

# RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/04/2021.



**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**

## 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.

## **EPÍGRAFE**

*“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<sub>La</sub>** – Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h<sup>-1</sup>)

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

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diferença estrutural da composição de parede bacteriana entre bactérias Gram negativas (a) e bactérias Gram positivas (b) \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2.** Esquema das regiões que compõem o operon lac \_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 3.** Esquema da metabolização da lactose pelo operon lac **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 4.** Esquema da metabolização da lactose quando na ausência de glicose no meio \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 5.** Representação da estrutura proteica da GFP e seu cromóforo **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 6.** Esquema da formação do grupamento cromóforo da proteína GFP \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7.** Mutações de GFP selvagem (a) e cromóforo da GFP selvagem (b). \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8.** Etapas de desenvolvimento de um novo bioprocesso para fabricação comercial envolvendo um produto derivado de DNA recombinante \_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 9.** Biorreator do tipo tanque agitado e aerado (a); impelidores tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (b) \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- 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. \_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- 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). \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- 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. \_\_\_\_\_ **Error! Bookmark not defined.**
- 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. **Error! Bookmark not defined.**
- 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. **Error! Bookmark not defined.**

**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. **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 16.** 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). **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 17.** Influência da temperatura na concentração de proteína produzida (A) e Diagrama de Pareto (B) apresentando a significância das variáveis estudadas. **Error! Bookmark not defined.**

**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. **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 19.** Concentração de EGFP (mg/L) dos experimentos realizados testando diferentes condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm), em função do tempo. **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 20.** Concentrações de biomassa entre os experimentos realizados testando diferentes condições de rotação (400, 800 e 1000 rpm) em função do tempo. **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 21.** Curva da concentração de EGFP em função da OTR - taxa de transferência de oxigênio (mmol/L/h). **Error! Bookmark not defined.**

**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. **Error! Bookmark not defined.**

**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. **Error! Bookmark not defined.**

**Figura 24.** Concentração de proteína em função do tempo do experimento utilizando oxigênio puro. **Error! Bookmark not defined.**



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Matriz experimental do Delineamento composto central, com as variáveis independentes temperatura, agitação, preenchimento do frasco e concentração lactose. **Error! Bookmark not defined.**

**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..... **Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 3.** Valores de  $t_{tab}$  para três níveis de significância usados em tratamento de dados estatísticos (90, 95 e 99%)..... **Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 4.** Condições testadas em mesa incubadora rotativa em 200 rpm à 25°C.....**Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 5.** Condições dos experimentos realizados em biorreator convencional no modo de operação batelada ..... **Error! Bookmark not defined.**

**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. .... **Error! Bookmark not defined.**

**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  $Y_1$  (concentração de biomassa). ...**Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 8.** Análise de variância referente a resposta concentração de biomassa ( $Y_1$ ) de acordo com o DCC. .... **Error! Bookmark not defined.**

**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  $Y_2$  (produção de proteína EGFP). **Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 10.** Análise de variância referente aos dados obtidos para a resposta  $Y_2$  (produção de EGFP) através do planejamento experimental DCC. .... **Error! Bookmark not defined.**

**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. .... **Error! Bookmark not defined.**

**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. .... **Error! Bookmark not defined.**

**Tabela 13.** Ensaio realizado em mesa incubadora rotativa referente a concentração de EGFP, biomassa e consumo de lactose das condições testadas. .... **Error! Bookmark not defined.**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.1 Escherichia coli</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.2 Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein - GFP)</b> Error! Bookmark not defined.	
<b>2.3 Biorreator e Bioprocessos</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>2.4 Planejamento experimental fatorial</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.1 Microrganismo</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.2 Meio de cultura</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.3 Cultura bacteriana estoque</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.4 Inóculo</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.5 Indutor</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.6 Metodologia Experimental</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.6.1 Cultivos em microplaca de 96 poços</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>4.6.2 Delineamento Central Composto (DCC) planejado através do software Protimiza Experimental Design</b> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

4.6.3	<i>Teste de suplementação do meio LB em mesa incubadora rotativa</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.6.4	<i>Cultivos realizados em biorreator convencional</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.6.5	<i>Experimento com oxigênio puro</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7	<i>Metodologia analítica</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7.1	<i>Análise de densidade óptica</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7.2	<i>Análise da concentração de proteína</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7.3	<i>Determinação da concentração de biomassa</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7.4	<i>Determinação da concentração de lactose</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.7.5	<i>Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (<math>k_{La}</math>)</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.8	<i>Determinação de parâmetros cinéticos</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.8.3	<i>Determinação da produção específica (<math>Y_p/x</math>) e produtividade (<math>Pr</math>)</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.8.4	<i>Determinação da taxa de transferência de oxigênio dissolvido (Oxygen Transfer Rate – OTR)</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.1	<i>Determinação da fonte de carbono e agente indutor</i> ...	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.2	<i>Delineamento composto central (DCC)</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.3	<i>Ensaio em biorreator convencional</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.4	<i>Teste de suplementação do meio LB</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
5.5	<i>Teste com oxigênio puro</i> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>17</b>
	<b>APÊNDICE</b> .....	<i>Error! Bookmark not defined.</i>



## 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 consequentemente 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)

## 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 bio sorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como bio sorvente. **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.