

- Funcionamento da disciplina (1^a) ✓✓
0. Introdução à Biotecnologia (2^a) ✓✓
1. Produção de Biomassa e Biomoléculas
- 1.1. Crescimento microbiano (3^a) ←
 - 1.2. Tecnologia de DNA recombinante (4^a) - *Rita Isabel Pacheco (ISEL-CQB)*
2. Noções gerais de fermentadores (5^a/6^a)
3. Processos de purificação de biomoléculas (7^a/8^a)
4. Estabilização de biomoléculas (9^a)
5. Sistemas para utilização de enzimas. Noções de biocatálise
- 5.1. Introdução à Biocatálise (10^a)
 - 5.2. Imobilização de biocatalisadores influência na cinética (11^a/12^a/13^a)
 - 5.3. biocatálise em meios não convencionais (14^a/15^a)
 - 5.4. biorreactores (16^a) *Total= 16*
 - 5.5. Aplicações industriais na catálise (17^a)
6. Aplicações

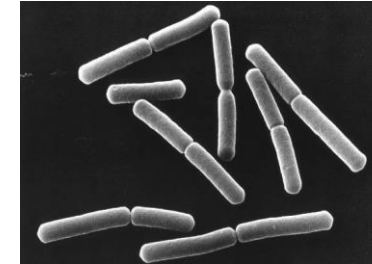
1. Produção de Biomassa e Biomoléculas

1.1. Crescimento microbiano

1.2. Tecnologia de DNA recombinante

Hoje

Amanhã



Fontes naturais

Microbianas

Plantas

animais

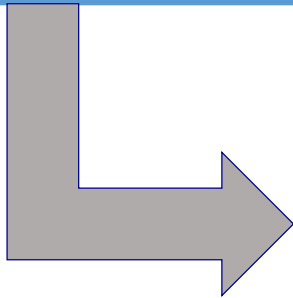
Fontes geneticamente modificadas

microbianas



1. Produção de Biomassa e Biomoléculas

1.1. Crescimento microbiano



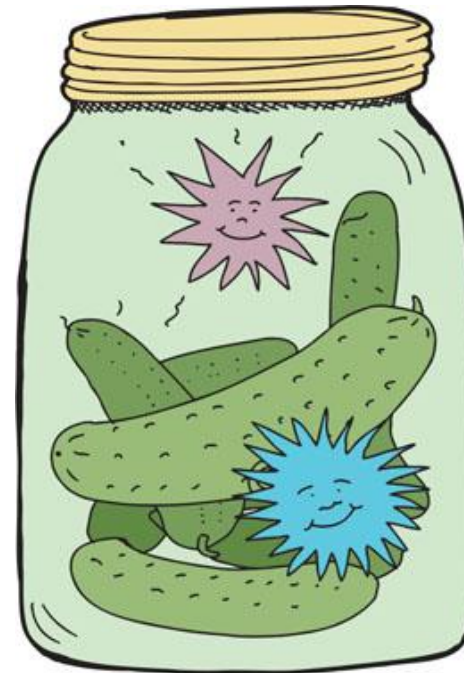
1.1.1. Processos aeróbios / anaeróbios (fermentações)

1.1.2. Crescimento microbiano: influencia de vários parâmetros

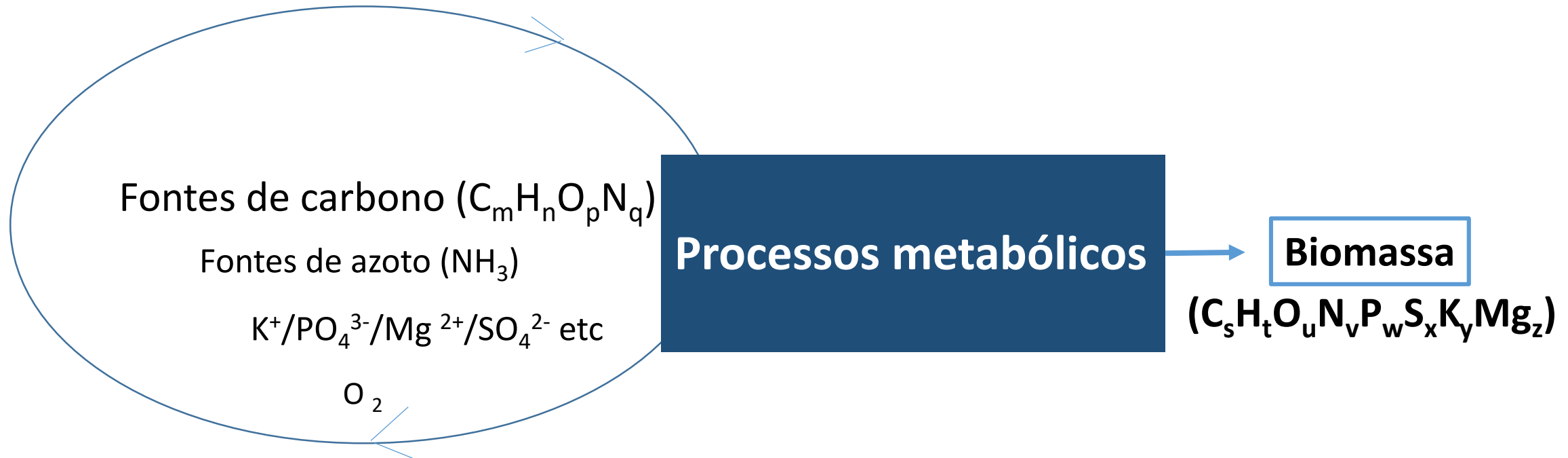
1.1.3. Quantificação do crescimento microbiano

1.1.4. Biossíntese de compostos de interesse industrial

1.1.1. Processos aeróbios / anaeróbios (fermentações)



Crescimento celular necessita de vários componentes





Ver este site

http://fbae.org/2009/FBAE/web-site/special-topics_general_issues_fermentation_biotechnology.html

Fermentation Biotechnology

Fermentation technology is the oldest of all biotechnological processes. The term is derived from the Latin verb *fevere*, to boil--the appearance of fruit extracts or malted grain acted upon by yeast, during the production of alcohol.

Fermentation is a process of chemical change caused by organisms or their products, usually producing effervescence and heat.

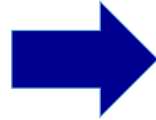
Microbiologists ferm: 'any process for the production of a product by means of mass culture of micro-organisms'.

Biochemists ferm: 'an energy-generating process in which organic compounds act both as electron donors and acceptors'; is 'an anaerobic process where energy is produced without the participation of oxygen or other inorganic electron acceptors'.

In biotechnology the microbiological concept is widely used.

Organismos heterotróficos usam moléculas orgânicas como fonte de carbono e energia

Heterotróficos usam



Respiração
fermentação

Fermentação
(anaeróbia)



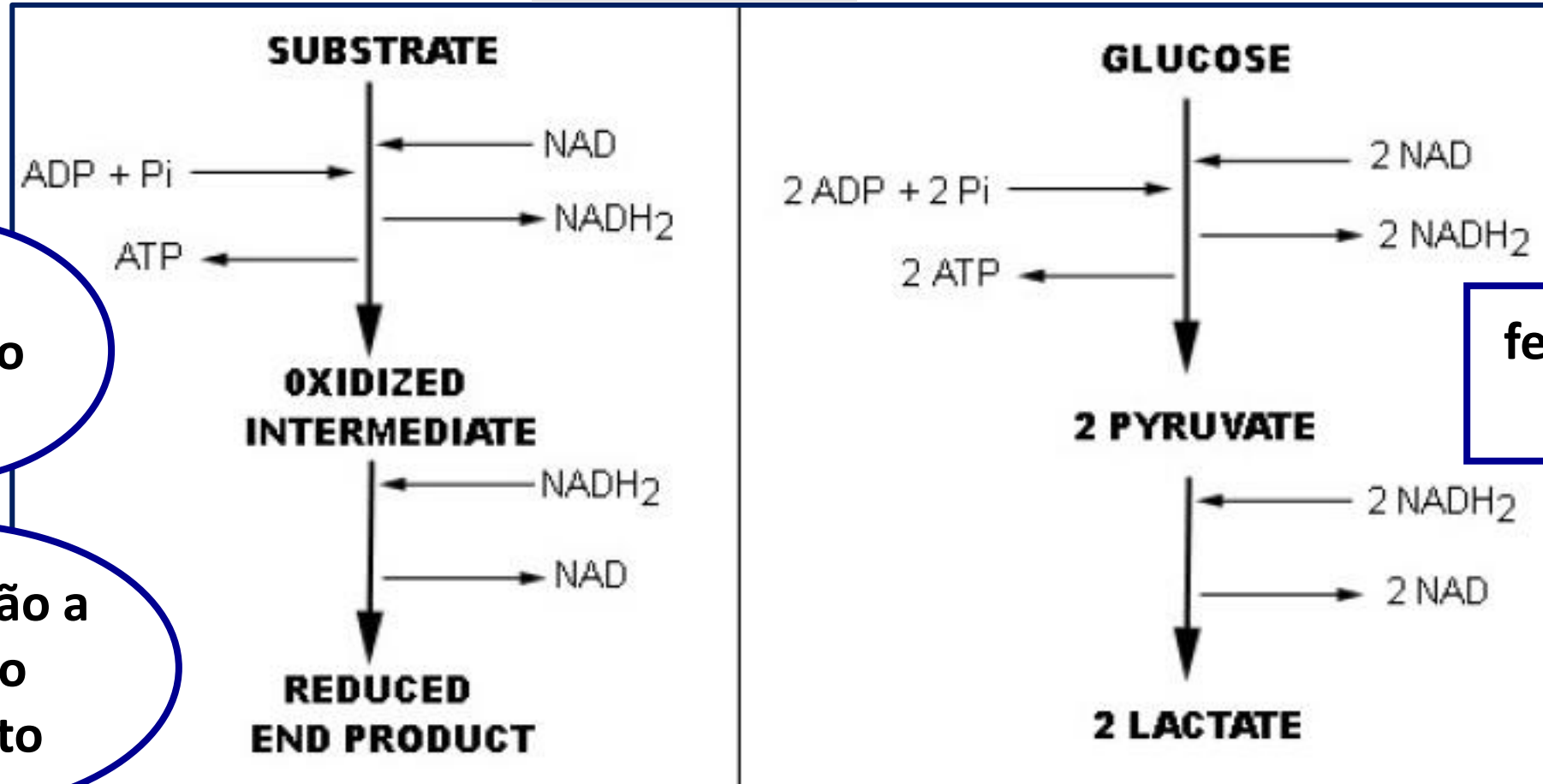
Metabolismo no qual a energia é obtida pela oxidação parcial de um composto orgânico com utilização de intermediários orgânicos como dadores e aceptadores de electrões;

Não existem sistemas para transporte de electrões de membrana;
Todo o ATP é produzido a nível de fosforilação do substrato

- metabolismo aeróbio produz maior quantidade de energia, no entanto as bactérias e outros microrganismos têm a capacidade de obter energia através de metabolismo anaeróbio em processo fermentativos



FERMENTAÇÃO

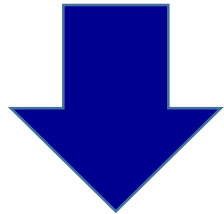


oxidação

fosforilação a nível do substrato

fermentação láctica

**Procariotas têm 3 vias
principais de glicólise**



Via de Embden-Meyerhof

Via heteroláctica (fosfoctolase)

Via Entner-Doudoroff

Enzimas chave nas diferenças



- ❖ **Frutose 1,6 difosfato aldolase**
- ❖ **Fosfoctolase**
- ❖ **Aldolase do ácido 2-ceto-3-desoxy-6-fosfogluconico**

Embden-Meyerhof

G6P

F6P

F1,6dP

2 G3P

piruvato

Heterolactica ou fosfocetolase

G6P

6Pgluconato

CO₂+ fosfato de pentose

G3P + acetil fosfato

Lactato+ etanol

Entner-Doudoroff

G6P

6Pgluconato

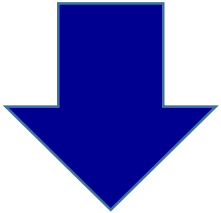
2-ceto-e-desoxy-6-fosfogluconato

Piruvato+G3P

Etanol+etanol

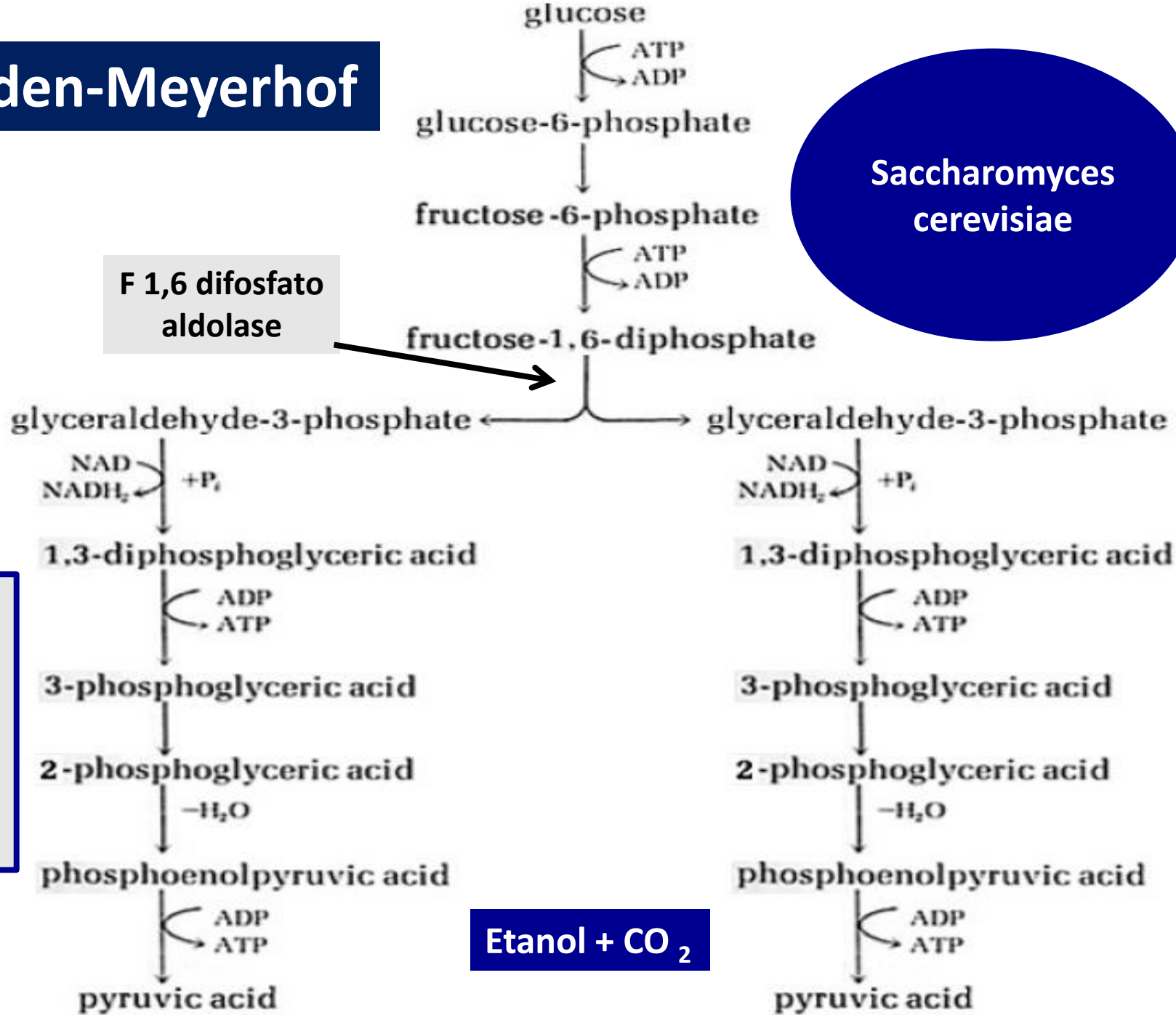
Via de Embden-Meyerhof

Procariotas têm 3 vias principais de glicólise



- Via de Embden-Meyerhof
- Via heterolactica (fosfocetolase)
- Via Entner-Doudoroff

Saccharomyces cerevisiae



Via Embden-Meyerhof é usada pelas bactérias como a *S. cerevisiae* para produzir etanol e CO₂.

Via usada pela maior parte das bactérias com aplicações industriais: indústria cervejeira, queijos, panificação

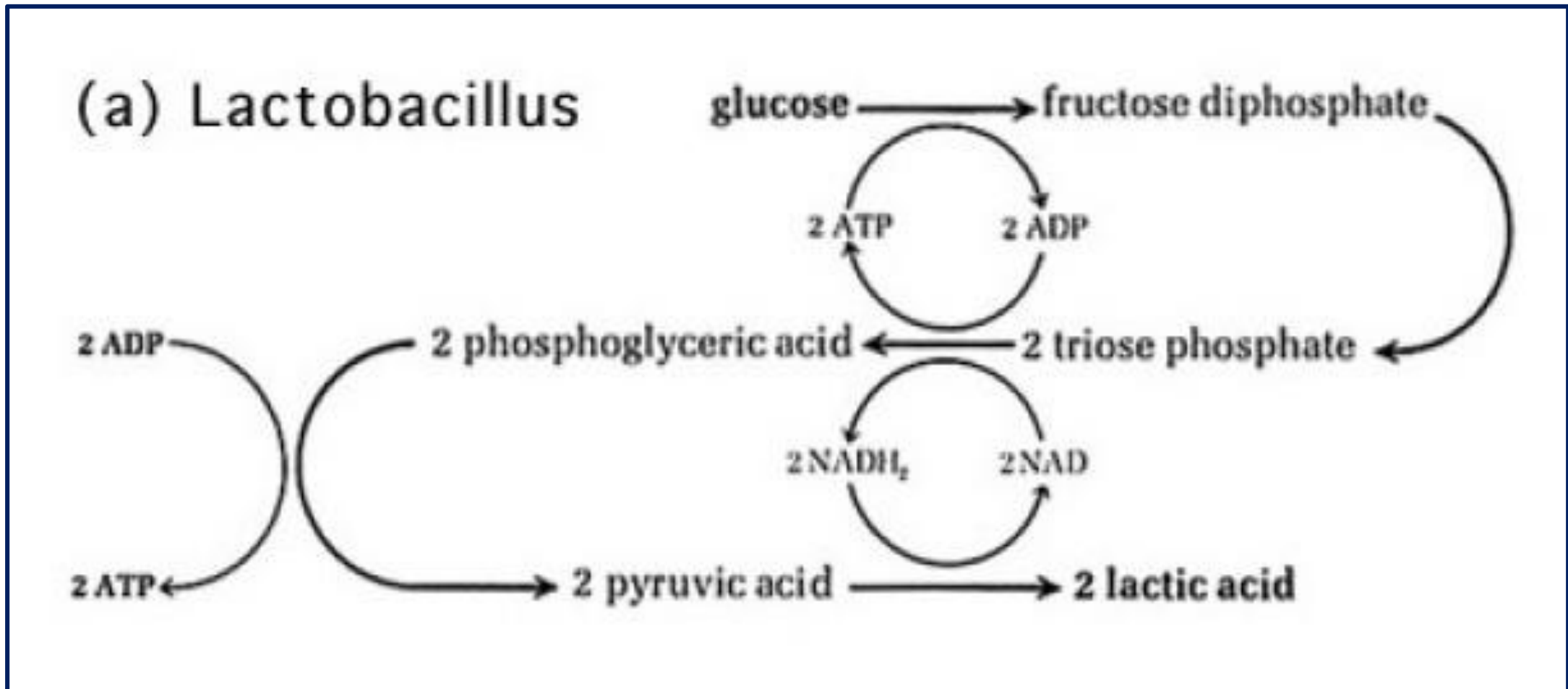
Com esta via as bactérias homolacticas podem produzir ácido lático

Com esta via bactérias heterolacticas produzem outros compostos como ácidos carboxílicos

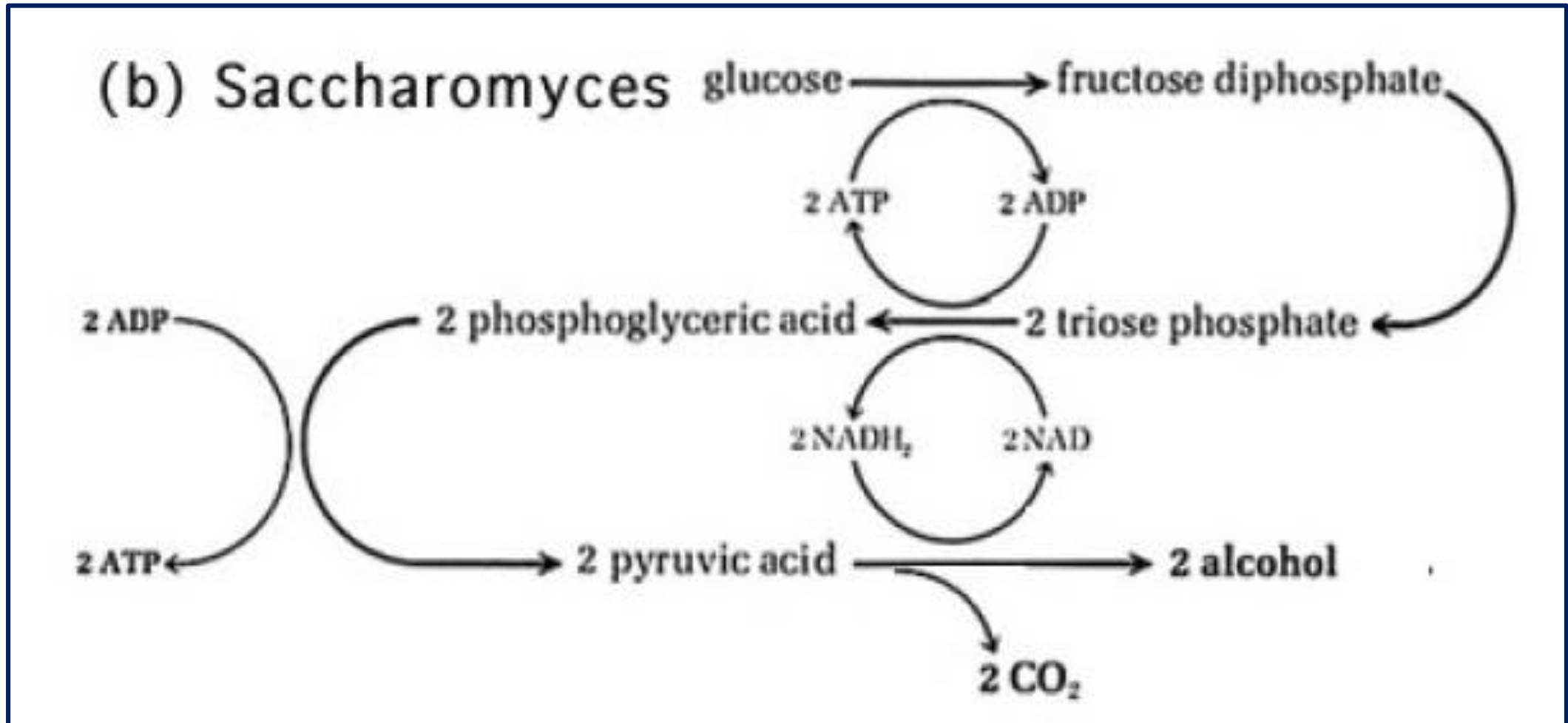
Bactérias de ácido lático reduzem o ácido pirúvico a ácido lático (fermentação homoláctica)

As leveduras reduzem o ácido pirúvico a etanol e CO₂ (fermentação alcoólica)

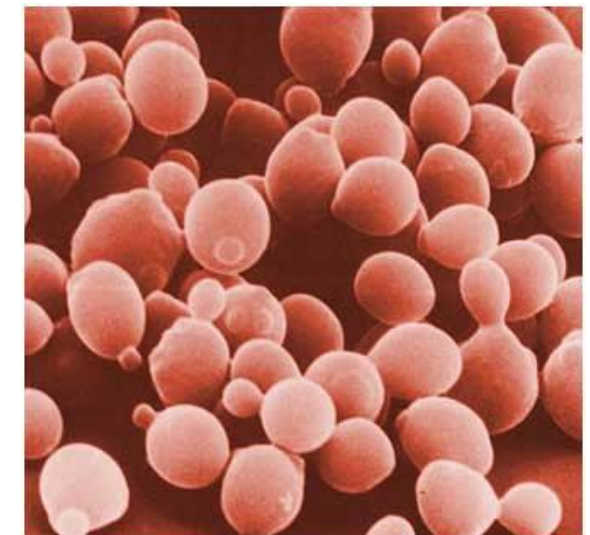
Fermentação láctica (homoláctica)



Fermentação alcoólica



Várias hipóteses de fermentações



Lactica (homolactica)

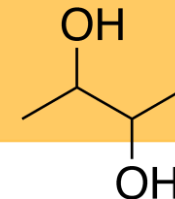
- Único produto ac. láctico
- Lactobacillus; Lactococcus
- Leite/iogurte/queijos

Acida Mista

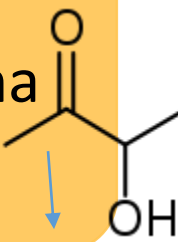
- Lactico+acético+fórmico+succínico+etanol
- Se as bactérias tiverem formato desidrogenase produzem $\text{CO}_2 + \text{H}_2$

Butanediol

- Vários ácidos e gás + 2,3-butanediol a partir da condensação de 2 piruvatos. Formação de acetoina
- Enterobacter



*Produção de
borracha*



Sabor a manteiga

Butírica

- Ac. Butírico+acético+CO₂+H₂
- Clostridia

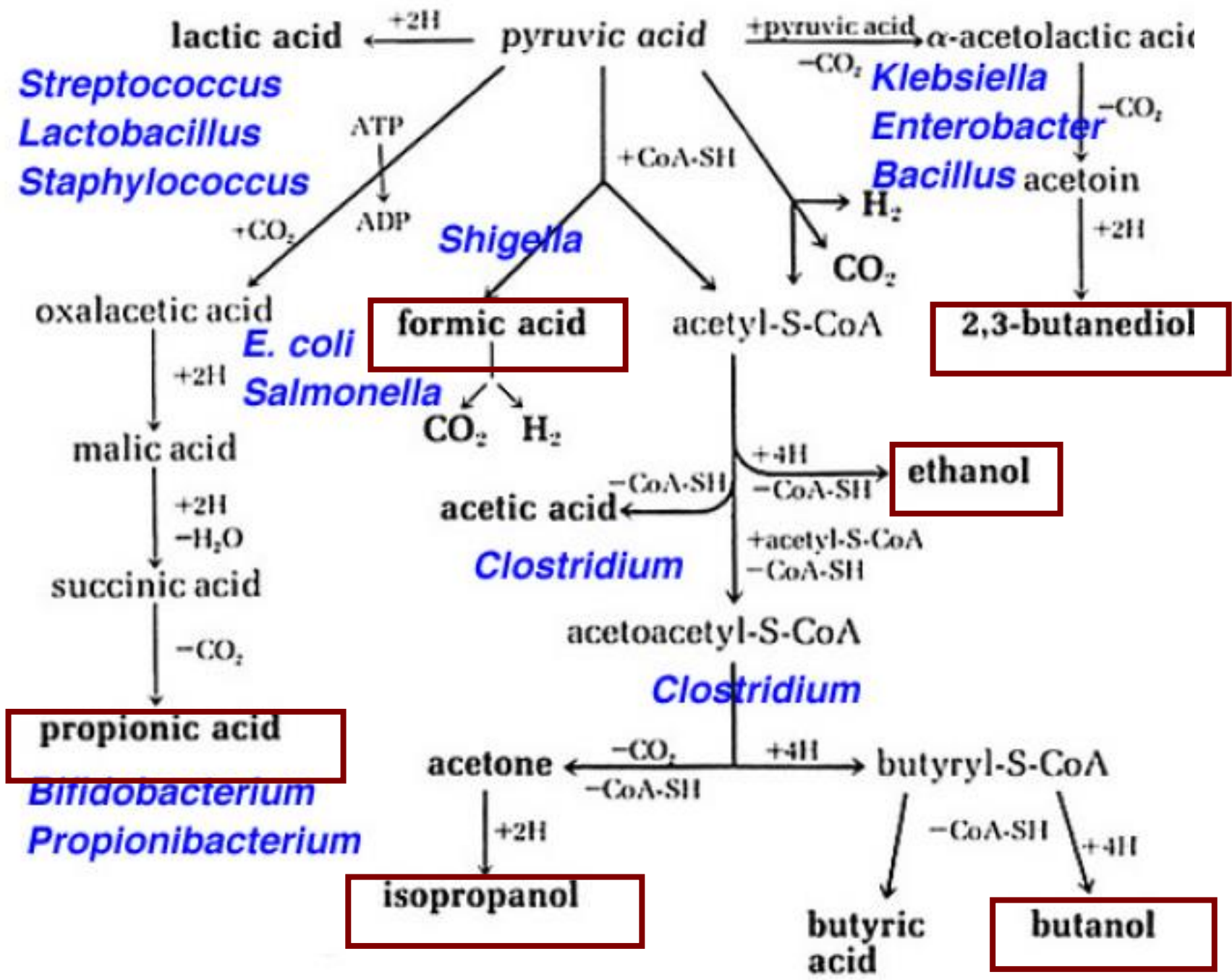
Butanol- acetona

- Butanol + acetona
- Clostridium acetobutylicum
- Utilizado na 1ª Guerra para explosivos (acetona)

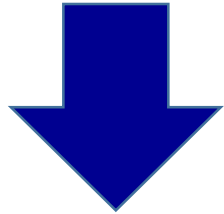
Propionica

- A partir do ácido láctico formação de ácido acético+propiónico e CO₂
- Propionibacterium e Bifidobacterium
- Queijo suíço, buracos devido ao CO₂

R
E
S
U
M
O



Procariotas têm 3 vias principais de glicólise

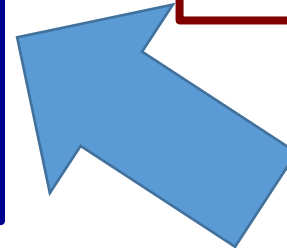


Via de Embden-Meyerhof
Via heteroláctica (fosfoctolase)
Via Entner-Doudoroff

Enzimas chave nas diferenças



- ❖ Frutose 1,6 difosfato aldolase
- ❖ Fosfoctolase
- ❖ Aldolase do ácido 2-ceto-3-desoxy-6-fosfogluconico



Embden-Meyerhof

G6P
F6P
F1,6dP
2 G3P
piruvato

Heterolactica ou fosfoacetolase

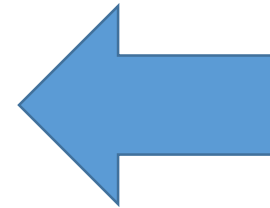
G6P
6Pgluconato
CO₂+ fosfato de pentose
G3P + acetil fosfato
Lactato+ etanol

Entner-Doudoroff

G6P
6Pgluconato
2-ceto-e-desoxy-6-fosfogluconato
Piruvato+G3P
Etanol+etanol

Outras vias de fermentação que diferem até à formação de ácido pirúvico

Via heterolactica (fosfocetolase)



Via Entner-Doudoroff

Via heterolactica (fosfocetolase)

Fosfocetolase (EC 4.1.2.9.) (catalisa a quebra ligações C-C com formação de grupo aldeídos)

G6P-Oxidada é descarboxilada para formar fosfato de pentoses
Fosfato de pentose e quebrada para formar G3P e acetilfosfato. Esta reacção é catalisada pelo enzima fosfocetolase

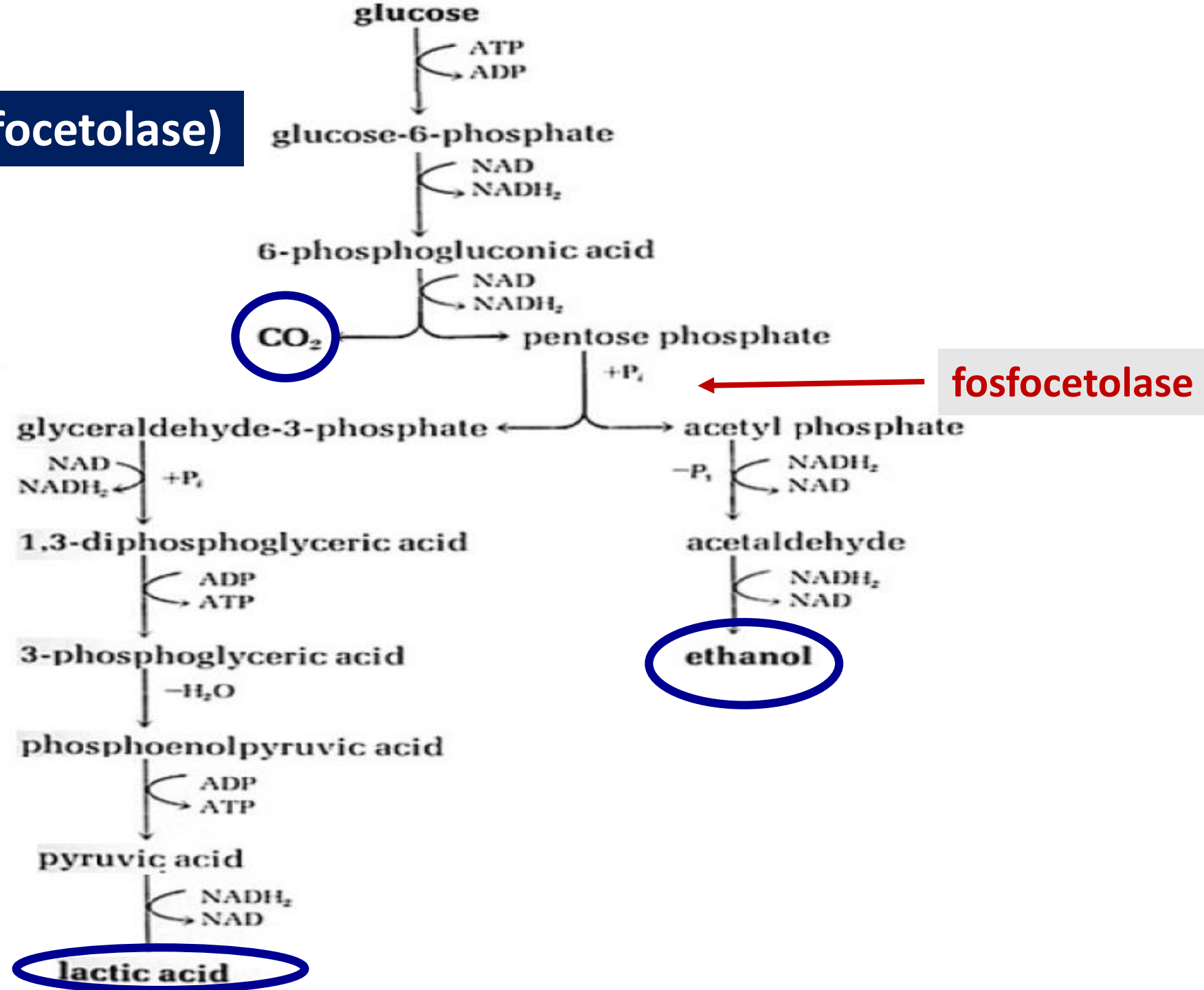
Indústria de fermentação para obtenção de kefir



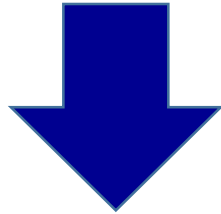
Via heterolactica (fosfocetolase)

G6P-Oxidada e descarbolxilada para formar fosfato de pentoses

Fosfato de pentose é quebrado em G3P e acetil fosfato pelo enzima fosfocetolase



Procariotas têm 3 vias principais de glicólise

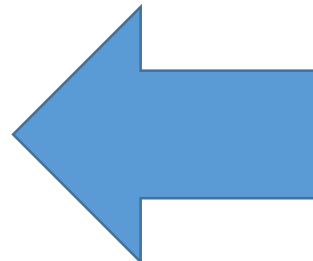


Via de Embden-Meyerhof
Via heteroláctica (fosfoctolase)
Via Entner-Doudoroff

Enzimas chave nas diferenças



- ❖ Frutose 1,6 difosfato aldolase
- ❖ Fosfoctolase
- ❖ Aldolase do ácido 2-ceto-3-desoxy-6-fosfogluconico



Embden-Meyerhof

G6P

F6P

F1,6dP

2 G3P

piruvato

Heterolactica ou fosfoacetolase

G6P

6Pgluconato

CO₂+ fosfato de pentose

G3P + acetil fosfato

Lactato+ etanol

Entner-Doudoroff

G6P

6Pgluconato

2-ceto-e-desoxy-6-fosfogluconato

Piruvato+G3P

Etanol+etanol

Via Entner-Doudoroff

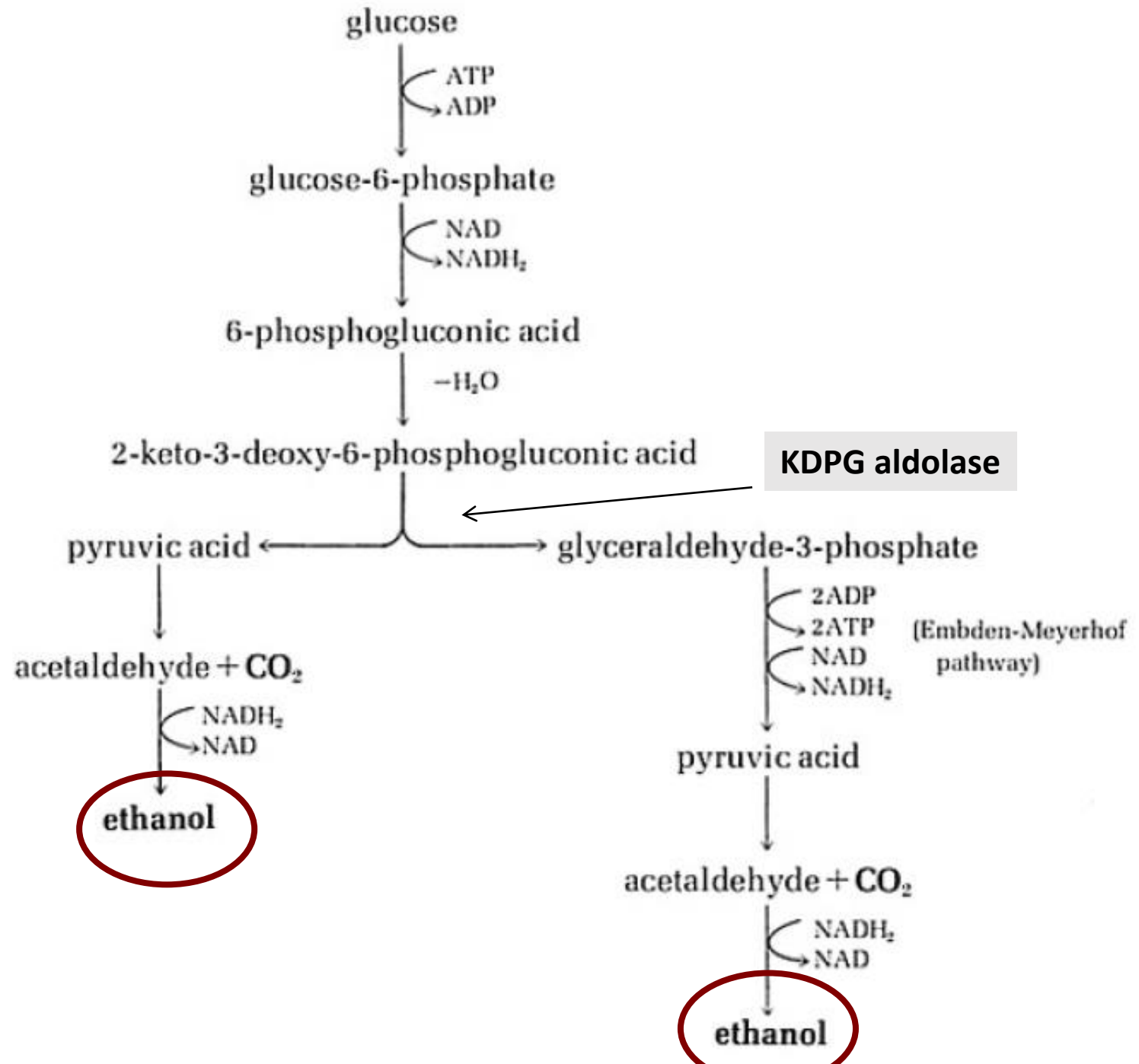
Formação de «pulque» por fermentação do suco de um cacto que contem *Zymomonas* na superfície

A destilação do pulque dá «tequilha»



Via Entner-Doudoroff

Uses 6-phosphogluconate dehydratase and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase to create pyruvates from glucose



Vias oxidativas da glucose utilizadas por diferentes bactérias

Bacterium	Embden-Meyerhof pathway	Phosphoketolase (heterolactic) pathway	Entner Doudoroff pathway
<i>Acetobacter aceti</i>	-	+	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	-	-	+
<i>Azotobacter vinelandii</i>	-	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	major	minor	-
<i>Escherichia coli</i>	+	-	-

Vias oxidativas da glucose utilizadas por diferentes bactérias
(Continuação)

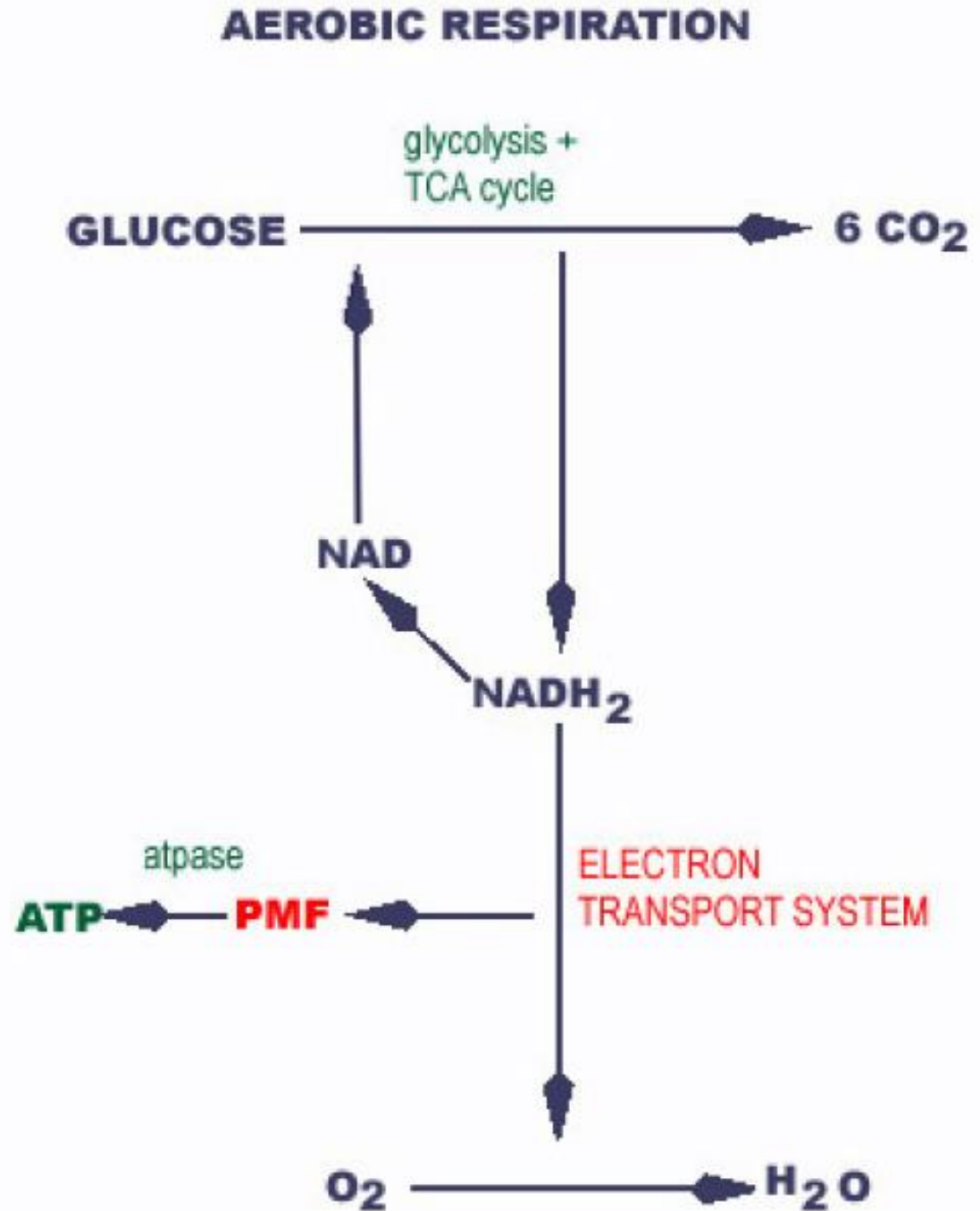
Bacterium	Embden-Meyerhof pathway	Phosphoketolase (heterolactic) pathway	Entner Doudoroff pathway
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	+
<i>Vibrio cholerae</i>	minor	-	major
<i>Zymomonas mobilis</i>	-	-	+

Produtos finais das fermentações microbianas

Pathway	Key enzyme	Ethanol	Lactic Acid	CO ₂	ATP
Embden-Meyerhof <i>Saccharomyces</i>	fructose 1,6-diP aldolase	2	0	2	2
Embden-Meyerhof <i>Lactobacillus</i>	fructose 1,6-diP aldolase	0	2	0	2
Heterolactic <i>Streptococcus</i>	phosphoketolase	1	1	1	1
Entner-Doudoroff <i>Zymomonas</i>	KDPG aldolase	2	0	2	1

Respiração aeróbia

Terminal aceitador de elétrons é o Oxigenio (O_2)



Respiração anaeróbia

Respiração em que o aceitador terminal de electrões não é o O₂

electron acceptor	reduced end product	name of process	organism
O ₂	H ₂ O	aerobic respiration	<i>Escherichia, Streptomyces</i>
NO ₃	NO ₂ , N ₂ O or N ₂	anaerobic respiration: denitrification	<i>Bacillus, Pseudomonas</i>
SO ₄	S or H ₂ S	anaerobic respiration: sulfate reduction	<i>Desulfovibrio</i>
fumarate	succinate	anaerobic respiration: using an organic e-acceptor	<i>Escherichia</i>
CO ₂	CH ₄	methanogenesis	<i>Methanococcus</i>

Respiração
anaeróbia

metanogenese

- Principal fonte de CH_4 no planeta.
- Efeito de estufa

desnitrificação

- Importante na agricultura. Remove NO_3 do solo

Redução de
sulfato

- SO_4^{2-} a S^{2-} formando H_2S

NITRIFICATION



DENITRIFICATION

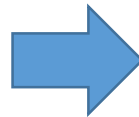
Cálculos de Rendimentos energéticos do metabolismo anaeróbico

Nestes processos não ocorre fosforilação oxidativa, não há o principal processo de produção de energia

Energia tem de vir da degradação do próprio substrato, fosforilação ao nível do substrato

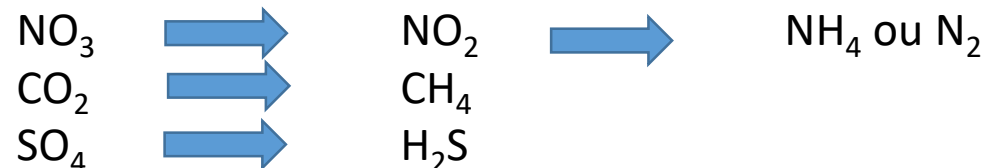


Só da 8% da energia do processo aerobio



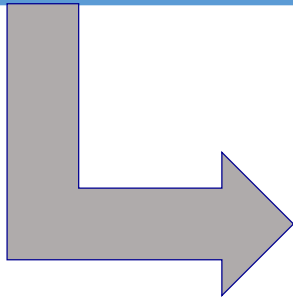
Para a produção da mesma quantidade de células tem de se consumir muito mais substrato no processo anaerobio

Outros aceitadores finais de electrões para além do O₂, ou seja outros doadores de agentes oxidante oxigénio: exº



1. Produção de Biomassa e Biomoléculas

1.1. Crescimento microbiano



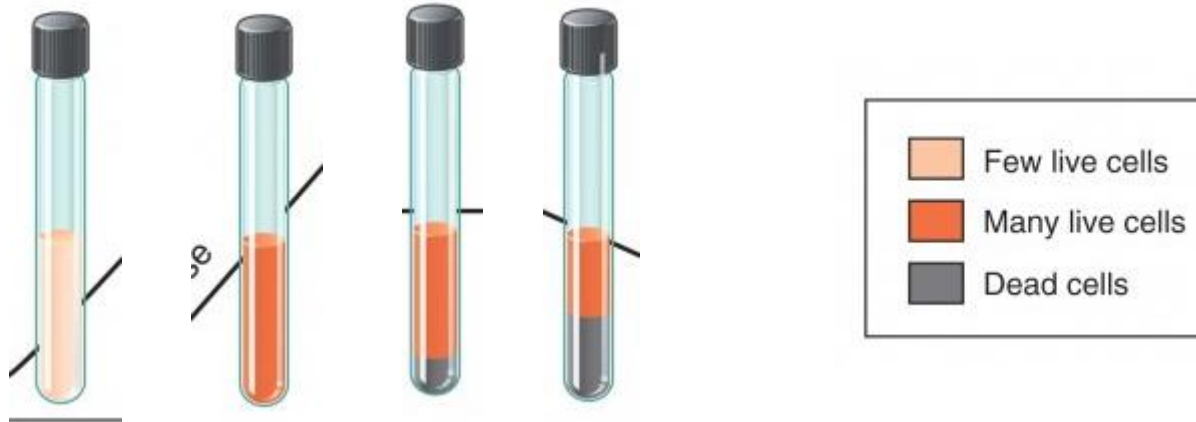
1.1.1. Processos aeróbios / anaeróbios (fermentações)

1.1.2. Crescimento microbiano: influencia de vários parâmetros

1.1.3. Quantificação do crescimento microbiano

1.1.4. Biossíntese de compostos de interesse industrial

1.1.2. Crescimento microbiano: influencia de vários parâmetros



Crescimento microbiano



Nutrientes

Processos de cultivo

Efeito dos parâmetros ambientais (T, pH, O₂)

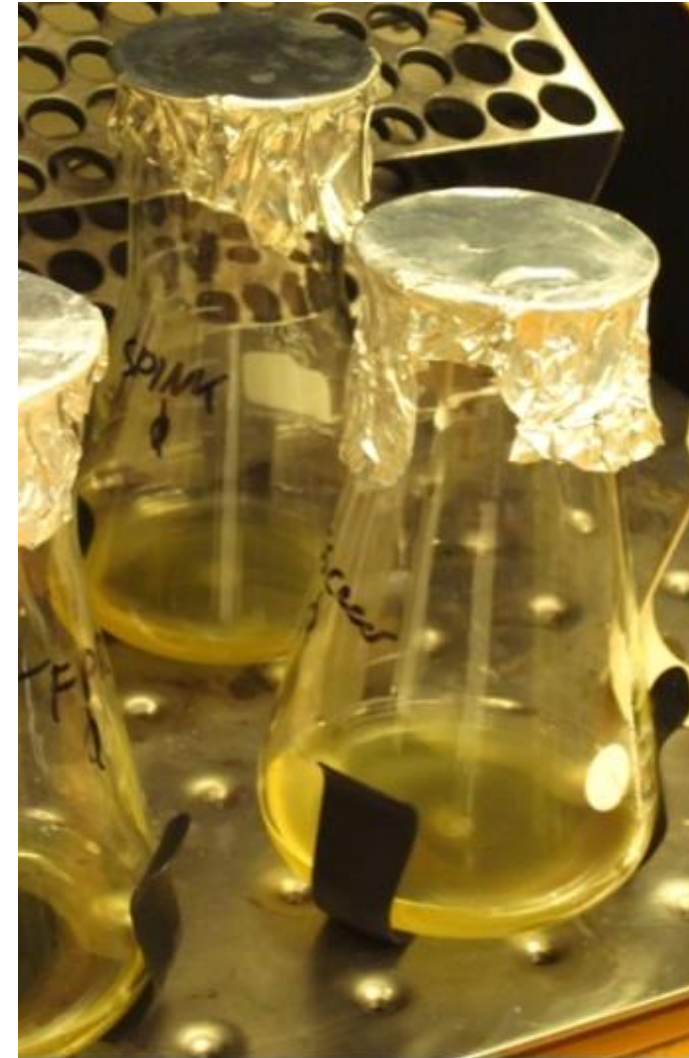
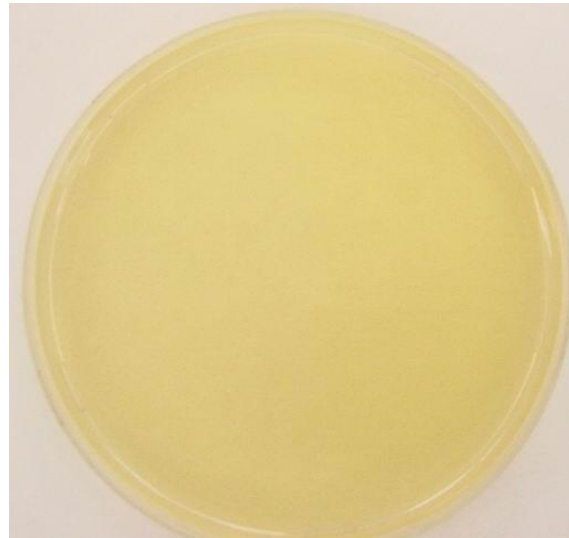
Efeito da H₂O

Processo de cultivo

Meios líquidos → **Culturas em descontinuo**

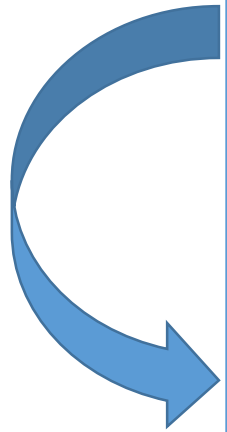
Meios semi-sólidos → **Isolamento de estirpes**

Meio tornado sólido com a presença de agar que liquefaz a 100°C e solidifica à temperatura ambiente até aos 40°C



Processo de cultivo

Meios de cultivo podem ser classificados em vários tipos



Meios definidos quimicamente (meios sintéticos) nos quais a composição química é conhecida; são meios de composição mínima com os nutrientes necessários para que o organismo cresça

Meios complexos em que a composição química não é conhecida completamente, contêm matérias de origem biológica como extractos de levedura, etc

Meios selectivos tem um componente que impede o crescimento de certo tipo de bactérias mas favorece o de outros

Meios enriquecidos contêm um componente que permite o crescimento de um tipo de bactéria específico

Conclusão: Microrganismos têm a capacidade de usar várias fontes de carbono, inclusive diferentes da glucose- Ex^{os}

Crescimento sobre óleos e gorduras

lipases

Ácido gordo + glicerol

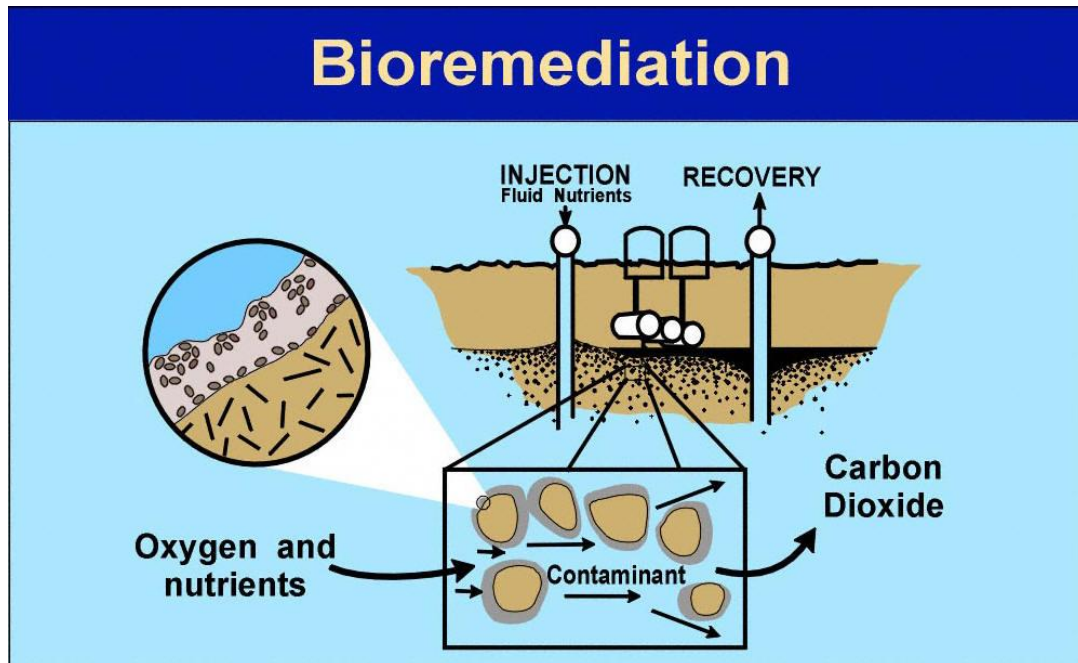
Gliceraldeído-3 P

Células
convertido em
tioester CoA

β -oxidação

Biodegradação/biorremediação

Biodegradação/biorremediação

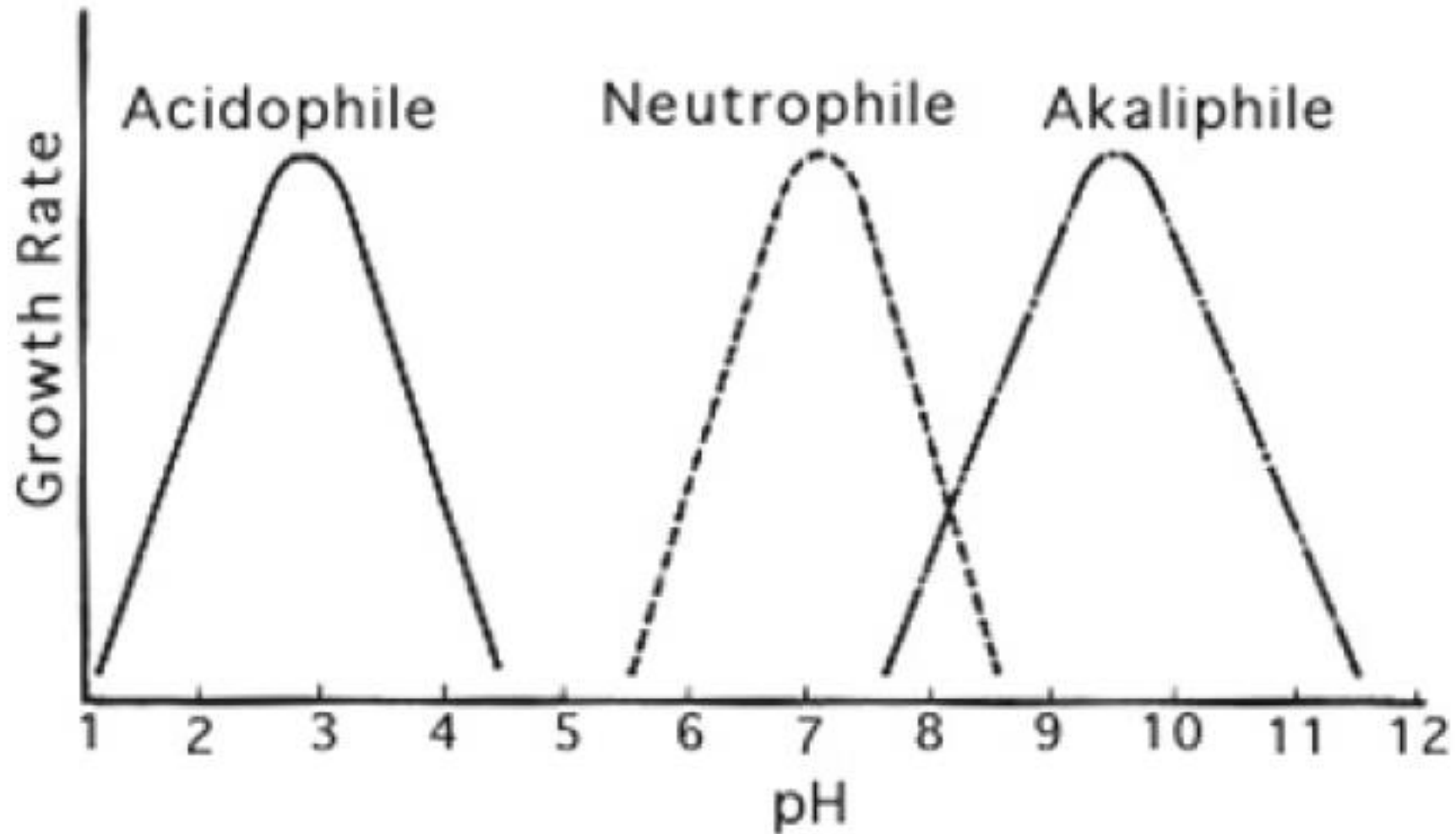


**Efeito dos parâmetros ambientais (O_2 , T, pH),
sais e açúcares no crescimento dos
microrganismos**

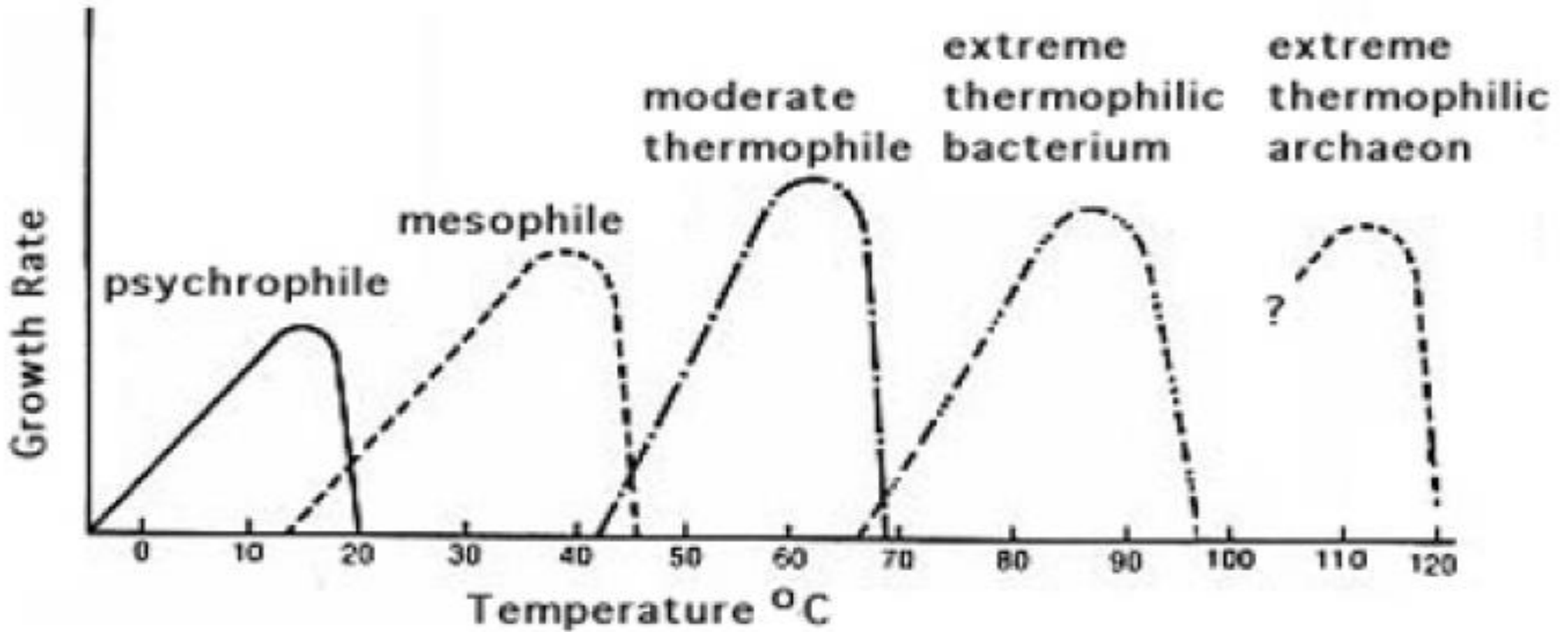
Efeito do O₂ no crescimento

Group	Environment		O₂ Effect
	Aerobic	Anaerobic	
Obligate Aerobe	Growth	No growth	Required (utilized for aerobic respiration)
Microaerophile	Growth if level not too high	No growth	Required but at levels below 0.2 atm
Obligate Anaerobe	No growth	Growth Toxic	
Facultative Anaerobe (Facultative Aerobe)	Growth	Growth	Not required for growth but utilized when available
Aerotolerant Anaerobe	Growth	Growth	Not required and not utilized

Efeito do pH no crescimento



Efeito da temperatura



Temperature for growth (degrees C)

Group	Minimum	Optimum	Maximum	Comments
Psychrophile	Below 0	10-15	Below 20	Grow best at relatively low T
Psychrotroph	0	15-30	Above 25	Able to grow at low T but prefer moderate T
Mesophile	10-15	30-40	Below 45	Most bacteria esp. those living in association with warm-blooded animals
Thermophile*	45	50-85	Above 100 (boiling)	Among all thermophiles is wide variation in optimum and maximum T

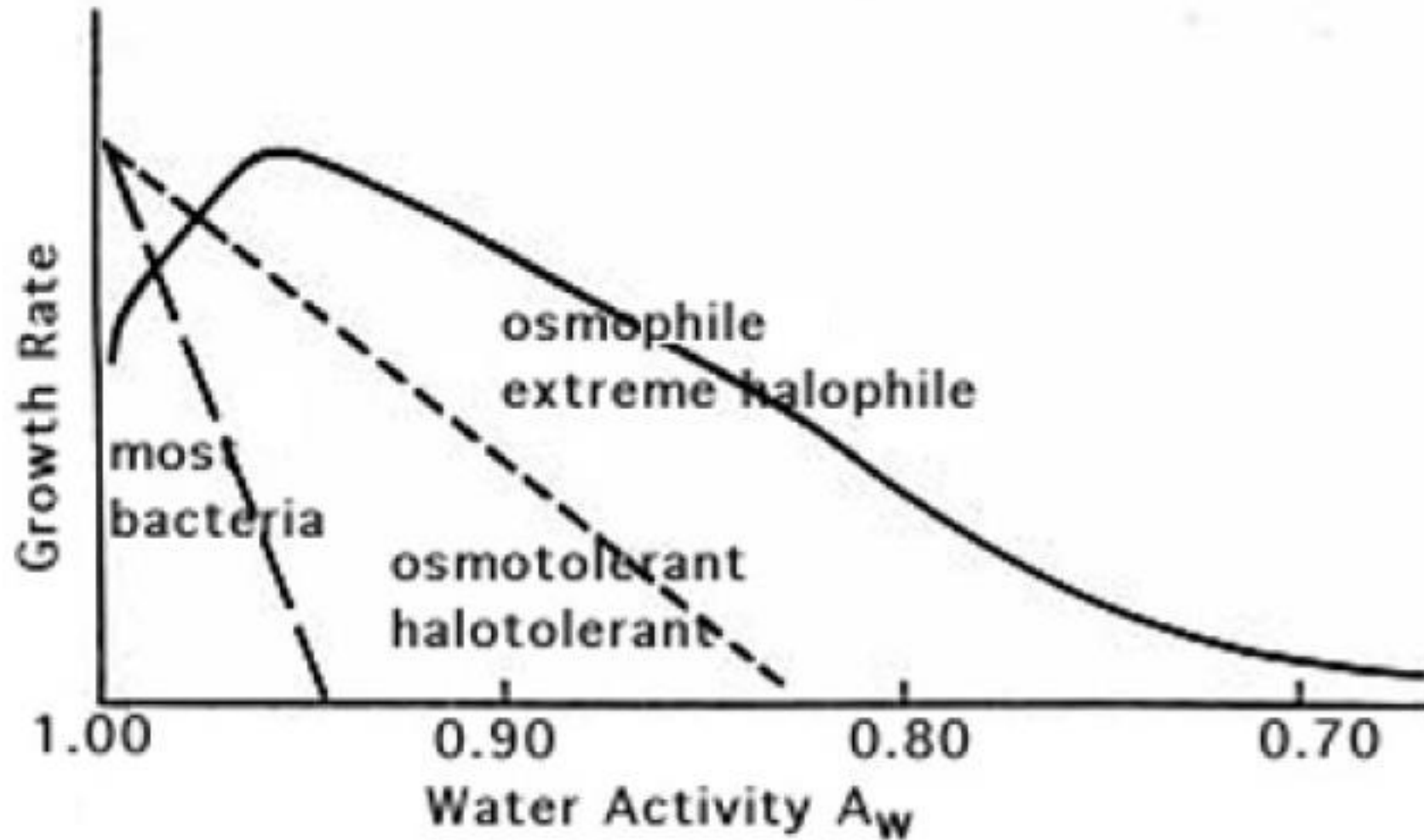
Efeito da H₂O

- Disponibilidade da H₂O para o crescimento celular depende da sua presença na atmosfera ou seja da humidade relativa ou da sua presença na solução onde o microrganismo cresce ou na propria matéria
- A disponibilidade da água para participar em reacções ou permitir solubilidade de nutrientes é chamada actividade da água
- A actividade da água pura é 1, $A_w=1$, 100% de água
- A actividade da água é afectada pela presença de solutos como sais e açúcares (glicidos). Quanto maior a concentração de um destes solutos em solução, menor será a actividade da água, ou seja menor será a sua disponibilidade para participar em reacções
- Microrganismo só vivem em geral com A_w entre 0,7 e 1.

Efeito dos sais e açúcares

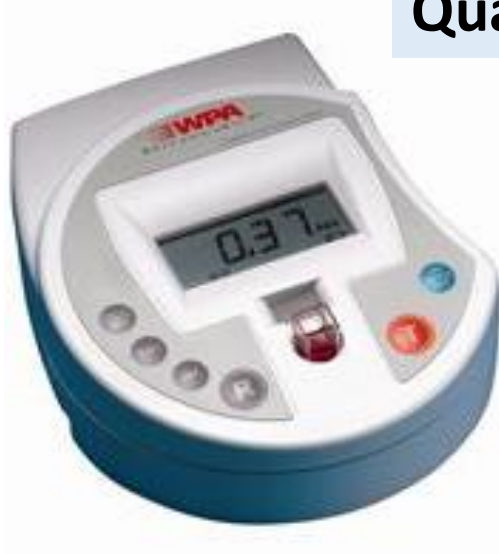
- ◆ Devido à capacidade dos microrganismos crescerem em diferentes concentração de sal (NaCl)
- ◆ Os que requerem alguma concentração e sal chamam-se halófilo
- ◆ Existem halófilos moderados (1-15% de NaCl)
- ◆ Halófilos extremos (15-30%)
- ◆ Halo tolerantes são os microrganismos que crescem bem em concentrações moderadas mas tb são capazes de crescer sem NaCl
- ◆ Organismos que vivem em concentrações elevadas de açucares são osmófilos
- ◆ Os que vivem em ambientes secos, desidratados são xerófilos.

Efeito dos sais e açúcares (cont.)



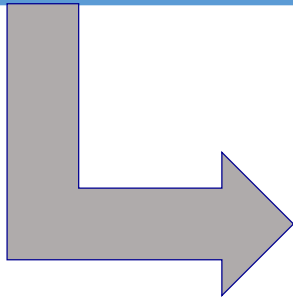
1.1.3. Quantificação do crescimento microbiano

Quantifying the unseen



1. Produção de Biomassa e Biomoléculas

1.1. Crescimento microbiano



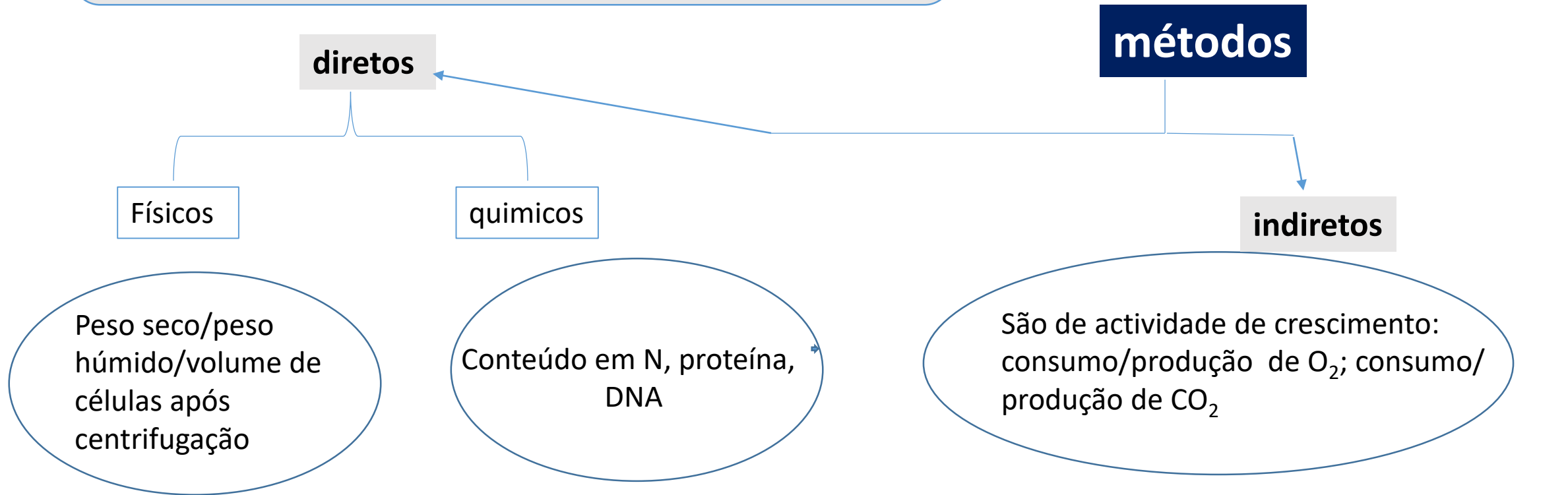
1.1.1. Processos aeróbios / anaeróbios (fermentações)

1.1.2. Crescimento microbiano: influencia de vários parâmetros

1.1.3. Quantificação do crescimento microbiano

1.1.4. Biossíntese de compostos de interesse industrial

1.1.3. Quantificação do Crescimento microbiano

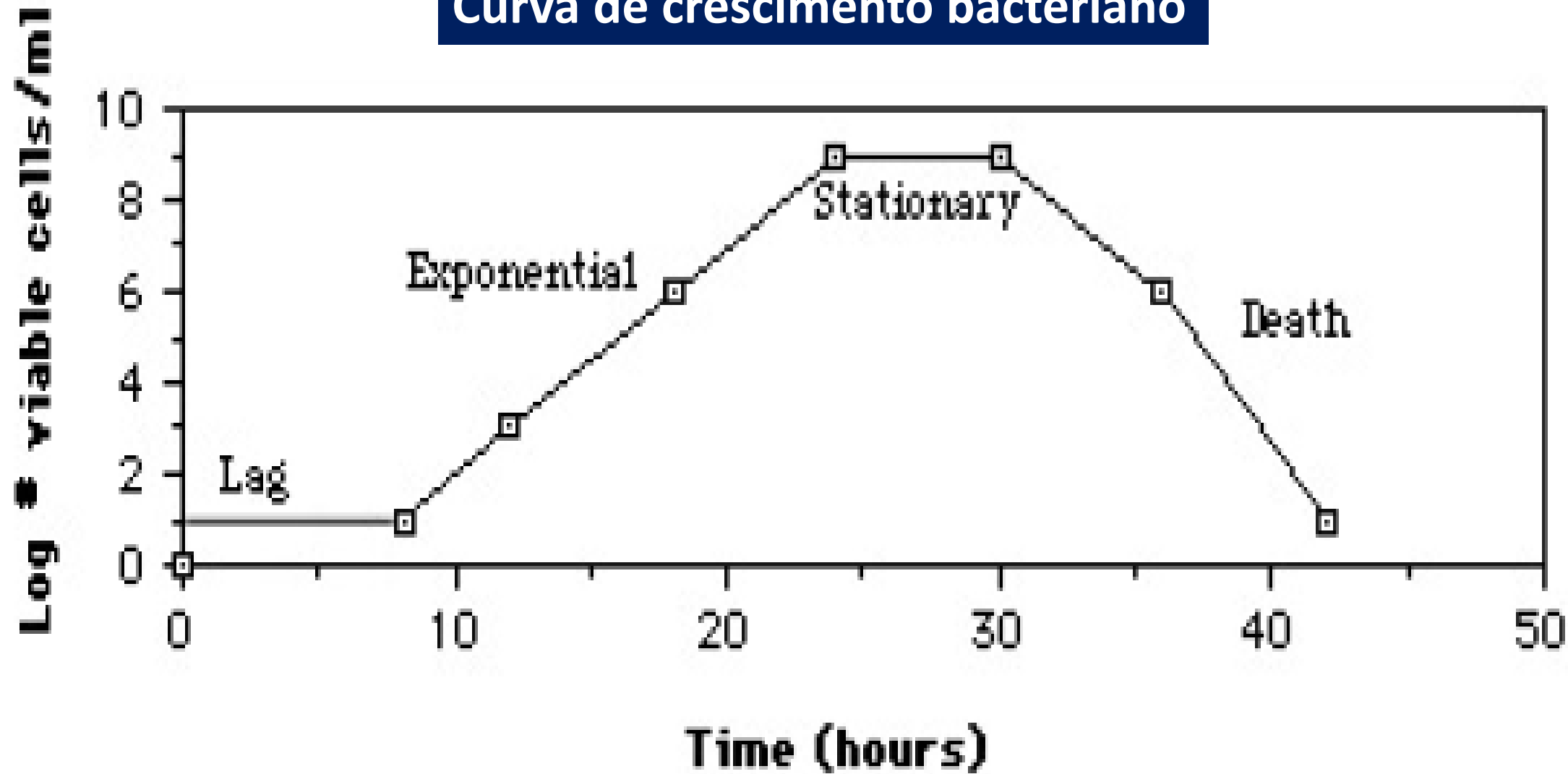


Turbidimetria (densidade ótica) mede a luz dispersa e está relacionada com o numero de células

Métodos utilizados para medir o crescimento bacteriano

Method	Application	Comments
Direct microscopic count	Enumeration of bacteria in milk or cellular vaccines	Cannot distinguish living from nonliving cells
Viable cell count (colony counts)	Enumeration of bacteria in milk, foods, soil, water, laboratory cultures, etc.	Very sensitive if plating conditions are optimal
Turbidity measurement	Estimations of large numbers of bacteria in clear liquid media and broths	Fast and nondestructive, but cannot detect cell densities less than 10^7 cells per ml
Measurement of total N or protein	Measurement of total cell yield from very dense cultures	only practical application is in the research laboratory
Measurement of Biochemical activity e.g. O ₂ uptake CO ₂ production, ATP production, etc.	Microbiological assays	Requires a fixed standard to relate chemical activity to cell mass and/or cell numbers
Measurement of dry weight or wet weight of cells or volume of cells after centrifugation	Measurement of total cell yield in cultures	probably more sensitive than total N or total protein measurements

Curva de crescimento bacteriano



Como calcular o tempo de geração

Crescimento celular é uma progressão geométrica

O tempo de geração é o tempo necessário para que ocorram 2 gerações consecutivas

G-tempo de geração= tempo (min) /n (numero de gerações ou seja o numero de vezes que as células duplicam)

$$G=t/n$$

Cálculo de n

$$b=B \times 2^n$$

b=numero de bacterias no final do intervalo de tempo

B= numero de bactérias no inicio do intervalo de tempo

$$\log b = \log B + n \log 2$$

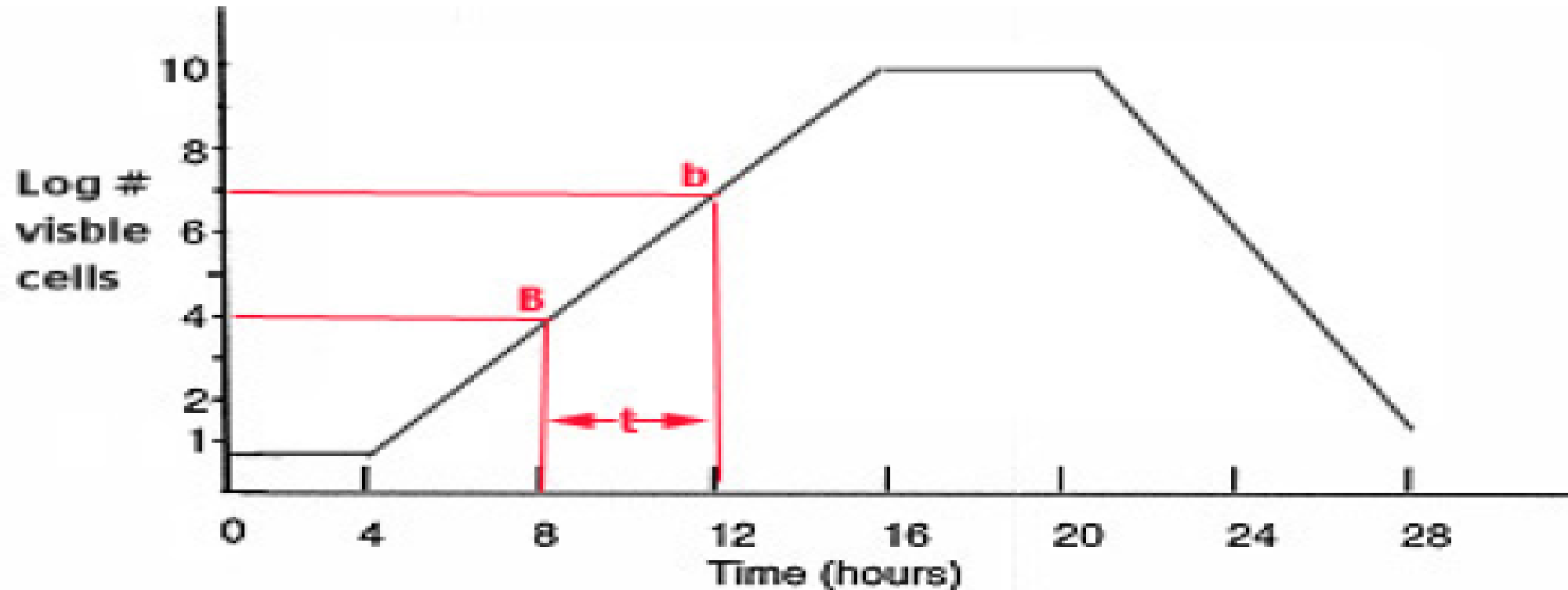
$$n = (\log b - \log B) / \log 2$$

$$n = (\log b - \log B) / 0,301$$

$$n = 3,3 \log (b/B)$$

$$G = t / (3,3 \log b/B)$$

Exemplo. Calcular o tempo de geração da população de bactérias quando aumentam de 10^4 para 10^7 em 4 h



$$G = t / (3,3 \log b/B)$$

$$\log b/B = \log (10^3) = 3$$

$$t = 4h = 240 \text{ min}$$

$$b = 10^7$$

$$G = 240 / (3,3 \times 3)$$

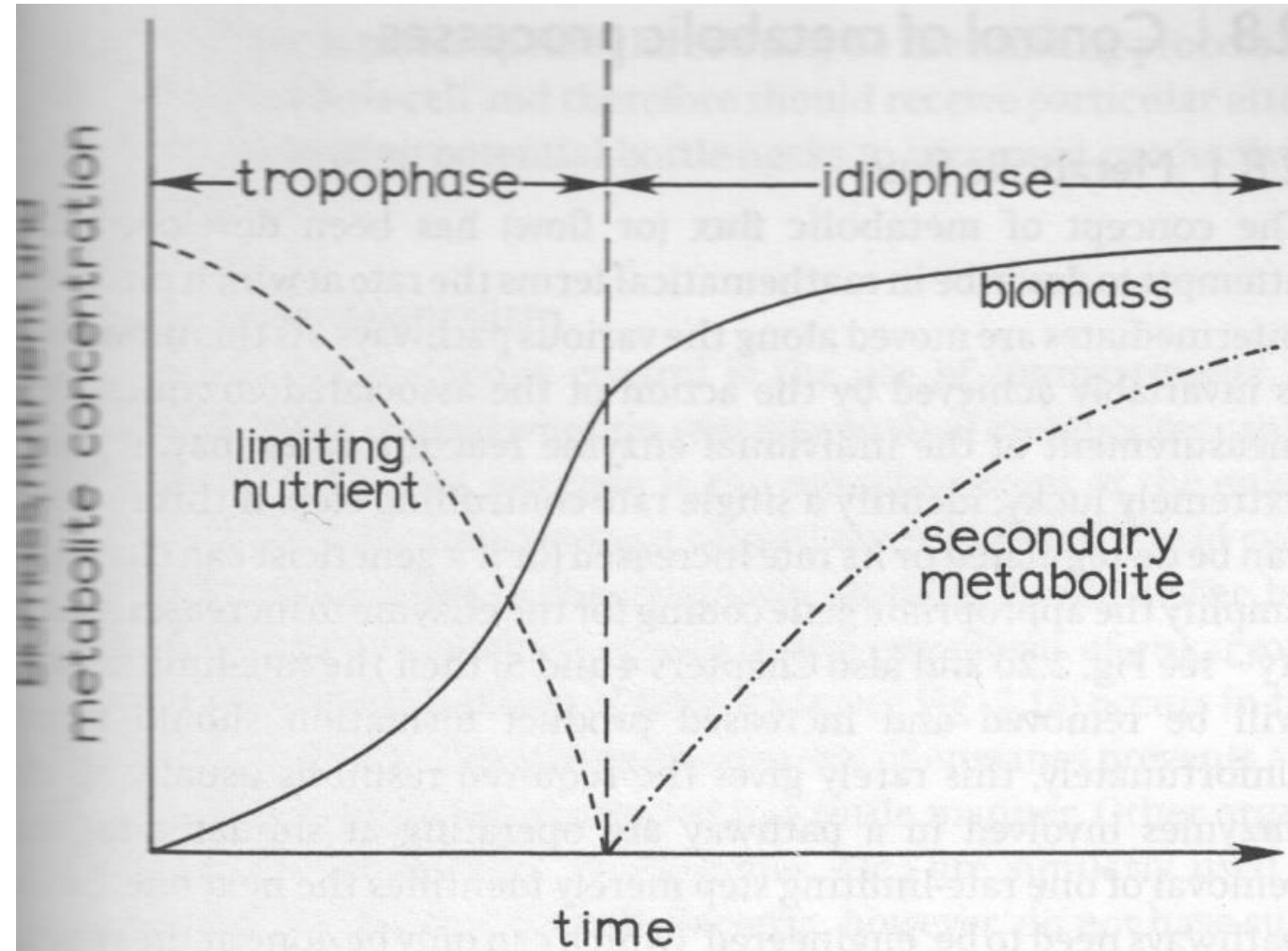
$$B = 10^4$$

$$G = 24 \text{ min}$$

Metabolismo primário



- Ocorre durante uma fase de crescimento chamada tropofase
- Todos os nutrientes estarão no meio de cultura, em excesso
- Células crescem em modo exponencial
- Um dos nutrientes esgota-se e a velocidade de crescimento diminui, parando o crescimento
- Metabolismo não para

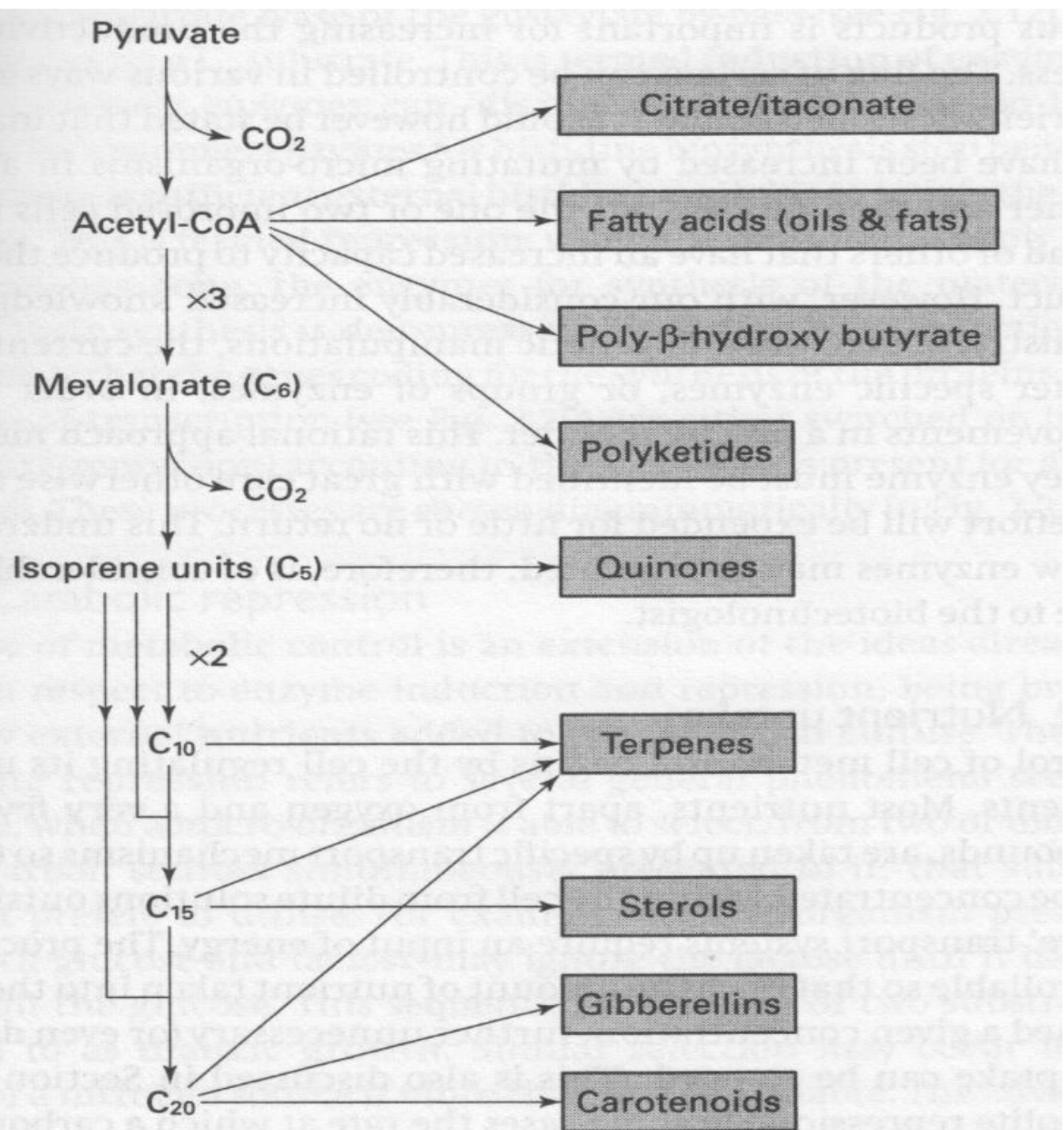
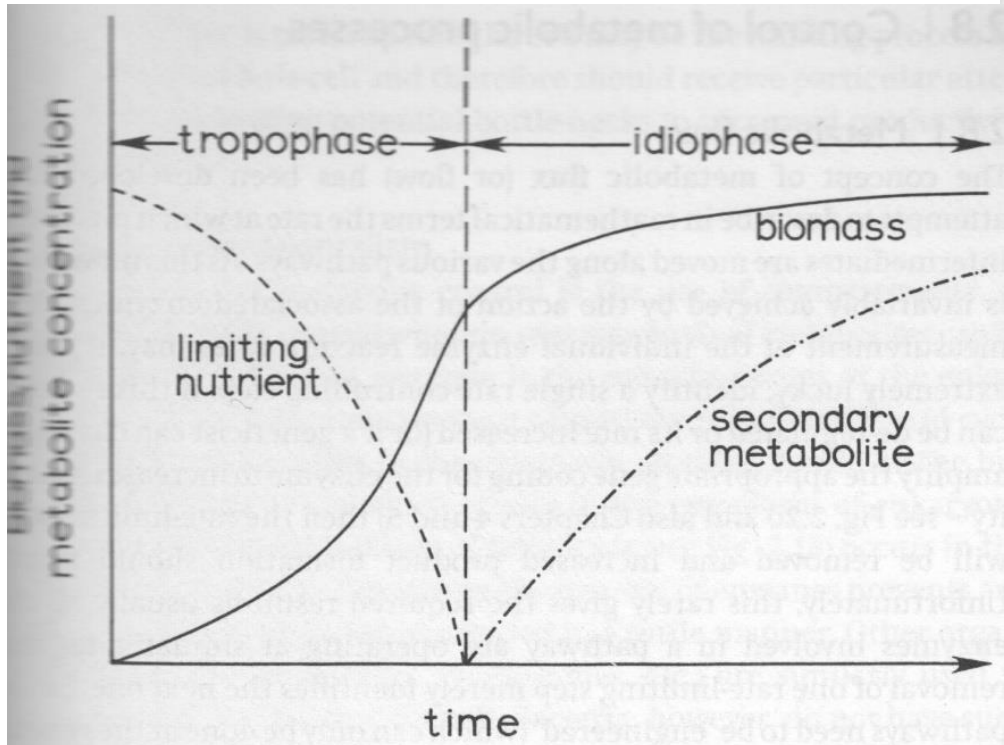


Metabolismo secundário



Os compostos resultantes deste metabolismo são os de interesse biotecnológico

Estes compostos são produzidos na chamada idiofase



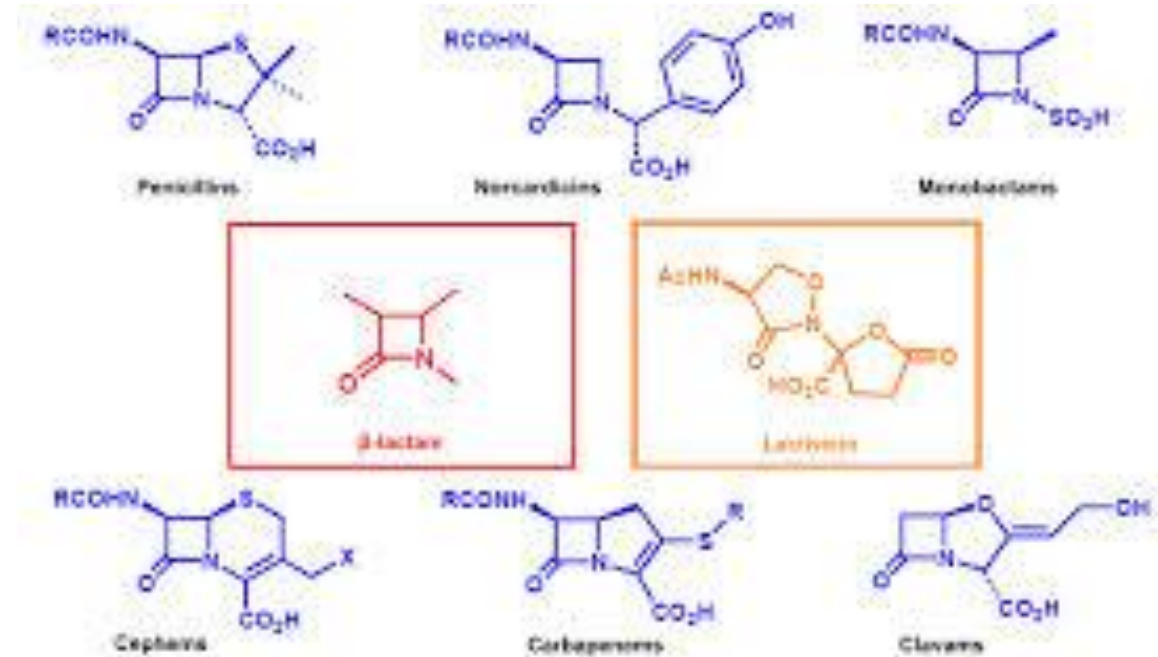
Eficácia do crescimento microbiano

Expressa em termos de rendimento de células formadas por massa de carbono utilizada como substrato Y_s

Substrato	Microrganismo	Rendimento molar (peso seco de microrganismo g/mole de substrato)	Coefficiente de conversão de carbono (peso seco de microrganismo g/g de substrato)
metano	Methylomonas	17,5	1,46
matanol	Methylomonas	16,6	1,38
etanol	Candida utilis	31,2	1,3
glicerol	Klebsiella pneumoniae	50,4	1,4
glucose	E.Coli aeróbio/anaerobio	95,0/25,8	132/0,36
	S. Cerevisiae aeróbio/anaerobio	90/21	1,26/0,29
	Penicillium chrysogenum	81	1,13
sacarose	Klebsiella pneumoniae	173	1,2
xilose	Klebsiella pneumoniae	52,2	0,87

Biossíntese de compostos de interesse industrial

**Metabolismo primário
e metabolismo secundário**



Naturally occurring antibiotics targeted at penicillin binding proteins.
 We are presently investigating the mechanism of action of Lactivins



FACULDADE • DE • CIÊNCIAS | UNIVERSIDADE • DE • LISBOA

U LISBOA | UNIVERSIDADE
DE LISBOA

*3º ano da Lic em
Bioquímica*

Introdução à Biotecnologia

RESUMO

Crescimento dos microrganismos depende de:

Tipo de fonte de carbono

Vias de catabolismo do substrato

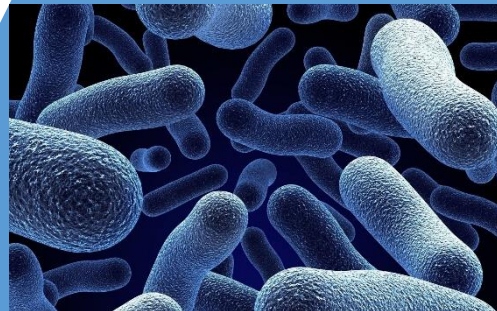
Fornecimento de substratos complexos

Requisitos energéticos para assimilar nutrientes

Eficácia da produção de ATP

Presença de substratos inibidores

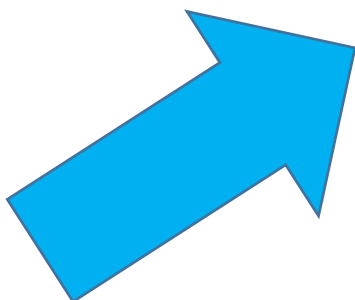
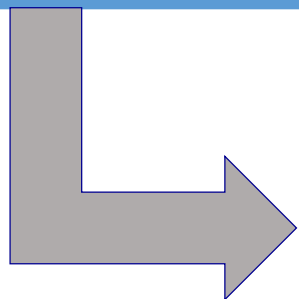
Estado fisiológico do microrganismo





1. Produção de Biomassa e Biomoléculas

1.1. Crescimento microbiano



1.1.1. Processos aeróbios / anaeróbios (fermentações)

1.1.2. Crescimento microbiano: influencia de vários parâmetros

1.1.3. Quantificação do crescimento microbiano

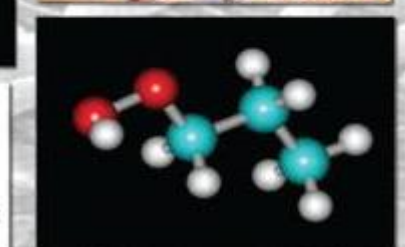
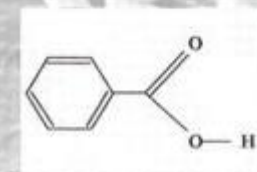
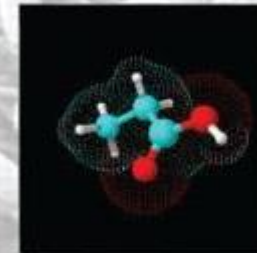
1.1.4. Biossíntese de compostos de interesse industrial

1.1.4. Biossíntese de compostos de interesse industrial

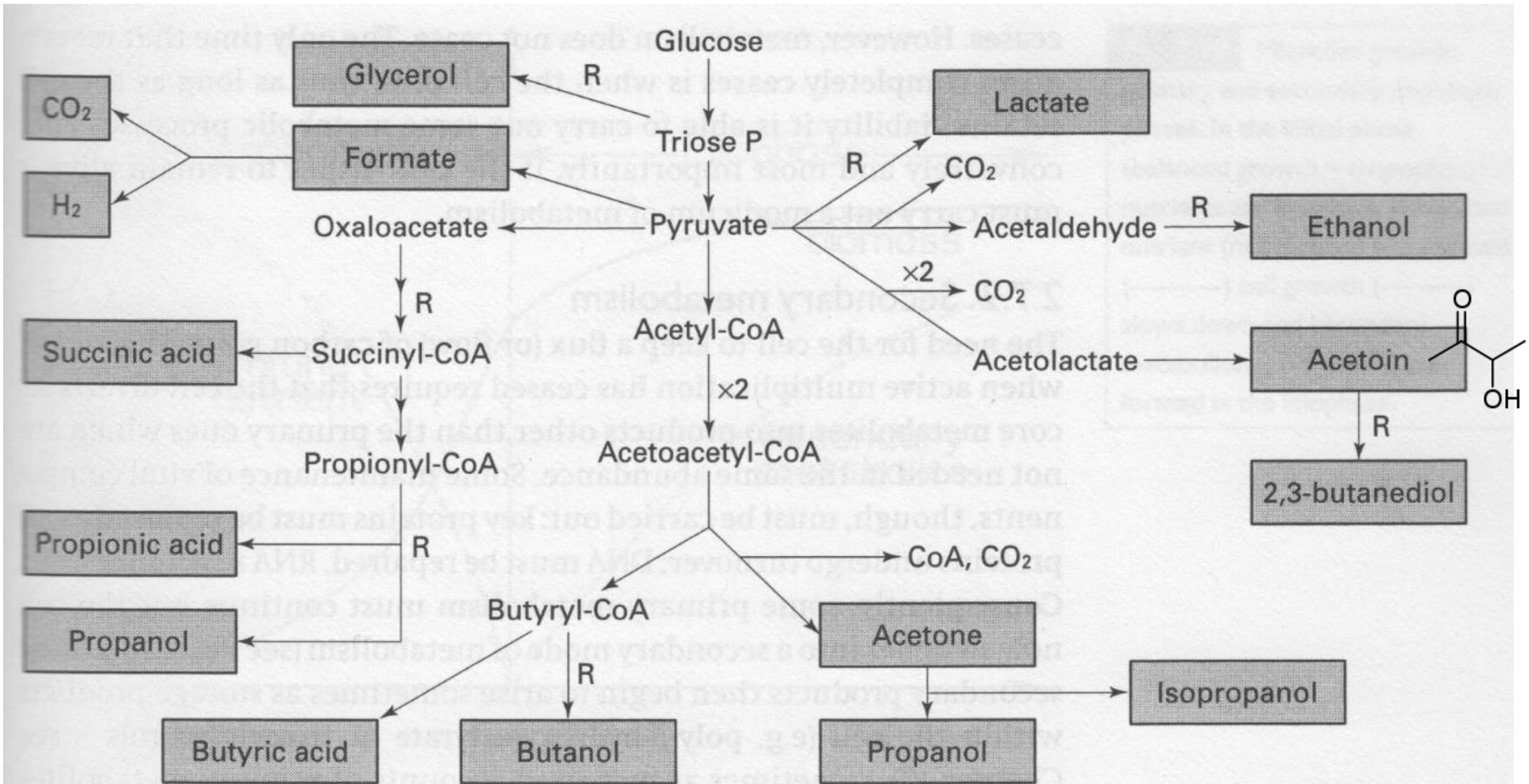


ORGANIC ACIDS and FOOD PRESERVATION

R-COOH



Produtos de metabolismo anaeróbico aproveitados pela indústria



EXEMPLOS

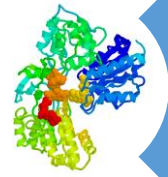
Aplicações industriais de fungos na produção de valor acrescentado

Leveduras	Bolores	Indústria	Aplicação
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Agaricus bisporus</i>	Alimentar	Biomassa
<i>S. cerevisiae</i>	-----	Alimentar	Cerveja, vinho (álcool) Pão, vinho (CO2) Sulfitos (conservante)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Trichoderma viride</i>	Alimentar	Bebidas Aromas
<i>Cryptococcus curvatus</i>	<i>Mortierella alpina</i>	Alimentar	Ac gordos poli-insaturados
<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentar	Ac orgânicos (conservantes)
----- --	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Farmacêutica	Antibióticos
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Aspergillus sp</i> <i>Rhizopus spp</i> <i>Trichoderma sp</i>	Alimentar, papel detergentes	Enzimas
<i>S. cerevisiae</i> outras	<i>Aspergillus niger</i> outros	Alimentar Farmaceutica	Proteínas

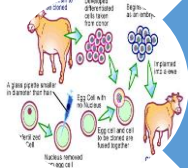
**Modificação de actividade enzimática
Sobre expressão e proteínas**

**Conseguido através da
engenharia genética**

Aplicações de tecnologia de DNA recombinante



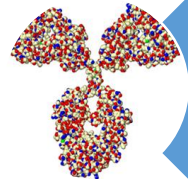
Expressão de proteínas/enzimas



Criar animais transgenicos



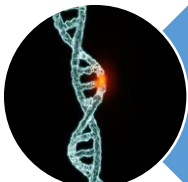
Animais com genes «apagados» knock-out



Produção em larga escala de proteínas terapêuticas



Terapia genica



Mutação de genes e função

Objectivo da 3ª aula

Identificar fontes de produção de moléculas comercializáveis

Como produzir proteínas/pequenos metabolitos

Crescimento microbiano

Meios de cultivo

Algumas aplicações industriais