



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA ACADÊMICA  
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

**Daniela Silva Gomes**

**PRODUÇÃO DE CUTINASES POR *Escherichia coli*  
RECOMBINANTE E POTENCIAL PARA APLICAÇÃO  
AMBIENTAL**

**Recife**

**2013**



**Daniela Silva Gomes**

**PRODUÇÃO DE CUTINASES POR *Escherichia coli*  
RECOMBINANTE E POTENCIAL PARA APLICAÇÃO  
AMBIENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

Co-orientadora: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

**Recife**

**2013**

**PRODUÇÃO DE CUTINASES POR *Escherichia coli* RECOMBINANTE E  
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO AMBIENTAL**

**Daniela Silva Gomes**

Examinadores:

---

Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP  
Orientadora

---

Prof. Dr. José Roberto Tavares  
Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Defendida em \_\_\_\_\_

Coordenadora: Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

À Deus, por permitir-me desfrutar desta vitória.  
À minha mãe, Maria Aparecida Silva Gomes, minha maior inspiração, minha eterna guerreira.  
Ao meu pai, José Pedro Gomes Irmão, pelos seus ensinamentos. (*In memoriam*).



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir ter forças, sabedoria para lutar e por colocar no meu caminho pessoas tão maravilhosas.

Aos meus pais, que sempre investiram na minha formação e que sempre acreditaram num futuro melhor para seus filhos e ao meu irmão Pedro, que mesmo distante, torce por mim.

À minha família – avós, tios, primos - por todo carinho.

À minha queridíssima orientadora, Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro, por me receber com os braços abertos e um sorriso no rosto desde o primeiro dia, pelos seus ensinamentos acadêmicos, pelas conversas informais, por torcer por mim em todos os sentidos. Sempre levarei suas lições comigo.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Galba Takaki pelo suporte e pela sua importância no contexto científico.

Ao José Roberto, pelo companheirismo, incentivo e atribuições.

Ao Professor Dr. Artur Cavaco-Paulo e à Dra. Teresa Matamá, pelo suporte, presteza e atenção concedida.

Aos meus amigos que, mesmo nos momentos mais turbulentos, sabem retirar de mim um sorriso sincero.

Aos professores do Mestrado em Desenvolvimento em Processos Ambientais, pela compreensão e ensinamentos.

Aos colegas do mestrado e do NPCIAMB, pelo companheirismo.

Aos funcionários da Universidade Católica de Pernambuco, pela eficiência e suporte.

Aos técnicos do NPCIAMB, Severino Humberto e André Felipe, por todo suporte e atenção.

Aos membros da banca examinadora, por suas valiosas contribuições.

A todos que, de alguma forma, contribuíram nesta caminhada.

À CAPES e ao CNPq, pelo suporte financeiro.

## SUMÁRIO




<b>LISTA DE FIGURAS</b>	
<b>LISTA DE TABELAS</b>	
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	
<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>CAPÍTULO I</b> .....	18
<b>1.1 Introdução</b> .....	18
<b>1.2 Objetivos</b> .....	20
1.2.1 Objetivo geral .....	20
1.2.2 Objetivos específicos .....	20
<b>1.3 Revisão da literatura</b> .....	21
1.3.1 Micro-organismos.....	21
1.3.2 Enzimas.....	22
1.3.3 Cutinases .....	25
1.3.4 Produção microbiana de enzimas.....	29
1.3.5 Ultrafiltração.....	31
1.3.6 Formulação.....	33
1.3.7 Polímeros.....	34
1.3.8 Degradação de plásticos.....	36
<b>1.4 Referências bibliográficas</b> .....	38
<b>CAPÍTULO II</b> .....	43
<b>2.1. Resumo</b> .....	44
<b>2.2 Abstract</b> .....	45
<b>2.3 Introdução</b> .....	46
<b>2.4 Material e métodos</b> .....	47
2.4.1 Micro-organismos.....	47
2.4.2 Produção de cutinases.....	47
2.4.3 Determinação da atividade enzimática.....	48
2.4.4 Ultrafiltração.....	48
2.4.5 Efeitos de pH e temperatura na estabilidade de cutinases.....	48



2.4.6 Aplicação de cutinases engenheiradas.....	49
2.4.7 Formulação do líquido metabólico.....	49
<b>2.5 Resultados e discussão</b> .....	50
2.5.1 Curva de crescimento microbiano.....	50
2.5.2 Efeitos da concentração de IPTG na produção de cutinases.....	51
2.5.3 Ultrafiltração de líquidos metabólicos.....	53
2.5.4 pH ótimo e estabilidade de cutinases em líquidos metabólicos concentrados livres de células.....	54
2.5.5 Estabilidade térmica de cutinases em líquidos metabólicos concentrados livres de células.....	56
2.5.6 Formulação de líquido metabólico concentrado com atividade de cutinases.....	57
2.5.7 Aplicação de líquidos metabólicos com atividade de cutinases no tratamento de plásticos.....	58
<b>2.6 Conclusões</b> .....	63
<b>2.7 Referências bibliográficas</b> .....	63
<b>CAPÍTULO III</b> .....	67
<b>3.1 Conclusões gerais</b> .....	67
<b>ANEXO</b> .....	69



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.3.1	Cálculo da taxa de velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ).....	22
Figura 1.3.2	Enzimas utilizadas em biocatálises.....	25
Figura 1.3.3	Estrutura de cutinases apresentando a tríade catalítica (Ser120, Asp175 e His188), em conjunto com cinco cadeias beta (setas pretas) e quatro hélices (A, B, C e F).....	26
Figura 1.3.4	Estrutura 3D de uma cutinase mostrando acessibilidade da região sítio ativo. A região em vermelho corresponde à área móvel e em azul, a área rígida. Os sítios com resíduos de aminoácidos específicos para a catálise estão indicados na cor branca.....	27
Figura 1.3.5	O fluxograma mostra etapas convencionais utilizadas em processos biotecnológicos para obtenção de enzimas. F: fermentação; S: separação sólido-líquido, E: extração de células; C: concentração; P <sub>i</sub> : operações de purificação; D: secagem; F <sub>i</sub> : formulação;  :enzima extracelular;  : enzima intracelular;  : fluidos celulares.....	31
Figura 1.3.6	Reação de polimerização para produção de politereftalato de etileno (PET).....	36
Figura 1.3.7	Dados de produção nacional de polímeros termoplásticos, geração de RSU e índice de reciclagem mecânica (IRM) dos polímeros pós-consumo.....	37
Figura 2.5.1	Curva de crescimento celular das culturas de <i>E. coli</i> CUT e <i>E. coli</i> CUT-N1 na presença do meio LB e ampicilina.....	52
Figura 2.5.2	Retenção de atividade enzimática de líquido concentrado e formulado de <i>E. coli</i> CUT a pH 6-9.....	54
Figura 2.5.3	Retenção de atividade enzimática de líquido concentrado e formulado de <i>E. coli</i> CUT a pH 6-9.....	55
Figura 2.5.4	Estabilidade térmica dos líquidos metabólicos das culturas de <i>E. coli</i> CUT e <i>E. coli</i> CUT-N1 em pH ótimo.....	56
Figura 2.5.5	Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o	

	planejamento fatorial $2^3$ cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol (1), PEG-200 (2) e $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ (3) e como variável resposta a atividade de cutinases CUT-N1 no tempo inicial da formulação do bioproduto.....	60
Figura 2.5.6	Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol, PEG-200 e $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ e como variável resposta, a atividade de cutinases produzida por <i>E. coli</i> CUT-N1, durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente.....	61
Figura 2.5.7	Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol, PEG-200 e $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ e como variável resposta, a atividade de cutinases produzida por <i>E. coli</i> CUT-N1, durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente.....	62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.4.1 Fatores e níveis investigados na estabilização de cutinases (EC 3.1.1.74).....	50
Tabela 2.5.1 Tabela 2. Atividade de cutinases do líquido metabólico livre de células das culturas de <i>E. coli</i> CUT e <i>E. coli</i> CUT-N1 sob cultivo submerso na presença de diferentes concentrações de IPTG.....	52
Tabela 2.5.2 Atividade enzimática das fases concentradas de líquidos metabólicos.....	53
Tabela 2.5.3 Tratamento de PET por cutinases em tampão fosfato pH 7,2 durante 48 h.....	57
Tabela 2.5.4 Matriz decodificada de planejamento fatorial e atividade de cutinases no tempo inicial e retenção de atividades no bioproduto produzido por <i>E. coli</i> CUT-N1.....	59



## RESUMO

Cutinases (EC 3.1.1.74) são enzimas que catalisam a hidrólise da cutina, um biopoliéster insolúvel que compõe a estrutura da cutícula das plantas. Essas enzimas possuem potencial na síntese de triglicerídeos, polímeros, surfactantes, em indústrias química, farmacêutica e agroquímica. As cutinases têm sido aplicadas na modificação de superfícies de polímeros, facilitando a degradação desses compostos. O objetivo deste trabalho foi produzir e caracterizar cutinases por *Escherichia coli* modificadas geneticamente para aplicação no tratamento de politereftalato de etileno (PET). *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 foram cultivadas em Lysogenybroth (LB) na presença de 100 µg/mL de ampicilina e isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) como indutor. As atividades de cutinases foram determinadas na presença do paranitrofenilbutirato (pNPB). A máxima atividade de cutinases foi 1,4 UI/mL, determinada no líquido metabólico livre de células, produzido por *E. coli* CUT-N1. Os líquidos metabólicos com atividade de cutinase produzidos por *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 foram concentrados duas vezes por ultrafiltração e formulados com conservantes microbiológicos e substâncias estabilizadoras de estruturas protéicas. As cutinases apresentaram pH ótimo igual a 7,0 e estabilidade térmica a 30 - 50 °C. A adição de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, em concentrações inferiores a 10 % estabilizou a atividade de cutinases durante 60 dias, a 28 °C. As cutinases produzidas pelas culturas de *E. coli* degradaram o plástico politereftalato de etileno (PET), com perda de massa de 0,90 %. Cutinases microbianas recombinantes são uma alternativa para aplicação em tratamento biológico de plásticos.

**Palavras-chave:** cutinase heteróloga, *Escherichia coli*, aplicação ambiental.





## ABSTRACT

Cutinase (EC 3.1.1.74) are enzymes that catalyze the hydrolysis of cutin, an insoluble biopolyester that compound the cuticle of plants. These enzymes have potential in the synthesis of triglycerides, polymers, surfactants in chemical, pharmaceutical and agrochemical industries. Cutinases have been applied to the surface modification of polymers, facilitating the degradation of these compounds. The aim of this work was to produce and characterize cutinases by *Escherichia coli* genetically engineered for use in the treatment of polyethylene terephthalate (PET). *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 were grown in Lysogeny broth (LB) in the presence of 100 µg/ml ampicillin and isopropyl β-D-1-thiogalactopiranosídeo (IPTG) as inducer. Cutinases activities were determined in the presence of p-nitrophenyl butyrate (p-NPB). The maximum cutinase activity was 1.4 U/mL, determined in the cell-free metaboliquid, produced by *E. coli* CUT-N1. The metabolic liquid with activity of cutinase produced by *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 were concentrated two times by ultrafiltration and formulated with microbial preservatives and stabilizing substances of protein structures. Cutinases had optimum pH equal to 7.0 and thermal stability at 30 - 50 °C. The addition of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at concentrations less than 10% stabilized cutinase activity for 60 days at 28 °C. Cutinases produced by cultures of *E. coli* degraded the plastic polyethylene terephthalate (PET) with a weight loss of 0.90%. Recombinant microbial cutinases are an alternative for application in biological treatment of plastics.

**Keywords:** heterologous cutinase, *Escherichia coli*, environmental application.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A produção industrial de bioprodutos por micro-organismos ocupa lugar de destaque no mercado devido à possibilidade de produção em grande escala sendo as bactérias, leveduras e fungos filamentosos os potenciais produtores. A capacidade de rápida reprodução em ambientes líquidos confere às bactérias o favorecimento de produção de biomassa e enzimas, dentre outros compostos com elevada produtividade (GALLEZOT, 2011).

As enzimas são biocatalisadores com propriedades de grande interesse industrial, de elevada atividade catalítica, especificidade e versatilidade, além de executarem transformações de modo seletivo, rápido e em condições brandas de reação, diferindo dos catalisadores químicos. Outra vantagem na utilização de enzimas é a facilidade em regular a atividade catalítica por modificação da natureza do meio de reação, pela adição de substâncias químicas, dentre outros fatores (PATEL, 2002; BRADY, JORDAN, 2009).

A cutinase (EC 3.1.1.74) é classificada sistematicamente como uma cutina hidrolase, ou seja, uma esterase que hidrolisa a cutina, podendo agir e ser classificada também como lipase (BRENDA, 2012). As cutinases são hidrolases capazes de catalisar reações reversas de esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólise) e aminólise, sendo a atividade de água do meio reacional um dos fatores determinantes para cada classe de reação (PIO, 2007; VILLENEUVE et al., 2000). A estabilidade da enzima e a determinação de parâmetros como pH e temperatura tem sido de grande importância para a atividade e aplicação de cutinases (IYER, ANANTHANARAYAN, 2008). As cutinases possuem diversas aplicações, dentre elas está a degradação de materiais plásticos (GUEBITZ, CAVACO-PAULO, 2008).

A elevada produção industrial de politereftalato de etileno (PET), o controle de descarte e a degradação desse polímero pela ação de micro-organismos são objetos de estudos acadêmico e industrial. A biodegradação de plásticos depende da ação de enzimas microbianas, além das características do polímero e seu pré-tratamento, sendo a hidrólise a etapa primordial na decomposição desses compostos (ARTHAM, DOBLE, 2008; SHAH et al., 2008).

Empresas investem na substituição gradual de processos químicos pelos enzimáticos, resultando em produtos de maior valor agregado, pela qualidade e por envolverem tecnologias limpas (VERMELHO et al., 2008). Nesse âmbito, a biotecnologia busca a produtividade máxima e a minimização dos custos dos processos, aliada ao desenvolvimento sustentável e à competitividade econômica. Nesse sentido, a produção de cutinase para aplicação em processo de biodegradação de PET que foi investigada neste trabalho, é uma estratégia tecnológica de interesse ambiental por auxiliar a redução de resíduos sólidos que poluem o ambiente.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Produzir cutinases (EC 3.1.1.74) por *Escherichia coli* recombinante e aplicar em degradação de PET.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Produzir cutinases por cultivo submerso;
- Determinar a atividade da enzima produzida;
- Concentrar o extrato bruto enzimático;
- Caracterizar o líquido metabólico concentrado quanto ao pH e temperatura;
- Aplicar cutinases na degradação de PET;
- Investigar a estabilidade do líquido metabólico na presença de glicerol, PEG-200,  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ , sorbato de sódio e benzoato de sódio durante o armazenamento;
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

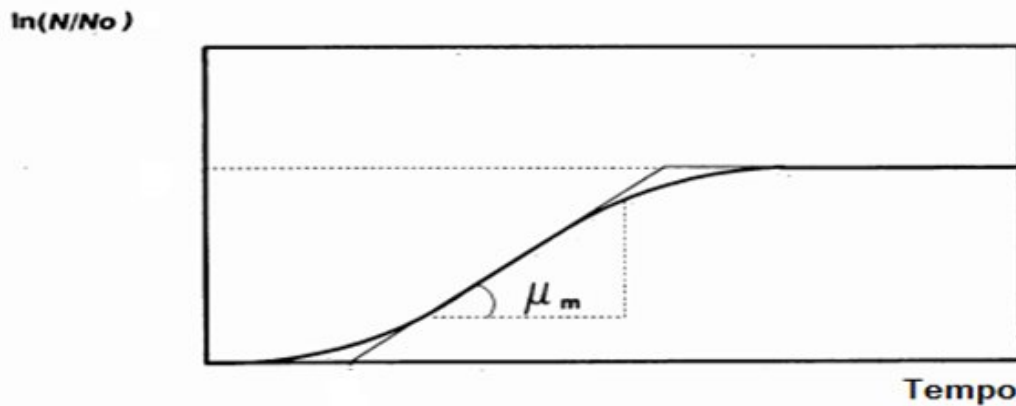
### 1.3.1 Micro-organismos

Os micro-organismos procariotos ou eucariotos, utilizados nos processos biotecnológicos, são geralmente isolados do ambiente natural e posteriormente modificados a partir da engenharia genética com o objetivo de otimizar a produtividade específica de um bioproduto (SMITH, 2004).

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante possibilita a expressão de enzimas em diferentes hospedeiros e tem permitido a obtenção de biocatalisadores mais eficientes e específicos (BON et al., 2008). A manipulação dos genes representa uma ferramenta analítica de elevado potencial para aumentar o rendimento e a qualidade de produtos; melhorar as características de produtos já existentes; produzir produtos por vias metabólicas diferentes; e, desenvolver novos compostos que não existiam previamente (biossíntese dirigida ou híbrida) (PAIVA, SÁ-PEREIRA, 2008).

A análise do comportamento de micro-organismos sob diferentes condições físico-químicas é necessária para a aplicação de modelos matemáticos. A curva de crescimento microbiano é definida a partir do logaritmo do número de organismos em função do tempo, resultando numa curva sigmoideal, com uma fase de adaptação após  $t = 0$ , seguida de uma fase exponencial e, logo após, por uma fase estacionária quando a concentração celular atinge o valor máximo e o número de células viáveis é igual ao número de células que morrem. A taxa de velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) é calculada na fase exponencial do crescimento celular, de acordo com a Figura 1.3.1 (HUANG, 2010).

A taxa de crescimento específico de um micro-organismo é um parâmetro relevante para a produção de metabólitos por fermentação. Muitas enzimas são sintetizadas de modo que a taxa de crescimento específico das células tem um impacto direto na taxa específica de síntese enzima. Condições que otimizam a taxa de crescimento dos micro-organismos (pH, temperatura e oxigênio dissolvido) são muitas vezes semelhantes às condições que maximizam a taxa específica de produção de enzima (ILLANES, 2008).



Fonte: HUANG, 2010

**Figura 1.3.1** Cálculo da taxa de velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ )

Propriedades morfológicas e reológicas do micro-organismo produtor também são relevantes para a produção de enzimas, especialmente para o caso de micro-organismos miceliais (KIM et al., 2003). O aumento da viscosidade e reologia não-newtoniana podem reduzir as taxas de transferência de oxigênio, estando a síntese de enzimas geralmente relacionado à morfologia de crescimento (BHARGAVA et al., 2005).

### 1.3.2 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, capazes de atuar em reações químicas com elevada especificidade. Sob condições ideais, executam reações bioquímicas de forma eficiente, preservando a funcionalidade e a integridade dos sistemas biológicos. São proteínas compostas por resíduos de aminoácidos ligados covalentemente através de ligações peptídicas cujos polímeros formados, podem também integrar-se a moléculas de lipídeos e carboidratos. Possuem elevada especificidade que depende do tipo de reação ou do substrato e atuam por redução da energia de ativação. A maioria das características de enzimas como catalisadores derivam de sua estrutura molecular e da distribuição dos aminoácidos ao longo da proteína. Os aminoácidos podem ser apolares (hidrofóbicos) ou polares (com carga ou sem carga) cujas estruturas químicas influenciam sua conformação tridimensional que consequentemente interferem na estabilidade da cadeia protéica e na especificidade da enzima. Fatores externos, como temperatura e pH, podem afetar as propriedades dessas moléculas (VOET, VOET, 2011).

As enzimas podem ser obtidas através de cultivo submerso, a partir de micro-organismos que apresentam elevada cinética de crescimento, com densidades celulares e níveis de expressão elevados, o que facilita a recuperação do biocatalisador.

A utilização das enzimas como catalisadores de processos é de fundamental importância, devido à obtenção de produtos de elevado valor agregado, por tecnologias limpas e em sintonia com as demandas de caráter tecnológico, de mercado e de preservação ambiental. São aplicadas em diversos setores, incluindo biorremediação, síntese orgânica, análises clínicas, produção de fármacos, detergentes, alimentos, dentre outros. Podem ser utilizadas de forma eficiente em meio aquoso, em meio não convencional ou sob condições extremas, como por exemplo, na presença de temperatura elevada (BRAIUCA et al., 2006).

Maiores produtividades têm sido obtidas no processo de obtenção de enzimas, utilizando micro-organismos recombinantes. Estudos de engenharia genética têm sido feitos para o aumento da estabilidade das enzimas. Regiões instáveis tem sido alvo de mutações específicas, embora, na maioria dos casos, estes pontos não sejam de fácil identificação (GASEIDNES et al., 2003).

Condições adversas de temperatura, pH ou solvente e a presença de agentes quelantes, caotrópicos ou de metais pesados podem alterar a configuração do sítio ativo e induzir a perda da função da enzima. A integridade da estrutura da enzima é fundamental para a estabilidade funcional da molécula. Regiões instáveis estão geralmente localizadas próximas ou na superfície da enzima, justificando a relação entre a importância da atividade catalítica e a manutenção da estrutura da molécula (EIJSINK et al., 2004).

Uma enzima pode sofrer alteração de sua estrutura, desalinhando os aminoácidos localizados no sítio ativo e promovendo a perda de sua função catalítica (desnaturação). Este processo pode ser reversível se o agente desnaturante for removido. O processo de inativação ocorre quando a proteína é submetida a alterações químicas que provocam o desdobramento da molécula e a perda de um cofator essencial, ocorrendo conseqüentemente, proteólise e perda irreversível de atividade. A estabilidade estrutural da molécula não está diretamente relacionada com a atividade catalítica e, em muitos casos, são fatores que seguem direções opostas. Esse fato pode ser observado, por exemplo, quando a enzima

sofre inativação térmica: a atividade enzimática aumenta com a temperatura porém, a estabilidade diminui (ILLANES, 2008).

Outra propriedade relevante das enzimas é a sua especificidade. As enzimas são moléculas geralmente muito específicas quanto ao seu substrato. Essa interação ocorre, pois o substrato possui ligações químicas que podem ser reconhecidas pelo sítio ativo da enzima, que possui grupos funcionais que ancoram o substrato corretamente no sítio ativo para o início da reação. Quando submetidas à condições atípicas, as enzimas podem sofrer modificações estruturais que podem alterar a especificidade pelo substrato. Parales et al. (2000) realizaram estudos de mutagênese dirigida, na qual resíduos de aminoácidos específicos localizados próximos ao sítio ativo foram substituídos produzindo uma alteração de especificidade pelo substrato.

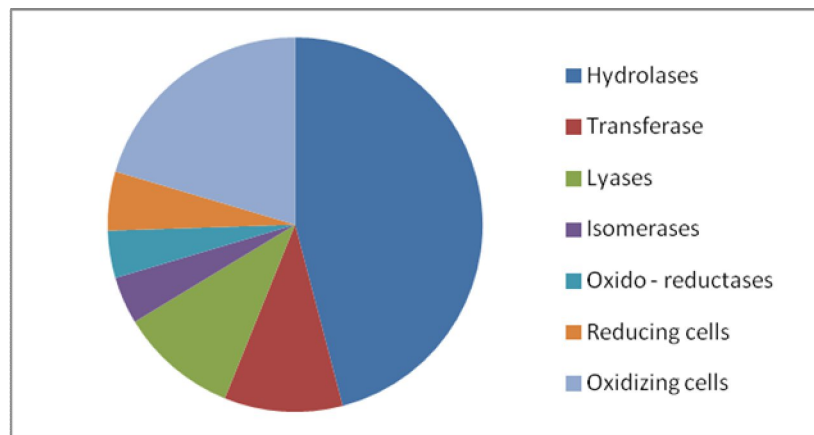
Além das aplicações industriais, o uso de enzimas possui elevada relevância em análises clínicas e química, biomedicina e pesquisa, pois devido a sua especificidade e sensibilidade, tornaram-se ferramentas analíticas potentes na quantificação de substâncias em concentrações muito baixas. As enzimas também são cada vez mais utilizadas no tratamento dos resíduos sólidos e biorremediação. O tratamento biológico dos resíduos ocorre tanto por processos aeróbicos quanto anaeróbicos. As enzimas podem ser aplicadas na remoção de produtos químicos contidos em resíduos ou efluentes industriais por remoção de poluentes insolúveis (L'OPEZ et al., 2004). Como estratégia em biorremediação, a aplicação de enzimas apresentam aspectos vantajosos em relação à biorremediação química ou microbiana, como apresentar menor toxicidade e serem biodegradáveis (SUTHERLAND et al. 2004). Por outro lado, os elevados custos de produção de enzimas tem sido um aspecto negativo na aplicação desses biocatalizadores em larga escala (ALCALDE et al., 2006).

A biocatálise ou biotransformação envolve processos em que um catalisador biológico é utilizado na conversão de um substrato (composto orgânico) a partir de etapas enzimáticas. Para um processo de biocatálise eficaz, é necessária a análise detalhada de fatores que condicionam integralmente o desenvolvimento e a otimização de um processo biotecnológico (ILLANES, 2008).

Com a identificação de novas enzimas, a biocatálise ampliou os seus horizontes, sendo também aplicada na indústria farmacêutica, na proteção ambiental e na biorremediação. Com as preocupações ambientais, as reações catalisadas por



enzimas são cada vez mais estudadas para substituir os métodos tradicionais de síntese química, sendo as hidrolases a classe de maior aplicabilidade (Figura 1.3.2). Comparando os dois processos, as reações catalisadas por enzimas geram menos produtos secundários devido à elevada seletividade e especificidade e produzem resíduos ambientalmente seguros (VENTURA et al, 2008).



Fonte: STRAATHOF, 2002

**Figura 1.3.2** Enzimas utilizadas em biocatálises

A baixa estabilidade das enzimas no meio reacional é um fator preocupante em processos industriais. A estabilidade é determinante para a obtenção de elevadas taxas de conversão (BON et al., 2008).

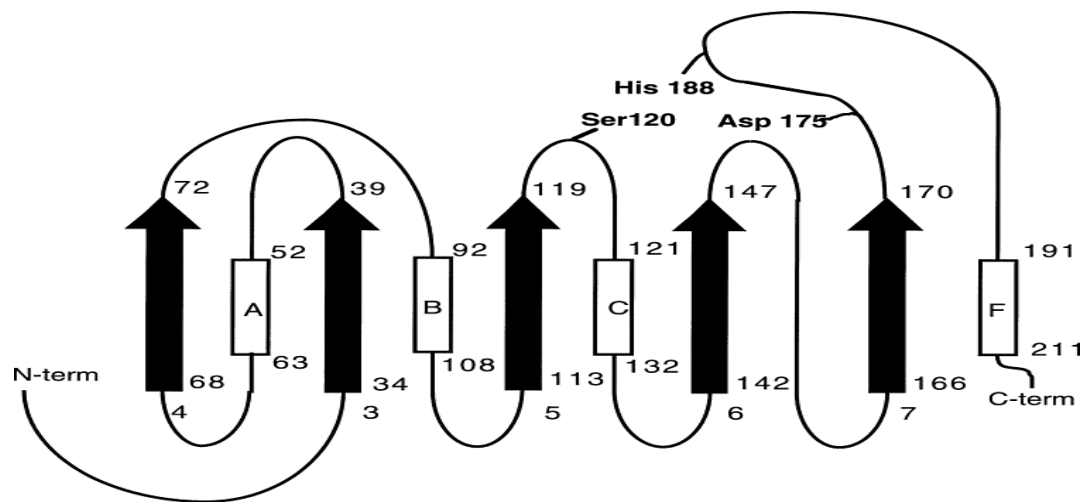
### 1.3.3 Cutinases

As hidrolases constituem uma classe de enzimas que catalisa a reação de hidrólise de várias ligações covalentes. Compreendem uma diversidade de enzimas, cujas atividades dependem principalmente de uma tríade catalítica formada por resíduos de serina (Ser), asparagina (Asp) e histidina (His) (SHEN, 2010). Possuem inúmeras aplicações, desde aplicações em detergentes até a resolução de misturas racêmicas para produção de fármacos quirais de grande importância na indústria farmacêutica (LIN et al., 2006; CHAUBEY et al., 2006; FERNANDEZ et al., 2006; SOETAN et al., 2010).

Dentre as hidrolases, as esterases catalisam reações que envolvem ligação éster. São enzimas que não utilizam cofatores e que geralmente possuem elevada estabilidade e, segundo representações de cinética de Michaelis-Menten,

necessitam de uma mínima concentração de substrato para atingir elevada atividade (BORNSCHEUER, 2002).

As cutinases são esterases que contem uma estrutura protéica compacta com 197 resíduos de aminoácidos e apresentam a tríade catalítica composta por Ser120, His188 e um grupo carboxil de Asp175, típica das hidrolases (Figura 1.3.3). Também são caracterizadas por apresentar cinco cadeias  $\beta$ , quatro hélices e núcleo hidrofóbico. Na estrutura proteica das cutinases há resíduo triptofano (Trp69) que está localizado próximo a uma ponte dissulfeto (Cys31-Cys109) (EGMOND, DE-VLIEG, 2000).



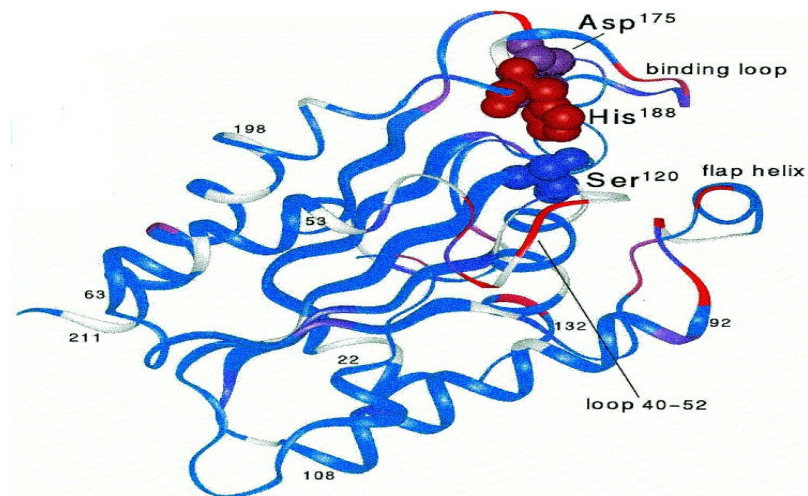
Fonte: ENGMOND, DE-VLIEG, 2000

**Figura 1.3.3** Estrutura de cutinase apresentando a tríade catalítica (Ser120, Asp175 e His188), em conjunto com cinco cadeias beta (setas pretas) e quatro hélices (A, B, C e F)

Métodos de cristalografia e de engenharia de proteínas utilizados para definir a estrutura das enzimas, tornaram possível o esclarecimento do mecanismo de ação das cutinases. A partir dessas ferramentas, foi possível compreender as relações entre estrutura e função de cutinase cujos estudos tem auxiliado na aplicabilidade da enzima (EGMOND, DE-VLIEG, 2000).

O grupo das cutinases é composto por cerca de 20 membros. Em todas serina-hidrolases, o sítio ativo está invariavelmente localizado na extremidade C-terminal de uma das cadeias  $\beta$ . O sítio catalítico das cutinases não é protegido por alça helicoidal anfipática, presente nas lipases. Por outro lado, em algumas cutinases, há a presença de um sítio de conformação que abre e fecha, característica típica das lipases. Esse movimento de “mini-tampa” das cutinases

coabrindo o sítio ativo é responsável por sua adaptação a diferentes solventes (MELO, 2003). A figura 1.3.4 ilustra uma representação tridimensional da estrutura protéica de uma cutinase onde estão diferenciadas a área móvel e a área rígida do sítio ativo, além de resíduos de aminoácidos específicos para a catálise. Ressalta-se a ausência da ativação interfacial detectada no comportamento catalítico das cutinases (BRORREGUERO et al., 2001).



Fonte: ENGMOND, VLIEG, 2000

**Figura 1.3.4** Estrutura 3D de uma cutinase mostrando acessibilidade da região sítio ativo. A região em vermelho corresponde à área móvel e em azul, a área rígida. Os sítios com resíduos de aminoácidos específicos para a catálise estão indicados na cor branca

As cutinases são consideradas enzimas versáteis por demonstrarem atividade hidrolítica sobre uma grande variedade de ésteres, desde ésteres sintéticos solúveis, como p-nitrofenil ésteres, a triglicerídeos insolúveis de cadeia longa, como trioleína e tricaprilina, bem como triacilgliceróis emulsificados (EGMOND, DE-VLIEG, 2000). A maioria dos estudos em biocatálise por cutinases tem se concentrado na degradação de poliésteres e na esterificação ou transesterificação de pequenas moléculas. A atividade esterásica da cutinase tem sido investigada em produtos e processos industriais (PIO et al., 2008).

As cutinases têm sido aplicadas na composição de detergentes de roupas e louças. Quando comparada com uma lipase comercial para remoção de gordura no processo de lavagem, as cutinases apresentam vantagens, pois a enzima tem a propriedade de hidrolisar gorduras na ausência do cálcio. As cutinases podem

também ser utilizadas na síntese de surfactantes, produtos de higiene pessoal, triglicerídeos, polímeros, fármacos e agroquímicos (PIO et al., 2008).

O uso de enzimas como lipases e cutinases no processo de tratamento da superfície de fibras têxteis tem mostrado melhora na hidrofiliabilidade de poliésteres através da hidrólise de ligações éster (VERTOMMEN et al., 2005). As cutinases também têm apresentado outras propriedades, como remover mancha de gordura em tecidos, modificar a superfície de fibras sintéticas de poliéster e poliamida, melhorar a aderência de líquidos nas fibras de algodão (SILVA et al., 2005; DEGANI, GEPSTEIN, DOSORETZ, 2002).

Na indústria alimentícia, as cutinases tem mostrado eficiência em reações de esterificação de ácido ferúlico com 1-octanol, realizadas a partir da aplicação de cutinase de *Fusarium solani pisi* (STAMATIS, SERETI, KOLISIS, 1999). Carvalho et al. (1997) aplicaram a cutinase recombinante de *Fusarium solani pisi* em micelas reversas de bis (2-etil-1-hexil) sulfosuccinato de sódio (AOT) / isooctano, obtendo hexil acetato, um éster de cadeia curta com aroma de fruta.

Inseticidas organofosforados, utilizados no controle de pragas na agricultura e no tratamento de parasitas na pecuária, são compostos que permanecem no ambiente, principalmente em formas lipídicas. Possuem a capacidade de serem absorvidos por praticamente todas as vias, incluindo o trato gastrointestinal, pele, membranas mucosas e pulmões, causando danos à saúde (PIO et al., 2008).

Estudos realizados na biodegradação destes inseticidas utilizando cutinase de *Fusarium oxysporum* e esterase de levedura apresentaram resultados significativos. A porcentagem de degradação do inseticida pela cutinase foi cerca de 60% da quantidade inicial durante os primeiros 30 min e cerca de 50% foi decomposto nos primeiros 15 min (KIM et al., 2006).

No setor industrial de óleos e gorduras, diversos processos para manipulação da composição das misturas de triglicerídeos têm sido realizados. Apesar das lipases terem sido as enzimas mais utilizadas neste segmento, as cutinases possuem também considerável potencial por hidrolisar os ácidos graxos de cadeia curta (BADENES et al., 2010).

### **1.3.4 Produção microbiana de enzimas**

No início da década de 1960, estudos de produção de enzimas por microorganismos foram iniciados e atualmente, esses metabólitos representam quase

90% do utilizado no mercado (ILLANES, 2008). Os micro-organismos são excelentes produtores de enzima por serem versáteis, possuírem metabolismo robusto e facilidade de crescimento em larga escala por cultivo submerso ou sólido. Essas características têm implicações tecnológicas relevantes, fazendo com que a produção de microbiana de enzimas torne o processo simples e de baixo custo, independente de produtos secundários.

As enzimas podem ser obtidas através de cultivo submerso, a partir de micro-organismos que apresentam elevada cinética de crescimento, com densidades celulares e níveis de expressão elevados, o que facilita a recuperação do biocatalisador.

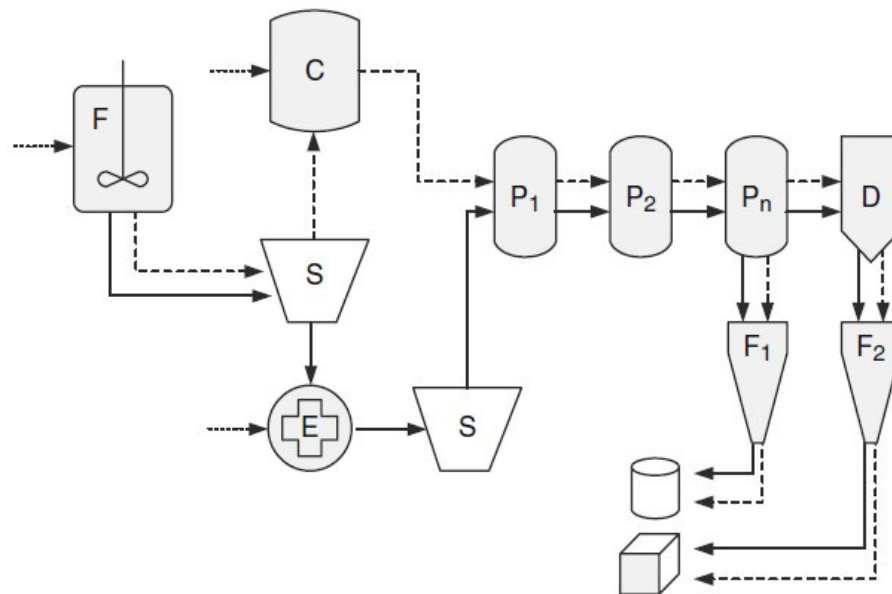
A maioria das enzimas é produzida por organismos mesófilos. No entanto, o potencial das enzimas produzidas por micro-organismos extremófilos tem estimulado pesquisas em busca de enzimas adaptadas à aplicação em condições extremas: estáveis a altas temperaturas e ativas sob temperaturas baixas (DE MIGUEL-BOUZAS, et al. 2006). Ainda que os extremófilos sejam de difícil manipulação em laboratório, os seus genes podem ser clonados em hospedeiros mesófilos adequados, como no caso da clonagem de genes de enzimas termofílicas de archaea (BERTOLDO, ANTRANIKIAN, 2002).

Avanços na genética molecular e engenharia genética nas últimas décadas tornaram possível clonar e expressar qualquer gene num micro-organismo hospedeiro adequado. A partir desse processo, enzimas de outros micro-organismos e de organismos superiores podem ser produzidas em hospedeiros microbianos convenientes como bactérias, leveduras e fungos. Este fator tem contribuído significativamente com o aumento da quantidade de enzimas que podem ser produzidas por cultivo microbiano e também no aumento da produtividade da fermentação e da qualidade do produto enzimático. Essa proporção deve ter aumentado significativamente durante a última década por causa dos avanços na tecnologia de DNA recombinante e na tecnologia da engenharia de proteínas e também por causa do aumento da produção de enzimas especiais para as indústrias farmacêuticas e de química fina. Por exemplo, a produção de proteases alcalinas para detergentes fez uso extensivo das ferramentas da engenharia genética e de proteínas para construir proteases projetadas especificamente para agir de forma eficiente sob condições extremas de lavagem (MAURER, 2004).

O tipo de aplicação de enzimas pode definir o tipo de processo para a sua produção. Enzimas podem ser produzidas para diversas aplicações, de processos industriais a aplicações em pequena escala em pesquisas (THOMAS et al., 2002). Enzimas especiais para uso farmacêutico, por exemplo, são produzidas em quantidades relativamente pequenas e com elevado grau de pureza, enquanto que as enzimas utilizadas na produção de alimentos, no tratamento de tecidos e combustíveis são geralmente extratos brutos, produzidos em larga escala. Enzimas microbianas podem ser produzidas por fermentação e recuperadas a partir do líquido metabólico (enzimas extracelulares) ou a partir do extrato celular originado da ruptura celular (AEHLE, 2003).

Os processos realizados para obtenção de metabólitos compreendem o tratamento da matéria-prima, preparação dos meios de produção, esterilização e a síntese enzimática, representada pela fase de reprodução das células produtoras, além dos processos de separação (extração da enzima a partir do meio de produção), purificação (remoção de contaminantes indesejados) e formulação do produto enzimático (operações finais de estabilização) (Figura 1.3.5). A produção de enzimas em larga escala ocorre tanto em cultivos submersos quanto em cultivos no estado sólido (BON et al., 2008).

Enzimas microbianas produzidas por fermentação sob condições controladas envolvem parâmetros operacionais, pH, temperatura, aeração e agitação que são rigidamente controlados (EUROPEAN COMMISSION, 2002). A fermentação submersa é o processo mais relevante na produção de enzimas microbianas, embora a fermentação em estado sólido a partir de fungos filamentosos também apresenta potencial.



Fonte: Illanes, 2008

**Figura 1.3.5** O fluxograma mostra etapas convencionais utilizadas em processos biotecnológicos para obtenção de enzimas. F: fermentação; S: separação sólido-líquido, E: extração de células; C: concentração; P<sub>i</sub>: operações de purificação; D: secagem; F<sub>i</sub>: formulação; ----->: enzima extracelular; —>: enzima intracelular; ----->: fluidos celulares.

O cultivo submerso foi desenvolvido após a Segunda Guerra Mundial para produção industrial de antibióticos e desde então tem representado a área mais relevante da engenharia de bioprocessos. Essa tecnologia, desenvolvida e automatizada tem sido utilizada na produção da maior parte das enzimas industriais (EL-MANSI et al., 2007). O cultivo submerso pode ser realizado em diferentes modos de operação. O método mais tradicional é a fermentação em biorreator, onde o mesmo é preenchido com o meio de cultivo e os micro-organismos são inoculados e incubados sob condições controladas. Nesse processo, quando o produto é sintetizado, as células são separadas para a recuperação da enzima (intracelular), ou então toda a biomassa é descartada e o meio contendo a enzima extracelular é recuperado (ILLANES, 2008).

### 1.3.5 Ultrafiltração

A baixa concentração de enzimas dispersas no líquido metabólico livre de células representa uma das desvantagens na produção de enzimas, visto que a concentração do bioproduto tem impacto no custo de produção fina. Mesmo sob

condições ótimas de crescimento celular, a concentração de proteína raramente ultrapassa algumas gramas por litro (LIU et al., 2000), de modo que o líquido metabólico contendo a enzima geralmente é concentrado antes de processos de purificação ou formulação.

Muitas das operações utilizadas na concentração de enzima têm potencial para purificação. A operação mais relevante para a concentração de enzima é de ultrafiltração, que consiste numa operação de filtração por membrana, onde a diferença de pressão através da membrana é a força motriz. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho (1.000 a 100.000 Da), de modo que abrange a maior parte das enzimas. Apesar do potencial de purificação, a ultrafiltração tem sido utilizada principalmente para concentrar enzimas por remoção de solvente (água) e solutos de pequeno tamanho (ILLANES, 2008).

Membranas de ultrafiltração são feitas de materiais diferentes (poliamida, poliacrilonitrila, polisulfona, dentre outros) desde que apresentem estabilidade, resistência mecânica e compatibilidade química. O coeficiente de rejeição também é outro fato relevante, pois ele determina a fração da concentração de soluto (proteína) que é retida pela membrana.

A ultrafiltração é um processo suave e, portanto, a inativação de enzimas é mínima. Porém, a polarização de concentração (acumulação de proteínas próximo da membrana) constitui um fator negativo na estabilidade das enzimas. O aumento da concentração da proteína pela membrana estabelece um gradiente que promove a difusão contrária da proteína para fora da superfície da membrana (GOOSEN et al., 2005). Para minimizar a concentração e evitar a polarização, é importante reduzir a espessura da película para limpar os depósitos. Baixas concentrações de proteína e baixo fluxo são também aconselháveis.

O grau de pureza das enzimas comerciais depende do tipo de aplicabilidade e varia de preparações enzimáticas brutas até altamente purificadas. A ultrafiltração é utilizada para concentrar, purificar e fracionar soluções que contem macromoléculas, proporcionando estabilização de atividade enzimática. Nesse processo, a filtração tangencial sob pressão, possibilita a permeabilidade de moléculas de solventes e solutos de menor tamanho através dos poros da membrana, enquanto outras moléculas ou partículas maiores são retidas. O diâmetro dos poros dessas membranas encontram-se na faixa entre 0,05  $\mu\text{m}$  e 1 nm. (RODRIGUES, et al., 2003).



### 1.3.6 Formulação de enzima

A estabilidade enzimática indica a manutenção da atividade catalítica por um determinado período. Sob a influência de alguns fatores, como a temperatura e o pH, as enzimas podem sofrer modificações estruturais e posterior inativação ou desnaturação. As enzimas com aplicações tecnológicas devem ser estáveis sob condições de armazenamento e operacionais por um longo período de tempo (CHANOTAKIS, 2003). Agentes, como o glicerol e a sacarose tem sido adicionados a líquidos metabólicos com atividade enzimática visando à estabilização de enzimas industriais. Substâncias similares a esses polióis, como sorbitol e xilitol, podem também preservar a atividade de enzimas (CARNEIRO, 2003).

Alguns procedimentos são fundamentais para formulação dos extratos enzimáticos. Para a manutenção da conformação nativa do biocatalisador e de sua atividade, além de agentes estabilizantes, devem ser adicionados conservantes microbiológicos, produtos microbiostáticos inibidores de crescimento microbiano, ou microbicidas, tornando o líquido metabólico viável comercialmente e aplicável em setores industriais.

Após a etapa de purificação, o processo de formulação é um passo crucial na produção de enzimas, especialmente no caso de enzimas industriais, uma vez que é geralmente essa etapa da produção que confere vantagem competitiva ao produtor.

Formulação de enzima inclui operações de tratamento final, estabilização e normalização. O tratamento final refere-se à eliminação de contaminantes não removidos previamente. Para enzimas industriais, nesse processo a remoção dos sais e o ajuste de pH, são considerados se a enzima é produzida no estado líquido.

A estabilização é um fator relevante na produção de enzimas, já que o produto deve resistir às condições de armazenamento e transporte, sem perdas significativas de atividade. Enzimas em estado líquido podem perder 10-20% da sua atividade durante um período de 4-6 meses em temperatura ambiente, portanto o armazenamento refrigerado é recomendado para aumentar a sua vida de prateleira.

Aditivos químicos também são utilizados para aumentar a estabilidade da enzimas durante o armazenamento e sob condições operacionais. Esses compostos possuem a finalidade de prevenir a contaminação microbiana e/ou preservar a estrutura da enzima. A contaminação microbiana é um problema em enzimas no

estado líquido, bem como a ação de proteases as quais podem degradar a enzima de forma considerável.

A filtração e a adição de conservantes são alternativas para garantir a qualidade microbiológica da enzima, impedindo a deterioração. No entanto, a questão-chave para a estabilização de enzima é a preservação da conformação da cadeia protéica para impedir a agregação, desdobrando qualquer alteração prejudicial na estrutura tridimensional nativa da enzima. Proteínas são mais estáveis em soluções concentradas e com força iônica elevada. Alguns sais neutros podem atuar como estabilizantes por promover interações hidrofóbicas da molécula de enzima, enquanto que os outros podem promover efeitos caotrópicos que desestabilizam a estrutura da proteína (CHANIOTAKIS, 2004).

Alguns cátions que fazem parte do sítio ativo podem agir como estabilizadores, como  $Mg^{++}$ ,  $Co^{++}$  e  $Ca^{++}$ . Polióis de baixo peso molecular, tais como glicerol e sorbitol e açúcares também podem atuar como estabilizadores de redução da atividade de água e prevenção de desdobraimento da proteína (JOO et al., 2005). O glicerol também pode ser utilizado para proteger contra a desnaturação em baixas temperaturas.

### **1.3.7 Polímeros**

Polímeros são macromoléculas compostas de uma quantidade variável (dezenas ou centenas de milhares) de unidades repetidas, ligadas covalentemente por monômeros. Esses compostos possuem elevada massa molar e podem ser classificados de diversas maneiras: quanto à obtenção (naturais ou sintéticos), quanto à função química (poli-hidrocarbonetos, policarbonatos, poliésteres, etc.), quanto à resistência mecânica (plásticos, fibras, borrachas e resinas) e quanto à aplicação tecnológica (termoplásticos e termorrígidos). A classificação dos polímeros também depende do tipo e do número médio de monômeros na cadeia, além da forma da ligação covalente (CANEVAROLO-JR, 2006).

Os polímeros sintéticos orgânicos são basicamente formados por hidrocarbonetos insaturados, derivados do petróleo, como o etileno e o propileno. O primeiro polímero sintético, o polifenol, foi produzido em 1907 por Leo Baekeland, nos USA. Diversas macromoléculas foram sintetizadas em todo o mundo, tornando os polímeros um material onipresente em nosso cotidiano. No século XX, os

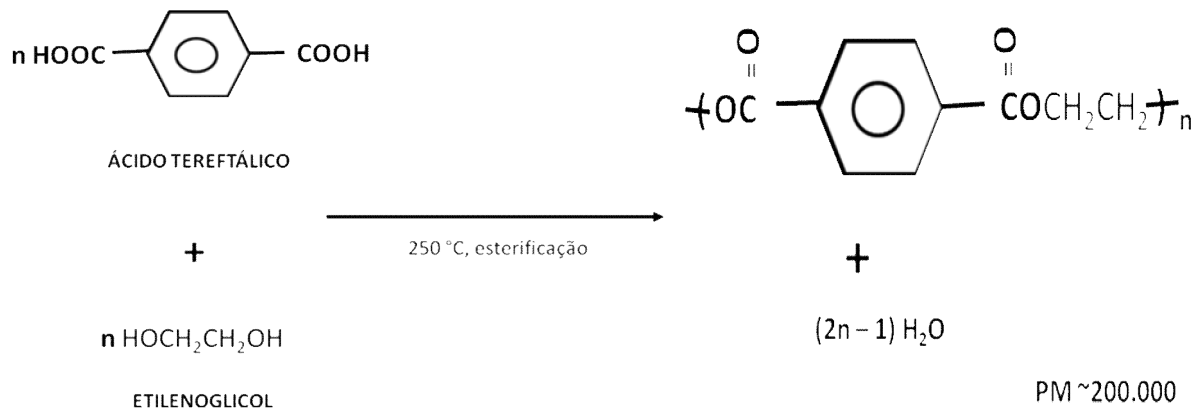
polímeros sintéticos (plásticos, as borrachas e fibras sintéticas) passaram a ser produzidos em larga escala (MANO, 2004).

A reação de polimerização que dá origem a esses materiais, em geral, é classificada em: condensação e adição. Na reação por condensação, cada etapa do processo elimina uma molécula de uma substância simples, geralmente a água. Na reação por adição, os monômeros reagem para produzir um polímero, sem ocorrer a formação de subprodutos (MARINHO, 2005). As reações por adição são conduzidas na presença de catalisadores, exercendo controle sobre a estrutura da molécula, proporcionando efeitos nas propriedades do polímero. As poliamidas, como o Nylon, os poliuretanos e os poliésteres, como o politereftalato de etileno (PET) são polímeros obtidos por condensação. Exemplos de polímeros obtidos por reação de polimerização por adição: polietileno (PE), policloreto de vinila (PVC), poliestireno (PS) (MANO, 2004).

Os polímeros plásticos apresentam-se sólidos como produtos finais e podem ser inseridos na categoria dos termoplásticos que são materiais que, sob a ação do calor, podem ser moldados a quente, tomando a forma definitiva após o resfriamento. Esse processo pode ser repetido diversas vezes, o que torna esse material reprocessável e também permite que esses materiais possam ser reciclados. Dentro do grupo dos termoplásticos, o PET possui elevado destaque (CANEVAROLO-JR, 2006).

As poliamidas, os poliésteres e o polipropileno são os plásticos mais utilizados para produção de fibras, tanto têxteis como de reforço. Para confecção de peças de vestuário, essas fibras podem ser transformadas em fios por processos de moldagem como a fiação por fusão, fiação seca ou úmida (MARINHO, 2005).

O PET é um poliéster, polímero termoplástico, obtido a partir de monômeros do etilenoglicol e o ácido tereftálico a partir de reações de condensação, gerando além do polímero, substâncias secundárias, como a água (Figura 1.3.6) (ABIPET, 2012).



**Figura 1.3.6** Reação de polimerização para produção de PET

Utilizadas principalmente por indústrias de refrigerantes e sucos, as garrafas PET movimentam hoje um mercado que produz cerca de 9 bilhões de unidades anualmente no Brasil, das quais 53% não são reaproveitadas. Com isso, cerca de 4,7 bilhões de unidades por ano são descartadas na natureza, poluindo rios, indo para lixões ou mesmo espalhadas por terrenos vazios. Entre 1995 e 2005, a produção de PET para fabricação de garrafas aumentou de 120 mil toneladas para cerca de 374 mil toneladas, devido principalmente à indústria de refrigerantes (ABIPET, 2012).

O PET possui elevada resistência mecânica e química, suportando o contato com agentes agressivos e por essas características, é utilizado na fabricação de garrafas e frascos para refrigerantes, águas, sucos, óleos comestíveis, medicamentos, cosméticos, além de fibras para a indústria têxtil, isolante elétrico, dentre outros (MARINHO, 2005).

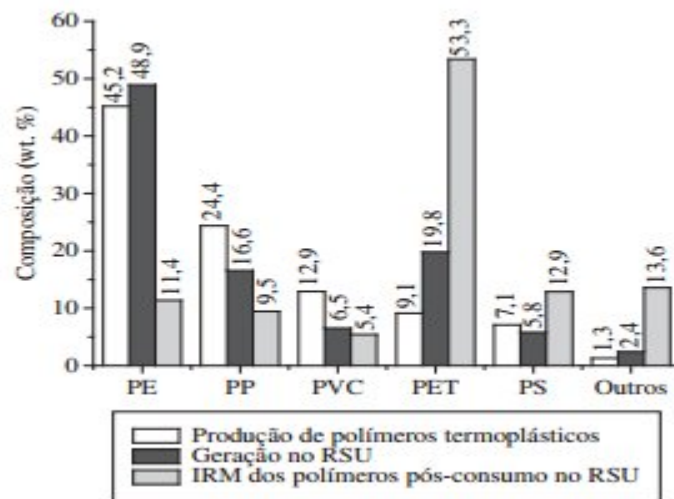
A partir da reação de esterificação, o ácido tereftálico e o etilenoglicol formam um prepolímero, o bis (2-hidroxietileno) (BHET). Em seguida, com a utilização de catalisadores (metal, óxido ou sal metálico), à temperatura de aproximadamente 280 °C, o BHET sofre reação de policondensação, originando o PET com massa molar média de 200.000 (MARINHO, 2005).

### 1.3.8 Degradação de plásticos

Na última década, a quantidade de plásticos tem aumentado substancialmente na composição de resíduos sólidos urbanos (RSU). Em 2005,

cerca de 20 % p/p dos RSU coletados no Brasil foram constituídos por esse material (PLASTIVIDA, 2008).

A figura 1.3.7 ilustra a produção de polímeros termoplásticos. De acordo com a referência, os plásticos de maior produção foram PE, PP, PVC e PET em ordem decrescente. Com relação à geração de resíduos sólidos, ficou constatado que o descarte no ambiente de PET atingiu cerca de 20 %. Logo, uma grande quantidade desse plástico tem sido responsável pela poluição ambiental e pelo acúmulo de resíduos sólidos nos aterros sanitários (ROMÃO et al., 2009).



Fonte: Romão, Spinace e Paoli(2009).

**Figura 1.3.7** Dados de produção nacional de polímeros termoplásticos, geração de RSU e índice de reciclagem mecânica (IRM) dos polímeros pós-consumo

O tempo médio de degradação de plásticos atinge cerca de 500 anos em média. Nesse ponto de vista, é necessário aperfeiçoar o processo de degradação a fim de diminuir o tempo de meia-vida desses compostos. A composição dos plásticos pode submeter-se à degradação química por exposição a algum agente agressivo: resíduos de catalisador, presença de oxigênio e/ou impurezas de monômeros, enquanto que a degradação física pode ser provocada por cisalhamento e/ou calor (DE PAOLI, 2008). Considerando que as degradações físico-químicas envolvem temperaturas e pressões elevadas, alternativas tem sido investigadas através do tratamento biológico por ação de enzimas.

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIPET – Associação Brasileira da Indústria do PET. Disponível em: <<http://www.abipet.org.br/index.html>>. Acesso em: 24 set 2012.

AEHLE, W. Enzymes in industry: production and applications. **Wiley-VCH**, 2003, 484 p.

ALCALDE, M.; FERRERA, M.; PLOU, F. J. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in biotechnology**, v. 24, p. 281–287, 2006.

ARTHAM, T.; DOBLE, M. Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. **Macromolecular Bioscience**. v.8, p. 14–24, 2008.

BADENES, S. M.; LEMOS, F.; CABRAL, J. M. S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. **Biotechnology Letters**. v.32, p. 399-403, 2010.

BERTOLDO, C.; ANTRANIKIAN, G. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p.151–160, 2002.

BHARGAVA, S.; WENGER, K. S.; RANE, K. Effect of cycle time on fungal morphology, broth rheology, and recombinant enzyme productivity during pulsed addition of limiting carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 89, p. 524–529, 2005.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, 506 p.

BORNSCHEUER, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 543–547, 2002.

BORREGUERO, I.; CARVALHO, C. M. L.; CABRAL, J. M. S.; SINISTERRA, J. V.; ALCÁNTARA, A. R. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2001. 613 p.

BRADY, D.; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**. v. 31, p. 1639-1650, 2009.

BRAIUCA, P.; EBERT, C.; BASSO, A.; LINDA, P.; GARDOSI, L. Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. **Trends Biotechnology**, v. 24, p. 419-425, 2006.

BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.info/>>. Acesso em: 27 abr 2012.

**CANEVAROLO-JR, S. V. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos engenheiros. São Paulo: Artliber Editora, 2006, 208 p.**

CARNEIRO, A. F. G. C. **Estabilização de enzimas para modificação de fibras sintéticas.** 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologias de Fabricação) – Universidade do Minho, 2003.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; KOUL, S.; TANEJA, S. C. Enantioselectivity modulation through immobilization of *Arthrobacter* sp. lipase: kinetic resolution of fluoxetine intermediate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, p. 39-44, 2006.

CHANOTAKIS, N. A. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 89–95, 2003.

DE MIGUEL BOUZAS, T.; BARROS-VELAZQUEZ, J.; GONZALEZ-VILLA, T. Industrial applications of hyperthermophilic enzymes: a review. **Protein and Peptide Letters**, v. 13, p. 645–651, 2006.

DE PAOLI, M. A. **Degradação e Estabilização de Polímeros.** 2008, 221 p.

DEGANI, O.; GEPSTEIN, S.; DOSORETZ, C. G. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 102-103, p. 277-289, 2002.

EGMOND, M. R.; DE-VLIEG, J. *Fusarium solani pisi* cutinase. **Biochimie**, v. 82, 11, p.1015–1021, 2000.

EIJSINK, V. G. H.; BJORK, A. G.; ASEIDNES, S. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 105–120, 2004.

EL-MANSI, E. M. T.; BRYCE, C. F. A; DEMAIN, A.L. **Fermentation microbiology and biotechnology**, 2007, 552 p.

EUROPEAN COMMISSION. **Final Report: Collection of information on enzymes.** European Commission. Contract n° B4-3040/2000/278245/MAR/E2. Co-operation between the Federal Environment Agency Austria and Inter-University Research Center for Technology, Work and the Culture, Austria, 2002.

FERNANDEZ, G. V.; BRIEVA, R.; GOTAU, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

GASEIDNES, S.; SYNSTAD, B.; NIELSEN, J. E. Rational engineering of the stability and the catalytic performance of enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 3–8, 2003.

GOOSEN, M. F. A.; SABLANI, S. S.; AL-HINAI, H. Fouling of reverse osmosis and ultrafiltration membranes: a critical review. **Separation Science and Technology**, v. 39, p. 2261–2297, 2005.

GUEBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Enzymes go big: surface hydrolysis and functionalisation of synthetic polymers. **Trends in Biotechnology**. v. 26, n.1, p. 32–38, 2008.

ILLANES, A. **Enzyme Biocatalysis: principles and applications**. 2008, 398 p.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**. v. 43, n.10, p. 1019–1032, 2008.

JOO, H. S.; KOO, I. M.; CHO, J. W. Stabilization method of an alkaline protease from inactivation by heat, SDS and hydrogen peroxide. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 36, p. 766–772, 2005.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P. Optimization of submerged culture process for the production of mycelial biomass and exo-polysaccharides by *Cordyceps militaris* C738. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p.120–126, 2003.

KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017–1026, 2006.

LIN, E. S.; WANG, C. C.; SUNG, S .C. Cultivating conditions influence lipase production by the edible basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 98-102, 2006.

LIU, Y. C.; LIAO, L. C.; WU, W. T. Cultivation of recombinant *Escherichia coli* to achieve high cell density with a high level of penicillin G acylase. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China: B**, v. 24, p. 156–160, 2000.

LOPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A. Optimization of an industrial biocatalyst of glutaryl acylase: stabilization of the enzyme by multipoint covalent attachment onto new amino-epoxy Sepabeads. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 219–227, 2004.

MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. São Paulo: Edgard Blücher, 344 p., 2004.

MARINHO, J. R. D. **Macromoléculas e polímeros**. São Paulo: Manole, 506 p., 2005.

MAURER, K. Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**, 15:330–334, 2004.

MELO, E. P.; BAPTISTA, R. P.; CABRAL, J. M. S. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 299 p., 2003.



PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, P. A aplicação da biologia molecular na produção de enzimas. In: BON, Elba P. S.; FERRARA, Maria A.; CORVO, Maria L. **Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, p. 273-287, 2008.

PARALES, R. E.; LEE, K.; RESNICK, S. M.; Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 1641–1649, 2000.

PATEL, R. N. Microbial/enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 804-826, 2002.

PIO, T. A.; MACEDO, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. **Enzyme Microbial Technology**, v. 42, p. 613-619, 2007.

PIO, T. F.; FRAGA, L. P.; MACEDO, G. A.; KAMIMURA; E. S. Cutinases fúngicas: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, 2008.

RODRIGUES, S. L. C.; MOREIRA, R. L. S.; CARDOSO, M. H.; MERCON, F. Avaliação de parâmetros de ultrafiltração de suco de banana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, p. 98-101, 2003.

ROMÃO, W.; SPINACE, M. A. S.; PAOLI, M. Poli(tereftalato de etileno), PET: uma revisão sobre os processos de síntese, mecanismos de degradação e sua reciclagem. **Polímeros**. v. 19, p. 121-132, 2009.

SOETAN, K. O.; AIYELAAGBE, O. O.; OLAIYA, C. O. A review of the biochemical, biotechnological and other applications of enzymes. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 382-393, 2010.

SHEN, H. C. Soluble epoxide hydrolase inhibitors: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 20, p. 941-956, 2010.

SILVA, C. M.; CARNEIRO, F.; O'NEILL, A.; FONSECA, L. P.; CABRAL, J. M. S.; GUEBITZ, G.; CAVACO-PAULO, A. Cutinase - A new tool for biomodification of synthetic fibers. **Journal of Polymer Science**. v. 43, p. 2448-2450, 2005.

STAMATIS, H.; SERETI, V.; KOLISIS, F. M. **Journal of American Oil Chemists' Society**. 1505 p., 1999.

STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 548–556, 2002.

SUTHERLAND, T. D.; HORNE, I.; WEIR, K. M. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 817–821, 2004.

THOMAS, S. M.; DICOSIMO, R.; NAGARAJAN, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 238–242, 2002.

VENTURA, M.M.; FREITAS, S.M.; FREIRE, A.P., Catálise enzimática – Alguns destaques na evolução da enzimologia. In: BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia – Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 506 p., 2008.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D’AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BOM, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, Elba P. S.; FERRARA, Maria A.; CORVO, Maria L. **Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, p. 273-287, 2008.

VERTOMMEN, M. A. M. E.; NIERSTRASZ, V. A.; VAN DER VEER, M.; WARMOESKERKEN, M. M. C. G. Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). **Journal of Biotechnology**. v. 120, p. 376-386, 2005.

VILLENEUVE, P.; MUDERWHA, J. M.; GRAILLE, J.; HASS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, p. 113, 2000.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2011, 1520 p.

## **CAPÍTULO II**

### **PRODUÇÃO DE CUTINASES HETERÓLOGAS POR *E. coli* E FORMULAÇÃO ENZIMÁTICA PARA APLICAÇÃO NO DEGRADAÇÃO DE PLÁSTICO\***

Daniela Silva Gomes<sup>1</sup>  
Maria Teresa Gonçalves de Macedo Matamá<sup>2</sup>  
Artur Cavaco-Paulo<sup>2</sup>  
Galba Maria de Campos Takaki<sup>1</sup>  
Alexandra Amorim Salgueiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP  
Rua Nunes Machado, 42, Boa Vista, 50050-590, Recife – PE, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Engenharia Biológica  
Universidade do Minho - UMINHO  
4700 Braga, Portugal

\*Manuscrito aceito para publicação na Revista Electronic Journal of Biotechnology  
(Anexo I)

## 2.1 RESUMO

A ação hidrolítica de cutinases tem sido utilizada na degradação de materiais plásticos. O politereftalato de etileno (PET) possui elevado tempo de meia-vida em relação ao tratamento de resíduos sólidos urbanos. O objetivo deste trabalho foi de produzir cutinases por *Escherichia coli* geneticamente modificadas, caracterizar e formular essas enzimas, melhorando o tratamento de materiais plásticos. A atividade máxima de cutinases foi de 1,4 UI/mL, produzidos por cultivo submerso em meio LB, na presença de ampicilina e isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). As cutinases obtidas apresentaram pH ótimo 7,0 e estabilidade térmica a 30-50 °C, durante 90 min. A adição de glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  no líquido metabólico, concentrado por ultrafiltração, estabilizou a atividade da enzima durante 60 dias, a 28 °C. No tratamento de PET, durante o período de 48 h, as cutinases conduziram à perda de peso máxima de 0,90%. Cutinases microbianas recombinantes são uma alternativa para aplicação no tratamento biológico de materiais plásticos.

**Palavras-chave:** cutinases; politereftalato de etileno; aplicação ambiental.

## 2.2 ABSTRACT

The hydrolytic action of cutinases has been applied to the degradation of plastics. Polyethylene terephthalate (PET) have long half-life which constitutes a major problem for their treatment as urban solid residues. The aim of this work was to accelerate their degradation using enzymatic hydrolysis by recombinant cutinases. The wild type form of cutinase from *Fusarium solani pisi* and its C-terminal fusion to cellulose binding domain N1 from *Cellulomonas fimi* were produced by genetically modified *Escherichia coli*. The maximum activity of cutinases produced in Lactose Broth in the presence of ampicillin and isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was 1.4 IU/mL. Both cutinases had an optimum pH around 7.0 and they were stable between 30 and 50 °C during 90 min. The addition of glycerol, PEG-200 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to the metabolic liquid, concentrated by ultrafiltration, stabilized the activity during 60 days at 28 °C. The treatment of PET with cutinases during 48 h led to maxima weight loss of 0.90 %. Recombinant microbial cutinases may present advantages to plastic disposal through biological treatments.

**Keywords:** cutinases, poly(ethylene terephthalate), environmental applicattions.

## 2.3 INTRODUÇÃO

As cutinases (EC 3.1.1.74) são enzimas versáteis por demonstrarem várias propriedades para aplicação em produtos e processos industriais. Esses biocatalisadores apresentam atividade hidrolítica sobre vários ésteres, desde ésteres sintéticos solúveis a triglicerídeos insolúveis de cadeia longa, como trioleína e tricaprilina, bem como triacilgliceróis emulsificados (Egmond e De-Vlieg, 2000).

A maioria dos estudos em biocatálise por cutinases tem se concentrado na degradação de poliésteres e outros polímeros e na esterificação ou transesterificação de pequenas moléculas. Por exemplo, novas cutinases de *Thermobifida fusca* (Thf42\_Cut1) e *Thermobifida cellulolysitica* (Thc\_Cut1 e Thc\_Cut2) foram clonadas, caracterizadas e as propriedades cinéticas de hidrólises de PET foram comparadas. Correlações semelhantes foram determinadas entre essas enzimas para os parâmetros cinéticos na presença de substrato solúvel, para os produtos de hidrólise de PET e para o grau de hidrofilização de PET (Acero et al. 2011).

A ferramenta de clonagem da genética molecular foi também utilizada para construção de cutinases quiméricas por fusão do domínio catalítico com um módulo de ligação em carboidratos (CBM). Essa estratégia resultou em aumento da concentração de enzima na superfície do substrato (Boraston et al. 2004). Construções de genes foram obtidas usando CBM distintos, fundidos de forma independente para o C-terminal da cutinase. A CBM do tipo B da endoglucanase C a partir de *Cellulomonas fimi*, é capaz de se ligar à celulose amorfa e foi selecionada com base na afinidade do substrato. Os resultados obtidos demonstraram a hidrólise do substrato e um aumento da reatividade e hidrofilicidade nas fibras de celulose que apresentaram maior absorção de corante reativo em tecidos tratados quando comparadas com as fibras tratadas por cutinase nativa (Matamá et al. 2009).

As caracterizações enzimáticas de pH ótimo e temperatura ótima, bem como de estabilidades ao pH e térmica durante o tempo de reação, apresentam elevada importância quanto à aplicação de bioprodutos com atividade catalítica. Além desses parâmetros, a adição de substâncias químicas na formulação de produtos aumenta e/ou estabiliza a atividade enzimática durante o armazenamento e condições operacionais de processos biotecnológicos são fundamentais na comercialização de enzimas (Vermelho et al. 2008).

Os polímeros plásticos possuem elevada versatilidade e aplicabilidade no mercado. O politereftalato de etileno (PET) são termoplásticos que foram produzidos em larga escala no século XX (Mano, 2004; Canevarolo-Jr, 2006). As garrafas PET movimentam no Brasil, um mercado de 9 bilhões de unidades/ano, sendo mais de 50% descartadas na natureza por não serem reaproveitadas (ABIPET: <http://www.abipet.org.br/index.html>).

Na última década, a quantidade de polímeros plásticos tem aumentado exponencialmente na composição de resíduo sólido urbano. Estratégias para modificação estrutural e biodegradação são alternativas para redução do acúmulo desses polímeros. Por conseguinte, o objetivo deste trabalho foi produzir cutinases por *E. coli* recombinante e investigar condições de estabilidade da enzima para aplicação na degradação de PET.

## 2.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.4.1 Micro-organismos

Culturas de *E. coli* geneticamente modificadas, gentilmente cedidas pelo Prof Artur Cavaco-Paulo, a partir da Universidade do Minho - Portugal, foram utilizados para a produção das cutinases a seguir:

- tipo selvagem CUT de *Fusarium solani*;
- CUT-N1: cutinase de *F. solani* fundida ao CBM tipo B N1 de endoglucanase C de *Cellulomonas fimi*.

Estas culturas foram mantidas em Lysogeny Broth (LB) (1% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% NaCl a pH 7,0) e agar a 2%, suplementado com 100 µg/ml de ampicilina.

### 2.4.2 Produção de cutinases

Culturas de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 com 24 h de incubação foram inoculadas separadamente em frascos de Erlenmeyer com LB suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e incubadas sob agitação em orbital de 150 rpm, a 37 °C, durante 12 h. Esses inóculos a 0,1 % v/v foram utilizados para produção de cutinases por *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 em frascos de Erlenmeyer com LB

suplementado com ampicilina e mantidos sob as mesmas condições. As culturas foram induzidas pela adição de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ao atingirem uma absorbância em 600 nm ( $A_{600}$ ) igual a 0,6. Os sobrenadantes livres de células foram centrifugados a uma velocidade orbital de 5000 rpm durante 20 min, a 4 °C e utilizado para dosagem de cutinases e determinação de pH. Os cultivos submersos foram realizados em triplicata.

#### **2.4.3 Determinação da atividade enzimática**

A atividade de cutinases foi determinada em espectrofotômetro a 405 nm através da reação de hidrólise de p-nitrofenil butirato (p-NPB). Uma alíquota do sobrenadante livre de células (0,07 mL) foi adicionada a 3,43 mL da solução contendo 1,12 mM de p-NPB, tampão fosfato 50 mM pH 7,2, Triton X-100 0,2% e tetrahydrofurano 0,43 M (Pio et al. 2008).

Os cálculos de atividade de cutinases foram baseados no coeficiente de extinção do p-nitrofenol em 405 nm ( $15,1 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). Uma unidade internacional (UI) de cutinases foi definida como a quantidade de enzima necessária para converter 1  $\mu\text{mol}$  de p-NPB em p-nitrofenol (p-NP) por minuto. Todos os ensaios de atividade foram realizados em triplicata.

#### **2.4.4 Ultrafiltração**

Os sobrenadantes livres de célula foram submetidos à ultrafiltração para concentração por membrana filtrante plana (Pellicon XL - Millipore) com porosidade de 10 KDa sob pressão de 2,5 bar. A amostra foi separada em duas fases: retentado (concentrado) e permeado. O processo foi realizado no laboratório da Bioenzima Indústria e Comércio Ltda. Após o processo de concentração, conservantes microbiológicos (sorbato de sódio 0,25% e benzoato de sódio 0,25%) foram adicionados ao líquido metabólico concentrado.

#### **2.4.5 Efeitos de pH e temperatura na estabilidade de cutinases**

O pH ótimo para atividade das cutinases foi determinado no líquido metabólico concentrado e formulado na presença do substrato (p-NPB) em tampão fosfato 0,1 M (pH 6-8) e tampão glicina-NaOH (pH 9). Alíquotas foram retiradas para determinação de atividades de cutinases nos intervalos de 30, 60 e 90 minutos.



O extrato enzimático concentrado e formulado de cutinases, em pH ótimo, foi incubado em diferentes temperaturas, variando entre 30 e 70 °C. Alíquotas foram retiradas em 30, 60 e 90 min de incubação para determinação da estabilidade térmica.

Os ensaios de investigação de pH e temperatura foram realizados em triplicata. A determinação enzimática foi realizada conforme descrito anteriormente no item 2.4.3.

#### **2.4.6 Aplicação de cutinases engenheiradas**

O PET utilizado nos experimentos de tratamento foi processado industrialmente pela Coca Cola e descartado no ambiente.

As garrafas PET foram cortadas em partículas de 20 x 20 mm e submetidas a um pré-tratamento em solução de Tween - 80 a 2 % v/v, a 50 °C durante 1 h. Em seguida, foram lavadas em água destilada durante 1 h e submetidas à secagem em estufa à temperatura de 40 °C durante 24 h.

Os polímeros pré-tratados foram pesados e submetidos à radiação UV durante 1 h; 0,01 % de PET foram adicionados a uma solução contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,5 e 1 % do líquido metabólico concentrado e formulado com atividade de cutinases. As amostras foram incubadas em frascos de Erlenmeyer e submetidos a uma agitação orbital de 90 rpm a 37 °C, durante 48 h. Após o tratamento, as amostras foram lavadas em solução de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 2 g/L durante 2 h, com o objetivo de parar a reação enzimática. Em seguida, os polímeros foram lavados em solução de Tween-80 a 10 g/L, a 25 °C, durante 1 h e posteriormente lavados em água destilada (O'Neill e Cavaco-Paulo, 2004).

Após o processo de pré-tratamento, as amostras de PET foram secas em estufa (40 °C durante 24 h) e submetidos à pesagem.

#### **2.4.7 Formulação do líquido metabólico**

O planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com quatro repetições no ponto central foi utilizado para investigar a estabilidade da enzima, utilizando os produtos químicos glicerol, polietilenoglicol (PEG-200) e sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como os fatores (Tabela 1). Alíquotas foram retiradas com 0, 30 e 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente (28 °C) para determinação enzimática.

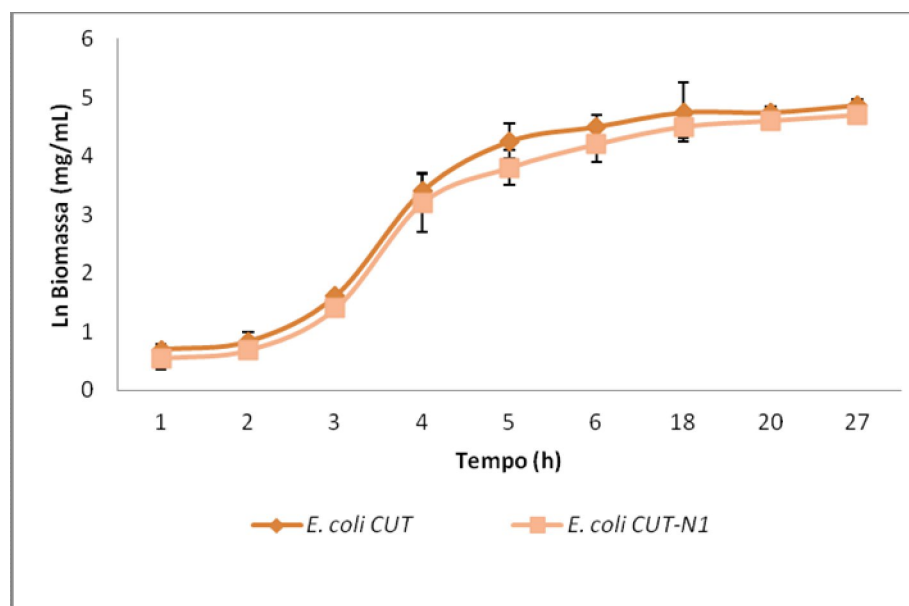
**Tabela 2.4.1. Fatores e níveis investigados na estabilização de cutinases (EC 3.1.1.74)**

Fatores (%)	Níveis		
	-	Ponto central	+
Glicerol	0	2,5	5
PEG-200	5	7,5	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	7,5	10

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1 Curva de crescimento microbiano

A figura 2.5.1 ilustra a curva de crescimento das culturas de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1, cultivadas na presença de lactose como fonte de carbono (meio LB) e ampicilina sob cultivo submerso. Na análise do comportamento dessas culturas, a fase de latência do crescimento microbiano foi observada durante as primeiras duas horas de cultivo. A curta duração dessa fase é justificada por essas culturas terem sido previamente inoculadas sob as mesmas condições físico-químicas com células na fase estacionária máxima (12 h).



**Fig. 2.5.1 Curva de crescimento celular das culturas de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 na presença do meio LB e ampicilina**

A fase exponencial de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 ocorreu entre 2 e 6 h de cultivo. A taxa de velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ), estimada pela inclinação máxima na fase exponencial de crescimento, foram iguais a  $1,3 \text{ h}^{-1}$  e  $1,2 \text{ h}^{-1}$ , para *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1, respectivamente. A maior produção de biomassa foi determinada na fase estacionária máxima, atingindo  $1,3 \text{ g/L}$  com 24 h de cultivo para as duas culturas de *E. coli* que apresentaram nas condições de trabalho, comportamento semelhante durante o cultivo submerso.

A literatura apresenta dados de cinética microbiana de *E. coli* modificadas geneticamente. Chaves (2009) avaliou parâmetros cinéticos de clones de *E. coli* recombinantes para expressão de antígenos de *Leishmania chagasi*. Nas análises de crescimento em meio de cultivo contendo triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio a pH 7, foram determinados valores de  $\mu_{\text{máx}}$  que variaram entre  $0,11$  e  $0,22 \text{ h}^{-1}$ . Nesse estudo, também foi observado que a fase de crescimento exponencial foi encerrada após 6 h de cultivo e a biomassa máxima obtida foi igual a  $3,14 \text{ g/L}$  com 24 h de cultivo. A produtividade de células atingiu  $0,13 \text{ g/L.h}$  cujo valor foi maior que  $0,05 \text{ g/L.h}$ , calculado para *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 neste trabalho.

O Efeito Crabtree pode justificar a baixa produção de biomassa obtida nos cultivos de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 quando o crescimento celular é inibido por liberação de proteínas heterólogas do metabolismo de culturas modificadas geneticamente. Um outro aspecto a ser considerado no crescimento dessas culturas modificadas geneticamente é o comportamento das células na presença de IPTG (item 2.5.2).

### **2.5.2 Efeitos da concentração de IPTG na produção de cutinases**

A tabela 2.5.1 ilustra a produção diferenciada de cutinases pelas culturas modificadas geneticamente de *E. coli* na presença de diferentes concentrações de IPTG, adicionadas no início da fase exponencial, com 3 h de cultivo (absorbância em  $600 \text{ nm} = 0,4-0,6$ ). As concentrações máximas de cutinases foram obtidas com 24 h de cultivo. As culturas de *E. coli* apresentaram comportamentos diferentes em relação a esse indutor investigado. A maior atividade de cutinases foi de  $1,4 \text{ UI/mL}$  por *E. coli* CUT-N1 na presença de  $0,2 \text{ mM}$  de IPTG, determinada com 24 h de cultivo submerso. A concentração de  $0,4 \text{ mM}$  desse indutor inibiu a produção de cutinases por essa cultura. *E. coli* CUT expressou no máximo  $0,7 \text{ UI/mL}$  de cutinases na concentração de  $0,2 \text{ mM}$  de IPTG.

A indução pelo IPTG foi eficiente para a cultura *E. coli* CUT-N1 que apresentou mais de 50 % da atividade na menor concentração investigada (0,2 mM). Por conseguinte, nesse trabalho, 0,2 mM foi a concentração de IPTG utilizada para a produção de cutinases pelas culturas de *E. coli* modificadas geneticamente.

**Tabela 2.5.1. Atividade de cutinases do líquido metabólico livre de células das culturas de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 sob cultivo submerso na presença de diferentes concentrações de IPTG**

<i>E. coli</i>	IPTG (mM)	Atividade de cutinases (UI/mL)					
		3 h	4 h	5 h	18 h	20 h	24 h
<i>E. coli</i> CUT	0,2	0,02	0,08	0,1	0,5	0,6	0,7
<i>E. coli</i> CUT-N1	0,2	0,06	0,3	0,4	0,8	1,2	1,4
<i>E. coli</i> CUT	0,4	0,01	0,06	0,1	0,4	0,5	0,6
<i>E. coli</i> CUT-N1	0,4	0,04	0,3	0,4	0,7	0,8	0,9

A diminuição da atividade de cutinases nos dois cultivos pode ser devido ao efeito tóxico do IPTG na concentração de 0,4 mM. A investigação da adição de indutores é uma variável importante no processo de produção de proteínas, especialmente em grande escala, uma vez que IPTG possui custo elevado e pode ser tóxicos para a célula (Einsfeldt, 2011). Pan et al. (2008) confirmaram que IPTG, utilizado para induzir a expressão de genes clonados, é um composto tóxico que em concentrações elevadas, reduzem drasticamente o crescimento celular em algumas culturas recombinantes de *E. coli*.

A indução de expressão de proteínas utilizando IPTG também é um fator que causa resposta de estresse na célula, podendo ocasionar a perda do plasmídeo que contém o gene recombinante de interesse (Sorensen e Mortensen, 2005). Kosinski e Bailey (1991) observaram a inibição temporária da proteína H35 durante a fase exponencial de crescimento, após a adição de IPTG a uma cultura de *E. coli*. Além disso, elevados níveis de expressão da proteína recombinante, utilizando IPTG como indutor também podem induzir a expressão de diversas proteases cuja atividade enzimática influencia no resultado da enzima expressa (Han e Lee, 2006).

Parekh e Patel (2012) avaliaram as concentrações de IPTG: 0,1, 0,5 e 1 mM durante 2, 4 e 6 h de indução da proteína Fcε-Bik por *E. coli* modificada geneticamente. O nível de expressão dessa proteína foi investigado por eletroforese em gel de poliacrilamida. A redução da expressão da proteína recombinante na

concentração de 1 mM de IPTG foi observada em comparação às outras concentrações do indutor.

### 2.5.3 Ultrafiltração de líquidos metabólicos

Os líquidos metabólicos livres de células das culturas de *E. coli* modificadas geneticamente foram concentrados duas vezes pelo processo de ultrafiltração (Tabela 2.5.2). A retenção de atividade de cutinase no bioproduto concentrado atingiu 93 % quando comparado com as amostras controle.

**Tabela 2.5.2. Atividade enzimática das fases concentrada de líquidos metabólicos**

Micro-organismo	Atividade enzimática (UI/mL)		Retenção de atividade (%)
	Controle	Concentrado	
<i>E. coli</i> CUT	0,7	1,3	93
<i>E. coli</i> CUT – N1	1,4	2,6	93

As atividades enzimáticas determinadas nos líquidos metabólicos concentrados foram aproximadamente o dobro das atividades das amostras controles. A massa molar média das cutinases é igual a 24 KDa e por conseguinte, apenas 7 % dessas enzimas atravessaram os poros da membrana de 10 KDa (UNIPROT: <http://www.uniprot.org/uniprot/P00590>). Logo, as atividades enzimáticas nos permeados foram baixas, atingindo 0,10 e 0,15 UI/mL nos cultivos de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1, respectivamente.

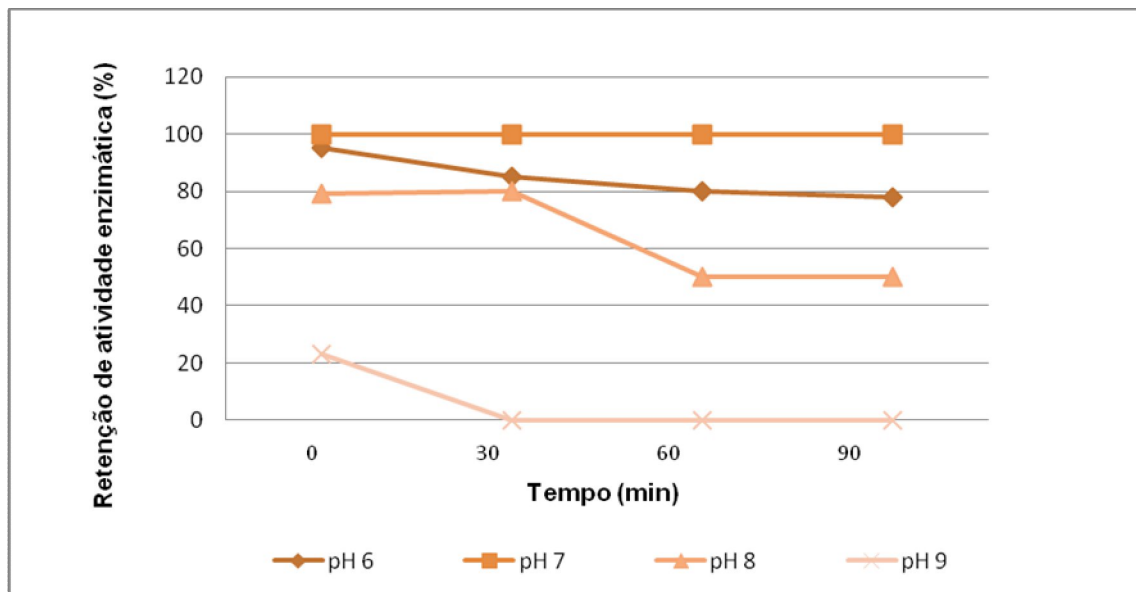
Não houve perda de atividade de cutinases no processo de ultrafiltração, isto é, a membrana de 10 KDa sob as condições de trabalho não reteve nenhuma substância essencial à atividade das enzimas. A adição dos conservantes microbiológicos ao líquido metabólico antes e após o processo de ultrafiltração também não influenciou a atividade enzimática.

A ultrafiltração por membrana utiliza força tangencial para impulsionar a passagem de substâncias através dos poros, ocasionando a passagem de moléculas maiores que o tamanho do poro.

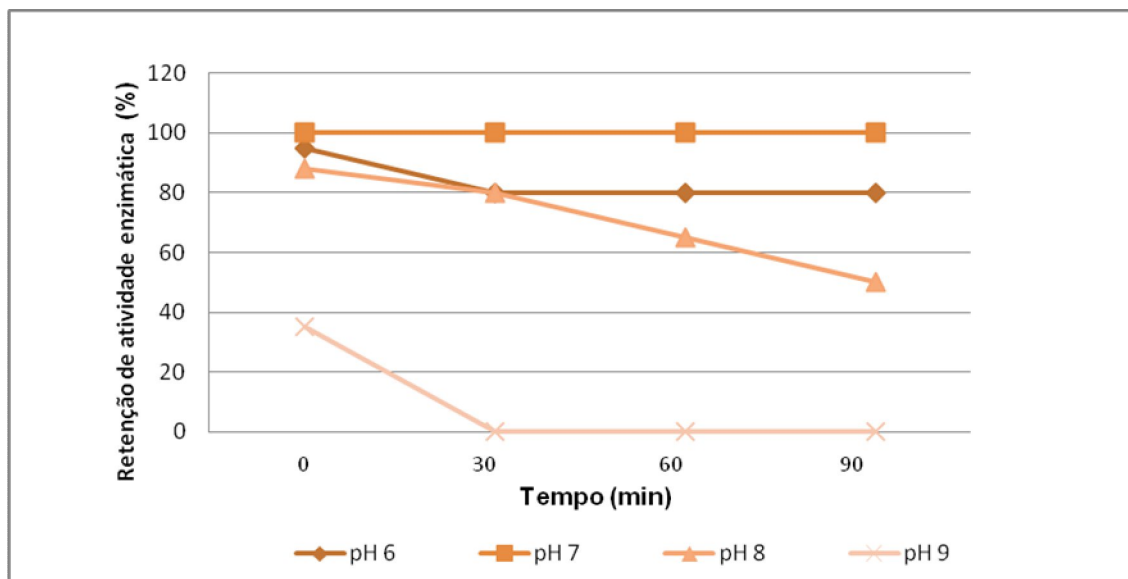
### 2.5.4 pH ótimo e estabilidade de cutinases em líquidos metabólicos concentrados livres de células

As figuras 2.5.2 e 2.5.3 ilustram o pH ótimo e a estabilidade em diferentes pHs dos extratos enzimáticos concentrados de cutinases durante 30, 60 e 90 minutos à temperatura de 28 °C. As cutinases expressas por *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 apresentaram o mesmo comportamento em função do pH. A atividade máxima foi determinada em pH 7,0 (pH ótimo) e a estabilidade máxima foi determinada com 90 min de incubação nesse pH.

A estabilidade ao pH de cutinases produzidas pelas culturas de *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 diminuiu à medida que variou de pH 7,0 a pH 9,0. A atividade de cutinases a pH 9,0 atingiu apenas 20 % do valor máximo no tempo inicial e não foi determinada durante a incubação de 30 a 90 minutos. A atividade das enzimas a pH 6,0 diminuiu durante a incubação e atingiu 80-90 % do valor máximo durante os 90 min.



**Fig. 2.5.2 Retenção de atividade enzimática de líquido concentrado e formulado de *E. coli* CUT a pH 6-9**



**Fig. 2.5.3 Retenção de atividade enzimática de líquido concentrado e formulado de *E. coli* CUT-N1 a pH 6-9**

O pH ótimo 7,0 para cutinases foi também determinado por Pio et al. (2008), que cultivaram *Fusarium oxysporum* em placas de Petri na presença de batata-dextrose-ágar (BDA) e investigaram o pH na faixa de pH 4 a 10.

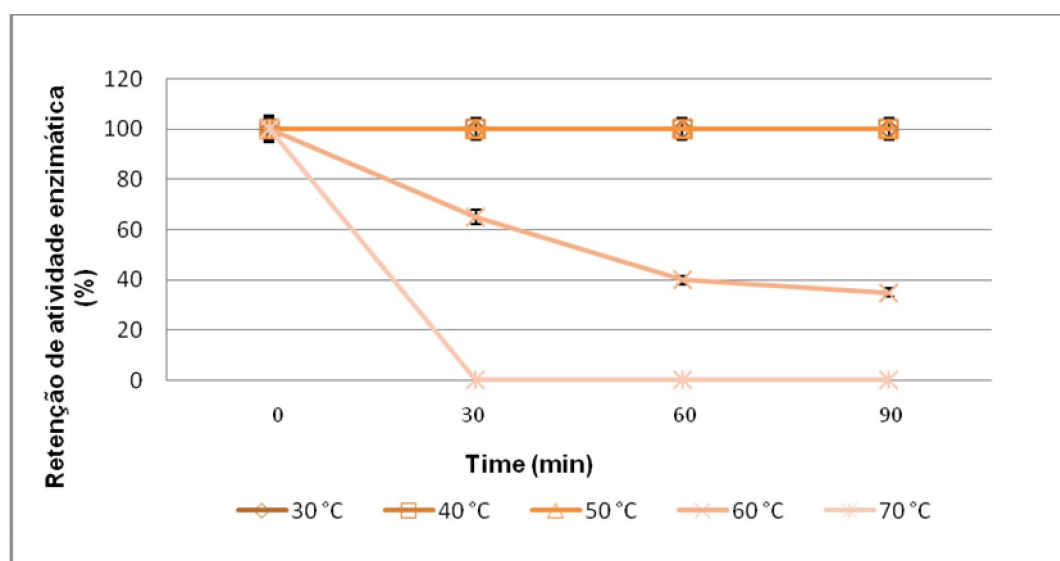
Por outro lado, cutinases produzidas por *F. solani pisi* e *T. fusca*, após isolamento e purificação, apresentaram pH ótimo 8,0 na presença de trioleína e pNPB. Essas enzimas foram produzidas em meios específicos sob agitação em orbital de 200 rpm, a 50 °C (Cheng et al. 2008).

Speranza et al. (2011) caracterizaram cutinases produzidas por *F. oxysporum* em cultivos sólidos e determinaram também atividade máxima a pH 8,0 em diferentes meios de cultivo na presença de farelo de trigo, casca de soja e farelo de arroz e, a pH 9,0 na presença de torta de pinhão manso. Embora as atividades máximas tenham sido em meio levemente alcalino, a estabilidade dessas cutinases foi maior em pH 6,0.

O pH ótimo de três cutinases construídas por fusão com diferentes CBM e expressas em *E. coli* foi o mesmo valor do pH ótimo da enzima nativa (pH 8,0). A estabilidade ao pH foi máxima para as três enzimas recombinantes após incubação por 24 h a 37 °C em pH ótimo (Zhang et al. 2010).

### 2.5.5 Estabilidade térmica de cutinases em líquidos metabólicos concentrados livres de células

A figura 2.5.4 ilustra as atividades de cutinases produzidas por *E. coli* modificadas geneticamente sob pH ótimo, após incubação em temperaturas de 30 a 70 °C durante 30, 60 e 90 min. As culturas de *E. coli* produziram cutinases termofílicas. As atividades alcançaram o máximo valor após incubação a 30, 40 e 50 °C, durante 90 min. A retenção de atividade a 60 °C foi apenas 38 % e não foi determinada atividade enzimática após incubação a 70 °C, após os 90 min. As cutinases de *E. coli* CUT e de *E. coli* CUT-N1 apresentaram o mesmo comportamento.



**Fig. 2.5.4 Estabilidade térmica dos líquidos metabólicos da cultura de *E. coli* CUT-N1 em pH ótimo**

A literatura apresenta diversas referências de cutinases termofílicas. Zhang et al. (2010) determinaram temperatura ótima de 50 °C para cutinases recombinantes e observaram o tempo de meia-vida foi de 53 h após incubação na temperatura ótima. Ronkvist et al. (2009) caracterizaram cutinases produzidas por diferentes microorganismos e determinaram termoestabilidade a 50 °C para cutinases produzidas por *Pseudomonas mendocina* e *F. solani*, enquanto que cutinases de *Humilica insolens* apresentaram termoestabilidade a 70-80 °C.

Por outro lado, cutinases mesofílicas também são produzidas por microorganismos. Speranza et al. (2011) compararam características de cutinases



produzidas por *F. oxysporum* em cultivos sólidos distintos. A temperatura ótima e a estabilidade térmica variou entre 30 e 37°C em função do substrato. Cheng et al. (2008) caracterizaram cutinases produzidas por *F. solani pisi* e *T. fusca* e determinaram temperaturas ótimas de 30 e 40 °C, respectivamente. Cutinases de *T. fusca* exibiram estabilidade térmica superior, com atividades residuais de mais de 80 % após 160 h, a 40 °C.

### 2.5.6 Aplicação de líquidos metabólicos com atividade de cutinases no tratamento de plásticos

A tabela 2.5.4 apresenta os resultados de diferença de peso durante a investigação do tratamento de PET por aplicação de líquidos metabólicos livres de células produzidos por *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 com atividades de cutinases iguais a 1,3 e 2,6 UI/mL, respectivamente. A maior perda de massa do PET durante o tratamento por ação das cutinases foi determinado na presença do líquido metabólico produzido por *E. coli* CUT-N1 e atingiu uma diminuição de cerca de % da massa desse plástico após o período de incubação a 37 °C durante 48 h.

**Tabela 2.5.3. Tratamento de PET por cutinases em tampão fosfato pH 7,2 durante 48 h**

Amostras	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Perda de massa (%)
Controle	167,4±0,04	167,4±0,04	0
<i>E. coli</i> CUT	183,0±0,15	182,9±0,15	0,06
<i>E. coli</i> CUT-N1	167,2±0,22	165,7±2,77	0,90

Vertommen et al. (2005) observaram uma modificação superficial de PET por ação catalítica de cutinases e lipases comerciais. Após 120 h de incubação, a degradação desse plástico foi observada, além da determinação de co-polímeros do PET, presentes nos líquidos metabólicos.

Ronkvist et al. (2009) compararam a ação catalítica de cutinases produzidas por *H. insolens*, *P. mendocina* e *F. solani* na presença de filmes de PET como substratos. Após 96 h de incubação, as atividades catalíticas das cutinases produzidas por *F. solani* e por *P. mendocina* resultaram numa perda de 5 % em peso do filme desse plástico a 40 e 50 °C, respectivamente. No entanto, a hidrólise por cutinases produzidas por *H. insolens* a 70 °C resultou numa perda de peso igual a 97±3 % em 96 h. Os autores determinaram uma perda de espessura da película de

PET de baixa cristalinidade de 30  $\mu\text{m}/\text{dia}$ . Além disso, a análise dos produtos aquosos dos três tratamentos mostrou a presença de ácido tereftálico e etileno glicol.

Acero et al. (2011) avaliaram cutinases produzidas por *T. cellulolytica* DSM44535 (Thc\_Cut1 e Thc\_Cut2) e *T. fusca* DSM44342 (Thf42\_Cut1) na hidrólise de PET. A cutinase Thc\_Cut1 hidrolisou esse substrato com liberação de elevadas quantidades de ácido tereftálico, dentre outros compostos. Embora as cutinases Thc\_Cut1 e Thc\_Cut2 tenham apresentado alto grau de homologia, as propriedades hidrolíticas foram distintas. A modelagem dessas enzimas revelou que diferenças eletrostáticas e hidrofóbicas nas propriedades da superfície do sítio ativo poderiam ser responsáveis por essas diferenças. Esses autores observaram o aumento da hidrofiliabilidade do PET, indicado pela diminuição do ângulo de contato com a água.

Ribitsch et al. (2012) caracterizaram o processo de hidrólise de PET por cutinase produzida por *Thermobifida alba* (Tha\_Cut1). Esses autores determinaram a diminuição do ângulo de contato da água (WCA) de 87,7° a 45,0° na superfície hidrolisada de PET, conduzindo à melhoria na hidrofiliabilidade do polímero, característica fundamental no tratamento de degradação de plástico.

A literatura mostra a versatilidade das cutinases utilizada no tratamento de outros polímeros. Wang et al. (2010) apresentaram resultados de aplicação de cutinases em processos de pré-tratamento enzimático de tecidos. Os autores observaram que as cutinases atuam como agentes modificadores da superfície do polímero, facilitando a absorção de outras substâncias em diversos tratamentos.

### **2.5.7 Formulação de líquido metabólico concentrado com atividade de cutinases**

A tabela 2.5.3 apresenta as atividades de cutinases produzidas por *E. coli* CUT-N1 no líquido metabólico livre de células, concentrado e formulado com glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A atividade da amostra controle foi 2,6 UI/mL, na ausência dos aditivos químicos, enquanto os líquidos metabólicos formulados apresentaram atividades de cutinases de 1,4 a 2,6 UI/mL. A atividade de cutinases foi independente das concentrações de PEG-200 (5 e 10 %) e glicerol (0 e 5 %), enquanto que a concentração do sal influenciou a atividade enzimática cujo valor máximo foi determinado na presença de 10 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (ensaios 5 e 8), no tempo inicial.

Em baixas concentrações, os sais podem estabilizar proteínas por interações eletrostáticas não específicas, dependendo apenas da força iônica do meio. Em elevadas concentrações, os sais exercem efeitos específicos em proteínas, resultando na precipitação desses compostos. Os sais atuam no aumento da tensão interfacial entre a superfície da proteína e no solvente, alterando a solubilidade (Hamada et al. 2009).

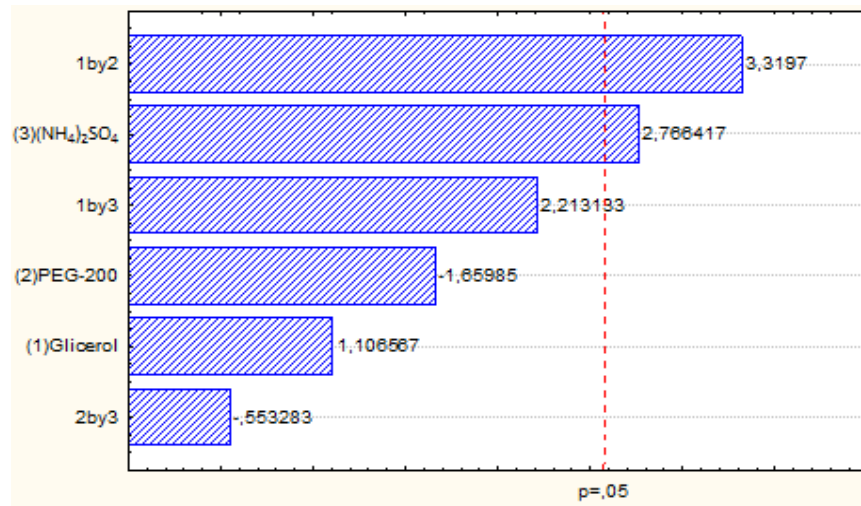
Na formulação para estabilizar CUT-N1 produzida pela *E. coli*, as atividades máximas (2,4 – 2,6 UI/mL) determinadas no tempo inicial não apresentaram estabilidade durante o armazenamento. Por outro lado, a atividade cutinolítica de 2,2 UI/mL, determinada nos ensaios do ponto central (ensaios 9, 10, 11 e 12), apresentou 100 % da retenção da atividade, na presença de 2,5 % de glicerol, 7,5 % de PEG-200 e 7,5 % de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , durante 60 dias de armazenamento, a 28 °C.

**Tabela 2.5.4. Matriz decodificada de planejamento fatorial, atividade de cutinases no tempo inicial e retenção da atividade enzimática da *E. coli* CUT-N1**

Ensaio	Glicerol (%)	PEG-200 (%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Atividade enzimática (UI/mL)	Retenção de atividade (%)	
					30 dias	60 dias
1	0	5	5	2,2	100	50
2	5	5	5	1,8	100	100
3	0	10	5	1,8	100	100
4	5	10	5	1,8	100	100
5	0	5	10	2,6	70	75
6	5	5	10	2,4	90	70
7	0	10	10	1,4	100	80
8	5	10	10	2,6	70	70
9	2,5	7,5	7,5	2,2	100	100
10	2,5	7,5	7,5	2,2	100	100
11	2,5	7,5	7,5	2,2	100	100
12	2,5	7,5	7,5	2,2	100	100

A retenção máxima de atividade de cutinases (100 %) foi determinada em 78 % dos líquidos metabólicos formulados durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente (28 °C). Nesses ensaios, a concentração do  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  foi menor do que 10 %. Esses resultados são confirmados pelos diagramas de Pareto (figuras 5 e 6).

A figura 2.5.5 ilustra o diagrama de Pareto que apresenta os efeitos exercidos pelos fatores: glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  sobre a variável resposta atividade de cutinases do bioproduto produzido por *E. coli* CUT-N1, no tempo inicial.



Legenda: A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ( $p=0.05$  nível de 95% de confiança).

**Fig. 2.5.5 Diagrama de Pareto de efeitos padronizados para o planejamento fatorial  $2^3$  cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol (1), PEG-200 (2) e  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  (3) e como variável resposta a atividade de cutinases CUT-N1 no tempo inicial da formulação do bioproduto**

Considerando apenas os efeitos e interações dos parâmetros analisados que foram estatisticamente significativos, o aumento da concentração de 5 a 10 % de  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  apresentou efeito positivo na atividade de cutinases e favoreceu a ação catalítica dessa enzima.

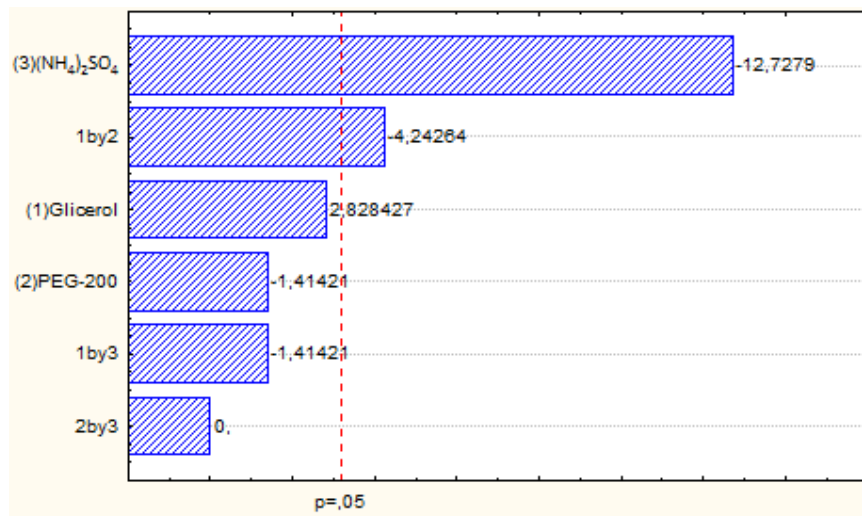
Talekar et al. (2011) estabilizaram alfa-amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* imobilizada utilizando sulfato de amônio. À medida que a concentração do sal foi aumentada, a recuperação da atividade enzimática atingiu 100% com 70 % de sulfato de amônio. Os autores concluíram que a precipitação diminui a superfície contato com o solvente e, conseqüentemente, aumenta a estabilidade de proteínas.

O PEG é um dos mais versáteis polímeros solúveis em água para o redobramento de proteínas recombinantes e estabilização de proteínas por modificação química (Hamada et al. 2009). Na formulação das cutinases produzidas

por *E. coli* CUT-N, o diagrama de Pareto (figura 5) mostra que a interação entre os fatores glicerol e PEG-200 agem positivamente na estabilidade das proteínas.

Os diagramas de Pareto, apresentados nas figuras 2.5.6 e 2.5.7, ilustram os efeitos exercidos pelos fatores investigados para análise da influencia dos aditivos estabilizadores de estruturas protéicas (cutinases), respectivamente, durante 30 e 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Os resultados estatisticamente significativos desses diagramas de Pareto estão analisados a seguir. Com 30 dias de armazenamento, o aumento da concentração de  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  de 5 a 10 % apresentou efeito negativo na estabilidade de cutinases, isto é, quanto maior a concentração desse sal, menor a atividade da enzima. A interação negativa entre glicerol e PEG-200 sobre a estabilidade das cutinases indicou que o aumento das concentrações dessas duas variáveis diminuiu a atividade de cutinases.

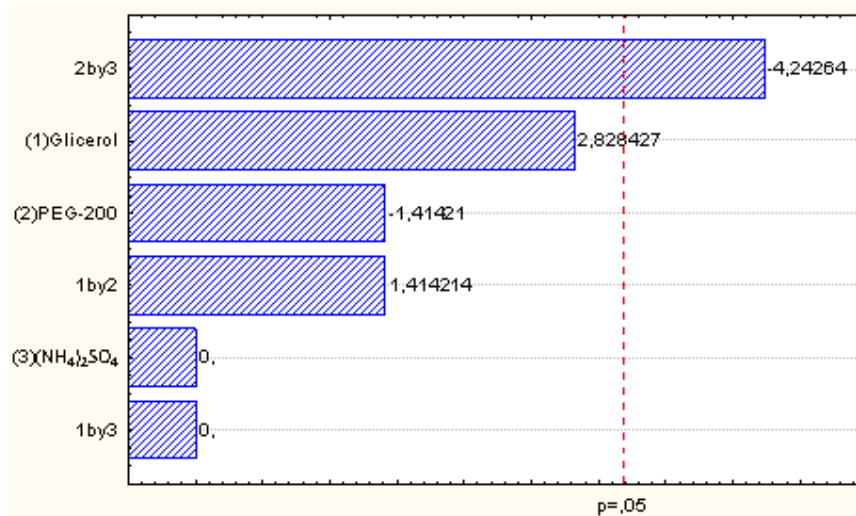


Legenda: A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ( $p=0.05$  nível de 95% de confiança).

**Fig. 2.5.6 Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  e como variável resposta, a atividade de cutinases CUT-N1, durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente**

Os resultados dos efeitos da atividade de cutinases com 60 dias de armazenamento estão ilustrados na figura 6. Apenas a interação entre os fatores  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  e PEG-200 apresentou efeito estatisticamente significativo cujo valor foi

negativo para estabilização das cutinases, isto é, o aumento das concentrações dessas variáveis diminuiu a atividade catalítica.



Legenda: A linha tracejada vertical indica o ponto no qual os efeitos estimados foram estatisticamente significativos ( $p=0.05$  nível de 95% de confiança).

**Fig. 2.5.7 Diagrama de Pareto para o planejamento fatorial cujas variáveis independentes foram concentrações de glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  e como variável resposta, a atividade de cutinases CUT-N1, durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente**

Todas as amostras de bioprodutos com atividade de cutinases produzidas por *E. coli* CUT, formuladas com glicerol, PEG-200 e  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  apresentaram atividade enzimática menores que a amostra controle (não formulada). As retenções de atividade diminuíram em 83 % dos ensaios durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

## 2.6 CONCLUSÕES

- Produção máxima de cutinases recombinantes CUT e CUT-N1 é induzida por IPTG 0,2 mM;
- ultrafiltração por membrana de 10 KDa é eficiente para concentrar cutinases presentes em líquido metabólico livre de células;
- cutinases CUT e CUT-N1 produzidas por culturas de *E. coli* modificadas geneticamente apresentam pH ótimo 7,0 e estabilidade térmica a 30-50 °C;

- tratamento enzimático de PET por cutinases durante 48 h, diminui a massa desse plástico;
- 2,5 % de glicerol, 7,5 % de  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  e 7,5 % de PEG-200 adicionados no líquido metabólico estabilizam cutinases recombinantes durante 60 dias de armazenamento, a 28 °C.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACERO, E.H.; RIBITSCH, D.; STEINKELLNER, G.; GRUBER, K.; GREIMEL, K.; EITELJOERG, I.; TROTSCHA, E.; WEI, R.; ZIMMERMANN, W.; ZINN, M.; CAVACO-PAULO, A.; FREDDI, G.; SCHWAB, H. and GUEBITZ, G. (2011). Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, vol. 44, no. 12, p. 4632-4640. DOI: 10.1021/ma200949p.

**CANEVAROLO-JR, S.V. (2006) Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos engenheiros. Artliber. 280 p. ISBN 9788588098107.**

CHAVES, R.V.A.; VAZ, M.R.F.; ANDRADE, S.S.L.; PEDRINI, M.R.S. and MACEDO, G.R. (2009) Avaliação do clone (eIF) quanto ao crescimento e expressão de antígenos da *Leishmania chagasi*. In: *Sinaferm*. CD Rom do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos.

CHEN, S.; TONG, X.; WOODARD, R.W.; DU, G.; WU, J. and CHEN, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 38, p. 25854-25862. DOI: 10.1074/jbc.M800848200.

EGMOND, M.R. and DE VLIEG. J. (2000) *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie*, vol. 82, no. 11, p.1015–1021. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01183-4.

EINSFELDT, K.; JÚNIOR, J.B.S.; ARGONDIZZO, A.P.C.; MEDEIROS, M.A.; ALVES, T.L.M.; ALMEIDA, R.V. and LARENTIS, A.L. (2011) Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the

influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, vol. 29, no. 41, p. 7136-7143. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.073.

HAMADA, H.; ARAKAWA, T. and SHIRAKI, K. (2009). Effect of additives on protein aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 10, no. 4, p. 400-407. DOI: 10.2174/138920109788488941.

HAN, M.J. and LEE, S.Y. (2006) The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiology and Molecular Biology Review*, vol. 70, no. 2, p. 362-439. DOI: 10.1128/MMBR.00036-05.

HUANG, L. (2010) Growth kinetics of *Escherichia coli* O157: H7 in mechanically-tenderized beef. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, no. 1, p. 40-48. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.013.

KOSINSKI, M.J. and BAILEY, J.E. (1991) Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal/3-galactosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 1-2, p. 55-68. DOI: 1367507.

LO, Y.C.; CHEN, W.M.; HUNG, C.H.; CHEN, S.D. and CHANG, J.S. (2008) Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, vol. 42, no. 4-5, p. 827-842. DOI: 10.1016/j.watres.2007.08.023.

MANO, E.B.; DIAS, M.L. and OLIVEIRA, C.M.F. (2004) *Química experimental de polímeros*. Edgard Blücher. 344 p. ISBN 8521203470.

MATAMÁ, T.; ARAÚJO, R.; GÜBITZ, G.M.; CASAL, M. and CAVACO-PAULO, A. (2010) Functionalization of cellulose acetate fibers with engineered cutinases. *Biotechnology Progress*, vol. 26, no. 3, p. 636-643. DOI: 10.1002/btpr.364.

O'NEILL, A. and CAVACO-PAULO, A. (2004) Monitoring biotransformation in polyester fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 22, no. 5/6, p. 353-356. DOI: 10.1080/10242420400025760.



PAN, H.; XIE, Z.; BAO W. and ZHANG, J. (2008) Optimization of culture conditions to enhance cisepoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 42, no. 2, p. 133-138. DOI: 10.1016/j.bej.2008.06.007.

PIO, T.F.; FRAGA, L.P. and MACEDO, G.A. (2008) Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. vol. 39, no. 1, p. 74-77. DOI: 10.1590/S1517-3822008000100018

RIBITSCH, D., ACERO, E.H., GREIMEL, K., EITELJOERG, I., TROTSCHA, E., FREDDI, G., SCHWAB, H. and GUEBITZ, G.M. (2012) Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* for PET-surface hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 30, no. 1, p. 2-9. DOI: 10.3109/10242422.2012.644435.

RONKVIST, A.M.; XIE, W.; LU, W. and GROSS, R.A. (2009) Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, vol. 42, no. 14, p. 5128–5138. DOI: 10.1021/ma9005318.

SORENSEN, H.P. and MORTENSEN, K.K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, vol. 115, no. 2, p. 113-128. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P.O. and MACEDO, G.A. (2011) Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium sp.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, no. 3–4, p. 181–186. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.06.003.

TALEKAR, S.; WAINGADE, S.; GAIKWAD, V.; PATIL, S. and NAGAVEKAR, N. (2012) Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase. *Journal of Biochemical Technology*, vol. 3, no. 3. ISSN 0974-2328. In press.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N.; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; COURI, S. and BON, E.P.S. (2008) Enzimas proteolíticas: aplicações

biotecnológicas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. and CORVO, M.L. eds. *Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, Interciência, p. 273-287.

VERTOMMEN, M.A.M.E.; NIERSTRASZ, V.A.; VAN DER VEER, M. and WARMOESKERKEN, M.M.C.G. (2005) Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, vol. 120, no. 4, p. 376–386. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.06.015.

WANG, P.; CUI, L.; WANG, Q.; FAN, X.; ZHAO, X. and WU, J. (2010) Combined use of mild oxidation and cutinase/lipase pretreatments for enzymatic processing of wool fabrics. *Engineering in Life Sciences*, vol. 10, no. 1, p. 19-25. DOI: 10.1002/elsc.200900041.

ZHANG, Y.; CHEN, S.; XU, M; CAVACO-PAULO, A.; WU, J. and CHEN, J. (2010). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 20, p. 6870–6876. DOI: 10.1128/AEM.02348-10.

## CAPÍTULO III

### 3.1 CONCLUSÕES GERAIS

- A caracterização de bioproduto com atividade enzimática e sua estabilidade ao armazenamento e sob condições operacionais são primordiais no desenvolvimento tecnológico de produtos comerciais;
- Investigação científica de fisiologia microbiana deve ser incentivada visando aumentar a produtividade de enzimas de aplicação tecnológica;
- A fase exponencial das culturas ocorreu entre 2 e 6 h de cultivo, com velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) iguais a  $1,3 \text{ h}^{-1}$  e  $1,2 \text{ h}^{-1}$ , para *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1, respectivamente. Culturas microbianas com elevada  $\mu_{\text{máx}}$  são eficientes na produção de bioprodutos;
- A faixa de concentração de IPTG investigada na expressão da proteína em *E. coli* CUT e *E. coli* CUT-N1 mostrou que a menor quantidade do indutor foi eficiente na produção da enzima;
- O processo de ultrafiltração por membrana de 10 KDa e pressão de 2,5 bar foi eficiente para concentrar líquidos metabólicos livres de células com atividade de cutinases;
- As cutinases produzidas por culturas de *E. coli* modificadas geneticamente apresentaram atividade máxima em pH 7,0 e termoestabilidade na faixa entre 30 e 50 °C;
- Concentrações de 5 a 10 % de  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  apresentaram efeito positivo na atividade de cutinases, favorecendo a atividade catalítica dessa enzima, embora após 30 dias de armazenamento, essas concentrações apresentaram efeito negativo na estabilidade de cutinases;
- A interação entre glicerol e PEG-200 sobre a estabilidade das cutinases com 30 dias de armazenamento causou efeitos negativos na atividade de cutinases;
- Após 60 dias de armazenamento, os fatores  $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$  e PEG-200 causaram efeitos negativos para estabilização das cutinases;
- Planejamentos fatoriais subsequentes precisam ser realizados para investigar a concentração desse sal para otimização da estabilidade das cutinases.

- O tratamento enzimático em PET durante 48 h ocasionou uma perda de massa de 0,90 % e 1,57 %.
- Cutinases microbianas recombinantes são uma alternativa para aplicação em tratamento biológico de plásticos;

## **ANEXOS**

## **ANEXO I**

**Production of heterologous cutinases by *E. coli* and improved enzyme formulation for application on plastic degradation**

Daniela S. Gomes<sup>1\*</sup>

Teresa Matamá<sup>2</sup>

Artur Cavaco-Paulo<sup>2</sup>

Galba M. Campos-Takaki<sup>1</sup>

Alexandra A. Salgueiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Boa Vista, 50.050-590 Recife - PE, Brasil

<sup>2</sup>IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

\* Corresponding author: [daniela-gomes@ig.com.br](mailto:daniela-gomes@ig.com.br)

## **Production of heterologous cutinases by *E. coli* and improved enzyme formulation for application on plastic degradation**

Daniela S. Gomes<sup>1</sup>, Teresa Matamá<sup>2</sup>, Artur Cavaco-Paulo<sup>2</sup>, Galba M. Campos-Takaki<sup>1</sup> and Alexandra A. Salgueiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - NPCIAMB, Coordenação Geral de Pesquisa, Pró-reitoria Acadêmica, Universidade Católica de Pernambuco, Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, Boa Vista, 50.050-590 Recife - PE, Brasil

<sup>2</sup>IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

### **Abstract**

**Background:** The hydrolytic action of cutinases has been applied to the degradation of plastics. Polyethylene terephthalate (PET) have long half-life which constitutes a major problem for their treatment as urban solid residues. The aim of this work was to characterize and to improve stable the enzyme to optimize the process of degradation using enzymatic hydrolysis of Polyethylene terephthalate (PET) by recombinant cutinases.

**Results:** The wild type form of cutinase from *Fusarium solani pisi* and its C-terminal fusion to cellulose binding domain N1 from *Cellulomonas fimi* were produced by genetically modified *Escherichia coli*. The maximum activity of cutinases produced in Lactose Broth in the presence of ampicillin and isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was 1.4 IU/mL. Both cutinases had an optimum pH around 7.0 and they were stable between 30 and 50 °C during 90 min. The addition of glycerol, PEG-200 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  to the metabolic liquid, concentrated by ultrafiltration, stabilized the activity during 60 days at 28 °C. The treatment of PET with cutinases during 48 h led to maxima weight loss of 0.90 %.

**Conclusions:** Recombinant microbial cutinases may present advantages in the treatment of Poly(ethylene terephthalate) PET through enzymatic treatments.

### **Introduction**

Cutinase (EC 3.1.1.74) also known as cutin hydrolases are versatile enzymes that demonstrate various useful properties applied to industrial products and processes. These biocatalysts have hydrolytic activity on various compounds, ranging from natural to synthetic esters, whether soluble or insoluble with long chain triglycerides such as triolein, tricaprylin and emulsified triglycerides (Egmond and De-Vlieg, 2000).

Biocatalysis by cutinases have been applied to the degradation of polyesters among other polymers and to the esterification or transesterification of small molecules. For example, cutinases from *Thermobifida fusca* (Thf42\_Cut1) and *Thermobifida cellulolytica* (The\_Cut1 and The\_Cut2) were cloned and the kinetic properties of Poly(ethylene terephthalate) PET hydrolysis were characterized and compared with closely related cutinases so as to explain their different hydrolysis efficiencies. Similar behavior between enzymes was determined by



kinetic parameters in the presence of the soluble substrate, in the hydrolysis products of PET and in PET hydrophilization. (Acero et al. 2011). The authors Acero et al. (2013) compared these to Thc\_Cut2, mutants carrying Arg29Asn and/or Ala30Val exchanges and observed considerable higher specific activity and higher kcat/KM values in soluble substrates. The results described their specific activities and kinetic parameters on soluble substrates and their ability to hydrolyze PET. This investigation described a PET model substrate bis(benzoyloxyethyl) terephthalate (3PET).

Recently, two novel class II HFBs (hydrophobins) from *Trichoderma* spp. were described and these cutinases can stimulate activity in PET. The authors suggest individual HFBs can display different properties, and could be used in the enzymatic hydrolysis of aromatic-aliphatic polyesters such as PET (Espino-Rammer et al., 2013).

The construction of chimeric cutinases by fusing the cutinase gene with genes coding carbohydrate-binding modules (CBM) resulted in higher enzyme concentrations on the surface of the cellulose-based solid substrates. Different gene constructs were obtained so that different CBMs fused independently to the C-terminus of cutinase and produced different substrate affinities. The type B CBM of the endoglucanase C from *Cellulomonas fimi* is capable of binding to amorphous cellulose and was selected based on substrate affinity. The results demonstrated the hydrolysis of the substrate and increased the reactivity and hydrophilicity of the cellulose acetate fibers with higher reactive dye uptake in fabrics treated when compared to the fibers treated with the wild type of cutinase (Matamá et al. 2009).

Enzyme characterization regarding optimum pH and optimum temperature as well as pH and thermal stabilities during the reaction time is very important for the application of bioproducts with catalytic activity. These parameters can be further improved by the addition of certain chemicals in the formulated product which could increase and / or stabilize the enzyme activity during storage and operating conditions which are the key factors for marketing the enzyme (Vermelho et al. 2008).

Plastic polymers have high versatility and applicability worldwide. Poly(ethylene terephthalate) PET is a thermoplastic that was mass-produced in the twentieth century (Mano, 2004; Canevarolo-Jr, 2006). PET is a thermoplastic polymer resin of the polyester family to use for food and other liquid containers. In Brazil, the market in PET commercial bottles produces 9 billion units/year and more than 50 % are discarded in the environment and are not reused (<http://www.abipet.org.br/index.html>). The recycling rate of PET is a very interesting strategy for industrial organizations considering to takes into account social, economic and environmental aspects is (McBean et al., 2005; Singh et al., 2009; Barboza et al., 2009). In addition, the environmental incentive, recycling of PET as an industry is getting its driving force from the increasing value and applications of virgin and modified PET (Awaja and Pavel, 2005; Abipet, 2011). Those polymers can only react to produce partly crystalline structures called "semicrystalline" partly crystalline structures, usually (Srtobl,1997).

In the last decade, the amount of plastic polymers in the composition of municipal solid waste has increased exponentially. In addition, strategies to cope with this involve structural modification and biodegradation and these are being developed as alternatives so as to reduce the accumulation of these polymers. The goal of this work was to improve stable recombinant cutinase production by *Escherichia coli* to be applied in the enzymatic degradation of PET.

## Materials and methods

### Microorganisms

Cultures of *E. coli* genetically modified, kindly provided by Prof. Artur Cavaco-Paulo, from the University of Minho – Portugal, were used for the production of the following cutinases:

- wild type CUT from *Fusarium solani*;
- CUT-N1: cutinase from *F. solani* fused to the type B CBM N1 of endoglucanase C from *Cellulomonas fimi*.

These cultures were maintained in Lysogeny broth (LB) (1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl, pH 7.0) and 2 % agar, supplemented with 100 µg/ml ampicillin.

### Poly(ethylene terephthalate)

PET bottles were obtained from commercial use.

### Production of cutinases

Cultures of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 with 24 h of incubation were separately inoculated in Erlenmeyer flasks with LB-medium, supplemented with 100 µg/ml of ampicillin and incubated under orbital agitation at 150 rpm at 37 °C for 12 h. These cultures were used (0.1 % v/v) to inoculate fresh LB-medium, supplemented with Ampicillin and maintained under the same conditions. The production of cutinases CUT and CUT-N1 was induced by the addition of isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) after the cultures reached an absorbance at 600 nm (A600) of 0.6. The culture media were centrifuged at the orbital speed of 5000 rpm for 20 min at 4 °C and the cell-free supernatants were used for measuring cutinase activity and determining pH. The cultures were grown in triplicate.

### Determination of enzyme activity

The esterase activity was determined by spectrophotometry at 405 nm by the hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate (p-NPB). An aliquot of the cell-free supernatant (0.07 mL) was added to 3.43 ml solution containing 1.12 mM p-NPB, 50 mM phosphate buffer pH 7.2, Triton X-100 0.2 % v/v and tetrahydrofuran 0.43 M (Pio et al. 2008). The extinction coefficient of p-nitrophenol at 405 nm was 15.1 mmol<sup>-1</sup>. Cm<sup>-1</sup>. One international unit (U) of cutinase was defined as the amount of enzyme required to convert 1 µmol of p-NPB into p-nitrophenol (p-NP) per minute. All activity assays were performed in triplicate.

### Ultrafiltration

The supernatant (cell-free) was subjected to ultrafiltration in order to concentrate the enzymes. A flat membrane filter (Pellicon XL - Millipore) with a 10 kDa cutoff was used under a pressure of 2.5 bar. The sample was separated into two: retentate (concentrate) and permeate. The process was conducted in the laboratory of Bioenzima Indústria e Comércio Ltda. After the concentration process, anti-microbial preservatives (0.25 % sodium sorbate and 0.25 % sodium benzoate) were added to the concentrated metabolic liquid.

### Effects of pH and temperature on the stability of cutinases

The optimum pH for esterase activity in the concentrated and formulated enzyme solutions was determined in the presence of the substrate (p-NPB) in 0.1 M phosphate buffer (pH 8.6) and glycine-NaOH buffer (pH 9). Aliquots were removed for activity determination at intervals of 30, 60 and 90 minutes.

The concentrated and formulated enzyme extract of cutinases at optimum pH was incubated at different temperatures between 30 and 70 °C. Aliquots were withdrawn at 30, 60 and 90 min of incubation to determine thermal stability.

Assays of optima pH and investigation of temperature were performed in triplicate. Esterase activity was determined as previously described.

#### **Application of engineered cutinases**

The PET used in the treatment experiments was produced industrially and discarded in the environment.

These synthetic polymers were cut into pieces smaller than 20 x 20 mm. The samples were subjected to a pretreatment solution of Tween-80 at 2 % v/v, at 50 °C for 1 h. Then, they were washed in distilled water for 1h and dried in an oven at 40 °C for 24 h.

The pretreated polymers were weighed and subjected to UV radiation for 1 h; 0.01 % of PET was added to a solution containing 0.1 M phosphate buffer pH 7.5 and 1 % of concentrated and formulated cell-free culture medium with esterase activity. The samples were incubated in Erlenmeyer flasks and subjected to orbital shaking 90 rpm, at 37 °C for 48 h. After the treatment, the samples were washed in a solution of 2 g/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> for 2 h, in order to stop the enzymatic reaction. Then, the polymers were washed in 10 g/L Tween-80, at 25 °C for 1h and subsequently washed with distilled water (O'Neil and Cavaco-Paulo, 2004).

The treated polymers were dried in an oven (40 °C for 24 h) and weighed.

#### **Formulation of the concentrated liquid metabolic**

The 2<sup>3</sup> factorial design with four center point replicates was used to optimize the enzyme stability by adding the following compounds: glycerol, polyethylene glycol (PEG-200) and ammonium sulfate ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) as the factors (Table 1). Aliquots were removed at 0, 30 and 60 days of storage at room temperature (28 °C) to determine esterase activity.

**Table 1. Factors and levels of full factorial design investigated in the stabilization of cutinases**

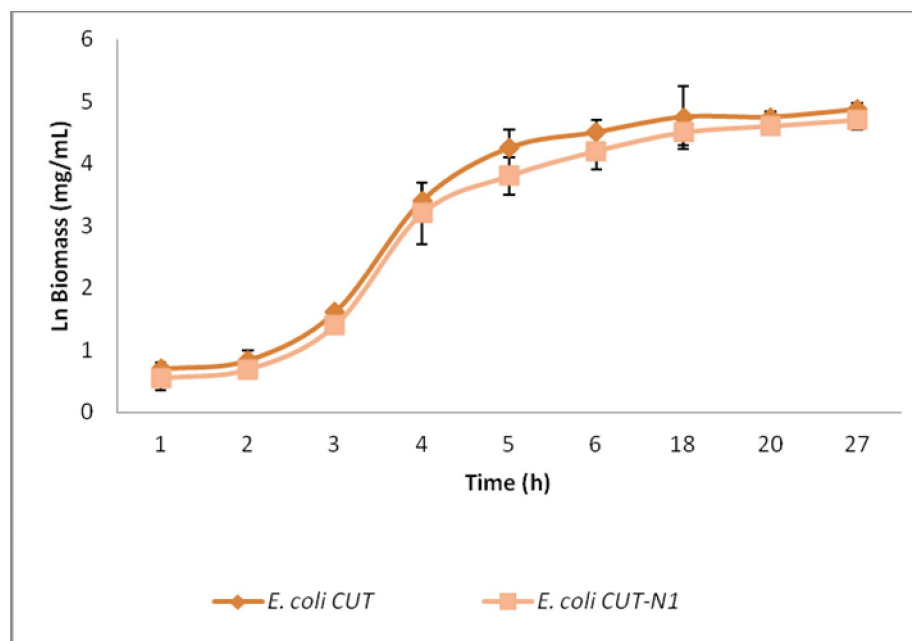
Factors (%)	Full Factorial Design		
	Levels		
	-	0	+
Glycerol	0	2.5	5
PEG-200	5	7.5	10
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5	7.5	10

## **Results and discussion**

### **Microbial growth curve**

Figure 1 illustrates the growth curves of both cultures of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1, grown in LB-medium at 37 °C. At the initial time of the cultivation the pH was 7.0 which value increased in the exponential phase of the cell growth to pH 7.2-7.3 that remained until the end of the experiment.

The lag phase of microbial growth was during the first two hours of cultivation. The exponential phase of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 occurred between the second and sixth hours. The maximum specific growth rates ( $\mu_{\max}$ ) estimated by the maximum gradient in the exponential growth phase were 1.3 h<sup>-1</sup> and 1.2 h<sup>-1</sup> for *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1, respectively. The highest biomass production was determined in the maximum stationary phase, reaching 1.3 g/L after 24 h for the two cultures of *E. coli* that, under the working conditions, showed a similar behaviour.



**Fig. 1 Cell growth curve of cultures of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 in LB medium supplemented with 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Ampicillin**

The literature presents kinetic data of microbial *E. coli* genetically modified. Chaves (2009) evaluated the kinetic parameters of transformed *E. coli* clones for the expression of antigens of *Leishmania chagasi*. The growth in the culture medium containing tryptone, yeast extract, sodium chloride at pH 7 led to  $\mu_{\max}$  values ranging between 0.11 to 0.22 h<sup>-1</sup>. These authors also observed that the exponential growth phase finished within 6 of culture and the maximum biomass obtained was equal to 3.14 g/L after 24 h of cultivation. Cell productivity reached 0.13 g/L.h which was greater than the value 0.05 g/L.h calculated for *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 in our study.

The Crabtree effect may explain the low biomass production obtained in the cultures of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1. Cell growth can be inhibited by the production of heterologous proteins by the genetically modified cultures. Another aspect to be considered is the growth

inhibition of these cultures because of the presence of IPTG itself. The addition of inducers is an important variable in the production of proteins, especially on a large scale, since IPTG is costly and it can be toxic to cells (Einsfeldt, 2011). Pan et al. (2008) confirmed that IPTG used to induce expression of cloned genes is a toxic compound that in high concentrations drastically reduces cell growth in some cultures of recombinant *E. coli*.

#### Effects of the concentration of IPTG in the production of cutinases

Table 2 illustrates the influence of IPTG concentration on the production of cutinases by *E. coli*. IPTG was added at the start of the exponential phase after 3 h (absorbance at 600 nm = 0.4-0.6). The maximum activity concentration of both cutinases was obtained after 24 h of cultivation. The cutinase activity produced by *E. coli* cultures showed different behaviours regarding the effect of this inductor. The cutinase activity by *E. coli* CUT-N1 was strongly dependent on the IPTG concentration; CUT-N1 production was inhibited by increasing the IPTG concentration. The maximum cutinase activity was 1.4 U/ml by *E. coli* CUT-N1 in the presence of 0.2 mM of IPTG after 24 h of cultivation. *E. coli* CUT expressed the maximum of 0.7 U/ml of cutinases at the concentration of 0.2 mM of IPTG. This value was not significantly changed by doubling the IPTG concentration.

Therefore, in this study, the concentration of 0.2 mM of IPTG was chosen for the production of both cutinases CUT and CUT-N1.

**Table 2. Activity of cutinases in the supernatant cell-free of *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 under submerged culture in the presence of different concentrations of IPTG**

<i>E. coli</i>	IPTG (mM)	Activity of cutinases (U/mL)					
		3 h	4 h	5 h	18 h	20 h	24 h
<i>E. coli</i> CUT	0.2	0.02	0.08	0.1	0.5	0.6	0.7
<i>E. coli</i> CUT-N1	0.2	0.06	0.30	0.4	0.8	1.2	1.4
<i>E. coli</i> CUT	0.4	0.01	0.06	0.1	0.4	0.5	0.6
<i>E. coli</i> CUT-N1	0.4	0.04	0.30	0.4	0.7	0.8	0.9

The decrease of the esterase activity may be partially due to the toxic effect of IPTG at the concentration of 0.4 mM. On the other hand, the induction of protein expression in the presence of IPTG induces stress to cells, which can lose the plasmid that contains the recombinant gene of interest (Sorensen and Mortensen, 2005). Kosinski and Bailey (1991) observed the temporary inhibition of protein during the exponential growth phase after the addition of IPTG to a culture of *E. coli*. Furthermore, high levels of recombinant protein expression in the presence of IPTG can also induce the expression of several proteases the enzymatic activity of which influences the activity of the heterologous enzyme (Han and Lee, 2006). Parekh and Patel (2012) investigated the IPTG concentrations: 0.1, 0.5 and 1 mM during 2, 4 and 6 h of induction of the protein Fcε-Bik by *E. coli*. The level of expression of this protein was determined by electrophoresis in polyacrylamide gel. The reduction of the expression of the recombinant protein in the presence of IPTG at 1 mM was observed when compared to other concentrations of the inducer.

#### Ultrafiltration of metabolic liquid

The (cell-free) supernatants with cutinolytic activity from the two genetically modified *E. coli* were concentrated twice by ultrafiltration (Table 3). The retention of the activity of cutinases on the concentrated bioproduct reached 93 % when compared with the sample controls.

**Table 3. Enzymatic activity in the concentrated metabolic liquid**

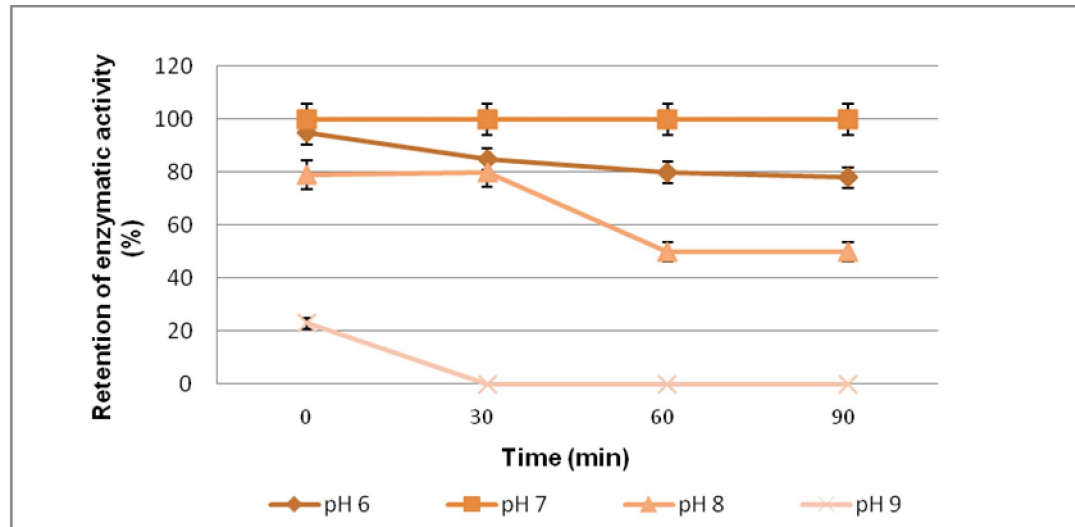
Microorganism	Cutinolytic activity (U/mL)		Retention of activity (%)
	Control	Concentrate	
<i>E. coli</i> CUT	0.7	1.3	93
<i>E. coli</i> CUT – N1	1.4	2.6	93

The cutinases determined in the concentrates showed approximately double the activity of the control samples. Few enzyme molecules crossed through the membrane; the activities in permeates reach only 0.10 and 0.15 U/ml for *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1, respectively. The average molecular mass of cutinases (24 kDa) and the pores of the membrane (10 kDa) are responsible for these results (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00590>). The substances cross through the pores by tangential force in the ultrafiltration process and, consequently, molecules larger than the pore size can also cross the membrane.

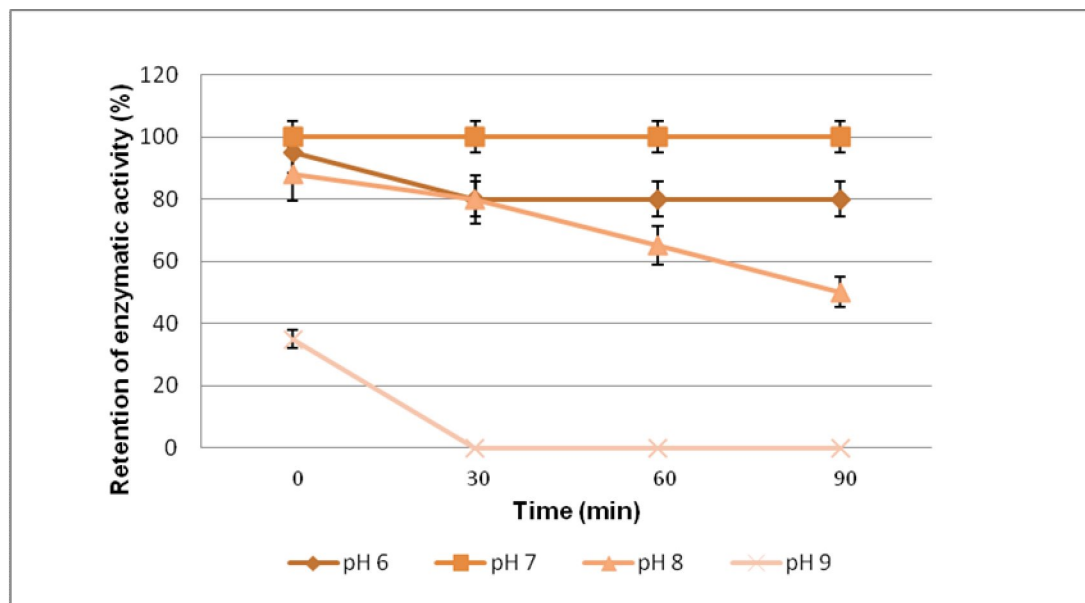
There was no loss of cutinolytic activity in the process of ultrafiltration. Under working conditions, the membrane has not retained any essential substance for the enzyme activity; neither did the addition of anti-microbial preservatives influence the enzyme activity.

#### **pH optimum and pH stability of cutinases**

Figures 2 and 3 show the optimum pH and stability at different pHs of the concentrated and formulated supernatant with esterase activity during 30, 60 and 90 min at 28 °C. Cutinases expressed by *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 showed the same behaviour as a function of pH. The maximum activity was determined at pH 7.0 (optimum pH) and the maximum stability was determined during 90 min of incubation at the optimum pH. The pH stability of cutinases produced by *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 decreased from pH 7.0 to pH 9.0. The esterase activity at pH 9.0 reached only 20 % of the maximum value in the initial time and was not determined during the incubation. The enzyme activity at pH 6.0 decreased during the incubation and reached 80-90 % of the maximum value during 90 min.



**Fig. 2 Retention of enzymatic activity of the concentrated and formulated metabolic liquid from *E. coli* CUT at pH 6 to 9**



**Fig. 3 Retention of enzymatic activity of the concentrated and formulated metabolic liquid from *E. coli* CUT-N1 at pH 6 to 9**

In the tested range of pH (4 to 10), the optimum pH 7.0 for cutinases from *Fusarium oxysporum* was also found by Pio et al. (2008). Moreover, cutinases produced by *F. solani pisi* and *T. fusca*, after isolation and purification, showed optimum pH 8.0 for the hydrolysis of triolein and pNPB. These enzymes were produced in specific media under orbital agitation of 200 rpm at 50 °C (Cheng et al. 2008). Speranza et al. (2011) characterized cutinases produced by *F. oxysporum* and also determined maximal activity at pH 8.0 in different solid culture media in the presence of wheat bran, soybean rind and rice bran; and at pH 9.0 in the

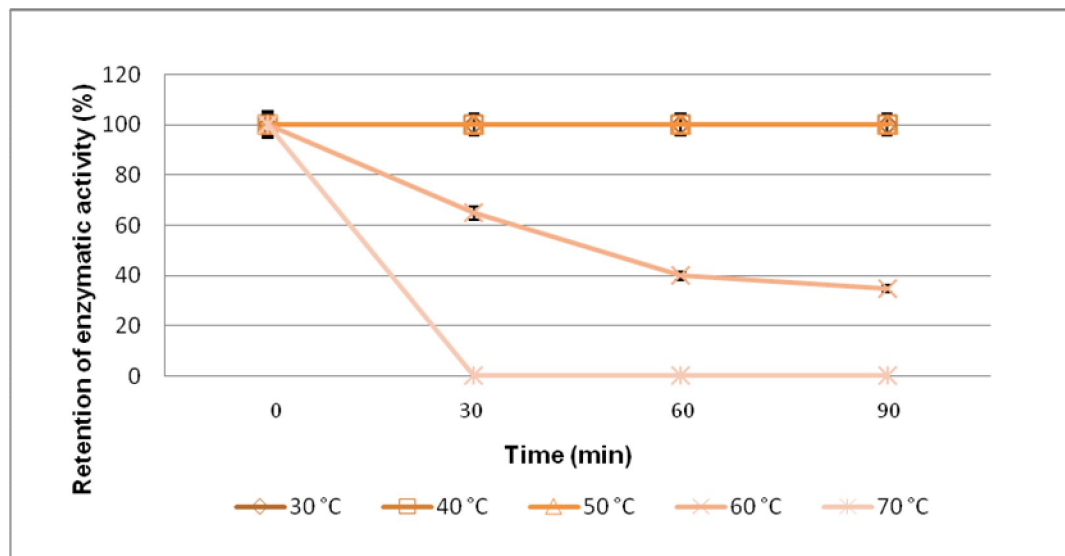
presence of *Jatropha curcas* seed cake. Although the maximum activities took place in slightly alkaline medium, the pH stability of these cutinases was higher at pH 6.0.

The optimum pH of three cutinases constructed by fusion with different CBM and expressed in *E. coli* was the same value as the native enzyme optimum pH (pH 8.0). The pH stability was highest for the three chimeric enzymes after incubation for 24 h at 37 °C under optimum pH (Zhang et al. 2010).

### Thermal stability of cutinases

Figure 4 shows the activities of CUT-N1 at optimum pH and after incubation at temperatures of 30 to 70 °C during 30, 60 and 90 min. CUT showed the same behavior. The activities were retained after incubation at 30, 40 and 50 °C, during 90 min. The retention of activity at 60 °C was only 38 % and non-enzymatic activity was determined after incubation at 70 °C, during 90 min.

The literature shows several references of optimum temperature of cutinases equal to/above 50 °C. Zhang et al. (2010) determined optimal temperature of 50 °C for recombinant cutinases and observed the half-life of 53 h after incubation at optimum temperature. Ronkvist et al. (2009) characterized cutinases produced by different microorganisms and determined thermostability at 50 °C for cutinases produced by *Pseudomonas mendocina* and *F. solani*, while cutinases from *Humilica insolens* showed thermostability at 70-80 °C.



**Fig. 4 Thermal stability of the metabolic liquid of *E. coli* CUT-N1 at optimum pH**

Moreover, mesophilic cutinases are also produced by microorganisms. Speranza et al. (2011) compared characteristics of cutinases produced by *F. oxysporum* in different solid media. The optimum temperature and the thermal stability ranged between 30 and 37 °C depending on the substrate. Cheng et al. (2008) characterized cutinases produced by *F. solani pisi* and *T. fusca* and determined optimum temperatures of 30 and 40 °C, respectively. Cutinases from *T. fusca*



exhibited higher thermal stability; the residual activity was higher than 80 % after 160 h, at 40 °C.

#### **Application of CUT and CUT-N1 in the degradation of plastics**

Table 4 presents the weight difference after the treatment of PET with cell-free culture media produced by *E. coli* CUT and *E. coli* CUT-N1 with cutinase activity (1.3 and 2.6 U/mL, respectively). The higher mass loss during the treatment of PET was verified in the presence of CUT-N1. The decrease of the weight was approximately one percent of this plastic mass after incubation at 37 °C during 48 h.

**Table 4. Treatment of PET by cutinases in phosphate buffer pH 7.2 during 48 h**

<b>Samples</b>	<b>Initial weight (mg)</b>	<b>Final weight (mg)</b>	<b>Weight loss (%)</b>
Control	167.4±0.04	167.4±0.04	0
<i>E. coli</i> CUT	183.0±0.15	182.9±0.15	0.05
<i>E. coli</i> CUT-N1	167.2±0.22	165.7±2.77	0.90

Vertommen et al. (2005) observed a surface modification of PET by the catalytic activity of commercial lipases and cutinases. After 120 h of incubation, the degradation of this plastic was observed, beyond the determination of co-polymers of PET, presents in the aqueous phase.

Ronkvist et al. (2009) compared the catalytic activity of cutinases produced by *H. insolens*, *F. solani* and *P. mendocin* in the presence of PET films as substrates. After 96 h of incubation, the catalytic activities of cutinases produced by *F. solani* and *P. mendocina* resulted in a weight loss of 5 % of this plastic at 40 and 50 °C, respectively. However, the hydrolysis of cutinases produced by *H. insolens* at 70 °C, resulted in a weight loss of 97±3 % after 96 h. The authors determined a loss of the thickness film with low-crystallinity of 30 µm/day. Moreover, the analysis of the aqueous products of the three treatments showed the presence of terephthalic acid and ethylene glycol.

Acero et al. (2011) evaluated cutinases produced by *T. cellulosilytica* DSM44535 (Thc\_Cut1 and Thc\_Cut2) and *T. fusca* DSM44342 (Thf42\_Cut1) in the PET hydrolysis. The cutinase Thc\_Cut1 hydrolyzed this substrate and released large amounts of terephthalic acid, among other compounds. Different hydrolytic properties were determined although the cutinases Thc\_Cut1 and Thc\_Cut2 showed a high degree of homology. The modeling of these enzymes revealed that electrostatic and hydrophobic differences in the surface properties of the active site could be responsible for these characteristics. These authors observed an increase in the PET hydrophilicity due to a decrease in the contact angle with the water.

Ribitsch et al. (2012) characterized the hydrolysis of PET from cutinases produced by *Thermobifida alba* (Tha\_Cut1). The authors determined the decrease in the water contact angle of 87.7° to 45.0° at the surface of PET hydrolyzed, leading to an improvement in the polymer hydrophilicity, a fundamental characteristic in the treatment of plastic degradation.

The literature shows the versatility of cutinases used in the treatment of other polymers. Wang et al. (2010) showed results of cutinase applications in enzymatic processes of pretreating the tissue. The authors showed that cutinases act as modifier agents of the polymer surface, by facilitating the absorption of other substances in different treatments.

#### **Formulation of concentrated metabolic liquid with cutinolytic activity**

Table 5 shows the activities of cutinases produced by *E. coli* CUT-N1 in the concentrated metabolic liquid and formulated with glycerol, PEG-200 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The activity of the control sample was 2.6 U/ml in the absence of the chemical additives whereas the formulated bioproduct showed cutinolytic activities of 1.4 to 2.6 IU/mL. The activity of cutinases was independent of the concentrations of PEG-200 (5 and 10 %) and glycerol (0 and 5 %) while the concentration of the salt influenced the enzyme activity the maximum value of which was determined in the presence of 10 % of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (assays 5 and 8) at initial time.

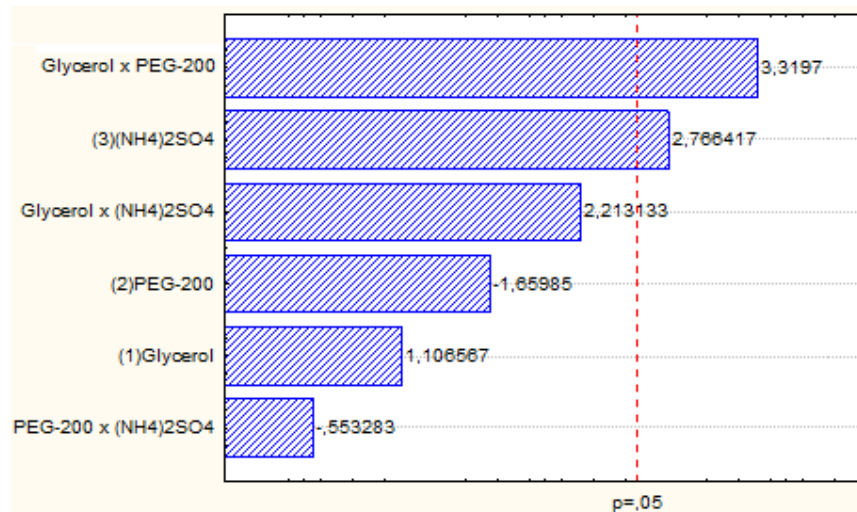
At low concentrations, salts can stabilize proteins by non-specific electrostatic interactions, depending only on the ionic strength of the medium. At high concentrations, salts exert specific effects on protein, resulting in the precipitation of these compounds. Salts act on the increase of the interfacial tension between the protein surface and the solvent, changing the solubility (Hamada et al. 2009).

In the formulation to stabilize CUT-N1 produced by *E. coli*, the maximum activities (2.4-2.6 U/mL) determined at zero time showed low storage stability. On the other hand, the cutinolytic activity of 2.2 U/ml determined on center point assays 9, 10, 11 and 12, showed 100 % of retention of the activity in the presence of 2.5% v/v glycerol, 7.5 % v/v PEG-200 and 7.5 % of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , during 60 days of storage at 28 °C. Therefore, concentrations of these chemical additives used on the center point are proposed to stabilize the CUT-N1.

**Table 5. Decoded matrix of the factorial design, cutinolytic activity at initial time and retention of activity of the bioproduct produced by *E. coli* CUT-N1**

Assay	Glycerol (%)	PEG-200 (%)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (%)	Activity (U/mL)	Retention of activity (%)	
					30 days	60 days
1	0	5	5	2.2	100	50
2	5	5	5	1.8	100	100
3	0	10	5	1.8	100	100
4	5	10	5	1.8	100	100
5	0	5	10	2.6	70	75
6	5	5	10	2.4	90	70
7	0	10	10	1.4	100	80
8	5	10	10	2.6	70	70
9	2.5	7.5	7.5	2.2	100	100
10	2.5	7.5	7.5	2.2	100	100
11	2.5	7.5	7.5	2.2	100	100
12	2.5	7.5	7.5	2.2	100	100

Figure 5 illustrates the Pareto chart that shows the effects by the factors: glycerol, PEG-200 and  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  on the response variable: esterase activity of the bioproduct produced by *E. coli* CUT-N1 at the initial time.



Key: The vertical dashed line indicates the point at which the effects estimated were statistically significant ( $p = 0.05$  at 95 % confidence).

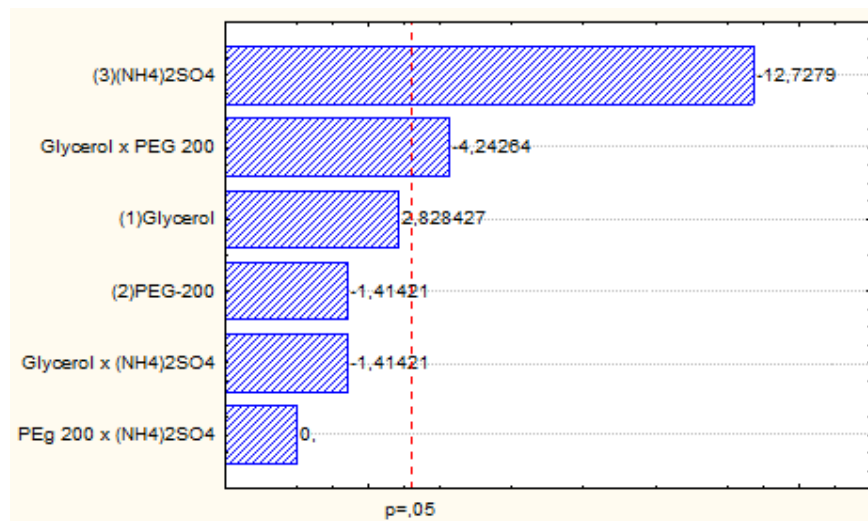
**Fig. 5 Pareto chart of standardized effects for (1) glycerol, (2) PEG-200 and (3)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  using activity of cutinases CUT-N1 as the response variable at initial time**

Considering the effects of the factors statistically significant, the increase of the concentration of 5 to 10 % of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  in the activity of cutinases showed positive effect and led to higher catalytic action of the enzyme produced by *E. coli* CUT-N1. Talekar et al. (2011) stabilized alpha-amylase from *Bacillus amyloliquefaciens* immobilized using  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . As the concentration of this salt increased the enzyme activity also increased. The maximum activity was at 70 % of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . The authors concluded that the precipitation reduces the contact surface with the solvent and increases the stability of proteins.

PEG is one of the most versatile water soluble polymers for refolding recombinant proteins and for stabilizing proteins by chemical modification (Hamada et al. 2009). In this study, the Pareto chart (figure 5) shows the positive effect of the interaction between glycerol and PEG-200 in the activity of CUT-N1.

The interpretation of the factorial design by Pareto chart in figure 6, using the retention of the esterase activity during 30 days of storage as response, shows that the only significant variable (factor) was the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  concentration. The increase of 5 to 10 % of this salt negatively affected the stability of both cutinases, i.e., at higher concentrations of the salt, the enzyme stability decreased. The negative interaction between glycerol and PEG-200 in the stability of cutinases during 30 days of storage indicated that the increase of the concentrations of these two variables, at working conditions, decreased the activity of cutinases.

The effects of the factors on the activity during 60 days of storage at room temperature were not statistically significant.



Key: The vertical dashed line indicates the point at which the effects estimates were statistically significant ( $p = 0.05$  at 95 % confidence).

**Fig. 6 Pareto chart of standardized effects for (1) glycerol, (2) PEG-200 and (3) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> using activity of cutinases CUT-N1 as the response variable during 30 days of storage at room temperature**

All the tested samples of CUT – formulated with glycerol, PEG-200 and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - showed lower enzyme activity than the control sample (non-formulated). The retention of the activity decreased in 83 % of assays during 60 days of storage at room temperature.

### Conclusions

- Maximum productions of recombinant cutinases CUT and CUT-N1 is induced by 0.2 mM IPTG;
- ultrafiltration membrane of 10 kDa is effective to concentrate cutinases in cell-free metabolic liquid;
- cutinases CUT and CUT-N1 produced by cultures of *E. coli* genetically modified have optimum pH 7.0 and thermal stability at 30-50 °C;
- enzymatic treatment of PET by cutinases during 48 h decreases the mass of this plastic;
- 2.5 % v/v glycerol, 7.5 % (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>), and 7.5 % v/v PEG-200 added at the metabolic liquid stabilize recombinant cutinases during 60 days of storage at 28 °C.

### Acknowledgements

This research study was financially supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## References

ACERO, E.H.; RIBITSCH, D.; STEINKELLNER, G.; GRUBER, K.; GREIMEL, K.; EITELJOERG, I.; TROTSCHA, E.; WEI, R.; ZIMMERMANN, W.; ZINN, M.; CAVACO-PAULO, A.; FREDDI, G.; SCHWAB, H. and GUEBITZ, G. (2011). Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, vol. 44, no. 12, p. 4632-4640. DOI: 10.1021/ma200949p.

ACERO, E.H.; RIBITSCH, D.; DELLACHER, A.; ZITZENBACHER, S.; MAROLD, A.; STEINKELLNER, G.; GRUBER, K.; SCHWAB, H. and GUEBITZ, G.M. (2013). Surface engineering of a cutinase from *Thermobifida cellulositica* for improved polyester hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, no.6 . DOI: 10.1002/bit.24930

AWAJA F. and PAVEL, D. (2005). Review Recycling of PET. *European Polymer Journal*, vol. 41, p. 1453–1477. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005.

BARBOZA, E.S.; LOPEZ, D.R., AMICOA, S.C. and FERREIRA, C.A. (2009). Determination of a recyclability index for the PET glycolysis. *Resources, Conservation and Recycling*, vol. 53, p. 122–128. DOI: 10.1016/j.resconrec.2008.10.002.

CANEVAROLO-JR, S.V. (2006). *Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos engenheiros*. Artliber. 280 p. ISBN: 9788588098107.

CHAVES, R.V.A.; VAZ, M.R.F.; ANDRADE, S.S.L.; PEDRINI, M.R.S. and MACEDO, G.R. (2009). Avaliação do clone (eIF) quanto ao crescimento e expressão de antígenos da *Leishmania chagasi*. In: *Sinaferm*. CD Rom do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos.

CHEN, S.; TONG, X.; WOODARD, R.W.; DU, G.; WU, J. and CHEN, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 38, p. 25854-25862. DOI: 10.1074/jbc.M800848200.

COELHO,T.M.; CASTRO, R. and GOBBO JUNIOR, J.A. (2011). PET Containers in Brazil: A Logistics Model for Post-Consumer Waste Recycling. *Post-Consumer Waste Recycling and Optimal Production*, p. 167-182. DOI: 10.5772/35062.

EGMOND, M.R. and DE-VLIEG. J. (2000). *Fusarium solani* pisi cutinase. *Biochimie*, vol. 82, no. 11, p.1015–1021. DOI: 10.1016/S0300-9084(00)01183-4.

EINSFELDT, K.; JÚNIOR, J.B.S.; ARGONDIZZO, A.P.C.; MEDEIROS, M.A.; ALVES, T.L.M.; ALMEIDA, R.V. and LARENTIS, A.L. (2011). Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. *Vaccine*, vol. 29, no. 41, p. 7136-7143. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.073.

ESPINO-RAMMER, L.; RIBITSCH D, P.A.; MAROLD, A.; GREIMEL, K.J.; HERRERO, A. E.; GUEBITZ, G.M.; KUBICEK, C.P. and DRUZHININA, I.S. (2013). Two novel class II hydrophobins from *Trichoderma* spp. stimulate enzymatic hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) when expressed as fusion proteins. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 79, no. 14, p. 4230-4238. DOI: 10.1128/AEM.01132-13.

HAMADA, H.; ARAKAWA, T. and SHIRAKI, K. (2009). Effect of additives on protein aggregation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, vol. 10, no. 4, p. 400-407. DOI: 10.2174/138920109788488941.

HAN, M.J. and LEE, S.Y. (2006). The *Escherichia coli* proteome: past, present, and future prospects. *Microbiology and Molecular Biology Review*, vol. 70, no. 2, p. 362-439. DOI: 10.1128/MMBR.00036-05.

HUANG, L. (2010). Growth kinetics of *Escherichia coli* O157: H7 in mechanically-tenderized beef. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 140, no. 1, p. 40-48. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.013.

KOSINSKI, M.J. and BAILEY, J.E. (1991). Temperature and induction effects on the degradation rate of an abnormal/3-galactosidase in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, vol. 18, no. 1-2, p. 55-68. DOI: 1367507.

LO, Y.C.; CHEN, W.M.; HUNG, C.H.; CHEN, S.D. and CHANG, J.S. (2008). Dark H<sub>2</sub> fermentation from sucrose and xylose using H<sub>2</sub>-producing indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Research*, vol. 42, no. 4-5, p. 827-842. DOI: 10.1016/j.watres.2007.08.023.

MANO, E.B.; DIAS, M.L. and OLIVEIRA, C.M.F. (2004). *Química experimental de polímeros*. Edgard Blücher. 344 p. ISBN 8521203470.

MATAMÁ, T.; ARAÚJO, R.; GÜBITZ, G.M.; CASAL, M. and CAVACO-PAULO, A. (2010). Functionalization of cellulose acetate fibers with engineered cutinases. *Biotechnology Progress*, vol. 26, no. 3, p. 636-643. DOI: 10.1002/btpr.364.

MCBEAN, E.A.; DEL ROSSO, E. and ROVERS, F.A. (2005). Improvements in financing for sustainability in solid waste management. *Journal Resources, Conservation and Recycling*, vol. 43, p. 391-401.

O'NEILL, A. and CAVACO-PAULO, A. (2004). Monitoring biotransformation in polyester fibres. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 22, no. 5/6, p. 353-356. DOI: 10.1080/10242420400025760.

PAN, H.; XIE, Z.; BAO W. and ZHANG, J. (2008). Optimization of culture conditions to enhance cisepoxysuccinate hydrolase production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 42, no. 2, p. 133-138. DOI: 10.1016/j.bej.2008.06.007.

PIO, T.F.; FRAGA, L.P. and MACEDO, G.A. (2008). Inoculum padronization for the production of cutinase by *Fusarium oxysporum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, no. 1, p. 74-77. DOI: 10.1590/S1517-3822008000100018.

RIBITSCH, D., ACERO, E.H., GREIMEL, K., EITELJOERG, I., TROTSCHA, E., FREDDI, G., SCHWAB, H. and GUEBITZ, G.M. (2012). Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* for PET-surface hydrolysis. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 30, no. 1, p. 2-9. DOI: 10.3109/10242422.2012.644435.

RONKVIST, A.M.; XIE, W.; LU, W. and GROSS, R.A. (2009). Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, vol. 42, no. 14, p. 5128–5138. DOI: 10.1021/ma9005318.

SINGH, R.K.; MURTY, H.R.; GUPTA, S.K. and DIKSHIT, A.K. (2009). An overview of sustainability assessment methodologies. *Ecology Indicators*, vol. 9, p. 189–212. DOI: 10.1016/j.ecolind.2011.01.007.

SULAIMAN, S.; YAMATO, S.; KANAYA, E.; KIM, J-J.; KOGA, Y.; TAKANO, K. and KANAYA, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 5, p. 1556–1562. DOI: 10.1128/AEM.06725-11.

SORENSEN, H.P. and MORTENSEN, K.K. (2005). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, vol. 115, no. 2, p. 113-128. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.004.

SPERANZA, P.; CARVALHO, P.O. and MACEDO, G.A. (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium sp.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 72, no. 3–4, p. 181–186. DOI: 10.1016/j.molcatb.2011.06.003.

STROBL, G. (1997). *The Physics of Polymers: Concepts for Understanding Their Structures and Behavior*, Berlin, Germany, Springer. ISBN: 3-540-60768-4.

TALEKAR, S.; WAINGADE, S.; GAIKWAD, V.; PATIL, S. and NAGAVEKAR, N. (2012). Preparation and characterization of cross linked enzyme aggregates (CLEAs) of *Bacillus amyloliquefaciens* alpha amylase. *Journal of Biochemical Technology*, vol. 3, no. 3. ISSN 0974-2328. In press.

VERMELHO, A.B.; MELO, A.C.N.; SÁ, M.H.B.; SANTOS, A.L.S.; D'AVILA-LEVY, C.M.; COURI, S. and BON, E.P.S. (2008). Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. and CORVO, M.L. eds. *Enzimas em biotecnologia - produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro, Interciência, p. 273-287.

VERTOMMEN, M.A.M.E.; NIERSTRASZ, V.A.; VAN DER VEER, M. and WARMOESKERKEN, M.M.C.G. (2005). Enzymatic surface modification of poly(ethylene terephthalate). *Journal of Biotechnology*, vol. 120, no. 4, p. 376–386. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.06.015.

WANG, P.; CUI, L.; WANG, Q.; FAN, X.; ZHAO, X. and WU, J. (2010). Combined use of mild oxidation and cutinase/lipase pretreatments for enzymatic processing of wool fabrics. *Engineering in Life Sciences*, vol. 10, no. 1, p. 19-25. DOI: 10.1002/elsc.200900041.

ZHANG, Y.; CHEN, S.; XU, M; CAVACO-PAULO, A.; WU, J. and CHEN, J. (2010). *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 20