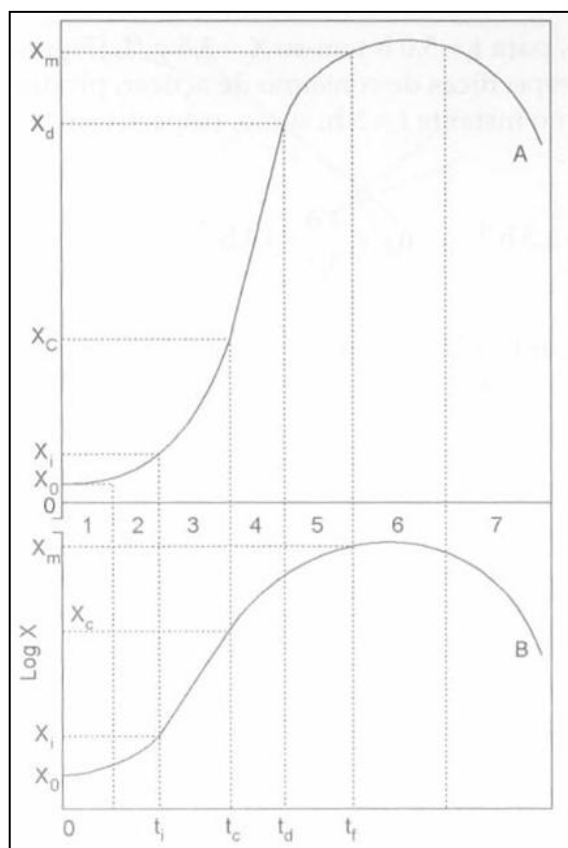


Figura 3 – Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo. (Fonte: SCHMIDELL, W. et al.)

**Fase 2:** Fase de transição, onde se observa o início da reprodução microbiana, havendo um aumento gradual da velocidade de crescimento.

**Fase 3:** Corresponde à fase logarítmica, ou fase exponencial. Durante esta fase, em que todos os nutrientes estão presentes em excesso, os microrganismos dividem-se e a população cresce com uma velocidade específica de crescimento máxima ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e constante que depende do potencial genético do microrganismo, da composição do meio de cultura e das condições de crescimento (temperatura, pH, etc.).

**Fase 4:** Conhecida como fase linear de crescimento, por apresentar velocidade de crescimento constante.

**Fase 5:** Fase de desaceleração. Devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura, necessários ao crescimento, e/ou ao acúmulo de metabólitos inibidores, as velocidades específica e de crescimento diminuem até se tornarem nulas, no tempo  $t_f$ .

**Fase 6:** Fase estacionária. Nessa fase, a concentração celular atinge seu valor máximo,  $X_m$ , e permanece constante, pois a velocidade de crescimento se iguala a velocidade de morte celular.

**Fase 7:** Fase de declínio. A morte celular se acentua, superando a velocidade de produção de células novas.

#### **3.5.4. Cálculos da velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ )**

Com base no conhecimento da curva de crescimento microbiano descrita acima, é possível conhecer a velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo em um dado meio.

Na fase logarítmica, sabe-se que a velocidade específica de crescimento é máxima e constante, podendo ser descrita pela seguinte expressão:

$$\mu_{\text{máx}} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Integrando-a, resulta:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{\text{máx}} \cdot t \Rightarrow \boxed{\ln X = \mu_{\text{máx}} \cdot t + \ln X_0}$$

Portanto, o trecho da fase logarítmica no gráfico de  $\ln X$  vs. tempo se iguala a uma reta cujo coeficiente angular equivale ao valor de  $\mu_{\text{máx}}$ .

## 4. LINHAGENS DE *ESCHERICHIA COLI* UTILIZADAS

### 4.1. BL21(DE3)

As linhagens de *Escherichia coli* utilizadas nos ensaios são derivadas da linhagem B do Instituto Pasteur em Paris utilizadas por d'Herelle em seus estudos sobre bacteriófagos em 1918. Esta linhagem e suas derivadas foram de grande importância no desenvolvimento das bases da biologia, medicina e biotecnologia e ainda hoje são amplamente utilizadas em pesquisas (Daegelen, 2009).

Com o passar dos anos e o trabalho acumulado de diversos pesquisadores, foi obtida a linhagem BL21(DE3) por Studier em 1986. Esta linhagem contém em seu genoma um prófago (DNA viral) derivado de fago  $\lambda$ , o qual traz um gene indutível para T7 RNA polimerase (Daegelen, 2009).

A transcrição por T7 RNA polimerase é altamente ativa e seletiva para seus promotores, os quais não estão presentes naturalmente em *Escherichia coli*. Esta enzima é capaz de promover a elongação de cadeias de RNA cerca de cinco vezes mais rápido do que a RNA polimerase de *E. coli*. Sendo assim, a T7 RNA polimerase produz eficientemente transcritos completos de quase qualquer DNA que esteja associado a um promotor adequado. Esta característica a torna muito atrativa para uso no direcionamento da expressão de genes selecionados em *E. coli* (Studier, 1985).

A linhagem BL21(DE3) possui em seu genoma uma única cópia do o gene 1 do bacteriófago T7, o qual codifica a enzima T7 RNA polimerase, sob controle do promotor *lacUV5*. Desta forma, a adição de IPTG<sup>+</sup> induz o promotor *lacUV5* a produzir T7 RNA polimerase, a qual por sua vez induz a transcrição ativa e seletiva do promotor e a consequente expressão do gene de interesse (Studier, 1985).

Como uma certa quantidade de T7 RNA polimerase é produzida mesmo sem adição de indutor, a linhagem BL21(DE3) não pode ser utilizada para expressão de proteínas tóxicas (Studier, 1985).

Por ser uma linhagem amplamente conhecida e sobretudo adequada à aplicação à qual se destinam as linhagens desenvolvidas neste trabalho (expressão de proteínas recombinantes não-tóxicas), a linhagem BL21(DE3) foi escolhida como ponto de partida para as mutações a serem avaliadas e constitui portanto a linhagem de controle no âmbito deste estudo.

#### **4.2. BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>**

A linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> é obtida a partir da linhagem BL21(DE3), submetida à deleção de um gene responsável pela produção da proteína de membrana lpp. A nova linhagem apresenta a vantagem de excretar enzimas recombinantes para o meio extracelular de forma mais eficiente que a linhagem de origem (Azzoni, 2009). Por meio deste estudo, deseja-se verificar se o aumento na permeabilidade da membrana causado pela ausência da proteína lpp poderia ter efeitos benéficos sobre a capacidade de consumo de sacarose da *E. coli*.

A deleção do gene lpp que codifica para proteína de membrana celular foi realizada segundo o método de inativação de genes descrito por Datsenko e Warner (2000) que se utiliza da recombinase do fago *lambda Red*, mencionado no item 3.2 deste trabalho. O gene lpp foi deletado através da substituição deste gene pelo gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. Este procedimento pode ser dividido em três etapas: preparação do cassete de recombinação, preparação das células competentes e eletroporação.

#### 4.2.1. Preparação do cassete de recombinação

Para a obtenção do cassete de recombinação, o gene de resistência ao cloranfenicol é amplificado por PCR utilizando primers a partir do plasmídeo pKD3. Para isso, são utilizados primers contendo, na extremidade 5', uma seqüência de 40 nucleotídeos homólogos à região adjacente ao gene *lpp* da *E. coli*, o qual se desejava substituir pelo gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. Estas regiões dos primers estão indicadas por H1 e H2 na figura abaixo. A extremidade 3' dos primers contém uma seqüência homóloga aos locais de ligação para amplificação do gene de resistência ao cloranfenicol, indicados pelas seqüências P1 e P2 na figura abaixo. A figura 4 ilustra as diferentes regiões dos primers escolhidos para a PCR. Nesta figura, o gene de resistência ao antibiótico é flanqueado pelos sítios de recombinação FRT, onde atua a enzima recombinase FLP. A existência destes sítios é fundamental, pois possibilita a futura deleção do gene de resistência ao cloranfenicol do material genético da bactéria, caso isto venha a ser desejado.

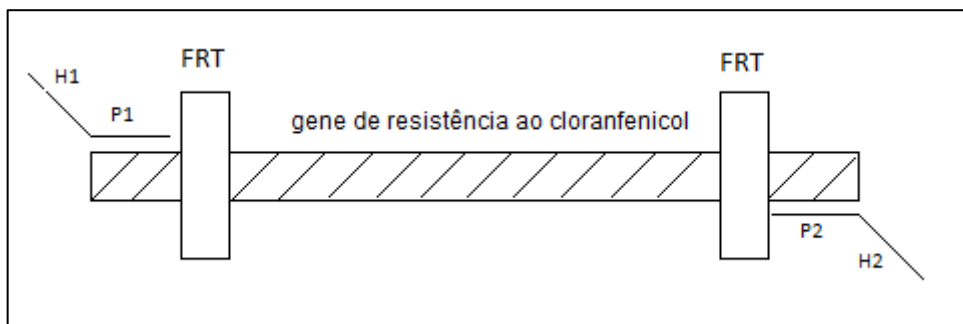
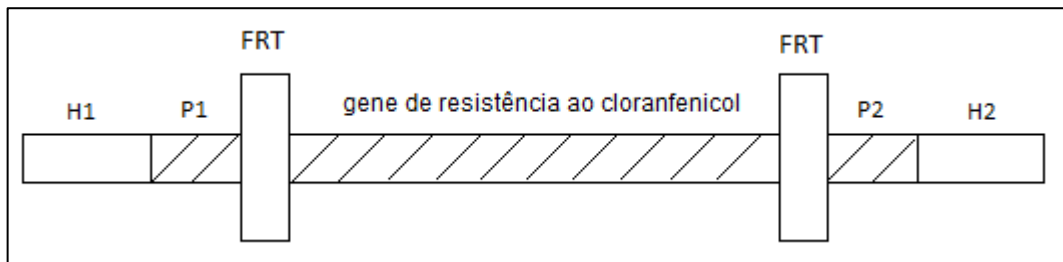


Figura 4 – Representação esquemática dos primers utilizados na PCR

Uma vez concluída a PCR, são obtidos os chamados “cassetes de recombinação”, com a seguinte forma (figura 5):



**Figura 5 – Representação esquemática do cassete de recombinação.**

#### **4.2.2. Preparação das células competentes**

Nesta etapa, a linhagem é preparada para a substituição do gene *lpp* pelo gene de resistência ao cloranfenicol.

Para tanto, uma amostra do banco desta linhagem é cultivada em meio LB e transformada recebendo o plasmídeo pKD46 para a expressão do sistema de recombinação *Red*. As células transformadas são selecionadas em placas contendo meio LB sólido e ampicilina 100 µg/mL.

Estas células contendo o plasmídeo do sistema de recombinação *Red*, são então preparadas para eletrocompetência, o que as torna aptas a seguir para a etapa seguinte de eletroporação.

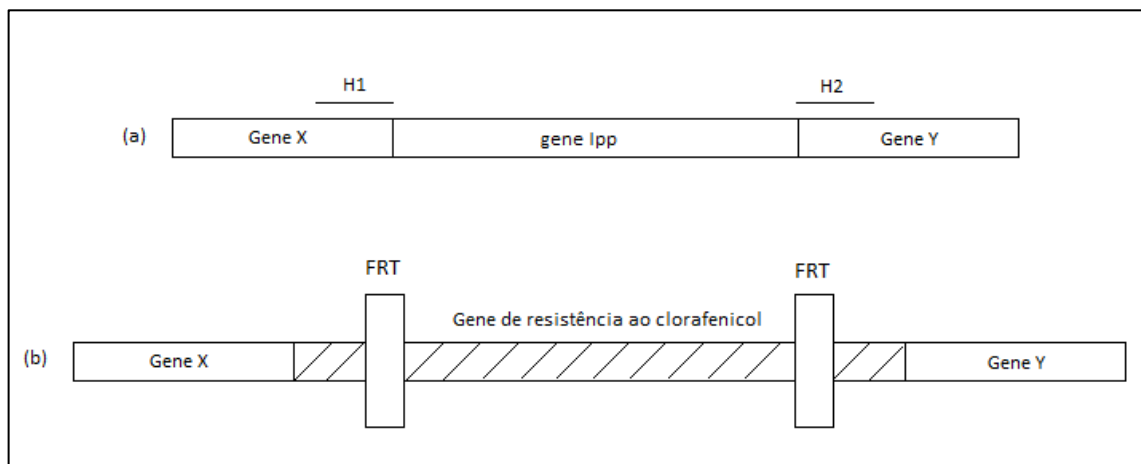
#### **4.2.3. Eletroporação**

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 (“aquaporinas”) na bicamada lipídica, permitindo que

macromoléculas migrem através desses poros (Lorio F.F., et al., 2007). Neste estudo, a eletroporação foi utilizada para permitir a entrada do cassete de recombinação nas células.

Amostras da solução de células transformadas são, então, plaqueadas em meio LB sólido contendo cloranfenicol. As colônias obtidas são repicadas em meio LB e, após o crescimento, são armazenadas a -80°C no próprio meio contendo 20% de glicerol.

Nesta etapa, ocorre a substituição do gene *lpp* pelo gene de resistência ao cloranfenicol, através do reconhecimento pela recombinase do fago  $\lambda$  Red dos fragmentos de DNA que flanqueiam aquele gene. Este passo está esquematizado na figura 6, abaixo.



**Figura 6 – (a) Localização dos sítios H1 e H2 reconhecidos pela recombinase do fago *lambda* Red. (b) Resultado da recombinação gênica.**

Convém salientar que as modificação genética das linhagens de *E. coli* estudadas foram realizadas pelos pesquisadores e técnicos do CTBE, com experiência nesse tipo de modificação genética.

### 4.3. BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC

Esta linhagem consiste na linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> descrita no item anterior, na qual foram inseridos posteriormente plasmídeos contendo o gene que codifica a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. succiniciproducens*.

Os plasmídeos contendo o gene SacC foram encomendados da empresa Prodimol pelos pesquisadores do CTBE. A seqüência de nucleotídeos encomendada, que deve estar presente no plasmídeo adquirido, está representada na tabela 1 abaixo.

**Tabela 1 – Seqüência de nucleotídeos contendo o gene SacC**

```

5'GTGTAGGCTGGAGCTGCTTCCTCGAGTGAATGAGCTGTGACAATTAATCATCGGCTCGTATA
ATGTGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGA
GATATACCCATATGCGGTGCTTTTTACCGCACTTTTCTTTATTTTATTTTCACCAAGGTATAATGAT
GATTATATTTAATAACGGTAAATATAAAAGCATTTTGGCGGCCGAACAGGGCGAGCTTGAACGAAT
TAAAAGCGAGGTAGAAAAAGATCGGGATTTTCGCCCTACTACCATCTCGCGCCATCTACAGGCT
TACTAAACGATCCCAACGGTTTGGTTTTGACGGCGAAAAATTTTCATCTGTTCTATCAATGGTTCC
CGTTTGATGCCATTCACGGCATGAAACACTGGAAGCATTTCACGACCGAGGATTTTCATATCTATA
CCGAAGCCGATCCGCTTATCCCTTGCGAACCTTTTTGAAAGTCACGGTTGTTATTCCGGCGGCGCC
TTACCAGTGGGCGATAAAATCGCCGCATTTTATACCGGTAACACAAGACGCGCTGCGGATAACCA
ACGGGTTCCCTTTCAAATTTAGCGATTTTGGACCGCACCGGTAAACTTCTCAGTAAACGCCATT
AATTGAAAATGCACCGAAAGGCTACACCGAACACGTTTCGTGATCCGAAACCTTACTTCACAAAAG
AAGGAAAAATCCGTTTTATTTGCGGCGCACAACGTGAAGATTTAACCGGCACCGCCATTATTTTTG
AAATGGATAATCTTGATGATGAGCCGCGCTTATTAGGCGAATTGTCTCTCCCGCTTTTGATAATC
AAAAGGTGTTTATGTGGGAATGCCCGGATTTATTGAAAGTCGGCGATAACGATATTTTCATCTGGT
CTCCGCAAGGCAAACGGCGCGAAGCCCGCGTTCCAAAATAATTTTCATGCGGTCTATGCCGT
AGGAAAATTGGATGATCGGACATTTAATGCCGCTCATATTGCCGAACCTTGATCAAGGTTTCGATTT
CTATGCGCCGCAAACCTTTTGGCGGCTGGAAAATCAAAGCATGCCGTTATGTTGCGTTGGTGCG
GTATGCCGATTTGACCTACCCGACGGATAAATACAAATGGCATTCAATGCTGACTCTCCCGCGG
GAAATTACATTGCAAGGCAATAGGCTTGTTGAGCGCCCGATAAAAAGAAATTTATCAAATTTGACC
GCACTTTTCGCAAATTTCCCTGCAACAGCAAGCGGAAATTCAGGATTTAGATCGAGCCTATATAAA
TTTGACGCGGAAAACACAGCGTTTAATATCCGCTTTTTTGCCAACGAACAAGGACAAACGCTCTC
GCTTTCTTATGACGGAGAACTTGTTTGTCTGGATCGTTCGCAAACGGAAGAAACGGAATGGATGA
AAAAATTTGCTAGTCAGCGTTATTGTGAAATAAAGAATCTGCGACAAGTGGAAATTTTCTTTGACC
GCTCAATTATTGAGATTTTCTGAATGACGGCGAAAAAGCCCTGACTTCGAGATTCTTTATTGCGA

```

ACCGCCAAAATTCCGTCAAACCGACCGCACTTTGCGGTTAAACGTCGGTTATCCGAAAGAAATT  
 GAATATAAATAGGAATTCGGACCATGGCTAATTCCCAT 3'

O gene SacC corresponde à seqüência em azul na tabela acima. Esta seqüência foi obtida a partir da base de dados virtual *EMBL Nucleotide Sequence Database* (**EMBL-Bank**).

A seqüência em vermelho claro sublinhada corresponde ao promotor *Tac*, indutível com IPTG. A seqüência em laranja corresponde ao operador *lac* e a seqüência em roxo representa o sítio RBS, onde ocorre a ligação do ribossomo no mRNA.

As seqüências em vermelho escuro correspondem aos sítios de restrição reconhecidos pelas enzimas *XhoI*, *XbaI*, *NdeI* e *EcoRI*. A existência destes sítios permite o recorte da seqüência encomendada em diferentes posições, o que pode vir a ser útil em aplicações futuras.

As seqüências em cinza nas extremidades 5' e 3' correspondem às regiões que serão reconhecidas pelos primers caso se deseje amplificar este gene por PCR. Esta característica não terá funcionalidade neste trabalho, mas será de grande utilidade em trabalhos futuros, caso se ambicione fazer a inserção do gene SacC no genoma da bactéria.

Com a inserção na *E. coli* de plasmídeos contendo as seqüências acima descritas, espera-se que sua capacidade de consumo de sacarose aumente, pois, como mencionado no item 2.3 deste trabalho, a superexpressão da enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (codificada pelo gene SacC) promove a hidrólise de sacarose em meio extracelular.

A inserção dos plasmídeos na linhagem B21(DE3)Lpp<sup>-</sup> foi realizada por técnicos e pesquisadores do CTBE.

#### 4.4. BL21(DE3)SacC

A última linhagem a ser estudada consiste na linhagem BL21(DE3) descrita no item 4.1, na qual foram inseridos posteriormente os mesmos plasmídeos descritos no item anterior, contendo o gene que codifica a enzima  $\beta$ -fructofuranosidase (SacC) de *M. succiniciproducens*. Espera-se que esta linhagem tenha maior capacidade de consumo de sacarose do que a linhagem BL21(DE3) que não contém plasmídeos com o gene SacC.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Estudos da cinética de crescimento celular

#### 5.1.1. Cultivo das linhagens de *E. coli*

As linhagens de controle, BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> e BL21(DE3), e a linhagem modificada neste trabalho, a BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>+SacC, foram cultivadas em dois meios de cultura distintos: meio M9 suplementado com sacarose, como única fonte de carbono, e meio M9 contendo apenas glicose como fonte de carbono.

Amostras do cultivo celular foram retiradas a cada hora, para acompanhar o crescimento celular e levantar curvas de concentração celular ( $X$ ) e de substrato ( $S$ ) ao longo do tempo, calcular a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e o fator global de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ).

O meio M9 foi preparado respeitando as concentrações de sais fornecidas na tabela 4, obtidas do artigo de *LEE J.W. et al.*

Tabela 2 – Composição do meio M9

Componentes	Concentração (g/L)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33,9
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15,0
NaCl	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	5,0
MgSO <sub>4</sub>	0,36
Glicose/Sacarose	10,0

O inóculo foi preparado a partir de crescimento “overnight” das linhagens em tubos tipo Falcon, contendo 3 mL de meio LB, inoculadas com 20  $\mu$ L do vial de cada

linhagem. Os tubos Falcon serão incubados em shaker a 37°C e 250 rpm. No dia seguinte, mede-se a concentração celular ( $DO_{600nm}$ ) e inocula-se a quantidade necessária para que se tenha  $2 \times 10^9$  células em cada erlenmeyer contendo 50mL de meio M9, já suplementado com a fonte de carbono do estudo. Os erlenmeyer inoculados são, então, incubados em shaker a 37°C e 250 rpm.

Amostras do cultivo celular foram retiradas de hora em hora e analisadas imediatamente para a concentração celular ( $DO_{600nm}$ ) e centrifugadas para medidas de massa seca de células e análise de concentração de sacarose/glicose no sobrenadante (HPLC, procedimento a ser realizado por técnicos do CTBE).

### **5.1.2. Medida de concentração celular**

As medidas de concentração celular foram realizadas indiretamente por meio de medidas de absorvância em espectrofotômetro . Foi considerando que uma unidade de  $DO_{600nm}$  medida, corresponde a concentração de  $1,0E9$  cél/mL e que para outros valores de  $DO_{600nm}$ , pode-se considerar o valor da concentração celular como proporcional a fornecida por esta relação.

O uso da medida de massa seca como ferramenta para se obter as concentrações celulares foi considerado e algumas medidas foram realizadas por esse método. No entanto, ele se mostrou impreciso e menos confiável do que as medidas por absorvância. O maior problema apresentado por esta metodologia foi a impossibilidade de separar todo o meio das células, de modo que ao secar as amostras, era possível observar claramente que havia muito açúcar residual sendo contabilizado com a massa celular.

### **5.1.3. Medida das concentrações de substrato**

Primeiramente, centrifugou-se amostras de 1,5 mL do cultivo celular em eppendorfs de massa conhecida no aparelho Eppendorf Centrifuge 5415 R, a 4°C 1e 10000g, por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e armazenado para análise de concentração de sacarose/glicose, a ser realizada com a ajuda de técnicos do CTBE.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. Ensaio de cultivo

Os ensaios de cultivo foram realizados de acordo com a metodologia descrita no item 5.1.1.

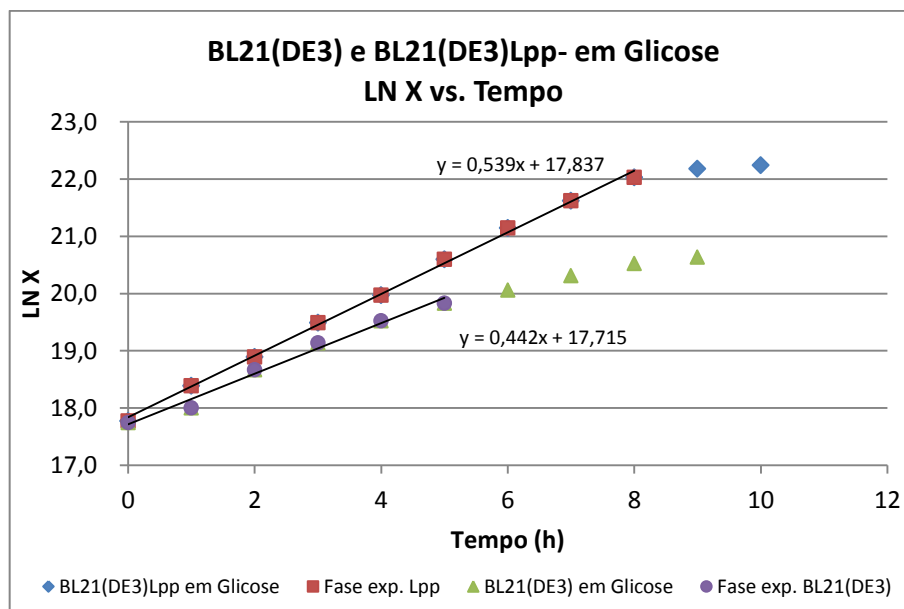
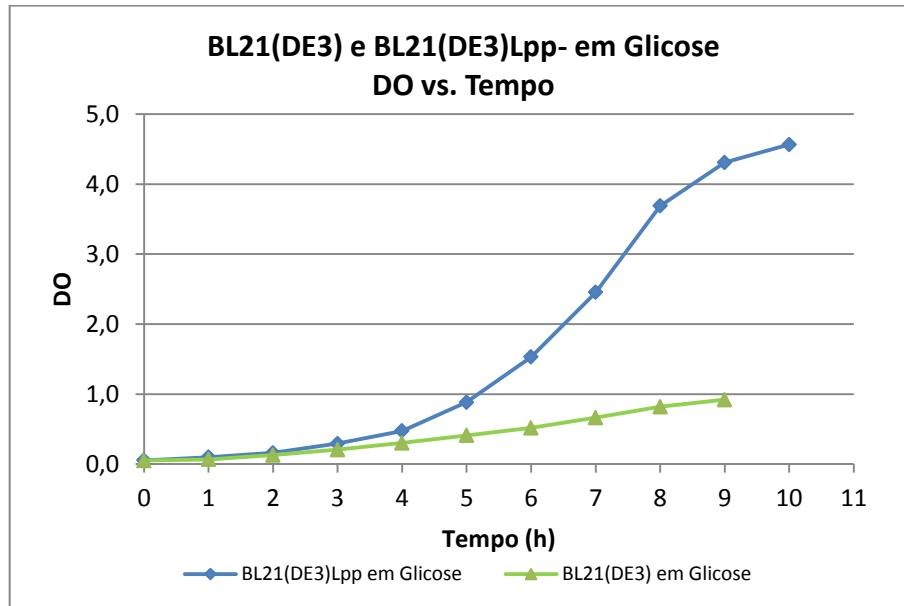
#### ***6.1.1. Cultivo das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> em meio M9 com glicose como única fonte de carbono***

O cultivo em meio M9 com glicose como única fonte de carbono foi realizado para as linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, com o objetivo de observar e comparar o comportamento das mesmas em meio contendo a fonte de carbono mais adequada ao seu crescimento.

O gráfico 1 mostra as curvas de crescimento obtidas para as duas linhagens cultivadas com glicose como fonte de carbono. Foi constatado que a linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> cresceu melhor do que a linhagem BL21(DE3). É possível que o fato de a parede celular da BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> ser mais permeável, graças à deleção de uma proteína constituinte da mesma, tenha tornado mais fácil o transporte dos açúcares para o interior da célula, facilitando o seu consumo e, conseqüentemente, favorecendo o crescimento desta linhagem.

Com base na curva de crescimento celular (gráfico 1 superior), foi construída a curva de logarítmico da concentração celular versus o tempo de ensaio (gráfico 1 inferior) e a velocidade específica máxima de crescimento foi calculada conforme método descrito no item 3.5.4. Como era de se esperar, com base nas curvas de

crescimento celular obtidas, o  $\mu_{\text{máx}}$  da BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> foi de  $0,539 \text{ h}^{-1}$ , superior ao da BL21(DE3) de  $0,442 \text{ h}^{-1}$ , demonstrando a sua melhor adaptação ao meio utilizado no estudo.



**Gráfico 1 - Curvas de crescimento células das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> em meio contendo glicose como única fonte de carbono. No gráfico inferior são apresentados os pontos utilizados para o cálculo do  $\mu_{\text{máx}}$ .**

Análises das variações nas concentrações de glicose (substrato) e ácido acético, conhecidamente um subproduto inibidor de crescimento, em função do tempo de

cultivo da BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> foram realizadas, a fim de se estudar melhor o comportamento desta linhagem no cultivo em glicose.

Pelo Gráfico 2, é possível observar que a fase exponencial de crescimento vai até aproximadamente 8 horas de cultivo e que depois, a concentração de substrato cai para valores que limitam o crescimento das células.

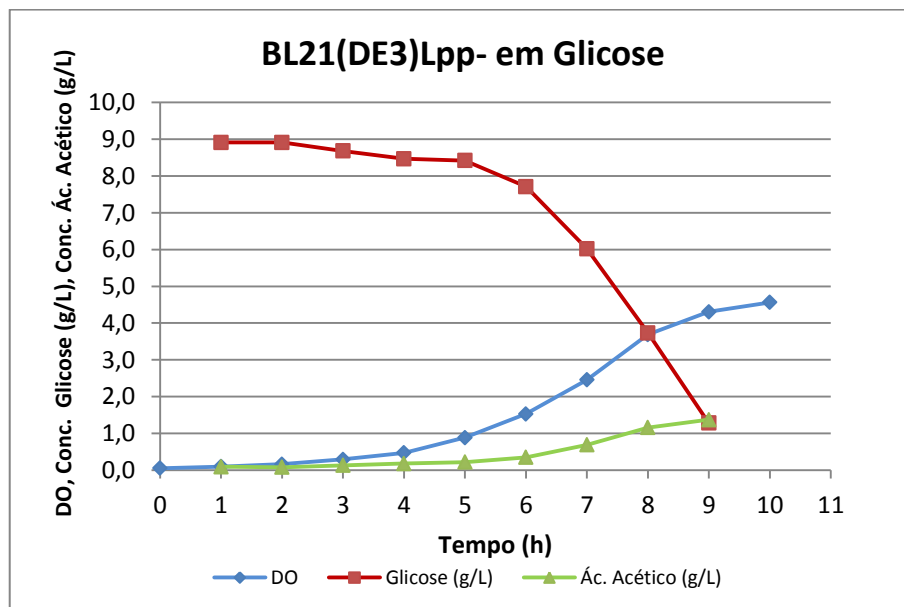
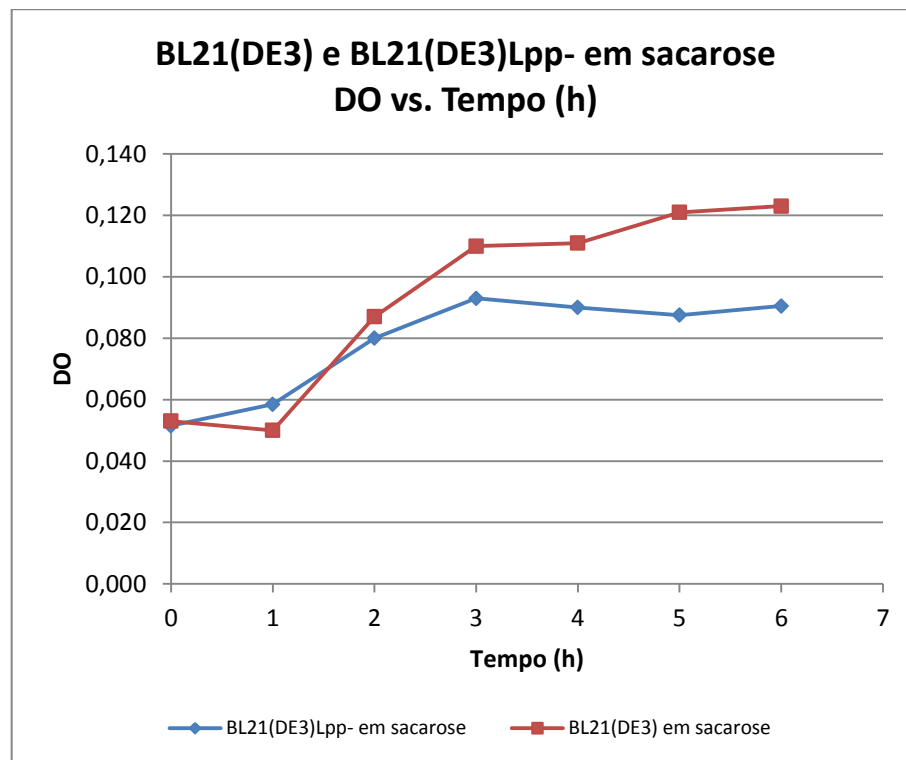


Gráfico 2 – Concentrações de glicose e ácido acético em função do tempo de cultivo da BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>.

### 6.1.2. Cultivo das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono

As linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> foram cultivadas também em meio M9 contendo sacarose como única fonte de carbono. O Gráfico 3 exibe as curvas de crescimento celular obtidas para as duas linhagens nessa condição.



**Gráfico 3 – Curvas de crescimento celular das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> em meio M9 com sacarose única fonte de crescimento**

Como se pode ver, o crescimento foi bastante inferior e parou bem antes do crescimento em glicose (em torno de 3 horas de cultivo em sacarose, contra 10 horas em glicose). Esse fato já era esperado, dado que ambas as linhagens não são capazes de consumir sacarose. O ligeiro crescimento que realizam no início do cultivo pode ser resultado de contaminantes, como pentoses e hexoses, presentes na sacarose utilizada na composição do meio e também resquícios do meio LB utilizado no inóculo. Tais açúcares serviriam de alimento para as células no início do cultivo, no entanto, devido às suas baixas concentrações, logo se esgotariam e as células parariam de crescer.

Dado que o crescimento de ambas as linhagens na sacarose foi muito baixo, não foi possível calcular os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  para elas.

### 6.1.3. Cultivo das linhagens modificadas BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono

A linhagem modificada, BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC, foi cultivada em meio M9 com sacarose, de acordo com a metodologia previamente descrita. Com o objetivo de comparar o efeito da indução do gene SacC pelo IPTG sobre o crescimento celular, dois ensaios foram realizados, sendo que em um deles as bactérias foram induzidas com IPTG logo no início do cultivo e no outro, a indução ocorreu apenas após 4 horas de cultivo.

As curvas de crescimento da linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC (Gráfico 4) indicam que a linhagem induzida logo no início do cultivo cresceu mais. No entanto, observa-se que, devido a um erro experimental no momento do inóculo, este cultivo recebeu uma quantidade inicial de células maior, resultando em uma concentração inicial superior, o que poderia justificar o crescimento a concentrações celulares mais altas.

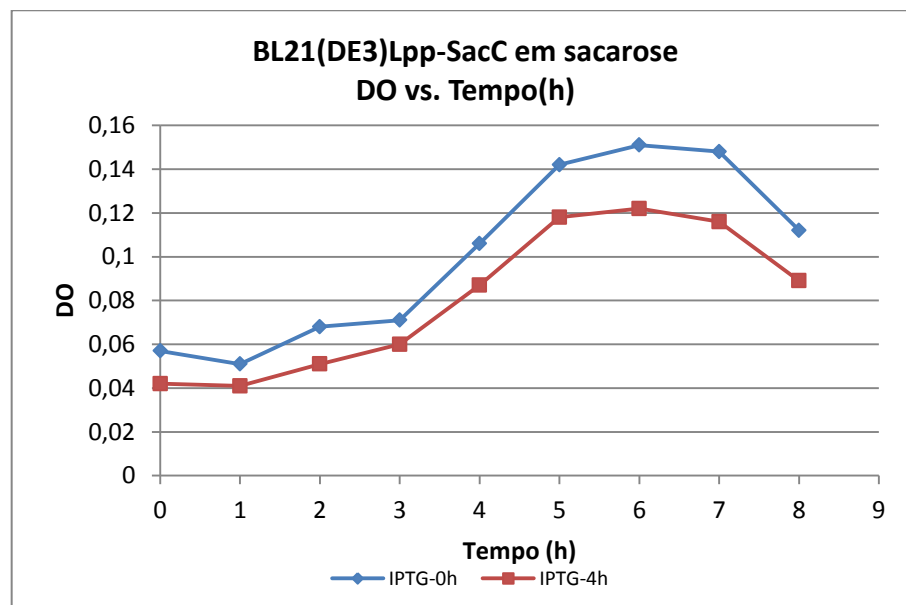


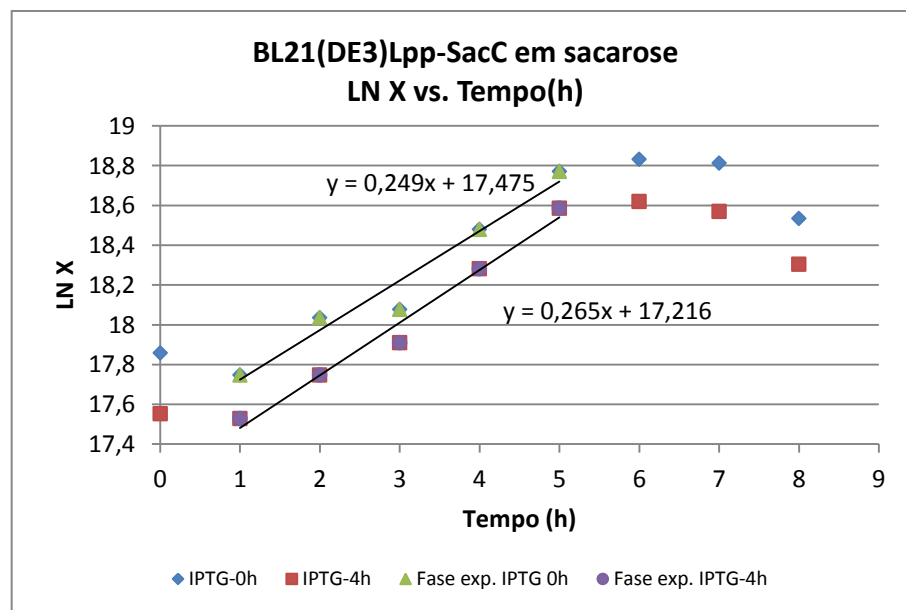
Gráfico 4 – Curvas de crescimento da BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC com indução por IPTG em 0h e 4h.

Além disso, nenhuma das duas culturas cresceu muito, de modo que seus valores máximos de DO<sub>600nm</sub> medidos foram de apenas 0,122 e 0,151, valores muito baixos

em comparação com a  $DO_{600nm}$  de 4,564 atingida pela BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup> em glicose (gráfico 1), mas ligeiramente superiores ao valor de 0,096 obtido pela mesma linhagem na sacarose.

Observando-se agora apenas a curva da IPTG-4h, no gráfico 4, não é possível observar nenhuma mudança significativa de comportamento no crescimento celular decorrente da indução do gene SacC.

No cálculo do  $\mu_{m\acute{a}x}$  para os dois cultivos (Gráfico 5), verificou-se que seu valor foi ligeiramente superior na linhagem que recebeu o IPTG tardiamente ( $0,265\text{ h}^{-1}$  contra  $0,249\text{ h}^{-1}$  no cultivo com indução no início do cultivo). Tal fato pode indicar que a indução do gene SacC impõe uma carga sobre o metabolismo da bactéria que atrapalha o seu crescimento. No entanto, para se verificar se esta hipótese é verdadeira, é necessário que mais ensaios sejam realizados, o que no tempo hábil disponível para a confecção deste TCC II, não é possível fazer.



**Gráfico 5 - Pontos utilizados para o cálculo do  $\mu_{m\acute{a}x}$ .**

#### 6.1.4. Cultivo das linhagens modificadas BL21(DE3)SacC em meio M9 com sacarose como única fonte de carbono

Assim como foi feito para a BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>SacC, a BL21(DE3)SacC foi cultivada em sacarose em dois ensaios, sendo que, em um deles, ela recebeu o IPTG logo no início do cultivo e no outro, a indução ocorreu apenas após 4 horas de ensaio.

Com base nas curvas de crescimento obtidas nos dois ensaios (Gráfico 6), pode-se observar que a linhagem induzida após 4h de ensaio não passou pela fase exponencial, apresentando apenas um ligeiro crescimento que em seguida se desacelerou. Já a curva da linhagem induzida por IPTG desde o início do cultivo não está consistente com o que se espera de um crescimento celular. Isto significa que não foi possível constatar através da indução em momentos diferentes que a transcrição do plasmídeo esteja ocorrendo conforme o esperado. A investigação das causas para este comportamento passaria pela identificação da sequência completa de nucleotídeos do plasmídeo, o que não foi possível devido ao curto tempo disponível para a realização deste trabalho. Sendo assim, não foi possível calcular o  $\mu_{\text{máx}}$  para as linhagens aqui discutidas.

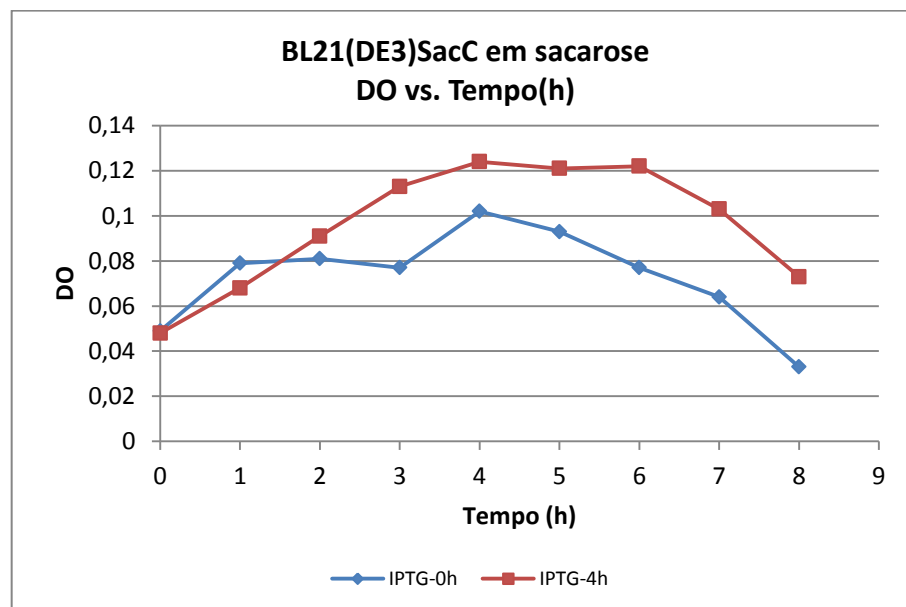


Gráfico 6 – Curvas de crescimento da BL21(DE3)SacC em sacarose com indução por IPTG em 0h e 4h.

## 7. PERSPECTIVAS

Este trabalho ilustrou a aplicação de uma estratégia que, se bem sucedida, pode trazer benefícios para a tecnologia de produção de etanol de segunda geração. Porém, devido ao curto tempo disponível para a realização dos ensaios, foi possível apenas a obtenção de um primeiro panorama comparativo das linhagens, o qual não permite concluir sobre a eficiência da estratégia aplicada devido às incertezas existentes em torno da reprodutibilidade dos resultados. Este estudo merece, portanto, ser repetido com um maior número de ensaios, de forma que se possa gerar resultados mais confiáveis e que possibilitem uma conclusão mais segura.

Além disso, sabe-se que o benefício trazido pelos plasmídeos contendo o gene SacC pode ter sido contrabalançado pelo peso extra que estes plasmídeos representam para o maquinário celular, desviando este para a transcrição e tradução dos plasmídeos em detrimento das atividades de replicação celular. Sabendo que este plasmídeo, tal e qual entregue pela empresa Prodimol, é um plasmídeo de alto número de cópias (existem muitas cópias do plasmídeo no interior da célula), uma idéia para diminuir este efeito seria extrair do plasmídeo o gene SacC com o auxílio de enzimas de restrição e inseri-lo em um novo plasmídeo, desta vez de baixo número de cópias. Outra possibilidade para solucionar este problema seria fazer a inserção do gene SacC no próprio genoma da bactéria através de recombinação homóloga, utilizando a mesma técnica que foi utilizada na obtenção da linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, descrita no item 4.2.

Também seria interessante a adição de uma etapa de validação do plasmídeo para certificação de que sua seqüência de nucleotídeos está de acordo com o que foi solicitado. Isto poderia ser feito com o auxílio da técnica de PCR (item 3.4).

Finalmente, poderia ser feito o acompanhamento da expressão de uma proteína recombinante nas células modificadas, uma vez que a expressão de rProteínas de forma mais econômica é a grande motivação deste estudo.

## 8. CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível observar que a linhagem BL21(DE3)Lpp<sup>-</sup>, a qual não expressa uma proteína da parede celular, apresentou crescimento em glicose muito mais rápido do que a linhagem BL21(DE3), a qual não possui esta modificação. Este comportamento pode ser explicado pela maior facilidade de difusão de nutrientes na linhagem modificada, graças à ausência da proteína lpp na parede.

Nos ensaios com sacarose, entretanto, todas as linhagens apresentaram crescimento muito baixo, mesmo aquelas contendo o gene SacC. Uma possível explicação para este comportamento é que o grande número de cópias do plasmídeo tenha sobrecarregado o maquinário celular. Uma idéia para diminuir este efeito seria inserir este gene em um novo plasmídeo, desta vez de baixo número de cópias ou fazer a inserção do gene SacC no próprio genoma da bactéria. Sugere-se que este estudo seja continuado no sentido de explorar as possibilidades acima mencionadas.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.O. **Avaliação de sistema de remoção de gene marcador de seleção por recombinação sítio-específica em *Passiflora edulis* spp., embriogênese somática e organogênese direta em *Saccharum officinarum* L**, Dissertação de Mestrado. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2011.

AZZONI, S.F. **Produção in house de celulase recombinante para aplicação na bioconversão de substratos celulósicos derivados da cana-de-açúcar**. Projeto preliminar de pesquisa. Campinas: Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, 2009.

BONETTI, A.M.; VIEIRA, C.U.; SIQUIEROLI, A.C.S. **Amplificação de DNA (Simulação de Polymerase Chains Reaction – PCR)**. Atividade para sala de aula. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, 2007.

CARVALHO, L. R. M; BRAVO<sup>2</sup>, J. P; VALLE<sup>3</sup>, J. S; GASQUES<sup>4</sup>, L. S; LINDE<sup>5</sup>, G. A; FERNANDEZ<sup>6</sup>, M. A; COLAUTO<sup>7</sup>, N. B. **Amplificação por PCR da Região Controle do DNA Mitocondrial de Raças de *Bombyx mori***, Umuarama: Arq. Ciênc. Vet. Zool. Unipar, v.11, n.1, p.15-19, jan/jun 2008.

CHO E.H.; GUMPORT R.I.; GARDNER J.F. **Interactions between Integrase and Excisionase in the Phage Lambda Excisive Nucleoprotein Complex**, Londres: Journal of Bacteriology, v.184, n.18, p.5200-5203, 2002.

DAEGELEN, P., STUDIER, F.W., LENSKI, R.E., CURE, S., KIM, J.F. **Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B. and the Derivation of B Strains REL06 and BL21(DE3)**. Londres: Journal of Molecular Biology, vol. 394, p.634-643, 2009.

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

GARCIA J.L. **Cloning in Escherichia coli and molecular analysis of the sucrose system of the Salmonella plasmid SCR-53**, Mol Gen Genet 201, p.575 – 577, 1985.

HESS M. **Thermoacidophilic proteins for biofuel production**, Trends in Microbiology, v.16, n. 9, p.414 – 419, 2008.

HUANG L.C.; WOOD E.A.; COX M.M. **A bacterial model system for chromosomal targeting**. Oxford: Nucleic Acids Research, v.19, p.443-448, 1991.

IORIO F.F.; DI STASI C.A.; BORGES F.S.; **Eletroporação: uma revisão**, Revista Fisioterapia Ser, ano 2, n.2, 2007.

LEE J.W., CHOI S., PARK J.H., VICKERS C.E., NIELSEN L.K., LEE S.Y. **Development of sucrose-utilizing Escherichia coli K-12 strain by cloning  $\beta$ -fructofuranosidases and its application for L-threonine production**, Appl Microbiol Biotechnol 88, p.905-913, 2010.

LIMA, N.; MOTA, M. **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**, cap. 7, p.125-161 Lousã: Lidel – Edições Técnicas, 2003.

LORENZ M. G, WACKERNAGEL W. **Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment**, Microbiol. Rev. 58, p.563–602, 1994.

MATSUZAKI H.; NAKAJIMA R.; NISHIYAMA J.; ARAKI H.; OSHIMA Y. **Chromosome engineering in Saccharomyces cerevisiae by using a site-specific recombination system of a yeast plasmid**. Washington: Journal of Bacteriology, v.172, p.610-618, 1990.

MOLLINA-HOPPNE A., DOSTER W., VOGEL R.F., GANZLE M.G. **Protective effect of sucrose and sodium chloride for Lactococcus lactis during sublethal and lethal high-pressure treatments**. Appl Environ Microbiol 70, p.2013 - 2020, 2004.

REID S.J.; ABRATT V.R. **Sucrose utilization in bacteria: genetic organization and regulation**. Appl Microbiol Biotechnol 67, p.312 – 321.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, v.2, capítulo 6, p.93-122. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001.

SPRENGER G.A.; LENGELER J.W. **Analysis of sucrose catabolism in Klebsiella pneumonia and in SCR+ derivatives of Escherichia coli K12**, J. General Microbiology 134: p.1635-1644, 1988.

STERNBERG N.; HAMILTON D. **Bacteriophage-p1 site-specific recombination between loxp sites**, Londres: Journal of Molecular Biology, v.150, p.467-486, 1981.

STUDIER F.W., MOFFAT, B.A. **Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to .Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes**. Londres: Journal of Molecular Biology, v. 189, p.113-130, 1985.

WYMAN C.E. **What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol**, Trends in Biotechnology, v.25, n.4, p.153 – 157, 2007.

<http://www.bioetanol.org.br>. *Site do Centro de Pesquisa e Tecnologia do Bioetanol - CTBE*, acessado em 02/10/2011.

<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/AAU37516>. *Banco de dados do European Bioinformatics Institute – EBI*, acessado em 21/11/2011.

<http://www.e-escola.pt/>, acessado em 22/11/2011.

PQI-2410, Engenharia Bioquímica II, Anotações de aula, 2011.