



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Ana Paula Abuchain Sousa**

**Aumento de escala para produção de Proteína verde  
fluorescente melhorada (*Enhanced Green Fluorescent  
Protein – EGFP*) a partir de *Escherichia coli* recombinante  
em biorreator convencional**

**Orientador:** Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

**Araraquara – SP**

**2019**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Ana Paula Abuchain Sousa**

**Aumento de escala para produção de Proteína verde fluorescente  
melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein* – EGFP) a  
partir de *Escherichia coli* recombinante em biorreator  
convencional**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

**Araraquara – SP**

**2019**

**S176a** Sousa, Ana Paula Abuchain.  
Aumento de escala para produção de Proteína verde fluorescente melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP*) a partir de *Escherichia coli* recombinante em biorreator convencional / Ana Paula Abuchain Sousa. – Araraquara, 2019. 84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Ciências Farmacêuticas. Área de Desenvolvimento de Fármacos E Medicamentos.

Orientador: Marcel Otavio Cerri.

1. Cultivo de *E. coli* recombinante. 2. Biorreator convencional. 3. Proteína verde fluorescente. I. Cerri, Marcel Otavio, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho,*

*Aos meus pais Ézer e Ana Lúcia, minhas referências de  
amor, dedicação e responsabilidade!*

*Ao meu querido esposo Caique, por ser meu porto seguro!*

*Aos meus irmãos Marcelo e Samuel, meus primeiros e  
melhores amigos na vida.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelo amparo em todos os momentos difíceis, pela sabedoria, fé e proteção.

A minha mãe Ana Lúcia Stain Abuchain pelo seu amor incondicional, por sua proteção e seus ensinamentos tão sábios, por ser a base de tudo que eu sou. Eu serei eternamente grata e feliz por tê-la tido em minha vida! Sua presença entre nós é e sempre será muito viva! Devo tudo que sou a ela!

Ao meu pai Ézer José Abuchain, por tudo que fez por mim durante toda a minha vida, por ser meu exemplo de dedicação e amor incondicional, em especial por ter sido, durante esses últimos dez anos, meu pai, minha mãe, meu conselheiro, minha base, meu alicerce. Cada etapa conquistada é por você meu pai!

Ao meu esposo Caique Lopes Sousa, por seu meu porto seguro, por todo carinho, amor, paciência e estímulo que me deu desde o começo da nossa história até agora.

Aos meus irmãos Marcelo Eduardo Abuchain e Samuel Luiz Abuchain que sempre me apoiaram, me ensinaram e me protegeram em todos os momentos difíceis, por todo companheirismo e amizade dedicados a mim desde o meu nascimento. Vocês são os meus melhores amigos.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri, que me recebeu de braços abertos desde a nossa primeira conversa. Por todo carinho, respeito, dedicação, paciência, ensinamentos e confiança depositados em mim durante esses anos. Serei eternamente grata a você, por ter proporcionado uma das conquistas mais desejadas da minha vida. Por ser uma das pessoas que eu mais respeito profissionalmente e em quem eu me espelho muito. Obrigada por todo auxílio e dedicação ao meu processo de amadurecimento profissional.

A Aylime Castanho Bolognesi Melchior Jesuino por ter entrado na minha vida no começo do mestrado e ter se tornado uma pessoa tão presente nela. Pelas conversas, por ter me aconselhado e me ensinado em todos os momentos que precisei, não só no mestrado como na vida pessoal. Muito obrigada por todos os ensinamentos, pelas tardes no café, pelos longos cultivos em biorreator, pelos finais de semana no laboratório, por torcer por minhas vitórias e por sempre me aconselhar como uma irmã! Com você aprendi muito! Sentirei saudades todos os dias.

Ao querido técnico Mateus Scontri que sempre esteve presente quando precisei, por toda paciência e auxílio nos cultivos e nos equipamentos e por toda amizade e confiança depositadas em mim. Sentirei saudades!

A minha querida amiga Camila Fernanda Amantino que esteve comigo todo o tempo e que participou do meu dia a dia e das minhas dificuldades e vitórias. Obrigada por estar comigo todos os dias, pelas marmitas com panqueca, pelas caronas, pelas ajudas com documentação, pelos lembretes de matrícula, pelos almoços diários, por tudo que você fez e faz por mim sem esperar nada em troca. Em você encontrei amizade sincera e companheirismo para enfrentar essa longa jornada.

A todos os amigos que fiz dentro da Universidade, que são muitos, por, de formas individuais, terem torcido por mim e me apoiado em todos os momentos.

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas –UNESP campus Araraquara, pelos anos em que aqui trabalhei e pela possibilidade de desenvolver minha pesquisa.

A seção de Pós Graduação pela paciência, ajuda e orientações.

A CAPES pelo apoio financeiro, processo nº 88882.180442/2018-01.

A FAPESP pelo apoio financeiro, nº de processo 2014/19793-3.

A todos aqueles que participaram de forma direta ou indireta para que eu alcança-se essa conquista.

## **EPIGRAFE**

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

*Arthur Schopenhauer*

## RESUMO

Avanços na biotecnologia proporcionaram possibilidades para o eficiente desempenho da produção em larga escala de diversas biomoléculas e conseqüentemente suas aplicações industriais. A *Escherichia coli* se destaca dentre a gama de microrganismos que agem como hospedeiros de genes, desempenhando a função de codificar a síntese proteica. Os vetores mais veiculados na produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são baseados no operon *lac*, onde o isopropil  $\beta$ -D1-tio-galactopiranosídeo (IPTG), análogo a molécula de lactose, é utilizado para a indução da produção da proteína de interesse. Estudos descritos na literatura também observaram o bom desempenho da lactose como agente de indução da *E. coli* recombinante na expressão de proteína verde fluorescente melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein* – EGFP), e suas vantagens quando comparada ao IPTG, como por exemplo menor custo e menor toxicidade. A EGFP se tornou promissora pelo fato de ser monomérica e não precisar de auxílio de quaisquer agentes adicionais para exibir atividade de fluorescência. Possui variadas utilidades no campo biológico como excelente biomarcador da expressão genica e biosensor. Em bioprocessos, operados em biorreatores convencionais é fundamental o estudo dos parâmetros interferentes nos cultivos para a otimização da expressão do produto desejado. A oxigenação em processos conduzidos de maneira aeróbica, também é uma tarefa desafiadora em biorreatores convencionais, sendo imprescindível o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, o que pode ser limitante para o crescimento e para a expressão da proteína de interesse. Em processos de produção de proteínas heterólogas presume-se que a produtividade pode ser proporcional à densidade celular final deste microrganismo no cultivo. Sendo assim, o presente trabalho visou a melhora do processo de obtenção da proteína heteróloga EGFP em biorreator convencional no modo de operação batelada. Foram realizados experimentos testando diferentes concentrações de glicose, lactose e IPTG, onde se observou que a lactose se comportou de maneira mais eficiente e promissora como fonte de carbono e agente indutor da expressão proteica quando comparado ao IPTG. Através do planejamento experimental denominado Delineamento Central Composto (DCC) observou-se que dentre as variáveis estudadas (temperatura ( $X_1$ ), agitação ( $X_2$ ), preenchimento do frasco tipo Erlenmeyer ( $X_3$ ) e concentração de lactose ( $X_4$ )) apenas temperatura foi significativamente estatística (nível de significância de 99%) para a expressão de EGFP no processo, de forma inversamente proporcional, enquanto que concentração de lactose e preenchimento do frasco se mostraram significativas para o crescimento celular de forma proporcional. Entre os experimentos realizados em biorreator convencional variando taxa de agitação de 400 rpm a 1000 rpm e taxa de aeração de 0,5 vvm a 0,75 vvm houve um aumento substancial da concentração de EGFP com o aumento da agitação, o que ocorreu devido a transferência de oxigênio ser melhorada em altas condições de agitação, ocorrendo aumento de  $k_{LA}$  (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $h^{-1}$ )) e OTR (*Oxygen Transfer Rate* – taxa de transferência de oxigênio). A suplementação com 2,5 g/L de extrato de levedura ao meio utilizado nos experimentos (composto de LB 25 g/L com lactose 40g/L) proporcionou o aumento do consumo da lactose de 20 g/L para 32 g/L aproximadamente. Observou-se também que as proteínas formadas ao final do processo em biorreator não estavam com ativação completa do cromóforo, que ocorre através da etapa de oxidação da molécula, pois em teste realizado submetendo a biomassa celular diluída, em vazão de oxigênio puro de 1 L/min aumentou em torno de 2,5 vezes a concentração de EGFP em relação a concentração inicial.

**Palavras chaves:** Cultivo de *E. coli* recombinante. Biorreator convencional. Proteína verde fluorescente.



## ABSTRACT

Advances in biotechnology have provided possibilities to the performance of large-scale of biomolecules and therefore of their industrial applications. *Escherichia coli* stands out among microorganisms that act as host genes, functioning as a synthetic protein. The most useful vectors for the production of recombinant proteins in *E. coli* are based on the operon *lac*, where isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyroside (IPTG), analogous to lactose, is used to induce the production of proteins of interest. Studies in the literature have also observed the good performance of lactose as an inducer of recombinant *E. coli* in the expression of Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), and its advantages when compared to IPTG, such as lower cost and toxicity. EGFP becomes promising because it is monomeric and does not need to help the main agents for fluorescence activity. It has several uses in the biological field as an excellent biomarker of gene expression and biosensor. In bioprocesses, operated in conventional bioreactors, it is fundamental to study the interfering parameters in the cultures to optimize the expression of the desired product. Oxygenation in aerobically conducted processes is also a challenging task in conventional bioreactors, with control of the concentration of dissolved oxygen in the culture medium is essential, which may be limiting for growth and expression of the protein of interest. In processes of production of heterologous proteins, it is assumed that the productivity may be proportional to the final cell density of this microorganism in the culture. Thus, the present work aimed at improving the process of obtaining the heterologous protein EGFP in conventional bioreactor in the mode of batch operation. Experiments were performed testing different concentrations of glucose, lactose and IPTG, where it was observed that lactose behaved in a more efficient and promising way as a source of carbon and inducing agent of protein expression when compared to IPTG. Experimental design called the Central Compound Designation (CCD) showed that temperature ( $X_1$ ), agitation ( $X_2$ ), Erlenmeyer flask filling ( $X_3$ ) and lactose concentration ( $X_4$ ) (level of significance of 99%) for the expression of EGFP in the process, inversely proportional, whereas lactose concentration and filling of the flask were shown to be significant for the cellular growth proportionally. Among the experiments performed in conventional bioreactor, varying agitation rate from 400 rpm to 1000 rpm and aeration rate of 0.5 vvm to 0.75 vvm there was a substantial increase in EGFP concentration with increased agitation, which was due to oxygen transfer coefficient ( $h^{-1}$ ) and OTR (Oxygen Transfer Rate) were observed. Supplementation with 2.5 g / L of yeast extract in the medium used in the experiment (composed of LB 25 g / L with lactose 40 g / L) provided an increase in lactose consumption from 20 g / L to approximately 32 g / L. It was also observed that the proteins formed at the end of the process in bioreactor were not with complete activation of the chromophore that occurs through the oxidation stage of the molecule, as in a test performed by subjecting the cellular biomass diluted, the pure oxygen flow rate of 1 L / min increased about 2.5 times the concentration of EGFP over the initial concentration.

**Key words:** recombinant *E. coli* cultivation. Conventional bioreactor. Green Fluorescent Protein.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**IPTG** - Isopropil  $\beta$ -D1-tio-galactopiranosídeo

**DO<sub>600nm</sub>** - Densidade Óptica lida em comprimento de onda de 600 nanômetros

**Meio LB** - Meio de cultura Luria Bertani

**GFP** - *Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente

**EGFP** – *Enhanced Green Fluorescent Protein* / Proteína verde fluorescente melhorada

**$Y_{p/x}$**  - Rendimento de produto em relação a grama de célula (mg/g)

**$Y_{x/s}$**  – Coeficiente de rendimento de substrato por grama de célula (g/g)

**X<sub>1</sub>** - Variável temperatura (°C)

**X<sub>2</sub>** - Variável agitação (rpm)

**X<sub>3</sub>** - Variável preenchimento do frasco (%)

**X<sub>4</sub>** – Variável concentração de lactose (g/L)

**ANOVA** - *The Analysis of Variance* / Análise de variância

**[EGFP]** - Concentração de EGFP (mg/L)

**[Lactose]** - Concentração de lactose (g/L)

**Rpm** - Rotação por minuto

**V<sub>vm</sub>** - Vazão de ar por volume de meio por minuto (L/min)

**OTR** – *Oxygen Transfer Rate* / taxa de transferência de oxigênio

***E. coli*** – *Escherichia coli*

***rE. Coli*** – *Escherichia coli* recombinante

**HPLC** - *High performance liquid chromatography* / Cromatografia líquida de alta eficiência

**$k_{La}$**  – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h<sup>-1</sup>)

**$\mu_{máx}$**  – Velocidade específica máxima de crescimento (h<sup>-1</sup>)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diferença estrutural da composição de parede bacteriana entre bactérias Gram negativas (a) e bactérias Gram positivas (b)_____	18
<b>Figura 2.</b> Esquema das regiões que compõem o operon lac _____	20
<b>Figura 3.</b> Esquema da metabolização da lactose pelo operon lac _____	21
<b>Figura 4.</b> Esquema da metabolização da lactose quando na ausência de glicose no meio __	22
<b>Figura 5.</b> Representação da estrutura proteica da GFP e seu cromóforo_____	24
<b>Figura 6.</b> Esquema da formação do grupamento cromóforo da proteína GFP _____	25
<b>Figura 7.</b> Mutações de GFP selvagem (a) e cromóforo da GFP selvagem (b)._____	26
<b>Figura 8.</b> Etapas de desenvolvimento de um novo bioprocesso para fabricação comercial envolvendo um produto derivado de DNA recombinante _____	28
<b>Figura 9.</b> Biorreator do tipo tanque agitado e aerado (a); impelidores tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (b) _____	30
<b>Figura 10.</b> Experimento com oxigênio puro na vazão de 1 L/min em amostras diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e outra amostra diluída em água, durante 8 horas. _____	43
<b>Figura 11.</b> Curvas de crescimento celular das condições onde se obteve a maior resposta de crescimento celular dentre as testadas no experimento em microplaca (glicose, lactose e IPTG). _____	49
<b>Figura 12.</b> Condições onde se obteve a maior resposta de emissão de fluorescência dentre as testadas no experimento em microplaca (glicose, lactose e IPTG) referentes a emissão de fluorescência ao término das 12 horas de cultivo. _____	49
<b>Figura 13.</b> Concentração de biomassa de cultivos realizados em diferentes condições de adição de lactose ao meio LB, um controle positivo (meio LB) e uma condição com adição de IPTG como agente indutor, a seta indica o momento da indução por IPTG. _____	51
<b>Figura 14.</b> Concentração de EGFP (mg/L) de cultivos realizados diferentes condições de adição de lactose ao meio LB, um controle positivo (meio LB) e uma condição com adição de IPTG como agente indutor, a seta indica o momento da indução por IPTG. _____	51
<b>Figura 15.</b> Concentração de biomassa (g/L) e EGFP (mg/L) de dois biorreatores operados em modo batelada nas condições de 300 rpm, 30°C e vazão de ar de 0,5 vvm (2 L/min), a seta indica o momento de indução por IPTG 0,05 mM. _____	53
<b>Figura 16.</b> Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta Y1 (concentração de biomassa) em função das variáveis X <sub>3</sub> e X <sub>4</sub> (preenchimento do frasco e concentração de lactose, respectivamente). _____	57

<b>Figura 17.</b> Influência da temperatura na concentração de proteína produzida (A) e Diagrama de Pareto (B) apresentando a significância das variáveis estudadas. _____	60
<b>Figura 18.</b> Crescimento celular entre os biorreatores em 20°C e em 25°C, operados em 600 rpm com vazão de ar de 3 L/min, utilizando meio LB com adição de 40 g/L de lactose. _____	61
<b>Figura 19.</b> Concentração de EGFP (mg/L) dos experimentos realizados testando diferente condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm), em função do tempo. _____	63
<b>Figura 20.</b> Concentrações de biomassa entre os experimentos realizados testando diferentes condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm) em função do tempo. _____	63
<b>Figura 21.</b> Curva da concentração de EGFP em função da OTR - taxa de transferência de oxigênio (mmol/L/h). _____	64
<b>Figura 22.</b> Fotos do biorreator operado em 1000 rpm, 25°C, 2 L/min de vazão de ar e meio de cultura composto de LB (25g/L) com adição de lactose 40 (g/L) nos momentos 0, 36 e 48 horas após o início do cultivo. _____	66
<b>Figura 23.</b> Concentração de EGFP (mg/L) e biomassa (g/L) do cultivo realizado em biorreator convencional operando em 800 rpm, com vazão de ar de 2 L/min, a 25°C com meio de cultivo composto por LB (25 g/L) mais 40 g/L de lactose mais 2,5 g/L de extrato de levedura. ____	69
<b>Figura 24.</b> Concentração de proteína em função do tempo do experimento utilizando oxigênio puro. _____	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Matriz experimental do Delineamento composto central, com as variáveis independentes temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração lactose. ....	38
<b>Tabela 2.</b> Condições de temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração de lactose para cada ponto experimental do planejamento DCC realizado em mesa incubadora rotativa.....	38
<b>Tabela 3.</b> Valores de $t_{tab}$ para três níveis de significância usados em tratamento de dados estatísticos (90, 95 e 99%).....	39
<b>Tabela 4.</b> Condições testadas em mesa incubadora rotativa em 200 rpm à 25°C.....	40
<b>Tabela 5.</b> Condições dos experimentos realizados em biorreator convencional no modo de operação batelada .....	42
<b>Tabela 6.</b> Médias das concentrações de produção de EGFP e de concentração de biomassa entre as duplicatas e/ou triplicatas dos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa proposto pelo planejamento experimental DCC. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Teste t de Student, erro padrão e valor de p das variáveis testada individualmente e da interação entre elas, dados obtidos para a resposta $Y_1$ (concentração de biomassa). ....	56
<b>Tabela 8.</b> Análise de variância referente a resposta concentração de biomassa ( $Y_1$ ) de acordo com o DCC. ....	57
<b>Tabela 9.</b> Erro padrão, teste t de Student e valor de p das variáveis testada individualmente e da interação entre elas, dados obtidos para a resposta $Y_2$ (produção de proteína EGFP). ....	58
<b>Tabela 10.</b> Análise de variância referente aos dados obtidos para a resposta $Y_2$ (produção de EGFP) através do planejamento experimental DCC. ....	59
<b>Tabela 11.</b> Parâmetros cinéticos dos dois biorreatores 3 (20°C) e 4 (25°C) operados em 600 rpm, 3 L/min de ar e meio LB com adição de lactose. ....	62
<b>Tabela 12.</b> Parâmetros cinéticos observados nos cultivos 5 (400 rpm), 6 (800 rpm) e 7 (1000 rpm) operados a 25°C em vazão de ar de 2 L/min composto de meio LB com adição de 40 g/L de lactose. ....	65
<b>Tabela 13.</b> Ensaio realizado em mesa incubadora rotativa referente a concentração de EGFP, biomassa e consumo de lactose das condições testadas. ....	67

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	18
2.2 Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP).....	23
2.3 Biorreator e Bioprocessos .....	27
2.4 Planejamento experimental fatorial .....	32
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 <i>Objetivo geral</i> .....	34
3.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	34
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	<b>35</b>
4.1 <i>Microrganismo</i> .....	35
4.2 <i>Meio de cultura</i> .....	35
4.3 <i>Cultura bacteriana estoque</i> .....	35
4.4 <i>Inóculo</i> .....	36
4.5 <i>Indutor</i> .....	36
4.6 <i>Metodologia Experimental</i> .....	36
4.6.1 <i>Cultivos em microplaca de 96 poços</i> .....	36
4.6.2 <i>Delineamento Central Composto (DCC) planejado através do software Protimiza Experimental Design</i> .....	37
4.6.3 <i>Teste de suplementação do meio LB em mesa incubadora rotativa</i> .....	40
4.6.4 <i>Cultivos realizados em biorreator convencional</i> .....	40
4.6.5 <i>Experimento com oxigênio puro</i> .....	42
4.7 <i>Metodologia analítica</i> .....	43
4.7.1 <i>Análise de densidade óptica</i> .....	43
4.7.2 <i>Análise da concentração de proteína</i> .....	43

4.7.3	Determinação da concentração de biomassa .....	44
4.7.4	Determinação da concentração de lactose .....	44
4.7.5	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) ....	45
4.8	Determinação de parâmetros cinéticos .....	45
4.8.3	Determinação da produção específica ( $Y_p/x$ ) e produtividade ( $Pr$ ) .....	46
4.8.4	Determinação da taxa de transferência de oxigênio dissolvido (Oxygen Transfer Rate – OTR) .....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
5.1	Determinação da fonte de carbono e agente indutor .....	48
5.2	Delineamento composto central (DCC) .....	54
5.3	Ensaio em biorreator convencional .....	61
5.4	Teste de suplementação do meio LB .....	66
5.5	Teste com oxigênio puro .....	69
6	CONCLUSÃO .....	72
	REFERENCIAS .....	74
	APÊNDICE .....	79

## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços em processos biotecnológicos tem proporcionado melhorias significativas na qualidade da vida humana, como por exemplo a utilização de proteínas recombinantes, fertilização *in vitro*, produção de antibióticos e vacinas e produção de anticorpos monoclonais. (DORAN 2012)

A GFP (*Green Fluorescent Protein* – Proteína verde fluorescente), observada pela primeira vez, na forma selvagem, na água-viva bioluminescente *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 1962) faz parte da ampla gama de proteínas fluorescentes, utilizadas como biomarcador, que merecem destaque. Esta proteína, em especial, merece destaque pelo fato de ser monomérica e não precisar de auxílio de nenhum agente ou cofator adicional para exibir atividade de fluorescência (HEIM et al., 1994).

A *Escherichia coli* (*E. coli*) se destaca, dentre a gama de microrganismos que agem como hospedeiros de genes, desempenhando a função de codificar a síntese proteica. Os vetores, ou também chamados de plasmídeos de expressão, mais veiculados na produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são baseados no *operon lac*, onde o isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG), é utilizado para a indução da produção da proteína de interesse (SORENSEN e MORTENSEN, 2005).

A utilização de *E. coli* em cultivos celulares é bastante utilizada em biotecnologia pois seu crescimento é rápido, o que significa um aumento da produtividade do produto de interesse no cultivo (BLIGHT e HOLLAND, 1994; HORTA 2011). Sendo assim, utilizar cultivos de *E. coli* para produção de proteínas recombinantes têm realçado a aplicação bem-sucedida na biotecnologia aliada à área de saúde.

Manipulações genéticas possibilitaram a obtenção de uma variação de GFP selvagem, a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), possui maior emissão de fluorescência quando comparada a GFP selvagem e a oxidação pós-traducional, necessária para que ocorra emissão de fluorescência pelo cromóforo ocorre quatro vezes mais rápido na proteína melhorada (HEIM et al., 1995; KREMERS, et al., 2006).

A EGFP pode ser usada como biomarcador, agente de auxílio na visualização da arquitetura celular e marcador da dinâmica e comportamento de si própria na biologia celular. Por ser instantaneamente detectável, esta proteína torna-se uma considerável ferramenta no processo de aperfeiçoamento de purificação de proteínas recombinantes e também pode ser aplicada como um poderoso marcador de expressão genética *in vivo* sem comprometer a localização real das proteínas fundidas (DUAN et al., 2013).



Além do amplo impacto na tecnologia devidos a estudos com EGFP, várias empresas também incorporaram este repórter para, por exemplo, rastreamento de drogas de alto rendimento, avaliação de vetores virais para terapia genética humana, controle biológico de pragas e monitoramento de microrganismos geneticamente modificados.

Uma vez delineada a etapa de expressão da proteína de interesse faz-se fundamental, em algumas circunstâncias, como por exemplo para a utilização da EGFP como biosensor ótico, que essa consiga ser expressa em escala industrial, de maneira que o rendimento de produto aumente (CINELLI et al., 2001). Apesar da vasta utilização da EGFP na biotecnologia, ainda são necessários novos estudos que visem a otimização e desenvolvimento de processos mais eficientes para sua produção (HUANG e SHUSTA, 2005).

Experimentos em frasco de agitação realizados no estudo de cultivos em pequena escala tem algumas vantagens, como por exemplo, a facilidade de manipulação, baixo custo de processo produtivo, e a possibilidade de realizar vários experimentos simultaneamente. No entanto, o suprimento de oxigênio para a célula pode se tornar limitante se a demanda do mesmo exceder a capacidade de transferência de oxigênio através do fechamento do frasco de agitação e/ou a interface gás-líquido. Em contrapartida, um biorreator oferece maior acesso no controle da transferência de oxigênio e também a possibilidade controle de pH. O ar é introduzido diretamente no sistema por meio de um difusor e a concentração de oxigênio na solução pode ser mantida em níveis elevados (VEGLIO et al., 1998).

Desta maneira, testes realizados com o objetivo de otimizar os parâmetros relacionados a bioprocessos, como por exemplo agitação, vazão de ar, pH, composição do meio e disponibilidade de oxigênio dissolvido totalmente controladas em biorreatores laboratoriais, podem ser realizados de modo a permitir o crescimento do microrganismo e conseqüentemente maximizar produção da proteína desejada.

A oxigenação em processos aeróbicos também é uma tarefa desafiadora em biorreatores convencionais, sendo imprescindível o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, o que pode ser limitante para o crescimento e atividade microbiana. (KNOLL et al., 2007)

Cultivos em reatores no modo batelada, que são cultivos onde todo o suprimento de fonte de carbono, pH e temperatura são ajustados no início do cultivo e mantidos da mesma forma até seu término, sem alteração das condições durante todo o crescimento bacteriano, são comumente utilizados na busca de melhores concentrações celulares. (HORTA, 2011)

Acredita-se que produção de proteínas heterólogas esteja diretamente relacionada a concentração celular do microrganismo. Por isso torna-se interessante buscar otimizar o processo de crescimento celular e o aumento da expressão proteica, verificando a relação entre estas duas fases em conjunto com estratégias que possam reduzir os custos dos processos realizado em larga escala.

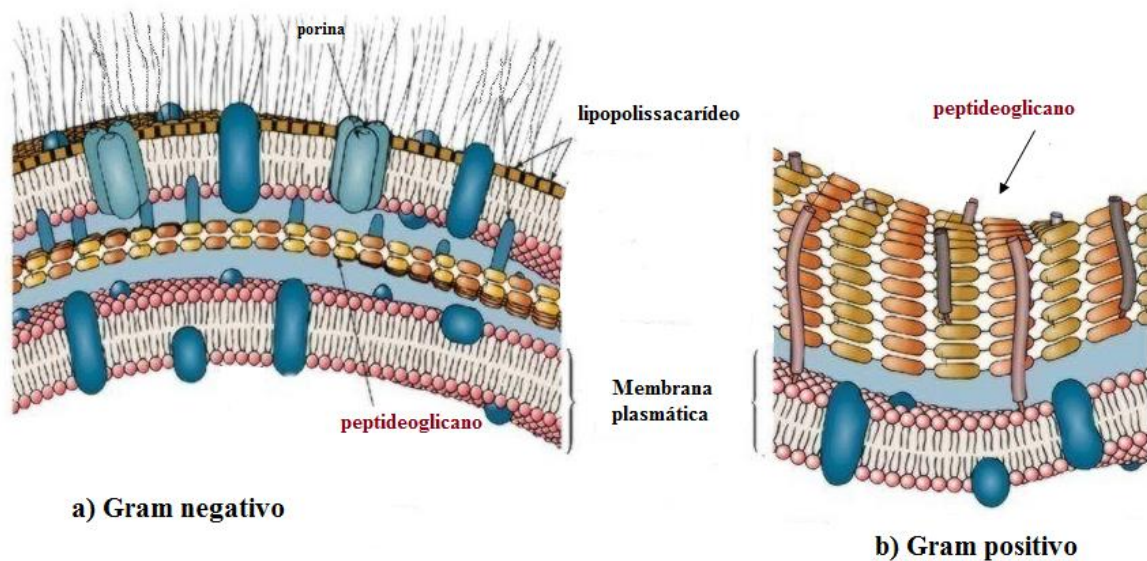
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* foi descrita em 1885 por Theodor Escherich, se apresenta na forma de bacilo e pertence à família das Enterobacteriaceae. Denominado um organismo procaríoto, é uma bactéria classificada como Gram negativa (Figura 1), onde apresenta em sua estrutura de parede celular uma membrana interna (citoplasmática) e uma membrana externa envolta por lipopolissacarídeos. Estas duas membranas são separadas por uma camada de peptídeoglicano e por um espaço periplasmático. Possui metabolismo anaeróbico facultativo, ou seja pode ser cultivada em condições de aerobiose e anaerobiose (NEIDHARDT et al., 1990).

Classificada, em relação a temperatura, como mesófila, seu crescimento celular se dá na faixa de temperatura entre 8°C a 48°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento a 37°C. A glicose é o substrato mais utilizado como fonte de carbono e energia no crescimento desse microrganismo. A *E. coli* possui, tipicamente, flagelos e pili, ambos surgem da membrana citoplasmática. Os flagelos são organelas que auxiliam a locomoção enquanto os pili são organelas de adesão ou que permitem a transferência de DNA durante a conjugação bacteriana (NEIDHARDT et al., 1990).

**Figura 1.** Diferença estrutural da composição de parede bacteriana entre bactérias Gram negativas (a) e bactérias Gram positivas (b)



FONTE: adaptado de [http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez\\_archivos/image009.jpg](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n2/sanchez_archivos/image009.jpg)

O material genético se encontra na região central, constituído de uma molécula de DNA circular. Outras moléculas pequenas de DNA circular podem existir, sendo denominadas plasmídeos. (TORTORA *et al.*, 2012).

Desde a década de 70 a tecnologia de DNA recombinante vem sendo utilizada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, para elucidação da sequência codificadora de um gene de interesse e conseqüentemente da proteína codificada por ele. Esta técnica também pôde ser empregada no desenvolvimento de microrganismos recombinantes capazes de produzir substâncias uteis, tais como a insulina humana, hormônio de crescimento, vacinas, enzimas industriais e proteínas de forma geral.

A *E. coli* é o sistema de expressão mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes para estudos estruturais e funcionais devido a vários fatores, como a facilidade com que este organismo pode ser manipulado geneticamente, suas elevadas taxas de crescimento já identificadas e seus baixos requisitos nutricionais. (BLIGHT e HOLLAND, 1994; ROCHA, 2003)

Na utilização de microrganismos recombinantes, a síntese de proteínas heterólogas acarreta uma diminuição significativa de recursos celulares, como por exemplo nucleotídeos e aminoácidos, isso ocorre pois parte significativa da produção de energia celular e de aminoácidos gerados são direcionados à síntese proteica, podendo gerar no microrganismo um estresse metabólico (KILIKIAN *et al.*, 2000).

Nestes sistemas de expressão em microrganismos recombinantes, além da energia celular necessária para a fase de síntese proteica, também é necessário que uma porcentagem da energia seja destinada para a etapa de replicação e manutenção do plasmídeo, isso compromete o crescimento celular o que pode levar a uma diminuição no rendimento de biomassa. Ademais a instabilidade plasmidial pode acarretar o surgimento de uma população de células com ausência do plasmídeo de interesse (GLICK, 1995; HEYLAND *et al.*, 2011; MOROWVAT *et al.*, 2014).

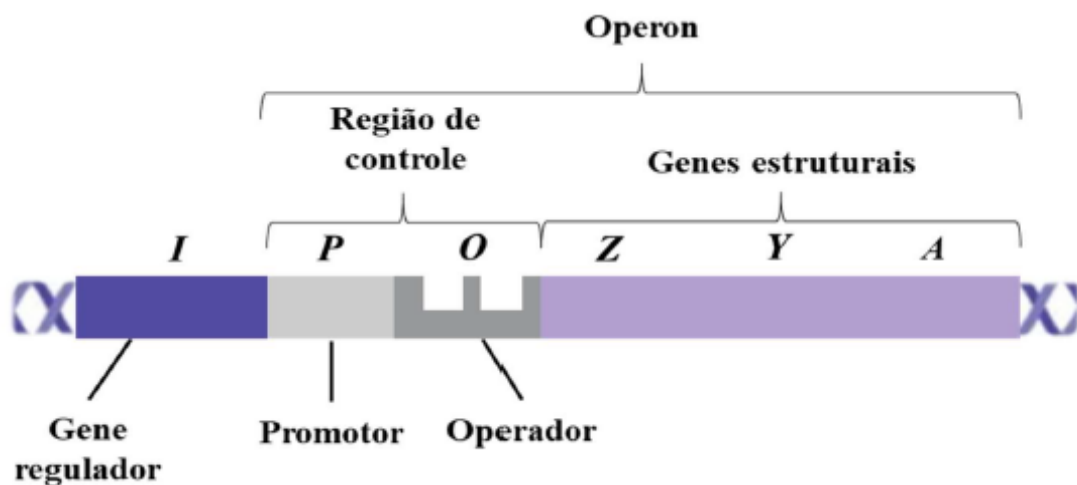
A não retenção do plasmídeo é conseqüência da distribuição desigual dos mesmos durante a divisão celular do microrganismo. Uma estratégia promissora utilizada para evitar esse mecanismo de perda do plasmídeo durante a divisão celular é a inserção, no plasmídeo, de genes de resistência a antibióticos criando, assim, uma pressão seletiva para que o plasmídeo seja retido pelas células recombinantes (HÄGG *et al.*, 2004).

Muitos são os fatores que podem influenciar a produção de proteínas heterólogas por microrganismos recombinantes, tais como temperatura do processo, substrato utilizado como

fonte de carbono e nitrogênio, composição do meio de cultura, a condição de agitação do equipamento utilizado, entre outros. Uma das fontes de carbono mais utilizadas para cultivos com *E. coli* é a glicose, que em condições de aerobiose, após ser catabolizada a piruvato e oxidada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase a acetilcoenzima A (acetil-CoA) através de uma descarboxilação oxidativa. Quando o fluxo de consumo da glicose pela via metabólica supera a capacidade de assimilação da acetil-CoA pela via do ácido cítrico e/ou cadeia transportadora de elétrons, ocorre acúmulo da enzima que é, portanto, transformada em acetato liberado no meio de cultivo (LEE, 1996).

Afim de evitar a produção de metabólitos indesejáveis, como o acetato, uma alternativa ao uso da glicose pode ser a lactose. Sabe-se que o metabolismo da lactose pela célula bacteriana depende da expressão de proteínas liberadas apenas quando em presença deste dissacarídeo ou seus análogos. A expressão de tais enzimas é regulada e coordenada pelo *operon* indutível *lac* (esquemático na Figura 2), proposto por François Jacob e Jacques Monod (TORTORA et al., 2012).

**Figura 2.** Esquema das regiões que compõem o *operon lac*

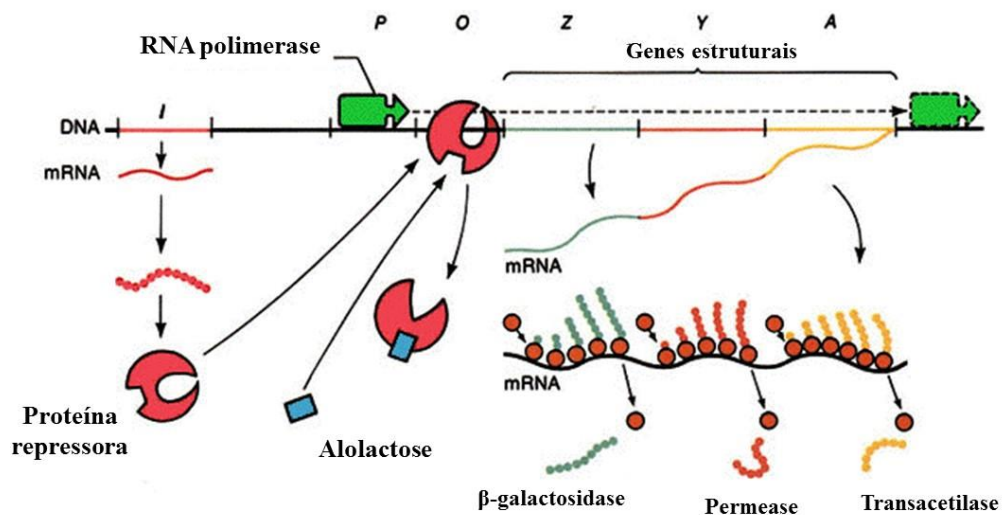


FONTE: adaptado de TORTORA et al., 2012.

O *operon lac* (Figura 2) é composto por um conjunto de genes regulados por apenas um operador. Tal estrutura é constituída por um sítio promotor (P) e um sítio operador (O) que juntos formam a região de controle, também é constituído por genes estruturais que codificam proteínas indutíveis, sendo esses o *lacZ*, *lacY* e *lacA*, e por fim possui uma região reguladora, *lacI*, responsável por codificar a proteína que regulará o *operon* (TORTORA et al., 2012).

Na ausência de lactose, a proteína repressora encontrada livre no meio celular se liga ao operador (O) impedindo, assim, que ocorra a transcrição dos genes estruturais subsequentes. Já quando há presença de lactose no meio, seu metabólito alolactose tem afinidade de ligação com a proteína repressora encontrada no meio celular. Quando se liga a essa proteína, a alolactose promove uma mudança conformacional na mesma impedindo que ocorra a ligação desta ao operador (O), dessa forma possibilita que a RNA polimerase ligue-se a região promotora e inicie a transcrição dos genes que codificam as enzimas necessárias à metabolização da lactose (esquemático na Figura 3). Os genes estruturais que compõem o *operon lac* tem funções específicas no metabolismo da lactose, como por exemplo o *lacZ* codifica a  $\beta$ -galactosidase que é responsável por realizar a hidrólise da lactose em galactose e glicose, o gene *lacY* é responsável por codificar a enzima lac permease, que realiza o transporte da lactose do meio extracelular para o meio intracelular (LEHNINGER, 2006). Por fim, o gene *lacA* codifica a transacetilase, enzima cuja função fisiológica exata ainda é desconhecida (CHAMPE, et al., 2009; TORTORA et al., 2012).

**Figura 3.** Esquema da metabolização da lactose pelo *operon lac*

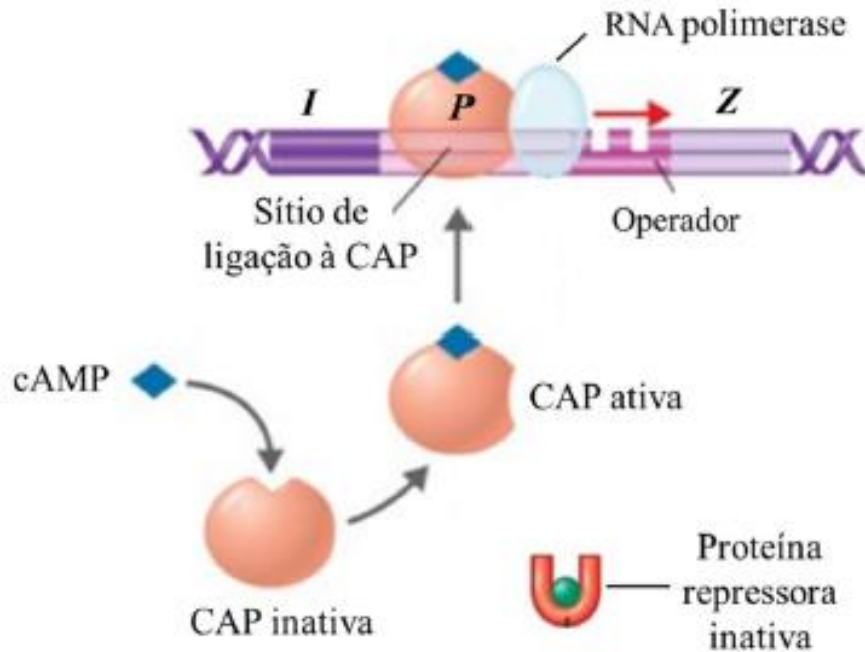


FONTE: adaptado de <http://labs.icb.ufmg.br/lbcd/grupo7/iniciar/aulaexp/exp1-2.html>

Concomitantemente ao processo descrito acima, referente a presença da alolactose inativando a proteína repressora para que a transcrição dos genes estruturais aconteça, também

é necessário que haja presença de AMP cíclico (cAMP) no meio celular. Quando acumulado, o cAMP se liga ao sítio alostérico da proteína ativadora catabólica (CAP) alterando sua conformação e permitindo a ligação desta ao promotor lac (P). Essa alteração conformacional favorece a ligação da RNA polimerase ao promotor, iniciando-se desta forma a transcrição dos genes de interesse Z, Y e A (esquemático na Figura 4) (TORTORA et al., 2012).

**Figura 4.** Esquema da metabolização da lactose quando na ausência de glicose no meio



FONTE: Adaptado de TORTORA et al., 2012

Sabe-se a glicose controla a formação de cAMP, quando a mesma não está presente no meio ocorre um acúmulo de cAMP favorecendo a transcrição dos genes estruturais do *operon lac*. Portanto, quando a glicose está presente, ela desencadeia um processo chamado de repressão catabólica, no qual a utilização de lactose fica reprimida devido a repressão da ligação da RNA polimerase ao promotor impedindo a transcrição das enzimas  $\beta$ -galactosidase, permease e transacetilase (CHAMPE et al., 2009).

Como demonstrado na figura 3 o funcionamento do sistema *operon lac* é dependente de um indutor, podendo ser a alolactose ou um análogo. Com ampla utilização na literatura, o isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) se mostrou bastante eficiente na indução e possui a vantagem de não ser consumido durante o processo, em contrapartida tem apresentado duas grandes desvantagens quando escalonado o processo para produção industrial, é caro e tóxico. (SHOJAOSADATI et al., 2008; ZHANG et al., 2009; SANTOS, 2012)

Os vetores de transcrição de genes heterólogos utilizando o microrganismo *E. coli* são baseados no *operon lac*. A estirpe ou fundo genético para expressão recombinante é altamente importante. As estirpes de expressão devem ser deficientes nas proteases naturais mais nocivas, manter o plasmídeo de expressão estável e conferir os elementos gênicos relevantes para o sistema de expressão. (SORENSEN e MORTENSEN 2005)

Uma das estirpes de *E. coli* mais utilizadas é a linhagem BL21, pois esse sistema obtém elevadas quantidades de proteínas recombinantes. Esta cepa possui em seu genoma uma cópia do gene codificador da enzima T7 RNA polimerase junto ao plasmídeo contendo o gene referente à proteína de interesse. Desta forma, se faz necessário o uso de um agente indutor que permita à inativação da proteína repressora iniciando a transcrição do gene da T7 RNA polimerase e, conseqüentemente, do gene da proteína de interesse contidos no vetor pET (NOVAGEN, 2005; BRIAND et al. 2016)

A linhagem *E. coli* BL21 provou ser excelente em aplicações de expressão recombinante, é uma cepa robusta de *E. coli*, capaz de crescer vigorosamente em meios mínimos, porém não patogênica e com pouca probabilidade de sobreviver nos tecidos do hospedeiro e causar doença. (CHART et al., 2000)

A manutenção de condições aeróbicas durante os cultivos com *E. coli* recombinante se faz necessário para a otimização da síntese proteica, uma vez que em condições anaeróbicas a formação de metabólitos indesejáveis como ácido acético e ácido lático dificultam o crescimento celular e a produção da proteína de interesse. (RIESENBERG e GUTHKE 1999)

## 2.2 Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)

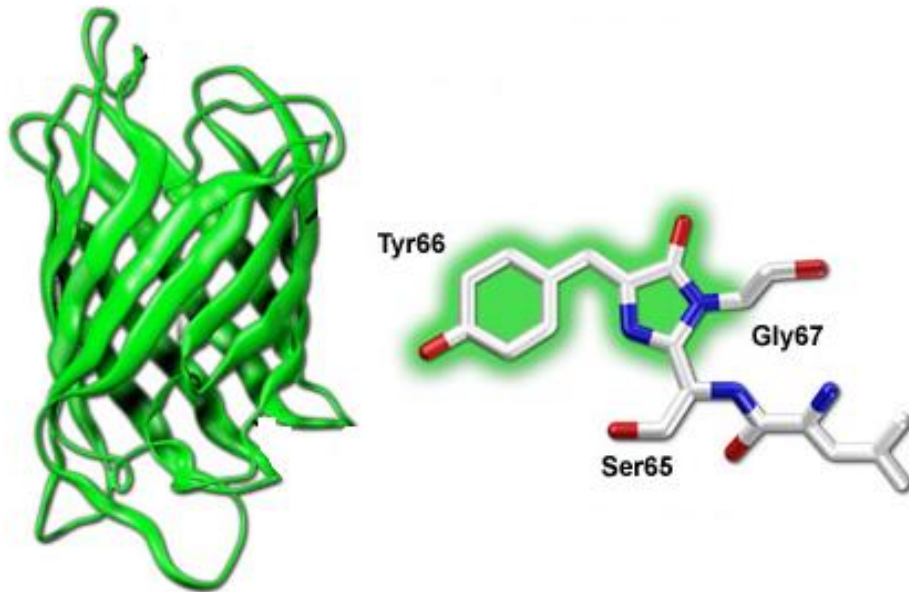
A proteína verde fluorescente (GFP – *Green Fluorescent Protein*) proveniente da água-viva bioluminescente *Aequorea victoria*, é uma proteína globular de caráter ácido com 238 aminoácidos e massa molecular de 27 kDa. São representados na Figura 5 sua estrutura cristalográfica que é composta por um conjunto de dois monômeros dispostos em 11 fitas formadoras de folhas  $\beta$ -pregueadas que se ordenam formando um cilindro, que abriga em seu centro geométrico o grupo cromóforo, ligado ao cilindro Barril-  $\beta$  por  $\alpha$ -hélices (YANG; MOSS; PHILLIPS JR, 1996). Tal grupamento se encontra posicionado no centro da proteína sendo protegido, assim, da ação de possíveis agentes de extinção de fluorescência (ENOKI et al, 2004).

É extremamente estável graças a sua estrutura terciária compacta, resistente a ação de proteases e agente químicos, mantém sua fluorescência em um largo espectro de pH (5,5 a 12,0)



e em temperaturas elevadas, como 70°C. Sua fluorescência visível deve-se à formação de um grupamento cromóforo originado a partir da ciclização do tripeptídeo serina (*Ser*), tirosina (*Tyr*) e glicina (*Gly*), presentes na cadeia proteica, portanto não necessita de nenhum cofator externo ou substrato para a emissão de fluorescência (CODY et al., 1993).

**Figura 5.** Representação da estrutura proteica da GFP e seu cromóforo

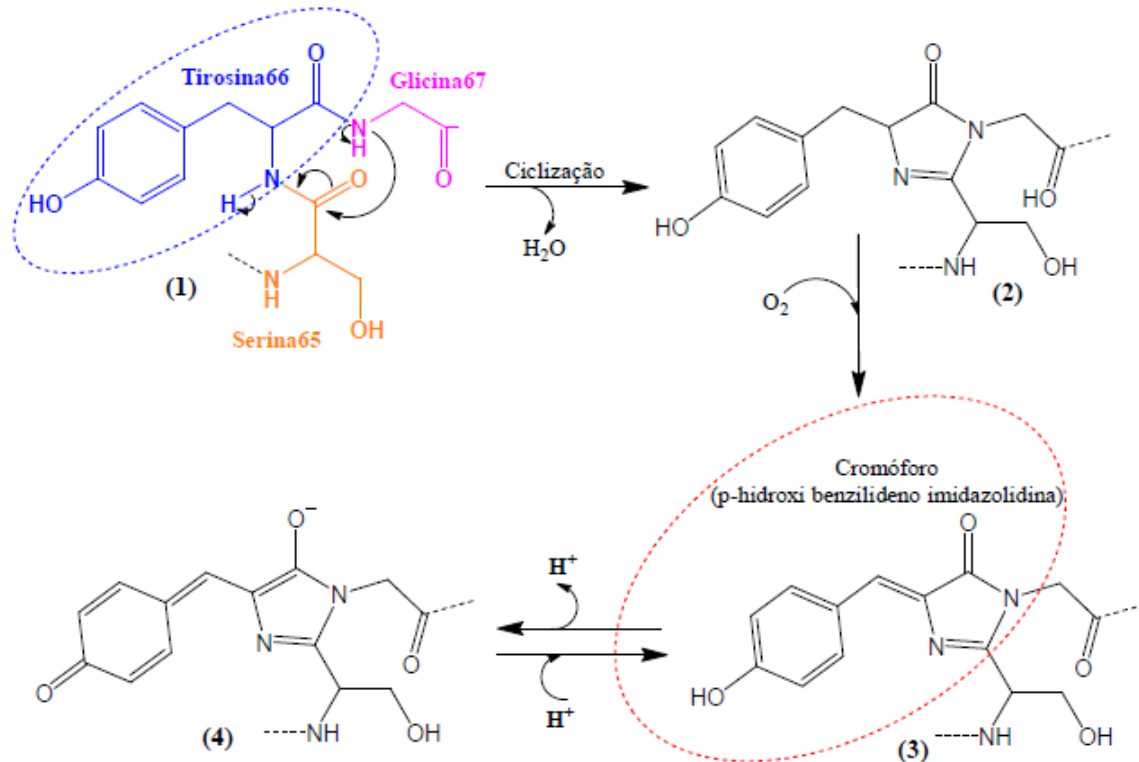


Fonte: Retirado de [http://2.bp.blogspot.com/-PREektWph8/T9cVneGftrI/AAAAAAAAAJIs/yA710\\_fSVcC/s1600/bioluminiscente.jpg](http://2.bp.blogspot.com/-PREektWph8/T9cVneGftrI/AAAAAAAAAJIs/yA710_fSVcC/s1600/bioluminiscente.jpg)

Quando exposta a luz ultravioleta sua máxima excitação é provocada em uma faixa de comprimento de onda de 395 nm a 470 nm e a emissão de fluorescência em uma faixa de 508 nm a 540 nm (PENNA e ISHII, 2002).

A formação do cromóforo, proposto por Heim e colaboradores em 1994 é esquematizado na Figura 6 (HEIM et al., 1994).

**Figura 6.** Esquema da formação do grupamento cromóforo da proteína GFP

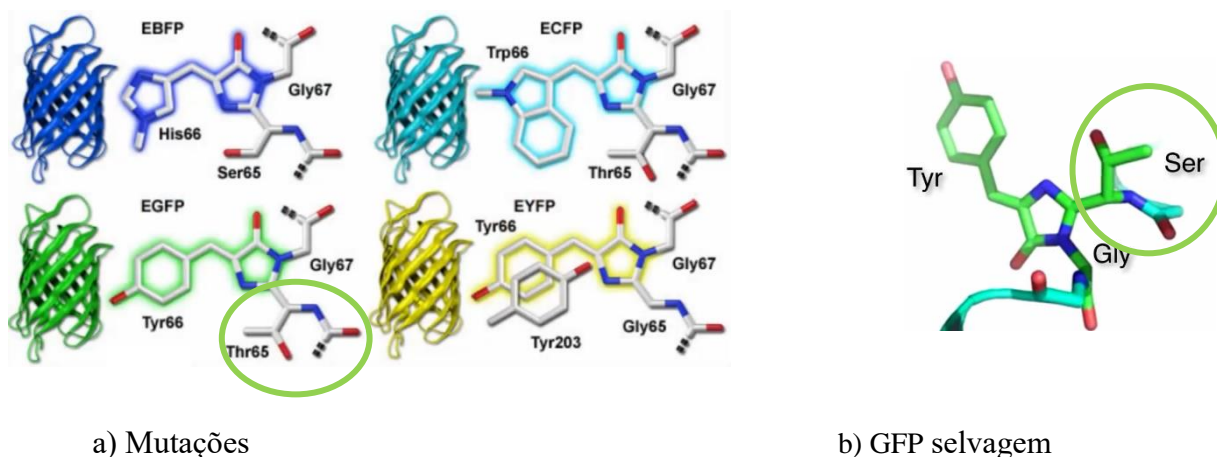


FONTE: adaptado de HEIM et al., 1994

A porção da cadeia de GFP representada pela estrutura (1), após transcrita, passa por uma etapa de ciclicização na qual o grupamento amida do resíduo de glicina se liga à carbonila do resíduo de serina, levando à formação da porção (2). Entretanto, esta apresenta-se incapaz de emitir fluorescência até que ocorra a oxidação com desidrogenação do resíduo de tirosina e formação do fluoróforo p-hidroxibenzilidenoimidazolidina (3), responsável pela fluorescência intrínseca da molécula. Quando na ausência de oxigênio, a biossíntese da molécula cessa na formação do composto (2) (HEIM et. al, 1994).

A Figura 7 apresenta algumas modificações na molécula da GFP originaram proteínas com diferentes cores de fluorescência, por exemplo fluorescência azul (BFP – *Blue Fluorescent Protein*) (HEIM et al., 1994), ciano (ECFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*) e amarela esverdeada (EYFP – *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*). Além dessas modificações moleculares, manipulações genéticas possibilitaram a obtenção de uma variação de GFP selvagem, como por exemplo a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), que possui maior emissão de fluorescência quando comparada a GFP selvagem e a oxidação pós-traducional, necessária para que ocorra emissão de fluorescência pelo cromóforo ocorre quatro vezes mais rápido na proteína melhorada (HEIM et al., 1995; KREMERS, et al., 2006).

**Figura 7.** Mutações de GFP selvagem (a) e cromóforo da GFP selvagem (b).



a) Mutações

b) GFP selvagem

FONTE: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/images/aequoreaafpintrofigure3.jpg>

A fluorescência desta proteína estudada é estável e pode ser monitorada pela microscopia de fluorescência, por citometria de fluxo, ou por técnicas macroscópicas de simples inspeção visual. Devido à presença de um grupo fenol no cromóforo, a maioria das variações de GFP indicam as faixas pH-sensíveis de absorção e de fluorescência. Esse comportamento foi explorado para projetar geneticamente os indicadores de pH em estudos da regulação de pH intracelulares específicos que não podem ser avaliados usando corantes convencionais. Estes indicadores de pH contribuíram para a elucidação sobre um número de funções celulares onde o pH intracelular é um modulador importante (BIZARRI et al., 2009).

A GFP e suas variações tem sido usada como repórter fluorescente em uma variedade de aplicações para monitorar processos dinâmicos em organismos incluindo a expressão de gene, a localização de proteínas, a dinâmica intracelular, em monitoramento de condições como pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio e nutrientes em culturas de microrganismos (CHALFIE et al., 1994; NIENDETHAL et al., 1996; POPPENBORG et al., 1997; MARCH et al., 2003).

Como a utilização do modelo recombinante de *E. coli* como sistema de expressão heterólogo para a produção de EGFP é vasto, diversos estudos são encontrados na literatura a fim de avaliar a influência de parâmetros físico-químicos no crescimento celular e na produção das biomoléculas (AUCOIN et al., 2006; CHEW et al., 2012; VERA et al 2007).

O modelo recombinante utilizado neste trabalho foi a *Escherichia coli* BL21(DE3) com os plasmídeos pET28(a) e pLysS que conferem resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol, respectivamente. O plasmídeo pET28(a) é responsável pela produção da EGFP e pela T7 RNA polimerase, enquanto o pLysS é um plasmídeo utilizado para limitar o escape da expressão de proteínas, artifício inteligente para garantir a produção de proteínas heterólogas apenas na presença de um agente indutor específico, mantendo os ciclos de proliferação celular e produção distintos (BENOIT et al., 2007).

### **2.3 Biorreator e Bioprocessos**

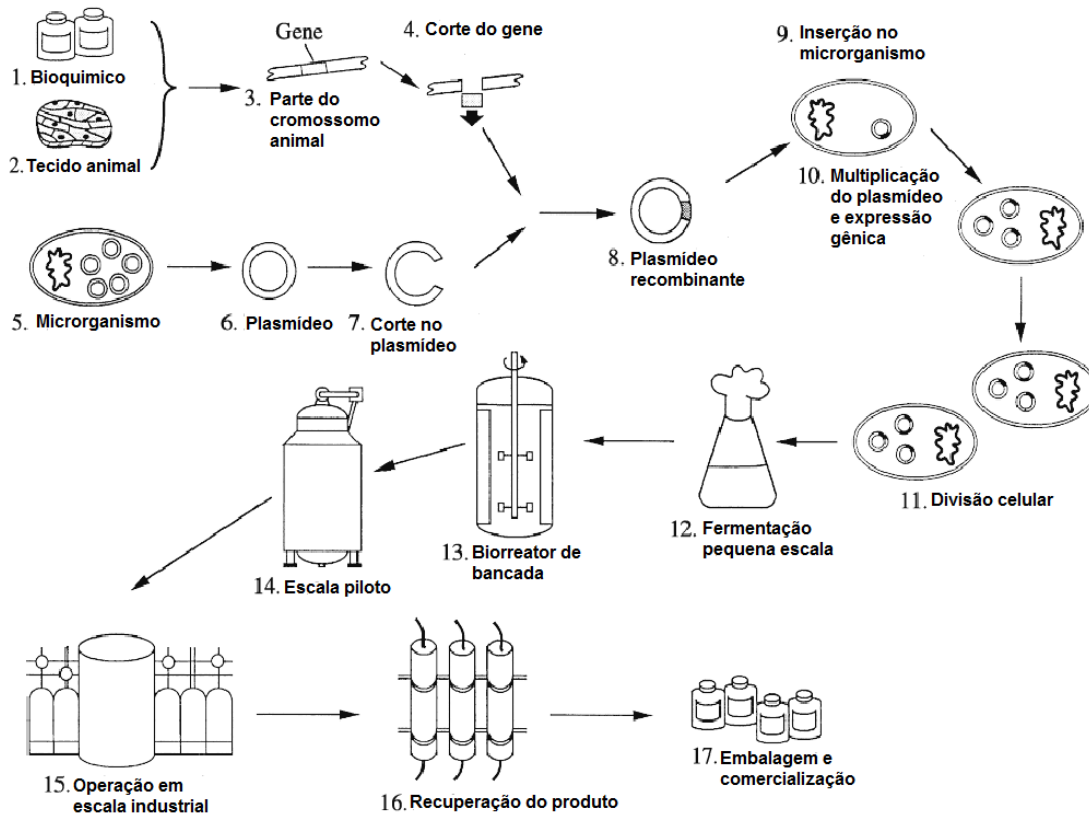
Bioprocessos são fundamentais na maior parte dos processos industriais para formação de produtos químicos, alimentares e farmacêuticos. De maneira geral um bioprocessos ocorre envolvendo o uso de equipamentos, como biorreatores, que possibilitam a conversão de um substrato em um produto desejado através da utilização de microrganismos (por exemplo) (SCHUGERL et al., 1987).

O uso de microrganismos utilizados na transformação de materiais biológicos em alimentos fermentados iniciou-se há séculos, desde então bioprocessos estão sendo desenvolvidos em uma ampla margem de produtos comerciais como álcool industrial, antibióticos, proteínas terapêuticas, tratamento de água, produção de cerveja e vacinas. (DORAN 2012)

O esquema demonstrado na Figura 7 ilustra as muitas etapas existentes que estruturam e elucidam um bioprocessos como um todo, como exemplo a figura ilustra um bioprocessos derivado da expressão de proteínas heterólogas por microrganismos recombinantes, mas essa não é a única versão que pode ser elucidada. Dentre as várias etapas constituintes de um bioprocessos como um todo as etapas iniciais (1-11) estão relacionadas a manipulação genética para construção de um modelo recombinante, onde o nível de expressão do produto desejado e a estabilidade das estirpes fabricadas são avaliadas. Nas etapas relacionadas ao crescimento e expressão do produto esperado (12-15), são otimizados os parâmetros para o cultivo do microrganismo, como composição do meio, pH, temperatura, velocidade de agitação, taxa de aeração, sistema de operação do biorreator e etc. Essas etapas são escalonadas desde pequena escala laboratorial a escala industrial, em cada etapa são realizados os ajustes dos parâmetros necessários de modo a aumentar o crescimento celular e a concentração do produto. As etapas finais (16 e 17) são etapas de purificação, onde é necessário que a partir do caldo cultivado

possa ser isolado apenas o produto desejado para que haja a comercialização industrial (DORAN 2012).

**Figura 8.** Etapas de desenvolvimento de um novo bioprocesso para fabricação comercial envolvendo um produto derivado de DNA recombinante



FONTE: adaptado DORAN 2012

A utilização de biorreatores na indústria tem papel essencial na produção e manutenção de culturas celulares em bioprocessos. Tais sistemas são confeccionados afim de controlar parâmetros importantes durante o bioprocessos, parâmetros esses que viabilizam a manutenção do microorganismo utilizado envolvido em um ambiente adequado, proporcionando condições ótimas de crescimento e de produção dos metabólitos de interesse. (SCHUGER, 1987).

A homogeneização e mistura em um biorreator são de extrema importância para que haja sucesso no cultivo, pois a falta de um nutriente é crucial para o crescimento do microorganismo. Ademais, a homogeneização também é importante para a dispersão de sólidos insolúveis, a homogeneização de temperatura, pH e nutrientes em todo o biorreator e a transferência de oxigênio para o meio líquido (CERRI 2009).

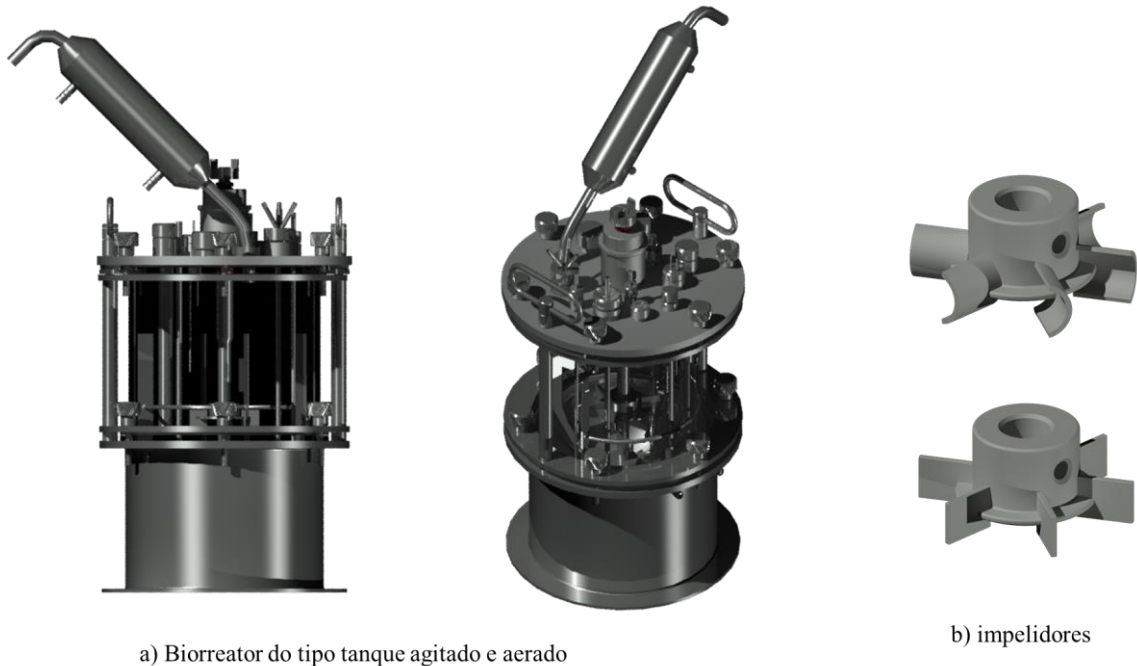
A escolha pelo tipo de equipamento a ser utilizado depende da avaliação de muitos fatores, dentre eles, o número de fases que compõe o sistema (homogêneo ou heterogêneo), o volume de produção, a velocidade que a reação ocorre, o custo e a produtividade do processo, entre outros (RIESENBERG e GUTHKE, 1999).

O equipamento mais utilizado para dispersão do gás na fase líquida, especialmente em bioprocessos operados de forma aeróbica, é o biorreator do tipo tanque agitado e aerado no qual o oxigênio ( $O_2$ ) é transferido para o meio líquido com o auxílio de agitação mecânica (CERRI 2009).

Biorreatores do tipo tanque agitado e aerado (Figura 8-a) também conhecidos como biorreatores convencionais, tem sua agitação gerada através de impelidores conectados a um eixo central, giratório e aerado pela parte inferior do equipamento, esse tipo de equipamento é munido de selo mecânico que garante a assepsia do processo, eletrodos esterilizáveis conectados a controladores de pH e  $O_2$  dissolvido, entre outros periféricos (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000). A agitação nesse tipo de reator tem funções como transferência de quantidade de movimento, calor e massa.

Através da busca em melhorar a qualidade e o desempenho de biorreatores convencionais se obtiveram diferentes tipos de impelidores, tornando-se o tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (Figura 8-b) um dos tipos mais utilizados (ASENJO e MERCHUK, 1994).

**Figura 9.** Biorreator do tipo tanque agitado e aerado (a); impelidores tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (b)



FONTE: figura a e b desenhadas por Vitor Teixeira Mazziero, aluno de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Campus Araraquara.

Biorreatores do tipo tanque agitado são capazes de fornecer valores altos de taxa de transferência de massa e calor e a homogeneidade da massa dentro do equipamento é eficiente. Usualmente nesses sistemas as variáveis mais importantes são a velocidade de agitação dada em rotações por minuto (rpm), o tipo e a quantidade de agitadores e a taxa de aeração utilizada dada em litros por minuto (L/min) (CERRI 2009).

Em bioprocessos onde o microrganismo seja cultivado de forma aeróbica, o  $O_2$  é um substrato essencial, sendo necessário que seu fornecimento seja de modo contínuo e eficaz para suprir a demanda que a célula necessita. Além disso, como descrito no trabalho anteriormente é de fundamental importância que a transferência de oxigênio seja otimizada pois a emissão de fluorescência pelo cromóforo da EGFP é totalmente dependente da fase de oxidação da molécula (HEIM 1994).

Quando comparado a outros nutrientes presentes em meios de cultura, o oxigênio apresenta-se em concentrações em torno de 10 mg/L a 20°C, podendo sua concentração ser entre 1.000 a 10.000 vezes menor que as concentrações de outros componentes do meio, como a glicose por exemplo (BAILEY e OLLIS, 1986).

A resistência global à transferência de oxigênio gás-líquido é a soma das resistências individuais, e suas magnitudes dependem da hidrodinâmica da bolha e da fase líquida, da composição e reologia do meio de cultura na presença do microrganismo utilizado, concentração e atividade celular, assim como do fenômeno interfacial gás-líquido, sendo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $kLa$ ) utilizado para comparar a capacidade de transferência desse gás em biorreatores operados em condições aeróbicas (KARGI e MOO-YOUNG, 1985).

O  $kLa$  pode ser definido como o produto do coeficiente de transferência de massa de filme líquido ( $kL$ ) pela área interfacial específica de troca de massa ( $a$ ), ambos dependentes de uma série de variáveis:

- 1) propriedades do líquido (densidade, difusividade e tensão superficial);
- 2) propriedades dinâmicas do líquido (viscosidade e parâmetros reológicos);
- 3) intensidade de agitação e fluxo da alimentação do gás.

De maneira geral, as variáveis do grupo 1 não modificam drasticamente ( $kLa$ ) diferente das variáveis dos grupos 2 e 3 que alteram significativamente o valor do mesmo (CERRI 2009).

A taxa de transferência de oxigênio (OTR- *Oxygen Transfer Rate*) é avaliada pelas diferentes condições de operacionais e geométricas dos biorreatores, sua medida é determinada pelo  $kLa$ , que por sua vez é afetado pelos parâmetros geométricos dos impelidores e do vaso, propriedades reológicas do meio de cultura (como viscosidade e tensão superficial), condições de operação e a concentração e morfologia do microrganismo (MOHAMED et al., 2009)

Existem relatos na literatura que cultivos utilizando bactérias e fungos filamentosos possuem dificuldade na transferência de oxigênio em decorrência da formação de aglomerados celulares que acabam apresentando comportamento não newtoniano (KAROW et al., 1953; RICHARDS, 1976). Aglomerados estes que aumentam a viscosidade do meio de cultura (OLSVIK e KRISTIANSEN, 1994). Entretanto, em processos realizados onde o microrganismo utilizado são bactérias unicelulares não filamentosas, como a *E. coli*, a reologia do meio não apresenta grande variação, não sendo este um fator limitante à transferência de oxigênio (LOZANO, 1982).

A concentração de oxigênio dissolvido no meio depende da OTR da fase gasosa para a líquida, da taxa de  $O_2$  consumido pela célula e da taxa de entrada desse substrato no interior do microrganismo (OCHOA e GOMEZ 2009).



Para controlar a concentração de oxigênio dissolvido em níveis satisfatórios, onde não ocorra limitação do mesmo, é necessário o monitoramento do oxigênio com ajustes em dois parâmetros específicos, a taxa de fluxo de ar e a frequência de agitação (SANTISTEBAN e MAUGERI 2005).

Além de permitir o controle dos parâmetros até aqui descritos, a utilização de biorreatores convencional fornece a possibilidade de variar diferentes perfis de operação do sistema, a depender do objeto em estudo. Nesse contexto, diferentes modos de operação do processo podem ser adotados, dentre eles: contínuo, batelada (*batch*) e batelada alimentada (*fed-batch*) (OCHOA e GOMEZ 2009).

De maneira geral estes três modos operacionais diferem-se pela maneira que os nutrientes, com exceção do oxigênio, são fornecidos ao microrganismo. No modo batelada todos os nutrientes estão no meio de cultura preparado antes da inoculação; no modo batelada alimentada há adição de nutrientes ao decorrer do processo de cultivo, ou seja o volume operacional do reator inicia em uma escala menor e vai aumentando a medida em que o sistema é alimentado com nutrientes porém não há remoção de caldo durante o processo; e por último no modo contínuo uma quantidade de caldo nutricional entra ao sistema e a mesma quantidade é removida continuamente.

## 2.4 Planejamento experimental fatorial

Planejamento fatorial é uma ferramenta que permite avaliar diversas variáveis, seus efeitos individuais bem como os efeitos de suas interações com a vantagem de realizar um menor número de ensaios.

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada através de procedimentos que avaliam o efeito singular de uma variável em um estudo, apresentando desvantagens como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis em conjunto.

Dentre os diversos tipos de planejamentos experimental, os sistemas de planejamento fatorial destacam-se por permitirem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

Este tipo de planejamento normalmente é representado por  $b^k$ , sendo que  $k$  representa o número de fatores e  $b$  o número de níveis escolhidos (NEVES et al., 2002). Para estes autores o caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator  $k$  está presente em

apenas dois níveis (experimento fatorial  $2^k$ ), ou seja, em um experimento com  $k$  fatores (ou variáveis) e dois níveis, são realizadas  $2 \times 2 \times \dots \times 2$  ( $k$  vezes) =  $2^k$  observações da variável resposta. Esta representação mostra que, se em um planejamento forem escolhidos 2 diferentes níveis para 3 fatores ( $2^3$ ), o número de experimentos diferentes a serem realizados será 8.

Neste tipo de planejamento fatorial, no qual os níveis são codificados com os sinais (+) e (-), a atribuição aos níveis superiores ou inferiores se dá de forma arbitrária e não interfere na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados. Estes sinais também permitem esquematizar estas variáveis na forma de matrizes de planejamento, assim como determinar, por meio de cálculos, a influência das mesmas e das suas interações no sistema (BRASIL et al., 2007).

Ademais cabe ressaltar que em planejamentos fatorial, repetições de experimentos são de importância essencial e servem para determinar o erro experimental na resposta de interesse e/ou a reprodutibilidade do esquema experimental utilizado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente trabalho foi aumentar a produção de EGFP por *rE. coli* linhagem BL21 DE3 pLysS pET28(a) e escalonar o processo de mesa incubadora rotativa para biorreator convencional.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar a substituição do indutor IPTG pela lactose no processo de produção de EGFP;
- b) Elucidar quais variáveis estatisticamente significativas ao processo a produção de EGPF utilizando *rE. coli*.
- c) Definir as melhores condições de operação do biorreator convencional em batelada para expressão da EGFP.

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 Microrganismo

Foi utilizado como microrganismo recombinante uma linhagem de *E. coli* BL21 DE3 pLysS pET28(a), conservado em criotubos, com 40% de glicerol (50% v/v), mantidos no ultra freezer modelo THERMO FORMA® 904, a temperatura de -80°C.

O plasmídeo pET28(a) contém o gene codificador da enzima T7 RNA polimerase e o gene codificador da EGFP, juntamente ao gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol. No plasmídeo pLysS estão contidos o gene codificador da lisozima T7e o gene de resistência ao antibiótico canamicina.

Devido ao fato dos aos plasmídeos conterem os genes de resistência aos antibióticos cloranfenicol e canamicina, em todos os experimentos realizados e inóculos utilizados, bem como no criotubo estoque contendo a suspensão bacteriana foram adicionados os mesmos dois antibióticos na concentração de 50 µg/mL.

### 4.2 Meio de cultura

Os meios de cultura líquidos utilizados foram:

- a. Meio complexo Luria Bertani (LB) 25 g/L, marca Difco™, composto por Triptona (10 g/L), Extrato de levedura (5 g/L) e NaCl (10 g/L).
- b. Meio complexo Luria Bertani 25 g/L (composição igual ao item 4.2 (a)) com adição de diversas concentrações de lactose ou glicose ou suplementado com extrato de levedura (2,5 g/L), a depender do teste realizado;

Os meios foram preparados com água destilada, com ajuste de pH para 7,0 utilizando NaOH 5M e esterilizados a 121° 1 atm, por 20 minutos, autoclave modelo AV 75, PHOENIX®.

Foi utilizada a cabine de segurança biológica classe II A 1 modelo SBIIA1 – 1266/4 Futerflux®, equipada com luz germicida UV para garantir a assepsia dos matérias envolvidos nos processos de retirada de amostras e manipulação do microrganismo.

### 4.3 Cultura bacteriana estoque

Foi preparado, em frasco do tipo Erlenmeyer convencional (com capacidade de 500 mL), um inóculo de *E. coli* em meio LB, utilizando 20% de preenchimento do frasco (100 mL).

Este inóculo foi incubado a 150 rpm e 30°C em mesa incubadora rotativa, durante 12 horas até obtenção de densidade óptica lida em 600 nanômetros ( $DO_{600nm}$ ) na faixa de 2,5 a 3,0. Após as 12 horas, retirou-se uma alíquota de 180  $\mu$ L que foi adicionada asépticamente a um criotubo estéril. Como crio protetor foram adicionados 120  $\mu$ L de glicerol 50% (v/v) obtendo-se volume final de 300  $\mu$ L. Em seguida os criotubos foram estocados a -80°C no ultra freezer modelo THERMO FORMA® 904.

#### **4.4 Inóculo**

Todos os experimentos realizados foram inoculados a partir de um inóculo inicial preparado 12 horas antes, sendo preparado um inóculo para cada experimento. Este inóculo foi preparado em frasco do tipo Erlenmeyer (com capacidade de 500 mL). O inóculo foi preparado com meio LB, 20% de preenchimento do frasco (100 mL) e inoculado com a cultura estoque mantida no -80°C, descrita no item 4.3. Este inóculo foi incubado em mesa incubadora rotativa a 150 rpm em 30°C durante 12 horas. Nos experimentos realizados em mesa incubadora rotativa e em biorreator convencional foi calculado a quantidade de inóculo para transferência para a etapa de produção de modo que esta inicia-se com  $DO_{600nm}$  igual a 0,1. Para o experimento realizado em microplaca de 96 poços esse cálculo foi feito para que a  $DO_{600nm}$  inicial fosse 0,5.

#### **4.5 Indutor**

Foi utilizado, a depender do experimento, o indutor isopropil- $\beta$ -D-1 tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações 0,05 mM, 0,075 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM, 0,75 mM e 1 mM, adicionado ao meio de cultura LB na etapa de produção, quando esta etapa se encontrava com uma  $DO_{600nm}$  na faixa de 2,0 a 2,5.

### **4.6 Metodologia Experimental**

#### **4.6.1 Cultivos em microplaca de 96 poços**

O cultivo em microplaca estéril de 96 poços foi realizado afim de observar a influência da adição de lactose nas concentrações 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 22,5 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L ao meio LB, também avaliar a adição de glicose nas concentrações 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 22,5 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L ao meio LB e por último a adição de IPTG nas concentrações 0,05 mM, 0,075 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM, 0,75 mM e 1 mM ao meio

LB. Cada poço contendo meio LB foi inoculado com quantidade suficiente de inóculo para obtenção de  $DO_{600nm}$  de 0,5. Foram utilizados como controle negativo poços não inoculados contendo apenas meio LB puro e poços contendo apenas meio LB com adição das substâncias em teste e como controle positivo poços contendo apenas o meio LB puro e inoculado com a cultura bacteriana. O cultivo foi realizado em leitor de microplacas modelo TECAN Infinite M 200 PRO, a 30°C e 150 rpm, tendo a  $DO_{600nm}$  e a unidade de fluorescência (UF) (em comprimento de onda de excitação da molécula de 485 nm e de emissão de fluorescência de 535 nm), registradas a cada 15 minutos durante 12 horas.

#### **4.6.2 Delineamento Central Composto (DCC) planejado através do software Protimiza Experimental Design**

Foi aplicado o planejamento experimental Delineamento Composto Central (DCC) obtido a partir do software Protimiza Experimental Design em mesa incubadora rotativa (modelo TECNAL® TE-421 contendo controle de temperatura e agitação) utilizando frasco do tipo Erlenmeyer convencional com capacidade de 500 mL. Este planejamento foi realizado com intuito de avaliar quais das seguintes variáveis apresentariam interferência estatisticamente significativa para o crescimento celular e expressão de EGFP: temperatura ( $X_1$ ), agitação ( $X_2$ ), preenchimento do frasco ( $X_3$ ) e concentração de lactose ( $X_4$ ) ou concentração de IPTG ( $X_4$ ). Duas variáveis dependentes (de resposta) foram observadas, sendo elas crescimento celular ( $Y_1$ ) e produção de EGFP ( $Y_2$ ).

Os experimentos que envolviam os pontos extremos do planejamento (+1 e -1) foram realizados em duplicata e o que envolveu apenas o ponto central de cada variável (0) foi realizado em triplicata.

A matriz dos cultivos realizados, obtida pelo software Protimiza Experimental Design e as condições de temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração de lactose dos pontos experimentais são ilustradas na tabela 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1.** Matriz experimental do Delineamento composto central, com as variáveis independentes temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração lactose.

<b>Temperatura</b>	<b>Agitação</b>	<b>Preenchimento do frasco</b>	<b>[Lactose]/[IPTG]</b>
<b>X1</b>	<b>X2</b>	<b>(X3)</b>	<b>X4</b>
-1	-1	-1	-1
+1	-1	-1	-1
-1	1	-1	-1
+1	1	-1	-1
-1	-1	1	-1
1	-1	1	-1
-1	1	1	-1
1	1	1	-1
-1	-1	-1	1
1	-1	-1	1
-1	1	-1	1
1	1	-1	1
-1	-1	1	1
1	-1	1	1
-1	1	1	1
1	1	1	1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

FONTE: software Protimiza Experimental Design

**Tabela 2.** Condições de temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração de lactose para cada ponto experimental do planejamento DCC realizado em mesa incubadora rotativa

<b>Variável</b>	<b>Ponto - 1</b>	<b>Ponto 0</b>	<b>Ponto +1</b>
<b>Temperatura (°C) – X1</b>	150	200	250
<b>Agitação (rpm) - X2</b>	20	25	30
<b>Preenchimento do frasco (%) – X3</b>	5	10	15
<b>Lactose (g/L) – X4</b>	5,0	22,5	40,0

FONTE: autoria própria

Após 12 horas de incubação do inóculo uma alíquota da suspensão bacteriana, baseada na  $DO_{600nm}$ , foi transferida para os frascos do tipo Erlenmeyer das condições a serem testadas, então estes frascos foram incubados a depender da condição teste e se observou a  $DO_{600nm}$  e expressão proteica a cada 12 horas até a máxima concentração de ambas.

Os resultados referentes a concentração de EGFP e biomassa, obtidos através dos cultivos realizados no planejamento experimental foram tratados no *software Protimiza Experimental Design*.

A significância das variáveis foi avaliada aplicando-se o teste t de *Student*. Onde quando o valor de t calculado ( $t_{calc}$ ) for maior que o valor de t tabelado ( $t_{tab}$ ), para determinado nível de significância ( $\alpha$ ) e graus de liberdade ( $\lambda$ ), considera-se que a variável tem interferência estatisticamente significativa na resposta de interesse. Os mesmos parâmetros foram utilizados para avaliar a significância da interação entre as variáveis analisadas.

A Tabela 3 apresenta os níveis de significância com seus respectivos valores de  $t_{tab}$  para 34 graus de liberdade, sendo está a condição do estudo.

**Tabela 3.** Valores de  $t_{tab}$  para três níveis de significância usados em tratamento de dados estatísticos (90, 95 e 99%)

Nível de significância (%)	Valor de $t_{tab}$
90	1,6909
95	2,0322
99	2,7284

FONTE: autoria própria

As respostas foram ajustadas a um modelo polinomial de primeira ordem, expresso pela Equação 1 (Eq. 01):

$$Y_x = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{1,2} X_1 X_2 + b_{1,3} X_1 X_3 + b_{1,4} X_1 X_4 + b_{2,3} X_2 X_3 + b_{2,4} X_2 X_4 + b_{3,4} X_3 X_4 \quad \text{Eq. 01}$$

Onde:

$Y_x$  - variável de resposta (dependentes) ( $Y_1$  = crescimento bacteriano;  $Y_2$  = concentração de EGFP),



$b_0$  – valor da média global das respostas

$b_1, b_2, b_3$  e  $b_4$  – efeitos principais

$b_{1,2}, b_{1,3}, b_{1,4}, b_{2,3}, b_{2,4}$  e  $b_{3,4}$ , – efeito de interação entre as variáveis

$X_1, X_2, X_3$  e  $X_4$  – variáveis estudadas (independentes).

A análise da superfície gerada permitiu inferir em qual região encontram-se as condições ótimas dentro da área avaliada. A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação  $R^2$  e a sua significância estatística foi determinada pelo teste F de Fisher.

#### 4.6.3 Teste de suplementação do meio LB em mesa incubadora rotativa

Estes experimentos foram realizados utilizando frasco do tipo Erlenmeyer em mesa incubadora rotativa. Todos os cultivos foram realizados nas condições de 200 rpm à 25°C, o controle foi composto de meio LB (na sua concentração padrão de 25 g/L) e as condições testes variaram a concentração de meio LB e a adição de extrato de levedura ao meio, em todas as condições foram adicionados 40 g/L de lactose ao meio, a Tabela 4 apresenta as condições testadas nessa etapa de experimentos. Foi retirada amostras a cada 12 horas de  $DO_{600nm}$ , concentração de EGFP e concentração de lactose.

**Tabela 4.** Condições testadas em mesa incubadora rotativa em 200 rpm à 25°C.

Condições	Composição do meio
<b>Controle</b>	LB (25 g/L) + Lac (40 g/L)
<b>1</b>	LB (12,5 g/L) + Lac (40 g/L)
<b>2</b>	LB (37,5 g/L) + Lac (40 g/L)
<b>3</b>	LB (25 g/L) + Lac (40 g/L) + Extrato de levedura (2,5 g/L)

FONTE: autoria própria

#### 4.6.4 Cultivos realizados em biorreator convencional

Nos experimentos realizados em biorreator convencional, foi utilizado um modelo de biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado, TEC-BIO-FLEX Tecnal-Brasil®, equipado com controlador de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, agitação, rotâmetro para

aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de 7,5 L, e volume útil de 5,0 L. O sistema dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com largura de 0,015 m, o diâmetro interno do biorreator é 0,190 m e diâmetro externo 0,217 m. O sistema foi montado utilizando dois impelidores do tipo turbinas Rushton como mostrado na Figura 8-b no tópico 2.3 Bioprocessos e Biorreator.

Para os cultivos realizados em biorreator convencional foram preparados 3,9 litros de meio de cultura contendo LB 25 g/L com adição de lactose 40 g/L (todos os biorreatores) e apenas para o último experimento houve adição, ao meio LB com lactose 40 g/L, de extrato de levedura 2,5 g/L. O biorreator contendo o meio era, então, esterilizado em autoclave para receber o inóculo de modo asséptico. Foram adicionados, pelo septo do reator, 200  $\mu$ L de cloranfenicol e 200  $\mu$ L de canamicina com seringa estéril previamente ao início da fase de produção sendo que, o volume final do biorreator foi de 4 litros após a adição da alíquota do inóculo.

O cálculo do valor em volume de inóculo foi feito baseado na  $D.O_{600nm}$ , para início em 0,1. A depender da condição de cultivo uma taxa de aeração, temperatura e agitação foram fixadas no aparelho e retirou-se alíquotas de amostra a cada duas horas até que se observa-se o pico de crescimento celular e expressão proteica.

A Tabela 5 demonstra todas as condições experimentais em biorreator convencional no sistema de operação batelada realizadas no presente trabalho.

As análises realizadas na etapa de experimentos em biorreator foram  $DO_{600nm}$ , determinação do crescimento celular, consumo de lactose e produção de EGFP.

**Tabela 5.** Condições dos experimentos realizados em biorreator convencional no modo de operação batelada

FONTE: autoria própria

<b>Experimento em Biorreator</b>	<b>Agitação (rpm)</b>	<b>Vazão de ar (vvm)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Composição Meio de cultura</b>
<b>1</b>	300	0,5	30	LB + Lactose 5g/L
<b>2</b>	300	0,5	30	LB + IPTG (indutor)
<b>3</b>	600	0,75	25	LB + Lactose 40g/L
<b>4</b>	600	0,75	20	LB + Lactose 40g/L
<b>5</b>	400	0,5	25	LB + Lactose 40g/L
<b>6</b>	800	0,5	25	LB + Lactose 40g/L
<b>7</b>	1000	0,5	25	LB + Lactose 40g/L
<b>8</b>	800	0,5	25	LB + Lactose 40g/L + Ext. Lev. 2,5 g/L

#### 4.6.5 Experimento com oxigênio puro

Foram realizados dois experimentos utilizando oxigênio puro na vazão de 1 L/min em cada. O primeiro experimento foi realizado com a biomassa celular (que foi armazenada em freezer) do cultivo realizado em biorreator. Foi feita uma diluição dessa biomassa em água e em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, a concentração de EGFP das amostras diluídas foi verificada, e então essas duas amostras foram submetidas a aeração com O<sub>2</sub> puro na vazão de 1 L/min durante 8 horas em temperatura controlada a 22°C. Durante as duas primeiras horas retirou-se amostra para análise de concentração proteica a cada 15 minutos, após duas horas de experimento as alíquotas foram retiradas no intervalo de uma hora. Esse teste foi realizado baseado em um artigo de Heim e colaboradores (1994) no intuito de verificar se havia proteínas formadas porém sem ativação do cromóforo pela etapa de oxigenação (HEIM et al., 1994)

No segundo experimento seguiu-se a mesma metodologia, porém desta vez uma alíquota foi medida antes da aeração com O<sub>2</sub> e após uma hora retirou-se outra alíquota para aferição da concentração de EGFP. Após a constatação das duas medidas, foram retiradas (no mesmo tempo de 1 hora após o início do experimento) 4 alíquotas das amostras e congeladas em freezer para determinação da estabilidade da concentração de EGFP. Cada amostra foi armazenada nesta etapa de estabilidade com água ou Tris-HCl, a depender da condição de

diluição anterior, ou seja a amostra que foi diluída em água e submetida a exposição de O<sub>2</sub>, ao final do experimento foi armazenada no freezer em água, do mesmo modo a amostra que foi diluída em tampão Tris-HCl foi armazenada no mesmo tampão.

**Figura 10.** Experimento com oxigênio puro na vazão de 1 L/min em amostras diluída em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e outra amostra diluída em água, durante 8 horas.



FONTE: autoria própria

## 4.7 Metodologia analítica

### 4.7.1 Análise de densidade óptica

Para a realização das análises espectrofotométricas de determinação de DO<sub>600nm</sub> utilizou-se o espectrofotômetro UV-Vis, modelo GENESYS 10S, marca THERMO SCIENTIFIC®.

As análises foram realizadas em duplicata em todos os experimentos. Uma alíquota de suspensão bacteriana era retirada em tempo específico, diluída em água (quando houvesse necessidade de diluição) e analisada em espectrofotômetro a 600 nm. Para todas as amostras utilizou-se cubetas de plástico (2 mL). O mesmo tipo de meio de cultura, a depender do experimento realizado, era utilizado para o preparo da cubeta utilizada como branco para manter a mesma diluição da amostra evitando o efeito matriz.

### 4.7.2 Análise da concentração de proteína

A concentração de EGFP produzida durante os cultivos foi determinada por análise indireta de fluorescência das células de *E. coli*. Um alíquota de 1 mL foi centrifugada uma vez por 15 minutos a 10 mil rpm a 26°C, o sobrenadante foi reservado para a análise da concentração de lactose e o precipitado de células foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8.

Após a amostra ser centrifugada e o precipitado ser ressuspendido em 1 mL de tampão Tris-HCl 50 mM, a mesma era congelada (1 ciclo de congelamento) por aproximadamente 8 horas. Após 8 horas a mesma era descongelada, homogeneizada em vórtex e aliqotada em placa de leitura preta de 96 poços, com volume máximo de cada poço de 200 µL, e dois poços usados como branco, um poço com água e outro poço com tampão Tris-HCl. Após o preparo da placa a mesma era inserida no leitor de placas, modelo EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®, onde a leitura da UF foi feita em um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 507. A placa utilizada nas leituras, foi placa de 96 poços para cultivo celular, preta, fundo plano, com tampa, da marca FALCON.

A concentração de EGFP (mg/L) foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente determinada (APÊNDICE), utilizando o Kit de Quantificação de GFP da marca BioVision, obteve-se a correlação  $[EGFP] = U.F/18552$ .

#### **4.7.3 Determinação da concentração de biomassa**

A concentração de biomassa foi determinada através da relação de  $DO_{600nm}$  em função de uma curva de calibração construída utilizando medidas de massa seca (g/L).

A curva de calibração para conversão dos valores de  $DO_{600nm}$  em biomassa (g/L) foi obtida a partir dos cultivos realizados em biorreator, através da adição de um volume conhecido da amostra e  $DO_{600nm}$  conhecida, em placas de Petri previamente secas e pesadas.

A amostra aliqotada na placa de Petri foi submetida a secagem por 24 horas em estufa de circulação a 60°C, após essas 24 horas a temperatura da estufa de circulação foi diminuída para 30°C e a amostra permaneceu nesta temperatura por mais 12 horas, então a placa com a amostra seca teve sua massa aferida e o valor anotado. Durante todas as etapas do procedimento o manuseio das placas foi feito, pelo examinador, usando luva, de modo a evitar interferentes da umidade ou oleosidade das mãos. O ensaio foi realizado em triplicata.

A partir das medidas de  $DO_{600nm}$  e da concentração de massa seca obteve-se a correlação de concentração celular  $C_x = 0,4132 * DO_{600nm}$ . Os resultados do ensaio e a curva de calibração estão contidos no APÊNDICE.

#### **4.7.4 Determinação da concentração de lactose**

A concentração de lactose foi medida através do aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography* - HPLC), da marca SHIMADZU

equipado com Detector de índice de refração RID 20A, forno CTO 20ª, bomba NexeraXR LC20AD e controladora CBM20A, injeção manual. As condições de corrida para as amostras foram:

- Coluna Amino CLC-NH2 Shimpack;
- Fase móvel: Acetonitrila/H<sub>2</sub>O 75:25;
- Temperatura do forno e detector 30°C;
- Fluxo 1,0 mL/min
- Tempo de eluição de 14 minutos;
- Loop de 20uL;

As amostras foram previamente filtradas e diluídas. A curva de calibração utilizada para conversão da área sob a curva em concentração de lactose (g/L) forneceu a correlação  $Lactose = \text{área}/140878$ , e pode ser encontrada no APÊNDICE.

#### **4.7.5 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ )**

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{LA}$ ) foi determinado em biorreator do tipo tanque agitado e aerado com volume de 4 litros de água destilada à 25°C, na ausência de microrganismos, testando diferentes taxas de aeração (0,5 vvm e 0,75 vvm) e velocidade de agitação (400, 600, 800 e 1000 rpm), através do método dinâmico com independência do tempo de retardo do eletrodo de oxigênio dissolvido (CERRI et al., 2016). Este método consiste em medir a concentração de oxigênio dissolvido no líquido usando um eletrodo, com sistema de aquisição de dados em tempo real. Pelo método proposto, é possível estimar o valor de  $k_e$  (sensibilidade do eletrodo), a partir da medida de  $k_{LA}$  pelo tempo de resposta do eletrodo ( $\epsilon$ ), sendo  $k_e = 1 / \epsilon$ , através de métodos numéricos sem necessidade de ensaios adicionais.

A concentração de oxigênio dissolvido foi monitorado por um eletrodo polarográfico (série Mettler-Toledo InPro6000). Os valores foram registrados em função do tempo, sendo o intervalo do tempo zero até a saturação ser atingida (100%). As condições de agitação e aeração foram as mesmas condições realizadas nos cultivos realizados em biorreator.

#### **4.8 Determinação de parâmetros cinéticos**

##### **4.8.1 Determinação da velocidade específica de crescimento ( $\mu_{máx}$ )**

A velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) foi determinada através de balanço de massa em biorreator no modo de operação batelada, representada pela Equação 2.

$$\frac{d(Cx.V)}{dt} = \mu \cdot Cx \cdot V \quad \text{Eq. 02}$$

Visto que na fase exponencial de crescimento  $\mu = \mu_{m\acute{a}x}$ , a velocidade específica de crescimento celular, após integrar e rearranjar a Eq. 02 pode ser calculada pela Equação 03.

$$\ln Cx/Cx_0 = \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad \text{Eq. 03}$$

onde  $Cx$  e  $Cx_0$  são as concentrações celulares no intervalo de tempo específico e no tempo zero, respectivamente. E  $t$  é o tempo.

#### 4.8.3 Determinação da produção específica ( $Y_{p/x}$ ) e produtividade ( $Pr$ )

Para calcular a produção específica ( $Y_{p/x}$ ) e a produtividade ( $Pr$ ) foram utilizadas as Equações 05 e 06, respectivamente.

$$Y_{p/x} = (Cp - Cp_0)/(Cx - Cx_0) \quad \text{Eq. 05}$$

$$Pr = Cp/t \quad \text{Eq. 06}$$

onde  $Cp$  e  $Cp_0$  são as concentrações de EGFP no intervalo de tempo específico e no tempo zero, respectivamente.

#### 4.8.4 Determinação da taxa de transferência de oxigênio dissolvido (*Oxygen Transfer Rate* – OTR)

A taxa de transferência de oxigênio dissolvido (*Oxygen Transfer Rate* – OTR) foi calculada com base nas Equação 07 e 08, respectivamente.

$$C^* = X_{O_2} \cdot P_{atm} \cdot H \quad \text{Eq. 07}$$

$$OTR = k_L a \cdot C^* \quad \text{Eq. 08}$$

onde  $H$  é a constante de Henry,  $X_{O_2}$  é concentração de oxigênio no ar e  $C^*$  é a saturação do oxigênio no líquido.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Determinação da fonte de carbono e agente indutor

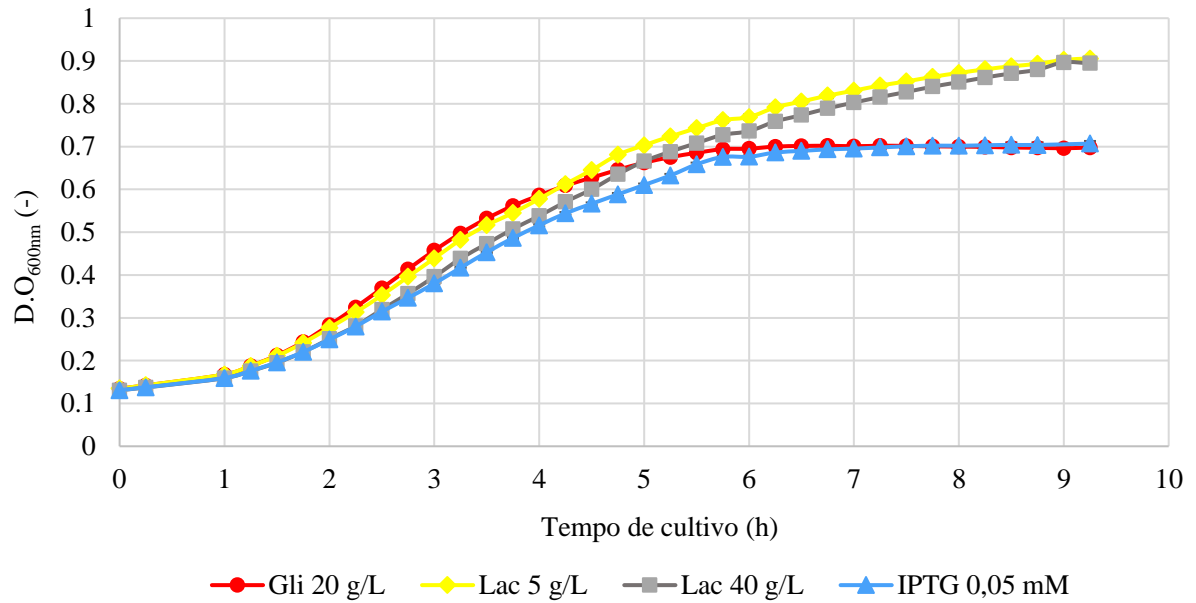
Para avaliar a influência da glicose e da lactose como fonte de carbono para o crescimento celular e a influência do IPTG e da lactose como agente de indução para a expressão proteica, foram realizados os experimentos em microplaca de 96 poços, um experimento em mesa incubadora rotativa e um experimento em biorreator convencional no modo de operação batelada.

Apesar de a temperatura ótima de crescimento celular da *E. coli* ser 37 °C, reduzir a temperatura para uma faixa de 26 a 30°C se mostra uma estratégia interessante pois, assim, é possível promover redução da demanda de oxigênio (O<sub>2</sub>) e os possíveis efeitos tóxicos gerados por metabólitos secundários, como produção de corpos de inclusão por exemplo (LEE, 1996). Dessa forma, foi estabelecida a condição de temperatura em 30°C para a realização desses ensaios preliminares.

O primeiro experimento foi realizado em microplaca de 96 poços, e testou a influência da adição ao meio de cultura LB de diferentes concentrações de glicose (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L), lactose (5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L) e IPTG (0,050 mM, 0,075 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 0,750 mM e 1 mM) à expressão proteica e crescimento celular. A comparação do crescimento celular das melhores concentrações observadas são relatadas na Figura 10. Os resultados foram obtidos através da medida de DO<sub>600nm</sub>.

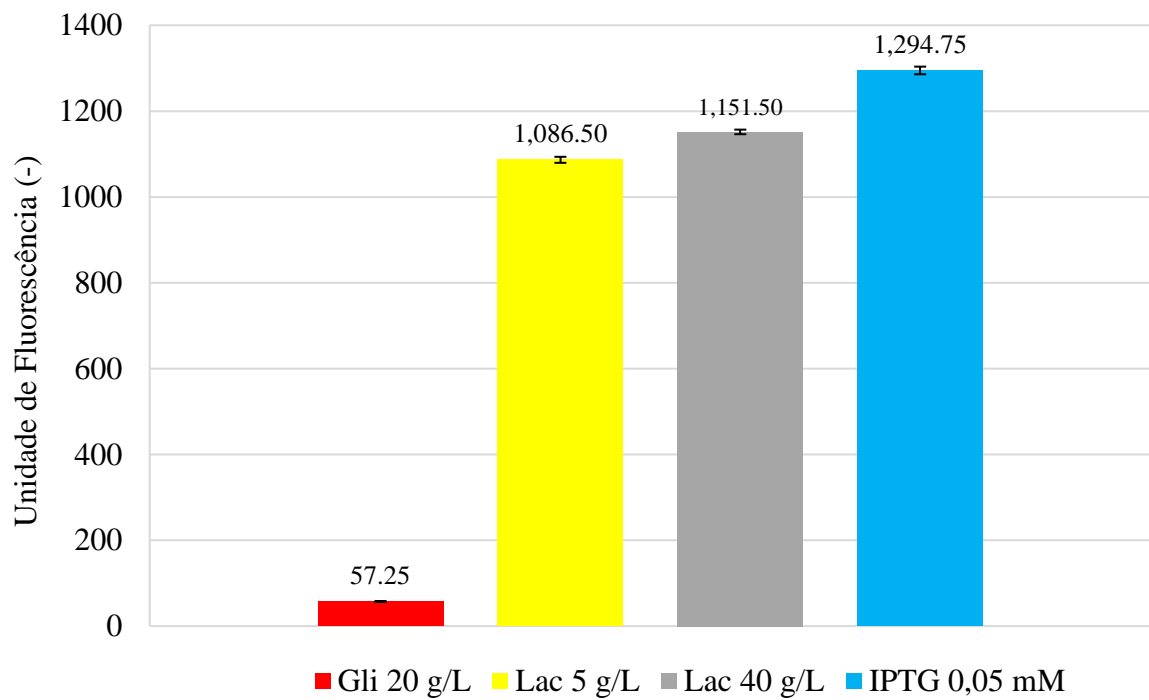
A Figura 11 demonstra os resultados encontrados para a expressão de EGFP das melhores condições testadas. Os resultados foram obtidos através de medida de EGFP de forma indireta dada em UF, no comprimento de onda de excitação 485 nm e emissão de fluorescência de 535 nm.

**Figura 11.** Curvas de crescimento celular das condições onde se obteve a maior resposta de crescimento celular dentre as testadas no experimento em microplaca (glicose, lactose e IPTG).



FONTE: autoria própria

**Figura 12.** Condições onde se obteve a maior resposta de emissão de fluorescência dentre as testadas no experimento em microplaca (glicose, lactose e IPTG) referentes a emissão de fluorescência ao término das 12 horas de cultivo.



FONTE: autoria própria

Pode-se observar na Figura 10 que as concentrações de 5 g/L e 40 g/L de lactose foram mais promissoras como fonte de carbono para o crescimento celular quando comparadas a concentração de 20 g/L de glicose e 0,05 mM de IPTG.

Dentre as diversas reações metabólicas das fontes de carbono, uma possível explicação para o menor crescimento celular, quando utilizada a glicose como fonte de carbono, pode ser referente aos danos celulares causados devido a formação de ácido acético formado pela via glicolítica, que reduz o pH intracelular levando a diminuição do crescimento celular. Assim, uma maior concentração de glicose pode potencializar a produção de ácido acético, causando morte celular e interrupção do crescimento (ROCHA 2003).

Já as concentrações de lactose de 5 g /L e 40 g/L atuaram como substância indutora para a expressão proteica semelhantemente ao indutor IPTG na concentração de 0,05 mM, demonstrado na Figura 11. Isso pode ser sugerido pelo fato de o IPTG ser uma molécula análoga a alolactose, viabilizando a lactose como fonte de carbono e como indutor da *E. coli* recombinante BL21, principalmente na ausência de glicose, o que condiz com a composição do meio utilizado no trabalho (NEUBAUER et al 1992; BRIAND et al 2016).

A partir dos dados observados nos cultivos apresentados, sugerindo a lactose como promissora fonte de carbono e atuando de maneira semelhante ao IPTG como agente de indução, um cultivo em mesa incubadora rotativa foi realizado para avaliar se resultados semelhantes ao experimento em microescala seriam observados no processo em maior escala.

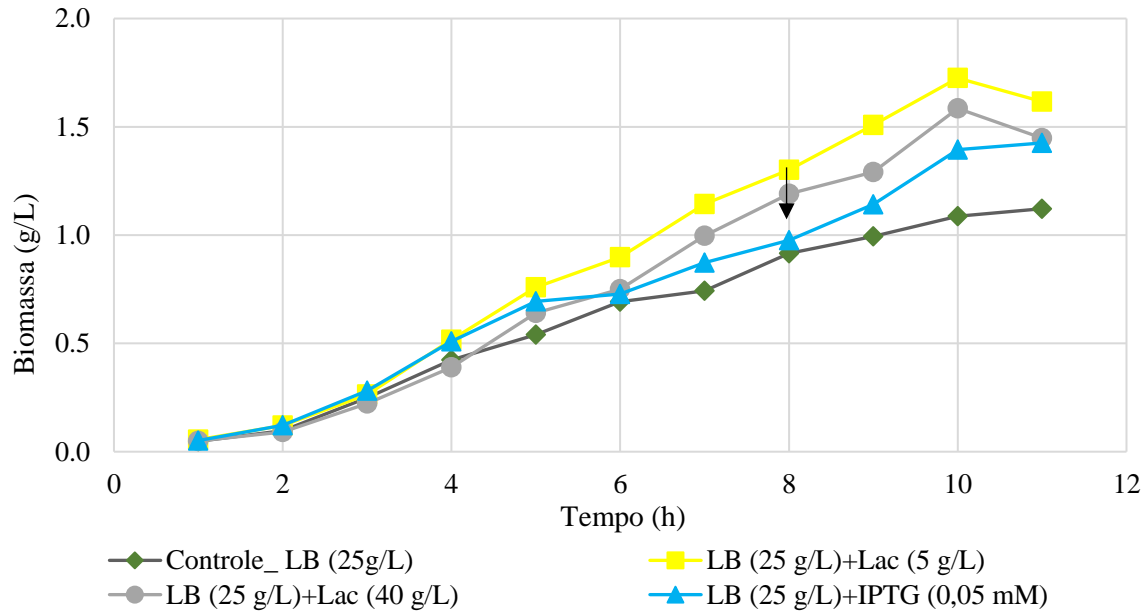
Neste experimento em mesa incubadora rotativa foram realizados 4 cultivos com as mesmas concentrações de lactose (5 e 40 g/L) e 0,05 mM de IPTG, apresentados no experimento em microplaca como as melhores condições de cada substância testada, a única condição que não foi continuada foi 20 g/L de glicose, devido a esta se mostrar repressora da expressão de EGFP.

As Figuras 12 e 13 demonstram os resultados observados de crescimento celular e expressão proteica, respectivamente, dos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa.

Vale ressaltar que estes experimentos escalonando o experimento realizado em microplaca (mesa incubadora rotativa e biorreator) foram realizados para avaliar a semelhança entre os resultados obtidos na microplaca, já que o equipamento utilizado no experimento em microplaca mensura a intensidade de fluorescência e a  $DO_{600nm}$  de maneira específica e diferente das dos outros equipamentos utilizados no estudo (leitor de fluorescência e espectrofotômetro), portanto não pode haver uma comparação dos valores absolutos deste

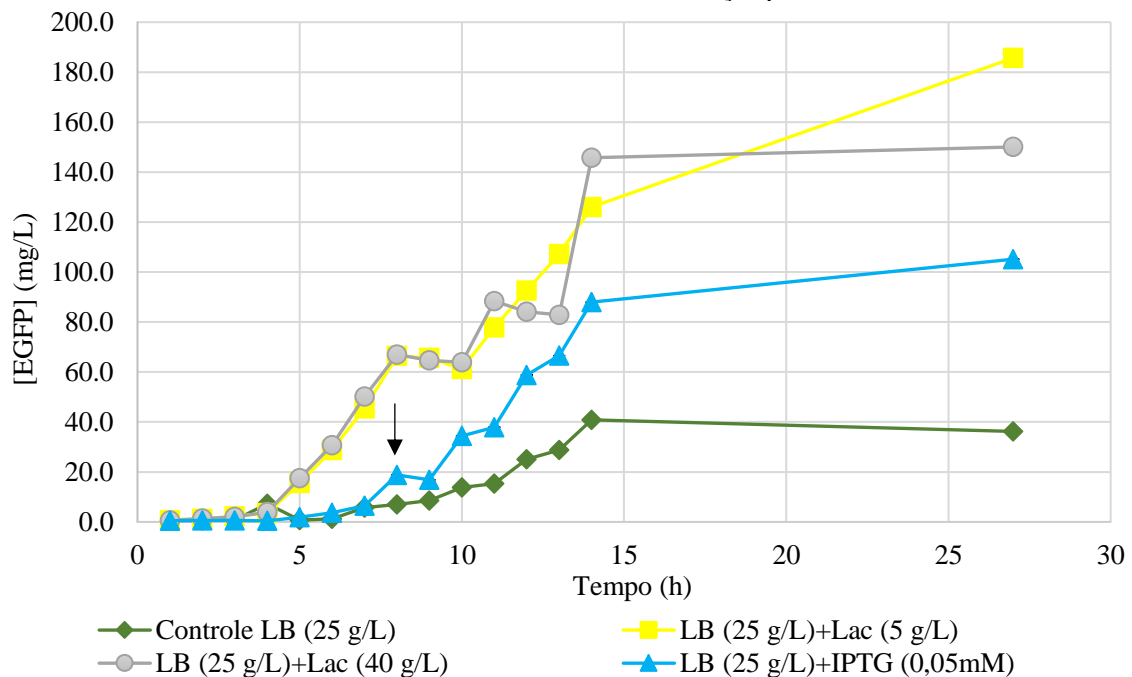
experimento com os demais, apenas com experimentos realizados no mesmo aparelho e utilizando a mesma metodologia.

**Figura 13.** Concentração de biomassa de cultivos realizados em diferentes condições de adição de lactose ao meio LB, um controle positivo (meio LB) e uma condição com adição de IPTG como agente indutor, a seta indica o momento da indução por IPTG.



FONTE: autoria própria

**Figura 14.** Concentração de EGFP (mg/L) de cultivos realizados diferentes condições de adição de lactose ao meio LB, um controle positivo (meio LB) e uma condição com adição de IPTG como agente indutor, a seta indica o momento da indução por IPTG.



FONTE: autoria própria

De maneira semelhante ao cultivo em microplaca, o crescimento celular no cultivo em mesa incubadora rotativa foi melhor utilizando lactose quando comparado as outras duas condições onde o meio de cultura foi composto apenas por LB 25 g/L, visto que em 10 horas de cultivo a biomassa na condição de LB + Lac 5 g/L foi 58% maior quando comparada com o controle (LB 25 g/L) e 24% maior quando comparada a condição adicionando IPTG 0,05 mM como agente indutor.

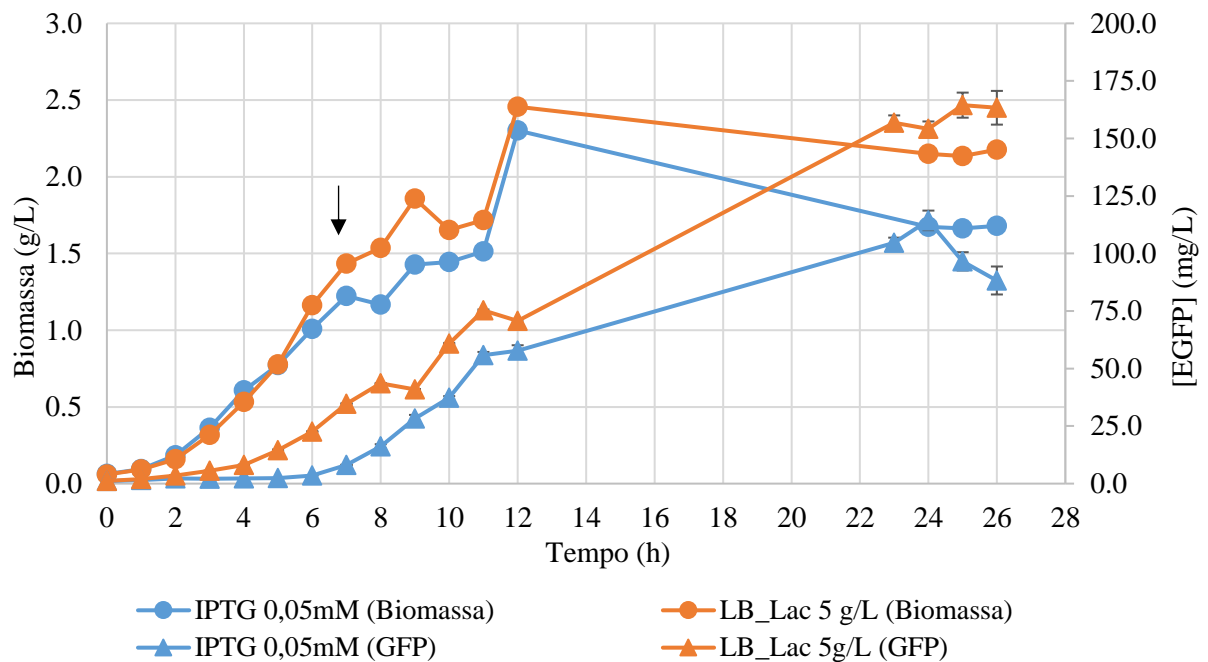
Em relação aos resultados obtidos referente a expressão proteica houve superioridade da condição LB + Lac 5 g/L sobre todas as outras condições, onde em 27 horas de cultivos esta condição apresentou aumento de 459% quando comparada ao controle (meio LB puro), 77% maior quando comparada a condição utilizando IPTG 0,05 mM como agente indutor e 24% maior quando comparada a condição com adição de 40 g/L de lactose ao meio LB.

Por último, foi realizado um teste em biorreator convencional, desta vez avaliando apenas uma das condições utilizando adição de lactose ao meio LB (1), sendo ela 5 g/L e utilizando a condição adicionando IPTG (0,05 mM) ao meio LB (2), como agente indutor, para verificar se os resultados se comportariam de maneira semelhante aos outros dois experimentos anteriores.

As duas condições testadas em biorreator foram operadas com os mesmos parâmetros, sendo agitação de 300 rpm, temperatura a 30°C e vazão de ar de 0,5 vvm (2,0 L/min), com a única variável entre eles sendo a adição, ao meio de cultura LB, de lactose (5 g/L) e a outra condição contendo apenas meio LB e adição de IPTG quando o cultivo apresenta-se  $DO_{600nm}$  na faixa de 2,0 a 2,5 (em torno de 7 horas após o início do cultivo). O biorreator contendo lactose foi operado desde o início do cultivo com o meio composto de LB + lactose 5 g/L, sem a adição de IPTG. O biorreator contendo apenas meio LB foi adicionado IPTG (0,05mM) quando o mesmo estava em  $DO_{600nm}$  na faixa de 2,0 a 2,5.

A Figura 14 apresenta os resultados observados referentes a concentração de biomassa em g/L e concentração de EGFP em mg/L dos dois cultivos em biorreator.

**Figura 15.** Concentração de biomassa (g/L) e EGFP (mg/L) de dois biorreatores operados em modo batelada nas condições de 300 rpm, 30°C e vazão de ar de 0,5 vvm (2 L/min), a seta indica o momento de indução por IPTG 0,05 mM.



FONTE: autoria própria

Como pode ser observado na Figura 14 o resultado correspondente a concentração de biomassa se manteve semelhante aos observados nos experimentos em microplaca e em mesa incubadora rotativa, onde com presença de lactose, no meio de cultura LB, ocorreu melhor crescimento celular em comparação ao meio LB puro com adição do IPTG (0,05 mM) como agente indutor, sendo a concentração de biomassa 29% maior quando adicionada lactose no meio comparada a condição utilizando meio LB puro com adição de IPTG.

Em relação aos resultados referentes a expressão da proteína, os resultados em mesa incubadora rotativa e em biorreator se mostraram diferentes do experimento realizado em microplaca. Tanto no ensaio em mesa incubadora rotativa quanto no biorreator, observou-se maior produção de EGFP quando a lactose foi utilizada em comparação a utilização do IPTG. Nos resultados encontrados em mesa incubadora rotativa e em biorreator convencional a condição realizada utilizando adição de lactose (5 g/L) teve concentração de proteína 77% (mesa incubadora rotativa) e 85% (biorreator convencional) maior do que a condição utilizando IPTG. Sugere-se que isso ocorra devido ao fato de a lactose apresentar menos toxicidade para a bactéria quando comparada a molécula de IPTG, consequentemente causando menos dano e morte celular e maior expressão proteica (GOMBERT e KILIKIAN 1998). Foi observado na literatura que a lactose pode ser utilizada como agente indutor de expressão proteica em

substituição ao IPTG (TOMAZETTO, 2006), além de ser capaz de promover o crescimento celular (NEUBAUER et al., 1991), característica que o IPTG não apresenta, o que promove um aumento da biomassa e conseqüentemente aumento da concentração proteica.

## **5.2 Delineamento composto central (DCC)**

Após a observação de que a lactose se comportou de maneira mais eficiente que o IPTG como indutor da expressão de EGFP, definiu-se seguir para experimentos subsequentes apenas utilizando lactose como fonte de carbono e agente de indução.

Foi realizado o planejamento experimental estatístico fatorial  $2^4$  chamado de Delineamento Composto Central (DCC) em mesa incubadora rotativa avaliando quatro variáveis independentes (temperatura (X1), agitação (X2), preenchimento do frasco (X3) e concentração de lactose (X4) ou concentração de IPTG (X4)), para o crescimento celular e expressão proteica. Os cultivos foram conduzidos em duplicata e com 3 repetições no ponto central, totalizando 35 ensaios.

Os resultados de biomassa e concentração de EGFP dos 35 cultivos realizados no planejamento são demonstrados em uma tabela no Apêndice. Todos os resultados demonstrados nessa tabela contida no Apêndice foram tratados matematicamente no software Protimiza, onde pode-se observar a interferência das variáveis estudadas para o crescimento celular a expressão da proteína.

Para melhor visualização do conjunto de dados coletados utilizando o planejamento  $2^4$ , as médias entre as duplicatas e/ou triplicata dos cultivos foram agrupados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Médias das concentrações de produção de EGFP e de concentração de biomassa entre as duplicatas e/ou triplicatas dos cultivos realizados em mesa incubadora rotativa proposto pelo planejamento experimental DCC.

<b>Temperatura</b> (°C)	<b>Agitação</b> (rpm)	<b>Preenchimento</b> (%)	<b>[Lactose]</b> (g/L)	<b>[GFP]</b> (mg/L)	<b>[Biomassa]</b> (g/L)
20	150	5	5	385,98	2,21
30	150	5	5	175,49	1,50
20	250	5	5	355,13	1,96
30	250	5	5	174,20	1,67
20	150	15	5	376,96	2,26
30	150	15	5	216,64	2,21
20	250	15	5	461,73	2,46
30	250	15	5	152,11	2,03
20	150	5	40	466,95	2,54
30	150	5	40	195,32	2,04
20	250	5	40	433,08	2,45
30	250	5	40	212,86	2,64
20	150	15	40	475,39	2,49
30	150	15	40	198,79	2,92
20	250	15	40	476,39	2,49
30	250	15	40	173,83	2,49
25	200	10	22,5	335,57	2,58

FONTE: autoria própria

Como pode ser observado na Tabela 6, a condição de experimento onde se obteve maior concentração de proteína foi em 20°C, 250rpm, 15% de preenchimento de frasco e 40 g/L de lactose (-1, +1, +1, +1) onde a média da produção entre a duplicata do cultivo foi de 476,4 mg/L de EGFP.

Observou-se também que, de maneira geral, em condições onde a variável temperatura foi 20°C houve aumento substancial da produção de EGFP quando comparada a todos os experimentos realizados em 30°C. Sugerindo que em temperaturas mais brandas a expressão proteica e/ou a capacidade de fluorescência do cromóforo seja favorecida. Este resultado corroborou com o estudo de Vera e colaboradores (2003), onde foi observado que a emissão de fluorescência específica foi 4 vezes maior em ensaios conduzidos a 16°C quando comparado aos ensaios conduzidos a 30°C e que de maneira geral, a expressão da proteína em temperaturas mais brandas melhora a solubilidade e a qualidade conformacional da mesma (VERA et al., 2003).

Outro fato que se pode observar diante dos dados na Tabela 6 é que a melhor D.O<sub>600nm</sub>, não obrigatoriamente acompanha a melhor expressão de proteína. Ou seja, sugere-se que a expressão proteica não depende apenas do melhor crescimento celular bacteriano.



Inserindo os dados no software Protimiza Experimental Design, obtivemos uma tabela com o cálculo estatístico de todas as variáveis e da interação entre elas (Tabela 7). Esta tabela apresenta o erro padrão e o teste t de *Student* para a resposta concentração de biomassa (g/L).

**Tabela 7.** Teste t de *Student*, erro padrão e valor de p das variáveis testada individualmente e da interação entre elas, dados obtidos para a resposta Y1 (concentração de biomassa).

Variável	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,12	47,13	0,0000
Temperatura (X1)	0,12	-1,58	0,1272
Agitação (X2)	0,12	0,13	0,8982
Preenchimento do frasco (X3)	0,12	2,98	0,0066
[Lactose] (X4)	0,12	4,50	0,0001
Temperatura x Agitação (X1.X2)	0,12	0,31	0,7616
Temperatura x Preenchimento (X1.X3)	0,12	1,48	0,1522
Temperatura x [Lactose] (X1.X4)	0,12	2,07	0,0492
Agitação x Preenchimento (X2.X3)	0,12	-1,12	0,2723
Agitação x [Lactose] (X2.X4)	0,12	0,26	0,7961
Preenchimento x [Lactose] (X3.X4)	0,12	-1,04	0,3076

FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*

Como pode ser verificado na Tabela 7, o efeito do preenchimento do frasco tipo Erlenmeyer (X3) e o efeito da concentração de lactose adicionada ao meio (X4) são estatisticamente significativos ao nível de confiança de 99%, uma vez que seus respectivos valores de  $t_{\text{calc}}$  (2,98 e 4,5, respectivamente) apresentaram-se maiores do que o  $t_{\text{tab}}$  para o nível de confiança de 99% e graus de liberdade desse estudo ( $t_{\text{tab}} = 2,7284$ ).

O efeito da interação entre as variáveis temperatura e concentração de lactose (X1.X4) também apresentou significância estatística, entretanto, nesse caso, ao nível de confiança de 95% ( $t_{\text{calc}} = 2,07$  e  $t_{\text{tab}} = 2,0322$ ).

As outras variáveis avaliadas e suas interações não foram estatisticamente significativas quando avaliadas pelo teste t de *Student* uma vez que os valores de  $t_{\text{calc}}$  apresentaram-se inferiores aos valores de  $t_{\text{tab}}$  para o nível de confiança de 90% ( $t_{\text{tab}} = 1,6909$ ).

Sendo assim, considerando-se um nível de significância de 0,1 ( $p < 0,01$ ), o modelo ajustado com as variáveis codificadas e contendo apenas as condições estatisticamente significativas é expresso pela Equação 9 (Eq. 09).

$$Y_1 = 5,55 + 0,37X_3 + 0,55X_4 \quad \text{Eq. 09}$$

onde  $Y_1$  é a concentração de biomassa,  $X_3$  é a variável preenchimento do frasco Erlenmeyer e  $X_4$  é a concentração de lactose.

A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos, na qual podemos observar que a regressão foi significativa (p-valor < 0,0001) e o  $F_{\text{calc}}$  foi aproximadamente 2,5 vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$  ( $F_{\text{calc}} = 13,1216$  e  $F_{\text{tab}} = 5,39$ ).

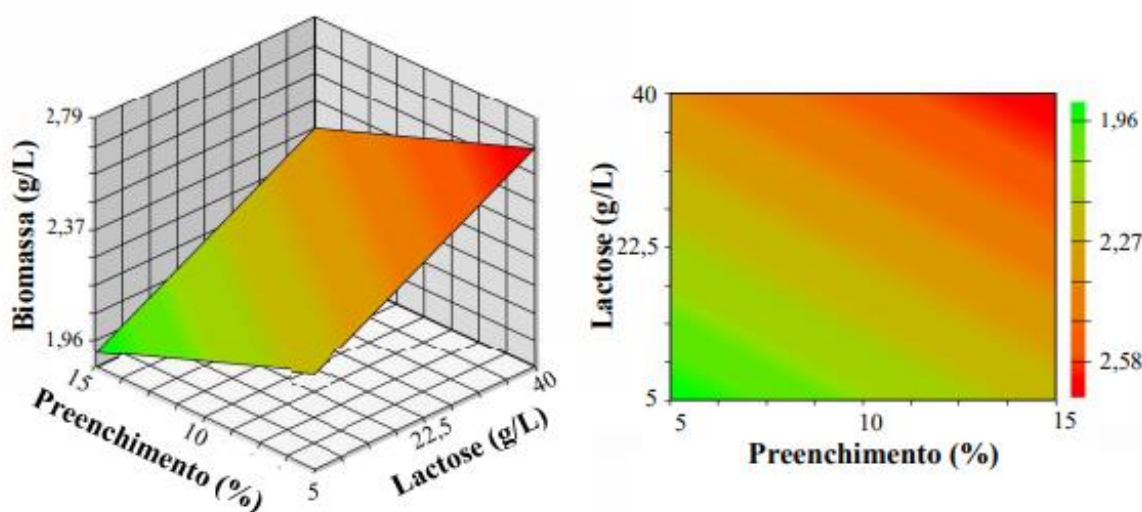
**Tabela 8.** Análise de variância referente a resposta concentração de biomassa ( $Y_1$ ) de acordo com o DCC.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
Regressão	14,1454	2	7,07227	13,1216	$6,8 \cdot 10^{-5}$
Resíduos	17,2483	32	0,5390		
<b>Total</b>	<b>31,3938</b>	<b>34</b>			

FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*.

A Figura 15 apresenta a superfície de resposta e curvas de contorno referentes à concentração de biomassa (g/L) em função da concentração de lactose e preenchimento do frasco.

**Figura 16.** Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta  $Y_1$  (concentração de biomassa) em função das variáveis  $X_3$  e  $X_4$  (preenchimento do frasco e concentração de lactose, respectivamente).



FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*.

De acordo com a superfície de resposta e curvas de contorno geradas, observou-se que o aumento nas variáveis X3 e X4 (preenchimento do frasco e concentração de lactose, respectivamente) acarreta em maior crescimento celular.

A Tabela 9 apresenta os dados de erro padrão, teste t de *Student* e valor de p, referentes aos resultados obtidos para a resposta Y2 (produção de proteína EGFP mg/L).

**Tabela 9.** Erro padrão, teste t de *Student* e valor de p das variáveis testada individualmente e da interação entre elas, dados obtidos para a resposta Y2 (produção de proteína EGFP).

Variável	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	10,96	28,34	0,0000
Temperatura (X1)	11,46	-10,54	0,0000
Agitação (X2)	11,46	-0,28	0,7784
Preenchimento do frasco (X3)	11,46	0,72	0,4757
[Lactose] (X4)	11,46	1,82	0,0807
Temperatura x Agitação (X1.X2)	11,46	-0,51	0,6117
Temperatura x Preenchimento (X1.X3)	11,46	-0,90	0,3747
Temperatura x [Lactose] (X1.X4)	11,46	-1,14	0,2641
Agitação x Preenchimento (X2.X3)	11,46	0,24	0,8092
Agitação x [Lactose] (X2.X4)	11,46	-0,15	0,8783
Preenchimento x [Lactose] (X3.X4)	11,46	-0,55	0,5889

FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*.

Como pode ser observado na Tabela 9, a variável temperatura (X1) foi a única que apresentou interferência estatisticamente significativa ao nível de confiança de 99%, uma vez que seu  $t_{\text{calc}}$  (10,54) apresenta-se maior do que o  $t_{\text{tab}}$  para nível de 99% de confiança e graus de liberdade desse estudo ( $t_{\text{tab}} = 2,7284$ ).

O efeito da concentração de lactose (X4) também apresentou significância estatística, entretanto ao nível de confiança de 90% ( $t_{\text{calc}} = 1,82$  e  $t_{\text{tab}} = 1,6909$ ). As outras variáveis estudadas individualmente e suas interações não foram estatisticamente relevantes quando avaliados pelo teste t de *Student*, uma vez que os valores de  $t_{\text{calc}}$  apresentaram-se inferiores aos valores de  $t_{\text{tab}}$  para o nível de confiança de 90% (1,6909).

Deste modo, considerando-se um nível de significância de 0,1 ( $p < 0,01$ ), o modelo ajustado com as variáveis codificadas e contendo apenas a condição estatisticamente significativa é expresso pela Equação 10 (Eq. 10).

$$Y_2 = 310,52 - 120,77X_1 \quad \text{Eq. 10}$$

onde  $Y_2$  é a concentração de proteína em mg/L e  $X_1$  é a variável temperatura

A Tabela 10 apresenta a ANOVA dos resultados obtidos, na qual podemos observar que a regressão foi significativa (p-valor < 0,0001) e o  $F_{\text{calc}}$  foi aproximadamente 15 vezes maior que o  $F_{\text{tab}}$  ( $F_{\text{calc}} = 119,38$  e  $F_{\text{tab}} = 7,56$ ).

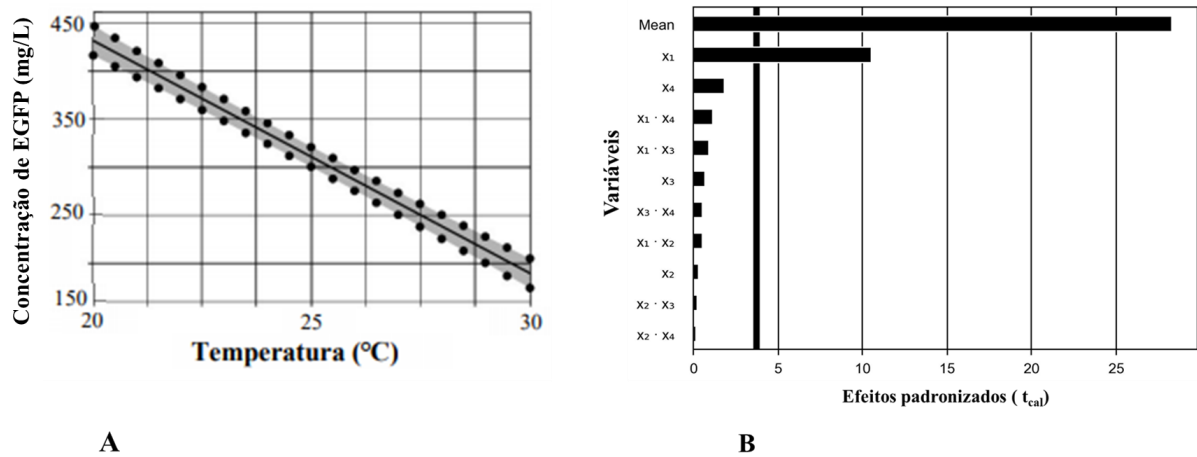
**Tabela 10.** Análise de variância referente aos dados obtidos para a resposta Y2 (produção de EGFP) através do planejamento experimental DCC.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
<b>Regressão</b>	$4,66.10^5$	1	$4,66.10^5$	119,3852	$1,68.10^{-12}$
<b>Resíduos</b>	$1,29.10^5$	33	$3,9.10^4$		
<b>Total</b>	$5,95.10^5$	34			

FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*.

Dessa forma, foi possível a construção do gráfico de resposta apresentado na Figura 16-A, relacionando a concentração da EGFP (mg/L) em função da temperatura(°C), que demonstra que em condições de temperatura mais branda ocorre maior produção de proteína EGFP pela *rE.coli*. E o Diagrama de Pareto apresentado na Figura 16-B, que demonstra que a variável X1 (temperatura) foi a única considerada estatisticamente significativa no processo de produção de EGFP.

**Figura 17.** Influência da temperatura na concentração de proteína produzida (A) e Diagrama de Pareto (B) apresentando a significância das variáveis estudadas.



FONTE: dados da pesquisa tratados no *software Protimiza Experimental Design*

Um estudo de Chew e colaboradores (2012) descreveu que dentre as variáveis estudadas no planejamento realizado pelos pesquisadores as que tiveram significância estatística foram a taxa de agitação, temperatura e tempo de indução, já que foi utilizado IPTG como agente indutor de expressão proteica. Contudo, este resultado encontrado corrobora com o presente estudo, a temperatura foi a variável que apresentou maior influência na produção da proteína de interesse (CHEW et. al., 2012).

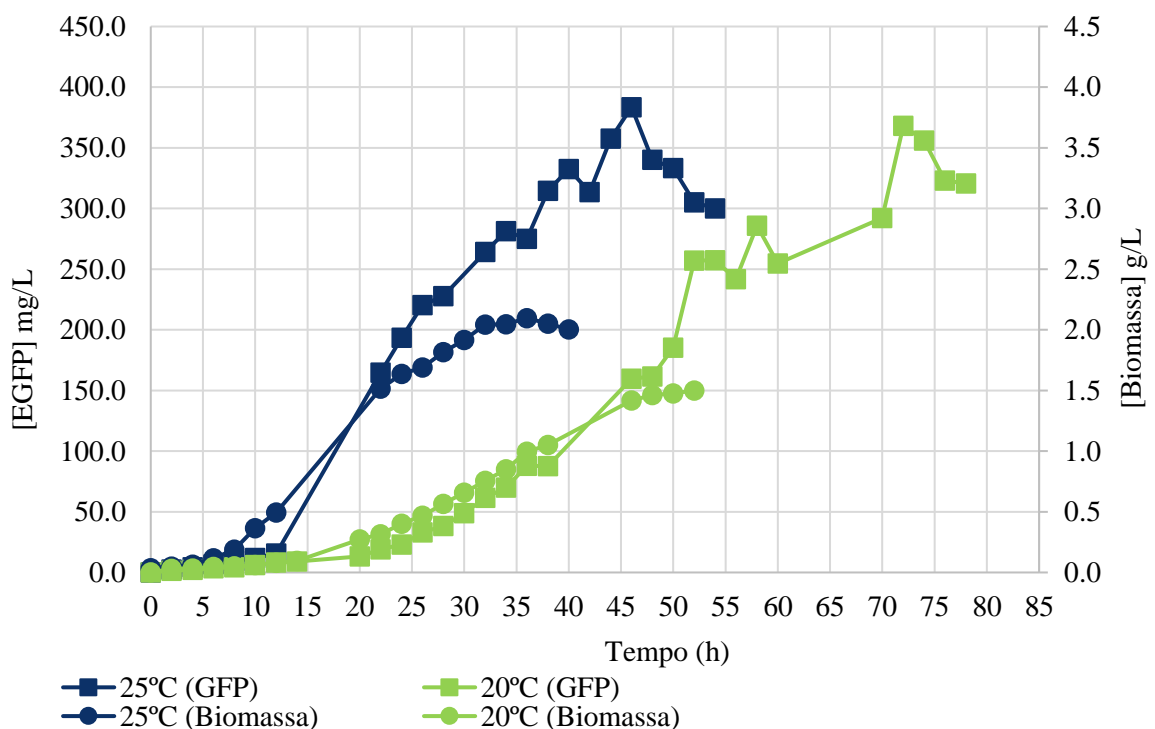
Sabe-se que a emissão de fluorescência pela proteína é melhorada quando sua estrutura terciária é formada corretamente (WALDO et al., 1999) o que pode ficar comprometido em temperaturas mais elevadas resultando na formação de corpos de inclusão na *E. coli* (SIEMERING et al., 1996). Sendo assim, 20°C foi a temperatura definida cultivos subsequentes.

A variável X4 (concentração de lactose) não apresentou interferência significativamente estatística para a expressão da proteína EGFP em um nível de significância de 0,1. Contudo, em relação a resposta Y2 (crescimento celular bacteriano), a variável X4 (concentração de lactose) apresentou interferência significativamente estatística, sendo que quanto maior a concentração de lactose, melhor o crescimento celular bacteriano observado. Além disso, observou-se que em um cultivo realizado em biorreator utilizando adição de 5g/L de lactose ao meio, a mesma foi completamente consumida em aproximadamente 5 horas. Tais resultados justificaram a escolha da concentração de 40 g/L de lactose para realização dos ensaio subsequentes.

### 5.3 Ensaio em biorreator convencional

Após a finalização do planejamento experimental, foram realizados dois experimentos pilotos em biorreator convencional, um nas condições de 20°C, 600rpm, 0,75vvm (3 L/min) e 40 g/L de lactose no meio LB (3), e outro B nas condições de 25°C, 600rpm, 0,75vvm e 40 g/L de lactose no meio LB (4). A comparação entre a curva de produção de EGFP e a concentração de biomassa (g/L) é demonstrada na Figura 17.

**Figura 18.** Crescimento celular entre os biorreatores em 20°C e em 25°C, operados em 600 rpm com vazão de ar de 3 L/min, utilizando meio LB com adição de 40 g/L de lactose.



FONTE: autoria própria

O que pode ser observado na Figura 17 foi que atingiu-se semelhantes concentrações de EGFP durante as duas condições de cultivo (383,50mg/L em 46 horas a 25°C enquanto que a 20°C em 72 horas obteve-se 368,14 mg/L), porém a 25°C a produção de proteína ocorreu de forma mais acelerada do que a 20°C, isso pode ser sugerido devido ao metabolismo bacteriano responder melhor em temperaturas em torno de 30 a 37°C, ficando mais lento em temperaturas amenas como 20°C. A Tabela 11 compara as produções de EGFP, crescimento celular, e parâmetros cinéticos dos dois biorreatores.

**Tabela 11.** Parâmetros cinéticos dos dois biorreatores 3 (20°C) e 4 (25°C) operados em 600 rpm, 3 L/min de ar e meio LB com adição de lactose.

<b>Biorreator</b>	<b>[biomassa] (g/L)</b>	<b>Pico [EGFP] (mg/L)</b>	<b><math>\mu_{máx}</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>Y<sub>p/x</sub> (mg/g)</b>	<b>Produtividade (mg/L.h)</b>
<b>3 (20°C)</b>	1,49	368,14	0,0895	249,85	5,11
<b>4 (25°C)</b>	2,29	383,50	0,2196	169,55	8,34

FONTE: autoria própria

Apesar de apresentar maior concentração da proteína desejada e uma velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{máx}$ ) maior (0,2196 h<sup>-1</sup> versus 0,0895 h<sup>-1</sup>), o cultivo a 25°C apresentou menor produção específica ( $Y_{p/x}$ ) (169,55 mg de GFP por grama de célula, enquanto que a 20°C foi de 249,85 mg de GFP por grama de célula). Isso se deve ao fato de que ambas as concentrações de EGFP obtidas foram semelhantes, entretanto a biomassa formada a 20°C foi aproximadamente 35% menor do que a 25°C.

Vale ressaltar que a diferença do  $Y_{p/x}$  entre as duas condições sugere a hipótese de que a expressão de EGFP não está unicamente relacionada ao crescimento celular, já que o aumento da biomassa não foi proporcional ao aumento da concentração de proteína nos dois cultivos.

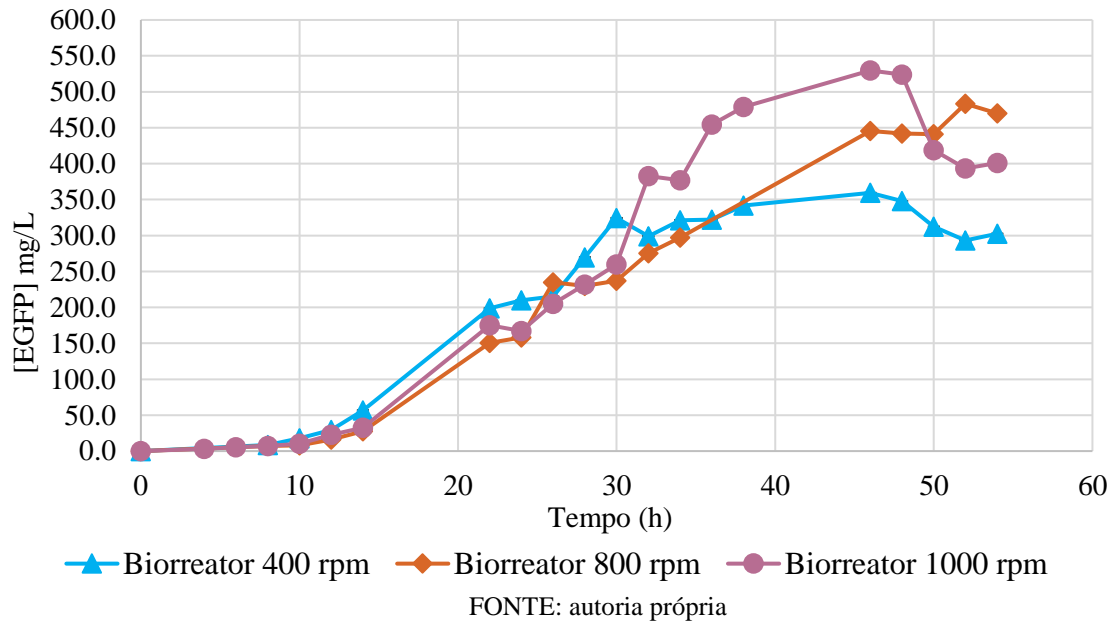
Por isso pode ser sugerido a hipótese de que a capacidade de expressão da proteína é melhor em condições de temperatura mais brandas, assim como a capacidade da proteína emitir fluorescência também pode ser melhorada em condições amenas como 20°C, porém a velocidade com que ela é produzida pela célula é menor, como observado quando comparamos a produtividade na condição 4 (25°C) de 8,34 mg/L.h em relação a condição 3 (20°C), 5,11 mg/L.h.

Sabe-se que variável agitação em biorreatores tem como papel principal promover melhora na transferência de massa e calor, além de influenciar na concentração e transferência do oxigênio, podendo, portanto, afetar o crescimento e expressão proteica pela célula bacteriana (CHEW et. al, 2012). Sendo assim, com a observação dos parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 11, levando-se em consideração principalmente o  $\mu_{máx}$  e a produtividade definiu-se a temperatura de 25°C como melhor temperatura de cultivo para ensaios subsequentes onde avaliou-se a variável agitação.

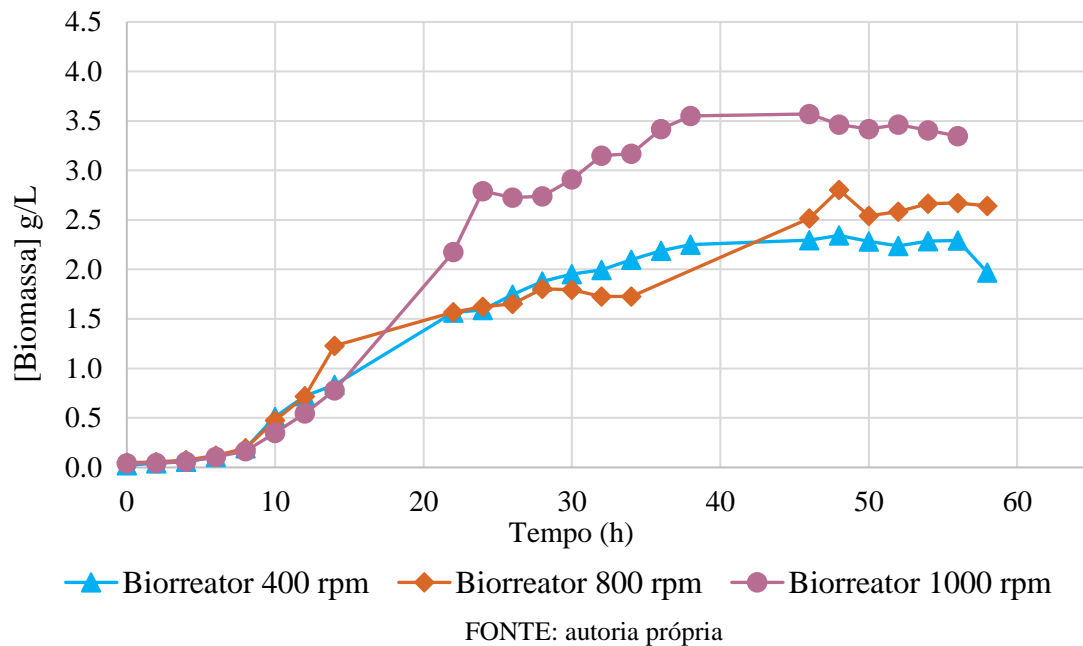
Foram realizados três cultivos em condições de agitação diferentes, sendo elas 400 rpm (5), 800 rpm (6) e 1000 rpm (7). A vazão de ar foi diminuída, em relação aos experimentos a 20 e 25°C, para 0,5 vvm (2 L/min) e as condições de operação foram mantidas em 25°C utilizando meio LB com adição de 40 g/L de lactose. Também como medida analítica adicional aos dois biorreatores pilotos (3 e 4) foi dosado a concentração de lactose de cada ensaio.

As figuras 18 e 19 apresentam os resultados do cultivos C, D e E (400, 800 e 1000 rpm, respectivamente).

**Figura 19.** Concentração de EGFP (mg/L) dos experimentos realizados testando diferente condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm), em função do tempo.



**Figura 20.** Concentrações de biomassa entre os experimentos realizados testando diferentes condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm) em função do tempo.



Como pode ser observado na Figura 18 a maior concentração de EGFP foi obtida na condição 7 com o biorreator operando em uma taxa de agitação de 1000 rpm, chegando a 529,70

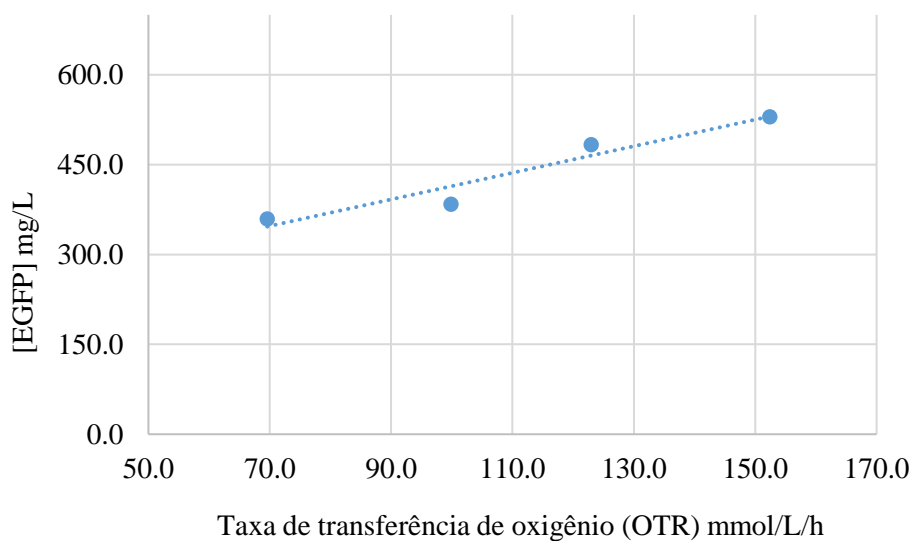


mg/L em 46 horas de cultivo, enquanto que a condição 6 obteve 483,37 mg/L em 52 horas de cultivo e a condição 5 359,39 mg/L de GFP em 46 horas. Isso pode ocorrer devido a transferência de oxigênio ser melhorada pelo aumento da agitação, e esta tem grande influência na capacidade de emissão de fluorescência pelo cromóforo devido a etapa de oxidação da molécula ser de fundamental importância e limitante para que o cromóforo emita fluorescência (HEIM et al, 1994).

O  $k_{LA}$  das condições testadas em biorreator (400, 800 e 1000 rpm na vazão de ar de 2 L/min ar-0,5 vvm e em 600 rpm com vazão de ar de 3 L/min -0,75vvm) foi medido e através deste parâmetro pode-se calcular a OTR a fim de avaliar a existência da relação entre o aumento de agitação (conforme ocorreu aumento da agitação ocorreu também o aumento da concentração de EGFP) e a transferência de oxigênio.

A Figura 20 apresentam o gráfico da relação entre a concentração de EGFP (mg/L) e o valor de OTR.

**Figura 21.** Curva da concentração de EGFP em função da OTR - taxa de transferência de oxigênio (mmol/L/h).



FONTE: autoria própria

Como pode ser visto na Figura 20 a relação entre OTR e concentração de EGFP (que melhorou com o aumento da taxa de agitação) se deu de forma linear, dessa maneira é possível afirmar que para as condições testadas quanto maior a taxa de agitação melhor é a transferência de oxigênio no meio obtendo-se maior concentração da proteína de interesse. A relação destas duas variáveis é apresentada pela Equação 11 (Eq 11).

$$OTR = 2,2198.[EGFP] + 192,17 \quad \text{Eq. 11}$$

Em melhores condições de transferência de oxigênio se torna mais fácil a absorção do oxigênio disponível no meio de cultura, devido a maior superfície de contato formada entre o líquido e o gás, favorecendo expressão da proteína de interesse.

É interessante observar que durante o planejamento experimental realizado em frasco do tipo Erlenmeyer, descrito no item 5.2, a taxa de agitação não apresentou interferência estatisticamente significativa para nenhuma das respostas (Y1-crescimento celular e Y2-produção de proteína), divergindo do resultado observado nesta etapa de cultivos em biorreator. Sendo assim, sugere-se que a variação entre as taxas de agitação empregadas durante o planejamento experimental  $2^4$  não tenha sido suficiente para promover diferença expressiva na transferência de oxigênio não alterando significativamente a concentração de EGFP.

A Tabela 12 mostra a comparação entre os biorreatores 5 (400 rpm), 6 (800 rpm) e 7 (1000 rpm) em relação aos parâmetros cinéticos observados.

**Tabela 12.** Parâmetros cinéticos observados nos cultivos 5 (400 rpm), 6 (800 rpm) e 7 (1000 rpm) operados a 25°C em vazão de ar de 2 L/min composto de meio LB com adição de 40 g/L de lactose.

Experimento	[biomassa] (g/L)	Pico [GFP] mg/L	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{p/x}$ (mg/g)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo Substrato (g/L)
<b>400 (5)</b>	2,34	359,39	0,2888	154,90	7,81	20,23
<b>800 (6)</b>	2,66	483,37	0,2095	184,84	9,30	18,31
<b>1000 (7e)</b>	3,57	529,70	0,2022	150,09	11,52	18,90

FONTE: autoria própria

De acordo com a Tabela 12 as condições 6 e 7 (800 rpm e 1000 rpm, respectivamente) se mostraram superior na produtividade e na concentração de proteína e formação de biomassa em relação a condição 5 (400 rpm), sendo a condição 7 a melhor em relação a produtividade e apresentando concentração de proteína 47% maior em relação a condição 5. Sendo assim, utilizando apenas os valores observados para expressão de GFP,  $\mu_{m\acute{a}x}$  e produtividade, as condições em 800 rpm e 1000 rpm foram selecionados como as condições mais promissoras para realização dos próximos ensaios.

A Figura 21 apresenta fotos do reator realizado a 1000 rpm em diferentes momentos do cultivo.

**Figura 22.** Fotos do biorreator operado em 1000 rpm, 25°C, 2 L/min de vazão de ar e meio de cultura composto de LB (25g/L) com adição de lactose 40 (g/L) nos momentos 0, 36 e 48 horas após o início do cultivo.



FONTE: autoria própria

O fato da expressão proteica não ser proporcional a formação de biomassa, mas responder proporcionalmente a taxa de agitação, explica o fato do  $Y_{p/x}$  ser diferente entre os cultivos e sugere que o aumento na taxa de transferência de oxigênio gerada pelo aumento na taxa de agitação seja o responsável pelo ganho na concentração proteica.

Observou-se que o consumo de lactose não se alterou dentre os três experimentos e que não foi consumida toda a fonte de carbono utilizada no cultivo. Sugere que outro micronutriente ou fonte de nitrogênio não está na concentração adequada, limitando o crescimento celular e não permitindo o consumo total da lactose.

Dessa forma, foram realizados alguns testes a fim de definir o que poderia estar limitando o crescimento celular bacteriano já que a fonte de carbono ainda não havia se esgotado.

#### **5.4 Teste de suplementação do meio LB**

O excesso de nutrientes ou a limitação destes podem prejudicar o crescimento bacteriano, limitando a obtenção do produto final desejado. Como observado no ensaio descrito no item 5.3, a lactose adicionada ao meio de cultivo não foi completamente consumida.

A fim de determinar se algum nutriente do meio LB estava atuando como limitante, foram realizados alguns testes de suplementação com diferentes concentrações do meio LB e de extrato de levedura adicionadas ao meio de cultivo com o objetivo de promover o consumo

total da lactose. Sendo assim, foi realizado um ensaio onde diferentes concentrações de meio LB foram avaliadas.

Todos os ensaios foram realizados em frasco agitado a 25°C, 200 rpm, 15% de preenchimento do frasco, utilizando-se meio LB. A DO600nm inicial foi de 0,1 utilizando-se inóculo preparado como descrito no tópico 4.4.

Todos os cultivos tiveram a adição de lactose na concentração de 40 g/L. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados observados e as condições testadas estão apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Ensaio realizado em mesa incubadora rotativa referente a concentração de EGFP, biomassa e consumo de lactose das condições testadas.

<b>Condição do meio de cultura (g/L)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>Concentração de EGFP (mg/L)</b>	<b>Consumo de lactose (g/L)</b>
<b>LB 12,5 (50% menos)</b>	2,34	152,68	15,13
<b>LB 25 (Controle)</b>	2,29	340,61	23,65
<b>LB 37,5 (50% mais)</b>	2,66	457,05	31,28
<b>LB 25 + Ext Lev 2,5</b>	5,35	936,68	32,98

FONTE: autoria própria

Como apresentado na Tabela 13, tanto a suplementação com 50% a mais da concentração padrão de LB quanto a suplementação com extrato de levedura levaram ao aumento da concentração de proteína e aumento de biomassa em relação ao controle (25 g/L de LB). Em contrapartida a diminuição em 50% da concentração de LB demonstrou piora de todos os parâmetros avaliados, inclusive piorando significativamente o consumo de lactose pelo microrganismo, corroborando com a hipótese de que o crescimento celular estava sendo limitado por falta de algum nutriente do meio.

A adição do extrato de levedura levou a um aumento significativo na formação de biomassa de aproximadamente 133% quando comparado ao grupo controle (LB 25 g/L), onde não houve suplementação com o extrato de levedura ou com 50% mais da concentração padrão de LB. Em relação a produção de EGFP, o grupo controle (LB 25 g/L) apresentou concentração de EGFP de 340,61 mg/L, enquanto no grupo suplementado com extrato de levedura a concentração foi de 936,68 mg/L, aumentando a produção cerca de 175%. Um estudo de Studier (2005) relatou que a adição de 0,5% de extrato de levedura ao meio levou à duplicação na

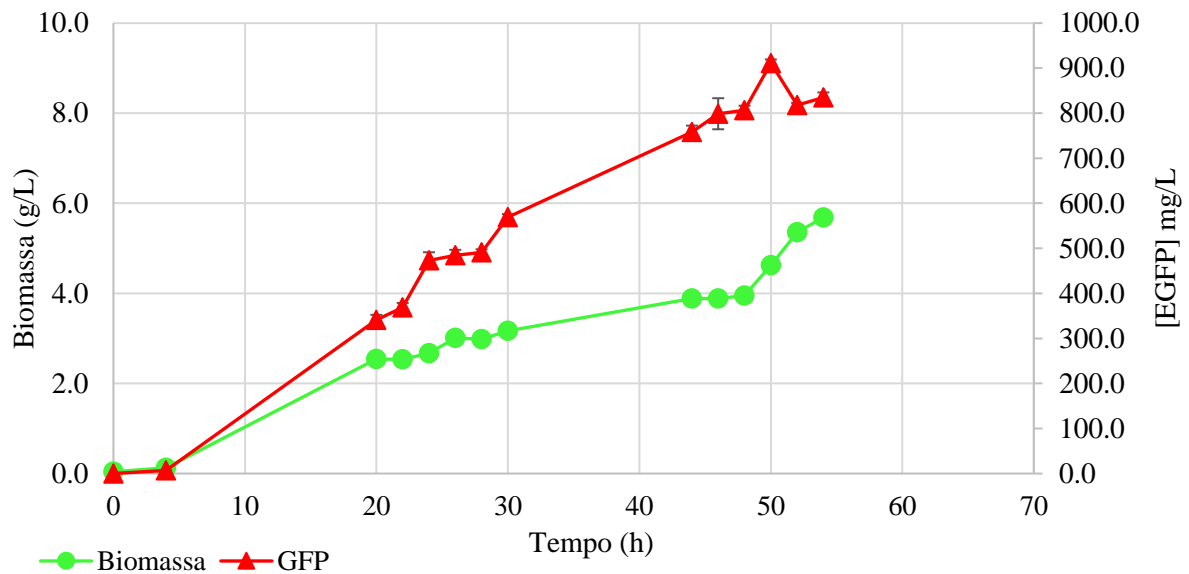
concentração de biomassa (STUDIER, 2005). A utilização de meios complexos contendo extrato de levedura é bastante difundida pois fornece nutrientes necessários ao crescimento de uma grande variedade de cepas de *E. coli*, apresentando maior crescimento quando comparado a utilização de meios quimicamente definidos (STUDIER, 2005).

Apesar do grupo suplementado com 50% a mais da concentração padrão de LB conter a mesma quantidade de extrato de levedura que o grupo onde só ocorreu suplementação com o extrato, apresentou menor formação de biomassa e menor produção proteica. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que neste caso (aumentando apenas a concentração de LB) o aumento da concentração de extrato de levedura (presente no meio LB) foi acompanhado do aumento na concentração do sal também presente no meio LB (NaCl). Essa variação pode ter provocado um aumento na pressão osmótica levando à lise celular.

Apesar de ainda não ter sido observado consumo completo da lactose presente no meio, houve um aumento de aproximadamente 39% no consumo deste açúcar. No grupo controle foi observado aproximadamente 20 g/L de lactose presente no meio ao final do cultivo, enquanto que os grupos com aumento na concentração do extrato de levedura apresentaram aproximadamente 8 g/L. Dessa forma, um ensaio em biorreator convencional suplementando o meio já utilizado (LB 25 g/L + lactose 40 g/L) com 2,5 g/L de extrato de levedura (condição 8) foi realizado, afim de observar se o perfil do consumo de lactose seria o mesmo encontrado no teste realizado em mesa incubadora rotativa.

A Figura 22 apresenta os resultados obtidos no cultivo em biorreator operado com taxa de agitação em 800 rpm, a 25°C, vazão de ar de 2,0 L/min com o meio composto de LB 25g/L suplementado com 40 g/L de lactose e 2,5 g/L de extrato de levedura.

**Figura 23.** Concentração de EGFP (mg/L) e biomassa (g/L) do cultivo realizado em biorreator convencional operando em 800 rpm, com vazão de ar de 2 L/min, a 25°C com meio de cultivo composto por LB (25 g/L) mais 40 g/L de lactose mais 2,5 g/L de extrato de levedura.



FONTE: autoria própria

Como demonstrado na Figura 22, o cultivo em biorreator convencional se comportou de maneira semelhante ao cultivo em mesa incubadora rotativa referente a produção de EGFP e concentração de biomassa (ambos em torno de 900 mg/L de proteína, com concentração de biomassa em torno de 6 g/L), o que reforça que a suplementação do meio utilizado com extrato de levedura se faz necessária. Porém houve um problema com o equipamento usado nesse ensaio, durante a madrugada, interrompendo o mesmo em 54 horas. A concentração de lactose foi dosada e até as 54 horas do início do cultivo e verificou-se o consumo de 27 g/L de lactose, concentração menor que a apresentada no cultivo em mesa incubadora rotativa (32,98 g/L) porém acredita-se que isso seja devido ao cultivo em biorreator ter sido interrompido em 54 horas, enquanto o consumo de lactose apresentado no cultivo em mesa incubadora rotativa foi em 70 horas de cultivo. Para estudos posteriores aconselha-se repetir este experimento e realizar um outro na condição de agitação de 1000 rpm para avaliar se a fonte de carbono será totalmente consumida pelo microrganismo.

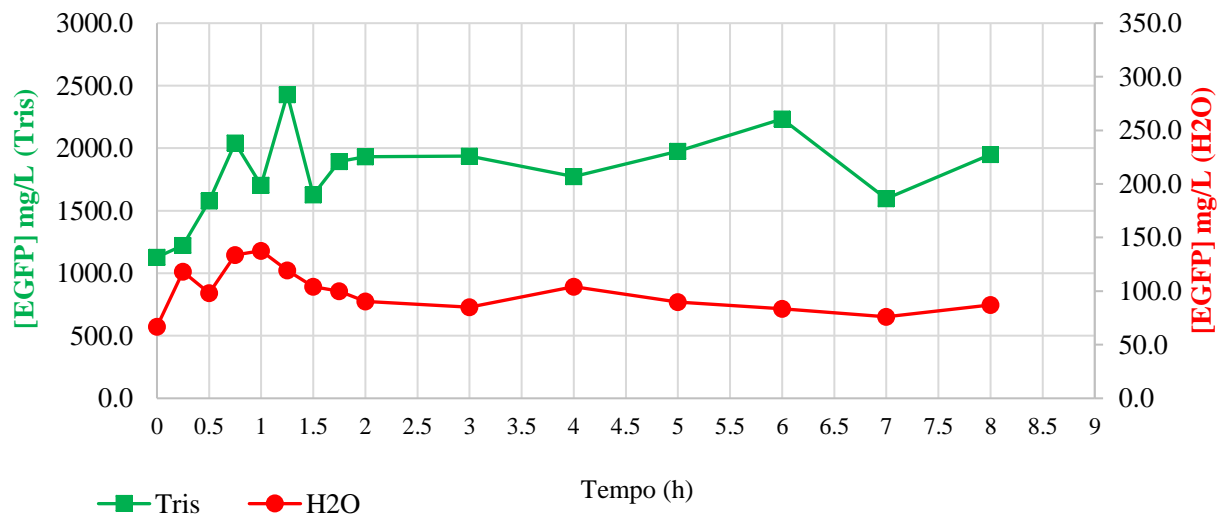
### 5.5 Teste com oxigênio puro

A fim de avaliar se a transferência de oxigênio foi limitante para a emissão de fluorescência pelo cromóforo da proteína, realizou-se um experimento onde a biomassa celular

do último cultivo em biorreator (que obteve a maior concentração de proteína e biomassa – condição 8) foi diluída em tampão Tris-HCL 50 mM de pH 8,0 (condição teste 1) e diluída em água (condição teste 2). A concentração de proteína foi analisada no início do experimento, e então foi adicionado oxigênio puro com vazão de 1 L/min nas duas condições com controle de temperatura a 22°C e retirou-se amostras a cada 15 minutos durante as duas primeiras horas de experimento e após isso retirou-se amostras a cada 1 hora. O experimento durou 8 horas.

A Figura 23 apresenta os resultados referente a concentração de proteína em função do tempo nos dois experimentos.

**Figura 24.** Concentração de proteína em função do tempo do experimento utilizando oxigênio puro.



FONTE: autoria própria

Como pode ser observado na Figura 23, durante as duas primeiras horas do experimento testando a adição de oxigênio puro houve aumento substancial da fluorescência na duas condições avaliadas (em Tris a concentração de EGFP em uma hora foi 115% vezes maior do que a inicial e em água foi 105% maior do que a concentração inicial). Após uma hora e meia de experimento as concentrações tiveram uma queda e se mantiveram estáveis até o término do experimento, porém em nenhuma delas a concentração final de EGFP foi menor que a inicial.

Através desses resultados foi confirmada a hipótese levantada de que haviam proteínas formadas porém com limitação de transferência de oxigênio para a célula, de maneira que não ocorria a etapa principal (oxidação da molécula) para a emissão de fluorescência do cromóforo.

Deste modo conclui-se também que o oxigênio não foi um fator limitante para os cultivos realizados em biorreator, visto que em nenhuma condição (1 a 8) a porcentagem de O<sub>2</sub>

não baixou de 95%. Porém com este experimento realizado submetendo a amostra de biomassa a vazão de 1 L/min de oxigênio puro observou-se que a transferência de oxigênio nos cultivos (até para os cultivos em maiores agitações) não está sendo suficiente para ativar a fluorescência de todas as moléculas formadas.

Este estudo foi baseado nos resultados encontrados no estudo de Heim e colaboradores (1994) que cultivaram o microrganismo em condições anaeróbicas e submeteram o produto (GFP) a adição de ar, observando que a proteína formada tinha sua emissão de fluorescência ativada pela presença do oxigênio presente no ar (HEIM et al., 1994).

Outro experimento foi realizado nas mesmas condições porém durou apenas uma hora, foi analisada a concentração de EGFP inicial e após uma hora analisou-se novamente e armazenou essas amostras (teste 1 e teste 2, diluídos em Tris e em água respectivamente) em freezer. A concentração de EGFP, das amostra armazenada em freezer, foi medida durante 4 dias a fim de avaliar a estabilidade desta amostra.

Como resultado observou se o teste 1, diluído em Tris-HLC 50 mM quando armazenado no mesmo tampão manteve sua concentração de EGFP constante, o teste 2, diluído em água quando armazenado em água também manteve a concentração proteica constante.



## 6 CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados observou-se que para a produção de EGFP, pelo modelo de *rE. coli* linhagem BL21 DE3 pLysS pET28(a), a lactose se comportou de maneira mais eficiente e promissora como fonte de carbono e agente de indução quando comparada ao IPTG, sendo a concentração de EGFP 77% maior quando na presença de lactose 5 g/L quando comparada a concentração obtida na condição utilizando IPTG 0,05 mM no experimento realizado em biorreator convencional.

Observou-se que entre as variáveis estudadas no planejamento estatístico, apenas a temperatura (°C) foi estatisticamente significativa para a resposta  $Y_2$  (produção de proteína EGFP – mg/L).

Com base aos dados obtidos pelo planejamento experimental referente a resposta  $Y_1$  (crescimento celular) as variáveis que se apresentaram estatisticamente significativas foram preenchimento do frasco tipo Erlenmeyer (%) e concentração de lactose (g/L), de maneira que quanto maior essas duas variáveis maior a concentração celular (g/L).

Observando os cultivos realizados em biorreator convencional constatou-se que em maior taxa de agitação ocorreu aumento substancial da produção de EGFP e melhor produtividade, isso pode ser sugerido devido ao fato de essa condição proporcionar melhor transferência de oxigênio, tornando esse substrato mais disponível para a célula, o que é essencial para que haja formação do cromóforo e para que ocorra emissão de fluorescência.

Observou-se também que ocorreu formação da proteína porém a fluorescência estava sendo limitada pela transferência de oxigênio, pois após o teste com adição de oxigênio em uma diluição da biomassa do último cultivo realizado em biorreator, averiguou-se que ocorreu um aumento de aproximadamente 115% da concentração final em relação a concentração inicial da proteína no meio.

Ao final de todos os experimentos foi observado um aumento de aproximadamente 9 vezes na concentração de produção de EGFP (de 105,14 a 936,68 mg/L) comparando as condições anteriores a otimização do processo com as condições otimizadas em mesa incubadora rotativa.

Em biorreator a concentração de proteína EGFP foi 8 vezes nas condições otimizadas em comparação as condições não otimizadas.

Além desse aumento promovido pela otimização das condições de operação do processo, ocorreu um aumento significativo após a adição de oxigênio puro durante

aproximadamente 2 horas de experimento na biomassa celular diluída, sendo esse aumento de aproximadamente 2,15 vezes em Tris e 2,05 vezes maior em água.

Sendo assim, frente a todos os experimentos avaliados conclui-se que o objetivo proposto pelo trabalho, o aumento da concentração de EGFP por *rE. coli*, foi alcançado de maneira satisfatória.

## REFERENCIAS

ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of Acid Proteinase Biosynthesis by the Fungus *Humicola lutea* 120-5 in an Air-Lift Bioreactor. **Enzyme and Microbiology Technology**. v. 26, p. 402-405, 2000.

ASENJO, J. A.; MERCHUK, J. C. Bioreactor System Design, Marcel Dekker, Inc. 1994.

AUCOIN, M. G. et al. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 27, 2006.

BAILEY, J.E. e OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup>. ed. Singapore: McGraw-Hill Book, 1986.

BENOIT, I. et al. Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase A using a serial factorial approach. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 1, p. 166–174, 2007.

BIZZARRI, R. et al. Green fluorescent protein based pH indicators for *in vivo* use: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, p. 1107–1122, 2009.

BLIGHT, M. A.; HOLLAND, I. B. Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. **Trends Biotechnol.** v. 12, p.450-455, 1994.

BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR , B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. **Química Nova**, v.30, n.3, p.548-553, 2007.

BRIAND, L. et al. **A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli***. Sci Rep. Nat, v.33037 p. 1-11, 2016.

CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de são Carlos. 2009.

CERRI, M. O.,; ESPERANÇA, M. N.; BADINO, A. C.; PERENCIN, M., RIBEIRO, A. A new approach for  $k_{La}$  determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. **J Chem Technol Biotechnol.** v. 91, p.3061-3069. 2016.

CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**. v.263, p.802-805. 1994.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 4<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 520.

CHART, H., SMITH, H.R., La RAGIONE, R.M. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 alpha and EQ1. **J. Appl. Microbiol.** v.89, p.1048–1058. 2000.

CHEW, F. N. et al. Statistical optimization of green fluorescent protein production from *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, p. 535–50, 2012.

CINELLI, R. A. G., et al. Green Fluorescent Proteins as Optically Controllable Elements in Bioelectronics. **Applied Physics Letters**. v. 79, p. 3353–3355, 2001.

CODY, C. W., et al. Chemical Structure of the Hexapeptide Chromophore of the *Aequorea* Green-Fluorescent Protein. **Biochemistry**. v.32, p.1212-1218. 1993.

DORAN P. **Bioprocess Engineering Principles**. 2<sup>nd</sup>. ed. Elsevier, 2012.

DUAN Z. et al. Application of green fluorescent protein-labeled assay for the study of subcellular localization of Newcastle disease virus matrix protein. **J. Virol. Methods**, v. 194, p.118-122, 2013.

ENOKI, S.; SAEKI, K.; MAKI, K.; KUWAJIMA, K. Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. **Biochemistry**. v. 43, p. 14238–14248, 2004.

GLICK, R. B. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**. v. 13, n. 2, p. 247-261, 1995.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal of Biotechnology**. v. 60, p. 47-54, 1998.

HAGG, P.; DePOHL, J. W.; ABDULKARIM, F. & ISAKSSON, L. A. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. **J. Biotechnology**. v.111. p.71-30. 2004.

HEIM, R.; CUBITT, A. B.; TSIEN, R. Y. Improved green fluorescence. **Nature**. v. 373, p. 663-664, 1995.

HEIM, R.; PRASHER, D. C.; TSIEN, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein (*Aequorea victoria*/blue fluorescent protein/*Escherichia coli*/imidazolidinone). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.91, p.12501-12504. 1994.

HEYLAND, J.; BLANK, L. M.; SCHMIDT, A. Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 155, p. 178–184, 2011.

HORTA, A.C.L. Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante. Tese de Doutorado, PPG-EQ/UFSCar, Dezembro 2011.

HUANG, D.; SHUSTA, E. V. Secretion and Surface Display of Green Fluorescent Protein Using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**. v. 21, p. 349-357, 2005.

KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocess. In: PRESS, P. (Ed.). **Comprehensive Biotechnology**. 1, v.2, p.5-56, 1985.

KAROW, E. O.; BARTHOLOMEW, W. H.; SFAT, M. R. Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. **Agricultural and Food Chemistry**. v. 1, n. 4, p. 302-306, 1953.

KILIKIAN, B. V.; SUÁREZ, I. D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 1019-1025, 2000.

KNOLL, A. et al. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. **Journal of Biotechnology**. v.132, p.197-179. 2007.

KREMERS, G. J.; GOEDHART, J.; VAN MUNSTER, E. B.; GADELLA, T. W. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. **Biochemistry**. v. 45, p. 6570-6580, 2006.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**. v. 14, n. 3, p. 98-105, 1996.

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. 4. ed. Sarvier 2006.

LOZANO, D. C. Estudo da caracterização das propriedades reológicas de caldos de fermentação. Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola/UNICAMP, 1982.

MARCH, J. C.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Biotechnological Application of Green Fluorescent Protein. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 62, p. 303–315, 2003.

MOHAMED, M. S. et al. Modeling of Oxygen Transfer Correlations for Stirred Tank Bioreactor Agitated with Atypical Helical Ribbon Impeller. **American Journal of Applied Sciences**, v.6, p.848-856, 2009.

MOROWVAT, M. H., BABAEIPOR, V., MEMARI, H. R., VAHIDI, H. Metabolic changes of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) during overexpression of recombinant human interferon beta in HCDC. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 4, p. 131-138, 2014.

NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell: a molecular approach**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1990.

NIEDENTHAL, R. K.; RILES, L.; JOHNSTON, M.; HEGEMANN, J. H. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. **Yeast Functional Analysis Report**. v.12, p. 773-786. 1996.

NEUBAUER, P.; HOFMANN, K.; HOLST, Ó; MATTIASSON, B; KRUSCHKE, P. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.36, p. 739-744. 1992.

NOVAGEN. *pET system Manual*. 11<sup>th</sup>. ed. Darmstadt, Germany: EMD Biosciences, 2005.

OCHOA, F. G.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial process: An overview. **Biotechnology Advances**. v.27. p.153-176. 2009.

OLSVIK, E.; KRISTIENSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. **Biotechnology Advances**. v. 12, p. 1-39, 1994.

PENNA, T. C. V.; ISHII, M. Selective permeation and organic extraction of recombinant green fluorescent protein (gfpuv) from *Escherichia coli*. **BCM Biotechnol**, v.2, p.1-11, 2002.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.10, n.2, p.106-110, 2005.

POPPENBORG, L. et al. The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. **Journal of Biotechnology**, v.58, p. 79-88. 1997.

RIESENBERG, R.; GUTHKE, R. High cell density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.51. p.422-430. 1999.

RICHARDS, J. W.; BLANCH, H. W.; BHAVARJU, S. M. Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer. **Biotechnology and Bioengineering**, v.18: p. 181- 208, 1976.

ROCHA, I. C. A. P. **Model-based strategies for computer-aided operation of recombinant *E. coli* fermentation.** Tese (Doutorado)- Universidade do Minho. 2003.

SANTISTEBAN B. O. Y. S.; FILHO-MAUGERI F. Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology.** v.36, p.717–724. 2005.

SANTOS, M. P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante.** Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de São Carlos. 2012.

SCHÜGERL, K. **Bioreaction Engineering**, volume 2: Characteristics Features of Bioreactors. Chichester, UK: John Wiley and Sons, 1987.

SHIMOMURA, O.; JOHNSON, F. H.; SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan *Aequorea*. **Journal of Cellular Physiology.** v. 59, p. 223-239, 1962.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEI, S. M. V.; BABAEIPOUR, V.; FARNOUD, A. M. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. **Iranian Journal of Biotechnology.** v. 6, n. 2, p. 63-84, 2008.

SIEMERING, K. R.; GOLBIK, R.; SEVER, R.; HASELOFF, J. Mutations That Suppress the Thermosensitivity of Green Fluorescent Protein. **Current Biology.** v. 6, p. 1653–1663, 1996.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **J. Biotechnol.**v.115, p.113-128. 2005.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. **Protein Expression and Purification.** v.41, p.207-234. 2005.

TOMAZETTO, G. Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL 21 utilizando lactose como indutor. Dissertação mestrado em Biologia Celular e Molecular)- UFRGS. Porto Alegre, 2006.p. 72.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. ISBN 978-85-363-2698-6.

VEGLIO, F.; BEOLCHINI, F.; UBALDINI, S. Empirical models for oxygen mass transfer, a comparison between shake flask and lab-scale fermentor and application to manganiferous ore bioleaching. **Process Biochemistry.** v.33, p.367-376. 1998

VERA, A. et al. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 1101–1106, 2007.

WALDO, G. S.; STANDISH, B. M.; BERENDZEN, J.; TERWILLIGER, T. C. Rapid Protein-Folding Assay Using Green Fluorescent Protein. **Nature Biotechnology**. v. 17, p. 691–695, 1999.

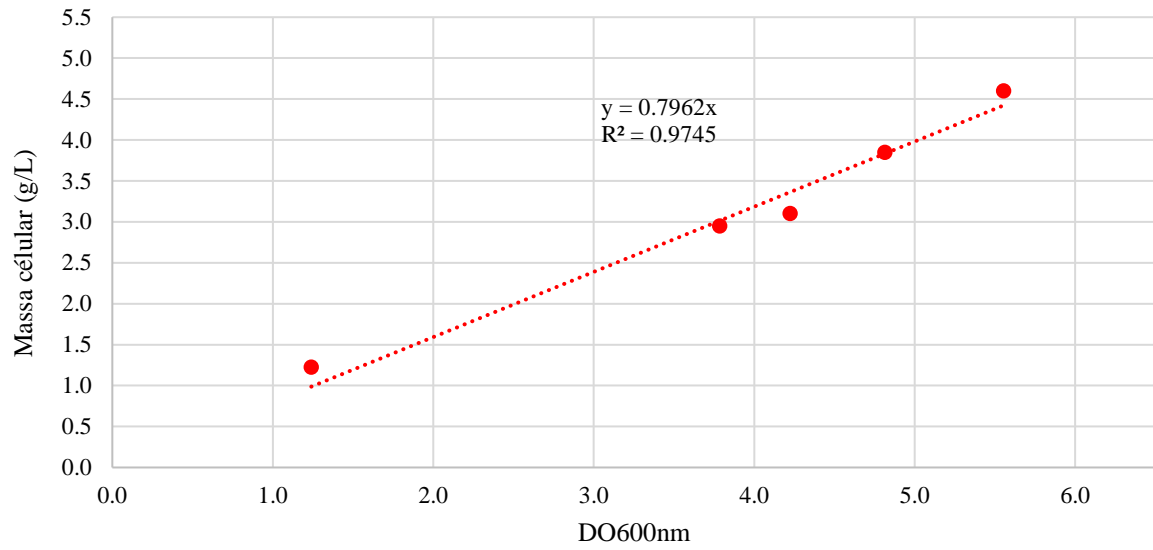
YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS JR, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1246–1251, 1996.

ZHANG, H. ZHENG, Y. LIU, Q.; TAO, X.; ZHENG, W.; MA, X.; WEI, D. Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin (T34A) in *Escherichia coli*. **Biochemical Engineering Journal**. v. 43, p. 163-168, 2009.

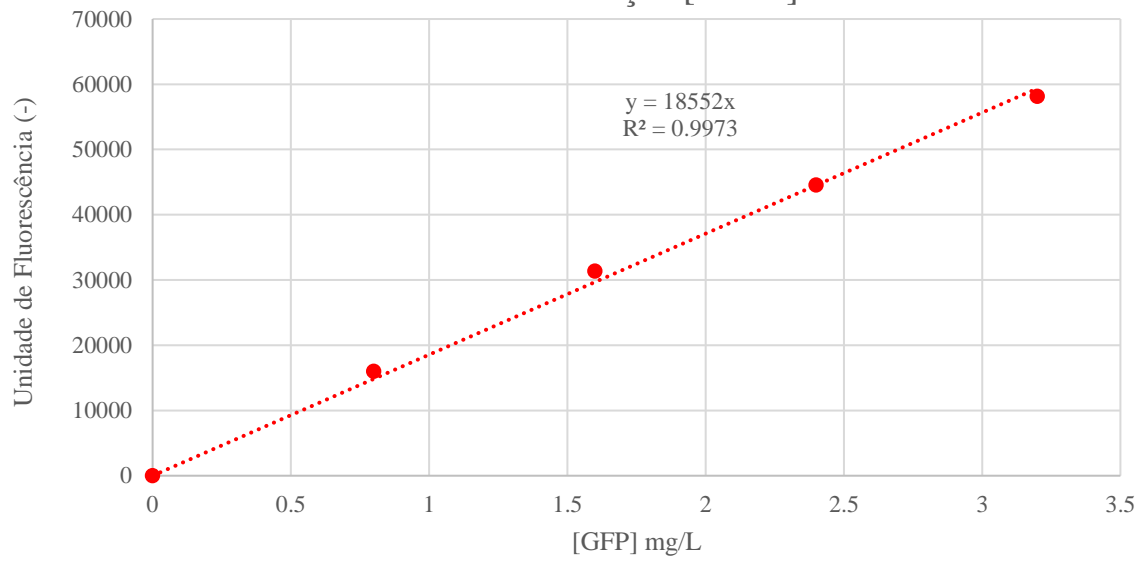
## APÉNDICE

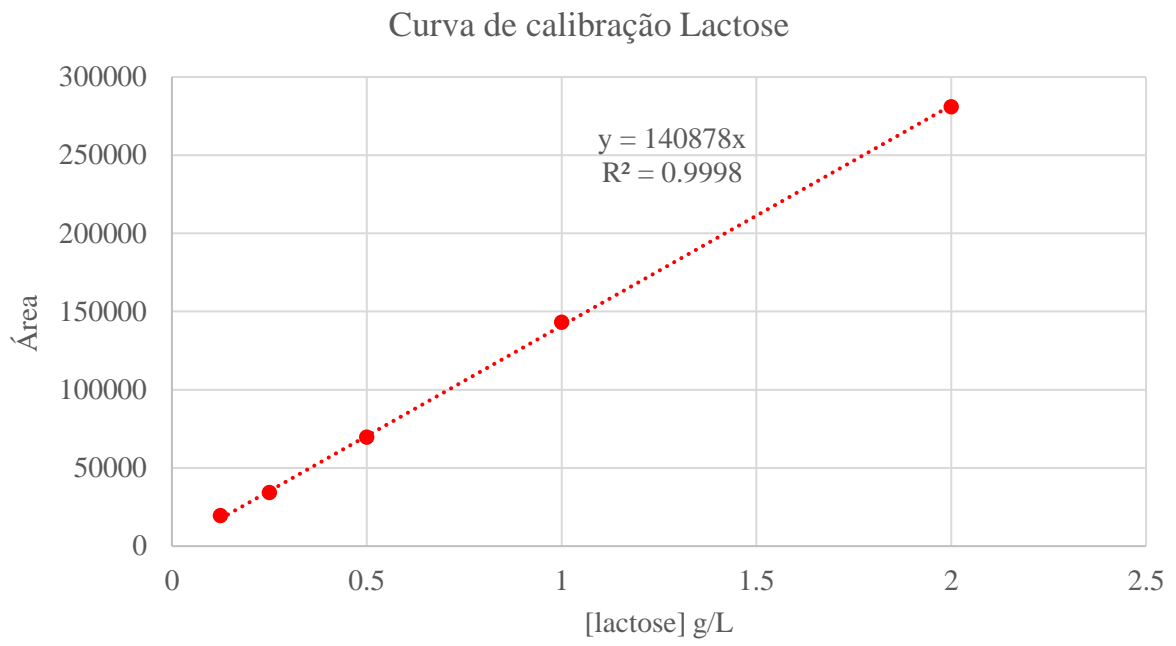


Curva de calibração Massa seca



Curva de calibração [EGFP]





Resultados coletados testando as quatro variáveis de interesse (X1, X2, X3 e X4), das duas respostas obtidas para tratamento estatístico dos dados (Y1 e Y2) crescimento celular e produção de proteína, respectivamente

Temperatura X1	Agitação X2	Preenchimento do frasco X3	[Lactose] X4	[biomassa] Y1	[GFP] (mg/L) Y2
-1	-1	-1	-1	2,30	328,18
-1	-1	-1	-1	2,12	443,78
1	-1	-1	-1	1,34	126,00
1	-1	-1	-1	1,64	224,97
-1	1	-1	-1	1,92	321,44
-1	1	-1	-1	2,00	388,81
1	1	-1	-1	1,38	157,42
1	1	-1	-1	1,96	190,98
-1	-1	1	-1	2,32	310,39
-1	-1	1	-1	2,20	443,52
1	-1	1	-1	2,04	153,23
1	-1	1	-1	2,39	280,05
-1	1	1	-1	2,55	464,38
-1	1	1	-1	2,38	459,08
1	1	1	-1	1,53	156,13
1	1	1	-1	2,53	148,08
-1	-1	-1	1	2,46	405,06
-1	-1	-1	1	2,48	528,83
1	-1	-1	1	2,12	108,98
1	-1	-1	1	1,95	281,65
-1	1	-1	1	2,52	346,82
-1	1	-1	1	2,36	519,34
1	1	-1	1	2,48	206,54
1	1	-1	1	2,81	219,17
-1	-1	1	1	2,57	443,88
-1	-1	1	1	2,40	506,89
1	-1	1	1	2,92	149,17
1	-1	1	1	2,91	248,40
-1	1	1	1	2,47	410,23
-1	1	1	1	2,50	542,56
1	1	1	1	2,20	155,92
1	1	1	1	2,78	191,74
0	0	0	0	2,67	361,12
0	0	0	0	2,42	319,67
0	0	0	0	2,65	325,93