

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

WERNER DAMIÃO MORHY TERRAZAS

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
E GLICEROL QUINASE PELA LEVEDURA RECOMBINANTE**

Pichia pastoris

Orientador: Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás

ARARAQUARA – SP
2012

WERNER DAMIÃO MORHY TERRAZAS

**FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
E GLICEROL QUINASE PELA LEVEDURA RECOMBINANTE**

Pichia pastoris

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Alimentos e Nutrição.

Área de Conhecimento: Ciência dos Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás

ARARAQUARA – SP
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Terrazas, Werner Damião Morhy
T324f Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela
levedura recombinante *Pichia pastoris* / Werner Damião Morhy Terrazas. –
Araraquara, 2012
128 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação
em Alimentos e Nutrição

Orientador: Edwil Aparecida de Lucca Gattás

1. *Pichia pastoris*. 2. Glicerol quinase. 3. Biomassa. 4. Plackett-Burman.
5. Superfície de Resposta. I. Gattás, Edwil Aparecida de Lucca, orient. II.
Título.

CAPES: 50700006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. EDWIL APARECIDA DE LUCCA GATTÁS – Orientadora

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO – Membro

Profa. Dra. MARISTELA DE FREITAS SANCHES PERES – Membro

Prof. Dr. RUBENS MONTE – Membro

Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

*No que tange à sua felicidade, às coisas que lhes
trarão orgulho ou desgosto, nada, repito, nada
exercerá efeito tão profundo sobre vocês quanto o
que seus filhos vierem a tornar-se.*

Gordon B. Hinckley

Dedico todo o esforço na execução deste trabalho à minha mãe Jeny Morhy (in memoriam) pela educação e formação moral que me concedeu, e a minha sogra Ivone Barros (in memoriam) pela grande ajuda e por sempre ter me tratado como um de seus filhos. Essas mulheres de minha vida sempre acreditaram no meu potencial do que vim a tornar-me como cidadão e pai de família.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso grande e poderoso Deus, pelo dom da vida, pela saúde e forças com que me abençoou, pelo auxílio espiritual naqueles desafios da vida que pareciam sem solução, em todas as tentativas que pareceram tempo perdido, e com os quais cresci em todos os sentidos... só o Senhor com sua onisciência sabe o caminho para me fazer crescer e aprender cada vez mais.

A família que Deus me deu: minha amada esposa Letícia, companheira, conselheira e amiga, que sempre acreditou no meu potencial e está me sustentando em todos os momentos. Aos nossos filhos: Samyra, Sara Ivone e Werner Filho, as razões de nossas vidas. Aos meus genros Sauro e Eder e ao nosso netinho Ivan, que com sua inocência enche nossas vidas com o amor que veio do céu.

Ao tio Lauro Morhy, professor aposentado da Universidade de Brasília, um docente que dedicou sua vida na formação de pesquisadores.

A Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás, pela orientação me conduzindo nesse mundo novo da Biotecnologia, uma das áreas da ciência em expansão e de grandes perspectivas no estudo da biodiversidade.

Aos professores Prof. Dr. Rubens Monti, Profa. Dra. Maristela de Freitas Sanches Peres, pela participação nas Bancas Examinadoras do Exame Geral de Qualificação e Defesa de Tese de Doutorado, que com suas experiências fizeram valiosas contribuições nas sugestões para continuação deste trabalho.

As professoras Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e Profa. Dra. Eleonora Cano Carmona pela participação na Banca Examinadora de Defesa de Tese de Doutorado por suas sugestões nas correções e redação final deste trabalho.

Aos amigos e contemporâneos no Laboratório de Biotecnologia em Alimentos Viviane Cristina Silva, Raquel Aizemberg e Flavia Daniele, pela convivência, apoio mútuo, amizade e companheirismo.

A Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP pelo auxílio na definição do Delineamento Experimental durante a elaboração do Projeto de Tese e por ter me aceito como Aluno Especial na sua Disciplina Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos. Os conhecimentos adquiridos foram fundamentais para vencer um importante gargalo desta pesquisa, e me tornar um entusiasta e multiplicador das técnicas de Planejamento de Experimentos.

A Prof^a Dr^a Suzana Ferreira-Dias da Universidade Técnica de Lisboa por sua contribuição na Análise Estatística dos dados experimentais e participação na preparação de pôster para apresentação em Congresso Científico Internacional e artigo científico para publicação.

Aos funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, obrigado por toda atenção e boa vontade.

Aos professores do Departamento de Alimentos e Nutrição pelos conhecimentos transmitidos e terem assim contribuído com minha formação.

Aos alunos do Programa Alimentos e Nutrição pela convivência acadêmica.

A Universidade do Estado do Pará – UEPA, pelo apoio indispensável com o investimento na minha qualificação docente, concedendo licença de afastamento integral e Bolsa de Estudos do Governo do Estado do Pará.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, obrigado pelas orientações sempre dadas de forma tão gentil.

Aos funcionários da Biblioteca da FCFar, pela amizade, atendimento eficiente de solicitações de bibliografias por empréstimo em outras bibliotecas da UNESP.

RESUMO

No presente trabalho, inicialmente foi feito um estudo da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) que tem sido adotada com muita frequência na otimização com várias aplicações na biotecnologia. Foi feita uma revisão na literatura científica dos conhecimentos existente, onde se priorizou as bases teóricas da RSM que consiste em: trabalho preliminar, onde são determinados as variáveis independentes e seus níveis; seleção do projeto experimental com a previsão e verificação da validade da equação do modelo e, representação gráfica da equação do modelo e determinação das condições ótimas de operação. Em seguida a RSM foi aplicada na otimização de biomassa pela levedura recombinante *Pichia pastoris*. *Pichia pastoris* que é uma levedura metilotrófica, geneticamente manipulada para expressar proteínas heterólogas que são de grande valor biotecnológico na pesquisa básica e em usos industriais na produção de grande variedade de proteínas heterólogas. Glicerol quinase (GK; EC 2.7.1.30) é uma enzima chave no metabolismo do glicerol e catalisa glicerol para glicerol-3-fosfato na biossíntese de fosfolípidos. Nessa etapa foi conduzido um estudo para determinar um meio otimizado para a produção de biomassa máxima pela recombinante *Pichia pastoris* com cultivo em frascos agitados usando 2,31% (p/v) de glicerol como fonte de carbono. A otimização foi realizada por metodologia de superfície de resposta (RSM). Em experimentos preliminares, realizados seguindo um planejamento Plackett-Burman, o conteúdo de glicerol (Gli) e tempo de crescimento (t) foram selecionados como os fatores mais importantes na produção de biomassa. Assim, os ensaios subsequentes foram realizados para a otimização da produção de biomassa, seguindo um delineamento composto central rotacionado (DCCR) em função do glicerol e do tempo. O glicerol mostrou exercer um significativo efeito linear positivo sobre a produção de biomassa. Além disso, o tempo mostrou ser um fator significativo positivo (linear e quadrático) sobre a produção de biomassa. Pontos experimentais de dados podem ser bem ajustados a uma superfície convexa descrito por um modelo polinomial de segunda ordem, como uma função de ambos os fatores ($R^2 = 0,94633$). A composição do meio otimizado para a produção de enzima foi de: 1% de extrato de levedura, 1% de peptona, 100 mmol.L^{-1} de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1,34% de YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ de biotina, 1% de metanol e 1% de glicerol. O modelo matemático obtido no DCCR, com $R^2 = 0,94633$ e $QM_{\text{Erro Puro}} = 0,19866$ foi: Biomassa = $-0,989 - 0,365 \cdot \text{Gli} + 0,167 \cdot t - 0,001 \cdot t^2 + 0,032 \cdot \text{Gli} \cdot t$. Na fase final dessa pesquisa foi feito um estudo dos parâmetros do meio de cultivo para produção da enzima glicerol quinase, onde são apresentados os resultados da seleção dos clones GK1, GK2, GK3 e GK4, tendo sido selecionado o clone GK4 por ter apresentado os seguintes resultados: proteína bruta $16,993 \text{ mg.mL}^{-1}$ e atividade enzimática de $0,63672 \text{ U.mL}^{-1}$, os melhores entre os quatro clones. O tempo de crescimento e indução em meio de cultivo BMMY foi de 48 horas. As melhores condições de concentração do meio foram: 1 % de extrato de levedura, 2% de peptona, $0,100 \text{ mg.mL}^{-1}$ de cultura do inóculo inicial, 100 mmol.L^{-1} de tampão fosfato de potássio em pH 6,0,

1,34% de YNB, 0,100% de metanol na fase de indução e 4×10^{-5} % de biotina. A atividade nessas condições foi de $0,796 \pm 0,28 \text{ U.mL}^{-1}$.

Palavras chaves: *Pichia pastoris*, Glicerol quinase, Biomassa, Plackett-Burman, Metodologia Superfície Resposta.

ABSTRACT

In this study, was initially used to study the response surface methodology (RSM) has been adopted frequently in optimization with many applications in biotechnology. A review of scientific literature on existing knowledge, which prioritized the theoretical foundations of RSM consisting of: preliminary work, where they are certain independent variables and their levels; project selection with the prediction and experimental verification of the validity of equation model and graphical representation of the model equation and determination of optimal operating conditions. RSM was then applied to the optimization of biomass by recombinant yeast *Pichia pastoris* in GK4 clone obtained from a previous selection of four clones from a cloning process of genetically modified yeast. *Pichia pastoris* is a methylotrophic yeast that has been genetically engineered to express heterologous proteins that are prized for basic research and industrial biotechnology purposes in the production of wide variety of heterologous proteins. Glycerol kinase (GK; EC 2.7.1.30) is a key enzyme in glycerol metabolism and catalyzes glycerol to glycerol-3-phosphate in the biosynthesis of phospholipids. The present study was undertaken to determine an optimized medium for the maximal biomass production of recombinant *Pichia pastoris* in shaker cultures using 2.31% (w/v) glycerol as the carbon source. Optimization was carried out by response surface methodology (RSM). In preliminary experiments, performed following a Plackett-Burman design, glycerol content (Gly) and growth time (t) were selected as the most important factors on biomass production. Therefore, subsequent experiments were carried out for optimization biomass production, following a central composite rotatable design as a function of Gly and time. Gly showed to have a significant positive linear effect on biomass production. Also, time showed to be a significant factor (at linear positive and quadratic levels) on biomass production. Experimental data points can be well fitted to a convex surface described by a second order polynomial model, as a function of both factors ($R^2 = 0.946$). The optimized medium composition for enzyme production was: 1% yeast extract, 1% peptone, 100 mmol.L⁻¹ potassium phosphate buffer pH 6.0, 1.34% YNB, 4 × 10⁻⁵% biotin, 1% methanol and 1% glycerol reaching 0.89 U.mL⁻¹ of glycerol kinase activity and 14.55 g.L⁻¹ total protein. The mathematical model obtained the CCRD, with $R^2 = 0.94633$ and MS Error Pure = 0.9886 was: Biomass = - 0.989 - 0.365Gly + 0.167t - 0.001t² + 0.032(Gly*t). In the last phase of this research was done a study of the parameters of the medium for production of the enzyme glycerol kinase. The time of induction and growth in culture medium BMMY was 48 hours. The best conditions were averaged concentration of the medium: 1% yeast extract, 2% peptone, 0.100 mg.mL⁻¹ of culture initial inoculum, 100 mmol.L⁻¹ potassium phosphate buffer pH 6.0, 1.34% YNB, 0.100% of methanol in the induction phase and 5% of 4x10⁻⁵ biotin. The activity under these conditions was 0.796 ± 0.28 U.mL⁻¹.

Keywords: *Pichia pastoris*, Glycerol kinase, Biomass, Plackett-Burman, Response Surface Methodology

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Valores utilizados no Delineamento Plackett & Burman (PB) PB12....	63
Tabela 2 – Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas	63
Tabela 3 – Valores utilizados no DCCR para produção de biomassa.	65
Tabela 4 – Matriz de dados codificados e originais do delineamento composto central rotacionado (DCCR), em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de <i>Pichia pastoris</i>	65
Tabela 5 – Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas	67
Tabela 6 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produção de biomassa (mg.mL ⁻¹) (sem checar a curvatura).	68
Tabela 7 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produção de biomassa (mg.mL ⁻¹) (checando a curvatura).	68
Tabela 8 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produtividade da biomassa (mg.mL ⁻¹).h. (sem checar a curvatura).	69
Tabela 9 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produtividade da biomassa (mg.mL ⁻¹).h (checando a curvatura).	70
Tabela 10 – Matriz de dados codificados do delineamento composto central rotacionado (DCCR), em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de <i>Pichia pastoris</i> e respectivos resultados experimentais de produção de biomassa (mg.mL ⁻¹).	71
Tabela 11 – Efeitos dos fatores considerados no DCCR em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de <i>Pichia pastoris</i> para a produção de biomassa (mg.mL ⁻¹).	72
Tabela 12 – Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (modelo completo).	72
Tabela 13 – Análise de Variância para a resposta produção de biomassa (modelo completo).	73

Tabela 14 – Efeitos dos fatores considerados no DCCR em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de <i>Pichia pastoris</i> para a produção de biomassa (mg.mL ⁻¹) (modelo selecionado)	73
Tabela 15 – Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)	73
Tabela 16 – Análise de Variância para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)	74
Tabela 17 – Teste para falta de ajuste e para a regressão linear para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)	74

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Atividade da glicerol quinase excretada extracelularmente pelos clones	107
Tabela 2 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de extrato de levedura....	109
Tabela 3 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de peptona.	109
Tabela 4 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de inóculo inicial.....	110
Tabela 5 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio.....	110
Tabela 6 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de YNB.....	111
Tabela 7 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de metanol.	111
Tabela 8 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de biotina.....	111

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Estratégia Experimental realizada	62
Figura 2 – Superfície de resposta da produção de biomassa a 30°C, em função do conteúdo de glicerol (% v/v) e tempo de crescimento (h).....	75
Figura 3 – Curva de contorno da produção de biomassa a 30°C, em função do conteúdo de glicerol (% v/v) e tempo de crescimento (h).....	76
Figura 4 – Valores observados experimentalmente da produção de biomassa e valores preditos pelo modelo.....	77

CAPÍTULO 3

Figura 1 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK1	105
Figura 2 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK2	106
Figura 3 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK3	106
Figura 4 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK4	107
Figura 5 – Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de <i>Pichia pastoris</i> em meio BMMY.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ε : Coeficiente de Absortividade molar

λ : Comprimento de onda (nm)

ε_i : Erro estatístico; Erro residual

AOX: Álcool oxidase

ATP: Adenosina 5'-trifosfato sal sódico

BMGY: Buffered complex médium containing glycerol (meio tamponado contendo glicerol)

BMMY: Buffered complex médium containing methanol (meio tamponado contendo metanol)

BSA: Albumina soro bovino

$C_3H_5(OH)_3$: glicerina (glicerol)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$: Cloreto de cálcio dihidratado

Cp: Conteúdo protéico

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$: Sulfato de cobre

Da: Dalton

DCCR: Delineamento composto central rotacionado

FSS: Fermentação e Sacarificação Simultânea

GK: glicerol quinase

GPDH: glicerol-fosfato-desidrogenase

K_2HPO_4 : Fosfato de potássio bibásico anidro

KH_2PO_4 : Fosfato de potássio monobásico anidro

K_m : Constante de Michaelis

M: Molaridade (mol/L)

$Mg(SO_4) \cdot 2H_2O$: Sulfato de magnésio dihidratado

mM: mili-molar

$N_2H_4 \cdot H_2O$: hidrazina hidrato

$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$: Citrato de sódio

NAD: β – Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NaF: fluoreto de sódio

PB: Delineamento Plackett-Burman

QM: Quadrado Médio

RMS: Metodologia de Superfície de Resposta (Response Methology Surface)

YNB: Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

CAPÍTULO 1 18

A Metodologia de Superfície de Resposta e seu uso na Biotecnologia

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO 21

2. REVISÃO DE LITERATURA 22

2.1. Experimentos Fatoriais 22

2.2. Planejamento Plackett-Burman 22

2.3. Otimização e Metodologia de Superfície de Resposta 26

2.3.1. Bases Teóricas da Metodologia de Superfície de Resposta 28

2.3.2. Vantagens e desvantagens da RSM 35

2.4. Revisão de estudos publicados 37

CAPÍTULO 2.....	49
Otimização das Condições do Meio de Cultivo para a Produção de Biomassa usando a Levedura de <i>Pichia pastoris</i>	

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	52
1.1. A Levedura <i>Pichia pastoris</i>	53
1.2. Proteína recombinante de <i>Pichia pastoris</i>	55
1.3. Objetivos....	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	61
2.1. Crescimento celular (Biomassa).....	61
2.2. Planejamento Experimental.....	61
2.2.1. Triagem dos fatores que afetam a produção de biomassa.....	62
2.2.2. Modelagem e otimização da produção de biomassa	64
2.2.3. Análise Estatística	66
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Triagem dos fatores que afetam a produção de biomassa.....	67
3.1.1. Produção de biomassa.....	68
3.1.2. Produtividade de biomassa	69
3.1.3. Modelagem e otimização da produção.....	70
4. CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

CAPÍTULO 3.....	87
Estudo de parâmetros do meio de cultivo para a produção de glicerol quinase usando a levedura de <i>Pichia pastoris</i>	

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	90
2. REVISÃO DE LITERATURA	92
2.1. Propriedades da enzima glicerol quinase	92
2.2. <i>Pichia pastoris</i> como um sistema de expressão	94
2.3. A produção de proteína heteróloga de <i>Pichia pastoris</i>	95
2.4. Objetivos... ..	97
3. MATERIAIS E MÉTODOS	98
3.1..Micro-organismo.....	98
3.2. Viabilidade Celular.....	98
3.3. Curva de Crescimento	99
3.4. Concentração de Inóculo.....	99
3.5. Condições para crescimento celular e indução da produção de glicerol quinase.....	100
3.6. Obtenção do Extrato Enzimático	101
3.7. Concentração do Extrato Enzimático	101
3.8. Determinação da proteína total do extrato celular de levedura	102
3.9. Ensaio de atividade de Glicerol quinase (GK)	103
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
4.1. Seleção de clones	105
4.2. Curva de crescimento.....	108
4.3. Condições do meio de cultivo.....	108
4.3.1. Concentração de extrato de levedura	109
4.3.2. Concentração de peptona	109
4.3.3. Concentração do inóculo inicial.....	109

4.3.4. Concentração de tampão fosfato de potássio	110
4.3.5. Concentração de YNB.....	110
4.3.6. Concentração do metanol na fase de indução	111
4.3.7. Concentração de Biotina	111
5. CONCLUSÃO	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

ANEXOS

Anexos Técnicos

1. Meios de cultura	122
1.1. YPDA.....	122
1.2. BMGY.....	123
1.3. BMMY.....	124
2. Solução de Ringer.....	125
3. Soluções estoques para o ensaio de atividade da enzima glicérol quinase.....	126
4. Soluções para determinação de proteína total.....	127

CAPÍTULO 1

A Metodologia de Superfície de Resposta e seu uso na Biotecnologia

RESUMO

A metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é uma técnica que tem sido adotada cada vez com mais frequência na otimização com várias aplicações na biotecnologia. Neste trabalho foi feita uma revisão na literatura científica dos conhecimentos existentes, iniciando com os experimentos fatoriais e planejamento Plackett-Burman na seleção de variáveis. Em seguida foi feita uma apresentação das bases teóricas da RSM que consiste em: trabalho preliminar, onde são determinados as variáveis independentes e seus níveis; seleção do projeto experimental com a previsão e verificação da validade da equação do modelo e, representação gráfica da equação do modelo e determinação das condições ótimas de operação. São apresentadas também as vantagens e desvantagens da RSM e analisados estudos publicados utilizando a RSM.

Palavras-chave: Planejamento Plackett-Burman, experimentos fatoriais, Metodologia Superfície Resposta.

ABSTRACT

The Response Surface Methodology (RSM) is a technique that has been adopted with increasing frequency in the optimization with many applications in biotechnology. This work was done in a scientific literature review of existing knowledge, starting with the factorial experiments Plackett-Burman design and the selection of variables. Then a presentation was made of the theoretical foundations of RSM consisting of: preliminary work, where they are certain independent variables and their levels; project selection with the prediction and experimental verification of the validity of the model equation, and graphical representation of the equation model and determine the optimal conditions of operation. Also presented are the advantages and disadvantages of RSM and analyzed published studies using the RSM.

Keywords: response surface methodology, Plackett-Burman design, factorial experiments.

1. INTRODUÇÃO

A Metodologia de Superfície de Resposta (ou RSM, de *Response Surface Methodology*) foi proposta por Box na década de 1950, baseada em planejamentos fatoriais, mas somente a partir dos anos 1990 tem sido mais intensamente utilizada, devido a crescente necessidade de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade e qualidade dos produtos, dentre outros objetivos, levando profissionais de diferentes formações a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (BARROS NETO et al., 2007; RODRIGUES & IEMMA, 2009).

RSM é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos em que uma resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis. O objetivo é otimizar essa resposta, sendo importante na aplicação, concepção, desenvolvimento e formação de novos produtos, bem como na melhoria do design de produtos existentes. Ela define o efeito de cada variável independente sozinha ou em combinação, sobre os processos. Além de analisar os efeitos das variáveis independentes, essa metodologia experimental gera um modelo matemático que descreve os processos (ANJUM et al., 1997; MYERS; MONTEGOMERY, 2009).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Experimentos Fatoriais

Experimentos fatoriais são aqueles que envolvem combinações entre dois ou mais fatores, onde cada combinação é um tratamento. Um esquema fatorial completo é denotado por N^k , onde k é o número de fatores em estudo e N é o número de níveis de cada fator. (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009; BARROS NETO et al., 2007). Ainda, segundo esses autores, à medida que se aumenta o número de fatores no esquema fatorial completo, o número de ensaios cresce exponencialmente, praticamente inviabilizando a sua utilização para 6 ou mais fatores com 2 níveis ($2^6=64$ ensaios) e para 4 ou mais fatores com 3 níveis ($3^4=81$ ensaios). Segundo Rodrigues e Iemma (2009) um atenuante para o problema do rápido crescimento do número de ensaios em fatoriais completos é selecionar *Screening Designs* através de delineamentos prévios com base em frações fatoriais (fatoriais fracionados e planejamento Plackett-Burman), dos fatores e/ou níveis, que realmente levam a respostas experimentais ótimas.

2.2. Planejamento Plackett-Burman

Os planejamentos Plackett-Burman (PB) fazem parte de uma classe de planejamentos fatoriais fracionados, estando disponíveis matrizes para qualquer n

múltiplos de 4 fatores ($n=12, 16, 20, 24, 36, \dots$ ensaios). Esses delineamentos foram propostos pelos cientistas Robin Plackett e Peter Burman, onde todas as colunas são mutuamente ortogonais. Cada coluna contém o mesmo número de sinais positivos e negativos. Os planejamentos são úteis na seleção de fatores (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005). Segundo Barros Neto et al. (2007), a ortogonalidade das colunas proporciona uma simetria que permite que os efeitos principais de cada fator sejam determinados individualmente (estimativas independentes, pois apresentam covariância nula e variância mínima), admitindo-se que os efeitos de interações sejam desprezíveis e, portanto, perfeitamente dispensáveis o cálculo dessas interações sem comprometer a qualidade dos resultados.

O delineamento experimental Plackett-Burman assume que não há interações entre os diferentes componentes de média na série de variáveis, x_i , em análise. Uma abordagem linear é considerada suficiente para triagem.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i \quad (i = 1, \dots, k)$$

Onde Y é a função alvo estimada e β_i são os coeficientes de regressão. O planejamento experimental Plackett-Burman é uma concepção fatorial fracionária e o efeito principal (o coeficiente de contraste) de uma tal concepção pode ser simplesmente calculado como a diferença entre a média das medições feitas no nível alto (1) do fator e a média de medições no nível baixo (-1).

A metodologia de *Screening Design* é uma ferramenta muito útil para a avaliação prévia das variáveis de um processo, como uma estratégia seqüencial para se checar a otimização do processo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os mesmos autores recomendam, que na otimização de um processo, é mais interessante começar com um fatorial fracionado ou PB, analisar os efeitos principais das variáveis e realizar outro experimento, seqüencialmente, reduzindo o número de variáveis e alterando as faixas de estudo em função do impacto que elas tiveram sobre as respostas.

Para a maioria dos processos multivariáveis, em que numerosos fatores potencialmente influentes estão envolvidos, é sempre óbvio determinar quais são os mais importantes. Por isso, é necessário submeter o processo para uma concepção de rastreio ou triagem inicial, antes da otimização. A metodologia proposta por Plackett e Burman (PLACKETT; BURMAN, 1946) é uma ferramenta para esta triagem inicial, com apenas um pequeno número de ensaios, tornando possível determinar a influência de vários fatores, e evitando o uso de um extenso esquema fatorial com informação mais completa, mas que envolve uma complexidade inviável de tempo e custo. Se, por exemplo, existem dez variáveis em dois níveis (2^{10}) a situação implica em 1024 ensaios. Se, no entanto, o processo é submetido à triagem inicial, a concepção fatorial completa e análise superfície de resposta pode ser limitada às variáveis mais críticas para a determinação das suas faixas ótimas de operação. O planejamento fatorial de um conjunto limitado de variáveis é vantajoso em relação ao método convencional de estudo de um único parâmetro por ensaio, pois, com tal abordagem, não é possível verificar e quantificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de

interesse. Havendo com frequência falhas em localizar as condições ótimas, devido à sua incapacidade de considerar o efeito de possíveis interações entre os fatores, além disso, o planejamento fatorial torna possível tirar proveito do conhecimento prático sobre o processo durante a análise final da superfície de resposta.

Uma desvantagem dos planejamentos Plackett-Burman é que as relações entre os contrastes calculados e os efeitos de um fatorial completo são bastante complexas, pois requer conhecimentos de Álgebra e Estatística-Matemática, tais como, corpos de Galois, matrizes de Hadamard e funções de Legrange segundo o enfoque Plackett-Burman. Isto torna mais difícil escolher ensaios adicionais necessários para desconfundir os efeitos (BARROS NETO et al., 2007).

Rodrigues e Iemma (2009) fazem duas recomendações que consideram relevantes. A primeira é escolher um delineamento PB com no mínimo quatro ensaios a mais que o número de fatores ($n-4$). Desta maneira os três graus de liberdade restantes podem ser usados para estimar os valores calculados para os efeitos principais. A segunda recomendação é a realização de pelo menos três repetições na condição do ponto central, sendo isso imprescindível. Devido a ausência de repetições dos ensaios, para que haja graus de liberdade no cálculo do Erro Padrão, sendo possível assim estimar o erro puro permitindo avaliar a repetibilidade do processo, e verificar a existência de curvatura quando os valores das respostas forem aproximadamente iguais.

2.3. Otimização e Metodologia de Superfície de Resposta

A otimização das condições de fermentação, particularmente físicas e parâmetros químicos são de primordial importância no desenvolvimento de qualquer processo de fermentação, devido ao seu impacto sobre a economia e a praticabilidade do processo. A diversidade de interações combinatórias dos componentes do meio com o metabolismo das células, bem como o grande número de constituintes do meio de cultura, necessárias para o crescimento celular e produção não permitem modelagem detalhada satisfatória. A busca unidimensional com variação sucessiva das variáveis é ainda utilizada, mesmo sendo bem aceito é praticamente impossível a busca unidimensional para alcançar um ótimo apropriado num número finito de experiências. Os métodos de otimização de variáveis unidimensional não são apenas entediantes, mas também pode levar a má interpretação dos resultados, especialmente porque a interação entre diversos fatores é negligenciado.

A Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) é um método comumente usado para encontrar as condições ideais, e também uma técnica eficiente para a otimização estatística de múltiplas variáveis com número mínimo de experimentos. (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005)

A otimização através de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta é uma prática comum na área de biotecnologia. Vários pesquisadores aplicaram esta técnica, especialmente para a otimização das condições de cultivo Chen (1996), Cordenunsi et al. (1985), Rao et al. (1993), Vohra e Satyanarayana

(2002), Rodrigues et al (2006), Iyer et al. (2010) e YIN et al. (2010), na determinação de valores ótimos para os parâmetros de processamento, tais como pH, temperatura e aeração, Harris e Cuppett (1990), Rahman e Jahim (2010), taxa de alimentação Bazaraa e Hassan (1996) e agitação Manana et al. (2007) entre outros. No entanto, na fermentação alcoólica, praticamente não há informação disponível sobre o uso desta técnica para estabelecer *designs* de otimização, especialmente numa escala industrial e, quando acompanhada pela utilização de modelagem e simulação para a determinação das respostas ótimas. Algumas aplicações em fermentação alcoólica têm sido apresentados por Bowman e Geiger (1984), com *Saccharomyces cerevisiae* ATTC 4126 cultivadas em amido parcialmente sacarificado. Análises dos níveis de hidratos de carbono, grau de sacarificação inicial, dosagem de glicoamilase, temperatura e tempo de fermentação foram investigados, utilizando o delineamento experimental para se obter rendimento ótimo.

Marchetti e Guerzoni (1991) utilizaram o método de análise de superfície de resposta para avaliar os efeitos de certos minerais sobre o desempenho de leveduras em fermentação. Cordenusi et al. (1985) trabalhou com fermentação em batelada, utilizando *S. cerevisiae*, para se obter um modelo matemático em função da quantidade inicial de açúcares redutores, da concentração de inóculo de levedura e do suplemento de nitrogênio inorgânico, tal como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Chen (1981) obteve resultados de otimização da ordem de 90-95% na produtividade de etanol. Isto foi possível quando se analisou a concentração de substrato, a concentração de levedura e a suplementação de nutrientes em um processo de fermentação realizado a partir de xarope de glicose como substrato.

Alguns estudos têm investigado maneiras de manter altos rendimentos e produtividade em processos (RODRIGUES et al. 1993, 1994, 1997), e Honorato da Silva et al. (1999). A chave para um projeto bem sucedido, num processo industrial adequado é uma profunda compreensão da dinâmica do sistema. Um modelo matemático baseado em balanços de massa e equações cinéticas fundamentais, utilizando parâmetros experimentais, têm sido desenvolvidos e utilizados para investigar a influência das variáveis operando sobre o rendimento e produtividade (BATISTA et al., 1998; RODRIGUES et al., 1992).

2.3.1. Bases Teóricas da Metodologia de Superfície de Resposta

Giesbrecht e Gumpertz (2004) afirmam que as técnicas de Metodologia de Superfície de Resposta são apropriadas quando as variáveis quantitativas independentes são controláveis onde o interesse é uma variável resposta é de alguma forma relacionada com as variáveis independentes. A relação verdadeira é desconhecida. Muitas vezes, o objetivo é tanto para encontrar conjuntos de condições que maximizam a produtividade, minimizam a proporção de defeitos, ou alguma combinação das duas. Projetos de superfície de resposta também são apropriados quando o interesse está centrado mais na análise da relação entre insumos variáveis que produzem resultados aceitáveis.

Para Meyers e Montgomery (2009), a RSM consiste de um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas que podem ser usados para definir as relações entre a resposta e as variáveis independentes. A RSM define o efeito das variáveis independentes, individualmente ou em combinação, sobre os processos.

Além da análise dos efeitos das variáveis independentes, esta metodologia experimental também gera um modelo matemático. A perspectiva gráfica do modelo matemático levou ao termo metodologia de superfície resposta (RSM).

A relação entre a resposta e a entrada é dada na Eq.. (1):

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_n) + \varepsilon_i \quad (1)$$

onde η é a resposta, f é a função desconhecida da resposta, $x_1, x_2, \dots, x_n$ que denota as variáveis independentes, também chamadas de variáveis originais, n é o número de variáveis independentes e, finalmente, ε_i é o erro estatístico que representa outras fontes de variabilidade não contabilizadas por f . Estas fontes incluem os efeitos, tais como o erro de medição. Supõe-se geralmente que ε tem uma distribuição normal padrão com média zero e variância 1.

É possível separar um estudo de otimização usando RSM em três fases. A primeira fase é o trabalho preliminar em que a determinação dos parâmetros independentes e os seus níveis são realizados. A segunda etapa é a seleção do projeto experimental, para a previsão e verificação da equação do modelo. A última é a obtenção da trama de superfície de resposta e curva de contorno da resposta, como uma função dos parâmetros independentes e determinação de pontos ótimos. Detalhes sobre cada estágio são dados a seguir:

2.3.1.1. O trabalho preliminar: a determinação de variáveis independentes e seus níveis

Os processos biotecnológicos são afetados por vários parâmetros. Por não ser possível identificar os efeitos de todos os parâmetros, é necessário selecionar os parâmetros que têm efeitos importantes. Experiências de rastreio ou triagem são úteis para identificar os parâmetros independentes. Fatoriais podem ser utilizados para esta finalidade. Após a identificação dos parâmetros importantes, a direção na qual se encontram as melhores condições é determinada e os níveis dos parâmetros são identificados. A Determinação destes níveis é importante porque o sucesso do processo de otimização refere-se diretamente a esses níveis.

As unidades das variáveis independentes diferem uma da outra. Mesmo se alguns dos parâmetros têm as mesmas unidades, nem todos estes parâmetros serão testadas com o mesmo intervalo. Uma vez que os parâmetros têm unidades diferentes e/ou intervalos no domínio experimental, a análise de regressão não deverá ser executada. Em vez disso, deve-se primeiro normalizar os parâmetros antes de executar uma análise de regressão. Cada uma das variáveis codificados é forçada a variar de -1 a 1, de modo que todos eles afetem a resposta mais uniformemente, e assim as unidades dos parâmetros são irrelevantes. A Equação comumente utilizada para a codificação é visto abaixo:

$$c_i = \frac{x_i - x_0}{\delta} \quad (2)$$

onde x_i é a variável original, c_i é a variável codificada, x_0 é a média da variável original ou na condição do ponto central e δ é o intervalo entre os valores da variável original.

2.3.1.2. Seleção do projeto experimental, previsão e verificação da equação do modelo

Alguns pacotes computacionais oferecem ótimos projetos com base nos critérios especiais e de entrada do usuário. Estes desenhos diferem um do outro no que diz respeito à sua seleção de pontos experimentais, o número de tiragens e blocos.

Após a seleção do projeto, a equação do modelo é definida e coeficientes da equação do modelo são previstos. O modelo utilizado na RSM é geralmente uma equação quadrática completa ou a forma reduzida desta equação.

O modelo de segunda ordem pode ser descrito como segue:

$$y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} X_j^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

onde $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ e β_{ij} são coeficientes de regressão para constante de interceptação, lineares, coeficientes quadráticos e de interação, respectivamente, e X_i e X_j são as variáveis independentes codificadas.

A notação da matriz do modelo é dada pela Equação:

$$y = X\beta + \varepsilon$$

$$\underbrace{\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{bmatrix}}_y = \begin{bmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \cdot & \cdot & x_{1k} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \cdot & \cdot & x_{2k} \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \cdot & \cdot & x_{nk} \end{bmatrix} \underbrace{\begin{bmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \beta_k \end{bmatrix}}_{\beta} + \underbrace{\begin{bmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \varepsilon_n \end{bmatrix}}_{\varepsilon} \quad (4)$$

O sistema de equações dadas acima é resolvido utilizando o Método dos Mínimos Quadrados (MMQ). O Método dos mínimos quadrados é uma técnica de regressão múltipla e este método pode ser resumido como se segue.

No MMQ, presume-se que os erros aleatórios são identicamente distribuídos com uma média de zero e uma variância comum desconhecida e são independentes uns dos outros. A diferença entre o valor observado (y) e o valor estimado ($\hat{y}$) para a i -ésima observação $\varepsilon_i = y_i - \hat{y}_i$ é chamado de residual e é uma estimativa do correspondente ε . O critério de escolha das estimativas β_j é que elas devem minimizar a Soma dos Quadrados dos Resíduos, que é muitas vezes chamado de a Soma dos Quadrados dos Erros e é denotada por SQE .

Assim,

$$SQE = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum (y_i - \hat{y})^2 \quad (5)$$

Os resíduos podem ser descritos como:

$$\varepsilon = y - X\beta \quad (6)$$

e o SQE é

$$SQE = \varepsilon^T \varepsilon = (y - X\beta)^T (y - X\beta) \quad (7)$$

Diferenciando a SQE em relação à β , obtemos um vetor de derivadas parciais, como segue:

$$\frac{\partial}{\partial \beta}(SQE) = -2X^T(y - X\beta) \quad (8)$$

Igualando esta derivada a zero temos $X\beta = y$ e este sistema sobre-determinado de equações poderia ser resolvido diretamente para a obtenção dos coeficientes de β pela seguinte igualdade:

$$X^T X\beta = X^T y \quad (9)$$

A solução formal destas equações é então

$$\beta = (X^T X)^{-1} X^T y = CX^T Y \quad (10)$$

onde

$$C = (X^T X)^{-1} \quad (11)$$

Note-se que C é uma matriz quadrada.

Depois que os coeficientes de regressão forem obtidos, a resposta estimada pode ser facilmente calculada usando a equação do modelo. Normalmente, o comportamento do sistema é desconhecido, assim se deve verificar se o modelo se adapta bem aos dados experimentais. Para verificação da adequação do modelo, várias técnicas são realizadas. Algumas dessas técnicas são, as Somas dos Quadrados dos Erros (SQE) e o teste da Falta de Ajuste. A capacidade total de previsão do modelo é comumente explicada pelo Coeficiente de Determinação (R^2), que é calculado a partir da SQE. Por outro lado, não se deve esquecer que o R^2 , sozinho, não é uma medida da exatidão do modelo. O R^2 é uma medida da quantidade de redução da variabilidade da resposta obtida

usando a variação explicada pelo modelo. No entanto, um grande valor de R^2 não implica necessariamente que o modelo de regressão é bom. Adicionando uma variável para o modelo, o R^2 irá sempre aumentar, independentemente do fato de que a variável adicional é estatisticamente significativa ou não. Assim, é possível para os modelos que têm grandes valores de R^2 produzir previsões distantes em novas observações ou estimativas médias da resposta (MYERS; MONTEGOMERY, 2009).

O R^2 deve ser próximo de 1,0 e SQE deve ser tão pequena quanto possível. Os valores aceitáveis de R^2 e os valores de SQE significa que a equação do modelo define o comportamento real do sistema e pode ser usado para a interpolação no domínio experimental. É preciso ter cuidado ao extrapolar para além da região contendo as observações originais. É bem possível que um modelo que se adapta bem na região dos dados originais não se encaixem bem fora desta região.

2.3.1.3. Representação gráfica da equação do modelo e determinação de condições ótimas de operação

A visualização da equação do modelo previsto pode ser obtida pelo gráfico da superfície de resposta e curvas de contorno. O gráfico da superfície de resposta é uma trama tridimensional teórica que mostra a relação entre a resposta e as variáveis independentes. O visor bidimensional da trama de superfície é chamado curva de contorno e na curva de contorno, linhas de resposta constantes

são traçadas no plano das variáveis independentes. Os gráficos de contorno ajudam a visualizar a forma de uma superfície de resposta. Quando a curva de contorno exhibe elipses ou círculos, o centro do sistema refere-se a um ponto de resposta máximo ou mínimo. Às vezes, a curva de contorno pode exibir sistema hiperbólico ou parabólico. Neste caso, o ponto estacionário é chamado um ponto de sela e não é nem um máximo nem um ponto mínimo. Estes gráficos fornecem informações úteis sobre o ajustamento do modelo aos dados, mas não podem representar o comportamento real do sistema. Não se deve esquecer que os contornos (ou superfícies) representam contornos da resposta estimada e a natureza geral do sistema surge como resultado de um modelo ajustado, e não a verdadeira estrutura (MEYRS; MONTGOMERY, 2009).

2.3.2. Vantagens e desvantagens da RSM

A Metodologia de Superfície de Resposta tem várias vantagens em comparação com os métodos clássicos experimentais ou otimização em que é avaliado um fator por vez, mantendo as outras variáveis fixadas para controlar o processo, isto é, determinar as condições ótimas avaliando separadamente os fatores. Com efeito, os métodos clássicos são demorados e um grande número de experimentos é necessário para explicar o comportamento de um sistema. Em primeiro lugar, esta técnica de análise oferece uma grande quantidade de informação a partir de um pequeno número de experimentos. Em segundo lugar, na RSM é possível observar o efeito de interação dos parâmetros independentes

na resposta, especialmente onde o efeito de interação dos parâmetros seria mais crítico, tais como sinergismo, antagonismo, e adição. A equação do modelo facilmente esclarece estes efeitos para a combinação binária dos parâmetros independentes. Além disso, o modelo empírico da resposta relacionada com as variáveis independentes é usado para obter informações sobre o que está sendo estudado. Com relação a estes, podemos dizer que o RSM é uma ferramenta útil para a otimização.

Por outro lado, o grande inconveniente de RSM é no ajuste dos dados para um polinômio de segunda ordem. Não se pode dizer que todos os sistemas que contenham curvatura são bem acolhidos pelo polinômio de segunda ordem. Além disso, o efeito da temperatura sobre os processos é descrito por curvas simétricas ou assimétricas em forma de sino. Não é possível explicar o efeito da temperatura com um polinômio de segunda ordem, especialmente quando a curva é não simétrica. Para contornar isto, os dados podem ser convertidos em uma outra forma que não pode ser explicada pelo modelo de segunda ordem. Por exemplo, transformações logarítmicas e outros métodos de linearização podem ser utilizados para esta finalidade. Um exemplo de transformação logarítmica de resposta e de parâmetros independentes é apresentado nas seguintes equações:

$$\ln y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad . \quad (15)$$

$$y = \beta_0 + \beta_1 (\ln x_1) + \beta_2 (\ln x_2) \quad (16)$$

Embora estas transformações possam ser úteis, não é possível afirmar que essas transformações dão resultados desejáveis para todos os sistemas. Além

disso, a transformação de resposta ou entradas é demorada e às vezes é difícil saber qual forma de transformação é a melhor.

Alternativamente, se o sistema está dificilmente explicado por um modelo de segunda ordem, deve-se escolher um intervalo menor de parâmetros independentes. É possível aumentar a precisão da equação do modelo, trabalhando em uma gama estreita de parâmetros independentes. O trabalho preliminar torna-se mais crítico para a determinação da gama de parâmetros independentes.

2.4. Revisão de estudos publicados

Kalil et al. (2000) buscando a otimização da atividade enzimática da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus*, estudou cinco fatores, utilizando primeiramente um delineamento fatorial fracionado ($2^{5-1} = 16$ ensaios), para determinar os efeitos dos fatores sobre a atividade enzimática, tendo sido selecionado três fatores para serem utilizadas em um Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR), conseguindo resultados em que a atividade enzimática passou de 9 para 110 U.mL⁻¹ após a realização de dois planejamentos seqüenciais.

Rodrigues et al. (1993) estudando por simulação em computador a otimização de um processo contínuo de purificação de enzimas, analisou 7 fatores, e fez uma comparação entre os planejamentos completo, os fracionados e os planejamentos do tipo Plackett & Burman (PB), para mostrar o potencial das

matrizes PB, selecionando 4 fatores para serem estudados em um DCCR na otimização do processo. Com apenas 10% dos ensaios é possível obter a mesma informação estatística, ou seja, utilizando um PB12 com doze ensaios, um fatorial fracionado 2^{7-3} com 16 ensaios e um fatorial completo 2^7 com 128 ensaios, foram selecionados os mesmos 4 fatores.

He e Tan (2006) utilizaram a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para otimizar o meio de cultura para a produção de lipase de *Candida* sp onde na primeira etapa da pesquisa foi utilizado um Delineamento Plackett-Burman para avaliar os efeitos dos diferentes componentes do meio de cultura. Óleo de soja, soja em pó e K_2HPO_4 apresentaram influência significativa sobre a produção de lipase. As concentrações de três fatores foram otimizadas posteriormente usando delineamentos compostos centrais e análise de superfície de resposta. A condição otimizada permitiu que a produção de lipase aumentasse de 5.000 para 6.230 U.mL⁻¹ em sistema de frasco agitados. A fermentação da lipase em fermentador de 5L atingiu a produção de 9.600 U/mL.

Ratnam et al. (2003) estudaram os efeitos quantitativos da temperatura, pH e tempo de fermentação na fermentação e sacarificação simultânea (FSS) de etanol a partir de amido de sagu com glucoamilase e *Zymomonas mobilis*, usando um Delineamento Box-Wilson, seguido de um Delineamento Composto Central (DCC). O processo FSS foi estudado utilizando a enzima livre e células livres, verificando-se que, com o amido de sagu, a concentração máxima de etanol foi de 70,68 g.L⁻¹ usando-se uma concentração de 140 g.L⁻¹ de amido, o que representa um rendimento de etanol de 97,08%. As condições ótimas de rendimento ocorreram em uma temperatura de 36,74 °C, pH de 5,02 e tempo de fermentação

de 17 horas. Assim, usando um Delineamento Composto Central, foi possível determinar os valores exatos dos parâmetros de fermentação em que ocorre a produção máxima de etanol.

Robert et al (2006) em uma pesquisa de extração de pectina de raiz de chicória por extração com ácido, seguido por precipitação com álcool, utilizou um Planejamento Blackett-Burman de 20 ensaios para estudar os efeitos de 17 parâmetros diferentes, no rendimento e na composição da pectina: pH, temperatura, tempo de extração, a razão de sólido/líquido, e diferentes pré-tratamentos das polpas antes da extração. As vinte extrações foram realizadas e examinadas quanto à sua importância no rendimento e teor de açúcar. A extração ácida de raízes de chicória resultou em um rendimento médio de 11% contendo 86% de açúcares. Verificou-se que a temperatura de extração, o tempo, pré-tratamento de protease, a pureza da água, e água de lavagem de polpas afetaram significativamente o rendimento e composição de pectina com um aumento de rendimento e pureza de pectina em condições mais severas de extração.

Silva et al. (2009) em um estudo de purificação do ácido clavulônico, um antibiótico importante produzido por cultivo submerso de *Streptomyces clavuligerus*, foi estudado através da utilização de fosfato e de polietileno glicol com base em duas fases aquosas sistemas. Os parâmetros dos efeitos sobre o rendimento e purificação foram avaliados por meio de um planejamento experimental. A metodologia de superfície de resposta foi usada para otimizar o coeficiente de distribuição, rendimento, e fator de purificação. As condições ótimas dos fatores de rendimento e purificação estão nas regiões em que o polietileno tem uma massa molecular baixa, próximo do pH para o ponto isoelétrico, e menor

volume de fase superior. Um rendimento de 100% e um fator de purificação de 1,5 vezes são obtidos quando se extrai o ácido clavulônico, maximizando as condições de um sistema de duas fases aquosas.

Aragon et al. (2008), descrevendo uma metodologia de dosagem de glicerol quinase em panificação utilizou RSM onde estudou as variáveis temperaturas, substrato e pH, obtendo os melhores resultados nas faixas de 52-56 °C para a temperatura, 150-170 mmol para a concentração do substrato e 10,2-10,5 para o pH, mostrando que a RSM foi adequada para modelar a otimização das condições de reação para maximizar a atividade da enzima glicerol quinase.

Aizemberg (2011) descrevendo parâmetros cinéticos da enzima glicerol quinase produzida pela levedura *Pichia pastoris* geneticamente modificada, utilizou um DCCR para otimizar as melhores condições em função da temperatura de reação e do pH, observou que os valores máximos de atividade foram obtidos com os maiores valores de pH e baixas temperaturas e, em altas temperaturas e menores valores de pH, sem um ponto máximo do domínio experimental.

Singh e Bishnoi (2012) estudaram a otimização da produção de etanol por palha de trigo como matéria-prima. Foi utilizado como substrato palha de trigo alcalino pré-tratado. A otimização da produção de etanol a partir de hidrolisado enzimático de palha de trigo foi estudada utilizando um processo de otimização estatística seqüencial, onde os primeiros fatores que afetam a produção de etanol foram rastreados por Delineamento Plackett-Burman e selecionados entre 15 fatores os 4 fatores mais significantes (pH, Temperatura, redução inicial de açúcar total e concentração de inóculo). A produção máxima de etanol obtida durante o Planejamento Plackett-Burman foi de 15,6 g.L⁻¹. Sob condições ideais de

produção de etanol a nível de biorreator a produção de etanol obtida foi de 16,4 g.L⁻¹ com produtividade de etanol de (0,43 g.L⁻¹).h⁻¹, em pH 5,5, temperatura de 30 °C, nível de inóculo de 3,3%. Esses resultados indicaram que a produção de etanol pode ser aumentada por otimização das condições de fermentação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEMBERG, R. **Produção de glicerol quinase em recombinante de *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Curso Ciência de Alimentos, UNESP, Araraquara-SP, 2011.

ANJUM, M. F.; TASADDUG, I.; AL-SULTAN. K. Response surface methodology: A neural network approach. **European Journal Operational Research**, v. 101, n. 1, p. 65-73. 1997.

ARAGON, C. C., FERREIRA-DIAS, S., GATTÁS, E. A. L., PERES, M. F. S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 113-120. 2008

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007. 480 p.

BATISTA, E.; RODRIGUES, M. I.; MEIRELLES, A. J. Optimization of a Secondary Reflux and Vaporization (SRV) distillation process using surface response analysis. **Computer Chemical Engineering**, v. 22, SUPPL.1, p. S737-S740, 1998.

BAZARAA, W. A.; HASSAN, E. E. Response surface optimization for the continuous glucose isomerization process. **Journal Industrial Microbiology Technology**. v. 17, n. 2, p. 100-103, 1996.

BOWMAN, L.; GEIGER, E. Optimization of fermentation conditions for alcohol production. **Biotechnology Bioengineering**. V. 26, n. 12, p. 1492-1497, 1984.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation and discovery**. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

CHEN, H. C. Optimizing the concentrations of carbon, nitrogen and phosphorus in citric acid fermentation with response surface method. **Food Biotechnology**, v. 10, p. 13-27, 1996.

CORDENUNSI, B. R.; DA SILVA, R. S. F.; SRIVASTAVA, K. C.; FABRE-SANCHES, S.; PERR, M. A. Mathematical model for the alcoholic fermentation in batch culture: Comparison between complete and incomplete factorial (3^3) designs. **Journal Biotechnology**, v. 2, n.1, p. 1-12, 1985.

GIESBRECHT, F. G.; GUMPERTZ, M. L. **Planning, construction, and statistical analysis of comparative experiments**. New York: Willey, 2004. 693p.

HARRIS, P. L.; CUPPETT, L. B. Optimization of lipase synthesis by *Pseudomonas fluorescens* by response surface methodology. **Journal Food Protection**, v. 53, p. 481-483, 1990.

HE, Y-Q.; TAN, T-W. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1-4, p. 9-14. 2006.

HONORATO DA SILVA, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Dynamic modelling, simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 74, n. 3, 1999.

IYER, R.; TOMAR, S. K.; SINGH, A. K. Response surface optimization of the cultivation conditions and medium components for the production of folate by *Streptococcus thermophilus*. **Journal Dairy Research**, v. 77, n. 3 p. 350-356, 2010.

KALIL, S. J.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Response surface analysis and simulation as a tool for bioprocess design and optimization. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 539-550, 2000.

MANANA, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, M. Z. Optimization of process parameters for the bioconversion of activated sludge by *Penicillium corylophilum*,

using response surface methodology. **Journal Environmental Sciences**, v.. 19, n. 1 p. 23-28, 2007.

MARCHETTI, R.; GUERZONI, M. E. Study on the effects of selected mineral nutrients and of their interactions on the yeast fermentation performance. Use of an experimental design. **Cerevisia Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 24-33. 1991.

MEYRS, R.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: process and product optmimization designed experiments**. 3nd ed. New York: Willey, 2009. 704p.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

RAHMAN, N. A.; JAHIM, J. M. Determination of Process Stability and Response for Glucose Isomerisation Process. **Modern Applied Science**, v. 4, n. 8, P. 96-103, 2010.

RAO, P. V.; JAYARAMAN, K.; LAKSHMANAN, C. M. Production of lípase by *candida rugosa* in solid state fermentation. 2: medium optimization and effect of aeration. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 391-395, 1993.

RATNAM, B. V. V.; RAO, M. N.; RAO, M. D.; RAO, S. S.; AYYANNA, C. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago

starch using response surface methodology. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 523-526, 2003.

ROBERT, C.; DEVILLERS, T.; WATHELET, B.; HERCK, J. P. V.; PAQUOT, M. Use of a Plackett–Burman Experimental Design to Examine the Impact of Extraction Parameters on Yields and Compositions of Pectins Extracted from Chicory Roots *Chicorium intybus* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7167-7174, 2006.

RODRIGUES, L. TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; MEI, H. V. D. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 1-10, 2006.

RODRIGUES, M. I. MACIEL FILHO, R.; ASENJO, J. A.; MAUGERI, F. A procedure for feasible and optimal operational strategies for control of CARE systems. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 69, n. 2, p. 254-260, 1997.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2^a. ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2009.

RODRIGUES, M. I.; MACIEL FILHO, F.; MAUGERI, F. The control problem for protein separation by the continuous affinity recycling extraction process. **Advances Bioprocess Engineering**, pp. 321-328, 1994.

RODRIGUES, M. I.; MACIEL FILHO, R.; MAUGERI, F. Optimization of a process of continuous enzyme purification by surface response analysis. **Food Control**, v. 4, n. 3, p. 144-148, 1993.

RODRIGUES, M. I.; ZAROR, C. A.; MAUGERI, F.; ASENJO, J. A. Dynamic modelling, simulation and control of continuous adsorption recycle extraction. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 1, p. 263-269, 1992.

SILVA, C. S.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 32, n. 5, p. 625-632, 2009.

SINGH, A.; BISHNOI, N. R. Ethanol production from pretreated wheat straw hydrolyzate by *Saccharomyces cerevisiae* via sequential statistical optimization. **Industrial Crops and Products**, v. 41, 2012, n. 1, p. 221-226, 2012.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. **Process Biochemistry**, v. 37, n.9, pp. 999-1004, 2002

YIN, H.; FAN, G.; GU, Z. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). **LWT-Food Science Technology**, v.43, n. 4, p. 666-669. 2010.

CAPÍTULO 2

Otimização das Condições do Meio de Cultivo para a Produção de Biomassa usando a Levedura de *Pichia pastoris*

RESUMO

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, que foi geneticamente manipulada para expressar proteínas heterólogas que são de grande valor biotecnológico na pesquisa básica e em usos industriais na produção de grande variedade de proteínas heterólogas. Glicerol quinase (EC 2.7.1.30) é uma enzima chave no metabolismo do glicerol e catalisa a reação do glicerol para glicerol-3-fosfato na biossíntese de fosfolípidos. O presente estudo foi realizado para determinar um meio otimizado para a produção de biomassa máxima de recombinante de *Pichia pastoris* com cultivo em frascos agitados usando 2,31% (p/v) de glicerol como fonte de carbono. A otimização foi realizada por metodologia de superfície de resposta (RSM). Em experimentos preliminares, realizados seguindo um planejamento Plackett-Burman, o conteúdo de glicerol (Gli) e tempo de crescimento (t) foram selecionados como os fatores mais importantes na produção de biomassa. Assim, os ensaios subsequentes foram realizados para a otimização da produção de biomassa, seguindo um delineamento composto central rotacionado (DCCR) em função do glicerol e do tempo. O glicerol mostrou exercer um significativo efeito linear positivo sobre a produção de biomassa. Além disso, o tempo mostrou ser um fator significativo positivo (linear e quadrático) sobre a produção de biomassa. Pontos experimentais de dados podem ser bem ajustados a uma superfície convexa descrito por um modelo polinomial de segunda ordem, como uma função de ambos os fatores ($R^2 = 0,94633$). A composição do meio otimizado para a produção de enzima foi de: 1% de extrato de levedura, 1% de peptona, 100 mmol.L⁻¹ de tampão fosfato de potássio, pH 6,0, 1,34% de YNB, 4x10⁻⁵% de biotina, 1% de metanol e 1% de glicerol. O modelo matemático obtido no DCCR, com $R^2 = 0,94633$ e $QM_{\text{Erro Puro}} = 0,19866$ foi: Biomassa = $-0,989 - 0,365 \cdot \text{Gli} + 0,167 \cdot t - 0,001 \cdot t^2 + 0,032 \cdot \text{Gli} \cdot t$.

Palavras chave: *Pichia pastoris*, glicerol quinase, biomassa, delineamento Plackett-Burman, Superfície de resposta.

ABSTRACT

Pichia pastoris is a methylotrophic yeast that has been genetically engineered to express heterologous proteins that are prized for basic research and industrial biotechnology purposes in the production of wide variety of heterologous proteins. Glycerol kinase (EC 2.7.1.30) is a key enzyme in glycerol metabolism and catalyzes glycerol to glycerol-3-phosphate in the biosynthesis of phospholipids. The present study was undertaken to determine an optimized medium for the maximal biomass production of recombinant *Pichia pastoris* in shaker cultures using 2.31% (w/v) glycerol as the carbon source. Optimization was carried out by response surface methodology (RSM). In preliminary experiments, performed following a Plackett-Burman design, glycerol content (Gly) and growth time (t) were selected as the most important factors on biomass production. Therefore, subsequent experiments were carried out for optimization biomass production, following a central composite rotatable design as a function of Gly and time. Gly showed to have a significant positive linear effect on biomass production. Also, time showed to be a significant factor (at linear positive and quadratic levels) on biomass production. Experimental data points can be well fitted to a convex surface described by a second order polynomial model, as a function of both factors ($R^2 = 0.946$). The optimized medium composition for enzyme production was: 1% yeast extract, 1% peptone, 100 mmol.L⁻¹ potassium phosphate buffer pH 6.0, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% methanol and 1% glycerol reaching 0.89 U/mL of glycerol kinase activity and 14.55 g.L⁻¹ total protein. The mathematical model obtained the CCRD, with $R^2 = 0.94633$ and $MS_{\text{Error Pure}} = 0.19886$ was: Biomass = $-0.989 - 0.365\text{Gly} + 0.167t - 0.001t^2 + 0.032(\text{Gly} \cdot t)$.

Keywords: *Pichia pastoris*, Glycerol kinase, Biomass, Plackett-Burman, Response Surface.

1. INTRODUÇÃO

A expressão de proteínas heterólogas tem sido a base das indústrias de biotecnologia industrial e farmacêutica nos últimos 30 anos. Há três a quatro plataformas de produção já disponíveis comercialmente e um número crescente em desenvolvimento englobando células hospedeiras diferentes, sistemas de expressão, e métodos para utilizar as instruções genéticas, bem como estratégias de bioprocessamento que tiram vantagem das combinações particulares para maximizar a produtividade volumétrica e qualidade do produto. É geralmente aceito que não existe um único sistema de expressão heterólogo universal, bioprocesso, e estratégia que funcionará para todas as proteínas. Cada produto de proteína deve ser considerado individualmente, com base no produto específico de proteínas, as especificações de qualidade únicas, e aplicação pretendida (McDONALDS, 2011).

1.1. A Levedura *Pichia pastoris*

O grande emprego da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fins biotecnológicos estimulou, nos últimos anos, o desenvolvimento de novos sistemas de expressão baseados em espécies alternativas de leveduras, a partir de um conjunto diverso de organismos, incluindo bactérias, fungos, protistas, plantas, invertebrados, vertebrados não humanos, e humanos. Semelhantemente a *S. cerevisiae*, os sistemas de expressão de proteínas de *Pichia* têm as vantagens de ter uma tecnologia de fermentação bem estabelecida, o custo-benefício e entendimento abrangente da genética molecular de hospedeiras. Dentre estes novos sistemas destacam-se as leveduras metilotróficas, ou seja, as que crescem em meio que contém metanol como única fonte de carbono. Quatro gêneros apresentam esta característica: *Pichia*, *Hansenula*, *Candida* e *Torulopsis*, mas somente as espécies *Pichia pastoris* e *Pichia angusta* encontraram maior aceitação para a produção de proteínas heterólogas em escala industrial por serem mais bem estudadas (TORRES et al., 2008; BALTZ et al., 2010).

Segundo Barnett, Payne e Yarrow (2000) *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica, de ocorrência natural em seiva exudada de castanheiros na França e em carvalho preto *Quercus kelloggii* nos Estados Unidos. Sua taxonomia é descrita como sendo pertencente ao reino *Fungi*, filo *Ascomicota*; sub-filo *Saccharomicotina*; classe *Saccharomicetes*; ordem *Saccharomicetales*; família *Saccharomicetaceae*; gênero *Pichia* e da espécie *Pichia pastoris*. De acordo com

Silveira (1995), a identificação taxonômica do gênero *Pichia* pode ser facilmente realizada por apresentar ascósporos redondos ou hemisféricos.

Algumas leveduras do gênero *Pichia* são encontradas no solo, água doce, insetos, exudado de árvores, sobre a superfície de plantas, frutas e uma variedade de alimentos e bebidas onde haja açúcares. Algumas espécies podem contribuir com efeitos desejáveis nas fases iniciais de fermentação de vinho, em vários tipos de salmoura, em diferentes tipos de queijos. Algumas espécies têm sido descritas como contaminante de alimentos e como patógenos humanos (BAKIR et al., 2004; OTAG et al., 2005; SILVEIRA, 1995).

Segundo Kalidas (2004) a levedura de *P. pastoris* normalmente existe no estado haplóide vegetativo. A reprodução vegetativa é por brotamento multilateral. A limitação de nitrogênio estimula o cruzamento e conduz à formação de células diplóides. *P. pastoris* é considerado homotálico, uma vez que as células da linhagem podem acoplar-se com a outra. Pode haver mais do que um tipo de cruzamento na população, que alterna com uma frequência elevada de modo que o cruzamento ocorre entre as células haplóides de tipo de cruzamento oposto. Célula diplóide mantida em meio de crescimento vegetativo padrão permanece diplóide. Se eles são transferidos para um meio de nitrogênio limitado, sofrem meiose e produzem esporos haplóides. A regulação fisiológica do cruzamento em *P. pastoris* facilita a sua manipulação genética, uma vez que é mais estável no seu estado haplóide vegetativo, é possível o isolamento fácil e a caracterização dos mutantes.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é um hospedeiro para a expressão de uma variedade de proteínas a partir de micro-organismos, fungos, plantas, e

tecidos de animais. Este sistema de expressão eucariótico permite um elevado nível de produção e eficiência elevada de proteínas recombinantes com facilidade técnica e de baixo custo, em relação outros sistemas de expressão eucarióticos. Além disso, pode realizar muitas modificações eucarióticas pos-translacionais, tais como glicosilação, formação de ligação de dissulfeto, e processamento proteolítico (RYU et al., 2011).

1.2. Proteína recombinante de *Pichia pastoris*

Devido ao seu potencial de produzir grandes quantidades de proteínas heterólogas e capacidade de produção em grande escala, *P. pastoris* vem sendo cada vez mais usado para pesquisa e produção de várias proteínas. Duas fases de cultivo constituem o método fundamental para produzir a proteína heteróloga em *P. pastoris*. A primeira é uma fase de crescimento celular com glicerol como fonte de carbono, e uma segunda é usualmente chamada, fase de indução, em que o metanol é adicionado para a biossíntese da proteína recombinante sob o controle estrito do promotor regulador álcool oxidase (AOX1). Quando a fonte de carbono está ligada a partir de glicerol à solução de metanol, a resposta das culturas recombinantes para a indução de proteínas heterólogas envolve mudanças significativas na fisiologia celular, taxa de crescimento e metabolismo. (CREEG et al. 2009; PAULOVÁ et al., 2012).

A concentração de células no início da segunda fase tem desempenhado de um papel importante na produção de proteína recombinante. A fim de alcançar

uma alta produtividade de proteínas heterólogas, a concentração de células deve ser ainda aumentada. Diferentes estratégias de alimentação de glicerol tem sido explorada para o cultivo de alta densidade de células de *P. pastoris* (WANG et. al., 2009; PAULOVÁ et al., 2012).

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* é cada vez mais utilizada para a expressão de proteínas recombinantes (BOLLOK et al., 2009; MATTANOVICH et al., 2012; KANG et al., 2011). Uma abordagem comum utilizada para a expressão da proteína heteróloga com esta espécie é para expressar o gene de interesse sob o controle do promotor de AOX1. Na linhagem selvagem de *P. pastoris*, o promotor controla a expressão de AOX1 álcool oxidase 1, que é a primeira enzima no metabolismo do metanol. Este promotor é relatado ser induzido por metanol, mas reprimido na presença de excesso de glicerol. (JUNGO et al., 2007; STADLMAYR et al., 2010). No entanto, uma acumulação excessiva de glicerol pode desencadear uma acumulação de etanol e acetato a níveis que reprimem o promotor AOX1 e pode, conseqüentemente, diminuir ou retardar a produção de proteína estranha.

O protocolo de fermentação padrão é a *P. pastoris* crescer em excesso de glicerol para reprimir a expressão, seguido por indução de produção de proteína por adição de metanol após o glicerol a dosagem final (STRATTON; CHIRUVOLU; MEAGHER, 1998).

Os sistemas de expressão neste micro-organismo permitem a produção de proteínas tanto na forma intracelular quanto na extracelular. Embora o sistema de produção extracelular apresente a vantagem da liberação da proteína, de

interesse no sobrenadante do meio de cultivo, ambos os modelos de expressão estão sendo amplamente estudados e precisam de quantidade suficiente de massa celular para que proteínas sejam purificadas para a utilização como produto (CEREGHINO; CREGG, 2000).

Centenas de proteínas foram clonadas e expressas usando o sistema *Pichia pastoris* (MACAULEY-PATRICK et al., 2005; HARTNER et al., 2008; RAMÓN; MARÍN, 2011). Cereghino e Cregg (2000) descreveram algumas das proteínas expressas no sistema *P. pastoris*, algumas originalmente encontradas em bactérias (α -amilase originalmente de *Bacillus licheniformis*, D-alanina carboxipeptidase de *Bacillus stearothermophilus*), outras encontradas em fungos, (glucoamilase de *Alternaria alternata*, catalase de *Aspergillus fumigatus*), outras, encontrada em protistas, (hexose oxidase de *Chondrus crispus* (alga vermelha), α -manosidase ácida de *Tripanossoma cruzi*), em plantas, (fitocromo B de batata, fosfatase ácida de nódulo de grão de soja), invertebrados (proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* (água viva); alguns vertebrados não humanos, (β -caseína bovina, inibidor de tripsina pancreático de bovino (aprotinina), gelatinase B de rato, transportador intestinal de peptídeo (PEPt1 e 2 de rato). Algumas de humanos, (albumina sérica, trombomodulina).

Segundo Cos et al. (2006), a otimização da expressão de proteínas heterólogas, que consiste em maximizar o rendimento e a produtividade, depende de diferentes fenótipos com o promotor AOX, ou outros promotores, meios de cultura e estratégias operacionais.

Macauley-Patrick et al. (2005) relatam que grande parte dos trabalhos em *Pichia pastoris* utiliza um meio complexo para o crescimento e indução da

expressão protéica. As formulações destes meios encontram-se nos protocolos da Invitrogen Corporation (Calsbad, CA, USA), e são dependentes do tipo de linhagem utilizada. A concentração de substratos (glicose ou glicerol) é uma limitação mais comum na produção em larga escala, porque a manutenção do substrato inicial em baixa concentração (não-inibitória) é essencial na otimização da produção de biomassa e conseqüentemente na proteína desejada.

Choi et al. (2006) observaram que a produção de proteínas heterólogas, a partir de *Pichia pastoris*, em fermentadores, utilizando glicerol e metanol como fontes de carbono, apresentou diferentes comportamentos: o glicerol no meio beneficiou o acúmulo de biomassa até a concentração permissível da fonte de carbono enquanto o metanol atuou como indutor da síntese de proteínas. Como prática mais convencional, adiciona-se glicerol no meio de cultura anteriormente a adição do metanol. O meio de cultivo BSM (Basalt Salt Medium) recomendado pela Invitrogen Co. (2000) para acúmulo de biomassa utiliza 40 g.mL⁻¹ de glicerol como fonte de carbono e suplementação dos nutrientes (como Fe, Cu, Mn e biotina), além de solução de traços de sais (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

A adição de fonte de nitrogênio e várias concentrações de fósforo e potássio favoreceram o crescimento microbiano, em culturas realizadas por sistema de batelada alimentada (D'ANJOU et al., 2000; STRATTON et. al., 1998). A adição de nitrogênio no meio de cultivo, com a finalidade de se obter altas concentrações de biomassa, em experimentos da produção de proteínas a partir de *Pichia pastoris*, também foi prática de outros autores (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Outros meios são utilizados para acúmulo de biomassa e produção de proteínas, tais como: BMGY e BMMY cujas diferenças residem na adição de glicerol ou metanol além de biotina, numa formulação de meio tamponado com fosfato de potássio 100 mmol e que leva extrato de levedura (1%), peptona (2%) e YNB (1,34%) (SHI et al., 2003; PLANTZ et al., 2006; XIE et al., 2005; CHEN et al., 2004).

Boze et al. (2001) obtiveram quantidades suficientemente altas de expressão de proteína em biorreator, comparando com o cultivo em pequenos frascos, quando *P. pastoris* foi cultivada usando uma alta densidade celular em biorreator alimentado ou em processo contínuo de fermentação, onde o pH e a quantidade de oxigênio foram controlados em diversas amostras. Segundo Werten et al. (1999) e Scorer et al. (1993) o valor do pH do meio exerce importante função na manutenção da estabilidade das proteínas heterólogas expressas pela *Pichia pastoris*.

Outro fator importante de controle é a temperatura de crescimento da levedura que possui ótimo em 30 °C e, acima de 32 °C é notada uma queda na expressão protéica pela célula. Excepcionalmente, temperaturas mais baixas, como 23 °C foram positivas sobre a síntese protéica pela levedura *Pichia pastoris* (LI et al., 2001; JAHIC et. al., 2003).

1.3. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Estabelecer estratégias para otimização da produção de biomassa:
 - o a partir de diferentes composições do meio de cultivo;
 - o e avaliar parâmetros que interferem no crescimento da levedura.
- Utilizar a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) com os delineamentos experimentais adequados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Crescimento celular (*Biomassa*)

Foi feita uma seleção prévia de quatro linhagens Gk1, GK2, GK3 e GK4 para produção extracelular de glicerol quinase recombinante, obtidas por técnicas de Engenharia Genética realizadas no Laboratório do Prof. Dr. Sandro Valente, onde foi selecionado a linhagem GK4.

A partir de uma suspensão concentrada de células da linhagem GK4, foi construída uma curva que relaciona a relação das absorbâncias com as massas secas correspondentes a cada suspensão diluída. Foi determinado o fator $F = 0,28 \text{ mg}_{\text{célula}} \cdot \text{mL}^{-1}$ relacionando o recíproco da inclinação desta curva para ser utilizado nos cálculos de biomassa (AIZEMBERG, 2011).

As leituras de densidade ótica foram realizadas no $\lambda = 570\text{nm}$ e os seus valores convertidos em massa seca utilizando-se a formula:

$$[\text{mg} / \text{mL}] = F \times \Delta A_{570\text{nm}} \times \text{diluição}$$

2.2. Planejamento Experimental

O esquema apresentado na Figura 1 apresenta a estratégia realizada para as duas respostas estudadas. Inicialmente foi conduzido um delineamento Plackett-Burman (PB), onde foi avaliado estatisticamente os efeitos das 8

variáveis, visando a seleção dos fatores mais importantes a considerar em experimentos posteriores, na modelagem e otimização da produção de biomassa. A partir da análise dos efeitos principais pelo PB, foi realizado um DCCR para a resposta da Produção de Biomassa.

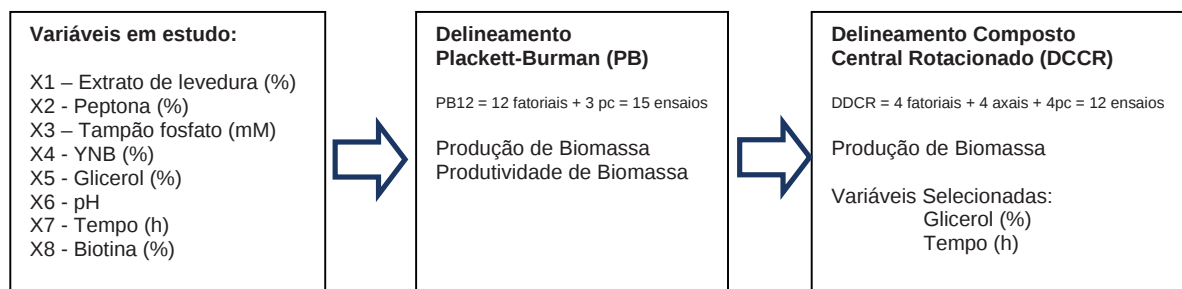


Figura 1 – Estratégia Experimental realizada

2.2.1. Triagem dos fatores que afetam a produção de biomassa

Um estudo preliminar de *Screening Design* foi realizado através de um experimento Plackett-Burman (PB) a fim de selecionar os fatores mais importantes a ser considerado nos estudos posteriores de modelagem, otimização e produção de biomassa.

Seguindo as recomendações da escolha de um delineamento de PB com um número mínimo de 4 ensaios a mais do que o número de variáveis a serem estudadas, propostas por Rodrigues e lemma (2009), foi realizado o estudo, adotando um PB12, ou seja, 12 ensaios, acrescidos de 3 pontos centrais, totalizando 15 ensaios para avaliação de 8 fatores ou variáveis. Os fatores testados foram: concentrações de componentes do meio de cultivo: extrato de levedura (EL), peptona (Pep), glicerol (Glic), YNB, biotina (Bt), tampão fosfato (T

Fos); e os parâmetros físicos: pH e tempo de crescimento.(t). Os níveis testados para cada fator são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores utilizados no Delineamento Plackett & Burman (PB) PB12

Variáveis	Código	Intervalo de Variação	Nível		
			-1	0	+1
EL	X1	0,5	0,5	1	1,5
Pep	X2	1,0	1	2	3
T Fos	X3	50	50	100	150
YNB	X4	0,67	0,67	1,34	2,01
Glic	X5	0,5	0,5	1	1,5
pH	X6	0,5	5,5	6	6,5
t	X7	24	24	48	72
Bt	X8	$0,5 \times 10^{-5}$	$1,5 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$

A matriz de dados utilizados na montagem dos ensaios é apresentada na Tabela 2.

Esse delineamento é uma metodologia de *Screening Design* para a seleção de variáveis em que se têm muitos fatores e pouco conhecimento das condições otimizadas, permitindo estudar simultaneamente os efeitos das variáveis. Isto reduz drasticamente o número de ensaios que deveriam ser realizados num fatorial completo, sendo imprescindível a realização de no mínimo 3 repetições na condição de ponto central (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 2 – Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	Y1	Y2
	EL %	P %	T Fos mmol	YNB %	Glic %	pH	t h	Bt %	Biomassa mg.mL ⁻¹	Prod. Biomas (mg.mL ⁻¹).h ⁻¹
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	y1 ₁	y2 ₁
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	y1 ₂	y2 ₂
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	y1 ₃	y2 ₃
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	y1 ₄	y2 ₄
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	y1 ₅	y2 ₅
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	y1 ₆	y2 ₆
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	y1 ₇	y2 ₇
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	y1 ₈	y2 ₈
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	y1 ₉	y2 ₉
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	y1 ₁₀	y2 ₁₀
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	y1 ₁₁	y2 ₁₁
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	y1 ₁₂	y2 ₁₂
13	0	0	0	0	0	0	0	0	y1 ₁₃	y2 ₁₃
14	0	0	0	0	0	0	0	0	y1 ₁₄	y2 ₁₄
15	0	0	0	0	0	0	0	0	y1 ₁₅	y2 ₁₅

2.2.2. Modelagem e otimização da produção de biomassa

Com os resultados do Delineamento Plackett-Burman, foram selecionadas duas variáveis, glicerol e tempo de crescimento, como os fatores mais importantes na produção de biomassa. Isto que deu origem a um segundo experimento seguindo um Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR), consistindo de um fatorial de 2^2 com dois níveis eqüidistantes de variação, matriz fatorial, codificados em -1 e +1, quatro pontos centrais e quatro pontos axiais $(\pm\alpha, 0)$; $(0, \pm\alpha)$, resultando em 12 ensaios (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; BARROS NETO et al.; 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

As variáveis independentes foram representadas pela porcentagem de glicerol no meio de cultura e pelo tempo de crescimento (h), enquanto a variável dependente (resposta) foi representada pela produção de Biomassa (mg/mL).

A região experimental, ou seja, o limite superior e inferior de cada uma das variáveis independentes foi determinado com base em resultados de várias pesquisas desenvolvidas com glicerol quinase obtidas por Tininis (2001); Aragon et.al. (2008), Silva (2009); Perez et. al. (2010) e Aizemberg (2011). Os parâmetros para a condição de ponto central foram às recomendações do protocolo *Pichia* da Invitrogen (2010). As variáveis independentes e os níveis de variação podem ser observados nas Tabelas 3 e 4, onde Z representa as variáveis originais e X as mesmas variáveis codificadas.

O polinômio de segundo grau empregado para o ajuste da variável resposta está representado na equação 1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad (1)$$

Onde X_1 e X_2 representam a porcentagem de glicerol no meio de cultivo e o tempo de fermentação, respectivamente, expressos em forma codificada; β_0 , β_1 , β_2 , β_{11} , β_{22} e β_{12} representam os coeficientes a serem estimados; Y representa a variável dependente (resposta) dos dados experimentais.

Com esse delineamento, cinco níveis diferentes (um central, dois fatoriais e dois axiais) foram testados para cada um dos fatores: teor de glicerol que variou de 0,19 a 2,31% (v/v) e tempo de crescimento de 14 a 82 h (Tabela 3). Todos os meios de reação foram preparados com tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0 contendo peptona 1% e $1,5 \times 10^{-5}$ % de biotina. Na Tabela 4 são apresentados os valores da matriz de dados utilizados no DCCR. Esta condição mostrou ser a melhor para promover a produção de biomassa.

Tabela 3 – Valores utilizados no DCCR para produção de biomassa.

Variáveis Originais	código	Unidade	Níveis Codificados				
			-1,41421	-1	0	1	1,41421
Glicerol (Z_1)	Glic	%	0,19	0,5	1,25	2	2,31
Tempo (Z_2)	t	h	14	24	48	72	82

Tabela 4 – Matriz de dados codificados e originais do delineamento composto central rotacionado (DCCR), em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de *Pichia pastoris*.

Ensaio	Variáveis Codificadas		Variáveis Originais	
	X_1	X_2	Glic	t
	Glicerol (%)	Tempo (h)	Glicerol (%)	Tempo (h)
1	-1	-1	0,50	24
2	-1	+1	0,50	72
3	+1	-1	2,00	24
4	+1	+1	2,00	72
5	-1,41421	0	0,19	48
6	+1,41421	0	2,31	48
7	0	-1,41421	1,25	14
8	0	+1,41421	1,25	82
9 (C)	0	0	1,25	48
10 (C)	0	0	1,25	48
11 (C)	0	0	1,25	48
12 (C)	0	0	1,25	48

2.2.3. Análise Estatística

Para os delineamentos Plackett-Burman e DCCR, os resultados obtidos da produção de biomassa e produtividade de biomassa foram analisados utilizando o software "StatisticaTM", versão 7, da Statsoft, Tulsa, EUA.

Para o delineamento DCCR, foram calculados os efeitos linear e quadrático das variáveis independentes e suas interações lineares na produção de biomassa. Sua importância foi avaliada por análise de variância. Superfícies tridimensionais foram ajustadas a cada conjunto de produção de biomassa e a produção estimada. Estas superfícies foram descritas por equação polinomial de segunda ordem. Os coeficientes de primeira e de segunda ordem dessas equações geralmente são desconhecidos e, portanto, foram estimados a partir dos dados experimentais, utilizando o princípio estatístico de mínimos quadrados. O ajuste dos modelos foi avaliado pelo Coeficiente de Determinação (R^2) e R^2 ajustado (R^2_{ajust}) (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; BARROS NETO et al., 2007; RODRIGUES; IEMMA, 2009). Na prática, R^2 deve ser de pelo menos 0,75 ou superior, valores acima de 0,90 são considerados muito bons (HAALAND, 1989).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem dos fatores que afetam a produção de biomassa

Na tabela 5 é apresentada a matriz codificada com os valores experimentais das variáveis respostas, produção de biomassa e produtividade de biomassa, utilizados no processamento dos dados.

Tabela 5 – Matriz de dados codificados para as variáveis estudadas

Ensaio	X ₁ EL %	X ₂ P %	X ₃ T Fos mmol	X ₄ YNB %	X ₅ Glic %	X ₆ pH	X ₇ t h	X ₈ Bt %	Y1 Biomassa mg.mL ⁻¹	Y2 Produtiv. Biomassa (mg.mL ⁻¹).h ⁻¹
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+	+1	5,369	0,075
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	2,797	0,117
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	2,951	0,123
4	+1	-1	+1	+1	-1	1	-1	-1	2,891	0,120
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	8,299	0,115
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	2,636	0,110
7	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	5,208	0,072
8	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	7,305	0,101
9	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	3,22	0,134
10	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	8,673	0,120
11	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	5,705	0,079
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	3,553	0,148
13	0	0	0	0	0	0	0	0	6,258	0,130
14	0	0	0	0	0	0	0	0	6,682	0,139
15	0	0	0	0	0	0	0	0	6,671	0,139

Na etapa de triagem, os efeitos lineares dos 8 fatores em estudo sobre a produção de biomassa e produtividade de biomassa foram calculados (Tabela 7). Um resultado positivo ou um efeito negativo de um fator sobre a resposta (produção de biomassa ou produtividade) indica que um aumento nos valores desse fator é acompanhado por um aumento ou uma diminuição da resposta, respectivamente.

3.1.1. Produção de biomassa

Nas Tabelas 6 e 7 são apresentados os efeitos principais sem a checagem e checando a curvatura, respectivamente, onde se verifica que os valores das variáveis são idênticos, mas os erros padrões listados na tabela 8 são consideravelmente menores, levando à significância as variáveis, tampão fosfato, glicerol, tempo e biotina, revelando seu impacto sobre a produção de biomassa.

Tabela 6 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produção de biomassa (mg.mL^{-1}) (sem checar a curvatura).

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Média	5,2145	0,292	17,868	<0,0001*
EL (%)	0,4538	0,653	0,695	0,5128
Pep (%)	-0,5692	0,653	-0,872	0,4166
T Fos (mM)	-0,9812	0,653	-1,504	0,1834
YNB (%)	0,1388	0,653	0,213	0,8386
Glic (%)	1,2602	0,653	1,931	0,1017
pH	-0,3235	0,653	-0,496	0,6377
Tempo (h)	3,7518	0,653	5,749	0,0012*
Biotina (%)	-0,7572	0,653	-1,160	0,2900

*significativo para $p < 0,10$; $R^2 = 0,87481$ QM Residual = 0,70788

Tabela 7 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produção de biomassa (mg.mL^{-1}) (checando a curvatura).

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	4,884	0,136	35,959	<0,0001*
Curvatura	3,306	0,607	5,443	0,0028*
EL (%)	0,454	0,272	1,671	0,1556
Pep (%)	-0,569	0,272	-2,095	0,0903
T Fos (mM)	-0,981	0,272	-3,612	0,0153*
YNB (%)	0,139	0,272	0,511	0,6310
Glic (%)	1,260	0,272	4,639	0,0056*
pH	-0,323	0,272	-1,191	0,2871
Tempo (h)	3,752	0,272	13,812	<0,0001*
Biotina (%)	-0,757	0,272	-2,787	0,0386

*significativo para $p < 0,10$; $R^2 = 0,98192$ QM Residual = 0,2213607

A produção de biomassa (mg.mL^{-1}) aumenta significativamente com o tempo de crescimento ($p < 0,10$). Além disso, embora com um valor de $p > 0,10$, os

efeitos das seguintes variáveis não pode ser negligenciado na produção de biomassa: um efeito positivo de glicerol e um efeito negativo da molaridade do tampão diminui a produção de biomassa. Assim, a fim de promover a produção de biomassa, deve-se considerar, longo tempo de crescimento, elevados teores de glicerol no meio e a utilização de solução tampão fosfato de baixa molaridade.

3.1.2. Produtividade de biomassa

Para a resposta Produtividade, as Tabelas 8 e 9 apresentam os efeitos principais sem a checagem e checando a curvatura, respectivamente, onde se verifica que o impacto da curvatura é semelhante ao observado na biomassa, levando à significância as variáveis, tampão fosfato, glicerol, e tempo, revelando seu impacto sobre a produtividade.

Tabela 8 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produtividade da biomassa (mg.mL^{-1}).h. (sem checar a curvatura).

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Média	0,1148	0,0046	25,198	<0,0001*
EL (%)	0,0000	0,0102	0,000	1,0000
Pep (%)	-0,0137	0,0102	-1,342	0,2283
T Fos (mM)	-0,0187	0,0102	-1,832	0,1166
YNB (%)	0,0007	0,0102	0,065	0,9499
Glic (%)	0,0153	0,0102	1,505	0,1830
pH	-0,0073	0,0102	-0,720	0,4987
Tempo (h)	-0,0317	0,0102	-3,108	0,0209
Biotina (%)	-0,0137	0,0102	-1,342	0,2283

*significativo para $p < 0,10$; $R^2 = 0,76385$ QM Residual = 0,0000365

Tabela 9 – Efeitos dos fatores considerados no delineamento Plackett-Burman na produtividade da biomassa (mg.mL⁻¹).h (checando a curvatura).

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(5)	p-valor
Média	0,110	0,002	62,757	<0,0001*
Curvatura	0,053	0,008	6,792	0,0011*
EL (%)	0,000	0,003	0,000	1,0000
Pep (%)	-0,014	0,003	-3,916	0,0112*
T Fos (mM)	-0,019	0,003	-5,349	0,0031*
YNB (%)	0,001	0,003	0,191	0,8560
Glic (%)	0,015	0,003	4,394	0,0071*
pH	-0,007	0,003	-2,101	0,0896
Tempo (h)	-0,032	0,003	-9,074	0,0003*
Biotina (%)	-0,014	0,003	-3,916	0,0112*

*significativo para $p < 0,10$; $R^2 = 0,97691$ QM Residual = ,0003113

A otimização da biomassa, aumenta com o tempo de crescimento, e a produtividade, diminui com o tempo. No entanto, como o glicerol favorece a biomassa e não afeta a produtividade, podem-se usar concentrações mais elevadas de glicerol para aumentar a biomassa. Além disso, como a biotina e a peptona não afetam a produtividade, mas afetam a produção de um modo negativo, deve-se trabalhar com baixos teores destes compostos para aumentar a produção. Quanto à molaridade do tampão, convém trabalhar com baixas molaridades porque tanto a biomassa como a produtividade são afetadas negativamente pela alta da molaridade do tampão, conforme a Tabela 9.

3.1.3. Modelagem e otimização da produção

Os valores de biomassa obtidos em cada um dos 12 ensaios do CCRD são apresentados na Tabela 10. Os valores experimentais de biomassa variaram de 1,141 a 7,375 mg.mL⁻¹. De maneira geral os resultados experimentais obtidos estão bem distribuídos pela matriz de dados e os pontos centrais apresentam

pouca variação, indicando que o experimento foi bem conduzido e, portanto, com boa repetibilidade (BOX; HUNTER; HUNTER, 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Tabela 10 – Matriz de dados codificados do delineamento composto central rotacionado (DCCR), em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de *Pichia pastoris* e respectivos resultados experimentais de produção de biomassa (mg.mL^{-1})

Ensaio	Variáveis Independentes codificadas		Variável Resposta
	X1	X2	Y
	Glic (%)	Tempo (h)	Biomassa (mg.mL^{-1})
1	-1	-1	2,881
2	-1	1	5,292
3	1	-1	2,646
4	1	1	7,375
5	-1,41421	0	3,574
6	1,41421	0	7,273
7	0	-1,41421	1,141
8	0	1,41421	6,997
9 (C)	0	0	5,107
10 (C)	0	0	5,184
11 (C)	0	0	5,894
12 (C)	0	0	5,936

Os cálculos para obtenção dos coeficientes de regressão do modelo foram realizados pela soma de quadrados do erro, com o nível de confiança de 95%.

Com o delineamento completo são obtidos diretamente os coeficientes de regressão das respostas, visto que seu impacto é similar ao do efeito. Na Tabela 11 são apresentados os efeitos e na Tabela 12, os coeficientes de regressão para biomassa, onde é possível avaliar o efeito positivo da concentração de glicerol sobre a resposta. A mudança do nível -1 para +1 levou a um aumento da produção de biomassa. O tempo de crescimento também teve um efeito positivo sobre a resposta.

Tabela 11 – Efeitos dos fatores considerados no DCCR em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de *Pichia pastoris* para a produção de biomassa (mg.mL⁻¹)

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Media	-1,274	1,577	-0,808	0,4500
Glic (L)	0,091	1,387	0,066	0,9495
Glic (Q)	-0,183	0,432	-0,423	0,6870
Tempo (L)	0,170	0,047	3,644	0,0108*
Tempo (Q)	-0,001	0,000	-3,210	0,0184*
Glic (L) x Tempo (L)	0,032	0,017	1,885	0,1084

*significativo para $p < 0,05$

A partir dos resultados experimentais da Tabela 11 os efeitos linear e quadrático de cada fator e da interação linear (Glicxtempo) foram calculados (Tabela 12). Tanto o conteúdo de glicerol quanto o tempo de crescimento apresentou ($p < 0,05$) efeitos lineares e positivo na produção de biomassa.

Tabela 12 – Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (modelo completo)

Fatores	Coefficiente de Regressão	Erro Padrão	t(6)	p-valor
Média	5,53	0,307	17,99	0,000002*
Glic (L)	1,77	0,435	4,07	0,006568*
Glic (Q)	-0,21	0,486	-0,42	0,686993
Tempo (L)	3,86	0,435	8,87	0,000114*
Tempo (Q)	-1,56	0,486	-3,21	0,01837*
Glic (L) x Tempo (L)	1,16	0,615	1,89	0,108374

*significativo para $p < 0,05$

A Análise de Variância visa verificar a validade da diferença entre as fontes de variação. Pela Tabela 13 verificou-se que o valor de $F_{\text{calc.}}$ é maior que o $F_{\text{tab.}}$, indicando que existe diferença significativa entre quase todas as fontes de variação, com exceção do nível quadrático de glicerol, sendo necessária uma exclusão dessa fonte de variação pela reparametrização do modelo.

Tabela 13 – Análise de Variância para a resposta produção de biomassa (modelo completo)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p-valor
Glic (L)	6,26434	1	6,26434	16,57352	0,006568*
Glic (Q)	0,06765	1	0,06765	0,17898	0,686993 NS
Tempo (L)	29,72835	1	29,72835	78,65205	0,000114*
Tempo (Q)	3,89438	1	3,89438	10,30334	0,01837*
Glic (L)x Tempo (L)	1,34328	1	1,34328	3,55391	0,108374
Resíduos	2,26784	6	0,37797		
Total	43,51706	11			

*significativo para $p < 0,05$; $F_{\text{tab}}(5, 6) = 8,75$; $R^2 = 0,94633$; $R^2_{\text{ajust.}} = 0,91566$

Nas tabelas 14, 15, 16 e 17 são apresentados os efeitos, os coeficientes de regressão, a análise de variância e o teste para falta de ajuste do modelo selecionado.

O efeito negativo significativo de tempo no nível quadrático (-1,52) na Tabela 14 indica que a produção de biomassa é descrita por uma superfície convexa de resposta em função do tempo. Apesar de ter um $p\text{-valor} > 0,05$, e efeito da interação na produção de biomassa não devem ser ignorados.

Tabela 14 – Efeitos dos fatores considerados no DCCR em função do conteúdo de glicerol e tempo de crescimento de *Pichia pastoris* para a produção de biomassa (mg.mL^{-1}) (modelo selecionado)

Fatores	Efeitos	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Média	5,45	0,22	24,35	$< 0,0001^*$
Glic (L)	1,77	0,41	4,33	0,0034*
Tempo (L)	3,86	0,41	9,44	0,0000*
Tempo (Q)	-1,52	0,45	-3,40	0,0115*
Glic (L) x Tempo (L)	1,16	0,58	2,01	0,0848

*significativo para $p < 0,05$

Tabela 15 – Coeficientes de regressão para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)

Fatores	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	t(7)	p-valor
Media	-0,989	1,339	-0,738	0,484
Glic (L)	-0,365	0,817	-0,447	0,668
Tempo (L)	0,167	0,043	3,859	0,006
Tempo (Q)	-0,001	0,000	-3,395	0,012
Glic (L) x Tempo (L)	0,032	0,016	2,007	0,085

*significativo para $p < 0,05$

A produção de biomassa (mg.mL^{-1}) de dados pode ser bem ajustada para uma superfície convexa (Figura 2) descrito pela seguinte equação do modelo polinomial de segunda ordem, em função do teor de glicerol (Gli, % v/v) e tempo de fermentação (t, h). O modelo selecionado pode ser descrito pela equação 3 abaixo:

$$\text{Biomassa} = -0,989 - 0,365\text{Glic} + 0,167t - 0,001t^2 + 0,032(\text{Glic} \cdot t) \dots\dots\dots \text{Eq. 3}$$

Tabela 16 – Análise de Variância para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p-valor
Glic (L)	6,26433	1	6,26433	18,77559	0,003425*
Tempo (L)	29,72835	1	29,72835	89,10240	0,000031*
Tempo (Q)	3,84561	1	3,84561	11,52613	0,011520*
Glic (L)x Tempo (L)	1,34328	1	1,34328	4,02611	0,084800
Resíduos	2,33550	7	0,33364		
Total	43,51706	11			

*significativo para $p < 0,05$; $F_{\text{tab}}(4, 7; 0,05) = 4,12$; $R^2 = 0,94633$; $R^2_{\text{ajust.}} = 0,91566$

Pela análise da ANOVA da Tabela 16, verificamos que para todas as fontes de variação selecionadas, o F_{cal} da regressão em relação aos resíduos é superior ao F_{tab} indicando que o modelo é válido e o Coeficiente de Correlação é bom, com o modelo explicando 94,63% dos resultados.

Tabela 17 – Teste para falta de ajuste e para a regressão linear para a resposta produção de biomassa (modelo selecionado)

Fonte de Variação	SQ	gl	QM	F	p-valor
Glic (L)	6,26433	1	6,26433	31,5331	0,011164*
Tempo (L)	29,72835	1	29,72835	149,6452	0,001176*
Tempo (Q)	3,84561	1	3,84561	19,3578	0,021766*
Glic (L)x Tempo (L)	1,34328	1	1,34328	6,7617	0,080353
Falta de Ajuste	1,73952	4	0,43488	2,1891	0,272924
Erro Puro	0,59598	3	0,19866		
Total	43,51706	11			

*significativo para $p < 0,05$; $F_{\text{tab}}(4, 3; 0,05) = 9,12$; $R^2 = 0,94633$; $R^2_{\text{ajust.}} = 0,91566$

A falta de ajuste do modelo na Tabela 17, apresentou $p = 0,272924$ e, portanto, não significativo, aceitando-se a hipótese de que a equação do modelo é adequada para descrever os dados, permitindo gerar as superfícies de resposta e as curvas de contorno.

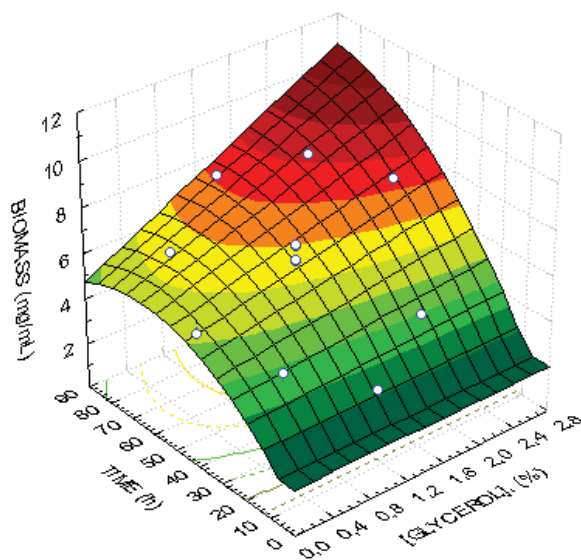


Figura 2 – Superfície de resposta da produção de biomassa a 30°C, em função do conteúdo de glicerol (% v/v) e tempo de crescimento (h).

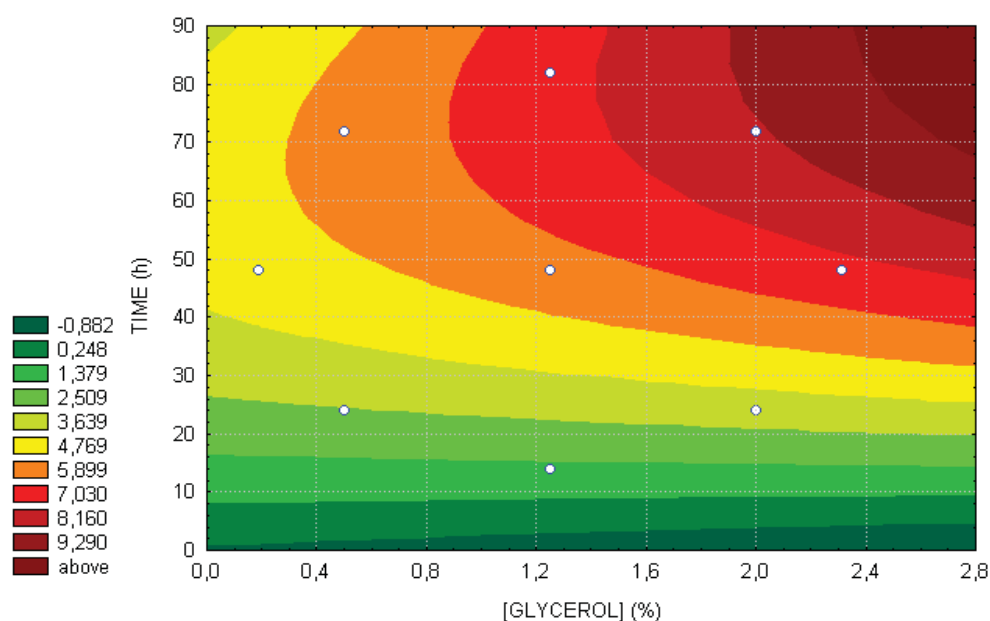


Figura 3 – Curva de contorno da produção de biomassa a 30°C, em função do conteúdo de glicerol (% v/v) e tempo de crescimento (h).

Embora a máxima produção esteja fora do domínio experimental, a Figura 3 mostra que os maiores valores de produção de biomassa são alcançados quando os maiores teores de Glicerol (acima de 2,4%) e longos períodos de crescimento (acima de 70 h) são utilizados.

Pela análise de variância do modelo ajustado apresentada na Tabela 17, os altos valores do Coeficiente de Determinação tanto para R^2 (0,94633) quanto para o R^2 ajustado (0,91566), juntamente com a relação linear entre os valores observados e preditos, apresentados na Figura 4, demonstram o bom ajuste deste modelo aos dados experimentais.

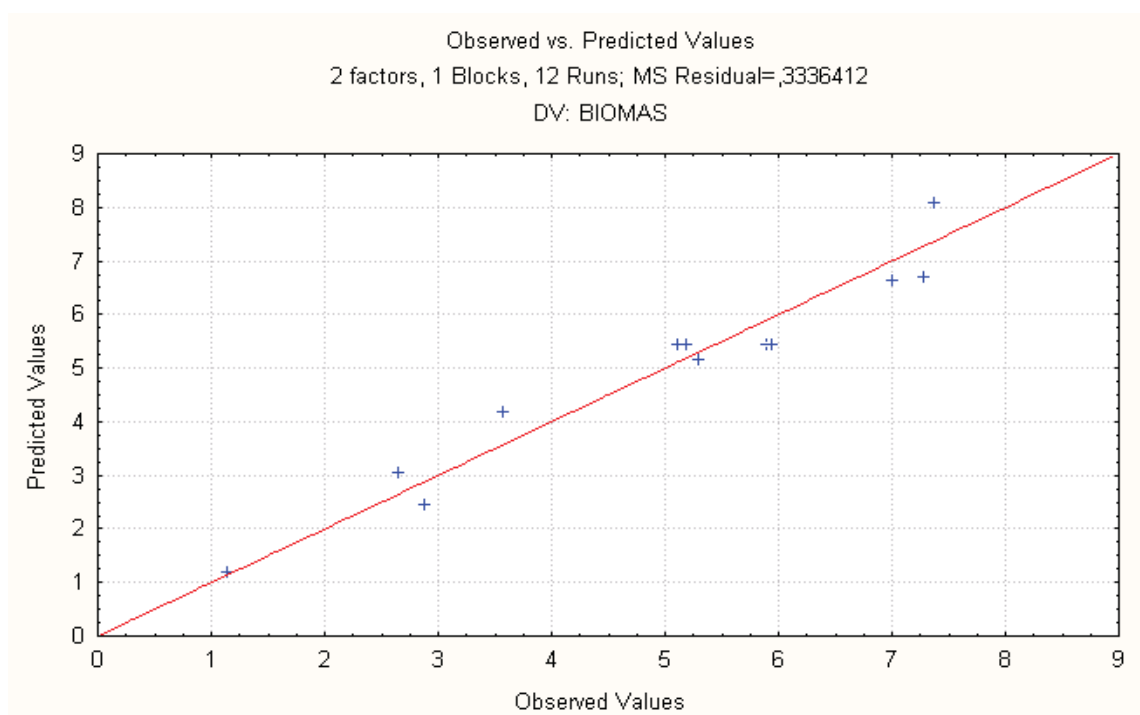


Figura 4 – Valores observados experimentalmente da produção de biomassa e valores preditos pelo modelo.

A biomassa depende significativamente do teor de Glicerol, de uma forma linear, e do tempo tanto a nível linear quanto quadrático. Na Tabela 15 pode-se verificar que a interação não foi retirada do modelo apesar de ter um p-valor de cerca de 0,10, pois, se for retirada, o modelo perde o seu ajuste. Ou seja, o efeito da interação não deve ser desprezado.

4. CONCLUSÃO

- O tempo de crescimento em meio de cultura BMGY foi de 24 horas, e o tempo de indução em meio de cultura BMMY de 48 horas.
- As variáveis selecionadas no *Screening Design* para serem estudadas no DCCR foram glicerol e tempo, com $R^2 = 0,97691$ e QM Residual = 0,003113.
- O modelo matemático obtido no DCCR, com $R^2 = 0,94633$ e QM_{Erro} Puro = 0,19866 foi:

$$\text{Biomassa} = -0,98 - 0,365 \cdot \text{Glic} + 0,167 \cdot t - 0,001 \cdot t^2 + 0,032 \cdot \text{Glic} \cdot t$$

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEMBERG, R. **Produção de glicerol quinase em recombinante de *Pichia pastoris***. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Curso Ciência de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP, 2011.

ARAGON, C. C., FERREIRA-DIAS, S., GATTÁS, E. A. L., PERES, M. F. S. Characterization of glycerol kinase from baker's yeast: Response surface modeling of the enzymatic reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, June 2008, p 113-120

BAKIR, M., CERIKSIOGLUN., TIRTIR, A., BERRAK, S., ÖZEK E., CANPOLAT, C. *Pichia anomala fungaemia* in immunocompromised children. **Mycoses**, v. 47, n. 5-6, p. 231-235, 2004.

BALTZ, R.; DAVIES, J. E.; DEMAİN, A. L. (editors in chief). **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. 3th ed. Washington: ASM Press, 2010.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and identification**. Cambridge Univesity Press, UK, 3th, 2000.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos:** pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 3ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007. 480 p.

BOLLOK, M.; RESINA, D.; VALERO, F.; FERRER, P. Recent patents on the *Pichia Pastoris* expression system: Expanding the toolbox for recombinant protein production. **Recent Patents Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 192-201. 2009.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. Statistics for experimenters: design, innovation and discovery. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2005.

BOZE, H., LABORDE, C., CHEMARDIN, P., FABIEN, R., VENTURIN, C., COMBARNOUS, Y., MOULIN, G. High-level secretory production of recombinant porcine follicle stimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Proc. Biochem.** v. 36, p. 907-913, 2001.

CEREGUINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast by *Pichia Pastoris*. **FEMS Microbiol.** v.24, p. 45-66, 2000.

CHAUHAN, A. K., AROA, D., KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. **Proc. Biochem.** v.34, p. 139-145, 1999.

CHEN, C-C., WU, P-H., HUANG, C-T., CHENG, K-J. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase. **Enzyme Microbial Technology**, v.35, p. 315-320, 2004.

CHOI, D. B., PARK, E. Y. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed batch culture of recombinant *Pichia pastoris*. **Proc. Biochem.** v. 41, p. 390-397, 2006.

COS, O., RAMÓN, R., MOTESINOS, J. L., VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories**, v. 6, p. 5-17, 2006.

CREGG, J. M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. **Methods Enzymology**, v. 463, p. 169-189. 2009.

D'ANJOU, M. C., DAUGULIS, A. J. Mixed-feed exponential feeding for fed-batch culture of recombinant methylotrophic yeast. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 141-146, 2000.

HAALAND, P. D., in: OWEN, D. B. (Ed.), Experimental Design in Biotechnology, Statistics: Textbooks and Monographs, Marcel Dekker Inc., New York and Basel, p. 258, 1989.

HARTNER, M F. S.; RUTH, C.; LANGENEGGER, D.; JOHNSON, S.; HYTRA, P.; LIN-CEREGUINO, J.; KOVAR, K.; CREGG, J. M. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n.12, e76. 2008.

INVITROGEN. The EasySelect[®] Pichia expression kit: **A manual of Methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and pPICZ α α in *Pichia pastoris***. Catalog no. K1740-01. Vienna, Áustria: Invitrogen Co. 2010

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal Biotechnology**, v. 102, n.1, p. 45-53, 2003.

JUNGO, C.; MARISON, I.; STOCKAR, U. V. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. **Journal Biotechnology**, v. 128, n. 4, p. 824-837. 2007.

KALIDAS, C. *Pichia pastoris*. **Encyclopedia Food Microbiology**, p. 1686-1692. 2004.

KANG, H. K.; YUN, S.; XIA, Y.; KIM, D. Cloning of levansucrase from *Leuconostoc mesenteroides* and its expression in *Pichia pastoris*. **Food Science Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 277-281. 2011.

LI, Z. J., XIONG, F., LIN, Q. S., D'ANJOU, M., DAUGULIS, A J., YANG, D. S. C., HEW, C. L. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expression Purification**, v. 21, p. 438-445, 2001.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, p.249-270, 2005.

MATTANOVICH, D.; BRANDUARDI, P.; DATO, L.; GASSER, B.; SAUER, M.; Recombinant protein production in yeasts. **Methods Molecular Biology**, v. 824, p. 329-368. 2012.

McDONALDS, K. A. 2.32 – Heterologous Protein Expression, In: MURRAY, M-Y, **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, v. 2, p. 441-449. 2011.

OTAG, F., KUYUCU, N., ERTURAN, Z., SEN, S., EMEKDAS, G., SUGITA, T. An outbreak of *Pichia ohmeri* infection in the pediatric intensive care unit: case reports and review of the literature. **Mycoses**. v.48.p.265-269, 2005.

PAULOVÁ, L.; HYKA, P.; BRASKÁ, B.; MELZUCH, K. KOVAR, K. Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut⁺. **Journal Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 180-188. 2012.

PERES, M. F. S.; SILVA, V. C.; VALENTINI, S. R.; GATTÁS, E. A. L. Recombinant expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase using the *Pichia pastoris* system. **Journal Molecular Catalysis B: Emzimatic**, v. 65, p. 128-132, 2010.

PLANTZ, B. A., SINHA, J., VILLARETE, L., NICKERSON, K. W., SCHLEGEL, V. L. *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 72, n. 2, 297–305, 2006.

RAMÓN, A.; MARÍN, M. Advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 700-706, 2011.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª. ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2009.

RYU, H. J.; SEO, E. S.; KANG, H. K.; KIM, Y. M.; KIM, D. Expression, purification, and characterization of human intestinal maltase secreted from *Pichia pastoris*. **Food Science Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 561-565. 2011.

SCORER, C. A., BUCKHOLS, R. G., CLARE, J. J., ROMANOS, M. A. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**. v. 136. n. 1-2, p.111-119, 1993.

SHI, X., KARKUT, T., CHAMANKHAH, M., ALTING-MEES, M., HEMMINGSEN, S. M., HEGEDUS, D. Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody

(scFv) gene in *Pichia pastoris*. **Protein Express Purification**, v. 28. p. 321-330, 2003.

SILVEIRA, V. D. **Micologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. 336p.

STADLMAYR, G.; MECKLENBRÄUKER, A.; ROTHMÜLLER, M.; MAURER, M.; SAUER, M.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Identification and characterisation of novel *Pichia pastoris* promoters for heterologous protein production. **Journal Biotechnology**, v. 150, N. 4, p. 519-529. 2010.

STRATTON, J.; CHIRUVOLU, V.; MEAGHER, M. High Cell-Density Fermentation. In: *Pichia* prothocols. **Methods Molecular Biology**, v. 103, p. 107-120. 1998

TININIS, C. R. C. S. **Ensaio enzimático para dosagem de glicerol**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Curso Ciência de Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP, 2001.

TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P. Proteínas recombinantes produzidas em leveduras. **Biotecnologia Ciência Desenvolvimento Brasil**, v. 12, p. 20-22, 2000.

TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P., DE MARCO, J. L. POÇAS-FONSECA, M. J. FELIPE, M. S. S. **O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas**. In: BON, E. P. S., FERRARA,, M. A., CORVO, M. L.

(editores). Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ; CAPES; FAPERJ; FCT (Portugal), 2008.

WANG, Y.; WANG, Z.; DU, G.; HUA, Z. LIU, L. CHEN, J. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1343-1349, 2009.

WERTEN, M. W. T.; BOSCH, T.J. V.D.; WIND, R. D.; MOOIBROEK, H.; WOLF, F. A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, p. 1087-1096. 1999.

XIE, J., ZHOU, Q., DU, P., GAN, R., YE, Q. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enzyme Microbial Technology**, v. 36, n. 1-2, p. 210-216, 2005.

ZHAO, P.; CAO, G. Production of bioactive sheep β -defensin-1 in *Pichia pastoris*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 39, n.1, 11-17. 2012.

CAPÍTULO 3

Estudo de parâmetros do meio de cultivo para a produção de glicerol quinase usando a levedura de *Pichia pastoris*

RESUMO

A expressão heteróloga de proteínas tem sido à base das indústrias de biotecnologia industrial e farmacêutica nos últimos anos e a levedura *Pichia pastoris* tem ampla utilização como um eficiente sistema de expressão de proteínas. O conhecimento dos parâmetros do meio de cultivo é importante para maximizar essa expressão. Nessa etapa foi realizado um estudo dos parâmetros do meio de cultivo para produção da enzima glicerol quinase. O tempo de crescimento e indução em meio de cultivo BMMY foi de 48 horas. As melhores condições de concentração do meio foram: 1 % de extrato de levedura, 2% de peptona, 0,100 mg/mL de cultura do inóculo inicial, 100 mmol/L de tampão fosfato de potássio em pH 6,0, 1,34% de YNB, 0,100% de metanol na fase de indução e 4×10^{-5} % de biotina. A atividade nessas condições foi de $0,796 \pm 0,28$ U.mL⁻¹.

Palavras-chave: Levedura geneticamente modificada, Glicerol quinase, Expressão.

ABSTRACT

The heterologous expression of proteins has been the basis for the biotechnology industry and pharmaceutical industry in recent years and the yeast *Pichia pastoris* has wide use as an efficient system of expression of proteins. The knowledge of the parameter settings of the culture medium is important to maximize this expression. In this step was a study of the parameters of the medium for production of the enzyme glycerol kinase. The time of induction and growth in culture medium BMMY was 48 hours. The best conditions were averaged concentration of the medium: 1% yeast extract, 2% peptone, 0.100 mg.mL⁻¹ of culture initial inoculum. 100 mmol.L⁻¹ of potassium phosphate buffer pH 6.0, 1.34% YNB, 0.100% of methanol in the induction phase and 4x10⁻⁵ % of biotin. The activity under these conditions was 0.796 ± 0.28 U.mL⁻¹.

Keywords: Genetically modified yeast, Glycerol kinase, Expression.

1. INTRODUÇÃO

A importância da quantificação do glicerol extrapola a conservação dos alimentos, e vai além da área clínica, médica e indústria de bebidas. As indústrias de etanol combustível e biodiesel têm interesse na dosagem do glicerol. O melhoramento da produção de enzimas a serem usadas no ensaio enzimático do glicerol envolve os sistemas gênicos de indução e repressão relacionados com o metabolismo do glicerol pela célula de levedura. As vias de síntese e degradação do glicerol são ocorrência universal para todas as células vivas, e qualquer conhecimento novo sobre o funcionamento e regulação destas vias, bem como das enzimas envolvidas são, portanto, muito relevantes.

A enzima glicerol quinase (GK) participa da fosforilação do glicerol na presença de ATP e íons magnésio. A produção de GK a partir de *Pichia pastoris* foi possível neste trabalho utilizando microrganismo geneticamente modificado, capaz de secretar a enzima para o meio de cultivo.

A levedura *Pichia pastoris* é atualmente um dos sistemas mais eficazes e versáteis para a expressão de proteínas heterólogas. Este desenvolvimento foi impulsionado principalmente pelas ferramentas genéticas prontamente disponíveis e da facilidade de cultivo de alta densidade de células usando metanol (ou metanol/misturas de glicerol) como indutor e fonte de carbono. O seu sucesso é devido ao seu potente promotor álcool oxidase-1 (AOX1), a capacidade para realizar modificações pós-translacionais e vias que conduzem a secreção

recombinante de produtos. Apesar das suas vantagens, o cultivo de *Pichia pastoris* é limitado por níveis elevados de expressão de protease, sensibilidade elevada a níveis de metanol, deficiência de nutrientes, quando cultivadas em meio definido, as dificuldades em estudo de sistemática devido aos efeitos de produtos específicos, e as preocupações de saúde e segurança associado com o armazenamento de grandes quantidades de metanol. Também surgem dificuldades que são específicas para os métodos de cultivo e estratégias de controle utilizadas. Para superar as limitações observadas de utilização de metanol como o desenvolvimento de calor elevado, a lise das células, e perigo de explosão, considerando a possibilidade de produzir proteínas com *Pichia pastoris* usando glicose como única fonte de carbono (POTVIN et al., 2010; HEYLAND et al. 2010).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Propriedades da enzima glicerol quinase

Glicerol quinase ou gliceroquinase (GK; EC 2.7.1.30; ATP: glicerol-3-fosfato-transferase) catalisa a fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato (JIN et al., 1982; CRANS; WHITESIDES, 1985; STEPANIAN et al., 2003; WIGHTMAN et al. 2012). Esta reação é dependente de magnésio e ATP. A enzima atua como um fator limitante do metabolismo de glicerol de diversos microrganismos, como *E. coli*, em reação regulada por metabólitos como frutose 1,6-bifosfato, adenina e proteína fosfocarreadoras III (SAKASEGAWA et al., 2001; WIGHTMAN et al. 2012).

A GK foi isolada pela primeira vez por Bublitz e Kennedy (1954), de fígado de rato. A GK é encontrada em órgãos e tecidos de animais e também em vários microrganismos (BRISSEON et al., 2001, WIGHTMAN et al. 2012). As características desta enzima são bastante variáveis conforme a fonte. Diversos pesos moleculares foram descritos: 53.000 Da, para GK obtida de *Trypanosoma brucei* (KRAKOW; WANG, 1990); 236.000 Da foi o tamanho da enzima extraída de *Debaryomyces hansenii* (NILSSON et al., 1989); 300.000 Da foi o peso molecular da GK de *E. coli* encontrado por Brisson et al. (2001).

O glicerol é um importante substrato gliconeogênico no fígado e no rim por causa da elevada atividade de glicerol quinase (EC 2.7.1.30). No entanto, músculo, cérebro e outros tecidos também conter glicerol quinase. Glicerol também tem implicações importantes por L-glicerol-3-fosfato (G3P) que

desempenha um papel-chave no metabolismo dos lipídeos e na homeostase de energia (TALEUX et. al. 2009).

Os valores de pH ótimo de reação variaram de 7,0-9,5 para enzimas de *Trypanosoma brucei*, de 9,0-9,5 para enzima de *Thermus flavus*; 7,0-8,0 para GK de *Debaryomyces hansenii* (KRAKOW; WANG, 1990; HUANG et al., 1997; NILSSON et al., 1989). A afinidade pelo substrato (glicerol) também é variável conforme a fonte de enzima. Huang et al. (1997), mostraram valores de K_m da enzima nos valores: $3,8 \times 10^{-5}$ M (*T. flavus*); $1,3 \times 10^{-6}$ M (*E. coli*); 8×10^{-5} M (*C. mycoderma*); e $4,2 \times 10^{-5}$ M para GK de fígado humano.

A glicerol quinase de *E. coli* foi purificada, cristalizada e algumas de suas propriedades foram determinadas (LIN et al., 1962; KOGA et al., 1998; BRISSON et al., 2001). Foi ativada por magnésio e manganês, apresentando o valor de K_m da ordem de $1,3 \times 10^{-6}$ M em reação contendo glicerol como substrato. Íon Ca^{++} também é citado como ativador da enzima, enquanto os íons Cd^{++} , Cu^{++} e Co^{++} provocaram inibição da atividade da GK de *Bacillus subtilis* e de *Pediococcus pentosaceus* (HUANG et al., 1997; PASTERIS; SAAD, 1998).

Em um estudo da atividade da enzima glicerol quinase proveniente de extratos de levedura seca de panificação, foram obtidos valores de K_m da enzima entre 1,99 mmol e 3,11 mmol e $V_{\max}$, entre $1,14 \text{ U.mL}^{-1}$ e $1,19 \text{ U.mL}^{-1}$ (ARAGON et al., 2008).

2.2. *Pichia pastoris* como um sistema de expressão

A capacidade da levedura *Pichia pastoris* de usar metanol como fonte de carbono e energia foi descrita pela primeira vez cerca de 40 anos atrás e desde então várias características deste organismo têm favorecido o seu desenvolvimento como um sistema heterólogo de expressão de proteína.

A maioria do seu sucesso vem da sua manipulação genética relativamente fácil, semelhante ao de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, o DNA linear pode ser eficientemente inserido através de métodos de recombinação homóloga produtoras de linhas celulares estáveis (mesmo para inserções de cópia de multi) e na ausência de pressão de seleção. Recentemente, *Pichia pastoris* demonstrou sua capacidade de produzir corretamente grandes quantidades de proteínas solúveis cruzadas intra e extracelular, que transportam as modificações encontradas normalmente em células eucarióticas, tais como pontes dissulfeto, as clivagens proteolíticas e glicosilação. Para fins de larga escala, esta célula hospedeira permite alta densidade de crescimento, requerendo meio de cultura de custo relativamente baixo. Outra vantagem importante do sistema de expressão de *Pichia pastoris* é que ser comercialmente disponível. Várias revisões recentes que descrevem este sistema em detalhes, as suas forças e limitações, tanto conceitualmente ou centrada nos métodos experimentais estão disponíveis (JUNGO; MARISON; STOCKAR, 2007; RAMÓN; MARÍN, 2011).

A levedura *Pichia pastoris* tornou-se últimos anos um dos principais micro-organismos através da biossíntese, para a produção de proteínas recombinantes (ZHAO; CAO, 2012; PORRO et al., 2011; SÜKRAN; ÇALIK, 2011). O estudo da

fermentação de levedura é atualmente muito dinâmico, e *Pichia pastoris* está em via de se tornar um sistema de expressão padrão (POTVIN et al., 2010; HEYLAND et al. 2010).

O sistema de levedura de *Pichia pastoris* é muito procurado para a fabricação industrial de proteínas recombinantes e também é um alvo interessante para melhorar ainda mais a nível genético (CEREGHINO; CREGG, 2000, BOETTNER et. al. 2002; PAULOVÁ et al., 2012).

Várias centenas de proteínas a partir de quase todos os reinos de vida têm sido expressas em levedura presente, quer intracelularmente ou segregada para o meio de cultura (CEREGUINO; CREGG, 2000; HARTNER et al., 2008).

2.3. A produção de proteína heteróloga de *Pichia pastoris*

As leveduras metilotróficas de *Pichia pastoris* podem usar metanol como a sua única de carbono e fonte de energia, na ausência de uma fonte de carbono repressora. Derivado do gene de álcool oxidase 1 (AOX1) da via de utilização de metanol, o promotor AOX1 é conhecido por ser um dos promotores mais fortes e estritamente regulada eucarióticas. Uma grande variedade de proteínas foram expressas utilizando este promotor, com rendimentos de até 14,8 g.L⁻¹ de colágeno de rato (WERTEN, 2009), e verifica-se o rendimento de 20-30 g.L⁻¹ de proteína recombinante (MORROW, 2007). Considerando que a levedura *P. pastoris* prefere na fase de crescimento uma via respiratória, em vez de um modo fermentativo, os produtos de fermentação tais como etanol e ácido acético não se

acumulam rapidamente (CEREGRINO et al., 2002; BALTZ et al., 2010), permitindo que as culturas atinjam elevada densidade celular de 200 g.L⁻¹ peso seco, (HEYLAND et al., 2010). Há uma tendência de *Pichia pastoris* para a secreção de proteínas, mesmo com elevado peso molecular, enquanto que em *S. cerevisiae* as proteínas são principalmente retida no periplasma. Além disso é possível a purificação simples de proteínas secretadas, devido aos níveis relativamente baixos de proteínas endógenas do meio extracelular.

Embora algumas proteínas possam ser expressas em Erlenmeyer, é comum que os níveis de expressão sejam grandemente aumentados em ambiente controlado. Culturas em vasos de fermentador oferecem várias vantagens sobre as culturas em Erlenmeyer, tais como o controle do pH e níveis de oxigênio dissolvido e alimentação contínua de componentes de carbono e outro durante o crescimento celular e expressão da proteína. Uma vez que as células de *P. pastoris* têm uma preferência para o crescimento respiratório, as culturas podem ser cultivadas para densidades celulares extremamente elevadas (até 500 unidades de absorbância a 600 nm). Isto é particularmente importante para a proteína secretada uma vez que as concentrações de proteínas expressas é muitas vezes proporcional à concentração de células em cultura. Os meios comuns definidos para *P. pastoris* de expressão de proteína são compostos de glicose e glicerol como fonte de carbono (BALTZ et al., 2010).

2.4. Objetivos

Os objetivos do presente trabalho são:

- Selecionar o melhor clone de *Pichia pastoris* geneticamente modificados entre os quatro clones estudados;
- Estudar as condições de produção da enzima glicerol quinase através de diferentes níveis de concentração dos componentes do meio de cultivo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. *Micro-organismo*

O microorganismo utilizado foi o clone GK4 da levedura *Pichia pastoris*. Essa levedura foi obtida em parceria com o grupo do Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, FCFAR-Unesp. Para a construção dessa linhagem foi utilizado o sistema de expressão da Invitrogen EasySelect®.

3.2. *Viabilidade Celular*

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se a técnica de coloração com azul de metileno e fazendo a contagem de células (viáveis e totais) em câmara de Neubauer (ANTONINI, 2004).

O método consiste na diluição da amostra com solução de Ringer (formulação no Anexo 2), em que a suspensão celular convenientemente diluída é examinada ao microscópio, onde são feitas as contagens das células vivas e mortas. As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as inativas (mortas) ficam coloridas de azul. A porcentagem ou o número de células viáveis foi determinado transferindo-se a amostra para a câmara de Neubauer com uma pipeta de Pasteur.

Em um tubo de ensaio foi adicionado 0,1 mL da suspensão de levedura do meio BMMY e 0,9 mL da solução de Ringer. O tubo foi fechado e agitado intensamente por 30 segundos e logo após foi deixado em repouso por 1 minuto.

Uma lamínula é colocada sobre a Câmara de Neubauer e com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, um pequeno volume da amostra preparada é transferido para a câmara.

A contagem das células viáveis na amostra foi feita em microscópio, nos aumentos de 400x a 600x. A determinação da viabilidade celular foi calculada em porcentagem pela seguinte fórmula:

$$Viabilidade Celular (\%) = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100$$

3.3. Curva de Crescimento

A curva de crescimento é necessária para se conhecer o perfil de crescimento do micro-organismo e verificar o tempo de acúmulo de produção de biomassa.

A curva de crescimento foi feita em meio de cultivo BMMY para se conhecer o tempo ideal para a determinação da atividade enzimática.

3.4. Concentração de Inóculo

Em aplicações industriais, a levedura é freqüentemente propagada em uma série de etapas até que seja inoculada no meio de cultivo em que será fermentado. A cultura utilizada para inoculação, em muitos casos não está bem definida, uma alta densidade de células é desejável, pois haverá um aumento

proporcional da secreção de proteínas, embora sua condição fisiológica geral possa afetar consideravelmente o resultado, bem como a duração da fermentação (BREJNING; JESPERSEN, 2002; INAN et al., 1999). Por isso é importante conhecer o comportamento do inóculo em concentrações diferentes. Neste trabalho variou-se em 0,050; 0,100 e 0,150 mg.mL⁻¹.

3.5. Condições para crescimento celular e indução da produção de glicerol quinase

As células foram cultivadas em meio YPDA por 24 horas a 30°C, antes de serem utilizadas como pré-inóculo. Para o preparo do pré-inóculo, uma alça de células foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio BMGY, e submetidos a incubação por 24 horas a 30 °C. Após a incubação, as células foram conservadas por uma noite em refrigeração, para sedimentação da biomassa. O sobrenadante foi descartado, e as células concentradas (20-30 mg.mL⁻¹) foram utilizadas como inóculo, com uma densidade inicial de célula de 0,05 mg.mL⁻¹, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio BMMY. Os experimentos foram realizados em Incubadora Refrigerada com Agitação TE-421 Tecnal, operando a 120 rpm a 30°C durante 48 horas.

Após as primeiras 24 horas em meio BMMY, foi adicionado um volume de metanol para concentração final de 0,5% para manutenção da indução a fim de realizar a medida da atividade estudada.

Após as 48 horas de crescimento e indução em BMMY, foi realizada a determinação de biomassa.

3.6. Obtenção do Extrato Enzimático

Em seguida, dois Erlenmeyers contendo 25 mL de meio foram inoculados com descritos no item anterior, reunidos e centrifugados a 15.000 *g* durante 10 minutos, a fim de retirar as células de levedura e utilizar o sobrenadante, no qual está contida a enzima de interesse, considerando que a levedura geneticamente modificada excreta a enzima glicerol quinase no meio extracelular.

3.7. Concentração do Extrato Enzimático

Em seguida, dois Erlenmeyers contendo 25 mL de meio foram inoculados com descritos no item 3.4, reunidos e centrifugados a 15.000 *g* durante 10 minutos, a fim de retirar as células de levedura e utilizar o sobrenadante, no qual está contida a enzima de interesse, considerando que a levedura geneticamente modificada excreta a enzima glicerol quinase no meio extracelular. Em seguida foi feita a concentração do meio utilizando membranas filtrantes da Amicon® Ultra-15 dotadas de dispositivos de filtro de baixa afinidade com membranas para centrifugação Ultracel®, da MILLIPORE (modelo 10.00 MWCO) através de centrifugação a 2.800 *g* na temperatura de 17 °C, para posterior dosagem de glicerol e proteína total.

A concentração em membranas foi feita nos ensaios de seleção de clones.

Nos ensaios de produção de glicerol quinase, a concentração do extrato enzimático obtido com o cultivo da levedura em meio BMMY foi feito por liofilização, com o propósito de aumentar a produção, onde as amostras contendo 0,225 g foram suspensas em 5 mL de tampão Tris-HCl 0,01 mol.L⁻¹ para a dosagem da atividade.

3.8. Determinação da proteína total do extrato celular de levedura

O Método de Lowry (LOWRY et al., 1951) é um método colorimétrico para estimação quantitativa de proteínas totais. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalizador cobre (Cu⁺²), e produz um composto com absorção máxima em 750 nm.

O mecanismo de redução do reagente de Folin-Ciocalteu por proteínas ocorre diretamente através das cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina), que contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica dos peptídeos e proteínas, que é facilitada pela formação do quelato entre o cobre e os peptídeos/proteínas.

Os teores de proteínas totais foram determinados por espectroscopia em um comprimento de onda de 750 nm utilizando uma curva padrão de BSA.

A principal vantagem do método de Lowry é a sua alta sensibilidade, por isto, tem sido utilizado para a determinação da concentração de proteínas totais

em diversos meios, sendo eles: plasma sanguíneo, saliva humana, tecido animal, plantas, suco biliar, membranas, derivados do leite e produtos alimentícios. (ZAIA et al., 1998)

3.9. Ensaio de atividade de Glicerol quinase (GK)

O ensaio enzimático foi realizado em espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, por meio de uma modificação de ensaio de Wielland (1962), utilizando-se da seguinte mistura: 0,070 mL de NAD^+ $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$; 0,070 mL de ATP $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$; 0,900 mL de tampão glicina-hidrazina ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de tampão glicina/NaOH a pH 9,8, contendo $0,88 \text{ mol.L}^{-1}$ de hidrazina hidrato); 0,210 mL de sulfato de magnésio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$; 0,330 mL de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$; 0,220 mL de água destilada; 0,400 mL de glicerol-fosfato-desidrogenase (Sigma nº G6751-1KU), diluído; 0,200 mL de extrato enzimático (glicerol quinase) diluído, totalizando 3,3 mL em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

Tanto a enzima glicerol-3-fosfato-desidrogenase, quanto o extrato enzimático de glicerol quinase foram diluídos em solução Tris-NAF 10 mmol.L^{-1} , pH 7,2.

O procedimento adotado para medir a atividade da enzima GK foi realizada em espectrofotômetro que teve ajustado o comprimento de onda a 340 nm e a velocidade de reação de 15 em 15 segundos em um intervalo de 120 segundos. O aparelho foi zerado com o branco-substrato, que é preparado com todos os reagentes da reação com exceção da amostra enzimática, que é substituída pela

água destilada, para que assim seja descontada a absorbância de cada reagente na reação final.

O processo de leitura foi iniciado com a leitura do branco-enzima, preparado com todos os reagentes, com exceção do glicerol como substrato com o objetivo de descontar da reação, a absorbância dada pela amostra contendo a enzima GK. Em seguida foi realizada a leitura da reação contendo todos os reagentes e a amostra contendo a enzima GK. Os valores do branco-enzima foram subtraídos dos valores da reação contendo a amostra enzimática e as diferenças foram utilizadas para a realização dos cálculos de atividade e a obtenção da curva de tempo.

$$U / mL = \frac{\Delta A \times V \times dil}{\Delta t \times \epsilon \times d \times v}$$

Onde:

ΔA = variação da absorbância no comprimento de onda em $\lambda=340\text{nm}$

V = volume do ensaio em mL

dil = diluição da enzima

Δt = tempo de variação (min)

ϵ = coeficiente de absortividade molar do NADH=6,22 em $(\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^2)^{-1}$

d = caminho ótico (cm)

v = volume de amostra no ensaio (mL)

A atividade catalítica específica foi expressa através do quociente de atividade ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$) e pelo conteúdo protéico (Cp) ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), sendo portanto expressa em $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de clones

Os quatro clones resultantes do processo de clonagem da levedura geneticamente modificada foram submetidos à análise de atividade da enzima glicerol quinase que apresentaram diferenças entre si, cujos resultados são apresentados nos gráficos das Figuras 1 a 4.

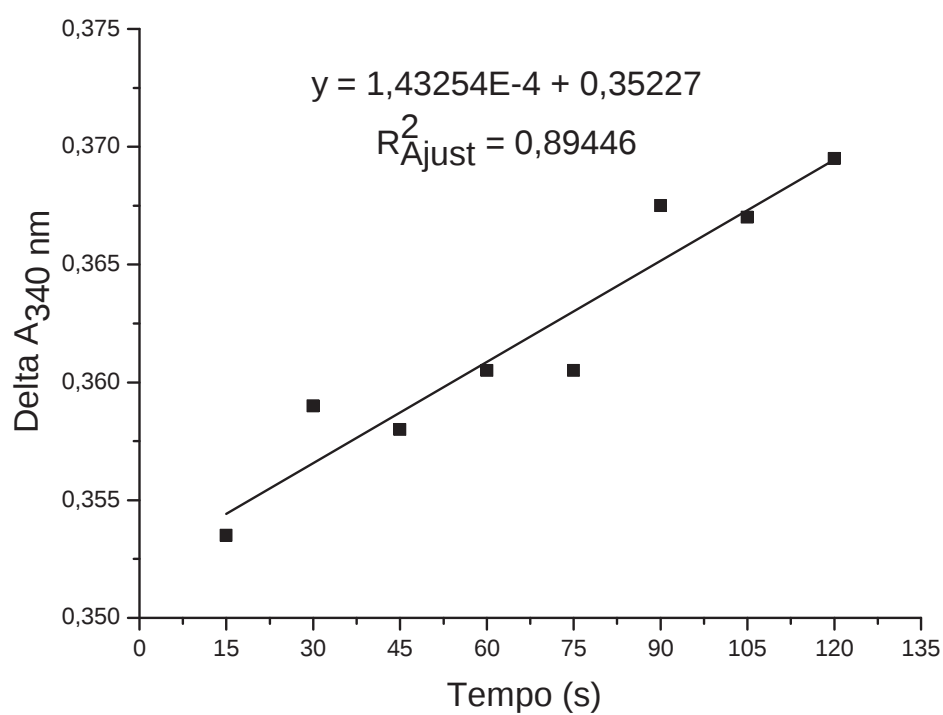


Figura 1 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK1

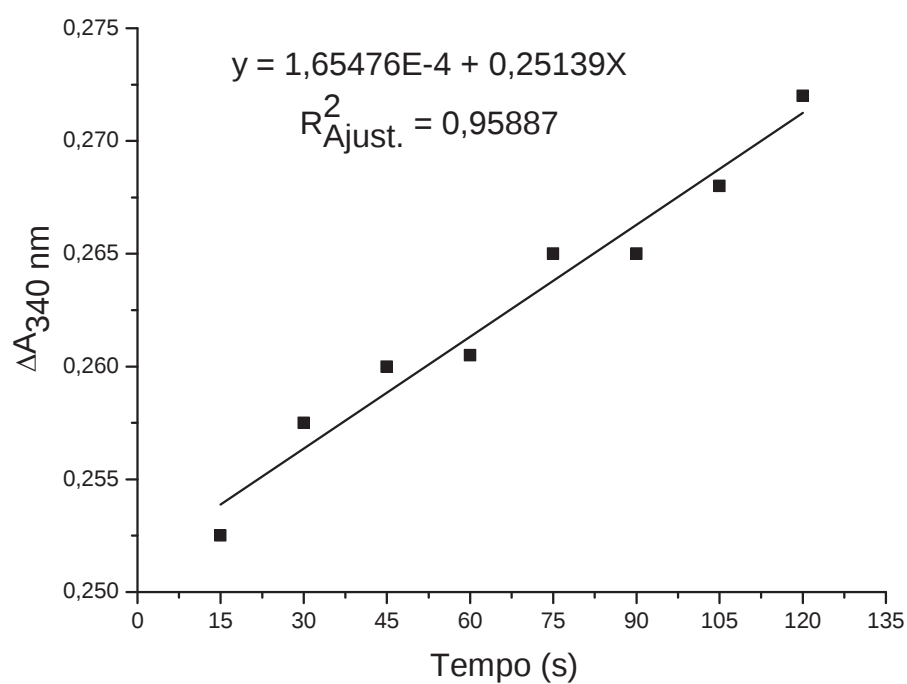


Figura 2 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK2

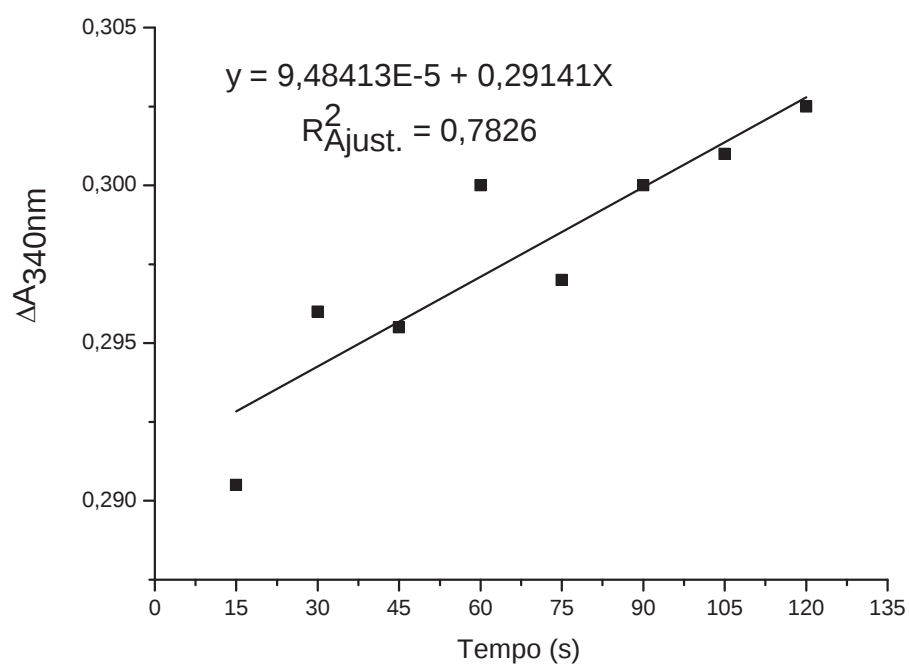


Figura 3 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK3

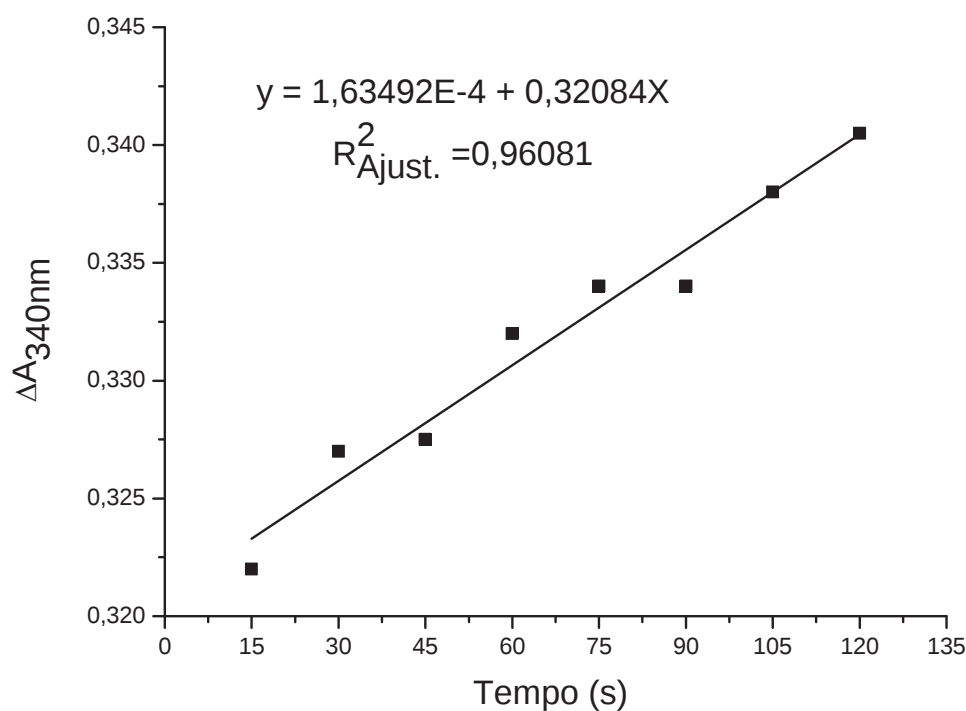


Figura 4 – Atividade da enzima produzida pelo clone GK4

Nos resultados apresentados na Tabela 1, verifica-se que o Clone GK4 apresentou, os maiores valores de atividade entre os quatro clones estudados. Portanto, esse clone foi o selecionado para os demais experimentos utilizados ao longo dessa pesquisa.

Tabela 1 – Atividade da glicerol quinase excretada extracelularmente pelos clones

Clone	Proteína Mg.mL ⁻¹	Atividade U.mL ⁻¹
GK1	11,2±0,166	0,32±0,0000
GK2	16,8±0,941	0,48±0,1838
GK3	25,3±1,228	0,19±0,1163
GK4	16,9±0,003	0,6±0,0000

Condições de cultivo: meio BMMY contendo 0,5% de metanol, densidade inicial de célula de 0,05 mg/mL e 48 horas de indução.

4.2. Curva de crescimento

Após 120 horas de crescimento e indução em meio BMMY, foi possível encontrar o tempo ideal de 48 horas, em que a viabilidade celular é máxima, como observado na Figura 5.

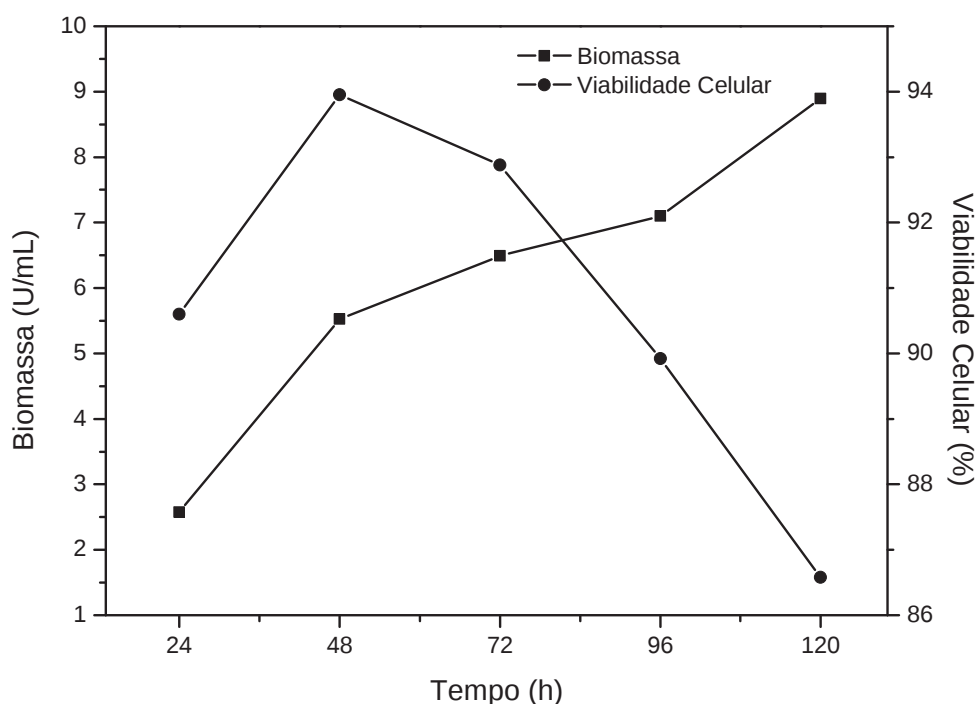


Figura 5 – Determinação de biomassa e viabilidade celular do crescimento de *Pichia pastoris* em meio BMMY

4.3. Condições do meio de cultivo

Determinações de biomassa, viabilidade celular e atividade de glicerol quinase após 48 horas de crescimento foram obtidas com a levedura *Pichia pastoris* em 3 níveis diferentes de concentração para o estudo dos parâmetros a seguir:

4.3.1. Concentração de extrato de levedura

A concentração do extrato de levedura apresentou pequena diferença nos níveis de 0,5 e 1%, como está apresentado na Tabela 2. Optou-se pela escolha da concentração de 1% por apresentar menor proteína total e portanto melhor atividade específica quando comparada com a concentração de 0,5%.

Tabela 2 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de extrato de levedura.

Concentração de Extrato de Levedura (%)	Biomassa mg/mL	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
0,5	5,801±0,76	88,60±5,50	178,15±12,04	1,077±0,49	6,05
1,0	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
1,5	6,110±1,20	94,60±1,81	205,71±26,75	0,594±0,23	2,89

4.3.2. Concentração de peptona

Foram utilizadas Concentrações de peptona de 1,5; 2,0 e 2,5%. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 a melhor concentração de peptona foi no nível de 2%.

Tabela 3 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de peptona.

Concentração de Peptona (%)	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
1,5	5,801±0,76	89,81±6,08	170,35±10,17	0,785±0,56	4,69
2,0	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
2,5	6,110±1,20	93,68±2,07	194,21±25,26	0,684±0,36	3,35

4.3.3. Concentração do inóculo inicial

Foram utilizadas densidades iniciais de célula (concentração de inóculo) de 0,050; 0,100 e 0,150 mg/mL. Os melhores resultados obtidos para produção de

glicerol quinase foram com a concentração de inóculo inicial ao nível de 0,1% , como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de inóculo inicial.

Concentração Inóculo Inicial mg/mL	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular %	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
0,050	5,886±1,62	90,46±6,63	185,28±18,23	0,316±0,43	1,17
0,100	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
0,150	6,263±0,59	92,66±2,98	210,69±23,57	0,902±0,54	4,83

4.3.4. Concentração de tampão fosfato de potássio

Foram utilizadas concentrações de tampão fosfato de potássio em pH 6, de 50; 100 e 150 mmol.L⁻¹. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 a melhor concentração foi a de 100 mmol.L⁻¹.

Tabela 5 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicerol quinase em diferentes concentrações de tampão fosfato de potássio.

Concentração de Tampão fosfato de Potássio mmol/L	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
50	6,166±0,41	89,81±6,08	158,27±12,04	0,674±0,24	4,26
100	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
150	6,118±0,86	93,68±2,07	237,54±28,82	0,913±0,61	3,84

4.3.5. Concentração de YNB

Foram testadas concentrações YNB de 0,67; 1,34 e 2,01%, onde a melhor concentração foi a de 1,34%, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicérol quinase em diferentes concentrações de YNB.

Concentração de YNB (%)	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
0,67	5,999±1,08	90,24±6,03	182,51±12,04	0,753±0,31	4,13
1,34	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
2,01	5,912±0,95	92,61±2,97	215,84±30,13	0,982±0,50	4,55

4.3.6. Concentração do metanol na fase de indução

Foram testadas concentrações de 0,075; 0,100 e 0,125% de metanol no meio de cultivo BMMY após 48 horas de crescimento e indução, obtendo-se as melhores condições na concentração de 0,100% de metanol. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicérol quinase em diferentes concentrações de metanol.

Concentração De Metanol (%)	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
0,075	6,029±1,28	90,05±6,62	168,26±14,34	0,316±0,43	1,87
0,100	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
0,125	5,882±0,45	93,07±3,22	196,65±26,75	0,902±0,54	4,59

4.3.7. Concentração de Biotina

As concentrações de biotina testadas foram: 2x10⁻⁵, 4x10⁻⁵ e 6x10⁻⁵%, onde os melhores resultados foram obtidos na concentração de 4x10⁻⁵%, e os dados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Produção de biomassa, viabilidade celular, proteína total e atividade da enzima glicérol quinase em diferentes concentrações de biotina.

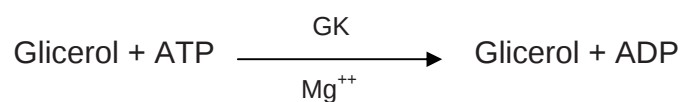
Concentração de Biotina (%)	Biomassa mg.mL ⁻¹	Viabilidade Celular (%)	Proteína Total mg.mL ⁻¹	Atividade	
				U.mL ⁻¹	U.mg ⁻¹ x10 ⁻³ de proteína
2x10 ⁻⁵	5,807±1,15	90,24±6,03	183,34±15,40	0,982±0,50	5,36
4x10 ⁻⁵	5,997±0,83	93,13±2,46	121,15±2,34	0,796±0,28	6,57
6x10 ⁻⁵	6,104±0,83	92,61±2,97	198,87±20,35	0,753±0,31	3,70

5. CONCLUSÃO

- Na seleção de clones estudados (GK1, K2, GK3 e K4) foi selecionado o clone GK4 que apresentou os melhores resultados: proteína bruta $16,993 \text{ mg.mL}^{-1}$ e atividade enzimática de $0,63672 \text{ U.mL}^{-1}$.
- As melhores condições do meio de cultivo para a produção de glicerol quinase foram:
 - o O tempo de crescimento e indução em meio BMMY foi de 48 horas.
 - o Concentração de extrato de levedura foi de 1%.
 - o Concentração de peptona foi de 2%.
 - o Concentração de inóculo inicial para a produção da enzima GK foi de $0,100 \text{ mg.mL}^{-1}$ de cultura.
 - o Concentração do tampão fosfato de potássio de 100 mmol.L^{-1} em pH 6,0.
 - o Concentração de YNB foi de 1,34%
 - o Concentração de metanol na fase de indução foi de 0,100%
 - o Concentração de biotina foi $4 \times 10^{-5}\%$.

A enzima glicerol quinase atua como fator limitante no metabolismo de glicerol de diversos micro-organismos. Esta enzima catalisa a fosforilação do

glicerol a glicerol-3-fosfato, com a transferência do grupamento fosfato da molécula de ATP, conforme a reação:



A glicerol quinase tem aplicação na indústria de alimentos e bebidas em metodologias analíticas de Análises Clínicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONINI, S. R. C. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. UFSCar. Depto. Tecnologia Aroindustrial e Sócio-Economia Rural. Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras, 2004

ARAGON, C. C. **Glicerol quinase de levedura de panificação**. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Curso Ciência de Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2008.

BALTZ, R.; DAVIES, J. E.; DEMAIN, A. L. (editors in chief). **Manual of industrial microbiology and biotechnology**. 3th ed. Washington: ASM Press, 2010.

BOETTNER, M.; PRINZ, B.; HOTZ, C.; STAHL, U.; LANG, C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. **Journal Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 51-62. 2002.

BREJNING, J.; JESPERSEN, L. Protein expression during lag phase and growth initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 1-2, p. 27-38, 2002.

BRISSON, D. VOHL, M. C., ST-PIERRE, J., HUDSON, T. J., GAUDET, D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes. **Bio Essays**, v. 23, p. 534-542, 2001.

BUBLITZ, C., KENNEDY, E. P. Synthesis of phosphatides in isolated mitochondria. The enzymatic phosphorylation of glycerol. **Methods Enzymol.** V. 211, p. 951-961. 1954.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 329-332. 2002.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CRANS, D. C., WHITESIDES, G. M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, sn-glycerol-3-phosphate, and chiral analogs. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107. n. 24, p. 7019-7027, 1985.

HARTNER, M. F. S.; RUTH, C.; LANGENEGGER, D.; JOHNSON, S.; HYTRA, P.; LIN-CEREGUINO, J.; KOVAR, K.; CREGG, J. M. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n.12, e76. 2008.

HEYLAND, J.; FU, J.; BRANCO, L. M.; SCHMID, A. Quantitative physiology of *Pichia pastoris* during glucose-limited high-cell density fed-batch cultivation for

recombinant protein production. **Biotechnology Bioengineering**, v. 107, n. 2, p. 357-368. 2010.

HUANG, H. S., YOSHIDA, T., MENG, Y., KABASHIMA, T., ITO, K., NISHIYA, Y., KAWAMURA, Y., YOSHIMOTO, T. Purification and characterization of thermostable glycerol kinase from *Thermus flavus*. **Journal Fermentation Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 328-332, 1997.

INAN, M.; CHIRUVOLU, V.; ESKRIDGE, K. M.; VLASUK, G. P.; DICKERSON, K. BROWN, S.; MEAGHER, M. M. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-bath fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant by *Pichia pastoris*. **Enzyme Microbial Technology**, v. 24, p. 438-445, 1999.

JIN, R. Z.; FORAGE, R. G.; LIN, E. C. C. Glycerol kinase as a substitute for dihydroxyacetone kinase in a mutant of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 152, n. 3, p. 1303-1307, 1982.

JUNGO, C.; MARISON, I.; STOCKAR, U. V. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. **Journal Biotechnology**, v. 128, n. 4, p. 824-837. 2007.

KOGA, Y.; ,ORIKAWA, M.; HARUKI, M.; NAKAMURA, H.; IMANAKA, T.; KANAYA, S. Thermostable glycerol kinase from a hyperthermophilic archaeon: gene cloning

and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Engineering*, v. 11, n. 12, p. 1219-1227, 1998.

KRAKOW, J. L., WANG, C. C. Purification and characterization of glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 43, n. 1, p. 17-25, 1990.

LIN, E. C. C., KOCH, J. P., CHESED, T. M., JORGENSEN, S. E. Utilization of I- α glycerol phosphate by *E. coli* with hydrolysis. **Proc. Natl. Aca. Sci. USA**. V. 48, p. 2145-2150, 1962.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275. 1951.

MORROW, K. J. Improving protein production processes. **Genetic Engineering Biotechnology News**, v. 27, p. 50. 2007.

NILSSON, A., THOMSON, K. S., ADLER, L. Purification and characterization of glycerol kinase in salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 991, n. 2, p. 296-302, 1989.

PASTERIS, S. E., SAAD, A. M. S. Characterization of glycerol kinase and NAD-independent glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Pediococcus pentosaceus* N5p. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 93–97, 1998.

PAULOVÁ, L.; HYKA, P.; BRASKÁ, B.; MELZUCH, K. KOVAR, K. Use of a mixture of glucose and methanol as substrates for the production of recombinant trypsinogen in continuous cultures with *Pichia pastoris* Mut⁺. **Journal Biotechnology**, v. 157, n. 2, p. 180-188. 2012.

PORRO, D.; GASSER, B. FOSSATI, T.; MAURER, M.; BRANDUARDI, P.; SAUER, M. MATTANOVICH, D. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. When area these systems better than bacterial production systems? **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 939-948. 2011.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG; Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. **Biochemical Engineering Journal**, available online, 15p. 2010.

RAMÓN, A.; MARÍN, M. Advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Journal**, v. 6, n. 6, p. 700-706, 2011.

SAKASEGAWA, S., TAKEHAKA, H., YOSHIOKA, I., TAKAHASHI, M., KAGIOMOTO, Y., MISAKI, H., SASKURABA, H., OHSHIMA, T. Increasing the thermostability of *Flavobacterium meningosepticum* glycerol kinase by changing

Ser329 to Asp in the subunit interface region. **Protein Engineering**, v. 14, n.9, p. 663-667, 2001.

SEARS, I. B., O'CONNOR, J., ROSSANESE, O. W., GLICK, B. S. A versatile set of vector for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**. v. 14. p. 783-790, 1998.

STEPHANIAN, S. V.; HUYN, S. T.; McCABE, E. R. B.; DIPPLE, K. M. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4 α binding site and evidence for transcriptional activation. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 80, p. 412–418, 2003.

SÜKRAN, E.; ÇALIK, P. Enhanced recombinant human erythropoietin production by *Pichia pastoris* in methanol fed-batch/sorbitol batch fermentation through pH optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 1, p. 59-65, 2011.

TALEUX, N.; GUIGAS, B.; DUBOCHAUT, H.; MORENO, M.; WEITZEL, J.; GOGLIA, F.; FAVIER, R.; LEVERVE, X. High expression of thyroid hormone receptors and mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the liver is linked to enhanced fatty acid oxidation in lou/c, a rat strain resistant to obesity. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 284, n. 7, p. 4308-4316, 2009.

WERTEN, M. W. T.; BOSCH, T.J. V.D.; WIND, R. D.; MOOIBROEK, H.; WOLF, F. A. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 15, p. 1087-1096. 2009.

WIELAND, O. Glycerol, U. V. Method. **Methods in Enzymology**, v. 5, p. 354-361, 1962.

WIGHTMAN, P. J.; JACKSON, G. R.; DIPPLE, K. M. Glycerol Hypersensitivity in a *Drosophila* Model for Glycerol Kinase Deficiency Is Affected by Mutations in Eye Pigmentation Genes. **PLoS ONE**, v. 7, n.3, e31779. doi:10.1371/journal.pone.0031779. 2012.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B.; LICHTIG, L. Determinação de proteínas totais via espectrometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quim. Nova**, v. 21, n.6, p. 787-793, 1998.

ZHAO, P.; CAO, G. Production of bioactive sheep β -defensin-1 in *Pichia pastoris*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 39, n.1, 11-17. 2012.

-

ANEXOS

Anexos Técnicos

1. Meios de cultura

Utilizaram-se os seguintes meios de cultura:

1.1. YPDA

Para a manutenção e propagação inicial do micro-organismo

Extrato de levedura (Bacto)	1% (p/v)
Peptona (Bacto)	2% (p/v)
Glicose (Synth)	2% (p/v)
Agar (Biobrás)	2% (p/v)

Para o preparo de um litro do meio de cultura YPDA dissolveu-se 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona, 20 g de glicose em 900 mL de água destilada. Adicionou-se 20 g de ágar e o volume foi completado para um litro. Autoclavou-se a 121 °C, a 1 atm por 15 minutos e depois foi distribuído em placas de Petri estéreis.

As culturas foram mantidas em meio YPDA, em geladeira a 4°C, através de transferências, seguidas de crescimento em meio novo (repicagem) a cada experimento.

1.2. BMGY

O meio BMGY foi utilizado para crescimento do inóculo sendo constituído por:

Extrato de levedura (Bacto)	1% (p/v)
Proteose Peptona (Bacto)	2% (p/v)
Tampão fosfato de potássio	100 mmol/L em pH 6,0
YNB (Difco)	1,34% (p/v)
Biotina (Sigma B4501-1G)	4×10^{-5} % (p/v)
Glicerol (Synth)	1% (v/v)

PREPARO DE SOLUÇÕES ESTOQUES:

Tampão fosfato de potássio 1 mol.L⁻¹ em pH 6: foi adicionado 13,2 mL de K₂HPO₄ (Reagen) 1 mol.L⁻¹ a 86,8 mL de KH₂PO₄ (Synth) mol.L⁻¹, quando necessário, ajustou-se o pH com NaOH (Synth) para pH 6,0. Esterilizou-se em autoclave a 120 °C, a 1,2 atm de pressão durante 15 minutos. O tempo de estabilidade da solução é de aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Solução de YNB 13,4%(concentrado): dissolveu-se 13,4 g de YNB (yeast nitrogen base) em 100 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF (0,22 µm). A solução se mantém estável por aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Solução de biotina 0,02% (concentrado): dissolveu-se 20 mg de biotina em 100mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de

PVDF (0,22 μm). A solução se mantém estável por aproximadamente um ano quando conservado a 4°C.

Glicerol concentrado: autoclavou-se uma quantidade suficiente de glicerol a 121 °C, 1 atm de pressão durante 15 minutos.

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMGY dissolveu-se 10 g de extrato de levedura, 20 g de peptona em 790 mL de água. Autoclavou-se a 120°C, a 1 atm de pressão durante 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100mmol.L⁻¹ em pH 6, 100 mL de YNB 13,4%, 2 mL de biotina 0,02%, 10 mL de glicerol concentrado.

1.3. BMMY

O meio de cultura BMMY foi utilizado para a expressão da atividade da enzima Glicerol kinase, sendo constituído por:

Extrato de levedura (Bacto)	1% (p/v)
Proteose Peptona (Bacto)	2% (p/v)
Tampão fosfato de potássio	100 mmol.L ⁻¹ em pH 6,0
YNB (Difco)	1,34% (p/v)
Biotina (Sigma B4501-1G)	4x10 ⁻⁵ % (p/v)
Metanol (Qhemis)	1% (v/v)

As soluções de tampão fosfato de potássio 1 mol.L^{-1} em pH 6,0, YNB e biotina foram preparadas como descrito anteriormente.

Solução de metanol diluída 10 vezes (10x): adicionou-se 5 mL de metanol em 95 mL de água destilada e esterilizou-se por filtração em membrana Millipore de PVDF ($0,22 \text{ } \mu\text{m}$). O tempo de prateleira é de aproximadamente dois meses quando conservado a 4°C .

Para o preparo de um litro do meio de cultura BMMY dissolveu-se 10 g de extrato de levedura e 20 g de peptona em 700 mL de água destilada. Autoclavou-se a 120°C , a 1 atm de pressão por 15 minutos. Adicionou-se 100 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol.L^{-1} em pH 6, 100 mL de YNB 13,4%, 2 mL de biotina 0,02 % e 100 mL de metanol 5%.

2. Solução de Ringer

A solução de ringer foi preparada a partir dos seguintes constituintes:

Azul de metileno (Laborclin)	0,00002% (v/v)
Cloreto de sódio (Synth)	0,0009% (p/v)
Cloreto de potássio (Synth)	0,062% (p/v)
Cloreto de cálcio (Reagen)	0,048% (p/v)
Bicarbonato de sódio (Reagen)	0,02% (p/v)
Glicose (Synth)	1,0% (v/v)

A solução foi mantida a 30°C .

3. Soluções estoques para o ensaio de atividade da enzima glicerol quinase

Solução tampão de diluição Tris-HCl 10 mmol.L⁻¹, pH 7,2, contendo 10 mmol.L⁻¹ de NaF: Pesou-se 0,1211g de C₄H₁₁NO₃ (Tris hidroximetil amino metano, Vetec) e 0,042g de NaF (fluoreto de sódio, Merk) adicionou-se 80mL de água destilada, ajustou-se o pH com HCl 6 mol.L⁻¹ e completou-se o volume para 100 mL. A solução foi conservada a 4 °C.

Solução tampão de dosagem glicerina hidrazina, pH 9,8: pesou-se 0,75g de glicina (Merk), adicionou-se 18,53 mL de N₂H₄.H₂O (Hidrazina hidrato, solução 25% Vetec) ajustou-se o pH para 9,8 com HCl 6 mol.L⁻¹ e completou-se o volume para 25 mL. A solução foi conservada a 4 °C.

Glicerol 6 mmol.L⁻¹: mediu-se 0,45 mL de C₃H₅(OH)₃ (glicerina, densidade 1,23 e pureza 95%), completou-se o volume para 100 mL com água destilada. A solução foi conservada em refrigeração.

Solução de ATP 0,05 mol.L⁻¹: pesou-se 0,0551g de ATP (Sigma A3377-5G) e dissolveu-se em 2 mL de água destilada. A solução foi preparada no instante do uso e mantida banho de gelo.

Solução NAD^+ $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$: pesou-se 0,0265 g de βNAD^+ (Sigma) e dissolveu-se em 2 mL de água destilada. A solução foi preparada no instante do uso e mantida em banho de gelo.

Solução de cloreto de cálcio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$: pesou-se 0,3676g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Synth), dissolveu-se em 15 mL de água destilada e completou-se o volume para 25 mL. A solução foi conservada em refrigeração.

Solução sulfato de magnésio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$: pesou-se 1,2324g de $MgSO_4 \cdot 2H_2O$ e dissolveu-se em 15 mL de água destilada e completou-se o volume para 25 mL. A solução foi conservada em refrigeração.

4. Soluções para determinação de proteína total

O conteúdo protéico (Cp) do extrato celular de levedura foi determinado pelo método de Lowry (LOWRY et al. (1951), tendo soro-albumina bovina como padrão e utilizando as seguintes soluções:

Reagente A: solução de $NaCO_3$ (Synth) a 2% com NaOH (Sinth) a 0,1N

Reagente B: solução de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Synth) a 0,5% e $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ (Synth) 1%

Reagente C: no momento de usar, misturar 50 mL do reagente A + 1 mL do reagente B

Reagente D: reagente de Folin Ciocalteu (Imbralab), diluído com água destilada a 1:2

Solução padrão de BSA (Inlab)

5 mg de albumina em 50 mL de NaOH 0,1N