

Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Márcio Domingos Moreira de Sousa

Otimização da fermentação para a produção de compostos fenólicos

Dissertação de Mestrado
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica
Ramo em Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho realizado sob orientação da
Professora Doutora Isabel Cristina Almeida Pereira Rocha
do
Doutor Nuno Costa Martins de Faria
e da
Doutora Adelaide Correia Braga

outubro de 2018

Declaração

Nome: Márcio Domingos Moreira de Sousa

Título dissertação: Otimização da fermentação para a produção de compostos fenólicos

Orientadores: Isabel Cristina de Almeida Pereira da Rocha

Nuno Costa Martins de Faria

Adelaide Correia Braga

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado:

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Tecnologia Química e Alimentar

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA DISSERTAÇÃO (PÁGINAS V E VI), APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, 31/10/2018

Assinatura: _____

Agradecimentos

A realização do presente trabalho foi possível graças à Universidade do Minho, especialmente graças ao departamento de Engenharia Biológica e pessoas incríveis que o integram.

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos à Doutora Isabel Rocha e ao Doutor Nuno Faria por todo o conhecimento transmitido, disponibilidade, orientação, e pela oportunidade de estagiar na Biotempo e participar no projeto BacHBerry.

Embora o presente trabalho resulte de um esforço coletivo, com inúmeras contribuições diretas e indiretas, não posso deixar de enaltecer a ajuda e apoio da Doutora Adelaide Braga. A sua ajuda foi fundamental para a elaboração e conclusão do presente trabalho. Estou extremamente grato pela imensa paciência, disponibilidade, vasto conhecimento transmitido e acima de tudo por incentivar e motivar na hora certa.

A todos os colegas de trabalho do laboratório de biosistemas e bioprocessos, especialmente à Patrícia Ferreira e Joana Oliveira, por toda a ajuda teórica e prática prestada, um muito obrigado.

Quero agradecer a todos os amigos que animaram e enriqueceram o meu percurso académico.

Agradeço também à minha família, especialmente aos meus irmãos, Hélder e Mónica, e à minha mãe, Margarida Moreira, pelo apoio moral e suporte emocional. Agradeço sobretudo à minha mãe, por quem nutro um profundo sentimento de apreço, que com grande esforço me manteve a estudar.

Por último, mas não menos importante, à Mónica Oliveira pelo companheirismo, ajuda nos momentos mais difíceis, e sobretudo pela sua paciência.

Resumo

Otimização da fermentação para a produção de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos, gerados na sua maioria por plantas, são um grupo de metabolitos secundários com elevado potencial farmacológico. Embora a extração de compostos fenólicos das plantas seja uma atividade recorrente, existem vários contras relativamente a este processo. Uma alternativa ao processo de extração é a síntese química. Porém, muitos destes processos são realizados em condições extremas, requerem elevadas quantidades de energia e precursores tóxicos para o homem e para o meio ambiente. Uma alternativa aos processos de extração, e de síntese química, são os processos biotecnológicos.

A presente dissertação foca na implementação de múltiplas estratégias para otimizar a produção de salidroside pela *C. glutamicum* DelAro4, nomeadamente a composição do meio e o modo de operação em bioreator. Foram avaliadas as concentrações ideais do precursor da salidroside, o tirosol, assim como as concentrações ideais de inóculo e glucose. Além do meio, otimizou-se o modo de operação dos bioreatores.

A adição de várias concentrações de tirosol, em modo descontínuo, a culturas de *C. glutamicum* DelAro4 em matraz, permitiu avaliar a sua toxicidade. Concluiu-se que a adição de baixas concentrações de tirosol, 60 mM, após 5 horas de fermentação, permitem obter concentrações mais elevadas de biomassa (12.3 g·L⁻¹) e, conseqüentemente, concentrações mais elevadas de salidroside (31.5 mM).

Observou-se que a adição de 40 mM de tirosol, em modo descontínuo, a culturas de *C. glutamicum* DelAro4 em bioreator, com 40 g·L⁻¹ de glucose após 5 horas de fermentação, causa uma inibição superior à observada nos ensaios em matraz. De modo a contrariar este efeito, e a obter uma concentração mais elevada de biomassa, aumentou-se a concentração de glucose para 80 g·L⁻¹, que permitiu obter concentrações mais elevadas de salidroside (32.2 mM).

Após o crescimento e produção de salidroside em modo descontínuo, testaram-se duas estratégias de alimentação semi-contínuas, adição de tirosol por caudal constante e por pulsos. Verificou-se que a melhor estratégia para a produção de salidroside é a adição de tirosol por pulsos, com 120 g·L⁻¹ de glucose. No entanto esta estratégia não permite um aumento de biomassa, como esperado, mas resulta num perfil de produção distinto que se traduz em concentrações de salidroside máximas (60 mM).

Abstract

Fermentation optimization for the production of phenolic compounds

Phenolic compounds, mostly produced by plants, are a group of secondary metabolites with high pharmacological potential. Although extracting phenolic compounds from plants is a recurring activity, there are several constraints in this process. An alternative to the extraction process is chemical synthesis. However, many of these processes are performed under extreme conditions, requiring high amounts of energy and toxic precursors to man and to the environment. An alternative to the extraction processes and chemical synthesis, are the biotechnological processes.

The present dissertation focuses on the implementation of multiple strategies to optimize the production of salidroside by *C. glutamicum* DelAro4, namely the medium composition and the operation's mode of the bioreactors. The optimum concentrations of the salidroside precursor, tyrosol, as well as optimum concentrations of inoculum and glucose were evaluated.

The addition of various concentrations of tyrosol to batch cultures of *C. glutamicum* DelAro4 in shake flasks experiments allowed to evaluate its toxicity. It was concluded that low concentrations of tyrosol, 60 mM of tyrosol added after 5 hours of fermentation, yielded higher concentrations of biomass (12.3 g·L⁻¹) and, consequently, higher concentrations of salidroside (31.5 mM).

The addition of 40 mM of tyrosol to batch cultures of *C. glutamicum* DelAro4 in bioreactor, with 40 g·L⁻¹ glucose, after 5 hours of fermentation, has been shown to cause greater inhibition than that observed in the shake flask experiments. In order to counteract this effect, and to obtain a higher concentration of biomass, the glucose concentration was increased to 80 g·L⁻¹, which allowed to obtain higher concentrations of salidroside (32.2 mM).

After culture growth and salidroside production in batch mode, two fed-batch strategies, addition of tyrosol by constant flow and by pulses, were also tested. It has been found that the best strategy for salidroside production is the addition of tyrosol by pulses, with 120 g·L⁻¹ glucose, that does not result in an increase in biomass concentration, as expected, but results in a distinct production profile which translates into higher salidroside concentrations (60 mM).

Índice

1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Compostos fenólicos	7
2.1.1. Salidroside	9
2.2. Vias de síntese dos compostos fenólicos	11
2.3. Produção de salidroside	12
2.3.1. Exploração de <i>Rhodiola</i> spp.	12
2.3.2. Síntese química	13
2.3.3. Síntese biotecnológica	14
2.3.3.1. Biotransformação	14
2.3.3.2. Biossíntese <i>de novo</i>	15
2.4. Extração e purificação de salidroside	18
2.5. Via de produção de salidroside	20
2.6. <i>C. glutamicum</i>	21
2.6.1. Relevância industrial	21
2.6.2. Produção de compostos aromáticos	22
3. Materiais e métodos	25
3.1. Microrganismo	27
3.2. Conservação da estirpe	28
3.3. Meios de cultura	28
3.4. Ensaio em matraz	30
3.5. Ensaio em bioreator	31
3.5.1. Operação descontínua	32
3.5.2. Operação semi-contínua	32
3.6. Métodos analíticos	33

3.6.1.	Determinação da concentração de biomassa	33
3.6.2.	Determinação da concentração de Salidrosina	34
3.7.	Cálculo dos parâmetros fisiológicos	35
3.8.	Análise estatística	35
4.	Resultados e discussão	37
4.1.	Influência da concentração de glucose no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4	39
4.2.	Influência da concentração de DMSO no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4	41
4.3.	Influência da concentração de tirosol no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 e produção de salidrosina	43
4.3.1.	Operação descontínua	43
4.3.2.	Operação semi-contínua	55
4.3.2.1.	Alimentação de tirosol com caudal constante	56
4.3.2.2.	Alimentação de tirosol por pulsos	58
5.	Conclusões e perspectivas futuras	65
	Bibliografia	69
	Anexos.....	85

Lista de abreviaturas

UGT – Uridina difosfato-glucuronosiltransferase
GRAS – *Generally Recognized As Safe*
ROS – Espécies reativas de oxigênio
AAA – Aminoácidos aromáticos
ADN – Ácido desoxirribonucleico
ATP – Adenosina trifosfato
PEP – Fosfoenolpiruvato
PDT – Prefenato desidratase
AAAAT – Aminoácido aromático aminotransferase
SAL – Salidrosinase
PDC – Piruvato descarboxilase
4-HPAA – 4-hidroxifenilacetaldeído
ACC – Agregado de calo compacto
PAL – Fenilalanina amônia-liase
TAL – Tirosina amônia-liase
PhGs – Feniletanóides glicosídeos
AIP – 2-aminoindan-2-fosfónico
TDC – Tirosina descarboxilase
TIO – Tiramina oxidase
AAS – Aromático acetaldeído sintase
UGT T8GT – UDP-glicose 4-O-glicosiltransferase
4CL – p-coumaroil CoA ligase
CHS – calcona sintase
CHI – calcona isomerase
STS – estilbeno sintase
IBG – *Institute of Bio and Geosciences*
BHI – *Brain Heart Infusion*
IPTG – Isopropil-D-1-tiogalactopiranósido
PES – Polietersulfona
DMSO – Dimetilsulfóxido
rpm – Rotações por minuto

RPA – Reatores perfeitamente agitados

OD – Oxigênio dissolvido

v_m – Volume de ar por volume médio e minuto

DO – Densidade ótica

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

UHPLC – *Ultra high-performance liquid chromatography*

HSCCC – *High-speed counter-current chromatography*

KMV – 2-ceto-3-metilvalerato

MES – Ácido 2-(4-morfolino) etanossulfônico

HEPES – Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfônico)

PIPES – Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanossulfônico)

MOPS – Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico

DAHP – 3-Desoxi-D-arabino heptulosonato 7-fosfato

Lista de figuras

Figura 1 – Estrutura molecular da salidroside (2-(4-hidroxifenil)etil- β -D-glucopiranoside).	9
Figura 2 – Síntese de fenóis pela via do chiquimato e do ácido malónico (Adaptado de (Taiz e Zeiger, 2010)).	11
Figura 3 – Via metabólica da síntese de salidroside em <i>Rhodiola</i> spp. A transformação de L-tirosina em 4-HPAA é catalisada pela 4HPAAS. O 4-HPAA é posteriormente transformado em tirosol, por ação catalítica da 4HPAR, que serve de precursor para a salidroside juntamente com UDP-glucose. Adaptado de Torrens-Spence et al., (2018).....	20
Figura 4 – Curvas de crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII), 30°C, pH 7 e 30% OD, com diferentes concentrações de glucose: ● 40 g·L ⁻¹ ; ■ 80 g·L ⁻¹ . Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.....	39
Figura 5 – Curvas de crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L ⁻¹ , meio definido (CGXII), 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de DMSO: × 0 mM; ● 80 mM; ■ 110 mM; ▲ 170 mM; ◆ 200 mM. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.....	41
Figura 6 – (A) Curvas de crescimento e (B) produção de salidroside de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L ⁻¹ , meio definido (CGXII), 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: × 0 mM; ● 40 mM; ■ 60 mM; ▲ 80 mM; ◆ 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L ⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.	44
Figura 7 – (A) Curvas de crescimento e de (B) produção de salidroside de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 1 g·L ⁻¹ , meio definido (CGXII), 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: × 0 mM; ■ 60 mM; ▲ 80 mM; ◆ 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L ⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.	46

Figura 8 – (A) Curvas de crescimento e de (B) produção de salidroside de *C. glutamicum* DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, meio definido (CGXII), 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ■ 60 mM; ▲ 80 mM. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes..... 48

Figura 9 – Curvas de crescimento e de produção de salidroside de *C. glutamicum* DelAro4 em bioreatores de 2-L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L⁻¹ glucose, 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ● crescimento; ■ Salidroside. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes. 51

Figura 10 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 e produção de salidroside em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose, 30% OD e 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ● Crescimento; ■ salidroside. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes. 54

Figura 11 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 e produção de salidroside em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose, 30% OD. Primeiro caudal de alimentação (2.4 mL·h⁻¹) iniciado às 6 horas com adição simultânea de um pulso de 20 mM de tirosol em ambos os ensaios. Segundo caudal (21.25 mL·h⁻¹ em C1 e 14.5 mL·h⁻¹ em C2) iniciado às 31 horas de fermentação. Segundo caudal interrompido às 56 horas em C1 e às 80 horas em C2. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). ● Crescimento; ■ salidroside. (A) Alimentação com condição C1; (B) Alimentação com condição C2. 56

Figura 12 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* e produção de salidroside em bioreator de 2-L com meio definido (CGXII) a 30°C, pH 7, 120 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação e concentrações de tirosol; ● Crescimento; ■ Salidroside; (setas) Pulsos tirosol; (A) Alimentação com condição P1; (B) Alimentação com condição P2; (C) Alimentação com condição P3. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-

2 g·L⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.59

Lista de tabelas

Tabela 1 – Processos biotecnológicos de produção de salidroside	17
Tabela 2 – Parâmetros fisiológicos de várias estirpes <i>C. glutamicum</i> cultivadas em meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L ⁻¹ glucose e 30% de OD, onde μ_{max} é a taxa específica de crescimento, X é a concentração máxima de biomassa e Y _{x/s} é o rendimento de biomassa/glucose.	22
Tabela 3 – Plasmídeos utilizados para a construção da estirpe utilizada na presente dissertação.	27
Tabela 4 – Concentração dos constituintes do meio BHI modificado.	28
Tabela 5 – Concentrações dos constituintes do meio CGXII.	29
Tabela 6 – Concentração dos constituintes da solução de micronutrientes utilizada no meio CGXII.	30
Tabela 7 – Condições da alimentação escalonada por pulsos. Pulsos realizados nas condições P1, P2 e P3 ao longo do tempo.	33
Tabela 8 – Parâmetros fisiológicos.	35
Tabela 9 – Parâmetros fisiológicos de culturas de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 0.5 g·L ⁻¹ , 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: 40, 60, 80 e 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L ⁻¹ . Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.	45
Tabela 10 – Parâmetros fisiológicos de culturas de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 1 g·L ⁻¹ , 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: 40, 60, 80 e 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L ⁻¹ . Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.	47
Tabela 11 – Parâmetros fisiológicos de culturas de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 0.5 g·L ⁻¹ , 40 g·L ⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas após a biomassa atingir 1.5-2 g·L ⁻¹ : 60 e 80 mM. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.	49

Tabela 12 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L⁻¹ glucose e 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.....53

Tabela 13 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose e 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.....55

Tabela 14 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação: C1 e C2. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.....57

Tabela 15 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 120 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação e concentrações: P1,P2 e P3. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.62

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

No presente capítulo apresentam-se o enquadramento da dissertação e os seus principais objetivos.

Os metabolitos secundários são uma importante fonte de medicamentos atualmente utilizados e são um recurso importante para a descoberta de novos fármacos (Kinghorn *et al.*, 2011; M. Cragg e J. Newman, 2012). A sua utilização como medicamentos sobrepõe-se ao uso como corantes, aromatizantes e fragrâncias, entre outros.

Os compostos fenólicos estão amplamente distribuídos no reino das plantas e estão entre os seus mais abundantes metabolitos secundários (Dai e Mumper, 2010). Estima-se que existam mais de 200.000 metabolitos secundários de plantas (Weckwerth, 2003) e que 20% do carbono fixado pela fotossíntese seja canalizado para a via fenilpropanóide (Ralston *et al.*, 2005).

No entanto, a utilização de compostos fenólicos produzidos pelas plantas em aplicações farmacêuticas e biotecnológicas é ainda limitada face ao seu potencial, uma vez que estes tendem a acumular em baixas quantidades durante um extenso período de tempo, os rendimentos estão dependentes de fatores abióticos e a purificação do composto desejado requer separação de uma multiplicidade de outros compostos de estrutura semelhante (Chemler e Koffas, 2008). A síntese química de compostos fenólicos, moléculas frequentemente complexas, é possível mas revela-se impraticável para vias com mais de 10 passos, dado cada passo diminuir o rendimento e aumentar os desperdícios e recursos (Chemler e Koffas, 2008). A dificuldade de produzir compostos fenólicos em quantidades substanciais por métodos tradicionais de extração e a complexidade inerente à síntese química é uma objeção à sua comercialização. A biossíntese de compostos fenólicos por meio de microrganismos recombinantes surge como uma alternativa aos métodos tradicionais (Marienhagen e Bott, 2013).

O projeto BacHBerry, do qual resulta a presente dissertação, incidiu no desenvolvimento de metodologias inovadoras, sustentáveis e economicamente viáveis, para a produção compostos fenólicos, isolados a partir de bagas, com recurso a plataformas bacterianas. Tais metodologias incluíram a bioprospeção, caracterização das vias metabólicas, modificação genética de bactérias e a otimização de processos de fermentação (Dudnik *et al.*, 2018). A integração dos dados adquiridos permitiu associar a produção de salidroside à uridina difosfato-glucuronosiltransferase, UGT, na presença de tirosol. Com recurso a estratégias de engenharia genética construiu-se uma estirpe de *Corynebacterium glutamicum* capaz de sintetizar UGT.

A *C. glutamicum* possui o estatuto GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e é utilizada profusamente para a produção de aminoácidos (Becker e Wittmann, 2012). O genoma da *C. glutamicum* foi publicado em 2003 (Ikeda e Nakagawa, 2003) possibilitando posteriores modificações genéticas de modo produzir uma variedade de compostos de interesse como ácidos

orgânicos, álcoois, diaminas, entre outros (Zahoor *et al.*, 2012). Recentemente a *C. glutamicum* foi geneticamente manipulada de modo a produzir compostos fenólicos como estilbenos e flavononas (Kallscheuer *et al.*, 2016).

A presente dissertação tem como principal objetivo a otimização da produção de salidroside pela *C. glutamicum* DelAro4 pMK2_malE-UGTOs pEKEx3_galU_pgm. Para tal modificou-se a composição do meio de cultura e o modo de operação dos bioreatores de forma a maximizar a produção do composto de interesse.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Do presente capítulo consta uma breve descrição dos compostos fenólicos, incluindo a salidroside, e as principais vias de produção. Refere-se também o estado da arte relativamente à produção de salidroside que compreende o cultivo de *Rhodiola spp.*, síntese química e síntese biotecnológica.

Apresentam-se ainda a relevância industrial da *C. glutamicum* e o seu potencial como plataforma para produção de compostos fenólicos de plantas.

2.1.	Compostos fenólicos	7
2.1.1.	Salidroside	9
2.2.	Vias de síntese dos compostos fenólicos	11
2.3.	Produção de salidroside	12
2.3.1.	Exploração de <i>Rhodiola spp.</i>	12
2.3.2.	Síntese química	13
2.3.3.	Síntese biotecnológica	14
2.3.3.1.	Biotransformação	14
2.3.3.2.	Biossíntese <i>de novo</i>	15
2.4.	Extração e purificação de salidroside	18
2.5.	Via de produção de salidroside	20
2.6.	<i>C. glutamicum</i>	21
2.6.1.	Relevância industrial	21
2.6.2.	Produção de compostos aromáticos.....	22

2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos maiores e mais amplamente distribuídos grupos de metabolitos secundários das plantas (Scalbert e Williamson, 2000). São um grupo quimicamente heterogêneo de aproximadamente 10.000 compostos individuais (Taiz e Zeiger, 2010). Apesar dos compostos fenólicos serem classificados como metabolitos secundários, ou seja, não essenciais à sobrevivência do organismo produtor, estes desempenham várias funções tais como de coloração das folhas, flores e frutos, antimicrobianos, antifúngicos, inseticidas, protetores de radiação UV, quelantes de metais pesados tóxicos, proteção antioxidante dos radicais livres gerados durante o processo fotossintético e formam os precursores da lignina, o material de impermeabilização e fortalecimento do tecido vascular das plantas (Parr e Bolwell, 2000). Determinados compostos fenólicos de baixo peso molecular são ubíquos em plantas superiores e outros, mais complexos, ocorrem apenas em determinadas espécies (Cheynier *et al.*, 2013). Não obstante à grande diversidade de estruturas, é regra a presença de um anel de benzeno com um hidrogênio substituído por um grupo hidroxilo (-OH) (Boudet, 2007).

Os compostos fenólicos são também designados de polifenóis. No entanto, uma classificação clara de um composto como 'polifenol' é complicada, uma vez que existem diferentes definições para o termo 'polifenol'. 'Poli' pode aludir a presença de vários grupos -OH num anel de benzeno (definição I) ou a presença de dois ou mais anéis de benzeno (definição II) (Kallscheuer, 2017). Os compostos fenólicos têm sido caracterizados com base na sua estrutura, C6 (fenóis simples, benzoquinonas), C6-C1 (ácidos fenólicos e aldeídos), C6-C2 (feniletanóides, acetofenonas, ácidos fenilacéticos), C6-C3 (ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas, fenilpropanos, cromonas), C6-C4 (naftoquinonas), C6-C1-C6 (xantonas), C6-C2-C6 (estilbenos, antraquinonas), C6-C3-C6 (flavonóides, isoflavonóides, neoflavonóides), (C6-C3-C6)_{2,3} (bi/tri-flavonóides, dímeros e trímeros de proantocianidina), (C6-C3)₂ (lignanós, neolignanós), (C6-C3)_n (lignina), (C6-C3-C6)_n (taninos condensados) (Eich, 2008; Cheynier *et al.*, 2013; Giada, 2016).

Atualmente, o crescente interesse pelas aplicações práticas dos compostos fenólicos tem estimulado uma ampla gama de estudos biológicos e epidemiológicos, visando caracterizar as suas propriedades promotoras de saúde (Boudet, 2007). Vários estudos indicam que os compostos fenólicos possuem atividade antibacteriana, anti-inflamatória, anti-cancerígena e anti-envelhecimento (Boudet, 2007; Rempe *et al.*, 2017).

O *stress* oxidativo, causado por espécies reativas de oxigênio (ROS), desempenha um papel crucial na fisiopatologia associada à neoplasia, aterosclerose e doenças neurodegenerativas. O desenvolvimento de cancro induzido por ROS envolve, por exemplo, a transformação maligna de células devido a mutações de ADN, bem como a modificação da expressão genética através de mecanismos epigenéticos (Ki e Hyong, 2006). Um grande número de estudos epidemiológicos sugere que um elevado consumo de frutas e vegetais ricos em antioxidantes está inversamente correlacionado com a incidência de cancro (BouDET, 2007). No entanto, certos antioxidantes exibem atividade pró-oxidante e potencial carcinogénico sob determinadas condições, pelo que a ingestão de compostos fenólicos isolados em elevadas quantidades pode ser nociva para saúde humana (Ki e Hyong, 2006). De forma similar, baixas concentrações de compostos fenólicos demonstram diminuir o *stress* oxidativo em bactérias por redução de ROS e concentrações elevadas apresentam potencial pró-oxidante e inibem o seu crescimento (Taleb *et al.*, 2016). Vários compostos fenólicos possuem propriedades antibacterianas como resultado do potencial pró-oxidante, que causa mudanças físico-químicas e estruturais em microrganismos. No entanto, permanece por esclarecer de que modo o potencial antioxidante contribui para a atividade bacteriostática e bactericida dos compostos fenólicos (Taleb *et al.*, 2016).

Os compostos fenólicos possuem grandes variações estruturais e o impacto da ação antimicrobiana em microrganismos depende dessas mesmas configurações (Gyawali e Ibrahim, 2014). Estes podem exercer ação antimicrobiana de duas formas, por disrupção do funcionamento da membrana celular ou por mecanismos de ação não membranares (Rempe *et al.*, 2017). A disrupção do funcionamento da membrana contribui para a atividade antibacteriana da maioria dos compostos fenólicos de plantas estudados, tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (Rempe *et al.*, 2017). No entanto, os mecanismos específicos que levam à falha estrutural da membrana celular não são completamente compreendidos, permanecendo questões sobre se os compostos alteram a estabilidade da membrana por interação direta ou por interferência com processos intracelulares (Rempe *et al.*, 2017). Além dos mecanismos de ação antimicrobianos membranares, estão identificados vários mecanismos de ação não membranares (Rempe *et al.*, 2017). Determinados compostos fenólicos, como a quercetina, apresentam ação antimicrobiana por disrupção do funcionamento da membrana celular e por mecanismos de ação não membranares (Rempe *et al.*, 2017).

Acredita-se que os grupos hidroxilo (-OH) são responsáveis pela ação inibitória dos compostos fenólicos (Lai e Roy, 2004). A sua quantidade e a posição relativa nos compostos fenólicos

aparentam influenciar a atividade antimicrobiana (Ammendola *et al.*, 2008; Gyawali e Ibrahim, 2014). O potencial antimicrobiano depende também da existência de ligações duplas, que permitem a deslocalização de elétrons e subsequente doação de prótons dos grupos –OH (Ultee *et al.*, 2002). Curiosamente, o número de grupos –OH também está relacionado com a atividade antioxidante (Rice-Evans *et al.*, 1996). Contudo, a relação entre atividade antioxidante e antimicrobiana não é completamente compreendida (Rempe *et al.*, 2017).

2.1.1. Salidrosin

A salidrosin (2-(4-hidroxifenil)etil-β-D-glucopiranos) (Figura 1) foi inicialmente isolada de *Rhodiola rosea* juntamente com a sua aglicona, tirosol (2-(4-Hidroxifenil)etanol), e denominada ‘rodiosida’ (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015). A designação ‘rodiosida’ foi posteriormente redefinida para salidrosin, dado o seu prévio isolamento a partir de *Salix triandra L.* em 1926 (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015). A salidrosin era inicialmente o principal marcador para identificação e padronização de extratos de *R. rosea* (Brown *et al.*, 2002). No entanto, a salidrosin foi isolada de várias outras espécies de *Rhodiola* (Grech-Baran *et al.*, 2015). Adicionalmente, a salidrosin, além de presente na família Crassulaceae, está presente em *Vaccinium vitis-idaea* (Ericaceae), *Olea europaea* (Oleaceae), *Betula platyphylla* (Betulaceae), entre outras (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015).

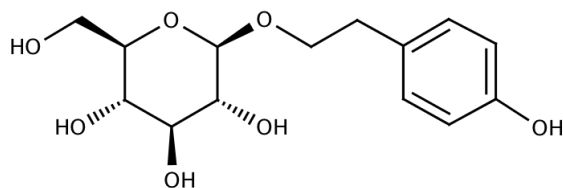


Figura 1 – Estrutura molecular da salidrosin (2-(4-hidroxifenil)etil-β-D-glucopiranos).

A primeira descrição escrita de *R. rosea* data de 77 d.C., quando o médico e botânico Grego Dioscórides descreveu a ‘*rodia riza*’ em *De Materia Medica* (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015). Em 1725, a *R. rosea* era tradicionalmente utilizada em países como Suécia, Noruega, Alemanha, nos

países da ex-união soviética e Islândia para o aumento da resistência física, produtividade no trabalho, longevidade, resistência à doença da altitude e tratamento da fadiga, depressão, anemia, impotência, indisposições gastrointestinais, infecções e desordens do sistema nervoso (Brown *et al.*, 2002; Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015). A *R. rosea* é descrita em várias farmacopeias oficiais de múltiplos países do continente europeu, notavelmente, Suécia, França, e Rússia, e os efeitos positivos da planta são atribuídos à salidroquina, tirosol e rosavinas (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015; Grech-Baran *et al.*, 2015; Cui *et al.*, 2017).

Além das observações etnofarmacológicas supracitadas, a salidroquina foi extensivamente estudada em animais e modelos celulares. Estudos farmacológicos modernos demonstraram que a salidroquina possui várias atividades biológicas, como resistência à anoxia, antirradiação, anti-fadiga, anti-tumoral, prevenção de doenças cardiovasculares e anti-envelhecimento (Luo *et al.*, 2017).

A salidroquina demonstrou possuir atividade anti-tumoral ao inibir o crescimento de várias linhas de células tumorais, como hepatoma QGY-7703, hepatoma SMMC-7721, células HeLa, adenocarcinoma gástrico humano, células SGC-7901 e células SW1116 (Yang e Liu, 2001; Razzaque e Taguchi, 2002; Sun, Xia e Xia, 2015; Luo *et al.*, 2017). Demonstrou também inibir a migração e invasão das células cancerígenas (Sun, Xia e Xia, 2015) e diminuir significativamente a angiogênese de células tumorais (Skopińska-Rózska *et al.*, 2008).

A salidroquina promove a biossíntese de mitocôndrias e possui potencial antioxidante (Luo *et al.*, 2017). Quando se produzem ROS em excesso a mitocôndria é exposta a ambientes com altas concentrações de oxigênio reativo que afetam o seu normal funcionamento (Xing *et al.*, 2014). As mitocôndrias danificadas produzem menos ATP e quantidades mais elevadas de ROS, potenciando um ciclo vicioso. Portanto, a promoção da biossíntese de mitocôndrias e das suas funções pode diminuir os níveis de ROS e reduzir os danos oxidativos (Xing *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2017). Além de favorecer a biossíntese de mitocôndrias, a salidroquina elimina radicais livres presentes nas células (Luo *et al.*, 2017).

Ensaio em humanos, embora não descritos na literatura para a salidroquina, foram realizados com extratos de *Rhodiola* spp. que contêm, entre outros compostos ativos, salidroquina. Vários ensaios clínicos em humanos com dupla ocultação e randomizados mostram que a *Rhodiola* spp. pode ter efeitos benéficos no desempenho físico, no desempenho mental e em certas condições de saúde mental, algumas das quais relacionadas com o *stress* (Hung, Perry e Ernst, 2011). Há, no entanto, uma falta de replicações independentes em alguns dos estudos realizados (Hung, Perry e Ernst, 2011).

2.2. Vias de síntese dos compostos fenólicos

Os compostos fenólicos derivam de duas vias de síntese, a via do chiquimato, via pela qual são formados os fenóis complexos, e a via do ácido malónico, da qual resultam os fenóis simples (Vuong, 2017). A combinação das duas vias resulta na síntese de flavonóides, o grupo de compostos fenólicos mais abundantes na natureza (Figura 2) (Vuong, 2017). Estas vias sintéticas produzem uma grande variedade de estruturas monoméricas e poliméricas que possuem diversas funções fisiológicas em plantas (Cheynier *et al.*, 2013).

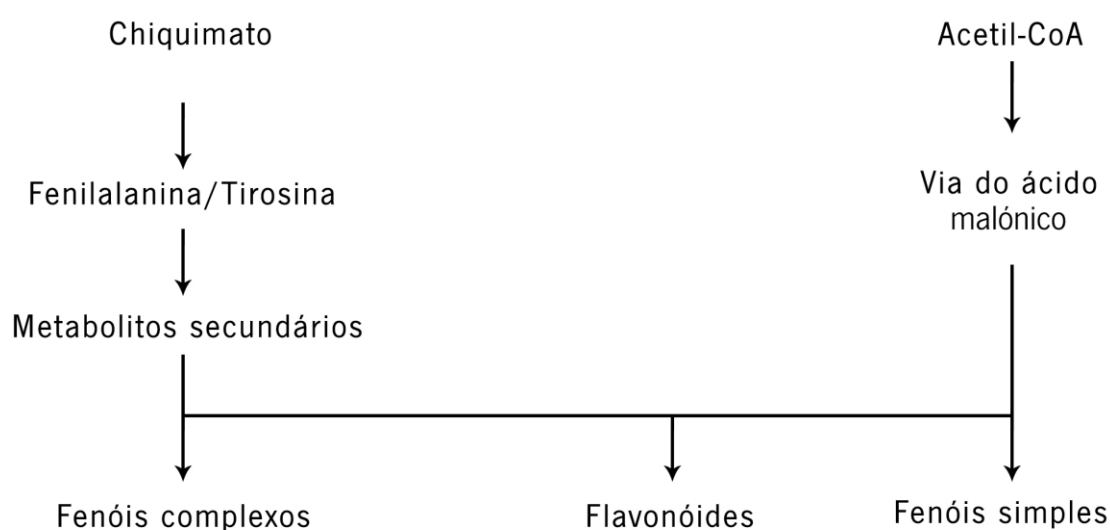


Figura 2 – Síntese de fenóis pela via do chiquimato e do ácido malónico (Adaptado de (Taiz e Zeiger, 2010).

Em bactérias, fungos e plantas, os aminoácidos aromáticos (AAA), fenilalanina e tirosina, são sintetizados a partir de um precursor comum, o corimato, que deriva da via do chiquimato (Figura 2) (Tzin e Galili, 2010). As bactérias direcionam mais de 90% da energia metabólica para a síntese de proteínas e conseqüentemente a via do chiquimato dos microrganismos serve quase exclusivamente a síntese de AAA (Herrmann, 1995). Em oposição, as plantas superiores utilizam os aminoácidos aromáticos não apenas para síntese proteica, mas também, e em maiores quantidades, como precursores de um vasto número de metabolitos secundários, com múltiplas funções biológicas e valor biotecnológico (Herrmann, 1995; Vogt, 2010). Assim, a via do chiquimato participa na biossíntese da maioria dos compostos fenólicos de plantas e a via do ácido malónico,

embora uma fonte importante de compostos fenólicos em fungos, bactérias e algas, é de menor importância em plantas superiores (Figura 2) (Taiz e Zeiger, 2010).

A biossíntese dos AAA em todos os organismos começa com a condensação de PEP (fosfoenolpiruvato) e E4P (eritrose 4-fosfato), e prossegue para o corismato, do qual resultam o triptofano, tirosina e fenilalanina (Ikeda, 2006). A sobreprodução de L-tirosina e L-fenilalanina por estirpes mutantes de *C. glutamicum* está descrita na literatura, o que a torna numa plataforma extremamente útil para a produção de compostos fenólicos de plantas (Hagino e Nakayama, 1974).

2.3. Produção de salidroside

2.3.1. Exploração de *Rhodiola* spp.

As *Rhodiola* spp. são a principal fonte de salidroside no mercado global. O aumento da procura de plantas da espécie *Rhodiola*, dado o seu potencial medicinal e comercial, levantou questões acerca da sua sobre-exploração. As populações naturais de *R. rosea* estão altamente ameaçadas e incluídas na lista de espécies de plantas ameaçadas em vários países (Rússia, Grã-Bretanha, República Checa, Bósnia e Herzegovina, vulneráveis na Eslováquia, com coleta estritamente proibida na Bulgária e na Polónia a *R. rosea* só é encontrada em Parques Nacionais (Grech-Baran *et al.*, 2015). O aumento das trocas comerciais da *R. rosea* e outras espécies de *Rhodiola* põe em questão a conservação do próprio género (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015).

As *Rhodiola* spp., plantas perenes herbáceas, podem ser obtidas por cultivo em 5 a 7 anos (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015; Grech-Baran *et al.*, 2015). No entanto, as plantas cultivadas contêm menores concentrações de salidroside (~0.5%) e são sensíveis a doenças radiculares, tornando o processo de cultivo dispendioso (Zhang *et al.*, 2005; Grech-Baran *et al.*, 2015). Apenas proliferam em zonas com temperaturas baixas, em solos com boa drenagem, arenosos e húmidos, com sol direto, elevada precipitação e as sementes possuem uma taxa de germinação baixa (10%) (Galambosi, 2006; Vstatieva, 2008). Deste modo, as colheitas de *Rhodiola* spp. provêm sobretudo da natureza e a organização mundial de saúde já advertiu para as consequências negativas da sobre-exploração de plantas medicinais nos seus habitats naturais (World Health Organization, 2003; Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015).

Apesar de grande parte das plantas utilizadas para transformação provirem da natureza, vários cultivos foram realizados com sucesso na Polónia, Bulgária, Finlândia e Rússia, com rendimentos em raízes desidratadas na ordem de 3-5 ton·ha⁻¹ (Galambosi, 2006, 2016; Vstatieva,

2008). Considerando que as raízes das culturas de *Rhodiola* spp. contêm aproximadamente 0.5% (p/p) de salidroside, é possível obter entre 15 a 25 Kg·ha⁻¹ de salidroside após 4 a 5 anos do cultivo (Vstatieva, 2008; Buchwald *et al.*, 2015; Galambosi, 2016).

As quantidades de fitoquímicos presentes nas plantas são influenciadas por vários fatores abióticos e bióticos, incluído a localização geográfica, condições do solo e meteorológicas, e a predisposição genética de populações de plantas para certas vias metabólicas (Lai e Roy, 2004). Além dos fitoquímicos, as plantas podem acumular minerais e metais pesados do solo tais como chumbo, cádmio, mercúrio e arsénico (Lai e Roy, 2004). A contaminação é indesejável, mas quase inevitável quando as plantas são de origem selvagem (Lai e Roy, 2004). Outros fatores, como o método de colheita, o procedimento de secagem, o manuseio, o transporte, a moagem, a exposição à luz e humidade e o armazenamento também afetam a qualidade do produto final (Lai e Roy, 2004).

Embora não existam no mercado formulações concentradas de salidroside, esta está presente nos extratos de *Rhodiola* spp. em baixas concentrações. Os extratos de *R. rosea* estão comercialmente disponíveis como suplemento alimentar e são utilizados, principalmente, pelas suas capacidades em diminuir a fadiga física e mental (Liu *et al.*, 2012). Os extratos de *R. rosea* SHR-5 são os únicos que passaram extensivos estudos toxicológicos e são geralmente reconhecidos como seguros (Liu *et al.*, 2012). Os extratos comerciais de *R. rosea* estão padronizados para a salidroside (0.8 – 1 %) e rosavinas (> 3 %) e são vendidos por fornecedores a fabricantes de suplementos dietéticos a preços que variam de 80-110 € / kg na UE e 70-100 \$ / kg nos USA, dependendo da qualidade do extrato (Cuerrier e Ampong-Nyarko, 2015; Bejar *et al.*, 2017). De acordo com Smith *et al.*, 2017 os suplementos alimentares à base de *Rhodiola* spp. figuram na 28.ª posição dos suplementos mais vendidos nos EUA em 2016. A venda de suplementos dietéticos de *Rhodiola* spp. nos EUA ultrapassou os 8 500 000 € em 2016 (Bejar *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2017).

2.3.2. Síntese química

Os processos químicos para a síntese de salidroside envolvem vários passos (proteção seletiva, ativação e acoplamento) que necessitam de reagentes dispendiosos, metais pesados como catalisadores e elevadas temperaturas de operação (140 C°) (Guo *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2014). Determinados processos requerem a utilização de reagentes como bromo, anidrido acético e brometo de tetrabutylamónio, extramente tóxicos para o meio ambiente e ser humano (Guo *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2014). Requerem também a utilização de metais pesados como cloreto de prata, cloreto de

zinco e paládio (Guo *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2014). Guo *et al.* (2010) e Liang *et al.* (2014) descrevem processos químicos para obtenção de salidroside com rendimentos de 91 e 47%, e tempos de reação de 20 e 15 horas, respectivamente.

Atualmente, não são conhecidos processos industriais de produção de salidroside por síntese química. No entanto, existem várias patentes relativas ao processo de fabricação de salidroside por esta via (CN104725440A, CN102286036A, CN102321127A).

2.3.3. Síntese biotecnológica

Os processos biotecnológicos são uma solução mais limpa, com produção de desperdícios reduzida e, geralmente, energeticamente mais eficientes relativamente aos processos de síntese química (Oecd, 1998). No entanto, de entre os vários tipos de processos biotecnológicos observam-se benefícios e inconvenientes.

A biotransformação envolve o uso de sistemas biológicos de modo a catalisar a conversão de um precursor em produto final (Liese *et al.*, 2006). Por outro lado, processos de biossíntese *de novo* permitem obter produtos a partir de fontes de carbono simples, sem recurso a precursores dispendiosos (Ghisalba *et al.*, 2010). Porém a produtividade de tais processos é em geral inferior em relação aos processos de biotransformação (Lopez-Gallego e Schmidt-Dannert, 2010).

2.3.3.1. Biotransformação

Estão descritos na literatura vários processos de biotransformação de tirosol em salidroside. O processo descrito por Xue *et al.* (2016) utiliza *Escherichia coli* (DE3) geneticamente manipulada, capaz de sintetizar UGT, para produção de salidroside na presença de tirosol (Tabela 1). Xue *et al.* (2016) identificaram e caracterizaram três UGTs de *Rhodiola sachalinensis* (UGT72B14, UGT73B6 e UGT74R1). De entre as três UGTs, a UGT72B14, que demonstrou a mais alta atividade para a produção de salidroside, foi posteriormente otimizada para expressão heteróloga em bactérias. A expressão de UGT72B14 foi otimizada pela mudança de 278 nucleótidos, com diminuição do conteúdo em G+C de 51.05%, sem alteração da sequência de aminoácidos, codificando códons preferencialmente utilizados pela *E. coli*. De todas as biotransformações citadas, a descrita por Xue *et al.* (2016) possui o 2º rendimento mais elevado (Tabela 1).

O processo de biotransformação descrito por Yu *et al.* (2008) assenta na utilização de extratos celulares de sementes de maçã maceradas, obtidas de fábricas de processamento de frutas, que

contêm enzimas necessárias à transformação do tirosol em salidroside. No entanto, os biocatalisadores responsáveis pela glicosilação do tirosol não são discriminados. Uma pesquisa no UNIPROT (3 de Maio de 2018) revelou que a *Malus domestica* possui várias UDP-UGTs, provavelmente responsáveis pela glicosilação observada por Yu *et al.* (2008). O biocatalisador demonstrou possuir uma vida útil de 29 dias. Com o *cross-linking* do material macerado, Yu *et al.* (2008) aumentaram o tempo de vida útil dos biocatalisadores de 29 dias para 51 dias. A temperatura do processo é a 2ª mais elevada dos processos citados (Tabela 1). A concentração máxima de salidroside é a mais elevada dos processos citados e a produtividade, devido ao extenso tempo de biotransformação, é a segunda mais elevada (Tabela 1).

Quando não é possível a utilização de células inteiras, quer por limitações difusionais do substrato e/ou produto, reações paralelas devido à presença de determinadas enzimas, quer por outros motivos, o uso das enzimas isoladas é aconselhado (Ghisalba *et al.*, 2010). O processo de biotransformação descrito por Zhang *et al.* (2005) envolve o uso de enzimas isoladas de *A. niger*, denominadas de salidrosideases (SAL), para a produção de salidroside a partir de tirosol e β -D-glucose. Zhang *et al.* (2005) apenas caracterizaram a enzima relativamente ao peso molecular (84.6 kDa) e temperatura e pH ótimos de transformação, 45 °C e 5.0, respetivamente, pelo que não é possível determinar se a SAL é uma UGT ou glicosidase. Uma pesquisa no UNIPROT (4 Maio de 2018) revelou que o *Aspergillus niger* possui várias glicosidases, provavelmente responsáveis pela glicosilação observada por Zhang *et al.* (2005). No entanto, é também possível que o *A. niger* possua UGTs não identificadas até à data. A concentração máxima de salidroside obtida pela SAL é a 2ª mais elevada dos processos citados e a produtividade é a mais elevada devido ao reduzido tempo de transformação (Tabela 1). O reduzido tempo de transformação pode dever-se à forma isolada das enzimas. No entanto, contabilizando os tempos de crescimento de *A. niger* e purificação das enzimas, o tempo total do processo é superior a 100 horas.

2.3.3.2. Biossíntese *de novo*

Com auxílio de técnicas de engenharia genética, introduzidas em 1970, enzimas de todos os tipos e de várias fontes biológicas podem agora ser produzidas e sobre expressas em microrganismos facilmente cultiváveis (BUD, 1989). Com o desenvolvimento da biologia de sistemas é possível descobrir e expressar vias inteiras de forma heteróloga em microrganismos, o que permite a produção *de novo* de vários compostos. Ao contrário da biotransformação, a biossíntese não depende de precursores, uma vez que os compostos de interesse são produzidos a partir de

nutrientes básicos (e.g. glucose, arabinose, lípidos). No entanto, a complexidade do sistema celular, que providencia o produto final, complica o controlo e a maximização do processo (Lopez-Gallego e Schmidt-Dannert, 2010). Um processo economicamente viável requer a conversão máxima do substrato (tipicamente uma fonte de carbono) no produto desejado sem produção de compostos indesejados, desperdícios e acumulação de metabolitos intermediários tóxicos (Lopez-Gallego e Schmidt-Dannert, 2010).

Os processos fermentativos de *E. coli* B-SAL2 DE3 e MG1655 descritos por Chung *et al.*, (2017) e Bai *et al.* (2014), respetivamente, permitem obter salidroside a partir da glucose. Porém, as concentrações máximas de salidroside e as produtividades de ambos os processos são reduzidas (Tabela 1). Chung *et al.*, (2017) manipularam geneticamente *E. coli* de modo a produzir tirosol a partir de tirosina, com recurso à piruvato descarboxilase (PDC), que converte 4-hidroxifenilpiruvato em 4-hidroxifenilacetaldéido (4-HPAA), e salidroside a partir do tirosol com recurso a uma UGT(85A1), proveniente de *Arabidopsis thaliana*. Adicionalmente procederam ao *knockout* dos genes *tyrR*, *pheA*, e *feaB*, de modo a direcionar recursos para a síntese de salidroside. Bai *et al.* (2014) procederam de forma semelhante a Chung *et al.*, (2017), com a exceção da UGT utilizada, expressando a UGT73B6 proveniente de *Rhodiola sachalinensis*, obtendo menores concentrações de salidroside (Tabela 1).

A salidroside ocorre naturalmente em determinados fungos parasitários como por exemplo no fungo endofítico *Phialocephala fortinii* Rac56 (Cui *et al.*, 2016). Os fungos endofíticos vivem nos tecidos de certas plantas sem causarem, aparentemente, qualquer sintoma de doença (Petrini *et al.*, 1993). Vários estudos demonstram que os fungos endofíticos se encontram virtualmente em todas as plantas estudadas (Strobel e Daisy, 2003). A coevolução a longo prazo, a interação complexa e a comunicação cruzada entre fungos endofíticos e seus hospedeiros, como trocas de sinais e transmissão de genes horizontais, ocorreram para lidar conjuntamente com *stresses* bióticos e abióticos (Kusari *et al.*, 2012). Nos últimos anos vários produtos secundários, derivados de plantas, foram isolados de fungos endofíticos tornando-os mais económicos e mais fáceis de produzir em maior escala por fermentação submersa (Cui *et al.*, 2016). Recentemente isolaram-se vários fungos endofíticos produtores de salidroside de diversas espécies de plantas (Cui *et al.*, 2016). Dos vários isolados destacou-se o fungo *P. fortinii* Rac56 pela sua demarcada capacidade de produzir salidroside (Tabela 1) (Cui *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Processos biotecnológicos de produção de salidroside

Método	Biotransformação			De novo Biossíntese			Cultura suspensa
	Biocatálise		Fermentação	Fermentação		Cultura suspensa	
Sistema	Sementes de maçã (Yu <i>et al.</i> , 2008)	<i>A. niger</i> MS-48 (Zhang <i>et al.</i> , 2005)		<i>E. coli</i> (DE3) (Xue <i>et al.</i> , 2016)	<i>E. coli</i> B-SAL2 DE3 (Chung <i>et al.</i> , 2017)		<i>E. coli</i> MG1655 (Bai <i>et al.</i> , 2014)
Catalisador	-	SAL	UGT	UGT	UGT	SAL	UGT
Temperatura (°C)	45	45	30	30	30	25	24
Tempo (h)	72	6	12	24	48	360	288
Precusores	Tirosol	Tirosol	Tirosol	Glucose 2 %	Glucose 2 %	Sacarose 3 %	Sacarose 3 %
Rendimento (%)	22	10	13.6	-	-	-	-
Concentração máxima de salidroside (mM)	18.98	9.99	0.02	0.96	0.19	7.79	0.29
Produtividade (mM·h ⁻¹)	0.27	1.65	5.8e ⁻⁴	0.04	0.004	0.023	9.96e ⁻⁴

Embora o *P. fortinii* Rac56 seja capaz de sintetizar tirosol a partir de fontes de carbono simples, e a concentração máxima de salidroside seja a 3ª mais elevada dos processos citados, o seu crescimento lento resulta em baixas produtividades (Tabela 1).

A *Rhodiola sachalinensis*, uma planta herbácea perene da família Crassulaceae, é uma reconhecida fonte natural de salidroside (Wu *et al.*, 2003). Devido ao seu rápido declínio e estatuto protegido, Wu *et al.*, (2003) propagaram calos compactos de *Rhodiola sachalinensis* em culturas suspensas de modo a obter salidroside (Tabela 1). A cultura de tecidos e células vegetais é um método alternativo promissor para a produção de metabolitos secundários em larga escala (Dicosmo e Misawa, 1995). No entanto, as culturas de tecidos e células vegetais apresentam várias desvantagens relativamente às culturas microbianas, tais como ciclos de crescimento relativamente longos, taxas de crescimento com grande variabilidade, tempos de duplicação longos, baixos rendimentos, entre outras (Dicosmo e Misawa, 1995). Wu *et al.*, (2003) propagaram eficientemente calos a partir dos explantes de cotilédones, folhas e caules obtidos de plantas com 2 semanas e explantes de raízes de plantas com 3 a 4 semanas. As raízes apresentaram as mais elevadas concentrações de salidroside e as mais baixas taxas de crescimento. Os cotilédones apresentaram as mais baixas concentrações de salidroside e, por outro lado, as mais elevadas taxas de crescimento. Por esta razão, Wu *et al.*, (2003) utilizaram cotilédones para produzir o agregado de calo compacto (ACC) de modo a otimizar a produção de salidroside. Porém, os longos períodos de crescimento, baixas concentrações máximas de salidroside e produtividade, tornam o processo pouco atrativo economicamente (Tabela 1).

Apesar de nenhum dos processos biotecnológicos referidos anteriormente estar atualmente em fase de industrialização, existem várias patentes e requisição de patentes relativamente aos genes relacionados com as vias de produção de salidroside e análogos (Bai *et al.*, 2014; Torrens-Spence *et al.*, 2018).

2.4. Extração e purificação de salidroside

As operações industriais de extração de compostos fenólicos são geralmente realizadas com recurso a solventes orgânicos aquosos (e.g. metanol, etanol, acetona e acetato de etilo) (Sultana, Anwar e Ashraf, 2009). Os suplementos alimentares SHR-5 e EPR-7, que contêm 2 e 3% de salidroside, respetivamente, são fabricados por extração com uma mistura aquosa de etanol 70% (v/v) (Dimpfel e Panossian, 2018). O material extraído, que dá origem aos suplementos SHR-5 e EPR-7, é submetido a um processo de evaporação a 60 e -70°C, respetivamente, de modo a

evaporar o solvente orgânico (Dimpfel e Panossian, 2018). Posteriormente, o extrato é misturado com material inerte em raios de 4-5:1 e 7-10:1, no caso dos suplementos SHR-5 e EPR-7, respectivamente, de modo a obterem-se as concentrações *standard* de compostos fenólicos para suplementos alimentares de *Rhodiola* spp. (Vlietinck *et al.*, 2009; Dimpfel e Panossian, 2018).

A purificação da salidroside é um passo essencial para a sua utilização na indústria farmacêutica. Embora não existam atualmente formulações puras de salidroside disponíveis no mercado de suplementação alimentar ou farmacêutico, estão descritas várias técnicas laboratoriais para a sua purificação a partir de *Rhodiola* spp..

Han *et al.*, (2002) descrevem um processo de cromatografia de alta velocidade em contracorrente (*High-speed counter-current chromatography* (HSCCC)), utilizado para purificar salidroside a partir de extratos de *Rhodiola crenulata*, dividido em duas Etapas. Na primeira etapa utilizaram um sistema de solventes de duas fases composto por acetato de etilo-n-butanol-água (1:4:5, (v/v)) e na segunda etapa utilizaram clorofórmio-metanol-isopropanol-água (5:6:1:4 (v/v)). O método possibilitou a obtenção de 21.9 mg de salidroside, a partir de 1.216 g de extrato, com 98% de pureza. O processo de separação HSCCC elimina o problema de adsorção irreversível de compostos de interesse ao suporte sólido dos processos cromatográficos com colunas sólido-líquido (Han *et al.*, 2002). Os rendimentos e a recuperação dos compostos de interesse são então mais eficientes relativamente à cromatografia sólido-líquido (Han *et al.*, 2002).

Embora o processo de purificação por HSCCC permita obter salidroside com elevado grau de pureza, o seu elevado custo e utilização de solventes orgânicos tornam o processo pouco apropriado para a indústria (Tang *et al.*, 2009). Por outro lado, a adsorção e dessorção em resinas macroporosas é um método eficiente com um efeito de purificação moderado, alta capacidade de absorção, baixos custos operacionais, baixo consumo de solvente e fácil regeneração (Tang *et al.*, 2009). A utilização da resina HDP-200 apolar, que possui uma área de 700-750 m²·g⁻¹, um diâmetro granular de 0.3-1.25 mm e um diâmetro de 85-90 Å, com um solvente orgânico aquoso (10% (v/v)) a uma taxa de caudal específico de 1 BV·h⁻¹, permitiu obter um produto final com 91.21% de pureza e um rendimento de 48.82% (Tang *et al.*, 2009). Estes valores foram obtidos após duas corridas de adsorção e dessorção numa coluna empacotada com resina HPD-200 (Tang *et al.*, 2009). Cristais lamelares de salidroside com uma pureza de 99% foram obtidos a partir do eluato de etanol a 10% na segunda corrida (Tang *et al.*, 2009).

2.5. Via de produção de salidroside

A via biossintética do precursor de salidroside, tirosol, foi já sugerida no passado (Zhang *et al.*, 2011; Grech-Baran *et al.*, 2015). No entanto, a elucidação e confirmação da via biossintética da salidroside na *Rhodiola* spp. é recente (Torrens-Spence *et al.*, 2018). Estes autores sugerem que o tirosol deriva da tirosina que é transformada em 4-HPAA por uma aromático acetaldeído sintase (AAS), designada 4-HPAA sintase, e posteriormente em tirosol por uma 4-hidroxifenilacetaldeído redutase (4HPAR) (Figura 3).

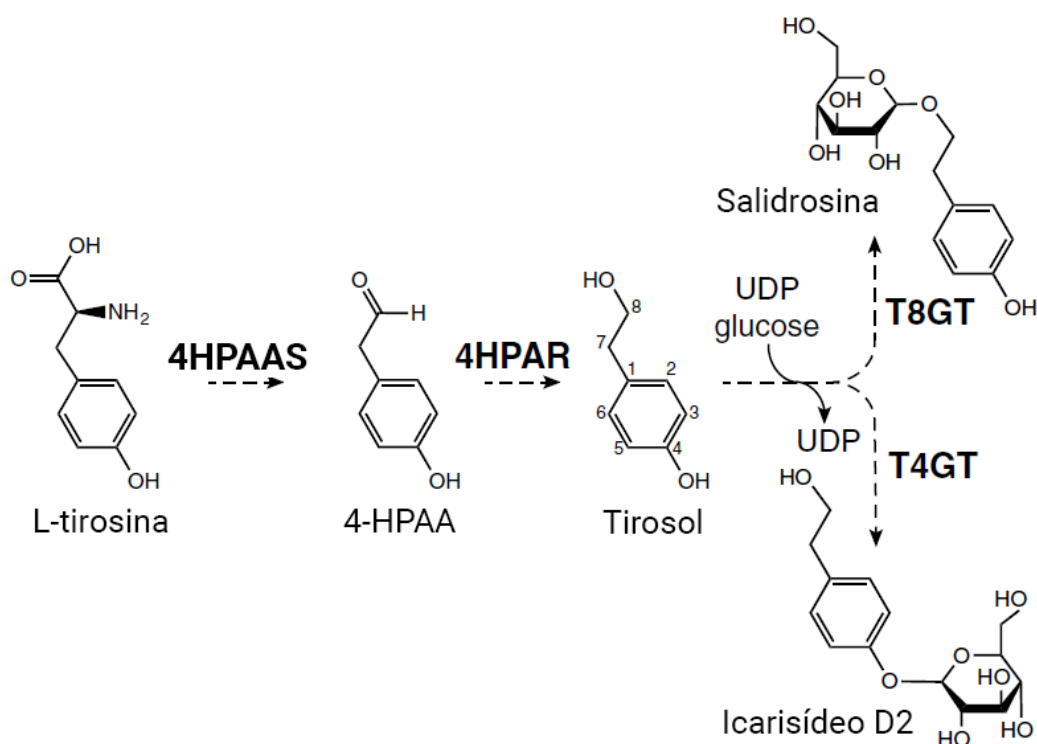


Figura 3 – Via metabólica da síntese de salidroside em *Rhodiola* spp. A transformação de L-tirosina em 4-HPAA é catalisada pela 4HPAAS. O 4-HPAA é posteriormente transformado em tirosol, por ação catalítica da 4HPAR, que serve de precursor para a salidroside juntamente com UDP-glucose. Adaptado de Torrens-Spence *et al.*, (2018)

O último passo da síntese de salidroside corresponde à glicosilação do tirosol (Figura 3). A glicosilação é um dos principais mecanismos responsáveis pela diversidade química dos metabolitos secundários (Fan *et al.*, 2017). Atualmente reconhece-se que tanto glicosidases como glicosiltransferases podem ser utilizadas na síntese de glicosídeos. No entanto, a atividade de hidrólise das glicosidases resulta em baixos rendimentos em glicosídeos (Fan *et al.*, 2017). Nas plantas, as UGTs utilizam como principal dador de moléculas açúcares UDP-ativados (e.g. glucose,

galactose, arabinose etc.) (Cheynier *et al.*, 2013). Geralmente as UGTs realizam a glicolidação dos compostos fenólicos na terminação (-OH) (Le Roy *et al.*, 2016). Na presente dissertação, a última reação da via de biossíntese de salidroside é catalisada por uma UGT, na presença de tirosol (Figura 3). Embora grande parte das UGTs identificadas em espécies de *Rhodiola* spp. não possuam regio-especificidade para a salidroside, sendo promíscuas relativamente ao produto formado (salidroside e icarisídeo), Torrens-Spence *et al.*, (2018) identificaram UGTs regioseletivas denominadas de UGT T8GT (tirosol: UDP-glicose 4-O-glicosiltransferase). As UGTs T8GT transformam o tirosol exclusivamente em salidroside. Por outro lado, UGTs T4GT glicolisam o tirosol em ambos os grupos hidroxilos, incluindo o grupo hidroxilo fenólico, que resulta na formação de salidroside e icarisídeo D2 (Figura 3) (Bai *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2017; Torrens-Spence *et al.*, 2018).

2.6. *C. glutamicum*

2.6.1. Relevância industrial

A *C. glutamicum* é uma actinobactéria do solo, auxotrófica em biotina, não produtora de esporos, gram positiva, de rápido crescimento, com estatuto GRAS desde a sua descoberta (Eggeling e Bott, 2005; Tatsumi e Inui, 2014). Esta bactéria cresce rapidamente até altas densidades celulares (Tabela 2), é geneticamente estável devido à ausência de um sistema de autorreparação, sem autólise, mantém a sua atividade metabólica uma vez cessado o crescimento, possui baixa produtividade em proteases que favorece a produção de proteínas recombinantes, possui elevada plasticidade de metabolismo e cresce com um largo espectro de fontes de carbono (e.g. pentoses, hexoses, e fontes de carbono alternativas) (Lee *et al.*, 2016). Este conjunto de propriedades torna a *C. glutamicum* propícia para manipulações genéticas e cultivo em condições industriais severas. No entanto, as manipulações genéticas diminuem frequentemente a taxa específica de crescimento e a concentração máxima de biomassa das culturas de *C. glutamicum* (Tabela 2).

O genoma da *C. glutamicum* ATCC 13032A foi sequenciado em 2003, verificando-se que consiste em um único cromossoma circular de 3 282 708 pares de bases (Kalinowski *et al.*, 2003) e um grande conjunto de ferramentas para engenharia genética de *C. glutamicum*, incluindo plasmídeos e promotores fortes, está atualmente disponível (Pátek e Nešvera, 2013).

As características suprarreferidas tornam a *C. glutamicum* conveniente para modificações genéticas para produção industrial de compostos químicos. A *C. glutamicum* é atualmente utilizada para produzir 3 e 2.2 milhões de toneladas de L-glutamato e L-lisina por ano, respetivamente (Becker *et al.*, 2011; Wendisch *et al.*, 2016). Adicionalmente estão disponíveis estirpes capazes de sintetizar

ácidos orgânicos (chiquimato, ácido alfa-cetoisovalérico), precursores de polímeros (sucinato, lactato, cadaverina, putrescina, ácido itacônico), e biocombustíveis (etanol, isobutanol, 1-propanol, 1,2-propanodiol) (Lee *et al.*, 2016).

Tabela 2 – Parâmetros fisiológicos de várias estirpes *C. glutamicum* cultivadas em meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L⁻¹ glucose e 30% de OD, onde μ_{max} é a taxa específica de crescimento, X é a concentração máxima de biomassa e $Y_{x/s}$ é o rendimento de biomassa/glucose.

Estirpes <i>C. glutamicum</i>	μ_{max} (h ⁻¹)	X (g·L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g·g ⁻¹)	Sistema	Referências
<i>Wild type</i> (ATCC13032)	0.40 ± 0.02	22 ± 2	0.56 ± 0.02	Bioreatores de 1.5 L c/ seis lâminas Rushton	(Buchholz, 2015)
<i>Wild type</i> (ATCC13032)	0.34	18.1	-		
Δsdh	0.31	13.1	-		
BL-1 (pAN6- <i>pycP458S</i>)	0.30	12.2	-	Bioreatores Multifors de 1.4 L	(Litsanov <i>et al.</i> , 2012)
BL-1 (pAN6- <i>pycP458Sppc</i>)	0.29	12.2	-		
BL-1 (pAN6- <i>aceAaceB</i>)	0.27	10.5	-		

Além da capacidade de produzir uma ampla gama de compostos industrialmente relevantes, a *C. glutamicum* é também uma bactéria promissora para a produção de compostos fenólicos de origem vegetal dada a existência da via do chiquimato. Estirpes super produtoras de corismato e aminoácidos aromáticos, incluindo L-fenilalanina e L-tirosina, foram desenvolvidas no passado com sucesso (Ikeda, 2006).

2.6.2. Produção de compostos aromáticos

Além da sobre produção de aminoácidos aromáticos, apenas alguns compostos aromáticos adicionais foram sobre produzidos em *C. glutamicum* (Lee e Wendisch, 2017). A *C. glutamicum* foi geneticamente manipulada de modo a desregular a via do chiquimato e aumentar o fluxo para a via das pentoses fosfato (Kogure *et al.*, 2016). A combinação de ambas as estratégias permitiu a sobre

produção de chiquimato na *C. glutamicum*. Embora o chiquimato não seja um composto aromático, as vias otimizadas representam uma base adequada para a produção de compostos aromáticos. Juntamente com a otimização da produção de tirosina e fenilalanina, a *C. glutamicum* torna-se um hospedeiro adequado para a produção de compostos aromáticos dada a sua pronunciada resistência a tais compostos (Ikeda e Katsumata, 1992; Ikeda, 2006; Lütke-Eversloh *et al.* 2007; Lee e Wendisch, 2017). No entanto, a presença de uma rede complexa de degradação de compostos aromáticos na *C. glutamicum* desviaram a atenção para outros microrganismos. Curiosamente, a degradação de aminoácidos aromáticos (e.g. fenilalanina e tirosina) não foi observada na *C. glutamicum* (Kallscheuer, 2017).

A *C. glutamicum* revelou-se capaz de utilizar compostos aromáticos, tais como ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico e ácido 3-(4-hidroxifenil) propiónico, como única fonte de carbono (Kallscheuer *et al.*, 2016). Análises de expressão genética global identificaram um *cluster* de genes (cg0340-cg0341 e cg0344-cg0347) com elevados níveis de transcrição na presença dos fenilpropanóides. O *cluster* identificado é constituído por 7 genes (*phdT*, *phdA*, *phdR*, *phdB*, *phdC*, *phdD* e *phdE*) responsáveis pela degradação dos compostos aromáticos acima mencionados. O gene cg0340 (designado *phdT*) codifica para uma proteína transportadora putativa, enquanto os genes cg0341 e cg0344-cg0347 (*phdA-E*) codificam enzimas envolvidas na β -oxidação dos fenilpropanóides. Cultivos realizados com estirpes de *C. glutamicum* mostraram que a perda individual dos genes *phdA*, *phdB*, *phdC*, *phdD* ou *phdE* impede o seu crescimento em todos os substratos fenilpropanóides testados (Kallscheuer *et al.*, 2016). A via identificada representa assim uma via catabólica periférica responsável pelo encurtamento das cadeias dos fenilpropanóides em ácidos benzoicos e acetil-CoA, posteriormente encaminhados para o ciclo do ácido tricarboxílico (Kallscheuer *et al.*, 2016).

Durante a construção da estirpe de *C. glutamicum* para produção de compostos fenólicos de origem vegetal, quatro *clusters*, compreendendo 21 genes, incluindo quatro genes do grupo *phd* envolvidos no catabolismo de compostos aromáticos, foram eliminados. A plataforma resultante, *C. glutamicum* DelAro4, mostrou-se incapaz de degradar uma série de compostos fenólicos e ácidos benzoicos simples, como o protocatecúico (Kallscheuer *et al.*, 2016). Esta estirpe foi usada como um chassi para a produção microbiana de vários compostos fenólicos, em particular, estilbenos, (2S)-flavanonas e flavonoides (Dudnik *et al.*, 2018).

A expressão dos genes da salsa (*Petroselinum crispum*), que codificam para a p-coumaroil CoA ligase (4CL), calcona sintase (CHS), e do gene da *Petunia x hybrida* que codifica a calcona

isomerase (CHI), permitiu a produção de duas (2S)-flavanonas (naringenina e eriodictiol). Foram obtidas concentrações máximas de 35 mg·L⁻¹ de naringenina e 37 mg·L⁻¹ eriodictiol a partir dos ácidos p-cumárico e cafeico, respetivamente (Dudnik *et al.*, 2018).

A expressão do gene 4CL em combinação com o gene codificante de uma estilbeno sintase (STS), proveniente de *Arachis hypogaea*, permitiu a produção dos estilbenos pinosilvina, trans-resveratrol e piceatanol, a partir de ácido cinâmico, p-cumárico e cafeico, respetivamente (Dudnik *et al.*, 2018).

Modificou-se geneticamente o metabolismo dos aminoácidos da estirpe de *C. glutamicum* DelAro4 de modo a conectar a via do chiquimato à via dos compostos fenólicos de plantas de modo a produzirem-se estilbenos a partir da glucose. Assim, obtiveram-se concentrações máximas de 60 mg·L⁻¹ de trans-resveratrol na ausência do precursor ácido p-cumárico (Dudnik *et al.*, 2018). A estirpe foi também modificada de modo a obterem-se compostos fenólicos mais complexos incluindo flavonoides (campferol e quercetina) (Kallscheuer *et al.*, 2017).

O principal constrangimento na produção de compostos fenólicos na *C. glutamicum* está relacionado com a atividade da TAL e com a disponibilidade intracelular de malonil-CoA que é o co substrato das reações enzimáticas realizadas pelas STS e CHS. Deste modo, os esforços para melhorar a produção de compostos fenólicos em *C. glutamicum* devem focar-se principalmente em melhorar a atividade das enzimas limitantes e aumentar a concentração de malonil-CoA intracelular (Dudnik *et al.*, 2018).

3. Materiais e métodos

No presente capítulo descrevem-se os materiais e métodos necessários para a conservação da estirpe de *C. glutamicum*, a preparação dos meios de cultura, o crescimento da estirpe em matraz e bioreator. São descritos também os métodos analíticos necessários para caracterizar vários parâmetros necessários à execução do trabalho, assim como os cálculos efetuados para determinação dos parâmetros fisiológicos.

3.1. Microrganismo	27
3.2. Conservação da estirpe	28
3.3. Meios de cultura.....	28
3.4. Ensaio em matraz.....	30
3.5. Ensaio em bioreator.....	31
3.5.1. Operação descontínua	32
3.5.2. Operação semi-contínua	32
3.6. Métodos analíticos.....	33
3.6.1. Determinação da concentração de biomassa	33
3.6.2. Determinação da concentração de Salidroside	34
3.7. Cálculo dos parâmetros fisiológicos	35
3.8. Análise estatística.....	35

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado na presente dissertação, *C. glutamicum* DelAro4 pMKEx2_malE-OsUGT13 pEKEx3_galU_pgm (Tabela 3), foi geneticamente manipulado e fornecido pelo centro de investigação *Institute of Bio and Geosciences* (IBG) (Jülich, Germany).

Tabela 3 – Plasmídeos utilizados para a construção da estirpe utilizada na presente dissertação.

Plasmídeo	Genótipo/características relevantes	Fonte ou referência
DelAro4	MB001(DE3) Δ cg0344-cg0347 Δ cg2625-cg2640 Δ cg1226 Δ cg0502	(Kallscheuer <i>et al.</i> , 2016)
pMKEx2	<i>kanr</i> ; vetor de transporte <i>C. glutamicum</i> (<i>lacI</i> , PT7, <i>lacO1</i> , pHM1519 <i>oriCg</i> ; pACYC177 <i>oriEc</i>)	(Kortmann <i>et al.</i> , 2014)
pMKEx2_malE-OsUGT13	Contém genes que codificam a proteína de fusão MalE-OsUGT13 (codão-otimizado para <i>C. glutamicum</i>)	(Kallscheuer <i>et al.</i> , 2018)
pEKEx3	<i>specr</i> ; vetor de transporte <i>C. glutamicum</i> (<i>lacI</i> , <i>Ptac</i> , <i>lacO1</i> , pBL1 <i>oriCg</i> ; pUCori <i>Ec</i>)	(Gande <i>et al.</i> , 2007)
pEKEx3_pgm_galU	Contém genes que codificam para fosfoglucomutase e UTP: glicose-1-fosfato uridililtransferase de <i>E. coli</i> MG1655 (não otimizado)	(Kallscheuer <i>et al.</i> , 2018)

3.2. Conservação da estirpe

As culturas foram criopreservadas a -80°C , após colheita de alíquotas de cultura em fase de crescimento exponencial, em meio BHI (*Brain Heart Infusion*) modificado (Tabela 4), de modo a manter as culturas viáveis e cultiváveis (Day e Stacey, 2007; Hoefman *et al.*, 2012), e posterior adição de glicerol (30% (v/v)). Cada alíquota foi utilizada para a realização dos pré inóculos, após descongelamento progressivo desde -80°C até temperatura ambiente.

3.3. Meios de cultura

A estirpe *C. glutamicum* DelAro4 foi cultivada em dois meios de cultura, BHI modificado (meio complexo) e CGXII (meio definido) (Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6). O meio BHI modificado foi utilizado para o crescimento de todos os pré inóculos. O meio CGXII foi utilizado para realização dos inóculos e como meio de crescimento nos ensaios em bioreator e matraz.

O meio BHI modificado foi esterilizado por autoclavagem a 121°C durante 20 min.

Tabela 4 – Concentração dos constituintes do meio BHI modificado.

Constituintes	Concentração ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
BHI	37
Canamicina	0.025
Espectinomicina	0.1

Nas Tabela 5 e Tabela 6 é apresentada a composição do meio CGXII (Keilhauer *et al.*, 1993). O pH do meio foi ajustado para 7. As culturas foram ainda suplementadas com os antibióticos, canamicina ($0.025\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) e espectinomicina ($0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) em solução, de modo a selecionar as bactérias com plasmídeo (Tabela 4). As soluções de antibióticos foram esterilizadas por filtração (filtro WHATMAN, polietersulfona (PES) – $0.2\ \mu\text{m}$) em condições estéreis e conservadas a -20°C . Nos ensaios em bioreator a ureia e o MOPS (Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico) foram removidos uma vez que o pH é automaticamente controlado.

Na preparação do meio CGXII, os compostos marcados com (*) na Tabela 5 foram dissolvidos em água destilada e esterilizados por autoclavagem a 121°C durante 20 min.

O ácido protocatecúico foi dissolvido numa solução aquosa de NaOH 10M (50 % (v/v)) e posteriormente esterilizado por filtração (filtro WHATMAN, PES – 0.2 µm) em condições estéreis e conservado a -20 °C. Esta solução foi preparada semanalmente.

A solução de biotina foi preparada com água destilada e o pH da solução acertado para 7 com NaOH e foi posteriormente esterilizado por filtração (filtro WHATMAN, PES – 0.2 µm) em condições estéreis e conservado a 4 °C.

A fonte de carbono, glucose, foi esterilizada por autoclavagem a 110 °C durante 30 minutos e posteriormente adicionada aos restantes componentes do meio em condições de assepsia. O efeito da concentração inicial de glucose na produção de salidroside foi também estudado e para tal realizaram-se ensaios com concentrações de glucose de 80 e 120 g·L⁻¹. De modo a manter a razão carbono/azoto em torno de 9, a concentração de (NH₄)₂SO₄ foi corrigida proporcionalmente (29.5 e 39.5 g·L⁻¹, para os ensaios com 80 e 120 g·L⁻¹, respetivamente).

Tabela 5 – Concentrações dos constituintes do meio CGXII.

Composto	Concentração g·L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄ *	20
K ₂ HPO ₄ *	1
KH ₂ PO ₄ *	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O*	0.25
CaCl ₂ *	0.01
Ureia*	5
MOPS*	42
Ácido protocatecúico	0.030
Biotina	0.0002
Glucose	40
Micronutrientes	0.02

Os compostos da solução de micronutrientes foram dissolvidos em água destilada e o pH da solução foi acertado para 1 com uma solução de HCl (Tabela 6). A solução foi posteriormente filtrada (filtro Merck, Náilon – 0.2 µm) em condições estéreis e conservada a 4 °C.

3. Materiais e métodos

Para induzir a expressão dos genes heterólogos foi adicionada uma solução 20 mM de IPTG (Isopropil-D-1-tiogalactopiranosido). Esta solução foi esterilizada por filtração (filtro WHATMAN, PES – 0.2 µm), e conservada a -20 °C.

As soluções de tirosol utilizadas (40, 60, 80 e 100 mM) foram preparadas com um rácio de aproximadamente 1:2 de tirosol:DMSO (dimetilsulfóxido). As soluções foram agitadas durante aproximadamente 20 minutos de modo a dissolver completamente o tirosol no DMSO.

Tabela 6 – Concentração dos constituintes da solução de micronutrientes utilizada no meio CGXII.

Composto	Concentração (mg·L ⁻¹)
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10
MnSO ₄ ·H ₂ O	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
CuSO ₄	0.2
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02

3.4. Ensaio em matraz

Os crescimentos foram realizados em matrizes de 500 mL com anteparos, suplementados com uma alíquota de 1 mL (células *C. glutamicum*), com 50 mL de meio BHI modificado (pré-inoculo) e incubadas a 200 rpm, 30 °C, durante 8 a 10 horas numa incubadora orbital (SHEL LAB). Posteriormente, as células foram separadas por centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos, lavadas com uma solução de NaCl 0.9 % (p/v), e subsequentemente usadas para inocular 100 mL de meio CGXII, em matrizes de 1 L com anteparos (inóculo), com uma biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹. Após incubação do inóculo a 200 rpm, 30 °C, durante 16-17 horas, as células foram separadas por centrifugação a 6000 rpm durante 10 minutos. Os *pellets* foram posteriormente utilizados para inocular os matrizes ou bioreatores com meio CGXII com uma concentração celular inicial de 0.5 ou 1 g·L⁻¹.

Com o objetivo de estudar a influência da concentração de DMSO no crescimento celular adicionaram-se várias concentrações de DMSO (80, 110, 170 e 200 mM) no início da fermentação, a matrizes de 500 mL com anteparos, com 50 mL de cultura e uma densidade celular inicial de

0.5 g·L⁻¹. As concentrações de DMSO testadas foram definidas tendo por base o volume de DMSO necessário para preparar as soluções de tirosol testadas (40, 60, 80 e 100 mM).

De forma a otimizar a produção de salidroside, foi também avaliado o impacto da concentração de tirosol no crescimento celular e na produção de salidroside. Para tal, adicionaram-se várias concentrações de tirosol 0 (controlo), 40, 60, 80 e 100 mM, no início da fermentação, a matrizes de 500 mL com anteparos, com 50 mL de cultura, com uma concentração inicial de biomassa de 0.5 e 1 g·L⁻¹, de modo a avaliar a influência da concentração de inóculo no crescimento celular e na produção de salidroside. Para induzir a expressão dos genes heterólogos foi adicionada uma solução de IPTG com uma concentração de 20 mM quando biomassa atingiu uma concentração de 1.5-2 g·L⁻¹, ou seja, após 5-6 horas de fermentação aproximadamente.

Foi também testada uma estratégia de produção em matrizes de 500 mL com anteparos, com 50 mL de cultura e concentração de biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, com posterior adição de tirosol após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Tais ensaios foram realizados apenas para as concentrações de tirosol de 60 e 80 mM. O IPTG (20 mM) foi adicionado em todos os ensaios após 5-6 horas, ou seja, após a biomassa atingir uma concentração de 1.5-2 g·L⁻¹.

3.5. Ensaios em bioreator

Todos os ensaios em bioreator foram realizados em reatores perfeitamente agitados (RPA) DASGIP® PBS de 2 L (Hamburg, Germany) com 3 agitadores do tipo Rushton de 6 lâminas. Os bioreatores foram esterilizados por autoclavagem a 121 °C durante 30 minutos com base mineral no interior. Os restantes componentes do meio, descritos na Tabela 5 e Tabela 6, foram adicionados posteriormente em condições de assepsia.

As células de *C. glutamicum* DelAro4 foram pré cultivadas em meio complexo BHI modificado e posteriormente cultivadas em meio definido CGXII (como descrito na secção 3.3) de modo a inocular os bioreatores com uma concentração inicial de biomassa de 0.5 g·L⁻¹.

O volume operacional dos bioreatores é de 1 L e em todos os ensaios a temperatura, o oxigénio dissolvido (OD) e o pH foram controlados automaticamente. A temperatura foi controlada e mantida a 30 °C com o módulo DASGIP Bioblock. O pH foi medido com uma sonda de pH (mettler toledo, 405-DPAS-SC-K8S/325) e mantido constante (pH 7) com adição automática de uma solução de NaOH 2 M com recurso ao módulo DASGIP MP4. O OD foi medido com recurso a uma sonda polarográfica de oxigénio (mettler toledo, InPro 6820/12/320) e mantido a 30 % através da adição de ar comprimido a um fluxo de 0.5 vvm (volume de ar por volume médio e minuto) e do controlo

automático da agitação de 650 rpm até um máximo de 1500 rpm. A formação de espuma foi controlada manualmente através da adição de *Antifoam 204* (Sigma-Aldrich).

O sistema de fermentação foi conectado a uma unidade de processamento com o *software* DASware control, que permite o controlo e a recolha de dados do processo.

3.5.1. Operação descontínua

De modo a estudar o efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento celular realizaram-se ensaios em descontínuo com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose sem adição de tirosol e de IPTG, designados de ensaios de controlo.

De modo a estudar o efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento celular e na produção de salidroside, foram realizados ensaios descontínuos com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose, suplementados com 40 mM de tirosol e 20 mM de IPTG após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹, ou seja, aproximadamente 5-6 horas após o início da fermentação.

3.5.2. Operação semi-contínua

Considerando que um dos principais problemas da presente biotransformação é a toxicidade do tirosol, foram testadas duas estratégias de alimentação semi-contínua: alimentação com caudal constante e alimentação por pulsos.

Os ensaios com caudal de alimentação constante foram iniciados com uma primeira fase em modo descontínuo, como descrito no ponto 3.5.1, com uma concentração inicial de glucose de 80 g·L⁻¹. Após 6 horas de fermentação (tempo ao fim do qual é atingida uma concentração de biomassa de aproximadamente 1.5-2 g·L⁻¹) a expressão de genes heterólogos foi induzida pela adição de 20 mM de IPTG, e foi iniciada a alimentação. Em simultâneo, com o início da alimentação, foi adicionado um pulso de 20 mM de tirosol ao sistema, de modo a manter uma concentração residual de tirosol no meio. Nestes ensaios foram testadas duas estratégias de alimentação diferentes; no primeiro ensaio (C1) foi utilizado um caudal de 2.4 mL·h⁻¹ entre as 6 e as 31 h, sendo posteriormente aumentado para 21.25 mL·h⁻¹, entre as 31 h e as 56 h; no segundo ensaio (C2) manteve-se o caudal de 2.4 mL·h⁻¹ entre as 6 e as 31 h, e entre as 31 h e as 80 h foi utilizado um caudal inferior (14.5 mL·h⁻¹), tendo sido prolongado o período de alimentação. A solução utilizada para alimentar os reatores era composta por 80 mM de tirosol. A alimentação do bioreator a um caudal constante foi feita através das bombas de alimentação do módulo DAGIP MP8.

Além da alimentação com caudal constante foi ainda testada uma outra estratégia de operação escalonada em que a alimentação foi feita por pulsos. Tal como nos ensaios com alimentação a caudal constante, foi realizada uma primeira fase em modo descontínuo, como descrito no ponto 3.5.1, com uma concentração inicial de glucose de 120 g·L⁻¹. Após 6 horas de fermentação a expressão de genes heterólogos foi induzida pela adição de 20 mM de IPTG e foi iniciada a alimentação por pulsos. Foram testadas 3 estratégias de suplementação diferentes, denominadas de P1, P2 e P3, de modo a obter uma concentração total de tirosol adicionada ao sistema de 90, 137 e 166 mM (P1, P2 e P3). Assim, o precursor foi adicionado ao bioreator faseadamente ao longo da fermentação, de acordo com a Tabela 7 onde se encontra indicado o momento de adição do precursor assim como a concentração do mesmo. Os pulsos foram adicionados aos bioreatores em condições de assepsia.

Tabela 7 – Condições da alimentação escalonada por pulsos. Pulsos realizados nas condições P1, P2 e P3 ao longo do tempo.

Estratégia					
P1		P2		P3	
Tempo (h)	Tirosol (mM)	Tempo (h)	Tirosol (mM)	Tempo (h)	Tirosol (mM)
6	20	6	20	6	20
27	10	26	15	26	10
39	10	36	15	36	20
51	20	51	15	51	20
55	10	60	24	60	24
60	20	72	24	72	24
		85	24	77	24
				85	24

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Determinação da concentração de biomassa

Em todos os ensaios foram recolhidas amostras, em intervalos predeterminados, de modo a determinar a concentração de biomassa. O crescimento celular foi quantificado por leitura da

densidade ótica (DO) com recurso ao leitor de microplacas (Synergy HT, BIO-TEK) a um comprimento de onda de 600 nm. Os valores de DO obtidos foram convertidos em peso seco de células ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) com recurso a uma reta de calibração (Anexo A1).

O procedimento experimental para a obtenção da reta de calibração da biomassa consistiu na recolha de cerca 10 mL de cultura (em triplicado), a meio da fase exponencial de crescimento, e centrifugação a 6500 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi seco em estufa a 70 °C durante 72 horas, ou até peso constante.

Simultaneamente, preparam-se várias diluições da suspensão de células e procedeu-se à leitura da respetiva DO que se verificou ser linear para a gama de absorção entre 0.1 e 0.5. O ajuste dos pontos experimentais de densidade ótica e concentração de células a uma reta (de modo a satisfazer a lei de Lambert-Beer) constitui a reta de calibração (Anexo A1).

3.6.2. Determinação da concentração de Salidrosina

De modo a determinar a concentração de salidrosina formada ao longo da fermentação, recolheram-se amostras de 2 mL e centrifugaram-se a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente o sobrenadante foi filtrado (filtro WHATMAN, PES – 0.2 μm), de modo a remover células e outras impurezas, e armazenado em vials a -20 °C para posterior análise. A concentração de salidrosina foi determinada por UHPLC (LC-30AD, Nexera X2, SHIMADZU), utilizando um detetor *diode array* (SPD-M20A), com recurso a uma coluna de fase reversa, Kinetex (1.7 μm C18 100 Å, 150 x 2.1 mm, Phenomenex) a 50 °C (CTO-30A). As amostras foram injetadas automaticamente (SIL-30AC Autosampler, SHIMADZU) a um caudal de 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando como eluentes ácido acético 0.1% (solvente A) e acetonitrilo suplementado com 0.1% de ácido acético (solvente B). A separação foi feita com recurso a um gradiente, em que a concentração do eluente B aumentou: minuto 0 a 6: de 5 % para 30 %, minuto 6 a 7: de 30 % para 50 %, minuto 7 a 8: de 50 % para 100 % e minuto 8 para 8.5: de 100 % para 5 %.

Os dados foram interpretados com o *software* LabSolutions.

A salidrosina foi determinada com recurso a uma reta de calibração, preparada com diluições sucessivas de uma solução com concentração de salidrosina conhecida (Anexo A2).

3.7. Cálculo dos parâmetros fisiológicos

A taxa específica de crescimento máxima μ_{max} (h^{-1}) foi determinada por aplicação do logaritmo à concentração da biomassa na fase exponencial. A linearização da fase exponencial permitiu obter o declive da reta que corresponde ao μ_{max} . Os restantes parâmetros fisiológicos foram calculados como descrito na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros fisiológicos.

Parâmetro	Equação	Unidades
P	$P = \frac{P_f}{t_{incubação}} \quad (1)$	$mM \cdot h^{-1}$
$Y_{P/S}$	$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i} \quad (2)$	$mM \cdot mM^{-1}$

Onde:

- P – Produtividade;
- $Y_{P/S}$ – Rendimento produto/substrato;
- $t_{incubação}$ – Tempo de incubação;
- P_f – Concentração final do produto;
- P_i – Concentração inicial do produto;
- S_i – Concentração inicial do substrato;

3.8. Análise estatística

As análises estatísticas de similaridade entre concentrações de biomassa, salidroquina, taxa específica de crescimento, rendimento produto/biomassa, rendimento substrato/produto e taxa específica de produção de salidroquina, foram realizadas por teste-t de Student com recurso ao Microsoft Excel 2013. Considerou-se que as amostras seguem uma distribuição bicaudal e rejeitou-se a hipótese nula quando $p < 0.05$.

4. Resultados e discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados da variação da concentração de glucose e do tirosol no crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 e na produção de salidroside. A par do estudo da variação da concentração de glucose e tirosol foram investigadas as melhores condições de operação dos bioreatores para a otimização da produção de biomassa e salidroside.

4.1.	Influência da concentração de glucose no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4	39
4.2.	Influência da concentração de DMSO no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4	41
4.3.	Influência da concentração de tirosol no crescimento de <i>C. glutamicum</i> DelAro4 e produção de salidroside	43
4.3.1.	Operação descontínua	43
4.3.2.	Operação semi-contínua	55
4.3.2.1.	Alimentação de tirosol com caudal constante	56
4.3.2.2.	Alimentação de tirosol por pulsos	58

4.1. Influência da concentração de glucose no crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 .

De modo a avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono no crescimento de *C. glutamicum* DelAro4, realizaram-se fermentações em bioreator com diferentes concentrações de glucose, 40 e 80 g·L⁻¹, sem adição de tirosol e sem adição de IPTG, não havendo expressão do gene de interesse. De modo a manter o rácio de carbono:azoto (C:N) em torno de 9, a concentração da fonte de azoto, (NH₄)₂SO₄, foi proporcionalmente ajustada nos ensaios suprarreferidos (Figura 4).

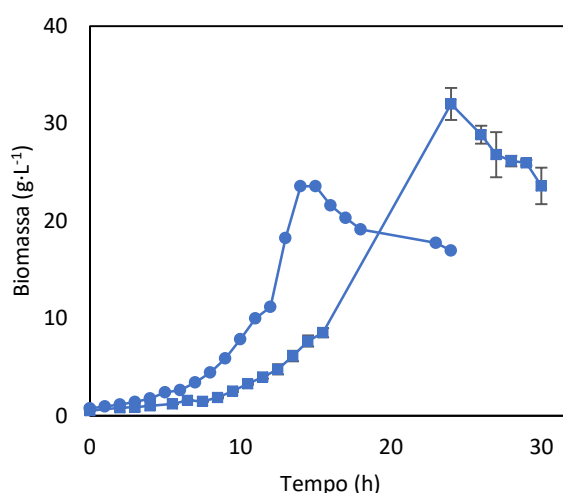


Figura 4 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII), 30°C, pH 7 e 30% OD, com diferentes concentrações de glucose: ● 40 g·L⁻¹; ■ 80 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Através da análise da Figura 4 é possível observar que as fases de latência dos ensaios com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose são aproximadamente de 3 e 7.5 horas, respetivamente. Obtêm-se fases de latência diminuídas se a composição e condições ambientais do inóculo e do meio fermentativo forem semelhantes (Chisti, 2014). Uma vez que o inóculo é constituído por meio CGXII com 40 g·L⁻¹ de glucose, a sua composição é semelhante à dos ensaios com 40 g·L⁻¹ de glucose. Porém, tal não se verifica nos ensaios com 80 g·L⁻¹ de glucose (Figura 4). Elevadas concentrações de glucose podem também dificultar a adaptação e desenvolvimento das células, devido ao *stress* osmótico (Gourdon *et al.*, 2003) e resultar em limitações difusionais de oxigénio e inibição por substrato (Braga *et al.*, 2018).

As fases exponenciais dos ensaios com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose são de aproximadamente 11 e 16 horas e as células possuem taxas específicas de crescimento máximas semelhantes, 0.252 ± 0.015 e 0.186 ± 0.022 h⁻¹, respectivamente ($p > 0.05$) (Figura 4). As taxas específicas de crescimento máximas de *C. glutamicum* DelAro4 observadas nos presentes ensaios são 2 vezes inferiores à taxa específica de crescimento de *C. glutamicum wild type* (ATCC13032), descrita por Buchholz (2015) (Tabela 2). É reconhecido que as células geneticamente manipuladas apresentam taxas específicas de crescimento diminuídas devido ao fardo metabólico causado pela presença de plasmídeos (Choi *et al.*, 2015). As células com plasmídeo apresentam taxas específicas diminuídas, possivelmente, devido ao direcionamento de recursos para funções relacionadas com a síntese de plasmídeos tais como replicação do plasmídeo, transcrição de DNA e tradução de mRNA (Fujita *et al.*, 1991). Uma vez que nos ensaios de crescimento a proteína de interesse (UGT) não foi expressa, dada a ausência do indutor IPTG, a transcrição de DNA posterior tradução de mRNA apenas é realizada para expressar as proteínas responsáveis pela resistência à canamicina e espectinomicina, codificadas pelos plasmídeos pMKEx2 e pEKE3x, respectivamente.

As taxas específicas de crescimento máximas de *C. glutamicum* DelAro4, obtidas na presente dissertação, são semelhantes às taxas específicas de crescimento máximas de *C. glutamicum* geneticamente manipuladas descritas por Litsanov *et al.* (2012) ($p > 0.05$) (Tabela 2). A estirpe de *C. glutamicum* DelAro4 pMKEx2_stsAh_4cIPc pEKE3_aroHEc_talFj, relacionada com a estirpe utilizada na presente dissertação, apresenta taxas específicas de crescimento máximas semelhantes (cerca de 0.2 h⁻¹) (Braga *et al.*, 2018). A estirpe DelAro4 pMKEx2_stsAh_4cIPc pEKE3_aroHEc_talFj contém os mesmos plasmídeos, pMKEx2 e pEKE3, e respectivas cassetes de resistência aos antibióticos canamicina e espectinomicina. O plasmídeo pMKEx2 possui genes heterólogos que codificam duas enzimas, 4-Coumarato CoA ligase e estilbeno sintase, responsáveis pela transformação de ácido p-cumárico em p-coumaroil CoA e p-coumaroil CoA em resveratrol, respectivamente (Braga *et al.*, 2018). O plasmídeo pEKE3 possui um gene heterólogo, DAHP sintase (3-Desoxi-D-arabino heptulosonato 7-fosfato sintase), responsável pela sobreprodução de DAHP e um gene homólogo, TAL, responsável pela sobreprodução de ácido p-cumárico (Braga *et al.*, 2018).

Após 14 e 24 horas de fermentação obtêm-se concentrações máximas de biomassa de 23.6 e 32 ± 1.7 g·L⁻¹ para os ensaios com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose, respectivamente (Figura 4). Duplicar a quantidade de glucose no meio permite aumentar 1.4 vezes a concentração máxima de biomassa. Resultados semelhantes foram também descritos por Braga *et al.*, (2018) com a estirpe de *C. glutamicum* DelAro4 pMKEx2_stsAh_4cIPc pEKE3_aroHEc_talFj. A concentração máxima de

biomassa de *C. glutamicum* DelAro4 obtida no ensaio com 40 g·L⁻¹ de glucose é semelhante às concentrações obtidas com *C. glutamicum wild type* descritas por Buchholz (2015) e Litsanov *et al.* (2012) ($p > 0.05$) (Tabela 2). Observa-se que, ao contrário da taxa específica de crescimento, a concentração máxima de biomassa não é significativamente afetada pelas manipulações genéticas da *C. glutamicum* DelAro4.

Decorridas 14 e 24 horas observa-se, nas culturas com 40 e 80 g·L⁻¹ de glucose, um declínio da concentração de biomassa devido a acumulação de metabolitos tóxicos e/ou exaustão de nutrientes/fonte de carbono (Maier, 2010) (Figura 4).

4.2. Influência da concentração de DMSO no crescimento de *C. glutamicum* DelAro4

Na presente dissertação a principal função do DMSO é a solubilização do tirosol. No entanto, o DMSO presente no sistema poderá facilitar o transporte do tirosol para o interior das células através da permeabilização da membrana celular (de Ménorval *et al.*, 2012).

De modo a avaliar o impacto do DMSO no crescimento celular de *C. glutamicum* DelAro4, realizaram-se fermentações em matraz com diferentes concentrações de solvente (80, 110, 170 e 200 mM) sem adição de tirosol e sem adição de IPTG, não havendo expressão dos genes de interesse. Estas concentrações foram definidas tendo em consideração as concentrações das soluções de tirosol posteriormente testadas e a quantidade de DMSO necessária para a sua solubilização (Figura 5).

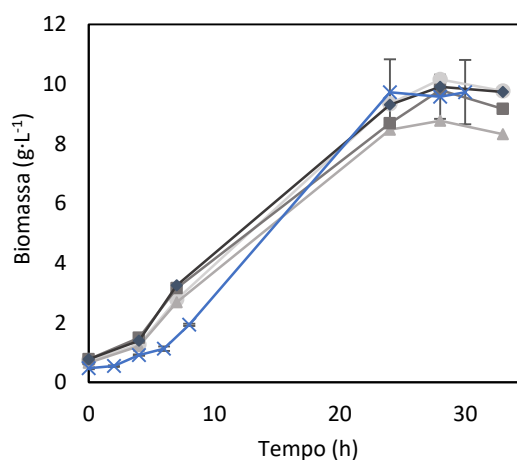


Figura 5 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, meio definido (CGXII), 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de DMSO: × 0 mM; ● 80 mM; ■ 110 mM; ▲ 170 mM; ◆ 200 mM. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Através da análise da Figura 5 observa-se que as fases de latência e exponencial são similares em todas as condições com duração de 2 e 20 horas, respetivamente. As taxas específicas de crescimento, 0.10 ± 0.03 , 0.10 ± 0.03 , 0.08 ± 0.06 , 0.08 ± 0.06 , 0.07 ± 0.06 e 0.08 ± 0.06 h⁻¹, das culturas suplementadas com 0, 80, 110, 170 e 200 mM de DMSO, respetivamente, são similares ($p > 0.05$).

Verifica-se que as concentrações máximas de biomassa obtidas nos ensaios suplementados com DMSO são similares à da cultura controlo (aproximadamente 9.7 g·L⁻¹) e semelhantes às concentrações descritas na literatura para culturas de *C. glutamicum* em matraz ($p > 0.05$) (Spelberg, 2013; Buchholz, 2015). No entanto, observa-se que a concentração máxima de biomassa e a taxa específica de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4, obtidas nos ensaios em matraz, são inferiores às dos ensaios em bioreator. Tal pode dever-se às limitações de oxigenação das culturas em matraz (Koch-Koerfges *et al.*, 2012).

Vários estudos dedicados à investigação das mudanças específicas em membranas lipídicas na presença de DMSO revelaram que este substitui a água na região interna polar, que por sua vez aumenta a área ocupada por lípido e diminui a espessura da membrana (Gordeliy *et al.*, 1998; Tristram-Nagle *et al.*, 1998). Tais efeitos foram confirmados por simulações de dinâmica molecular em vários artigos (Leekumjorn e Sum, 2006; Gurtovenko e Anwar, 2007; Notman *et al.*, 2007; de Ménorval *et al.*, 2012). De acordo com Gurtovenko and Anwar (2007) o DMSO exibe três modos distintos de ação, dependentes da sua concentração no meio. Baixas concentrações de DMSO (1.25 – 5 M) induzem um aumento da área total e a diminuição de espessura da membrana lipídica. Com concentrações intermédias de DMSO (5 – 10 M) são produzidos poros hidrofóbicos, semelhantes a poros formados por eletroporação. Altas concentrações de DMSO (12.5 – 50 M) provocam ondulação extrema e formação de múltiplos poros que destroem a membrana celular. De Ménorval *et al.*, (2012) descreve não existir permeabilização significativa quando usadas concentrações inferiores a 2.5 M. De acordo com Kligman, (1965) a concentração mínima inibitória de DMSO para *Corynebacterium* spp. ronda os 2.9 M.

Com base nos resultados obtidos é possível constatar que as concentrações de DMSO utilizadas não influenciam a taxa específica de crescimento e a concentração máxima de biomassa. Tal pode estar relacionado com o facto de a concentração máxima de DMSO utilizada, 200 mM, ser inferior às concentrações tóxicas, descritas por Gurtovenko and Anwar (2007) e (Kligman, 1965).

4.3. Influência da concentração de tirosol no crescimento de *C. glutamicum*

DelAro4 e produção de salidroside

Embora não descrito na literatura o efeito tóxico do tirosol em culturas de *C. glutamicum*, ensaios *in vitro* demonstram que compostos fenólicos, principalmente agliconas como o tirosol e hidroxitirosol, possuem propriedades antimicrobianas (Medina *et al.*, 2006; Cicerale *et al.*, 2010). De acordo com Landete *et al.*, (2008), concentrações superiores a 100 mM de tirosol inibem o crescimento da bactéria *L. Plantarum*. Segundo Azaizeh *et al.*, (2011) uma concentração de 4.4 mM de tirosol inibe parcialmente o crescimento de três bactérias isoladas, *E. coli*, *S. pyogenes* e *K. pneumoniae*. Abdel-Rhman *et al.* (2015a) descrevem também que baixas concentrações de tirosol, 0.01 mM, inibem o crescimento de *P. aeruginosa* em 50%. O mecanismo anti bacteriano do tirosol ainda não é claro. No entanto, é sabido que os vários compostos fenólicos que possuem atividade antimicrobiana, atuam por desestabilização da membrana celular (Rempe *et al.*, 2017).

Apesar da inerente toxicidade do tirosol em determinadas bactérias, em processos de biotransformação, concentrações elevadas de substrato/precursor propiciam rendimentos mais elevados e diminuem os custos associados à separação do produto do caldo fermentativo. De modo a avaliar os seus efeitos negativos, procedeu-se ao cultivo de *C. glutamicum* DelAro4 na presença de várias concentrações de tirosol (40, 60, 80 e 100 mM de tirosol) e diferentes modos de alimentação (operação descontínua e semi-contínua). Todas as fermentações com adição de tirosol foram também suplementados com IPTG após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (após 5-6 horas de fermentação).

4.3.1. Operação descontínua

De modo a maximizar a produção de salidroside, e minimizar o impacto do tirosol no crescimento celular, realizaram-se fermentações em matraz com diferentes concentrações de tirosol (40, 60, 80 e 100 mM de tirosol) adicionadas no início da fermentação (Figura 6). A adição de IPTG é realizada após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹.

Através da análise da Figura 6A observa-se que, tal como esperado, a adição de tirosol inibe o crescimento celular. A adição de 40 mM de tirosol provoca uma diminuição de 2.1 vezes na taxa específica de crescimento quando comparada com a cultura controlo (Tabela 9). Este efeito inibitório acentua-se com o aumento da concentração de tirosol e para o ensaio suplementado com 100 mM

4. Resultados e discussão

de tirosol observa-se que a taxa específica de crescimento diminui 51 vezes quando comparada com a da cultura controlo (Tabela 9).

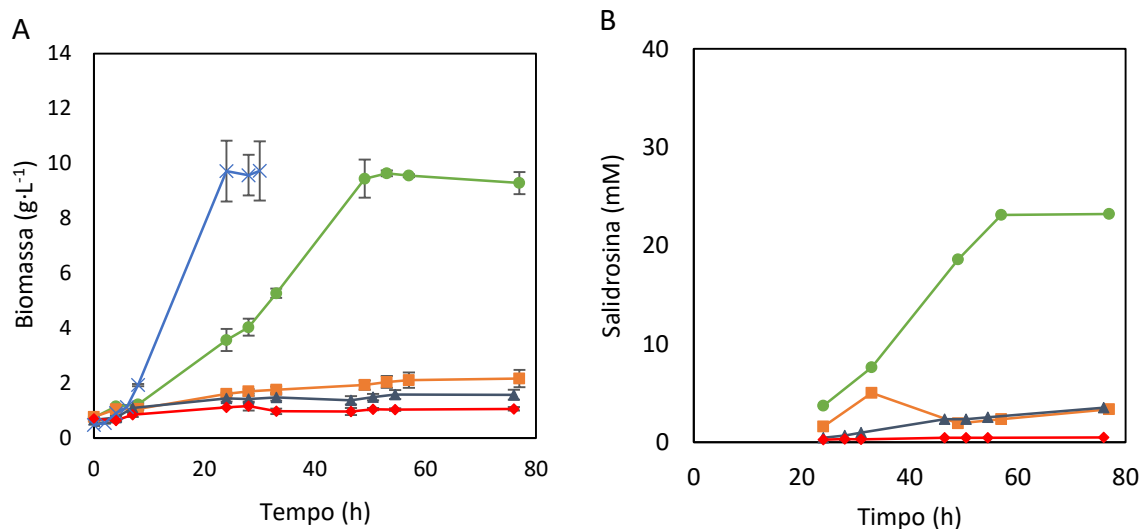


Figura 6 – (A) Curvas de crescimento e (B) produção de salidroside de *C. glutamicum* DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, meio definido (CGXII), 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: × 0 mM; ● 40 mM; ■ 60 mM; ▲ 80 mM; ◆ 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Verifica-se ainda que a fase de latência é de aproximadamente 2 horas em todas as condições (Figura 6A). Após 53 horas, o crescimento da cultura suplementada com 40 mM de tirosol atinge a fase estacionária com uma concentração máxima de biomassa de 9.7 ± 0.1 g·L⁻¹ (Figura 6A), semelhante à concentração da cultura de controlo ($p > 0.05$) (Figura 5). Nas restantes culturas não existe um crescimento apreciável (Figura 6A).

Com o objetivo de perceber qual o impacto da concentração de tirosol na formação do produto, quantificou-se a produção de salidroside ao longo do tempo (Figura 6B). Observa-se que a produção de salidroside na cultura suplementada com 40 mM de tirosol se inicia aproximadamente às 20 horas de fermentação e estabiliza assim que se atinge a concentração máxima de biomassa, alcançando um máximo de 23.2 ± 1.3 mM após 77 horas de fermentação (Figura 6B). Constata-se que a produção de salidroside está associada ao crescimento celular, uma vez que grande parte do produto se forma durante a fase exponencial de crescimento. A produção de salidroside, assim como a produção de biomassa, nas culturas suplementadas com 60, 80 e 100 mM, é residual (Figura 6B). O processo de biotransformação de tirosol em hidroxitirosol pela estirpe de *Halomonas* HTB24 demonstra um padrão semelhante de inibição do crescimento e formação de produto (Lieb Gott *et al.*, 2007). Estes autores suplementaram culturas de *Halomonas* HTB24 com 5, 10, 15, 20, 25, 30

e 40 mM de tirosol, com a concentração mais elevada a inibir completamente o crescimento celular e a produção de hidroxitirosol. Por outro lado, com concentrações intermédias de tirosol, 20 mM, obtiveram as mais elevadas concentrações de produto (Liebgott *et al.*, 2007). Ainda que concentrações intermédias inibam parcialmente o crescimento celular, estas propiciam concentrações máximas de produto mais elevadas.

Tabela 9 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: 40, 60, 80 e 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Concentração de tirosol (mM)			
	40	60	80	100
μ_{max} (h ⁻¹)	0.049 ± 0.016	0.01 ± 0.003	0.004 ± 0.004	0.002 ± 0.003
P (mM·h ⁻¹)	0.250 ± 0.015	0.046 ± 0.016	0.046 ± 0.009	0.006 ± 0.002
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.580 ± 0.038	0.077 ± 0.027	0.044 ± 0.009	0.005 ± 0.002

O rendimento produto/substrato da cultura suplementada com 40 mM de tirosol é aproximadamente 2 vezes inferior ao rendimento produto/substrato teórico máximo para UGTs não regiosseletivas, 50%, que catalisam a formação de salidroside e icariside D2 (Fan *et al.*, 2017).

De acordo com Liebgott *et al.*, (2007) baixas concentrações de tirosol, 5 mM, permitem obter taxas específicas de crescimento mais elevadas que se traduzem em rendimentos produto/substrato mais elevados em culturas de *Halomonas* HTB24. No entanto, as concentrações máximas de hidroxitirosol são obtidas com concentrações intermédias de tirosol (Liebgott *et al.*, 2007).

Os processos de biotransformação envolvem geralmente uma reação enzimática que resulta na transformação de um precursor em produto final (Liese *et al.*, 2006). Considerando que o número de cópias do plasmídeo que contém a sequência da UGT é estável por número de células pode assumir-se que um maior número de células corresponde a um maior número de plasmídeos e, por conseguinte, a uma maior quantidade de UGTs no meio disponíveis para catalisar a transformação de tirosol em salidroside (Wechselberger *et al.*, 2012). Reconhecendo-se a relação positiva entre concentração de biomassa e UGTs, e o facto da produção de salidroside se acentuar durante o crescimento, pode afirmar-se que se obtêm produtividades máximas quando o microrganismo

4. Resultados e discussão

crece com a mais elevada taxa de crescimento possível (de Hollander, 1993). Tal relação pode ser observada através da análise da taxa específica de crescimento e da produtividade (Tabela 9).

Com base nos resultados obtidos definiram-se novas estratégias com objetivo de minimizar o impacto negativo do tirosol no crescimento celular e, porventura, aumentar a produção de salidrosina. Uma das estratégias passou por aumentar a quantidade de biomassa inicial. Quantidades mais elevadas de inóculo permitem reduzir a duração da fase de latência e assim aumentar a produtividade em biomassa (Shida *et al.*, 1977), uma vez que conferem maior resistência às culturas e minimizam os efeitos tóxicos do precursor no crescimento celular (McNeil e Harvey, 2008).

Assim, realizaram-se ensaios em matraz com uma concentração inicial de biomassa de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e com diferentes concentrações de tirosol, 60, 80 e 100 mM (Figura 7).

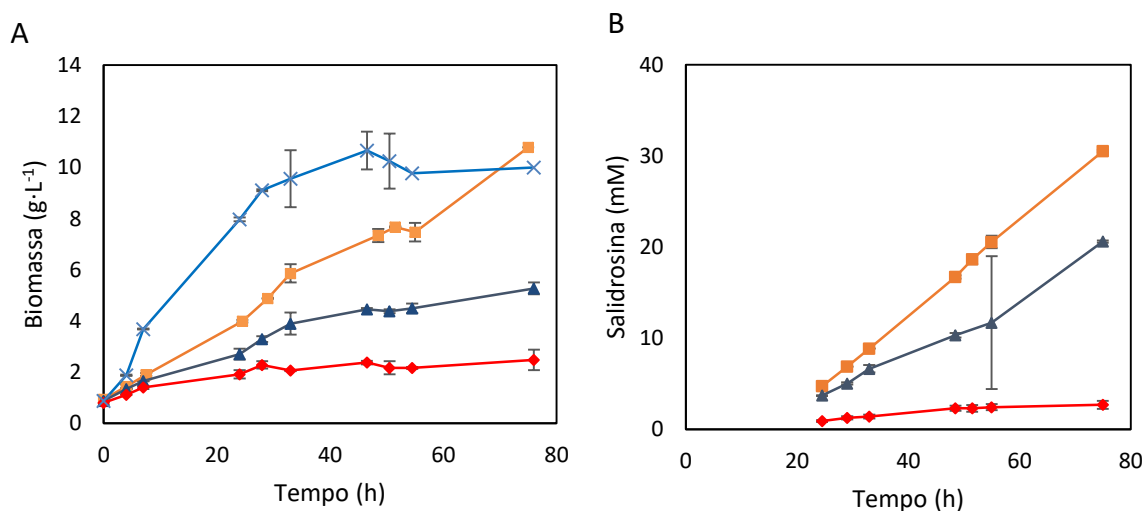


Figura 7 – (A) Curvas de crescimento e de (B) produção de salidrosina de *C. glutamicum* DelAro4 em matrazes de 500 mL com biomassa inicial de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, meio definido (CGXII), $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose, 30°C , 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: × 0 mM; ■ 60 mM; ▲ 80 mM; ◆ 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir $1.5\text{-}2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Através da análise da Figura 7A observa-se uma redução da toxicidade do tirosol em todas as culturas relativamente aos ensaios com $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de biomassa inicial. A fase de latência é desprezável e a fase exponencial é de aproximadamente 75 horas em todas as condições (Figura 7A). As taxas específicas de crescimento das culturas suplementadas com 60, 80 e 100 mM são de 0.031 ± 0.010 , 0.023 ± 0.009 e $0.013 \pm 0.007 \text{ h}^{-1}$, respetivamente, e a concentração de biomassa mais elevada é obtida na cultura suplementada com 60 mM de tirosol, $10.8 \pm 0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, semelhante à concentração da cultura de controlo ($p > 0.05$) (Figura 7A). Observa-se uma melhoria significativa

das concentrações máximas de biomassa e das taxas específicas de crescimento em todas as culturas relativamente aos ensaios com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹.

O efeito da concentração do inóculo é um fator bem conhecido e estudado nos processos de fermentação. O aumento da concentração do inóculo permite melhorar parâmetros como a taxa específica de crescimento, produtividade e rendimento produto/substrato. A produção de ácido glutâmico pela *C. glutamicum* pode ser melhorada com aumento da concentração inicial de inóculo (Tavakkoli *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2013). Qiang *et al.*, (2013) descrevem um comportamento semelhante para a produção de um polissacarídeo (HZ-7) por culturas de *Klebsiella* H-207. A produção de amilases por *Chryseobacterium* e *Bacillus* é também influenciada pelo aumento da concentração do inóculo (Hasan *et al.*, 2017), tal como a produção de proteases por *Bacillus circulans* (Subba Rao *et al.*, 2008). Não obstante todos os autores relatarem melhorias na formação de produto, é comum observar-se uma curva em forma de sino com o aumento da concentração de inóculo. Concentrações muito elevadas de inóculo estão relacionadas com a diminuição da formação de produto possivelmente devido ao rápido crescimento inicial das bactéria e falta de nutrientes suficientes disponíveis no meio para se obterem volumes elevados de biomassa (Hasan *et al.*, 2017), pelo que a densidade do inóculo não exerce um efeito positivo ilimitado nas fermentações (Tavakkoli *et al.*, 2012). O valor ótimo da concentração do inóculo varia também com o microrganismo e o sistema de fermentação utilizado (Reddy *et al.*, 2008).

Tal como esperado, o aumento da concentração do inóculo resulta num aumento da concentração máxima de biomassa e da taxa específica de crescimento que se traduz num aumento da concentração máxima de salidroside e da produtividade em todas as condições (Figura 7A e Figura 7B).

Tabela 10 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 1 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas no início da fermentação: 40, 60, 80 e 100 mM. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Concentração de tirosol (mM)		
	60	80	100
μ_{max} (h ⁻¹)	0.031 ± 0.010	0.023 ± 0.009	0.013 ± 0.007
P (mM·h ⁻¹)	0.407 ± 0.001	0.275 ± 0.059	0.036 ± 0.006
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.508 ± 0.002	0.257 ± 0.056	0.026 ± 0.004

A produtividade da cultura suplementada com 60 mM de tirosol é cerca de 2 vezes superior à da cultura suplementada com 40 mM de tirosol no início da fermentação. Verifica-se também uma melhoria dos rendimentos produto/substrato em todas as culturas relativamente ao ensaio com 0.5 g·L⁻¹ de biomassa inicial (Tabela 9 e Tabela 10).

Uma vez que a utilização de elevadas quantidades de inóculo na indústria representa um esforço adicional, definiu-se uma nova estratégia para minimizar o impacto negativo do tirosol no crescimento celular sem aumento da concentração de inóculo. Realizaram-se ensaios mantendo a concentração inicial de biomassa (0.5 g·L⁻¹), mas com adição do tirosol e IPTG após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. A adição tardia do precursor, durante a fase exponencial, permite atingir uma densidade celular elevada mais rapidamente e minimizar os efeitos tóxicos de determinados precursores (McNeil e Harvey, 2008).

Ensaio prévios revelaram que concentrações superiores a 80 mM são extremamente tóxicas, pois inibem fortemente o crescimento celular e a formação de produto, pelo que não foram utilizadas em ensaios posteriores. As culturas foram então suplementadas com 60 e 80 mM de tirosol quando estas atingiram uma densidade celular de aproximadamente 1.5-2 g·L⁻¹.

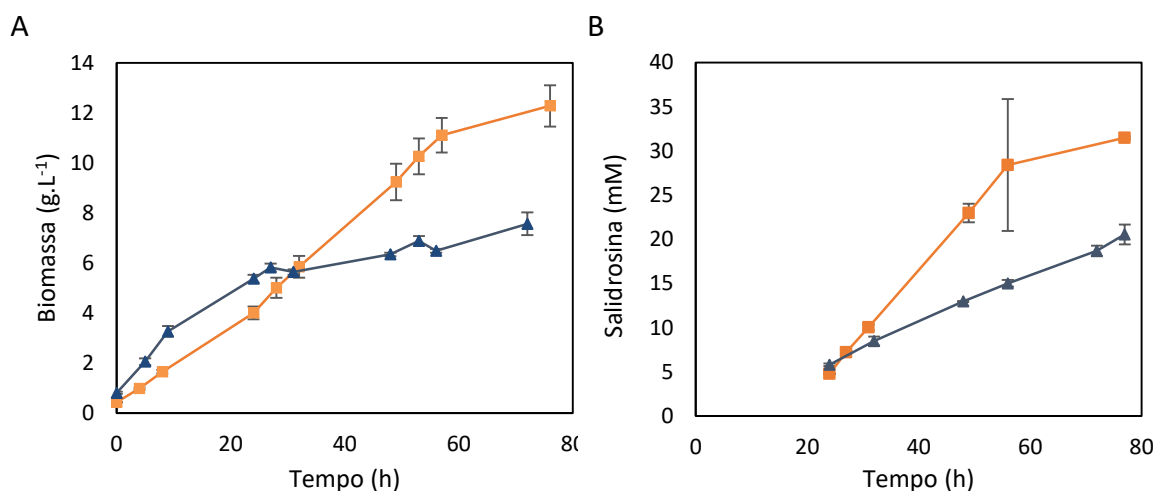


Figura 8 – (A) Curvas de crescimento e de (B) produção de salidroside de *C. glutamicum* DelAro4 em matrizes de 500 mL com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, meio definido (CGXII), 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ■ 60 mM; ▲ 80 mM. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Observa-se, na Figura 8A, uma redução da inibição do crescimento de todas as culturas suplementadas com tirosol após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ relativamente aos ensaios com o tirosol adicionado no início da fermentação, à semelhança do que sucede no ensaio com

concentração inicial de biomassa de 1 g·L⁻¹ (Figura 7A). Verifica-se ainda que a fase de latência é praticamente inexistente em todas as condições e que o crescimento celular diminui após adição do tirosol (Figura 8A). Após 76 horas de fermentação a concentração máxima de biomassa mais elevada, 12.3 ± 0.8 g·L⁻¹ é obtida com a concentração mais baixa de tirosol, 60 mM.

Lorenz *et al.*, (2013) descrevem uma estratégia de suplementação de precursores tóxicos semelhante à utilizada no presente ensaio. A adição de 5, 10, 20 e 40 mM de 2-ceto-3-metilvalerato (KMV), um precursor tóxico, a culturas de *E. coli* DH5, para a produção L-isoleucina, foi realizada durante a fase exponencial de modo a diminuir o impacto no crescimento celular.

A concentração máxima de salidroside da cultura suplementada com 60 mM de tirosol, 31.5 ± 2.5 mM, é semelhante à da cultura com 60 mM de tirosol com concentração inicial de biomassa de 1 g·L⁻¹ (Figura 7A e Figura 8A) e é 1.6, 3.1 e 1525 vezes superior às dos processos de biotransformação por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008), enzimas extraídas de *A. niger* MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e por células inteiras de *E. coli* (DE3), respetivamente, e 31.8, 160.5, 3.9 e 105.2 vezes superior à dos processos de produção *de novo* por *E. coli* B-SAL2 DE3 (Chung *et al.*, 2017), *E. coli* MG1655 (Bai *et al.*, 2014), *P. fortinii* Rac56 (Cui *et al.*, 2016), *R. sachalinensis* (Wu *et al.*, 2003), respetivamente (Tabela 1).

Tabela 11 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em meio definido (CGXII) com biomassa inicial de 0.5 g·L⁻¹, 40 g·L⁻¹ glucose, 30°C, 200 rpm e com diferentes concentrações de tirosol adicionadas após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: 60 e 80 mM. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Concentração de tirosol (mM)	
	60	80
μ_{max} (h ⁻¹)	0.042 ± 0.016	0.021 ± 0.014
P (mM·h ⁻¹)	0.409 ± 0.033	0.243 ± 0.013
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.524 ± 0.041	0.304 ± 0.016

A produtividade da cultura suplementada com 60 mM de tirosol é cerca de 700 vezes superior à do processo com células inteiras de *E. coli* (DE3), 6 vezes inferior à produtividade da biotransformação com enzimas extraídas de *A. niger* MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e 1.5 vezes inferior ao processo de biotransformação por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008) (Tabela 1 e Tabela 10). A produtividade é ainda 10.2, 102, 17.7 e 409 vezes superior à dos processos de produção *de novo*

por *E. coli* B-SAL2 DE3 (Chung *et al.*, 2017), *E. coli* MG1655 (Bai *et al.*, 2014), *P. fortinii* Rac56 (Cui *et al.*, 2016), *R. sachalinensis* (Wu *et al.*, 2003), respetivamente (Tabela 1 e Tabela 11).

O rendimento produto/substrato mais elevado, obtido na cultura suplementada com a menor quantidade de tirosol, 60 mM, é 1.9, 4.1 e 3 vezes superior aos rendimentos das biotransformações por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008), enzimas extraídas de *A. niger* MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e por células inteiras de *E. coli* (DE3), respetivamente (Tabela 1). O rendimento produto/substrato da síntese química descrita por Guo *et al.* (2010) e Liang *et al.* (2014) é 2.2 e 1.2 vezes superior ao rendimento da cultura com 60 mM de tirosol (Tabela 11). O rendimento produto/substrato da cultura suplementada com 60 mM de tirosol aproxima-se do rendimento produto/substrato teórico máximo para UGTs não regiosseletivas, 50%, que catalisam a formação de salidroside e icarisideo D2 (Fan *et al.*, 2017).

Embora os parâmetros fisiológicos das culturas suplementadas com 60 e 80 mM de tirosol sejam semelhantes aos parâmetros dos ensaios homólogos com concentração inicial de biomassa de 1 g·L⁻¹ (p > 0.05) (Tabela 10 e Tabela 11) com a presente estratégia é possível reduzir em 50% a concentração do inóculo. Na indústria, a quantidade de inóculo normalmente utilizada está entre 3 e 10% do volume do meio (Whitaker e Stanbury, 2013). À escala industrial, o inóculo deve ser gerado em vários estágios de modo a produzir biomassa suficiente para inocular um fermentador industrial (Whitaker e Stanbury, 2013). Quanto maior o número de estágios entre a cultura inicial e o fermentador final, maior o risco de contaminação e degeneração da estirpe (Whitaker e Stanbury, 2013). Por conseguinte, deve ser alcançado um compromisso quanto ao tamanho do inóculo a ser utilizado e o risco de contaminação e degeneração da estirpe. Outro fator a considerar na determinação do volume do inóculo é a economia do processo, uma vez que para um fermentador industrial, 10% do volume total, representa um investimento financeiro considerável e deve ser justificado em termos de produtividade (Whitaker e Stanbury, 2013).

Com base nos resultados obtidos em matraz e visando a maximização da concentração de biomassa e, possivelmente, o aumento da concentração máxima de salidroside, realizaram-se fermentações descontínuas em bioreatores, com 40 g·L⁻¹ de glucose, às quais se adicionaram 40 mM de tirosol quando a biomassa atingiu 1.5-2 g·L⁻¹ (Figura 9).

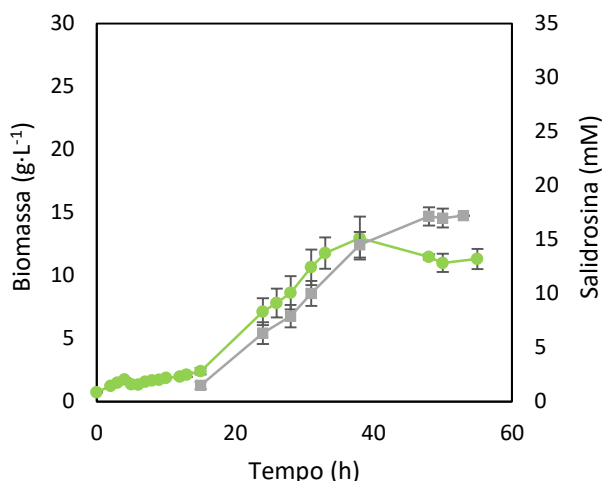


Figura 9 – Curvas de crescimento e de produção de salidroside de *C. glutamicum* DelAro4 em bioreatores de 2-L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L⁻¹ glucose, 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ● crescimento; ■ Salidroside. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Através da análise da Figura 9 observa-se que a fase de latência é semelhante à da cultura de controlo. No entanto, após a adição de 40 mM de tirosol, decorridas 5 horas de fermentação, verifica-se que o impacto negativo no crescimento é superior relativamente aos ensaios em matraz com 40 mM de tirosol e com 60 mM de tirosol adicionados após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (Figura 6A, Figura 8A e Figura 9). Verifica-se também que a taxa específica de crescimento da cultura em bioreator com 40 mM de tirosol é cerca de 3 vezes inferior à da cultura de controlo (Tabela 12).

A concentração máxima de biomassa da cultura suplementada com 40 mM de tirosol é obtida após 50 horas de fermentação, à semelhança do que sucede nos ensaios em matraz com a mesma concentração de tirosol (Figura 6A e Figura 9). Porém, ao contrário do que se verifica nos ensaios em matraz, a concentração máxima de biomassa da cultura em bioreator suplementada com 40 mM de tirosol é 2 vezes inferior à concentração da cultura de controlo (Figura 6A, Figura 8A e Figura 9). O aumento da toxicidade do tirosol em bioreatores pode dever-se às diferenças de operação entre reatores e matrizes, tais como modificações do meio CGXII (ver capítulo 3.3) e maior quantidade de oxigénio dissolvido no meio dos reatores (30%).

As elevadas concentrações de oxigénio presentes nos ensaios em bioreator (30%), relativamente às culturas nos ensaios em matraz, podem ter resultado em concentrações mais elevadas de ROS (Baez e Shiloach, 2014). O tirosol, como antioxidante, reage com radicais livres (e.g. O₂⁻, H₂O₂), produzindo radicais fenoxilicos de tirosol (d'Alessandro *et al.*, 2000; Leopoldini *et*

al., 2011; Galano *et al.*, 2012; Dávalos *et al.*, 2018). Os radicais fenoxílicos são altamente reativos e possivelmente mais tóxicos do que as moléculas que lhes dão origem (Wright e Shadnia, 2008). Shadnia e Wright, (2008) sugerem que a toxicidade intrínseca dos compostos fenólicos passa pela sua transformação em radicais fenoxílicos e posterior conversão em quinonas através de modificações metabólicas. Várias quinonas apresentam elevada atividade bactericida e bacteriostática (Armstrong e Spink, 1943; Cowan, 1999).

O aumento da toxicidade do tirosol nos ensaios em bioreator pode dever-se ainda às modificações realizadas no meio CGXII. Nos ensaios em bioreator a ureia e o MOPS foram removidos uma vez que o pH é automaticamente controlado (ver capítulo 3.3). É pouco provável que a ausência da ureia seja responsável pelo aumento da transformação de tirosol no seu radical fenoxílico, uma vez que não possui capacidade para doar protões, não interferindo nas reações *redox* (Prasad e Mishra, 2017). Por outro lado, a ausência de MOPS nos ensaios em bioreator pode ser responsável pelo aumento da toxicidade do tirosol juntamente com o aumento do OD. De acordo com Baker *et al.*, 2007 a presença de ácido 2-(4-morfolino) etanossulfónico (MES), uma solução tampão de estrutura semelhante ao MOPS, em concentrações relativamente altas, pode reciclar os radicais fenoxílicos ao composto fenólico que lhe deu origem por doação de protões. Outras soluções tampões, como o ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinoetanossulfónico (HEPES) e piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanossulfónico) (PIPES), demonstram um padrão semelhante de regeneração de radicais fenoxílicos ao composto fenólico de origem (Kirsch *et al.*, 1998; Lomonosova *et al.*, 1998; Keynes, Griffiths e Garthwaite, 2003). Embora não esteja descrito na literatura um comportamento semelhante para o MOPS, põe-se a possibilidade do mesmo comportamento ter ocorrido nos ensaios em bioreator, dada a semelhança estrutural entre os tampões MES e MOPS, ambos compostos por um anel de morfolina e vários grupos hidroxilo. A presença de MOPS pode também reduzir a concentração de H₂O₂ e O₂⁻, reduzindo consequentemente a taxa de formação do radical fenoxílico de tirosol, diminuindo assim a toxicidade do tirosol nos ensaios em matraz. Segundo Zhao e Chasteen, (2006) adição de 0.1 M de H₂O₂ e 0.1 M de MOPS (pH 7.0) resulta na oxidação de 6 % do MOPS após 24h, diminuindo os níveis de H₂O₂. Kagenishi, Yokawa e Baluška, (2016) descrevem que 1 % de MES diminui consideravelmente a presença de radiais O₂⁻.

A concentração máxima de salidroside, 17.2 ± 0.04 mM, no ensaio em bioreator, é consideravelmente inferior à dos ensaios em matraz com 40 mM de tirosol e com 60 mM de tirosol adicionados após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (Figura 6B, Figura 8B e Figura 9). Uma vez que a produtividade do ensaio em bioreator é semelhante às produtividades dos ensaios

em matraz, pressupõem-se que os tempos de fermentação mais longos dos ensaios em matraz permitem obter concentrações máximas de salidroside mais elevadas (Tabela 9, Tabela 11 e Tabela 12).

Tabela 12 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 40 g·L⁻¹ glucose e 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Concentração de tirosol (mM)
	40 (Indução)
μ_{max} (h ⁻¹)	0.088 ± 0.025
P (mM·h ⁻¹)	0.325 ± 0.001
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.430 ± 0.012

O rendimento produto/substrato obtido no ensaio em bioreator é ligeiramente inferior aos rendimentos dos ensaios em matraz com 40 mM de tirosol e com 60 mM de tirosol adicionados após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ e ao rendimento teórico descrito por Fan *et al.*, (2017) (Tabela 9, Tabela 11 e Tabela 12).

Com base nos resultados obtidos anteriormente, que permitem relacionar positivamente concentrações de biomassa mais elevadas a concentrações máximas de salidroside mais elevadas, realizaram-se fermentações com uma concentração inicial de glucose superior (80 g·L⁻¹). O aumento da concentração de glucose poderá contribuir para o aumento da concentração máxima de biomassa (ver capítulo 4.1).

Através da análise da Figura 10 observa-se que a fase de latência do ensaio com 40 mM de tirosol e 80 g·L⁻¹ glucose é semelhante à do ensaio de controlo. Após a adição do tirosol verifica-se uma forte inibição do crescimento, relativamente à cultura de controlo, tal como verificado no ensaio com 40 g·L⁻¹ de glucose (Figura 9 e Figura 10). As células crescem com uma taxa específica de crescimento 3 vezes inferior à da cultura de controlo e semelhante à da cultura com 40 g·L⁻¹ de glucose ($p > 0.05$) (Tabela 12 e Tabela 13). Após 49 horas a cultura atinge a concentração máxima de biomassa de 23.9 g·L⁻¹, 1.4 vezes menor que a concentração máxima de biomassa da cultura de controlo, que é seguida de um rápido declínio na concentração celular. Tal como esperado, o aumento da concentração de glucose permite aumentar em aproximadamente 2 vezes a biomassa formada em relação à cultura com 40 g·L⁻¹ de glucose (Figura 9 e Figura 10).

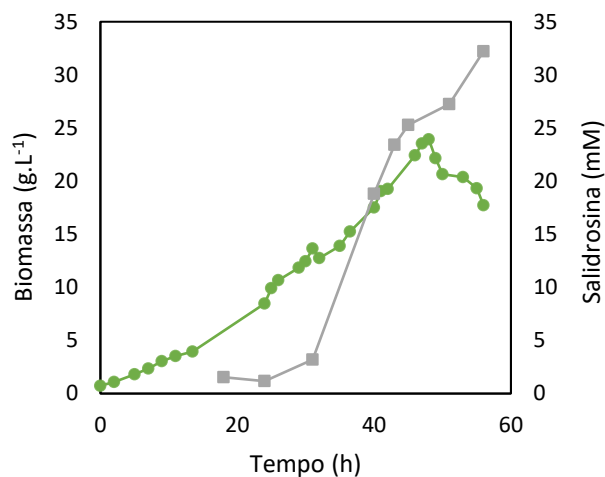


Figura 10 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 e produção de salidroside em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose, 30% OD e 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹: ● Crescimento; ■ salidroside. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Observa-se um aumento da concentração máxima de salidroside proporcional ao aumento da concentração máxima de biomassa. A concentração máxima de salidroside obtida, 32.2 mM, é 1.9 vezes superior à da cultura com 40 g·L⁻¹ de glucose e semelhante à dos ensaios em matraz com 40 mM de tirosol e com 60 mM de tirosol adicionados após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (Figura 6A, Figura 8A, Figura 9 e Figura 10). Observa-se que a formação de salidroside se acentua a meio da fase exponencial e se estende até ao fim da fermentação (Figura 10). Braga *et al.*, (2018) descrevem um comportamento semelhante na produção de resveratrol. Com uma concentração de glucose de 40 g·L⁻¹ obtém-se uma concentração máxima de biomassa de 18 g·L⁻¹, obtida após 23 horas de fermentação, e uma concentração máxima de resveratrol de 4 mg·L⁻¹. O aumento da concentração de glucose de 40 para 80 g·L⁻¹ resulta num aumento de 2 vezes na concentração máxima de biomassa (37 g·L⁻¹), obtida após 37 horas de fermentação, que é acompanhada por um aumento de 3 vezes da concentração máxima de resveratrol (12 mg·L⁻¹) (Braga *et al.*, 2018).

A produtividade do ensaio com 80 g·L⁻¹ de glucose é 1.8 vezes superior à produtividade do ensaio em bioreator com 40 g·L⁻¹ de glucose. Observa-se que o rendimento produto/substrato do ensaio em bioreator com 80 g·L⁻¹ de glucose aumenta 1.9 vezes em relação ao ensaio com 40 g·L⁻¹ de glucose e é ligeiramente superior à dos ensaios em matraz com 40 mM de tirosol e com 60 mM

de tirosol adicionados após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (Tabela 9, Tabela 11, Tabela 12 e Tabela 13).

Tabela 13 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose e 30% OD, com 40 mM de tirosol adicionados após a biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. O IPTG é adicionado em simultâneo com o tirosol. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Concentração Glucose (g·L ⁻¹)
	80
μ_{max} (h ⁻¹)	0.061 ± 0.007
P (mM·h ⁻¹)	0.575
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.806

Como esperado, o aumento da concentração de glucose resulta num aumento da biomassa que consequentemente resulta num aumento proporcional da produtividade e do rendimento produto/substrato. Uma vez que a quantidade de biomassa aumenta, e a quantidade de UGT presente no sistema aumenta proporcionalmente à biomassa, é possível transformar o tirosol presente no meio de forma mais rápida e eficiente.

De modo a melhorar os parâmetros diretamente relacionados com a produção de salidroside, tal como minimizar o impacto negativo no desenvolvimento de biomassa, optou-se por se alimentar o tirosol às culturas em bioreator com regime semi-contínuo. Esta estratégia permite a adição controlada de tirosol, mantendo a sua concentração em valores inferiores à concentração inibitória, e possivelmente o aumento da concentração máxima de salidroside.

4.3.2. Operação semi-contínua

Verificada a elevada toxicidade do tirosol nos ensaios em bioreator, a alimentação semi-contínua poderá ser um método eficiente para aumentar a concentração máxima de biomassa e, consequentemente, a salidroside, dado que permite manter a concentração de tirosol em níveis não tóxicos. Para tal realizaram-se ensaios com alimentação constante e por pulsos de tirosol com 80 e 120 g·L⁻¹ de glucose, respetivamente. Uma vez que é possível aumentar a fase exponencial de crescimento e a concentração máxima de biomassa com o aumento da concentração de glucose de 40 para 80 g·L⁻¹, pressupôs-se que 120 g·L⁻¹ de glucose possibilitariam um aumento acentuado de tais parâmetros. Becker *et al.*, (2016) descrevem aumentos das fases de crescimento, exponencial

e estacionária, e da concentração máxima de biomassa de *C. glutamicum* com o aumento da concentração de glucose no meio de 40 para 90 g·L⁻¹.

4.3.2.1. Alimentação de tirosol com caudal constante

De modo a reduzir os efeitos tóxicos do tirosol e aumentar a concentração máxima de salidroquina realizaram-se duas fermentações às quais se adicionaram o precursor em modo semi-contínuo. Foram definidas duas condições de alimentação para duas fermentações, C1 e C2, com diferentes caudais de alimentação (ver capítulo 3.5.2). Na condição C1 foram definidos dois caudais: 2.4 mL·h⁻¹ das 6 às 31 horas e 21.25 mL·h⁻¹ das 31 às 56 horas. Na condição C2 manteve-se o caudal de 2.4 mL·h⁻¹ das 6 às 31 horas e utilizou-se um caudal inferior, 14.5 mL·h⁻¹, entre as 31 às 80 horas. Em ambas as fermentações foi adicionado um pulso de 20 mM de tirosol às 6 horas, em simultâneo com o início da alimentação constante (ver capítulo 3.5.2). As curvas de crescimento e produção de salidroquina para as referidas condições estão representadas pela Figura 11.

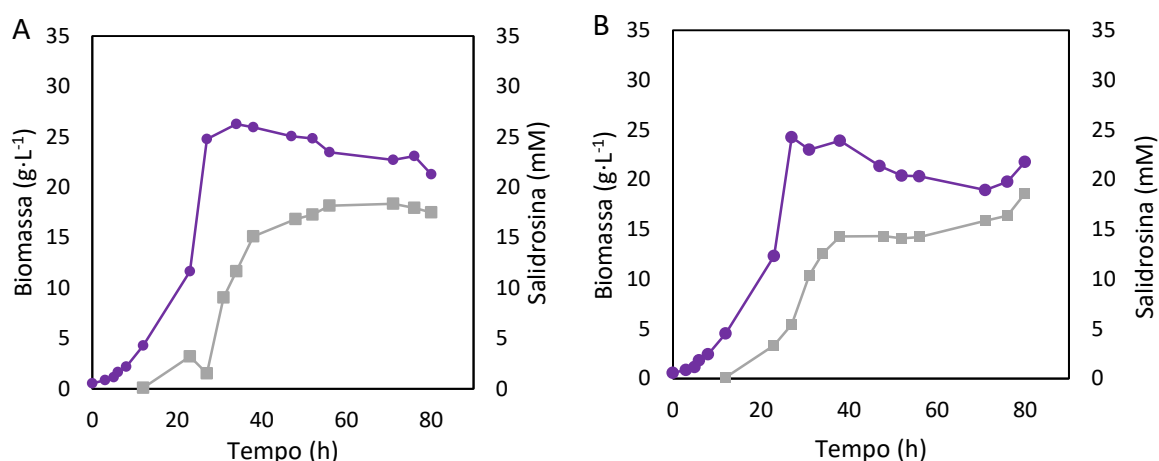


Figura 11 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* DelAro4 e produção de salidroquina em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose, 30% OD. Primeiro caudal de alimentação (2.4 mL·h⁻¹) iniciado às 6 horas com adição simultânea de um pulso de 20 mM de tirosol em ambos os ensaios. Segundo caudal (21.25 mL·h⁻¹ em C1 e 14.5 mL·h⁻¹ em C2) iniciado às 31 horas de fermentação. Segundo caudal interrompido às 56 horas em C1 e às 80 horas em C2. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). ● Crescimento; ■ salidroquina. (A) Alimentação com condição C1; (B) Alimentação com condição C2.

As fases de latência e exponencial de ambos os ensaios são semelhantes às da cultura de controlo (Figura 4 e Figura 11). As taxas específicas de crescimento máximas das culturas alimentadas com as condições C1 e C2 são semelhantes à taxa específica de crescimento máxima da cultura de controlo ($p > 0.05$) (Tabela 14). Observa-se uma melhoria significativa da taxa

específica de crescimento das culturas alimentadas com as condições C1 e C2 relativamente ao ensaio descontínuo com 80 g·L⁻¹ de glucose e 40 mM de tirosol (Figura 10 e Figura 11). Tal melhoria pode dever-se ao facto de que a quantidade inicial de tirosol, adicionada às 6 horas em simultâneo com o caudal constante, ser de apenas 20 mM de tirosol e a introdução de tirosol por caudal constante ser praticamente negligenciável até as 31 horas de fermentação.

Terminada a fase exponencial, após 30 horas de fermentação, ambas as culturas atingem uma concentração máxima de biomassa semelhante à da cultura com 80 g·L⁻¹ de glucose e 40 mM de tirosol (Figura 10 e Figura 11). No entanto, apesar da concentração de biomassa ser semelhante em ambos os ensaios, a produção de salidroside diminui 2 vezes nos ensaios com alimentação constante. Tal pode dever-se ao facto da produção de salidroside estar sobretudo associada à fase de crescimento exponencial que tem a duração de 23 horas, 2 vezes inferior à duração da fase exponencial do ensaio com 80 g·L⁻¹ de glucose com 40 mM de tirosol (Figura 11).

Após 80 e 71 horas obtêm-se as concentrações máximas de salidroside, 17.5 e 18.6 mM, nas culturas alimentadas com as condições C1 e C2, respetivamente, que são 2 duas vezes inferiores à concentração obtida no ensaio descontínuo com 80 g·L⁻¹ de glucose e 40 mM de tirosol (Figura 10 e Figura 11). Após as 31 horas, tempo no qual se inicia a alimentação com o segundo e mais elevado caudal de solução de tirosol, não há uma produção significativa de salidroside (Figura 11). É possível que a introdução de quantidades significativas de tirosol se realizem demasiado tarde nos presentes ensaios.

Tabela 14 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 cultivadas em bioreator de 2 L, com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 80 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação: C1 e C2. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Condições de alimentação	
	C1 (60 mM)	C2 (80 mM)
μ_{max} (h ⁻¹)	0.132 ± 0.021	0.130 ± 0.024
P (mM·h ⁻¹)	0.218	0.233
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.291	0.233

Uma vez que apenas 25 mM de tirosol foram adicionados durante a fase exponencial de crescimento, e é durante esta que se produz a maior parte da salidroside nos ensaios descontínuos, as produtividades dos ensaios com alimentação constante são aproximadamente 2 vezes inferiores

à produtividade do ensaio descontínuo com 80 g·L⁻¹ de glucose com 40 mM de tirosol (Tabela 13 e Tabela 14).

Os rendimentos produto/substrato das culturas alimentadas com as condições C1 e C2 são 1.8 e 2.2 vezes inferiores ao rendimento da cultura com 80 g·L⁻¹ de glucose e 40 mM de tirosol, respetivamente (Tabela 13 e Tabela 14). A adição de quantidades de tirosol mais elevadas com as condições de alimentação C1 e C2, 60 e 80 mM de tirosol, respetivamente, resultam em rendimentos produto/substrato menores.

Xue *et al.* (2007) descrevem um processo de transformação de validamicina A em valienamina por células inteiras de *Stenotrophomonas maltophilia* por fermentação semi-contínua (alimentação constante) e descontínua. A alimentação descontínua resultou em concentrações máximas de valienamina e produtividades mais elevadas quando comparada com a estratégia de alimentação de validamicina A por caudal constante (Xue *et al.*, 2007). Vários artigos demonstram que a alimentação de precursores por pulsos em biotransformações permite um maior rendimento produto/substrato, relativamente à alimentação constante, possivelmente devido à facilidade de manutenção do tirosol em níveis adequados no momento certo (Xue *et al.*, 2007; Gomes *et al.*, 2012; Le Meur *et al.*, 2014).

4.3.2.2. Alimentação de tirosol por pulsos

Uma vez que a estratégia de alimentação de tirosol por caudal contínuo não permitiu aumentar a produção de salidosina, testou-se uma nova estratégia de alimentação. Considerando o perfil de produção de salidosina do ensaio em bioreator com 80 g·L⁻¹ e 40 mM de tirosol, definiram-se três condições de alimentação escalonada de tirosol, P1, P2 e P3, totalizando uma adição de 90, 137 e 166 mM de tirosol, respetivamente, a reatores com 120 g·L⁻¹ de glucose (ver capítulo 3.5.2) (Figura 12).

Em cada ensaio, P1, P2 e P3, foram adicionados 6, 7 e 8 soluções (pulsos) com várias concentrações de tirosol em tempos predefinidos (Tabela 7). É possível observar na Figura 12A uma grande variabilidade nas fermentações do ensaio P1. A variabilidade da concentração de biomassa e de salidosina no bioreator podem dever-se às dificuldades na reprodução experimental de fermentações com alimentação semi-contínua (Mears, 2017).(Tabela 12).

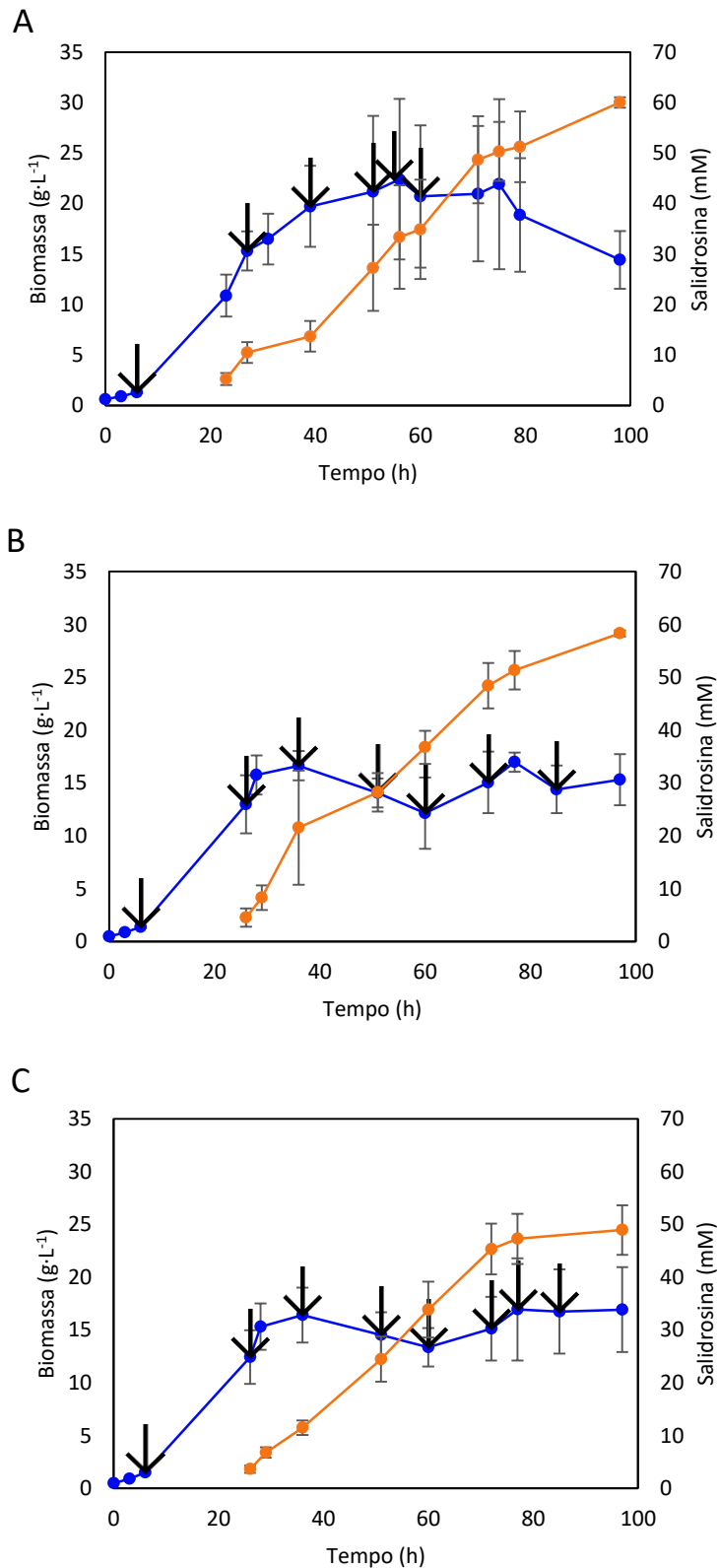


Figura 12 – Curvas de crescimento de *C. glutamicum* e produção de salidrošina em bioreator de 2-L com meio definido (CGXII) a 30°C, pH 7, 120 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação e concentrações de tirosol; ● Crescimento; ■ Salidrošina; (setas) Pulsos tirosol; (A) Alimentação com condição P1; (B) Alimentação com condição P2; (C) Alimentação com condição P3. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹ (aproximadamente após 5-6 horas). Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Através da análise da Figura 12 observa-se que a fase de latência é aproximadamente de 3 horas em todas as condições de alimentação. À semelhança do que sucede nos ensaios com alimentação por caudal constante, devido à adição de menores concentrações de tirosol no início da fermentação, existe um aumento significativo da taxa específica de crescimento. Ao contrário do esperado não se verifica um aumento da fase exponencial em relação aos restantes ensaios. No entanto observa-se que as culturas entram em fase estacionária após 28 horas de fermentação (Figura 12).

As concentrações máximas de biomassa das culturas suplementadas com as condições P1, P2 e P3 são semelhantes, apesar da maior frequência e concentração de pulsos na condição P2 e P3, e semelhantes às concentrações máximas de biomassa dos ensaios com 80 g·L⁻¹ de glucose e 40 mM de tirosol (Figura 11 e Figura 12) ($p > 0.05$). Contrariamente ao esperado, não existe um aumento da concentração máxima de biomassa relativamente aos restantes ensaios com 80 g·L⁻¹ de glucose (Figura 10 e Figura 11). Contudo, verifica-se um aumento da fase estacionária de 20 horas relativamente aos ensaios com as condições C1 e C2 (Figura 11 e Figura 12).

Após 100 horas de fermentação as concentrações máximas de salidroside, 60.1 ± 1.0 , 58.3 ± 0.6 e 48.9 ± 4.7 mM, das culturas suplementadas com as condições P1, P2 e P3, respetivamente, são aproximadamente 3 vezes superiores às concentrações das culturas alimentadas com as condições C1, C2 e 2 vezes superiores à concentração da cultura com 80 g·L⁻¹ de glucose suplementada com 40 mM de tirosol no momento da indução (Figura 10, Figura 11 e Figura 12). Xue *et al.* (2016) relatam que a utilização de um regime intermitente de alimentação de tirosol a culturas de *E. coli* resulta num aumento de 2 vezes na produção de salidroside relativamente à operação descontínua. Embora não se observe um aumento dos parâmetros diretamente relacionados com a produção de salidroside, como concentração máxima de biomassa e duração da fase exponencial, verifica-se a existência de um aumento da concentração máxima de salidroside. A concentração máxima de salidroside obtida no ensaio com a condição P1 é 3.2, 6 e 3000 vezes superior às dos processos de biotransformação por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008), enzimas extraídas de *A. niger*MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e por células inteiras de *E. coli*(DE3), respetivamente (Tabela 1). A concentração máxima de salidroside é ainda 62.6, 316.1, 7.7 e 207.1 vezes superior à dos processos de produção *de novo* por *E. coli*B-SAL2 DE3 (Chung *et al.*, 2017), *E. coli*MG1655

(Bai *et al.*, 2014), *P. fortinii* Rac56 (Cui *et al.*, 2016), *R. sachalinensis* (Wu *et al.*, 2003), respetivamente (Tabela 1).

Observa-se um comportamento distinto e inesperado relativamente à produção de salidroside. Ao contrário do que acontece em todos os restantes ensaios realizados, a produção de salidroside ocorre sobretudo durante a fase estacionária (Figura 12). Tal como previamente referido, a *C. glutamicum* mantém-se metabolicamente ativa uma vez cessado o crescimento, o que permite a produção de proteínas e transporte de compostos através da membrana celular durante a fase estacionária (Inui *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016). Smith, Cho e Liao, (2010) descrevem um processo de produção de isobutanol, por *C. glutamicum* geneticamente manipulada, durante a fase estacionária. As culturas são suplementadas com 80 g·L⁻¹ de glucose e atingem a concentração máxima de biomassa após 23 horas. A produção de isobutanol dá-se sobretudo durante as seguintes 100 horas que correspondem à fase estacionária (Smith, Cho e Liao, 2010).

A introdução de tirosol de forma intermitente durante a fase estacionária permite a sua manutenção em níveis adequados à produção constante de salidroside. Por esta razão, a estratégia de alimentação por pulsos revela-se mais eficiente do que as demais. De acordo com Xue *et al.* (2016) a utilização de um regime de suplementação intermitente de tirosol em culturas de *E. coli* resulta em concentrações máximas de salidroside e rendimentos produto/substrato mais elevados relativamente a ensaios descontínuos. Xue *et al.* (2016) adicionaram 50 mg·L⁻¹ de tirosol no início da fermentação nos ensaios descontínuos e 5 pulsos de tirosol, 20, 10, 10 e 10 mg·L⁻¹ nos instantes 0, 2, 4 e 6 horas, respetivamente, nos ensaios semi-contínuos. A alimentação por pulsos permitiu obter uma concentração máxima de salidroside de aproximadamente 7 mg·L⁻¹, 2 vezes superior à dos ensaios descontínuos. Xue *et al.*, (2007) descrevem também dois processos de transformação de validamicina A em valienamina por *Stenotrophomonas maltophilia* com alimentação constante e por pulsos. A alimentação do precursor por pulsos permite aumentar a concentração máxima de valienamina e o rendimento produto/substrato relativamente às fermentações por alimentação constante e descontínua. De modo similar, Le Meur *et al.*, (2014) descrevem uma melhoria de produção de poli 4-hidroxi-butirato quando utilizada alimentação por pulsos do precursor ácido 4-hidroxi-butírico relativamente à alimentação constante do precursor. Gomes, Teixeira e Belo, (2012) testaram duas estratégias de alimentação semi-contínua de modo a melhorar o rendimento produto/substrato de γ -decalactona produzida por *Yarrowia lipolytica*. O precursor de γ -decalactona, ricinoleato de metilo, foi adicionado aos reatores por alimentação com caudal constante e por pulsos,

4. Resultados e discussão

verificando-se que a estratégia de alimentação intermitente resulta em rendimento produto/substrato mais elevados.

Tabela 15 – Parâmetros fisiológicos de culturas de *C. glutamicum* DelAro4 em bioreatores de 2 L com meio definido (CGXII), 30°C, pH 7, 120 g·L⁻¹ glucose e 30% OD e com diferentes condições de alimentação e concentrações: P1,P2 e P3. O IPTG é adicionado após a concentração de biomassa atingir 1.5-2 g·L⁻¹. Os resultados apresentados correspondem à média e desvio padrão calculados de duas fermentações independentes.

Parâmetros fisiológicos	Condição de alimentação		
	P1 (90 mM)	P2 (137 mM)	P3 (166 mM)
μ_{max} (h ⁻¹)	0.151 ± 0.047	0.116 ± 0.053	0.111 ± 0.1
P (mM·h ⁻¹)	0.613 ± 0.010	0.601 ± 0.006	0.504 ± 0.048
$Y_{p/s}$ (mol·mol ⁻¹)	0.667 ± 0.011	0.426 ± 0.004	0.295 ± 0.028

As produtividades das culturas alimentadas com as condições P1, P2, e P3 são aproximadamente 1.7 vezes superiores às das culturas alimentadas com as condições C1 e C2 e semelhantes à produtividade do ensaio descontínuo em bioreator com 80 g·L⁻¹ de glucose suplementada com 40 mM de tirosol quando a concentração de biomassa atinge 1.5-2 g·L⁻¹ (Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15). Como previsto, a estratégia de alimentação por pulsos permite obter uma maior produtividade em relação à estratégia de alimentação constante de tirosol.

A produtividade da cultura suplementada com a condição P1 é cerca de 1060 vezes superior à do processo com células inteiras de *E.coli* (DE3), 2.7 vezes inferior à produtividade da biotransformação com enzimas extraídas de *A. niger* MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e 2.3 vezes superior ao processo de biotransformação por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008) (Tabela 1 e Tabela 15). A produtividade é ainda 15, 154, 28 e 618 vezes superior à dos processos de produção *de novo* por *E. coli* B-SAL2 DE3 (Chung *et al.*, 2017), *E. coli* MG1655 (Bai *et al.*, 2014), *P. fortinii* Rac56 (Cui *et al.*, 2016), *R. sachalinensis* (Wu *et al.*, 2003), respetivamente (Tabela 1 e Tabela 15).

O rendimento produto/substrato da cultura suplementada com a condição P1 é 1.6 e 2.3 vezes superior ao das culturas suplementadas com as condições P2 e P3, respetivamente, aproximadamente 1.6 vezes superior aos rendimentos das culturas alimentadas com as condições C1 e C2 e semelhante ao rendimento do ensaio descontínuo com 80 g·L⁻¹ de glucose suplementado com 40 mM de tirosol quando a concentração de biomassa atinge 1.5-2 g·L⁻¹ (Tabela 13, Tabela 14 e Tabela 15).

O rendimento produto/substrato mais elevado, obtido no ensaio suplementado com a menor quantidade de tirosol, P1, é 3.2, 7 e 5 vezes superior aos rendimentos das biotransformações por sementes de maçã (Yu *et al.*, 2008), enzimas extraídas de *A. niger* MS-48 (Zhang *et al.*, 2005) e por células inteiras de *E.coli* (DE3), respetivamente (Tabela 1). O rendimento produto/substrato da do ensaio P1 é 1.3 vezes inferior ao rendimento por síntese química descrita por Guo *et al.* (2010) e 1.5 vezes superior ao rendimento da síntese química de salidroside descrita por Liang *et al.* (2014).

A estratégia de alimentação de tirosol por pulsos resulta na produção constante de salidroside durante toda a fase estacionária com uma produtividade semelhante à do ensaio descontínuo em bioreator com 80 g·L⁻¹ de glucose suplementada com 40 mM de tirosol quando a concentração de biomassa atinge 1.5-2 g·L⁻¹ ($p < 0.05$) (Tabela 13 e Tabela 15) que se traduz num aumento da concentração máxima de salidroside relativamente aos restantes ensaios em bioreator.

Apesar de não existir uma melhoria relativamente à produtividade e rendimento produto/substrato nos ensaios com alimentação escalonada relativamente ao melhor ensaio descontínuo, com 80 g·L⁻¹ de glucose suplementada com 40 mM de tirosol quando a concentração de biomassa atinge 1.5-2 g·L⁻¹, é possível obter o dobro da salidroside com apenas uma operação. Embora fosse possível obter os mesmos resultados com duas operações descontínuas, deve considerar-se o tempo de preparação dos reatores entre cada operação de produção de salidroside. Assim, pode ser vantajoso operar um reator em modo semi-contínuo, com o dobro do tempo de fermentação, ainda que com os parâmetros fisiológicos semelhantes à operação descontínua.

5. Conclusões e perspectivas futuras

Com a presente dissertação pretendeu-se otimizar a fermentação de *C. glutamicum* DelAro4 de modo a obterem-se concentrações de salidroside, produtividades e rendimentos produto/substrato máximos. Para tal, foram otimizados o meio de cultura (concentração de precursor, glucose e quantidade de inóculo) e o modo de operação dos bioreatores (descontínuo e semi-contínuo).

Face à insolubilidade do precursor houve necessidade de utilizar um solvente orgânico. Realizaram-se ensaios com várias concentrações de DMSO e concluiu-se que este não é tóxico para a *C. glutamicum* DelAro4 para a gama de concentrações utilizada (80 a 200 mM).

De modo a avaliar o impacto do tirosol no crescimento celular adicionaram-se várias quantidades a culturas de *C. glutamicum* DelAro4 e concluiu-se que este é tóxico para toda a gama de concentrações testadas (40 a 100 mM). No entanto foi possível mitigar a toxicidade do tirosol através do aumento da concentração de inóculo, aumentando assim a resistência das culturas e a concentração máxima de salidroside, produtividade e rendimento produto/substrato. Uma vez que o aumento do inóculo representa um esforço adicional num ambiente industrial, experimentou-se adicionar o tirosol durante a fase exponencial, na qual as culturas apresentam uma resistência mais elevada. Com esta estratégia foi possível diminuir a quantidade de inóculo e obter concentrações máximas de salidroside, produtividades e rendimentos produto/substrato semelhantes para a mesma quantidade de tirosol (60 mM). Esta estratégia foi utilizada em todos os posteriores ensaios em bioreator.

Verificou-se que nos ensaios em bioreator a toxicidade do tirosol é superior à dos ensaios em matraz. Supõe-se que tal efeito possa dever-se à presença de quantidades mais elevadas de oxigénio nos reatores e/ou ausência de MOPS, que por sua vez facilita a transformação do tirosol em compostos com toxicidade mais elevada como radicais fenoxilícos e quinonas.

Assim, de modo a reduzir a toxicidade do tirosol nos ensaios em bioreator, optou-se por se alimentar o tirosol de modo semi-contínuo. Foram testadas duas estratégias de alimentação de tirosol, por caudal constante e por pulsos. A estratégia de alimentação por caudal constante revelou-se ineficiente. Por outro lado, a estratégia de alimentação por pulsos, associada a um aumento da concentração de glucose no meio ($120 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), permitiu obter as concentrações mais elevadas de salidroside, 60.1 mM ($18 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Além da modificação do modo de operação dos reatores relativamente ao tirosol seria interessante operar o reator de forma semi-contínua relativamente à alimentação da glucose. A

alimentação constante de glucose possibilitaria a manutenção das culturas por longos períodos de tempo e uma produção constante de salidroside.

O tirosol é um dos compostos fenólicos mais abundantes em águas residuais de lagares. Estudar a possibilidade da sua recuperação, purificação e posterior utilização como substrato para produção de salidroside através da *C. glutamicum* DelAro4 é uma possibilidade com interesse ecológico e económico.

Avaliar a existência de icariside permitiria perceber qual a especificidade de glicosilação do tirosol pela UGT utilizada no presente trabalho (OsUGT13).

A *C. glutamicum* revelou-se uma plataforma eficiente para a produção de elevadas quantidades de salidroside e demonstrou uma surpreendente resistência ao tirosol. A resistência pronunciada ao tirosol e a ausência de vias de degradação de ambos os compostos fenólicos são características que tornam a *C. glutamicum* um hospedeiro de interesse para a produção de salidroside.

Bibliografia

Abdel-Rhman, S. H., El-Mahdy, A. M. e El-Mowafy, M. (2015) «Effect of Tyrosol and Farnesol on Virulence and Antibiotic Resistance of Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*», *BioMed research international*. Hindawi Publishing Corporation, 2015, pp. 456–463. doi: 10.1155/2015/456463.

Ammendola, S., Mosca, L. e Bovicellic, P. (2008) «An expedient synthesis of 2,5-dihydroxytyrosol and studies on its effects on cell growth inhibition», *ARKAT USA*, 8, pp. 105–115. doi: <http://dx.doi.org/10.3998/ark.5550190.0009.810>.

Armstrong, W. D. e Spink, W. (1943) *Antibacterial Effects of Quinones*.

Azaizeh, H. *et al.* (2011) «Synergistic antibacterial effects of polyphenolic compounds from olive mill wastewater», *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, pp. 1–9. doi: 10.1155/2011/431021.

Baez, A. e Shiloach, J. (2014) «Effect of elevated oxygen concentration on bacteria, yeasts, and cells propagated for production of biological compounds», *Microbial Cell Factories*, 13(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12934-014-0181-5.

Bai, Y. *et al.* (2014) «Production of salidroside in metabolically engineered *Escherichia coli*», *Scientific Reports*, 4, pp. 1–8. doi: 10.1038/srep06640.

Baker, C. J. *et al.* (2007) «Interference by Mes [2-(4-morpholino)ethanesulfonic acid] and related buffers with phenolic oxidation by peroxidase», *Free Radical Biology and Medicine*, 43(9), pp. 1322–1327. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.07.020.

Becker, J. *et al.* (2011) «From zero to hero-Design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production», *Metabolic Engineering*, 13(2), pp. 159–168. doi: 10.1016/j.ymben.2011.01.003.

Becker, J. *et al.* (2016) *High-Density Fermentation of Corynebacterium glutamicum for Renewable Chemicals Production*.

Becker, J. e Wittmann, C. (2012) «Bio-based production of chemicals, materials and fuels - *Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory», *Current Opinion in Biotechnology*, pp. 631–640. doi: 10.1016/j.copbio.2011.11.012.

Bejar, B. E., Upton, R. e John, H. (2017) «Adulteration of *Rhodiola* (*Rhodiola rosea*) Rhizome and Root and Extracts», *Botanical Adulterants Bulletin*, pp. 1–8.

Boudet, A. M. (2007) «Evolution and current status of research in phenolic compounds», *Phytochemistry*, pp. 2722–2735. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.06.012.

Braga, A. *et al.* (2018) «Impact of the cultivation strategy on resveratrol production from

glucose in engineered *Corynebacterium glutamicum*», *Journal of Biotechnology*. Elsevier, 265(July 2017), pp. 70–75. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.11.006.

Brown, R. P., Gerbarg, P. L. e Zakir, R. (2002) «*Rhodiola rosea*: A Phytomedicinal Overview», *The Journal of the American Botanical Council*, (56), pp. 40–52. doi: http://rhodiolarosea.org/HerbGrams-2002_original.pdf.

Buchholz, J. (2015) *Development, characterization, and application of a novel scale-down apparatus for the investigation of the scale-up dependent CO₂/HCO₃ – stimulus in Corynebacterium glutamicum*.

Buchwald, W. *et al.* (2015) «Effect of fertilization on roseroot (*Rhodiola rosea* L .) yield and content of active compounds EFFECT OF FERTILIZATION ON ROSEROOT (*Rhodiola rosea* L .) YIELD AND CONTENT OF ACTIVE COMPOUNDS Waldemar Buchwald , Romuald Mordalski , Wojciech A . Kucharski», *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*, 14(2), pp. 109–121.

BUD, R. (1989) «History of “biotechnology”», *Nature*, 337(6202), pp. 10–10. doi: 10.1038/337010a0.

Chemler, J. A. e Koffas, M. A. (2008) «Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes», *Current Opinion in Biotechnology*, pp. 597–605. doi: 10.1016/j.copbio.2008.10.011.

Cheyrier, V. *et al.* (2013) «Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology», *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, pp. 1–20. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.

Chisti, Y. (2014) *Encyclopedia of Food Microbiology, Encyclopedia of Food Microbiology*. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00106-3.

Choi, J. W. *et al.* (2015) «Enhanced production of recombinant proteins with *Corynebacterium glutamicum* by deletion of insertion sequences (IS elements)», *Microbial Cell Factories*, 14(1), p. 207. doi: 10.1186/s12934-015-0401-7.

Chung, D., Kim, S. Y. e Ahn, J. H. (2017) «Production of three phenylethanoids, tyrosol, hydroxytyrosol, and salidroside, using plant genes expressing in *Escherichia coli*», *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–8. doi: 10.1038/s41598-017-02042-2.

Cicerale, S., Lucas, L. e Keast, R. (2010) «Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil», *International Journal of Molecular Sciences*, 11(2), pp. 458–479. doi: 10.3390/ijms11020458.

Cowan, M. M. (1999) «Plant products as antimicrobial agents», *Clinical Microbiology*

Reviews, pp. 564–582. doi: 0893-8512/99/\$04.00

Cuerrier, A. e Ampong-Nyarko, K. (2015) *Rhodiola rosea*. Boca Raton: CRC Press.

Cui, J. *et al.* (2016) «Potential of the Endophytic Fungus *Phialocephala fortinii* Rac56 Found in *Rhodiola* Plants to Produce Salidroside and p-Tyrosol», *Molecules*, 21(4), pp. 1–13. doi: 10.3390/molecules21040502.

Cui, J.-L. *et al.* (2017) «Fungal endophyte-induced salidroside and tyrosol biosynthesis combined with signal cross-talk and the mechanism of enzyme gene expression in *Rhodiola crenulata*», *Scientific Reports*. Springer US, 7, pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-12895-2.

d'Alessandro, N. *et al.* (2000) «Reaction of superoxide with phenoxyl-type radicals», *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 2, pp. 1862–1867. doi: 10.1039/B0033460.

Dai, J. e Mumper, R. J. (2010) «Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties», *Molecules*, 15(10), pp. 7313–7352. doi: 10.3390/molecules15107313.

Dávalos, J. Z. *et al.* (2018) «Energetic and Structural Properties of Two Phenolic Antioxidants : Tyrosol and Hydroxytyrosol», *The Journal of Physical Chemistry A*, 122, pp. 4130–4137. doi: 10.1021/acs.jpca.8b00457.

Day, J. G. e Stacey, G. (2007) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2.ª ed. Totowa, New Jersey: Humanpress.

Dicosmo, F. e Misawa, M. (1995) «Plant Cell and Tissue Culture: Alternatives for Metabolite Production», *Pergamon Biotechnology Advances*, 13(3), pp. 425–453. doi: 10.1016/0734-9750(95)02005-N.

Dimpfel, W. e Panossian, A. G. (2018) «Assessing the Quality and Potential Efficacy of Commercial Extracts of *Rhodiola rosea* L. by Analyzing the Salidroside and Rosavin Content and the Electrophysiological Activity in Hippocampal Long-Term Potentiation , a Synaptic Model of Memory», *Frontiers in Pharmacology*, 9, pp. 1–11. doi: 10.3389/fphar.2018.00425.

Dudnik, A. *et al.* (2018) «BacHBerry: BACterial Hosts for production of Bioactive phenolics from bERRY fruits», *Phytochemistry Reviews*, pp. 291–326. doi: 10.1007/s11101-017-9532-2.

Eggeling, L. e Bott, M. (2005) *Handbook of *Corynebacterium glutamicum**, Taylor & Francis Group.

Eich, E. (2008) *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*. Springer Science & Business Media.

Fan, B. *et al.* (2017) «Mining of efficient microbial UDP-glycosyltransferases by motif evolution cross plant kingdom for application in biosynthesis of salidroside», *Scientific Reports*. Springer US, 7(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-017-00568-z.

Fujita, M., Ike, M. e Hashimoto, S. (1991) «Feasibility of wastewater treatment using genetically engineered microorganisms», *Water Research*, 25(8), pp. 979–984. doi: 10.1016/0043-1354(91)90147-I.

Galambosi, B. (2006) «DEMAND AND AVAILABILITY OF RHODIOLA ROSEA L. RAW MATERIAL», em *DEMAND AND AVAILABILITY OF RHODIOLA ROSEA L. RAW MATERIAL*, pp. 223–236.

Galambosi, B. (2016) «Comparison of natural and cultivated roseroot (*Rhodiola rosea* L.) roots in Finland», *Agrimedia GmbH*, 12(3), pp. 141–147.

Galano, A. *et al.* (2012) «A quantum chemical study on the free radical scavenging activity of tyrosol and hydroxytyrosol», *Theoretical Chemistry Accounts*, 131(3), pp. 1–12. doi: 10.1007/s00214-012-1173-3.

Gande, R. *et al.* (2007) «The Two Carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* Essential for Fatty Acid and Mycolic Acid Synthesis †», *Journal of Bacteriology*, 189(14), pp. 5257–5264. doi: 10.1128/JB.00254-07.

Ghisalba, O., Meyer, H.-P. e Wohlgemuth, R. (2010) «INDUSTRIAL BIOTRANSFORMATION», em *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, pp. 1–18.

Giada, M. de L. R. (2016) «Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power», em *Agricultural and Biological Sciences*, pp. 88–112. doi: 10.5772/711.

Gomes, N., Teixeira, J. A. e Belo, I. (2012) «Fed-batch versus batch cultures of *Yarrowia lipolytica* for γ -decalactone production from methyl ricinoleate», *Biotechnology Letters*, 34(4), pp. 649–654. doi: 10.1007/s10529-011-0824-0.

Gordeliy, V. I. *et al.* (1998) «Lipid Membrane Structure and Interactions in Dimethyl Sulfoxide/Water Mixtures», *Biophysical Journal*, 75(5), pp. 2343–2351. doi: 10.1016/S0006-3495(98)77678-7.

Gourdon, P. *et al.* (2003) «Osmotic stress, glucose transport capacity and consequences for glutamate overproduction in *Corynebacterium glutamicum*», *Journal of Biotechnology*, 104(1–3), pp. 77–85. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00165-2.

Grech-Baran, M., Sykłowska-Baranek, K. e Pietrosiuk, A. (2015) «Biotechnological

approaches to enhance salidroside, rosin and its derivatives production in selected *Rhodiola* spp. in vitro cultures», *Phytochemistry Reviews*. Springer Netherlands, 14(4), pp. 657–674. doi: 10.1007/s11101-014-9368-y.

Guo, Y. *et al.* (2010) «Synthesis, Biological Activity of Salidroside and Its Analogues», *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 58(12), pp. 1627–1629. doi: 10.1248/cpb.58.1627.

Gurtovenko, A. a e Anwar, J. (2007) «Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide.», *The journal of physical chemistry. B*, 111(35), pp. 10453–10460. doi: 10.1021/jp073113e.

Gyawali, R. e Ibrahim, S. A. (2014) «Natural products as antimicrobial agents», *Food Control*, pp. 412–429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.

Hagino, H. e Nakayama, K. (1974) «Regulatory properties of prephenate dehydrogenase and prephenate dehydratase from *Corynebacterium glutamicum*», *Agricultural and Biological Chemistry*, 38(12), pp. 2367–2376. doi: 10.1080/00021369.1974.10861536.

Han, X. *et al.* (2002) «Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography», *Journal of Chromatography A*, 971, pp. 237–241.

Hasan, M. M. *et al.* (2017) «Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes», *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), pp. 59–68. doi: 10.1016/j.jgeb.2017.02.009.

Herrmann, K. M. (1995) «The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism», *Plant Physiology*, 107(1), pp. 7–12. doi: 10.1104/pp.107.1.7.

Hoefman, S. *et al.* (2012) «Survival or revival: Long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria», *PLoS ONE*, 7(4), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0034196.

de Hollander, J. A. (1993) «Kinetics of microbial product formation and its consequences for the optimization of fermentation processes», em *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, pp. 375–381. doi: 10.1007/BF00871231.

Hung, S. K., Perry, R. e Ernst, E. (2011) «Phytomedicine The effectiveness and efficacy of *Rhodiola rosea* L. : A systematic review of randomized clinical trials», *European Journal of Integrative Medicine*. Elsevier GmbH., 18(4), pp. 235–244. doi: 10.1016/j.phymed.2010.08.014.

Ikeda, M. (2006) «Towards bacterial strains overproducing L-tryptophan and other aromatics by metabolic engineering», *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 615–626. doi:

10.1007/s00253-005-0252-y.

Ikeda, M. e Katsumata, R. (1992) «Metabolic engineering to produce tyrosine or phenylalanine in a tryptophan-producing *Corynebacterium glutamicum* strain», *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), pp. 781–785. doi: 082/5.

Ikeda, M. e Nakagawa, S. (2003) «The *Corynebacterium glutamicum* genome: Features and impacts on biotechnological processes», *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 99–109. doi: 10.1007/s00253-003-1328-1.

Inui, M. *et al.* (2004) «Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions», *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 7(4), pp. 182–196. doi: 10.1159/000079827.

Kagenishi, T., Yokawa, K. e Baluška, F. (2016) «MES Buffer Affects Arabidopsis Root Apex Zonation and Root Growth by Suppressing Superoxide Generation in Root Apex», *Frontiers in Plant Science*, 7(79), pp. 1–8. doi: 10.3389/fpls.2016.00079.

Kalinowski, J. *et al.* (2003) «The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins», *Journal of Biotechnology*, 104, pp. 5–25. doi: 10.1016/S0168-1656(03)00154-8.

Kallscheuer, N., Vogt, M., Stenzel, A., *et al.* (2016) «Construction of a *Corynebacterium glutamicum* platform strain for the production of stilbenes and (2S)-flavanones», *Metabolic Engineering*, 38, pp. 47–55. doi: 10.1016/j.ymben.2016.06.003.

Kallscheuer, N., Vogt, M., Kappelmann, J., *et al.* (2016) «Identification of the *phd* gene cluster responsible for phenylpropanoid utilization in *Corynebacterium glutamicum*», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), pp. 1871–1881. doi: 10.1007/s00253-015-7165-1.

Kallscheuer, N. (2017) *Corynebacterium glutamicum - a novel platform for the production of plant polyphenols*. Heinrich Heine University Düsseldorf.

Kallscheuer, N. *et al.* (2017) «Functional expression of plant-derived O-methyltransferase, flavanone 3-hydroxylase, and flavonol synthase in *Corynebacterium glutamicum* for production of pterostilbene, kaempferol, and quercetin», *Journal of Biotechnology*, 258, pp. 190–196. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.01.006.

Kallscheuer, N. *et al.* (2018) «Identification and microbial production of the raspberry phenol salidroside that is active against Huntington's disease», *Plant Physiology*. doi: 10.1104/pp.18.01074.

Keilhauer, C., Eggeling, L. e Sahm, H. (1993) «Isoleucine Synthesis in *Corynebacterium*

glutamicum : Molecular Analysis of the ilvB-ilvN-ilvC Operon», *Journal of Bacteriology*, 175(17), pp. 5595–5603.

Keynes, R. G., Griffiths, C. e Garthwaite, J. (2003) «Superoxide-dependent consumption of nitric oxide in biological media may confound in vitro experiments.», *The Biochemical journal*, 369, pp. 399–406. doi: 10.1042/BJ20020933.

Ki, W. L. e Hyong, J. L. (2006) «The roles of polyphenols in cancer chemoprevention», *BioFactors*, pp. 105–121. doi: 10.1002/biof.5520260202.

Kinghorn, A. D. *et al.* (2011) «The relevance of higher plants in lead compound discovery programs», *Journal of Natural Products*, pp. 1539–1555. doi: 10.1021/np200391c.

Kirsch, M. *et al.* (1998) «Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxyxynitrite with HEPES and related tertiary amines: Implications for a general mechanism», *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), pp. 12716–12724. doi: 10.1074/jbc.273.21.12716.

Kligman, A. M. (1965) «Dimethyl Sulfoxide—Part 2», *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 193(11), pp. 923–928. doi: 10.1001/jama.1965.03090110061015.

Koch-Koerfges, A. *et al.* (2012) «Physiology and global gene expression of a *Corynebacterium glutamicum* Δ 1FO-ATP synthase mutant devoid of oxidative phosphorylation», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(2), pp. 370–380. doi: 10.1016/j.bbabi.2011.10.006.

Kogure, T. *et al.* (2016) «Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for shikimate overproduction by growth-arrested cell reaction», *Metabolic Engineering*, 38, pp. 204–216. doi: 10.1016/j.ymben.2016.08.005.

Kortmann, M. *et al.* (2014) «A chromosomally encoded T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Corynebacterium glutamicum* : construction and comparative evaluation at the single-cell level», *Microbial Biotechnology*, 8(2), pp. 253–265. doi: 10.1111/1751-7915.12236.

Kumar, R. S., Moorthy, I. M. G. e Baskar, R. (2013) «Modeling and optimization of glutamic acid production using mixed culture of *Corynebacterium glutamicum* ncm2168 and *Pseudomonas reptilivora* ncm2598», *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 43(7), pp. 668–681. doi: 10.1080/10826068.2013.772064.

Kusari, S., Hertweck, C. e Spiteller, M. (2012) «Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites», *Chemistry and Biology*, pp. 792–798. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.06.004.

- Lai, P. K. e Roy, J. (2004) «Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices.», *Current medicinal chemistry*, 11, pp. 1451–1460. doi: 10.2174/0929867043365107.
- Landete, J. M. *et al.* (2008) «Study of the inhibitory activity of phenolic compounds found in olive products and their degradation by *Lactobacillus plantarum* strains», *Food Chemistry*, 107(1), pp. 320–326. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.08.043.
- Lee, J. H. e Wendisch, V. F. (2017) «Biotechnological production of aromatic compounds of the extended shikimate pathway from renewable biomass», *Journal of Biotechnology*, 257, pp. 211–221. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.016.
- Lee, J. Y. *et al.* (2016) «The actinobacterium *Corynebacterium glutamicum*, an industrial workhorse», *Microbiology Biotechnology*, 26(5), pp. 807–822. doi: 10.4014/jmb.1601.01053.
- Leekumjorn, S. e Sum, A. K. (2006) «Molecular study of the diffusional process of DMSO in double lipid bilayers», *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758, pp. 1751–1758. doi: 10.1016/j.bbamem.2006.06.010.
- Leopoldini, M., Russo, N. e Toscano, M. (2011) «The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants», *Food Chemistry*, pp. 288–306. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.08.012.
- Liang, Q. *et al.* (2014) «Scalable synthesis of salidroside», *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences*, 23(7), pp. 446–453.
- Liebgoth, P. P. *et al.* (2007) «Bioconversion of tyrosol into hydroxytyrosol and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid under hypersaline conditions by the new *Halomonas* sp. strain HTB24», *FEMS Microbiology Letters*, 276(1), pp. 26–33. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00896.x.
- Liese, A., Seelbach, K. e Wandrey, C. (2006) *Industrial Biotransformations, Second Edition*, *Industrial Biotransformations, Second Edition*. doi: 10.1002/9783527608188.
- Litsanov, B. *et al.* (2012) «Efficient aerobic succinate production from glucose in minimal medium with *Corynebacterium glutamicum*», *Microbial Biotechnology*, 5(1), pp. 116–128. doi: 10.1111/j.1751-7915.2011.00310.x.
- Liu, Z. *et al.* (2012) «*Rhodiola rosea* extracts and salidroside decrease the growth of bladder cancer cell lines via inhibition of the mTOR pathway and induction of autophagy», *Molecular Carcinogenesis*, 51(3), pp. 257–267. doi: 10.1002/mc.20780.
- Lomonosova, E. E. *et al.* (1998) «The critical role of HEPES in SIN-1 cytotoxicity, peroxynitrite versus hydrogen peroxide», *Free Radical Biology and Medicine*, 24(4), pp. 522–528. doi: 10.1016/S0891-5849(97)00295-5.

Lopez-Gallego, F. e Schmidt-Dannert, C. (2010) «Multi-enzymatic synthesis», *Current Opinion in Chemical Biology*. Elsevier Ltd, 14(2), pp. 174–183. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.023.

Lorenz, E., Klatt, S. e Wendisch, V. F. (2013) «Reductive amination by recombinant *Escherichia coli*: Whole cell biotransformation of 2-keto-3-methylvalerate to l-isoleucine», *Journal of Biotechnology*, 168(3), pp. 289–294. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.06.014.

Luo, X. *et al.* (2017) «Pharmacological Activities and Progress in Structure Modification of», *Medicinal Chemistry*, 7(3), pp. 818–823. doi: 10.4172/2161-0444.1000434.

Lütke-Eversloh, T., Santos, C. N. S. e Stephanopoulos, G. (2007) «Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications», *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 751–762. doi: 10.1007/s00253-007-1243-y.

M. Cragg e J. Newman, D. and G. (2012) «Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years», *Journal of Natural Products*, 75(3), pp. 311–335. doi: 10.1021/np200906s.Natural.

Maier, R. M. (2010) «Bacterial Growth», em *Environmental microbiology*, pp. 37–54. doi: 10.1007/978-94-017-8908-0.

Marienhagen, J. e Bott, M. (2013) «Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products», *Journal of Biotechnology*. Elsevier B.V., 163(2), pp. 166–178. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.06.001.

McNeil, B. e Harvey, L. M. (2008) *Practical Fermentation Technology, Practical Fermentation Technology*. doi: 10.1002/9780470725306.

Mears, L. (2017) *Novel strategies for control of fermentation processes Novel strategies for control of fermentation processes*. Technical University of Denmark.

Medina, E. *et al.* (2006) «Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), pp. 4954–4961. doi: 10.1021/jf0602267.

de Ménorval, M. A. *et al.* (2012) «Effects of dimethyl sulfoxide in cholesterol-containing lipid membranes: A comparative study of experiments in silico and with cells», *PLoS ONE*, 7(7), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0041733.

Le Meur, S. *et al.* (2014) «Improved productivity of poly (4-hydroxybutyrate) (P4HB) in recombinant *Escherichia coli* using glycerol as the growth substrate with fed-batch culture», *Microbial Cell Factories*, 13(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s12934-014-0131-2.

Notman, R. *et al.* (2007) «The permeability enhancing mechanism of DMSO in ceramide

bilayers simulated by molecular dynamics.», *Biophysical journal*, 93(6), pp. 2056–2068. doi: 10.1529/biophysj.107.104703.

Oecd (1998) *Biotechnology for clean industrial products and processes: Towards industrial sustainability*. doi: 10.1787/9789264163409-en.

Parr, A. J. e Bolwell, G. P. (2000) «Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile», *Journal of the Science of Food and Agriculture*, pp. 985–1012. doi: 10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<985::AID-JSFA572>3.0.CO;2-7.

Pátek, M. e Nešvera, J. (2013) «Promoters and Plasmid Vectors of *Corynebacterium glutamicum*.», em *Corynebacterium glutamicum - Biology and Biotechnology*, pp. 51–88. doi: 10.1007/978-3-642-29857-8.

Petrini, O. *et al.* (1993) «Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi», *Natural Toxins*, 1(3), pp. 185–196. doi: 10.1002/nt.2620010306.

Prasad, A. K. e Mishra, P. C. (2017) «Scavenging of superoxide radical anion and hydroxyl radical by urea, thiourea, selenourea and their derivatives without any catalyst: A theoretical study», *Chemical Physics Letters*, 684, pp. 197–204. doi: 10.1016/j.cplett.2017.06.040.

Qiang, L. *et al.* (2013) «Optimization of Fermentation Conditions and Properties of an Exopolysaccharide from *Klebsiella* sp. H-207 and Application in Adsorption of Hexavalent Chromium», *PLoS ONE*, 8(1), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0053542.

Ralston, L. *et al.* (2005) «Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases.», *Plant physiology*, 137(4), pp. 1375–88. doi: 10.1104/pp.104.054502.

Razzaque, M. S. e Taguchi, T. (2002) «Cellular and molecular events leading to renal tubulointerstitial fibrosis», *Medical Electron Microscopy*, pp. 68–80. doi: 10.1007/s007950200009.

Reddy, L. V. A. *et al.* (2008) «Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches», *Bioresource Technology*, 99(7), pp. 2242–2249. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.006.

Rempe, C. S. *et al.* (2017) «The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics», *Frontiers in Microbiology*, p. 422. doi: 10.3389/fmicb.2017.00422.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J. e Paganga, G. (1996) «Structure-antioxidant activity

relationships of flavonoids and phenolic acids», *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 933–956. doi: 10.1016/0891-5849(95)02227-9.

Le Roy, J. *et al.* (2016) «Glycosylation Is a Major Regulator of Phenylpropanoid Availability and Biological Activity in Plants», *Frontiers in Plant Science*, 7, pp. 1–19. doi: 10.3389/fpls.2016.00735.

Scalbert, A. e Williamson, G. (2000) «Dietary intake and bioavailability of polyphenols.», *The Journal of nutrition*, 130, pp. 2073–2085. doi: 10.1089/109662000416311.

Shadnia, H. e Wright, J. S. (2008) «Understanding the toxicity of phenols: Using quantitative structure-activity relationship and enthalpy changes to discriminate between possible mechanisms», *Chemical Research in Toxicology*, 21(6), pp. 1197–1204. doi: 10.1021/tx800058r.

Shida, T., Mitsugi, K. e Komagata, K. (1977) «Reduction of Lag Time in 3. Effect of Inoculum Phases of Seed Bacterial Growth, Size and Growth Cultures», 23, pp. 187–200.

Skopińska-Rózewska, E. *et al.* (2008) «The influence of *Rhodiola quadrifida* 50% hydro-alcoholic extract and salidroside on tumor-induced angiogenesis in mice.», *Polish journal of veterinary sciences*, 11(2), pp. 97–104. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18683537>.

Smith, B. T. *et al.* (2017) «Herbal Supplement Sales in US Increase 7.7 % in 2016», *Herbalgram*, (115), pp. 56–65.

Smith, K. M., Cho, K. M. e Liao, J. C. (2010) «Engineering *Corynebacterium glutamicum* for isobutanol production», *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), pp. 1045–1055. doi: 10.1007/s00253-010-2522-6.

Spelberg, M. S. (2013) *Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for production of the adipate precursor 2-oxoadipate*.

Strobel, G. e Daisy, B. (2003) «Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products», *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), pp. 491–502. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

Subba Rao, C. *et al.* (2008) «Modelling and optimization of fermentation factors for enhancement of alkaline protease production by isolated *Bacillus circulans* using feed-forward neural network and genetic algorithm», *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), pp. 889–898. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03605.x.

Sultana, B., Anwar, F. e Ashraf, M. (2009) «Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts», *Molecules*, 14, pp. 2167–2180. doi:

10.3390/molecules14062167.

Sun, K. X., Xia, H. W. e Xia, R. L. (2015) «Anticancer effect of salidroside on colon cancer through inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway», *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(1), pp. 615–621.

Taiz, L. e Zeiger, E. (2010) *Plant Physiology*. Editado por E. Zeiger e L. Taiz. Sinauer Associates. Disponível em: <http://www.amazon.com/dp/0878938567>.

Taleb, H. *et al.* (2016) «The antibacterial activity of date syrup polyphenols against *S. aureus* and *E. coli*», *Frontiers in Microbiology*, 7, pp. 1–9. doi: 10.3389/fmicb.2016.00198.

Tang, J. *et al.* (2009) «Preparative purification of salidroside from *Rhodiola rosea* by two-step adsorption chromatography on resins», *Journal of separation science*, 32, pp. 185–191. doi: 10.1002/jssc.200800438.

Tatsumi, N. e Inui, M. (2014) *Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology*. Springer Science & Business Media.

Tavakkoli, M., Hamidi-Esfahani, Z. e Azizi, M. H. (2012) «Optimization of *Corynebacterium glutamicum* Glutamic Acid Production by Response Surface Methodology», *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), pp. 92–99. doi: 10.1007/s11947-009-0242-7.

Torrens-Spence, M. P. *et al.* (2018) «Complete Pathway Elucidation and Heterologous Reconstitution of *Rhodiola* Salidroside Biosynthesis», *Molecular Plant*, 11(1), pp. 205–217. doi: 10.1016/j.molp.2017.12.007.

Tristram-Nagle, S. *et al.* (1998) «DMSO produces a new subgel phase in DPPC: DSC and X-ray diffraction study», *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1369(1), pp. 19–33. doi: 10.1016/S0005-2736(97)00197-1.

Tzin, V. e Galili, G. (2010) «New Insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants», *Molecular Plant*, pp. 956–972. doi: 10.1093/mp/ssq048.

Ultee, A., Bennik, M. H. J. e Moezelaar, R. (2002) «The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*», *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), pp. 1561–1568. doi: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.

Vlietinck, A. *et al.* (2009) «Legal Requirements for the Quality of Herbal Substances and Herbal Preparations for the Manufacturing of Herbal Medicinal Products in the European Union *», *Planta Med*, 75, pp. 683–688. doi: 10.1055/s-0029-1185307.

Vogt, T. (2010) «Phenylpropanoid biosynthesis», *Molecular Plant*, 3(1), pp. 2–20. doi: 10.1093/mp/ssp106.

Vstatieva, L. E. (2008) «Introduction of Wild Golden Root (*Rhodiola rosea* L .) As A Potential Economic Crop in Bulgaria», 62(4), pp. 621–627.

Vuong, Q. V. (2017) «Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste», em *Utilisation of Bioactive Compounds from Agricultural and Food Waste*. CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 414. Disponível em: https://books.google.pt/books/about/Utilisation_of_Bioactive_Compounds_from.html?id=TZCojwEACAAJ&redir_esc=y.

Wechselberger, P. *et al.* (2012) «Efficient feeding profile optimization for recombinant protein production using physiological information», *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(9), pp. 1637–1649. doi: 10.1007/s00449-012-0754-9.

Weckwerth, W. (2003) «METABOLOMICS IN SYSTEMS BIOLOGY», *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), pp. 669–689. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135014.

Wendisch, V. F. *et al.* (2016) «Updates on industrial production of amino acids using *Corynebacterium glutamicum*», *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(6), p. 105. doi: 10.1007/s11274-016-2060-1.

Whitaker, A. e Stanbury, P. (2013) «Principles of fermentation technology», *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

World Health Organization (2003) *WHO guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*, World Health Organization. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Wright, J. S. e Shadnia, H. (2008) «Computational modeling of substituent effects on phenol toxicity», *Chemical Research in Toxicology*, 21(7), pp. 1426–1431. doi: 10.1021/tx800085a.

Wu, S., Zu, Y. e Wu, M. (2003) «High yield production of salidroside in the suspension culture of *Rhodiola sachalinensis*», *Journal of Biotechnology*, 106(1), pp. 33–43. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.07.009.

Xing, S. *et al.* (2014) «Salidroside stimulates mitochondrial biogenesis and protects against H₂O₂-induced endothelial dysfunction.», *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, pp. 1–13. doi: 10.1155/2014/904834.

Xue, F. *et al.* (2016) «Expression of Codon-Optimized Plant Glycosyltransferase UGT72B14 in *Escherichia coli* Enhances Salidroside Production», *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2016, pp. 1–8. doi: 10.1155/2016/9845927.

Xue, Y. P., Zheng, Y. G. e Shen, Y. C. (2007) «Enhanced production of valienamine by *Stenotrophomonas maltophilia* with fed-batch culture in a stirred tank bioreactor», *Process Biochemistry*, 42(6), pp. 1033–1038. doi: 10.1016/j.procbio.2007.04.002.

Yang, J. e Liu, Y. (2001) «Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis», *American Journal of Pathology*, 159(4), pp. 1465–1475. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62533-3.

Yu, H. L. *et al.* (2008) «Environmentally benign synthesis of natural glycosides using apple seed meal as green and robust biocatalyst», *Journal of Biotechnology*, 133(4), pp. 469–477. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.12.003.

Zahoor, A., Lindner, S. N. e Wendisch, V. F. (2012) «Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* aimed at alternative carbon sources and new products», *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 3(4), pp. 1–11. doi: 10.5936/csbj.201210004.

Zhang, C. *et al.* (2005) «Enzymic synthesis of salidroside: Purification and characterization of salidroside from *Aspergillus niger*», *Process Biochemistry*, 40(9), pp. 3143–3147. doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.043.

Zhang, J. X. *et al.* (2011) «A tyrosine decarboxylase catalyzes the initial reaction of the salidroside biosynthesis pathway in *Rhodiola sachalinensis*», *Plant Cell Reports*, 30(8), pp. 1443–1453. doi: 10.1007/s00299-011-1053-7.

Zhao, G. e Chasteen, N. D. (2006) «Oxidation of Good's buffers by hydrogen peroxide», *Analytical Biochemistry*, 349(2), pp. 262–267. doi: 10.1016/j.ab.2005.10.005.

Anexos

A1 – RETA DE CALIBRAÇÃO BIOMASSA

Como mencionado no capítulo 3.6, a concentração de biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi determinada com recurso a uma reta de calibração (Tabela A1).

Tabela A1 – Equação da reta de calibração da biomassa

Microrganismo	Gama de validade ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Equação		R^2
		$A_{600\text{ nm}} = (m \pm S_m) * C + (b \pm S_b)$		
<i>C. glutamicum</i> delAro4	0.05 – 0.13	$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$	0.998
		(1.434 ± 0.129)	(0.047 ± 0.01)	

Onde:

$A_{600\text{ nm}}$ - absorvância lida a 600 nm;

m - Declive da reta;

S_m - Erro padrão associado ao declive;

b - Ordenada na origem da reta;

S_b - Erro padrão associado à ordenada na origem;

C - Concentração celular ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

R^2 - coeficiente de determinação.

A2 - RETA DE CALIBRAÇÃO SALIDROSINA

As concentrações de salidrošina foram determinadas por *ultra high performance liquid chromatography* (UHPLC) (ver capítulo 3.6.2). Com as condições utilizadas o tempo de retenção da salidrošina é de 3.152 minutos. A reta de calibração da salidrošina está representada na Tabela A2.

Tabela A2 – Equação da reta de calibração de salidrošina de UHPLC (Condições 60 C° e 0.5 mL·min⁻¹)

Composto	Gama de validade (mg·L ⁻¹)	Equação		R ²
		$A = (m \pm S_m) * C + (b \pm S_b)$		
Salidrošina	3.9 – 250	$(m \pm S_m)$	$(b \pm S_b)$	0.999
		43171.057 ± 363.662	- 17413.588 ± 46464.870	

Onde:

A – Área do pico (mV.s);

m – Declive da reta;

C – Concentração de salidrošina (g·L⁻¹);

S_m – Erro padrão associado ao declive;

b – Ordenada na origem da reta;

S_b – Erro padrão associado à ordenada na origem;

R₂ – coeficiente de determinação.