

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE
MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli*
recombinante para produção de proteína verde
fluorescente (*Green Fluorescent Protein - GFP*)**

Ayline Castanho Bolognesi Melchior Jesuino

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

Araraquara - SP

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE
MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli*
recombinante para produção de proteína verde
fluorescente (*Green Fluorescent Protein - GFP*)**

Aylime Castanho Bolognesi Melchior Jesuino

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

Araraquara - SP

2020

J58d Jesuino, Aylime Castanho Bolognesi Melchior.
Diferentes estratégias de cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção de proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein - GFP*). – Araraquara: [S.n.], 2020.
117 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Marcel Otavio Cerri.

1. GFP. 2. *Escherichia coli*. 3. Modo de operação batelada alimentada. 4. Proteína verde fluorescente. 5. Condições de cultivo. 6. Aumento de escala. I. Cerri, Marcel Otavio, orient. II. Título.

Dedico este trabalho,

A Cecília, luz da minha vida. Foi tudo por você.

*Ao meu querido Fernando, amor da minha vida. Por todo
companheirismo, compreensão e paciência ao longo desses anos.*

*Aos meus pais Jefferson e Evanir, por todas as palavras,
todos os conselhos, e amor incondicional ao longo desses anos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, em primeiro lugar, pela proteção e por terem me dado força, ânimo, sabedoria e discernimento. Por terem me colocado, em meio ao turbilhão, em um lugar onde eu estaria cercada de pessoas bondosas e humanas.

Aos meus pais, Jefferson e Evanir, pelo amor incondicional, força, estímulo e participação em todos os momentos. Por todo o incentivo ao longo de toda minha vida, me mostrando o valor do estudo. Sei de tudo que vocês tiveram que abrir mão para que pudéssemos estudar. Vocês sabem que sem a presença de vocês eu não teria conseguido. Amo vocês.

Ao meu amado Fernando, que esteve presente em todos os momentos, por todas as conversas, paciência e cuidado nos momentos em que eu quis desanimar. Por todo esforço e viagens para que eu pudesse trabalhar. Obrigada por todo amor e dedicação, por ser meu ponto de tranquilidade.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri pela atenção, paciência e ensinamentos durante todos os momentos da realização deste trabalho. Marcel, você me recebeu de braços abertos em um dos momentos mais difíceis da minha vida, e por isso serei eternamente grata. Deus colocou você no meu caminho e se não fosse assim, com certeza eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada pela confiança, amizade e preocupação de todos os dias. Nunca poderei agradecer o suficiente.

A Ana Paula Abuchain Sousa, amiga querida de laboratório. Ana, você é uma das pessoas com o coração mais bondoso que eu já conheci. Muito obrigada por todo apoio ao longo deste trabalho. Você foi peça fundamental para que eu conseguisse conciliar minha vida com o doutorado. Eu vou sentir sua falta todos os dias!

Ao técnico Mateus Scontri, por toda ajuda, paciência, companhia e cafés. Obrigada por toda a ajuda ao longo dos cultivos e amizade. Você me deu todo apoio que eu precisava para que eu conseguisse trabalhar e transformou todos os dias de trabalho em dias mais leves.

A minha tia Helena, por todas as orações, e pelo tempo que morou comigo para me ajudar. A minha gratidão sempre.

A minha família, em especial meus primos. Cada um com suas diferenças contribuiu de forma pessoal a minha formação.

Às técnicas Adriana e Ana, por sempre me ajudarem com o HPLC e me darem

Agradecimentos

preferência a cada vaga que surgia na agenda!

À seção de pós-graduação, pela ajuda, paciência e orientações.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A proteína verde fluorescente (GFP; *green fluorescent protein*) tem sido amplamente empregada como biomarcador e pode ser obtida a partir da manipulação gênica, utilizando *Escherichia coli* recombinante como microrganismo para expressão proteica. A utilização de agentes indutores de expressão proteica se faz necessária para a obtenção da GFP, entretanto o IPTG (isopropil β -D1-tio-galactopiranosídeo), análogo da lactose normalmente utilizado, apresenta alta toxicidade e custo, necessitando-se encontrar uma alternativa a seu uso. Sendo assim, o presente trabalho visou a melhora do processo de obtenção da proteína heteróloga GFP utilizando-se *E. coli* recombinante em modo de operação batelada alimentada em biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado, adicionando-se lactose ao meio de cultivo para agir como fonte de carbono e agente indutor. Foram realizados ensaios a fim de avaliar o rendimento na formação de biomassa e proteína GFP frente a utilização de glicose, lactose e IPTG, mostrando-se a lactose como a mais promissora. Em ensaio em biorreator convencional do tipo tanque agitado e aerado, utilizando-se lactose na concentração de 5 g/L ou IPTG 0,05 mM foi observada expressão de GFP de 164 mg/L e 105 mg/L, respectivamente. Posteriormente foram realizados ensaios para testar diferentes meios, meio baseado no meio de autoindução e meio HCD, entretanto nenhum apresentou resultado satisfatório na formação de biomassa e produção de GFP que justificasse sua utilização no lugar do meio LB suplementado com lactose. Em planejamento experimental realizado variando-se temperatura, velocidade de agitação, preenchimento do frasco Erlenmeyer e concentração do indutor, podendo ser esse lactose ou IPTG, foi observada influência estatisticamente significativa num nível de significância de 0,01 do preenchimento do frasco e concentração de lactose na formação de biomassa de forma diretamente proporcional, enquanto que para a produção de GFP a temperatura foi a única variável significativa, de forma inversamente proporcional, levando a uma produção de 476 mg/L de GFP na melhor condição (40 g/L de lactose, 15% e preenchimento, 250 rpm e 20°C). Após determinadas as melhores condições, foram realizados ensaios em biorreator no modo de operação batelada variando-se a aeração (0,5 vvm e 0,75 vvm), velocidade de agitação (400 rpm, 600 rpm, 800 rpm e 1000 rpm) e temperatura (20°C e 25°C). Foi observado que a melhor temperatura para realização dos ensaios foi a 25°C e que a aeração não se mostrou interferente na produção de biomassa e GFP, entretanto, o aumento da velocidade de agitação trouxe ganho expressivo na expressão proteica, mostrando-se as velocidades de 800 rpm e 1000 rpm as condições mais promissoras (487,37 mg/L de GFP e 529,70 mg/L de GFP, respectivamente). Com adição de extrato de levedura e sulfato de magnésio ao meio, em ensaio realizado em frasco agitado, foi obtida produção de GFP de 1,1 g. Realizando-se ensaio em biorreator em modo de operação batelada alimentada com alimentação iniciada com 30 h e 48 h de cultivo, foi obtido melhor resultado com início no menor tempo, levando a expressão de 842,71 mg/L de GFP. Por fim, foi realizado teste com enriquecimento com oxigênio puro, a fim de garantir a completa oxidação do grupamento cromóforo, que levou a aumento de aproximadamente 2,15 vezes.

Palavras-chave: GFP; *Escherichia coli*; modo de operação batelada alimentada, proteína verde fluorescente, condições de cultivo, aumento de escala.

ABSTRACT

Advances in biotechnology techniques have allowed the use of biomolecules of medical and industrial interest on a large scale. Green fluorescent protein (GFP) has been widely used as a biomarker and can be accompanied by gene manipulation using recombinant *Escherichia coli* as a microorganism for protein expression. The use of protein expression inducing agents is necessary to obtain GFP, since the IPTG (isopropyl β -D1-thiogalactopyroside), a lactose analogue, is currently used in high toxicity and cost, and it is necessary to find an alternative to its use. Thus, the present study aimed at improving the process of obtaining the heterogenic GFP protein using recombinant *E. coli* in batch operation mode in conventional agitated and aerated tank type bioreactor, adding lactose to the culture medium to act as source of carbon and inducing agent. Biological assays of GFP and biomass gain were performed on the use of glucose, lactose and IPTG, showing a lactose as the most promising. In relation to the conventional agitated and aerated tank type bioreactor using the concentration of 5 g / L or 0.05 mM IPTG, GFP expression of 164 mg / L and 105 mg / L, respectively, was observed. Subsequently, tests were performed to test different media, MA_Lac medium, medium based on the medium of autoduction and HCD medium, however none presented satisfactory results in the formation of biomass and GFP production that justified its use in place of LB medium supplemented with lactose. In the experimental design carried out by varying the temperature, the agitation rate, the Erlenmeyer flask filling and the concentration of the inducer, it could be that lactose or IPTG, a statistically significant influence was observed at a significance level of 0.01 of the bottle filling and lactose concentration in the formation of biomass in a directly proportional way, whereas for the production of GFP the temperature was the only significant variable, inversely proportional, leading to a production of 476 mg / L GFP in the optimized condition (40 g / L lactose , 15% and fill, 250 rpm and 20 °C). After the best conditions were determined, bioreactor trials were performed in the batch mode, varying the aeration rate (0.5 vvm and 0.75 vvm), stirring rate (400 rpm, 600 rpm, 800 rpm and 1000 rpm) and temperature (20 °C and 25 °C). It was observed that the best temperature to perform the tests was at 25 °C and that the aeration rate was not interfering in the production of biomass and GFP, however, the increase of the agitation rate brought a significant gain in the yield, in wich the rates of 800 rpm and 1000 rpm were the most promising conditions (487.37 mg / L of GFP and 529.70 mg / L of GFP, respectively). With the addition of yeast extract and magnesium sulfate to the medium, in a test carried out in a shaken flask, the production of 1.1 g GFP was obtained. By performing a test in a bioreactor in fed batch operation mode beginning with 30 h and 48 h, the best result was obtained, starting in the shortest time, leading to the expression of 842.71 mg / L of GFP. Finally, a test was performed with enrichment with pure oxygen, in order to guarantee the complete oxidation of the chromophore group, which led to an increase of approximately 2.15 times.

Keywords: GFP; *Escherichia coli*; fed batch; green fluorescente protein; culture conditions; scale up.

LISTA DE ABREVIATURAS

a = área interfacial específica de troca de massa

ANOVA = Análise de variância

BFP = *Blue Fluorescent Protein*/ Proteína fluorescente azul

BPP = Boas Práticas de Produção

C* = Saturação do oxigênio no líquido

CACD = Cultivos de alta densidade celular

cAMP = AMP cíclico

CAP = Proteína ativadora catabólica

C_p = Concentração de GFP (mg/L)

C_{s0} = Concentração inicial do substrato (g/L)

C_{x0} = Concentração inicial de células (biomassa) (g/L)

C_x = Concentração de células (biomassa) (g/L)

DO_{600nm} = Densidade óptica no comprimento de onda de 600 nanômetros

E. coli = *Escherichia coli*

ECFP = *Enhanced Cyan Fluorescent Protein*/Proteína ciano fluorescente melhorada

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

EL = Extrato de levedura

EYFP = *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*/ Proteína fluorescente amarela melhorada

GFP = *Green Fluorescent Protein*/Proteína verde fluorescente

Lista de Abreviaturas

H = Constante de Henry

HCD = *High cell density*

IPTG = isopropil β -D1-tio-galactopiranosídeo

k_L = coeficiente de transferência de massa de filme líquido

k_{La} = coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h⁻¹)

k = Aceleração volumétrica (L/h²)

k_e = sensibilidade do eletrodo

Lac = Lactose

LB = Meio de cultura Luria Bertani

N = Amônio

P = Fosfato

Pr = Produtividade (mg/L.h)

Q = fluxo de alimentação/vazão (L/h)

rE. coli = *Escherichia coli* recombinante

t = tempo (h)

t_{calc} = Valor de *t* calculado do teste *t* de Student

t_{tab} = Valor de *t* tabelado do teste *t* de Student

UF = Unidade de fluorescência

V₀ = Volume de meio ao início do cultivo (L)

vvm = Vazão específica de ar (L/min)

Y_{p/x} = Produção específica (mg/g)

Y_{x/s} = Coeficiente de rendimento de substrato por célula (g/g)

Lista de Abreviaturas

XO_2 = Concentração de oxigênio no ar

μ = Velocidade específica de crescimento (h^{-1})

$\mu_{crítico}$ = Velocidade específica de crescimento crítica (h^{-1})

$\mu_{máx}$ = Velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1})

μ_{set} = Velocidade específica de crescimento escolhida (h^{-1})

UV = ultravioleta

α = Nível de significância

λ = Graus de liberdade

ε = tempo de resposta do eletrodo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Meios líquidos utilizados e seus respectivos códigos.....	40
Tabela 2. Componentes do meio HCD.....	41
Tabela 3. Matriz das variáveis codificadas analisadas no Planejamento fatorial 2 ⁴	43
Tabela 4. Variáveis reais analisadas no Planejamento fatorial 2 ⁴	43
Tabela 5. Valores de t_{tab} para cada nível de significância.....	44
Tabela 6. Formação de biomassa observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2 ⁴ quando utilizada a lactose como agente indutor.	63
Tabela 7. Formação de biomassa observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2 ⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.	63
Tabela 8. Expressão de GFP observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2 ⁴ quando utilizada a lactose como agente indutor.	65
Tabela 9. Expressão de GFP observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2 ⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.....	65
Tabela 10. Erro Padrão e teste t de Student para a resposta concentração de biomassa, de acordo com o Planejamento fatorial 2 ⁴	67
Tabela 11. ANOVA para a resposta concentração de biomassa (g/L), de acordo com planejamento fatorial 2 ⁴	69
Tabela 12. Erro Padrão e teste t de Student para a resposta produção de GFP (mg/L), de acordo com o Planejamento fatorial 2 ⁴	70
Tabela 13. ANOVA para a resposta produção de GFP (mg/L), de acordo com Planejamento fatorial 2 ⁴	71
Tabela 14. Condições de cultivo dos reatores de A a E realizado em modo de operação batelada.....	75
Tabela 15. Concentrações máximas de biomassa e GFP e parâmetros cinéticos dos reatores A e B realizados a 600 rpm e 0,75 vvm.	76
Tabela 16. Concentrações máximas de biomassa e GFP e parâmetros cinéticos dos reatores realizados nas rotações de 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm e 1000 rpm.	77
Tabela 17. Concentração de biomassa e GFP, parâmetros cinéticos e consumo de lactose observados em ensaio realizado em biorreator nas condições de 800 rpm e 1000 rpm com e sem controle de pH.....	81
Tabela 18. Ensaio realizado em frasco agitado para avaliar a influência da concentração do meio LB no consumo de lactose pela célula bacteriana.	83

Lista de Tabelas

Tabela 19. Delineamento fatorial 2^2 realizado em frasco agitado para avaliação da influência da concentração de fosfato e do meio LB no consumo de lactose pela célula bacteriana.....	84
Tabela 20. Ensaio realizado em mesa incubadora rotativa para avaliação da influência da concentração de amônio no consumo de lactose pela célula bacteriana.....	85
Tabela 21. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência do aumento na concentração de extrato de levedura no consumo de lactose pela célula bacteriana.	86
Tabela 22. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura no consumo de lactose pela célula bacteriana.....	87
Tabela 23. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência de diferentes concentrações de sulfato de magnésio (MgSO_4) no consumo de lactose pela célula bacteriana.	89
Tabela 24. Concentração de biomassa e GFP, parâmetros cinéticos e consumo de lactose observados em ensaio realizado em biorreator em modo de operação batelada alimentada.....	90
Tabela 25. Concentração de GFP (mg/L) observada nas condições otimizadas e não otimizadas em ensaios realizados em frasco agitado e em biorreator convencional em modo batelada.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da membrana de bactérias Gram-negativas.	18
Figura 2. Estrutura do operon lac.	21
Figura 3. Esquema de ativação do operon lac quando na presença de lactose.....	22
Figura 4. Esquema de ativação do operon lac quando na presença de lactose e ausência de glicose.	23
Figura 5. Estrutura dos plasmídeos pET e pLysS.....	24
Figura 6. Estruturas químicas da lactose, alolactose e IPTG.	25
Figura 7. Estrutura da proteína verde fluorescente (GFP) e seu grupamento cromóforo.	27
Figura 8. Esquema biosintético do grupamento cromóforo da proteína GFP.	29
Figura 9. Estrutura química das moléculas geradas por modificações na estrutura da molécula de GFP selvagem.	30
Figura 10. Biorreator do tipo tanque agitado e aerado (A) ; impelidores tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (B)	33
Figura 11. Curvas de crescimento celular dos melhores resultados observados frente a adição de diferentes concentrações de glicose, lactose e IPTG em ensaio realizado em microplaca.	52
Figura 12. Emissão máxima de fluorescência frente a adição de diferentes concentrações de glicose, lactose e IPTG em ensaio realizado em microplaca.	53
Figura 13. Curvas de crescimento celular frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em frasco agitado.	54
Figura 14. Expressão proteica frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em frasco agitado.	55
Figura 15. Curvas de crescimento celular e expressão proteica frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em biorreator em modo de operação batelada a 30°C, 300 rpm e aeração de 0,5 vvm	56
Figura 16. Curva de crescimento celular (biomassa g/L) e produção de GFP (mg/L) versus consumo de lactose (g/L) em ensaio realizado em biorreator em modo de operação batelada.	58
Figura 17. Curvas de crescimento celular bacteriano observadas quando utilizado meio HCD e meio LB(25g/L)_Lac(5g/L) em ensaio realizado em frasco agitado.	60
Figura 18. Curva de crescimento celular observadas em ensaios realizados em	

Lista de Figuras

bioreator utilizando-se meio LB(25g/L)_Lac(20g/L)_Glico(10g/L)_Glice(60g/L) e LB(25g/L)_Lac(5g/L).....	61
Figura 19. Diagrama de Pareto referente a formação de biomassa quando utilizada a lactose.	67
Figura 20. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de biomassa (g/L) em função do preenchimento do frasco (%) e concentração de lactose (g/L).	69
Figura 21. Diagrama de Pareto referente a formação de biomassa quando utilizada a lactose.	70
Figura 22. Gráfico resposta da influência da temperatura na produção de GFP (mg/L).	72
Figura 23. Curvas de concentração de biomassa (g/L) e produção de GFP (mg/L) em ensaio realizado em frasco agitado frente a variação de temperatura durante o cultivo.	74
Figura 24. Estrutura química do grupamento cromóforo da GFP, p-hidroxi benzilideno imidazolidina, destacado em verde.	78
Figura 25. Curva da concentração de GFP em função da OTR (taxa de transferência de oxigênio) (mmol/L.h^{-1}).	79
Figura 26. Fotos do reator realizado em modo batelada com velocidade de agitação de 1000 rpm nos tempos 0 horas, 36 horas e 48 horas de cultivo.	81
Figura 27. Concentração de GFP em função do tempo em experimento realizado para enriquecimento com oxigênio puro.	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Microrganismo	38
4.2 Meios de cultivo	39
4.3 Agentes indutores	42
4.4 Planejamento experimental.....	42
4.5 Metodologia Experimental	45
4.6 Metodologia analítica	47
4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
APÊNDICE.....	108

1. INTRODUÇÃO

Embora o ser humano se utilize de processos biotecnológicos há milhares de anos, o avanço da biotecnologia tem revolucionado a vida cotidiana. Manipulação genética, sequenciamento de DNA, novas drogas modificadoras do comportamento e de performance atlética, técnicas de fertilização *in vitro* e de manutenção de processos vitais, entre outros, modificam, alguns de forma irreversível, os seres humanos.

Dentre os processos citados acima vale ressaltar a manipulação gênica, que abriu diversas possibilidades para a produção de biomoléculas como por exemplo os biomarcadores, que permitem a detecção de doenças, controle de processos, entre outras atividades.

As proteínas fluorescentes têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores devido à simplicidade e facilidade na quantificação de sua fluorescência (CHEW et al, 2011). Dentre elas, a proteína verde fluorescente (GFP; *green fluorescent protein*), observada pela primeira vez na água-viva *Aequorea victoria* (SHIMOMURA et al., 1962), merece destaque.

Sendo o cromóforo formado a partir da ciclização de aminoácidos da própria proteína, a sua fluorescência é emitida sem a necessidade de nenhum cofator externo ao organismo que a expressa, característica que torna essa proteína um excelente marcador *in vivo* de expressão gênica (TIMMONS et al., 1997; GILL et al., 2000) e de localização de proteínas (GERDES; KAETHER, 1996; MARGOLIN, 2000) em vários sistemas biológicos.

Devido a facilidade na sua detecção, realizada por processos simples como espectrofluorimetria ou até inspeção visual utilizando uma lâmpada UV, a GFP tem sido amplamente utilizada como indicador biológico (PENNA et al., 2004(a)). Além disso, a ausência de riscos de toxicidade para o hospedeiro torna essa proteína ainda mais atrativa para a utilização no monitoramento de bioprocessos (REISCHER et al., 2004).

Apesar da vasta utilização da GFP na biotecnologia, ainda são necessários novos estudos que visem a otimização e desenvolvimento de processos mais eficientes para sua produção (HUANG; SHUSTA, 2005), já que altas concentrações da proteína são necessárias para que a mesma seja detectada acima do *background noise*. A utilização da GFP como biosensor ótico, por exemplo, requer, no mínimo, alguns miligramas de proteína pura para o ensaio (CINELLI et al., 2001).

A utilização de microrganismos recombinantes para a produção de proteínas

heterólogas tem sido uma ferramenta fundamental para o desenvolvimento da biotecnologia. A expressão de genes heterólogos utilizando a *Escherichia coli* (*E. coli*) é uma alternativa a ser explorada visando a produção da GFP recombinante. Os avanços na engenharia genética permitiram o desenvolvimento de sistemas de expressão bacteriana, particularmente em *E. coli*, capazes de produzir grandes quantidades de proteínas a partir de genes clonados (KANE; HARTLEY, 1988).

A utilização do modelo de expressão de *E. coli* é a primeira escolha, dentre os sistemas bacterianos, para análises laboratoriais (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014). A escolha desse sistema para a expressão do gene da GFP pode ser justificada pela sua facilidade de manuseio, seu baixo custo e por geralmente permitir altos níveis de expressão proteica (RÜCKER et al., 2001). Ademais, podem ser obtidas elevadas densidades celulares e altas taxas de crescimento com baixos requisitos nutricionais (BLIGHT; HOLLAND, 1994).

O alto rendimento no processo de obtenção de proteínas recombinantes é de extrema importância. Dessa forma, sendo as proteínas recombinantes expressas no citoplasma bacteriano da *E. coli* (BERLEC; STRUKELJ, 2013), a produtividade será proporcional à densidade celular, portanto a obtenção de cultivos com alta densidade celular é de grande interesse.

Sabe-se que parâmetros físico-químicos como temperatura durante o cultivo, composição do meio e pH, velocidades de agitação e aeração, concentração do indutor, densidade do inóculo, período de cultivo, oxigenação e tempo de indução, influenciam o crescimento de culturas celulares e a produção de proteínas heterólogas (BERLEC et al., 2008; DONOVAN et al., 1996; GAO; GU, 2007; NIKEREL et al., 2006; PSOMAS et al., 2007; WANG, et al., 2003). Além disso, definir os nutrientes essenciais ao processo é um desafio já que os mesmos devem estar em quantidade suficiente para suprir a demanda de crescimento sem que se acumulem, o que pode levar à inibição do crescimento ou formação de metabólitos indesejados (CHOU, 2007).

2. REVISÃO DA LITERATURA

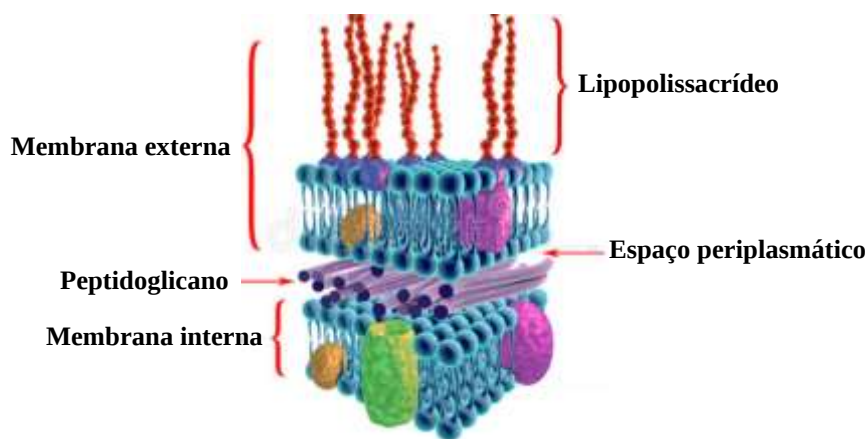
➤ *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) foi inicialmente descrita por Theodor Escherich, em 1885, e refere-se a um grupo de bactérias constituído por diferentes cepas com várias características em comum (TORTORA et al., 2012).

É um microrganismo procarioto, aeróbio e anaeróbio facultativo, com dimensão de 0,5 µm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento, tendo suas células constituídas basicamente por compostos orgânicos com composição média de 50% de carbono, 20% de oxigênio, 14% de nitrogênio, 8% de hidrogênio, 3% de fósforo, 2% de potássio, 1% de enxofre, 0,05% de cálcio, magnésio e cloro, 0,2% de ferro e um total de 0,3% de outros minerais como manganês, cobalto, cobre, zinco e molibdênio (NEIDHARDT et al., 1990).

A *E. coli* é um bacilo gram-negativo, tendo sua parede celular composta, portanto, por uma membrana interna (citoplasmática) e uma membrana externa envolta por lipopolissacarídeo, separadas pelo espaço periplasmático e por uma membrana de peptidoglicano (mureína), responsável por preservar a integridade celular frente a condições adversas (BAILEY; OLLIS, 1986; NEIDHARDT et al., 1990)(Figura 1).

Figura 1. Representação da membrana de bactérias Gram-negativas.



FONTE: adaptado de < <https://www.dreamstime.com/stock-illustration-structure-gram-negative-bacteria-cell-wall-labeled-d-illustration-image84181743>>.

O material genético bacteriano, constituído por uma molécula de DNA circular, localiza-se na região central da célula, no entanto, podem também existir outras pequenas moléculas de DNA circulares, conhecidas como plasmídeos (TORTORA et.

al., 2012).

A *E. coli* é uma bactéria capaz de crescer em pHs próximo da neutralidade (entre 6 e 8). Mesófila, apresenta crescimento em temperaturas na faixa de 8°C a 48°C, entretanto, 37°C é sua temperatura ótima de crescimento (NEIDHARDT et al., 1990), podendo, portanto, ser naturalmente encontrada na microbiota do trato intestinal humano e da maioria dos animais (TORTORA et al., 2012).

Apesar de não ser capaz de expressar proteínas complexas (ALTENBUCHNER; MATTES, 2005), atualmente seu uso é bastante difundido e diversificado. Enzimas industriais (renina, amilases, proteases e celulasas) além de proteínas terapêuticas (insulina, hormônios de crescimento e interferons) são alguns poucos exemplos dentre as muitas proteínas recombinantes produzidas utilizando-se a *E. coli* como organismo hospedeiro (EITEMAN; ALTMAN, 2006).

A síntese de proteínas heterólogas por microrganismos recombinantes acarreta uma diminuição significativa dos seus recursos celulares, como ATP, nucleotídeos e aminoácidos, já que a célula é forçada a direcionar parte significativa da energia e dos aminoácidos gerados para atender a demanda de síntese, levando o hospedeiro a um estresse metabólico (GOMBERT; KILIKIAN, 1998; KILIKIAN et al., 2000). Dessa forma, o hospedeiro se torna debilitado e o metabolismo e a fisiologia da célula são drasticamente alterados (GLICK, 1995; HEYLAND et al., 2011; MARISCH et al., 2013; MOROWVAT et al., 2014).

A intensidade na qual a proteína é sintetizada, as suas características, o número de cópias do plasmídeo e o tamanho do vetor, as condições sob as quais é realizada a indução (concentração, substância utilizada, temperatura), a composição do meio de cultura e o estado metabólico da célula são fatores intimamente relacionados à magnitude do estresse metabólico gerado (ASHRAF et al., 2013; BABAEIPOUR et al., 2013; GLICK, 1995).

Uma das consequências do estresse metabólico em *E. coli* são respostas fisiológicas geradas que podem levar a produção de várias outras proteínas além da de interesse (NELSON; COX, 2006). Sendo assim, a implementação de abordagens mais agressivas a fim de se obter rápido crescimento e produção proteica pode levar ao acúmulo de outras proteínas produzidas em resposta ao estresse que dificultarão as etapas posteriores de purificação.

Em sistemas de expressão baseados em plasmídeos, além da energia celular desviada para a síntese proteica, ocorre também um desvio para replicação e

manutenção do plasmídeo, de forma que o crescimento celular fica comprometido levando a uma diminuição no rendimento de biomassa. Ademais, promove-se uma instabilidade plasmidial que pode acarretar o surgimento de uma população de células com ausência do plasmídeo de interesse (GLICK, 1995; HEYLAND et al., 2011; MARISCH et al., 2013; MOROWVAT et al., 2014; WAEGEMAN; SOETAERT, 2011; YAZDANI; MUKHERJEE, 2002).

A não retenção do plasmídeo é consequência da distribuição desigual dos mesmos durante a divisão celular. Isso pode ser solucionado ao se inserirem genes de resistência a antibióticos de forma a criar uma pressão seletiva para que o plasmídeo seja retido pelas células (HÄGG et al., 2004).

De acordo com a literatura, muitos são os fatores influentes sobre a estabilidade do plasmídeo, dentre os quais encontram-se as condições do cultivo (CRAYNEST et al., 1996), a temperatura da cultura e a possível toxicidade da proteína codificada (CORCHERO; VILLAYERDE, 1998), a quantidade de cópias do plasmídeo, o substrato utilizado, a composição do meio (SUMMERS, 1991; ZHAO et al., 2001) e a velocidade de crescimento (PARKER; DiBIASIO, 1987),.

A influência da temperatura na produção de proteínas heterólogas está bem estabelecida na literatura, que descreve que o rápido crescimento celular pode ser observado com altas temperaturas, entretanto a síntese proteica é reduzida uma vez que a estabilidade do plasmídeo e a formação de sua estrutura terciária ficam comprometidas (ZHANG et al., 2003).

A escolha da fonte de carbono, outro fator bastante influente no crescimento celular bacteriano e na produção de proteínas heterólogas, deve ser realizada com bastante cuidado. A glicose, substrato mais utilizado experimentalmente, pode ser bastante atrativa por apresentar capacidade de atuar como fonte de carbono e de energia, além de seu baixo custo. Entretanto, pode promover a ocorrência do chamado metabolismo *overflow* durante o seu processamento pela via glicolítica, liberando acetato no meio (RIESENBERG, 1991).

A glicose, somente em condições de aerobiose, após ser catabolizada a piruvato é oxidada pelo complexo enzimático piruvato desidrogenase a acetilcoenzima A (acetil-CoA) através de uma descarboxilação oxidativa. Quando o fluxo de consumo da glicose pela via metabólica supera a capacidade de assimilação da acetil-CoA pela via do ácido cítrico e/ou cadeia transportadora de elétrons, ocorre acúmulo da enzima que é, portanto, transformada em acetato liberado no meio de cultivo (HOLMS, 1986;

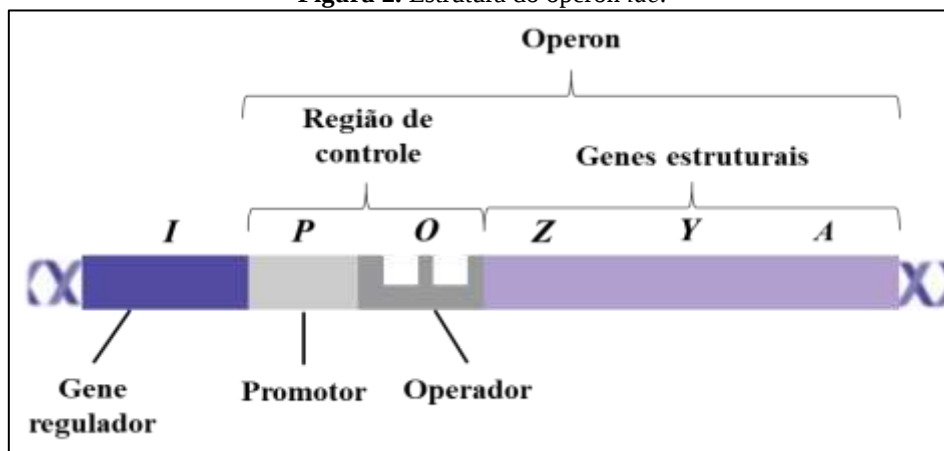
KLEMAN; STROHL, 1994; LEE, 1996). O acetato é conhecido por ser o principal inibidor do crescimento e da síntese protéica (KLEMAN; STROHL, 1994; LEE, 1996; LULI; STROHL, 1990).

A glicose é a fonte de carbono de primeira escolha da *E. coli*. Sendo facilmente assimilada, promove formação de acetato como descrito anteriormente. Entretanto, a formação de tal metabólito pode ser evitada utilizando-se outras fontes de carbono, como a lactose.

Diferentemente da glicose, que é pronta e preferencialmente utilizada pela *E. coli* já que as enzimas envolvidas em sua metabolização são constitutivas, sabe-se que o metabolismo da lactose pela célula bacteriana depende da expressão de proteínas liberadas apenas quando em presença deste dissacarídeo ou seus análogos. A expressão de tais enzimas é regulada e coordenada pelo operon indutível *lac*, proposto por François Jacob e Jacques Monod (TORTORA et al., 2012).

O operon, um conjunto de genes sob o controle de um único operador, é bastante comum em organismos bacterianos e permite a expressão de várias proteínas que são requeridas simultaneamente. Tal estrutura é constituída por um sítio promotor (P) e um sítio operador (O), que juntos formam a região de controle, e por genes estruturais codificadores das proteínas indutíveis, sendo esses, no caso do operon *lac*, *lacZ*, *lacY* e *lacA*. Além disso, possui também uma região reguladora (*lacI*, no caso do operon *lac*) responsável por codificar a proteína que regulará o operon (TORTORA et al., 2012) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura do operon *lac*.

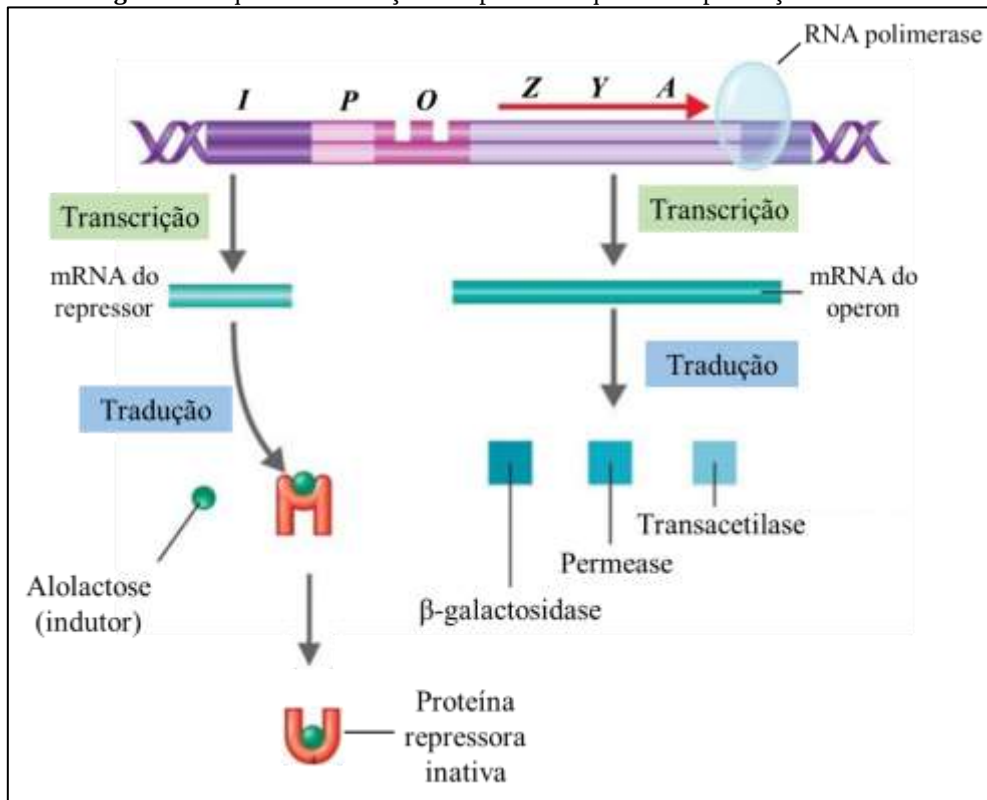


FONTE: adaptado de TORTORA et al., 2012.

Quando não é identificada a presença de lactose no meio, a proteína repressora

presente constitutivamente no meio celular encontra-se livre para se ligar ao operador, não permitindo que ocorra transcrição dos genes subsequentes. Quando a lactose se encontra presente, o seu metabólito alolactose é capaz de se ligar à proteína repressora impedindo, dessa forma, que a mesma se ligue ao operador. Sendo assim, a RNA polimerase consegue se ligar à região promotora e iniciar a transcrição e, conseqüentemente, a tradução dos genes codificadores das enzimas necessárias para a metabolização da lactose (TORTORA et al., 2012) (Figura 3).

Figura 3. Esquema de ativação do operon *lac* quando na presença de lactose.



FONTE: adaptado de TORTORA et al., 2012.

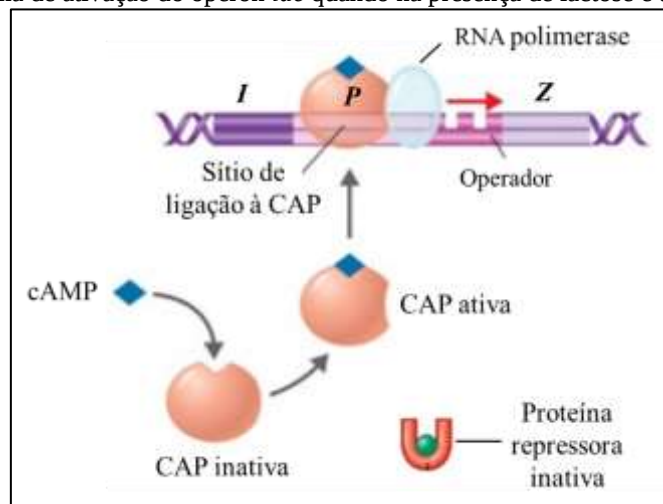
O gene *lacZ* codifica a β-galactosidase, enzima responsável por realizar a hidrólise da lactose em galactose e glicose. O gene *lacY* é o gene codificador da enzima lac permease, transportadora da lactose do meio extracelular para o meio intracelular (LEHNINGER, 2006). Por fim, o gene *lacA* codifica a transacetilase, enzima cuja função fisiológica exata ainda é desconhecida (CHAMPE, et al., 2009; TORTORA et al., 2012).

Outro fator decisivo para que ocorra a transcrição do operon *lac* é a presença de AMP cíclico (cAMP) no meio. Quando acumulado, o cAMP se liga ao sítio alostérico

da proteína ativadora catabólica (CAP) mudando sua conformação e permitindo a ligação ao promotor *lac*. Sua alteração conformacional favorece a ligação da RNA polimerase ao promotor, iniciando-se assim a transcrição dos genes de interesse Z, Y e A. (TORTORA et al., 2012).

A glicose tem papel fundamental no controle da concentração de cAMP presente no meio, de forma que na sua ausência ocorre acúmulo de cAMP favorecendo a transcrição dos genes presentes no operon (DONOVAN et. al 1996) (Figura 4).

Figura 4. Esquema de ativação do operon *lac* quando na presença de lactose e ausência de glicose.



FONTE: adaptado de TORTORA et al., 2012.

Quando na ausência de cAMP a proteína CAP não consegue se ligar ao promotor e consequentemente, a RNA polimerase também não (DONOVAN et. al 1996). Portanto, quando a glicose está presente, ela desencadeia um processo chamado de repressão catabólica, no qual a utilização de lactose fica reprimida (CHAMPE et al., 2009).

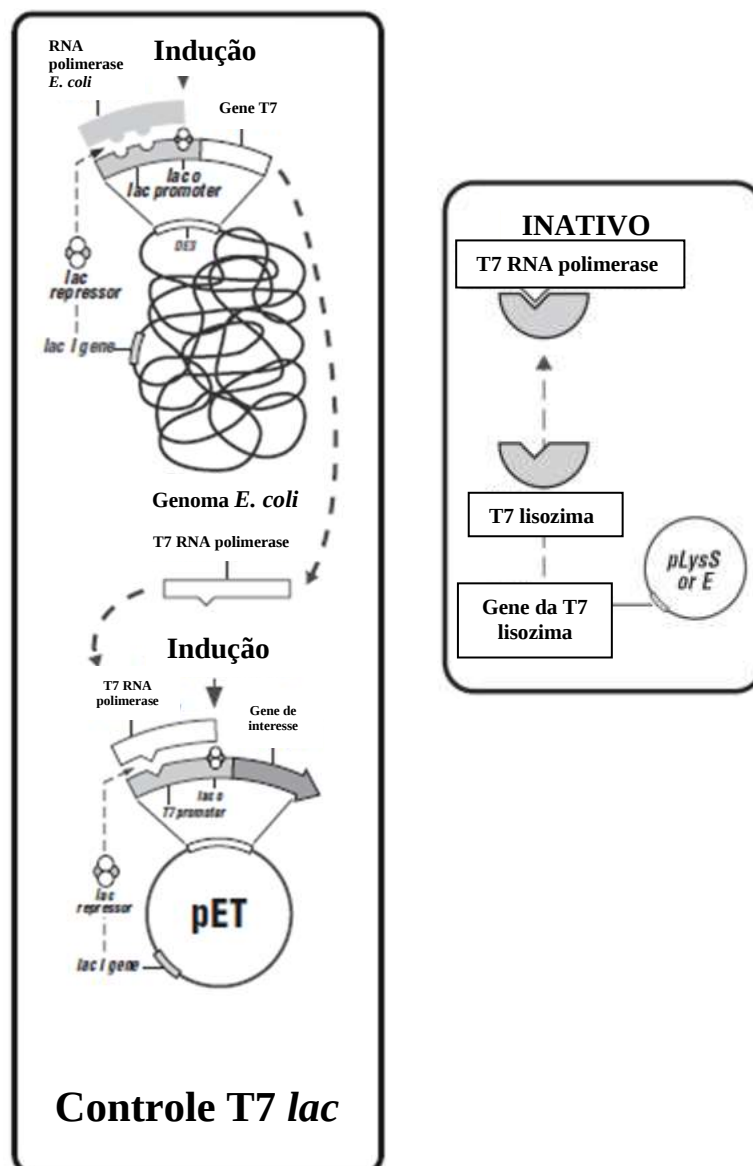
Os vetores de transcrição de genes heterólogos utilizando-se *E. coli* são derivados do operon *lac*. A cepa de *E. coli* BL21(DE3) pLysS pET28(a), utilizada no presente trabalho, possui o gene codificador da enzima T7 RNA polimerase (DE3) além do plasmídeo contendo o gene referente à proteína desejada (pET28(a)) (Figura 5).

Tal cepa apresenta em seu cromossomo o gene codificador da enzima T7 RNA polimerase sendo, portanto, transcrito pela RNA polimerase da *E. coli* constitutivamente presente no meio intracelular. Dessa forma, A T7 RNA polimerase é expressa pelas células bacterianas mesmo na ausência de agente indutor, entretanto, nesse caso, em concentrações basais. Sendo a expressão da enzima controlada por uma região *operon*

lac, quando na presença da lactose e seus análogos, haverá um aumento na expressão proteica (NOVAGEN, 2005). A T7 RNA polimerase presente no meio, então se liga à região promotora do T7lac do vetor pET e inicia a transcrição do gene de interesse (STUDIER et al., 1990; DUBENDORFF ; STUDIER, 1991) (Figura 5).

Uma maneira de se obter estabilidade adicional ao gene de interesse foi expressá-lo em um hospedeiro contendo também o plasmídeo pLysS, plasmídeo esse provido de genes codificadores da T7 lisozima, um inibidor natural da T7 RNA polimerase, promovendo maior controle na taxa de expressão proteica (MOFFATT; STUDIER, 1987; STUDIER, 1991).

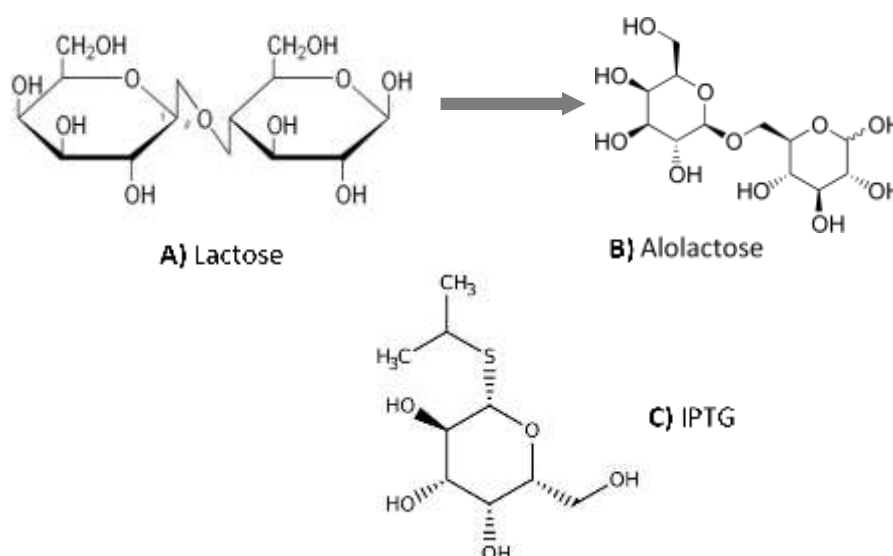
Figura 5. Estrutura dos plasmídeos pET e pLysS.



FONTE: Retirado e adaptado de NOVAGEN, 2005.

Desta forma, a adição de lactose (Figura 6A), através da formação de alolactose (Figura 6B), ou IPTG (Figura 6C), seu análogo amplamente utilizado, leva à inativação da proteína repressora permitindo o início da transcrição do gene da T7 RNA polimerase e, conseqüentemente, do gene da proteína de interesse clonado no vetor pET (NOVAGEN, 2005).

Figura 6. Estruturas químicas da lactose, alolactose e IPTG.



FONTE: autoria própria utilizando programa ChemDraw para desenho das estruturas.

Sendo assim, sabe-se que a lactose pode promover a indução da expressão do gene heterólogo, bem como o crescimento celular (NEUBAUER et al., 1991), sem a necessidade da adição de um agente indutor em determinado momento, permitindo portanto a não utilização de indutores de alto custo, como o IPTG, comumente utilizado (HOFFMAN et al., 1995; SHOJAOSADATI et al., 2008).

Quando utilizadas linhagens celulares baseadas no operon *lac* como sistemas de expressão proteica, se faz necessária a utilização de indutores. Para isso, é comumente utilizado o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose que apesar da efetividade na indução, reutilização por não ser consumido ao longo do processo e de não necessitar de transportador (SHOJAOSADATI et al., 2008), é bastante caro e tóxico (MENZELLA et al., 2002; ZHANG et al., 2009).

Devido a sua toxicidade, as normas de Boas Práticas de Produção (BPP) não recomendam seu uso quando em produção de proteínas com finalidades terapêuticas

(MERTEN et al., 2001). Portanto, uma alternativa ao seu uso como já descrito na literatura, é a própria lactose, já que a mesma não apresenta toxicidade e tem baixo custo (DONOVAN et al., 1996; SHOJAOSADATI et al., 2008). Ademais, pode ser utilizada também como fonte de carbono, sendo uma alternativa viável à utilização de glicose e prevenção da ocorrência do metabolismo *overflow* (LEE et. al., 2001).

São descritos na literatura cultivos utilizando meios complexos para obtenção de proteínas heterólogas, nos quais a maioria dos estudos relata a utilização do IPTG como agente de indução (GOYAL et al., 2009; HU et al., 2004; ZHANG et al., 2009). Li et al., (2006) realizaram um dos poucos estudos utilizando lactose como indutor, obtendo produção específica de 0,12g proteína hsBLyS/g massa seca e uma produtividade em biomassa de 0,92g massa seca/L.h utilizando uma estratégia de alimentação de lactose (LI et al., 2006). Silva (2011) realizou várias estratégias de indução utilizando lactose, comparando-as com indução comumente realizada por pulsos de IPTG e relata uma melhor produção da proteína desejada quando utilizada a lactose como agente indutor, sendo 16 % superior às concentrações observadas utilizando-se IPTG, enquanto que a concentração em biomassa foi o dobro (SILVA, 2011).

A utilização da lactose como agente de indução de expressão proteica e fonte de carbono parte do princípio de autoindução proposto por Studier (2005), que afirma que compostos indutores, como a lactose, já presentes no meio complexo ou definido desde o início do cultivo irá promover a indução da expressão proteica assim que a fonte de carbono preferencial se esgota durante o crescimento (STUDIER, 2005; XU et al., 2012).

Devido a possibilidade de não ser necessário o acompanhamento e definição do momento para realização da indução, o que torna tal estratégia bastante prática, a formulação proposta por Studier vem sendo empregada em grande número de estudos visando a produção de proteínas heterólogas em *E. coli* recombinante (*rE. coli*) (BLOMMEL et al., 2007; TYLER et al., 2005).

A abordagem de autoindução possui muitas vantagens frente aos métodos comumente utilizados, dentre as quais a de maior relevância para o presente trabalho, é a utilização da lactose, uma fonte barata e natural em substituição ao IPTG, indutor químico sabidamente caro e tóxico (SHOJAOSADATI et al., 2008; HOFFMAN et al., 1995).

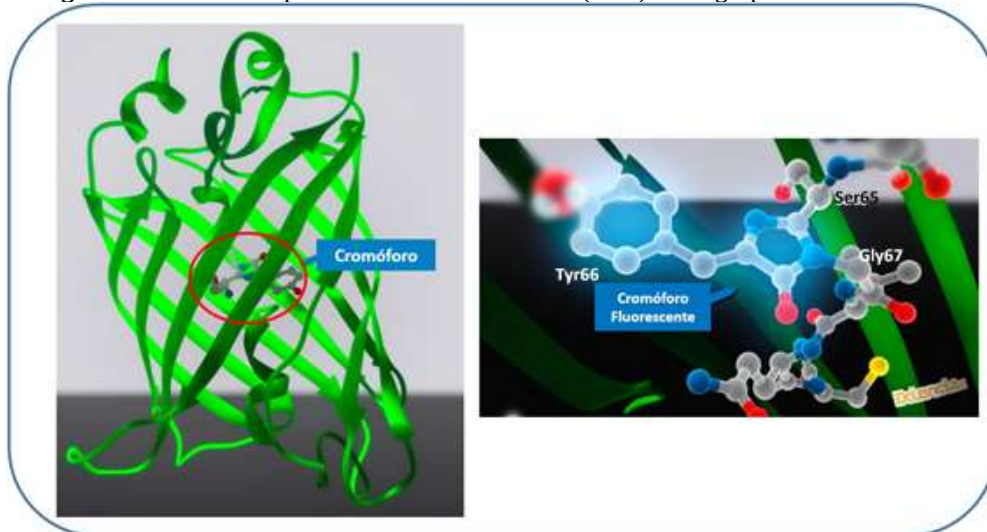
Dessa forma, a lactose representa uma alternativa promissora para utilização como fonte de carbono e agente indutor em ensaios realizados utilizando-se *rE. coli*

como modelo para expressão da proteína fluorescente GFP, objeto deste estudo.

➤ **Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein – GFP)**

A GFP é a primeira proteína descrita a apresentar fluorescência geneticamente codificável (BREJC et al., 1997), de modo que a sua coloração visível se deve à presença de um grupamento cromóforo formado a partir da ciclização do tripeptídeo -serina (Ser), -tirosina (Tyr) e -glicina (Gly) presentes na cadeia proteica, não necessitando, portanto, de nenhum cofator externo ou substrato (CODY et al., 1993). Tal grupamento encontra-se posicionado no centro da proteína, portanto, protegido da ação de possíveis agentes de extinção de fluorescência (*quenching agents*) (ENOKI et al, 2004) (Figura 7).

Figura 7. Estrutura da proteína verde fluorescente (GFP) e seu grupamento cromóforo.



FONTE: Retirado e adaptado de < <https://flagellum.wordpress.com/2011/02/20/%C2%BFcomo-se-convierte-una-proteina-en-una-lampara-china/>>.

É uma proteína globular de caráter ácido (pH entre 4,6 e 5,4), composta por 238 aminoácidos organizados estruturalmente em β -barril, e com massa molar de 27 kDa (CHALFIE; KAIN, 1998). É uma proteína bastante estável, devido essencialmente a sua estrutura terciária compacta, com alta resistência à degradação térmica (sendo estável a temperaturas até 70°C) (PENNA et al., 2004) e química, mantendo sua conformação mesmo quando exposta a esterilizantes químicos como óxido de etileno e formaldeído (MAZZOLA et al., 2006). Além disso, a sua fluorescência é mantida numa grande gama de valores de pH (5,5 a 12,0) (NOVAES et al., 2010; PENNA et al., 2004). Quando

exposta a luz ultravioleta, apresenta máxima excitação no intervalo de 395–498 nm e emissão em 508 nm (PENNA; ISHII, 2002).

A proteína GFP tem sido utilizada em bioprocessos agindo como marcador no monitoramento da produção, secreção e purificação de proteínas, do crescimento de culturas, e de respostas celulares (SU, 2005), e no monitoramento de condições como pH, temperatura e disponibilidade de oxigênio e nutrientes em culturas de microrganismos (MARCH et al., 2003). Tem ganhado espaço também na avaliação de possíveis vetores virais para terapia gênica em humanos, controle biológico de pragas, monitoramento de organismos geneticamente modificados e no descobrimento de novos fármacos, sendo utilizada em substituição a outros marcadores como luciferase e β -galactosidase (CHALFIE; KAIN, 2006).

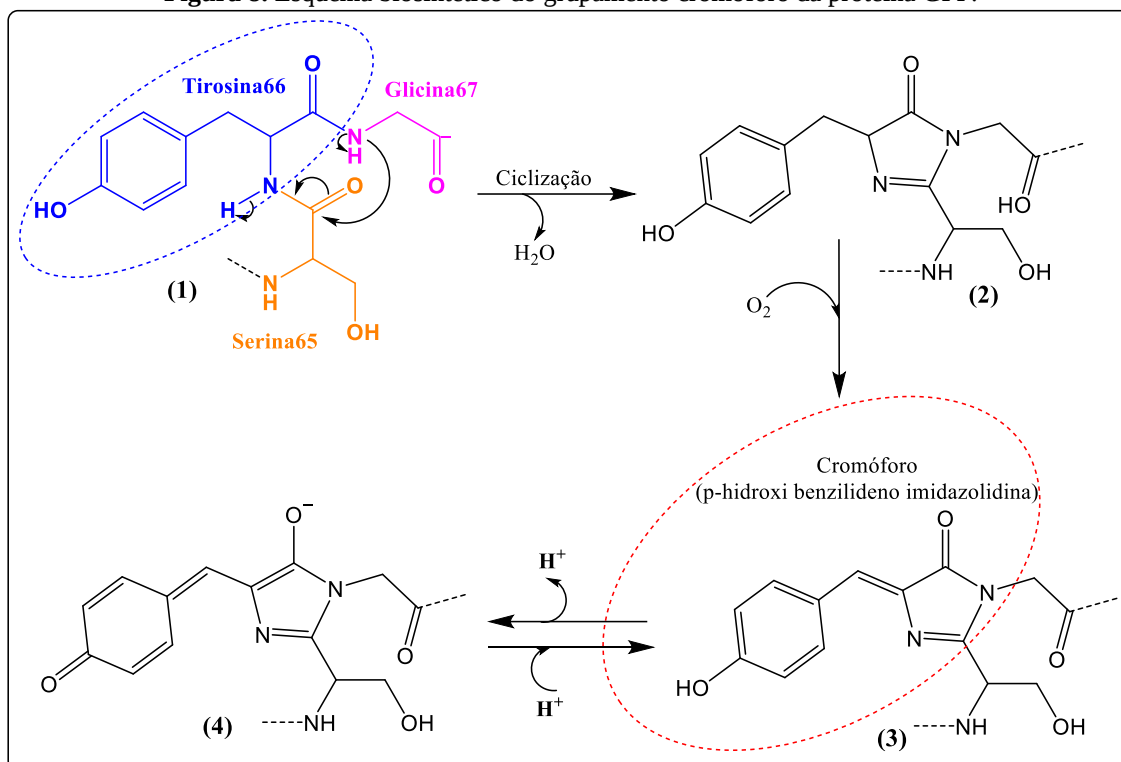
O controle e monitoramento de processos tem normalmente sido realizados recorrendo-se a análises de pH, oxigênio dissolvido, densidade óptica e concentração de substratos. Entretanto, nem sempre é possível de se avaliar esses parâmetros *in line*, não refletindo, portanto, em tempo real, a ocorrência do processo de interesse. Da mesma forma, a monitoramento do produto de interesse, parâmetro que garante a ocorrência e sucesso do processo, raramente é feita em linha por normalmente depender de análises realizadas em outros equipamentos.

Nesse sentido, a GFP tem apresentado grande potencial como ferramenta para monitoramento de processos *in situ*, devido sua alta resistência descrita anteriormente e por não apresentar riscos de toxicidade ao hospedeiro (REISCHER et al., 2004). Vários estudos descrevem sua utilização na monitoramento em linha da concentração de biomassa formada utilizando-se sensor de fibra óptica em fermentações de *E. coli* de baixa (KANG et al., 2002; RANDERS-EICHHORN et al., 1997) e alta densidade celular (CHAE et al., 2000; DELISA et al., 1999; DELISA et al., 2001). Ademais, a GFP tem sido utilizada como proteína de fusão já que demonstra não interferir na conformação e características das proteínas às quais se liga, seja pela porção N- ou C-terminal (CHA et al., 2000; JONES et al., 2004; POPPENBORG et al., 1997).

O fato de ser capaz de autossintetizar seu grupamento cromóforo necessitando apenas da presença de oxigênio molecular, sem necessitar, portanto, de qualquer substrato ou cofator externo ao microrganismo que a expressa para emissão de fluorescência, torna essa proteína também um excelente marcador *in vivo* de expressão gênica (TIMMONS et al., 1997) e de localização de proteínas (GERDES; KAETHER, 1996; MARGOLIN, 2000).

O mecanismo proposto por Heim e colaboradores em 1994 (HEIM et. al, 1994) para a formação do grupamento cromóforo e emissão de fluorescência pela molécula GFP está esquematizado na Figura 8.

Figura 8. Esquema biosintético do grupamento cromóforo da proteína GFP.



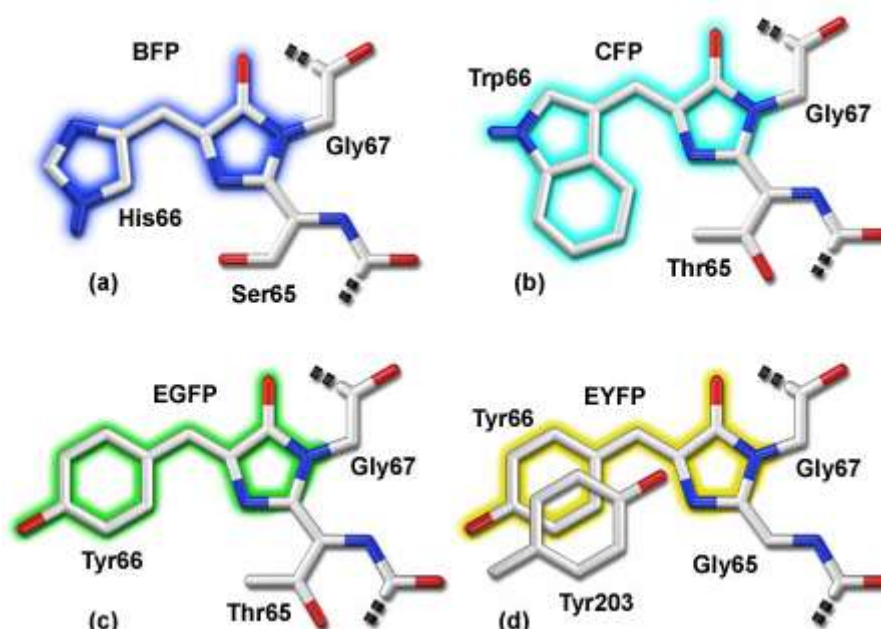
FONTE: adaptado de HEIM et. al, 1994.

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

Algumas modificações na molécula da GFP originaram proteínas com fluorescência azul (BFP – *Blue Fluorescent Protein*) (HEIM et al., 1994), ciano (CFP – *Cyan Fluorescent Protein*) e amarela esverdeada (EYFP – *Enhanced Yellow Fluorescent Protein*) (KREMERS, et al., 2006; NAGAI et al., 2002). Além disso, manipulações genéticas possibilitaram a obtenção de variante da própria GFP, como por exemplo a EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) (HEIM et al., 1995;

KREMERS et al., 2007) (Figura 9).

Figura 9. Estrutura química das moléculas geradas por modificações na estrutura da molécula de GFP selvagem.



FONTE: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html>

Durante a biossíntese do cromóforo da GFP selvagem, a conjugação entre as duplas ligações permite que sejam formadas espécies protonadas e desprotonadas, responsáveis pelos dois picos observados no espectro de absorção em 395nm e 475nm, respectivamente. Entretanto, a EGFP apresenta apenas uma máxima excitação, em 488 nm, devido a uma mutação na posição 65 onde a serina foi substituída por uma treonina (mutação S65T) de forma que as formas protonadas não ocorrem (HEIM et al., 1995; KREMMERS et al., 2007). Já a emissão de fluorescência em 508 nm (WARD et al., 1980) é devido às formas desprotonadas, não sendo, portanto, afetada (HEIM et al., 1994).

Além da maior fluorescência emitida pela EGFP quando comparada a GFP selvagem (HEIM et al., 1995; KREMERS et al., 2007), a oxidação pós-traducional crucial para emissão de fluorescência pelo fluoróforo ocorre quatro vezes mais rápido na proteína mutada, favorecendo sua utilização como biomarcador (HEIM et al., 1995).

Vários estudos relatam a necessidade da presença de oxigênio para a emissão de fluorescência da GFP (CHONG et al. 2008; BELPAIRE et al., 2005; JIMÉNEZ-

BANZO et al., 2008), entretanto, alguns autores relatam o efeito negativo gerado por elevadas concentrações desse gás, atribuindo tal efeito a formação de radicais livres (ALNUAMI et al. 2008; BELPAIRE et al., 2005; JIMÉNEZ-BANZO et al., 2008; PHILLIPS, 1997).

Além da influência da oxigenação na emissão de fluorescência pela GFP, outro fator essencial para a formação da proteína é a temperatura utilizada. Os efeitos deste parâmetro na produção de fluorescência têm sido extensivamente estudados ao longo dos últimos anos (BELPAIRE et al. 2005; KENTARO et al., 2004; MARTÍNEZ-ALONSO et al., 2008; VERA et al., 2007).

Vários autores têm relatado a relação inversamente proporcional da temperatura com a qualidade conformacional da proteína GFP, consequência tanto da melhora na solubilidade da proteína com diminuição na formação de corpos de inclusão, como na melhora da qualidade da fluorescência emitida pelas frações solúvel e insolúvel (CHEW et al., 2012; KENTARO et al., 2004; LIM et al., 1995; MARTÍNEZ-ALONSO et al., 2008; ODDONE et al., 2007; PEREZ-ARELLANO; PEREZ-MARTINEZ, 2003; VERA et al., 2007; WEBB et al., 1995).

Vera et al. (2007) avaliaram a influência da temperatura no crescimento celular bacteriano e na qualidade conformacional da proteína GFP recombinante utilizando-se *E. coli*, no qual foram avaliadas as temperaturas de 16°C, 30°C e 37°C. Os resultados demonstraram que com a diminuição da temperatura foi observada também diminuição na porção de proteínas insolúveis formadas (58,8% a 37°C, 54,4% a 30°C e 16,9% a 16°C), indicando que temperaturas de crescimento subótimas apresentam efeito positivo na solubilidade da GFP. Ademais, no mesmo trabalho, foi observada também melhora na fluorescência específica emitida, aumentada em quatro vezes quando diminuída a temperatura de 37°C para 16°C, indicando melhor enovelamento e formação do cromóforo quando em temperaturas mais baixas (VERA et al., 2007).

Dessa forma, os parâmetros de cultivo utilizados para expressão de GFP, como composição do meio de crescimento, pH, e principalmente, como já descrito, temperatura e oxigênio dissolvido, devem ser controlados e otimizados. Nesse sentido, a realização de cultivos em biorreatores é interessante por permitir melhor controle de tais parâmetros.

➤ **Biorreatores**

Biorreatores podem ser definidos como equipamentos que permitem a conversão

de substratos no produto desejado através da utilização de microrganismos, células animais ou vegetais, ou enzimas. Tais modelos utilizados devem ser mantidos em um ambiente controlado a fim de prover condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato e componentes nutricionais essenciais, e oxigênio, no caso de organismos aeróbios, garantindo condições ótimas de crescimento (SCHÜGERL, 1987).

Apesar de vários modelos de biorreatores estarem disponíveis, os mais comumente empregados em cultivos de microrganismos, independentemente da escala, são os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e os biorreatores não-convencionais pneumáticos, tipo coluna de bolhas e tipo *airlift* (RIESENBERG; GUTHKE, 1999).

A escolha do biorreator a ser utilizado depende da avaliação de diversos fatores, dentre eles, o número de fases componentes no sistema (homogêneo ou heterogêneo), o volume de produção, a velocidade com que a reação ocorre, o custo e a produtividade, entre outros (RIESENBERG; GUTHKE, 1999).

Os biorreatores tipo tanque agitado e aerado, ou convencionais, apresentam todas as qualidades necessárias para um bom biorreator, por esta razão, ainda são os biorreatores mais utilizados no setor industrial. Esse tipo de biorreator tem sua agitação realizada por meio de impelidores conectados a um eixo giratório controlado por um motor e aerado pela parte inferior do equipamento. Esses são munidos de selo mecânico de forma a garantir assepsia do processo, eletrodos esterilizáveis conectados a analisadores de pH e oxigênio dissolvido, entre outros periféricos. (ALEKSIEVA; PEEVA, 2000) (Figura 10).

Figura 10. Biorreator do tipo tanque agitado e aerado (A); impelidores tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton (B).



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

Buscando-se melhores desempenhos a fim de garantir uma mistura eficiente do meio reacional (contato intenso entre as fases sólida-líquida-gasosa), diferentes tipos de impelidores foram desenvolvidos, sendo o mais utilizado o impelidor tipo turbina de seis pás planas ou tipo Rushton, com o aspersor de gás localizado logo abaixo do impelidor (ASENJO; MERCHUK, 1994).

A agitação realizada em biorreatores apresenta diferentes funções durante o cultivo, promovendo transferência de calor e massa, homogeneização das suspensões e transferência de oxigênio para o meio líquido, sendo esse um dos fatores mais críticos na operação de um biorreator em processos aeróbios.

Quando realizados cultivo utilizando-se microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, o oxigênio geralmente é o fator limitante na cultura por apresentar baixa solubilidade em água. Quando comparado a outros nutrientes presentes em meios de cultivo, o oxigênio apresenta-se em concentrações em torno de 10 mg/L a 20°C, chegando a ser de 1.000 a 10.000 vezes menores que as concentrações de outros componentes do meio, como a glicose (BAILEY; OLLIS, 1986).

O oxigênio é essencial para a ocorrência do metabolismo da glicose, agindo como agente oxidante de algumas enzimas participantes da glicólise, e da respiração

celular para a geração de energia em forma de ATP através do ciclo de Krebs, energia essa fundamental para o crescimento celular e síntese de produtos e outras atividades celulares (SCHMIDELL, 2001). Ademais, como já descrito anteriormente, especificamente para o presente trabalho, o sucesso na obtenção da fluorescência emitida pela proteína GFP aqui estudada depende da presença de oxigênio para promover a oxidação do grupamento cromóforo (HEIM et al., 1994).

A baixa solubilidade do oxigênio não é o único fator a dificultar sua utilização pelas células. O processo de transferência de oxigênio em si, da fase gasosa para a fase líquida, enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos mais viscosos à medida que o cultivo evolui. Além disso, o aumento do consumo global de oxigênio é diretamente proporcional ao aumento da concentração celular e da velocidade específica de respiração celular. Sendo assim, a transferência de massa no biorreator deve ser contínua e eficaz de modo a suprir a demanda de oxigênio requerida pelas células.

A resistência global à transferência de oxigênio gás-líquido equivale à soma das resistências individuais, e suas magnitudes dependem da hidrodinâmica da bolha e da fase líquida, da composição e reologia do meio de cultivo, concentração e atividade celular, assim como do fenômeno interfacial gás-líquido, sendo o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) utilizado para comparar a capacidade de transferência desse gás em biorreatores aeróbios (KARGI; MOO-YOUNG, 1985).

O k_{La} pode ser definido como o produto do coeficiente de transferência de massa de filme líquido (k_L) pela área interfacial específica de troca de massa (a), ambos dependentes de uma série de variáveis:

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

De modo geral, as variáveis apresentadas nos pontos 2) e 3) tendem a alterar de forma significativa o k_{La} , ao contrário do efeito gerado pelas propriedades do líquido (1).

Alguns autores relatam que cultivos utilizando-se bactérias e fungos filamentosos apresentam dificuldade na transferência de oxigênio em decorrência da interação entre as células dos microrganismos que acabam apresentando comportamento não-newtoniano (KAROW et al., 1953; LEDUY et al., 1974; RICHARDS, 1976).

Tais interações promovem aumento na viscosidade aparente do meio de cultivo, relacionada principalmente a sua concentração, morfologia e interação com o meio de

cultivo (BOWERS, 1955; OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994). Entretanto, cultivos realizados utilizando-se bactérias unicelulares não filamentosas, como a *E. coli*, não devem apresentar grande variação no comportamento reológico não sendo este, portanto, um fator limitante à transferência de oxigênio (LOZANO, 1982).

Além de permitir o controle dos parâmetros até aqui descritos, a utilização de biorreatores fornece a possibilidade de trabalhar-se com diferentes perfis de alimentação a depender do objeto em estudo. Nesse contexto, diferentes modos de operação podem ser adotados, dentre eles: contínuo, descontínuo (*batch*) e semi-contínuo (*fed-batch*).

Em operações contínuas o fluxo de alimentação ocorre continuamente enquanto o meio de cultura contendo células, resíduos e o produto de interesse são removidos à mesma taxa a fim de manter-se constantes o volume da cultura e a concentração dos nutrientes (SHULER; KARGI, 2002). Apesar de permitir o controle da taxa de crescimento celular desejado, é um processo bastante demorado e que apresenta alta instabilidade do plasmídeo (ROCHA, 2003).

Diferentemente do processo contínuo, no processo em batelada (descontínuo) tanto os componentes necessários à nutrição da célula, com exceção do oxigênio, quanto o inóculo, são adicionados apenas no início do cultivo, variando, portanto, a concentração de substrato ao longo do processo conforme ocorre consumo do mesmo pelas células. Outra diferença é a coleta do produto de interesse, que nesse caso, ocorre apenas ao final do processo (LIM; SHIN, 2013). Dessa forma, o volume permanece praticamente constante.

Nas culturas em batelada alimentada os nutrientes são adicionados ao longo do cultivo, permitindo que a concentração do substrato seja regulada alterando-se a velocidade de alimentação, uma das maiores vantagens em relação às operações contínua e em batelada (YAMANE; SHIMIZU, 1984). Na operação em batelada alimentada não ocorre retirada do meio durante o processo, sendo assim, os nutrientes são adicionados enquanto as células e o produto de interesse permanecem no reator até o final do processo (LEE et al., 1999). Portanto, nesse caso ocorre aumento de volume do meio ao longo do tempo (LIM; SHIN, 2013).

Muitos estudos com o objetivo de desenvolver-se estratégias de cultivo a fim de obter-se altas densidades celulares utilizando-se *rE. coli* podem ser encontrados na literatura (KORZ et al., 1995; SEEGER et al., 1995; SHILOACH; FASS, 2005) sendo a batelada-alimentada o modo de operação mais utilizado para esse fim (YIM et al., 2001).

O bom rendimento e sucesso de um processo em batelada alimentada depende não somente da escolha do meio e nutrientes que irão melhor suprir as necessidades do microrganismo utilizado, mas também do desenvolvimento de estratégias de alimentação que favoreçam altas taxas de formação do produto de interesse. A utilização do modo de operação batelada alimentada permite o monitoramento e manutenção do μ através do controle no fornecimento de substrato (ÇALIK et al., 1999).

Nesse caso, a suplementação do meio deve ser controlada de modo a fornecer nutrientes em concentração suficiente para suprir a demanda do microrganismo para o crescimento celular, entretanto, sem permitir que ocorra o acúmulo do mesmo, garantindo que não ocorra inibição do crescimento bacteriano ou formação de metabólitos indesejados. Ademais, tanto o crescimento quanto a expressão proteica são fortemente influenciados pelo perfil de alimentação e pela taxa de crescimento, influenciando, portanto, a produtividade do processo (AULICINO et al., 2010).

Em estudo realizado por Norsyahida e colaboradores (2009) é relatado que, em um cultivo utilizando-se *E. coli*, uma baixa taxa de alimentação constante levou a obtenção de uma maior concentração proteica quando comparada aos resultados obtidos utilizando-se alta velocidade de alimentação (NORSYAHIDA et al., 2009). Entretanto, alguns autores utilizam estratégias de alimentação nas quais a velocidade específica de crescimento (μ) é aproximadamente igual à máxima ($\mu \approx \mu_{máx}$) sem que haja limitação ou inibição do crescimento celular e síntese proteica (RIESENBERG; GUTHKE, 1999).

A fim de manter a taxa de crescimento desejada, diferentes estratégias de alimentação podem ser exploradas. Neste contexto, as operações em batelada alimentada podem ser divididas em dois grupos de acordo com seu perfil de alimentação: 1) operações com *feedback*, nas quais parâmetros como pH (pH-*stat*) e oxigênio dissolvido (DO-*stat*) são verificados para regular a velocidade de alimentação (SHILOACH; FASS, 2005); 2) operações sem *feedback*, subdivididas em quatro grupos de acordo com a continuidade e a velocidade de alimentação, sendo elas fluxo de alimentação por pulso, constante, exponencial e linear (ÖZTÜRK et al, 2016).

Na alimentação por pulso a concentração do substrato varia, sendo mantida dentro de um limite pelos pulsos que são introduzidos no sistema antes que o substrato seja completamente consumido. Os limites máximo e mínimo da concentração do substrato, o número de pulsos e a quantidade de substrato adicionada em cada pulso deve ser previamente definida (ÖZTÜRK et al, 2016).

Na alimentação constante, como o próprio nome já diz, o fluxo de alimentação (Q) do sistema será mantido a uma taxa constante pré-determinada por todo o processo. Nesse caso, μ e a taxa de consumo do substrato (q_s) irão diminuir ao longo do tempo de cultivo devido ao aumento no volume e no número de células (LEE, 1996; ÖZTÜRK et al, 2016).

O aumento na produtividade pode ser alcançado alterando-se o perfil de alimentação de constante para exponencial ou para linear, nas quais os substratos são adicionados a uma vazão (Q; L/h) predeterminada de acordo com as equações abaixo, sendo a equação 1 (Eq. 1) para alimentação com vazão linear e a equação 2 (Eq. 2) para alimentação com vazão exponencial

$$Q(t) = k \cdot t \quad \text{Eq. 1}$$

$$Q(t) = \frac{\mu_0 V_0 C_{X_0}}{C_{S_0}^0 Y_{X/S}} \exp(\mu_0 t) \quad \text{Eq. 2}$$

onde t = tempo (h) e k = aceleração volumétrica (L/h²), μ_0 = velocidade específica de crescimento do microrganismo (h⁻¹), V_0 = volume ao início do cultivo (L), C_{X_0} = concentração inicial de células (g/L), C_{S_0} = concentração do substrato (g/L) e $Y_{X/S}$ = coeficiente de rendimento de substrato por célula (g_{célula}/g_{substrato}) (ÖZTÜRK et al, 2016). Dentre os perfis de alimentação, o modo exponencial é considerado o mais elaborado por se utilizar de um modelo empírico de crescimento celular para determinar a vazão de alimentação a fim de manter a μ constante, de forma que $\mu_{set} < \mu_{crítico} < \mu_{máx}$. Quando em condições de crescimento balanceado e não limitado pela deficiência de nutrientes é possível observar um crescimento celular exponencial, atingindo-se uma concentração celular elevada mais rapidamente (AULICINO et al., 2010).

Entretanto, a imposição de uma alta velocidade de crescimento celular em cultivos utilizando-se *E. coli* pode levar à formação de acetato quando utilizada a glicose como fonte de carbono. A liberação do referido composto pode ser minimizada através do controle da μ abaixo do seu valor crítico (LEE et al., 1999). Além disso, altas taxas de expressão da proteína heteróloga promovem estresse celular já que a mesma é forçada a direcionar o seu metabolismo para a síntese proteica, afetando assim o seu crescimento.

Sendo assim, o perfil de alimentação selecionado nas operações em modo

batelada alimentada permite regulação da concentração de nutrientes que irão afetar processos essenciais ao metabolismo do microrganismo e assim, favorecer a formação do produto de interesse.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo aumentar a produção da proteína verde fluorescente (GFP) em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, em modo de operação batelada alimentada, utilizando *Escherichia coli* recombinante, a fim de obter a máxima densidade celular com consequente máxima produção proteica.

3.2 Objetivos específicos

- Definição do melhor meio de cultura para crescimento da *Escherichia coli* recombinante e produção da proteína GFP;
- Definição da melhor temperatura para realização do cultivo;
- Definição da melhor fonte de carbono utilizada para crescimento da bactéria recombinante em questão e produção de GFP;
- Definição do melhor agente indutor para produção de GFP;
- Definição da melhor velocidade de agitação em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, em modo de operação batelada;
- Determinação dos parâmetros cinéticos em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, em modo de operação batelada;
- Determinação dos nutrientes necessários para suplementação do meio de cultivo.
- Determinação do melhor momento para início da alimentação em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, em modo de operação batelada alimentada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismo

Foi utilizado o microrganismo recombinante *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS pET28(a), conservado em criotubos contendo 40% de glicerol (v/v) 50% (v/v) a temperatura de -80°C em ultra freezer modelo THERMO FORMA® 904.

O plasmídeo pET28(a) contém o gene codificador da GFP, juntamente ao gene

de resistência ao antibiótico canamicina. No plasmídeo pLysS estão contidos o gene codificador da lisozima T7 e o gene de resistência ao antibiótico cloranfenicol.

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

4.2 Meios de cultivo

Para facilitar a descrição dos meios líquidos utilizados no presente trabalho, foi criado um código onde está descrito o meio utilizado e sua concentração, seguido da fonte de carbono e sua concentração e, por fim, os suplementos adicionados ao meio e suas respectivas concentrações. A Tabela 1 apresenta os meios e seus componentes juntamente aos seus respectivos códigos.

Tabela 1. Meios líquidos utilizados e seus respectivos códigos.

Suplementos Código	Lactose	Glicose	Glicerol	Fosfato	Amônio	Extrato de levedura	Sulfato de magnésio (MgSO ₄)
LB_Lac	*	-	-	-	-	-	-
LB_Glico	-	*	-	-	-	-	-
LB_Lac(20g/L)_Glico (10g/L)_Glice(60g/L) ¹	20 g/L	10 g/L	60 g/L	-	-	-	-
LB_Lac(40g/L)_P(2g/L)	40 g/L	-	-	2,0 g/L	-	-	-
LB_Lac(40g/L)_N	40 g/L	-	-	-	*	-	-
LB_Lac(40g/L)_EL	40 g/L	-	-	-	-	*	-
LB_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_MgSO ₄	40 g/L	-	-	-	-	2,5 g/L	*

FONTE: dados da pesquisa.

¹Adaptado de STUDIER, 2005.

*Diferentes concentrações.

*O meio complexo Luria Bertani (LB) composto por Triptona (10g/L), extrato de levedura (5g/L) e NaCL (10g/L), foi utilizado nas concentrações de 12,5 g/L, 25 g/L, 37,5 g/L e 50g/L.

A lactose e a glicose foram utilizadas nas concentrações de 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L. Além disso, a lactose foi utilizada também na concentração de 22,5 g/L.

No caso do meio LB_Lac(40)_P(2), utilizou-se fosfato dissódico em quantidade suficiente para fornecer 2 g/L de fosfato.

O meio LB_Lac(40)_N teve adicionado ao meio sulfato de amônio em quantidade suficiente para fornecer 1 g/L e 2 g/L de amônio, enquanto que o meio LB_Lac(40g/L)_EL teve adicionado ao meio concentrações de 2,5 g/L, 5,0 g/L, 7,5 g/L e 10 g/L de extrato de levedura.

Por fim, ao meio LB_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_MgSO₄ foram adicionados 0,5 mM, 1,0 mM e 2,0 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄).

- Meio definido para alta densidade celular (HCD), descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Componentes do meio HCD.

Componente	Concentração
Glicerol	40,00 g/L
KH₂PO₄	13,30 g/L
(NH₄)₂HPO₄	4,00 g/L
Ácido cítrico	1,70 g/L
MgSO₄.7H₂O	1,20 g/L
Citrato de Ferro (III)	100,00 mg/L
Tiamina	45,00 mg/L
Zn(CH₃COO)₂.2H₂O	33,80 mg/L
MnCl₂.4H₂O	15,00 mg/L
EDTA	13,00 mg/L
H₃BO₃	3,00 mg/L
CoCl₂.6H₂O	2,50 mg/L
Na₂MoO₄.2H₂O	2,10 mg/L
CuCl₂.2H₂O	1,50 mg/L

FONTE: Silva, 2011.

Para o preparo do meio HCD, foi feita uma solução contendo EDTA, ácido cítrico, ácido bórico e todos os sais descritos na Tabela 4, com exceção do sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Ajustou-se o pH para 6,3 e esterilizou-se esta solução a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Tanto o glicerol quanto a solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foram esterilizadas separadamente em autoclave também a 121°C e 1 atm por 20 minutos e adicionadas assepticamente à primeira solução.

Após esterilização, foram adicionados assepticamente a todos os meios os antibióticos cloranfenicol e canamicina na concentração de 50 µg/mL, esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

4.3 Agentes indutores

Para avaliação da melhor atividade de indução da produção de GFP pela *E. coli* foram utilizados como agente indutores a lactose, nas concentrações de 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 22,5 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L, e seu análogo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações 0,05 mM, 0,075 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,5 mM, 0,75 mM e 1 mM.

A lactose foi preparada adicionando-se a mesma ao meio de cultura durante seu preparo. Já o IPTG foi preparado em água e esterilizado por filtração em membrana de 22 µm e adicionado ao meio em momentos determinados a depender do ensaio realizado.

4.4 Planejamento experimental

O planejamento experimental foi realizado a fim de avaliar quais das seguintes variáveis apresentam interferência estatisticamente significativa no crescimento e produção de GFP pela *E. coli*: temperatura do cultivo (X_1), agitação (X_2), preenchimento do frasco Erlenmeyer de 500 mL (X_3) e concentração do indutor (X_4), podendo ser esse, lactose ou IPTG.

Todos os ensaios foram conduzidos apenas em mesa incubadora rotativa e o cálculo estatístico dos dados obtidos foi realizado utilizando-se o *software Protimiza Experimental Design®*.

A matriz do planejamento experimental, fornecida pelo *software*, com os valores codificados e reais pode ser encontrada nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Matriz das variáveis codificadas analisadas no Planejamento fatorial 2^4 .

Temperatura (X ₁)	Agitação (X ₂)	Preenchimento do frasco (X ₃)	Lactose/ IPTG (X ₄)
-1	-1	-1	-1
+1	-1	-1	-1
-1	+1	-1	-1
+1	+1	-1	-1
-1	-1	+1	-1
+1	-1	+1	-1
-1	+1	+1	-1
+1	+1	+1	-1
-1	-1	-1	+1
+1	-1	-1	+1
-1	+1	-1	+1
+1	+1	-1	+1
-1	-1	+1	+1
+1	-1	+1	+1
-1	+1	+1	+1
+1	+1	+1	+1
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0

FONTE: *Protimiza Experimental Design*®.**Tabela 4.** Variáveis reais analisadas no Planejamento fatorial 2^4 .

Variáveis	-1	0	+1
Temperatura (X ₁)	20°C	25°C	30°C
Agitação (X ₂)	150 rpm	200 rpm	250 rpm
Preenchimento do frasco (X ₃)	5%	10%	15%
Lactose (X ₄)	5 g/L	22,5 g/L	40 g/L
IPTG (X ₄)	0,05 mM	0,125 mM	0,2 mM

FONTE: dados da pesquisa.

A significância das variáveis foi avaliada aplicando-se o teste **t** de Student.

Sendo o valor de **t** calculado (**t_{calc}**) superior ao **t** tabelado (**t_{tab}**), para determinado nível de significância α e λ graus de liberdade, considera-se que a variável afeta significativamente a resposta. Além disso, para ser considerado estatisticamente significativo para um determinado nível de probabilidade, neste caso de 99%, o valor

do parâmetro calculado tem que ser significativamente diferente de zero nesse nível de confiança.

Os mesmos parâmetros foram utilizados para avaliar a significância da interação entre as variáveis analisadas.

A Tabela 3 apresenta os níveis de significância com seus respectivos valores de t_{tab} para os graus de liberdade do estudo, nesse caso, 34 graus de liberdade.

Tabela 5. Valores de t_{tab} para cada nível de significância.

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

As respostas foram ajustadas a um modelo polinomial de primeira ordem, expresso pela Equação 3 (Eq. 3):

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

Onde:

Y - variável de resposta (Y_1 = crescimento bacteriano; Y_2 = concentração de GFP),

b_0 – valor da média global das respostas

b_1 , b_2 , b_3 e b_4 – efeitos principais

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

X_1 , X_2 , X_3 e X_4 – variáveis estudadas.

A análise da superfície gerada permitiu inferir em qual região encontram-se as condições ótimas dentro da área avaliada.

A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 e a sua significância estatística foi determinada pelo teste F de Fisher.

4.5 Metodologia Experimental

4.5.1 Preparo da cultura estoque em criotubos

Foi preparado um pré-inóculo de *rE. coli* em meio complexo LB, realizado a 150 rpm e 30°C, durante 12-16 h até obtenção de densidade óptica de no mínimo 2,5 e no máximo 3. Deste, foi retirada uma alíquota de 180 µL que foi adicionada assepticamente a um criotubo estéril.

Como crioprotetor foram adicionados 120 µL de glicerol 50% (v/v) obtendo-se volume final de 300 µL. Em seguida os criotubos foram estocados a -80°C.

4.5.2 Preparo do inóculo

Todos os cultivos foram iniciados a partir de um inóculo preparado em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 20 % de preenchimento com meio LB na concentração de 25 g/L, inoculado com 300 µL de meio de cultura contendo o microrganismo conservado em criotubos, como descrito no item 4.5.1. Os antibióticos cloranfenicol e canamicina foram adicionados assepticamente ao meio em volume suficiente para obtenção da concentração final de 50 µg/mL.

O inóculo foi mantido em mesa incubadora rotativa a 150 rpm e 30°C durante 12-16 h até obtenção de densidade óptica de no mínimo 2,5 e no máximo 3, garantindo assim que o crescimento se encontrasse ainda em fase exponencial.

4.5.3 Ensaio em microplaca de 96 poços

O cultivo em microplaca estéril de 96 poços foi realizado a partir de um inóculo preparado como descrito no item 4.5.2. Cada poço contendo meio complexo LB foi inoculado com quantidade suficiente de inóculo para obtenção de densidade óptica inicial de 0,05. Foram utilizados como controle poços não inoculados contendo meio LB puro e meio LB com adição das substâncias em teste (glicose, lactose e IPTG).

O cultivo foi realizado em leitor de microplacas modelo TECAN Infinite M 200 PRO, a 30°C e 150 rpm, tendo a densidade óptica e a unidade de fluorescência registradas a cada 15 minutos durante 12 horas.

4.5.4 Ensaaios em frasco agitado

Todos os ensaios em frasco agitado foram realizados em frasco Erlenmeyer de 500 mL com diferentes volumes de preenchimento e em diferentes rotações e

temperaturas, a depender do ensaio realizado.

Todos os cultivos foram iniciados com densidade óptica (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,1, a partir de inóculo preparado como descrito no item 4.5.2 e tiveram a adição dos antibióticos canamicina e cloranfenicol em volume suficiente para obtenção da concentração final de 50 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.5 Cultivos em biorreator

Os experimentos aqui descritos foram realizados em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, TEC-BIO-FLEX Tecnal-Brasil®, equipado com controlador de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, rotação, rotâmetro para aeração e bombas de alimentação de nutrientes, adição de antiespumante e adição de soluções ácidas e básicas. O biorreator dispõe de volume total de 7,5 L e de 5,0 L de volume útil, com diâmetro interno de 0,190 m e diâmetro externo de 0,217 m. O sistema dispõe de quatro chicanas opostas diametralmente com largura de 0,015 m e foi montado utilizando-se dois impelidores do tipo turbinas Rushton.

Os cultivos foram realizados com 4 L de meio LB (25 g/L) utilizando-se água destilada. O pH foi ajustado em 7,0 e posteriormente foi esterilizado em autoclave (modelo AV 75, PHOENIX®) a 121°C e 1 atm, por 20 minutos.

Todos os reatores foram inoculados com inóculos preparados como descrito no item 4.5.2, em quantidade suficiente para obter-se DO_{600nm} inicial de 0,1, e tiveram cloranfenicol e canamicina adicionados na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$.

A aeração, temperatura e rotação variaram entre os cultivos a depender do ensaio realizado, sendo avaliadas aeração de 0,5 e 0,75 vvm, temperaturas de 20°C e 25°C e agitação de 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm e 1000 rpm. Amostras foram retiradas para quantificação da concentração de GFP, lactose e DO_{600nm} a cada 2 horas.

4.5.5.1 Cultivos em biorreator em modo de operação batelada alimentada

Os cultivos conduzidos em biorreator no modo de operação batelada alimentada foram realizados a 800 rpm, 0,5 vvm e 25°C, com 3 L de meio LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_MgSO₄(1,0mM) utilizando-se água destilada com pH 7.

O meio de cultivo foi preparado em duas etapas, de forma que a solução de sulfato de magnésio foi autoclavada separadamente. Tanto o biorreator contendo o meio LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L) quanto a solução de sulfato de magnésio foram

autoclavados em autoclave (modelo AV 75, PHOENIX®) a 121°C e 1 atm, por 20 minutos. Posteriormente, a solução de sulfato de magnésio foi adicionada, assepticamente, em quantidade suficiente para fornecer 1,0 mM de sulfato de magnésio ao meio.

Foram preparados 2 L de meio LB(25g/L)_Lac(90g/L) que foram adicionados ao biorreator em um alimentação com vazão contínua e um fluxo de alimentação de 33,3 mL/h, fornecendo 3 g/h de lactose ao meio (1g/L.h de lactose, considerando o volume inicial do biorreator), sendo iniciada com 24 horas, 30 horas e 48 horas de cultivo.

Todos os reatores foram inoculados com inóculos preparados como descrito no item 4.5.2, em quantidade suficiente para obter-se DO_{600nm} inicial de 0,1, e tiveram cloranfenicol e canamicina adicionados na concentração de 50 µg/mL.

Amostras foram retiradas para quantificação da concentração de GFP, lactose e DO_{600nm} a cada 2 horas.

4.6 Metodologia analítica

4.6.1 Determinação da concentração celular

O crescimento celular foi acompanhado de acordo com a densidade óptica do meio de cultura no comprimento de onda de 600nm (DO_{600nm}) utilizando espectrofotômetro GENESYS 10S, THERMO SCIENTIFIC®, bem como por medidas de massa seca (g/L).

A curva de calibração para conversão dos valores de DO_{600nm} em massa de célula (g/L) foi obtida a partir dos cultivos realizados em biorreator, através da adição de um volume conhecido da amostra em placas de Petri previamente secas e pesadas. A amostra foi submetida a secagem por 24 horas em estufa a 60°C e pesada posteriormente.

O ensaio foi realizado em triplicata.

A partir das medidas de DO_{600nm} e da concentração de biomassa (Cx) obteve-se a correlação $Cx = 0,4132 \cdot DO_{600nm}$.

Os resultados do ensaio e a curva de calibração podem ser encontrados no APÊNDICE A.1.

4.6.2 Determinação da concentração de proteína

Para análise da concentração de GFP nas amostras, uma alíquota foi

centrifugada a 10000 rpm por 20 minutos em centrífuga UNIVERSAL 320R, HETTICH®. O sobrenadante foi armazenado para posterior quantificação da concentração de lactose e o aglomerado celular ressuspensionado em 1 mL de tampão Tris-HCl pH 8. As amostras foram congeladas e a concentração de GFP foi lida somente após um ciclo de descongelamento para que ocorresse a lise celular.

Para leitura, as amostras foram adicionadas em placas de 96 poços e a unidade de fluorescência (UF) foi medida em leitor de placas Multimode Plate Reader PERKINELMER ENSPIRE® em comprimento de onda de excitação da molécula de 488 nm e de emissão de fluorescência de 507 nm.

A curva de calibração para conversão da UF registrada em concentração de GFP (mg/L) forneceu a correlação $GFP = UF/18552$ (APÊNDICE A.2).

4.6.3 Determinação da concentração das fontes de carbono

➤ Lactose

As concentrações de lactose do meio de cultura foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando aparelho SHIMADZU, com controladora CBM20A, bomba NexeraXR LC20AD, fluxo de 1 mL/min, coluna Amino CLC-NH₂ Shimpack, utilizando acetonitrila:água (75:25) como fase móvel, tempo de corrida de 14 minutos, tempo de retenção (R_t) de 10,8 minutos, detector RID 20A, temperatura de 30°C e volume de injeção da amostra de 20 µL.

A curva de calibração utilizada para conversão da área sob a curva em concentração de lactose (g/L) forneceu a correlação $Lactose = \text{área}/140878$, e pode ser encontrada no APÊNDICE A.3.

➤ Glicose

As concentrações de glicose do meio de cultura foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando aparelho SHIMADZU, com controladora CBM20A, bomba NexeraXR LC20AD, fluxo de 0,9 mL/min, coluna Aminex® HPX 87 P BIO RAD, utilizando água como fase móvel, tempo de corrida de 10 minutos, tempo de retenção (R_t) de 8,3 minutos, detector RID 20A, temperatura de 70°C e volume de injeção da amostra de 20 µL.

A curva de calibração utilizada para conversão da área sob a curva em concentração de glicose (g/L) forneceu a correlação $Glicose = \text{área}/124023$, e pode ser

encontrada no APÊNDICE A.4.

4.6.4 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) e da taxa de transferência de oxigênio dissolvido (Oxygen Transfer Rate – OTR)

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

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

A taxa de transferência de oxigênio dissolvido (Oxygen Transfer Rate – OTR) foi calculada com base nas Equações 4 (Eq. 4) e 5 (Eq. 5).

$$C^* = X_{O_2} \cdot P_{atm} \cdot H \quad \text{Eq. 4}$$

$$OTR = k_L a \cdot C^* \quad \text{Eq. 5}$$

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

4.6.5 Enriquecimento com oxigênio puro

Foram realizados dois experimentos utilizando oxigênio puro a fim de avaliar a possível presença de moléculas proteicas não oxidadas.

O primeiro experimento foi realizado com a biomassa celular congelada de cultivos anteriores. Uma alíquota da mesma foi diluída em água e outra em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e tiveram sua fluorescência emitida verificada. Posteriormente, as

duas amostras foram submetidas a aeração com O₂ puro na vazão de 1 L/min durante 8 horas em temperatura controlada a 22°C.

Durante as duas primeiras horas foram coletadas amostras para verificação da fluorescência emitida a cada 15 minutos e posteriormente passaram a ser coletas em intervalos de uma hora, até a finalização do experimento (HEIM et al., 1994).

No segundo experimento seguiu-se a mesma metodologia, porém desta vez uma alíquota foi medida antes da aeração com O₂ e após uma hora retirou-se outra alíquota para aferição da concentração de GFP. Após a constatação das duas medidas, foram retiradas 4 alíquotas das amostras e congeladas em freezer para determinação da estabilidade da concentração de GFP quando armazenadas em água e no tampão Tris-HCl.

4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

4.7.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máx}}$)

A velocidade específica de crescimento é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 6 (Eq. 6).

$$d(Cx.V)/dt = \mu.Cx.V \quad \text{Eq. 6}$$

Na fase exponencial do crescimento $\mu = \mu_{\text{máx}}$ portanto, após integrar e rearranjar a Equação 4, a velocidade específica de crescimento pode ser calculada através da Equação 7 (Eq. 7).

$$\ln Cx/Cx_0 = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad \text{Eq. 7}$$

onde Cx_0 é a concentração celular no tempo zero e t é o tempo de cultivo.

4.7.2 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$)

Para o cálculo do coeficiente de rendimento de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi utilizada a Equação 8 (Eq. 8).

$$Y_{x/s} = Cx - Cx_0 / (Cs_0 - Cs) \quad \text{Eq. 8}$$

onde Cx_0 é a concentração celular no tempo zero, Cs_0 é a concentração inicial do substrato, e Cx e Cs são as concentrações celular e de substrato, respectivamente, variando com o tempo.

A partir do cálculo do consumo de lactose e da produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, foi possível calcular o valor do $Y_{x/s}$.

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

Para o cálculo da produção específica ($Y_{p/x}$) e produtividade (Pr) foram utilizadas as Equações 9 (Eq. 9) e 10 (Eq. 10), respectivamente.

$$Y_{p/x} = (Cp - Cp_0)/Cx - Cx_0 \quad \text{Eq. 9}$$

$$Pr = Cp/t \quad \text{Eq. 10}$$

onde Cp é a concentração de GFP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da fonte de carbono e agente indutor

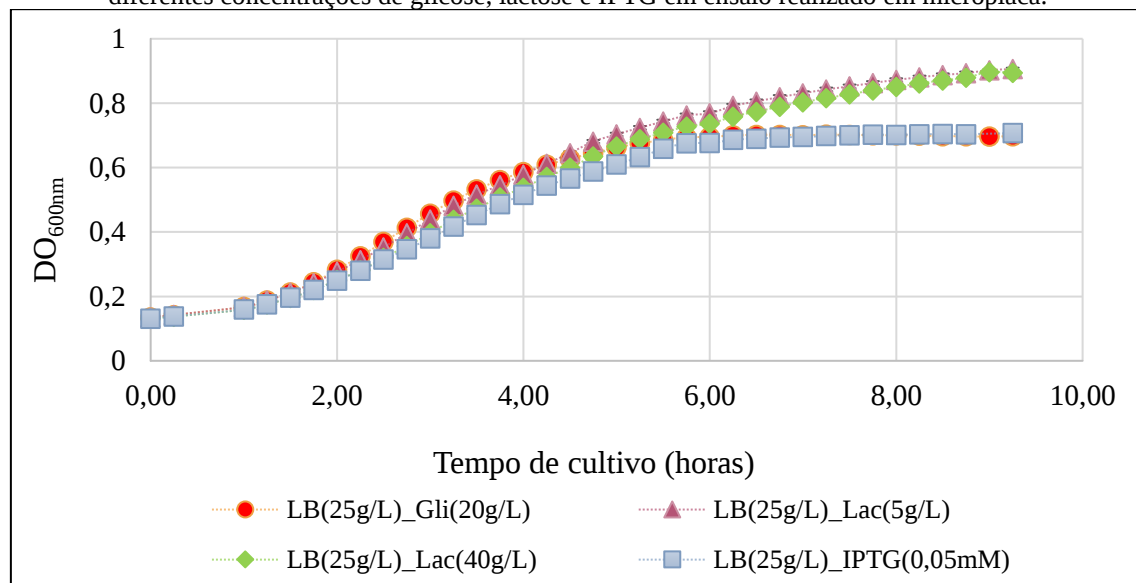
Foram realizados ensaios preliminares a fim de obter-se resultados iniciais sobre a influência da lactose e da glicose sobre o crescimento e produção da *E. coli* recombinante em estudo, além de avaliar o comportamento da lactose e do IPTG como agentes indutores.

Como relatado anteriormente, a temperatura ótima de crescimento para *E. coli* é de 37 °C, entretanto, reduzindo-se a temperatura para entre 26°C e 30°C, apesar de notar-se uma redução na capacidade de consumo de nutrientes e na velocidade específica de crescimento, é possível promover uma redução na demanda de oxigênio e nos possíveis efeitos tóxicos gerados por metabólitos secundários (LEE, 1996). Sendo assim, 30 °C foi a temperatura escolhida para condução dos ensaios preliminares.

O primeiro ensaio realizado foi o cultivo em microplaca de 96 poços no qual foi utilizado meio LB adicionado de glicose e lactose nas mesmas concentrações de 5 g/L, 10 g/L, 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L. Já o IPTG foi utilizado nas concentrações de 0,050 mM, 0,075 mM, 0,125 mM, 0,250 mM, 0,500 mM, 0,750 mM e 1 mM. O meio LB foi preparado de acordo com as instruções do fabricante, na concentração de 25 g/L.

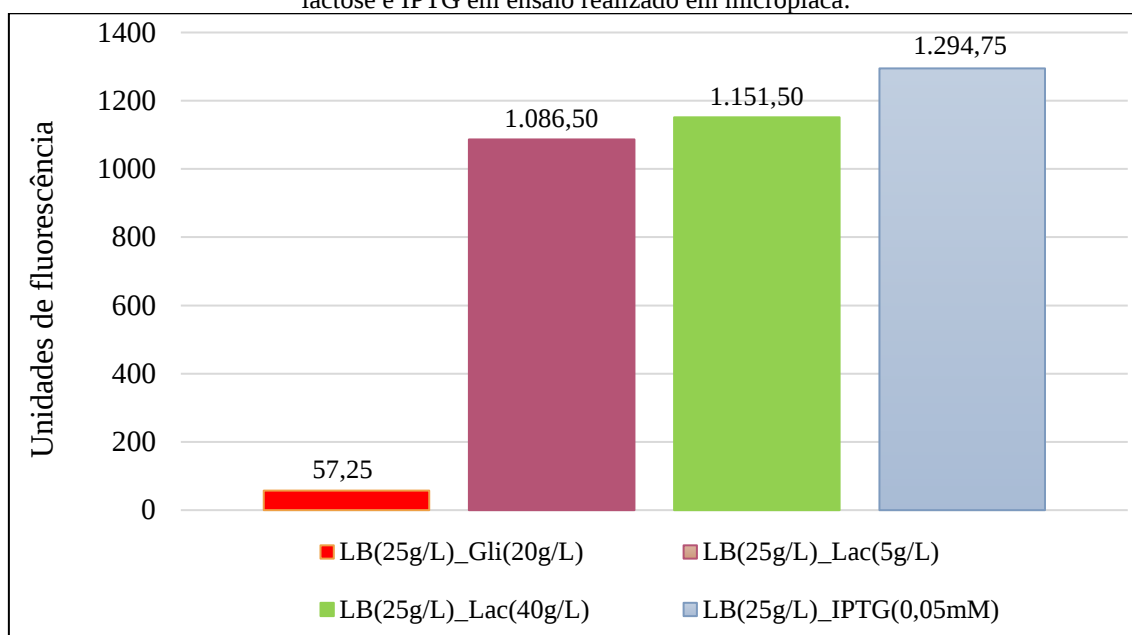
As Figuras 11 e 12 apresentam as melhores condições observadas para o crescimento celular e emissão de fluorescência (medida indireta da GFP), respectivamente, frente aos três compostos testados.

Figura 11. Curvas de crescimento celular dos melhores resultados observados frente a adição de diferentes concentrações de glicose, lactose e IPTG em ensaio realizado em microplaca.



FONTE: dados da pesquisa.

Figura 12. Emissão máxima de fluorescência frente a adição de diferentes concentrações de glicose, lactose e IPTG em ensaio realizado em microplaca.



FONTE: dados da pesquisa.

Os dados apresentados nos gráficos não estão expressos em concentração de GFP (mg/L) e biomassa (g/L) pois o ensaio foi realizado em equipamento diferente do utilizado para a realização das curvas de calibração.

Pôde-se observar que o cultivo contendo glicose apresentou menor crescimento celular, quando comparado à resposta observada frente a adição de lactose, e semelhante a observada no grupo no qual houve adição do IPTG. Além disso, apresentou emissão de fluorescência em torno de 20 vezes menor quando comparado com as respostas obtidas na presença da lactose e do IPTG.

A glicose é um dos substratos mais utilizados em cultivos de *E. coli* por ser facilmente metabolizada, apresentar baixo custo e ser fonte de carbono e energia. Entretanto, como descrito anteriormente, pode ocorrer ativação do “metabolismo overflow” levando à formação de acetato.

Sabe-se que concentrações de acetato acima de 5 g/L são capazes de levar a uma diminuição da velocidade de crescimento e concentração de biomassa (LULI; STROHL, 1994). Como resultado, ocorre diminuição da expressão da proteína recombinante desejada, o que explica o resultado observado no ensaio aqui descrito, já que a formação de acetato se dá durante a via glicolítica (RIESENBERG, 1991), não havendo assim formação do mesmo no metabolismo da lactose e nem frente a presença do IPTG.

Dessa forma, apesar de seu uso ser amplamente descrito na literatura para

crescimento de *E. coli*, nesse caso sua utilização não se apresentou promissora, não justificando a continuidade na sua utilização no trabalho.

A fim de avaliar se o aumento de escala iria alterar de alguma forma o resultado observado para o crescimento celular e emissão de fluorescência (expressão proteica), foram realizados ensaios em frasco agitado e em biorreator.

O ensaio em frasco agitado foi realizado em duplicata, com leitura também em duplicata, a 30°C e 150 rpm, utilizando-se meio LB na concentração de 25 g/L adicionado de IPTG na concentração de 0,05 mM ou lactose nas concentrações de 5 g/L e 40 g/L. Todos os frascos foram iniciados com DO_{600nm} de aproximadamente 0,1 a partir de inóculo preparado como descrito no item 4.5.2 e tiveram adicionados ao meio os antibióticos cloranfenicol e canamicina na concentração de 50 µg/mL.

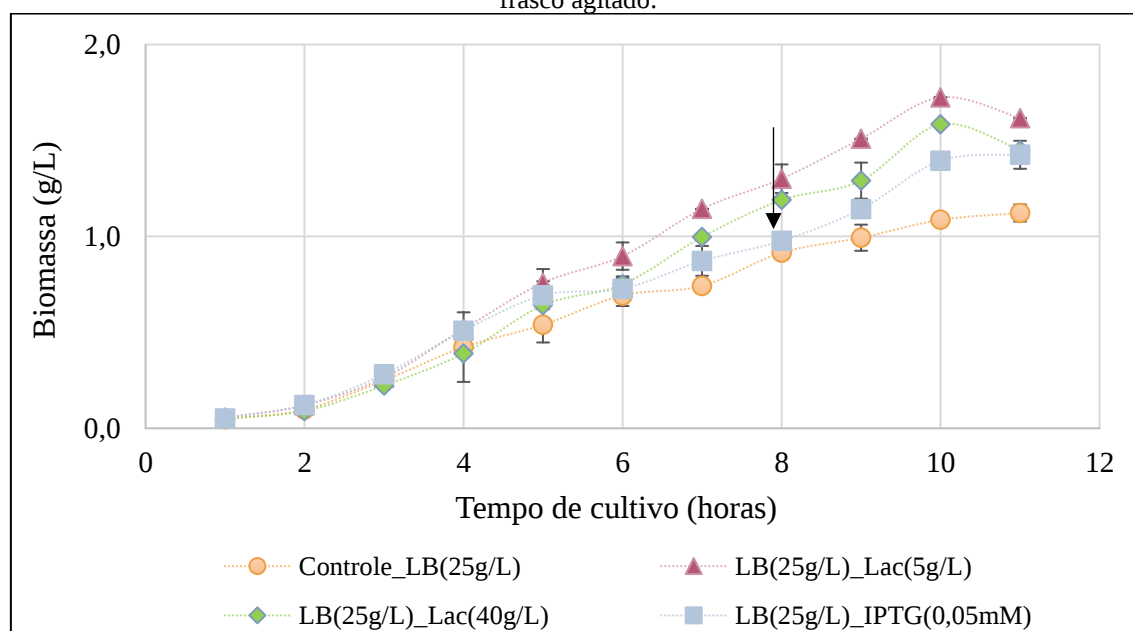
A indução com o IPTG ocorreu quando a DO_{600nm} chegou em torno de 2,5, com aproximadamente 8 horas de cultivo, enquanto a lactose foi adicionada ao meio de cultivo durante o preparo do mesmo.

O momento para indução com o IPTG foi determinado de forma que o crescimento do microrganismo estivesse, aproximadamente no meio da fase exponencial.

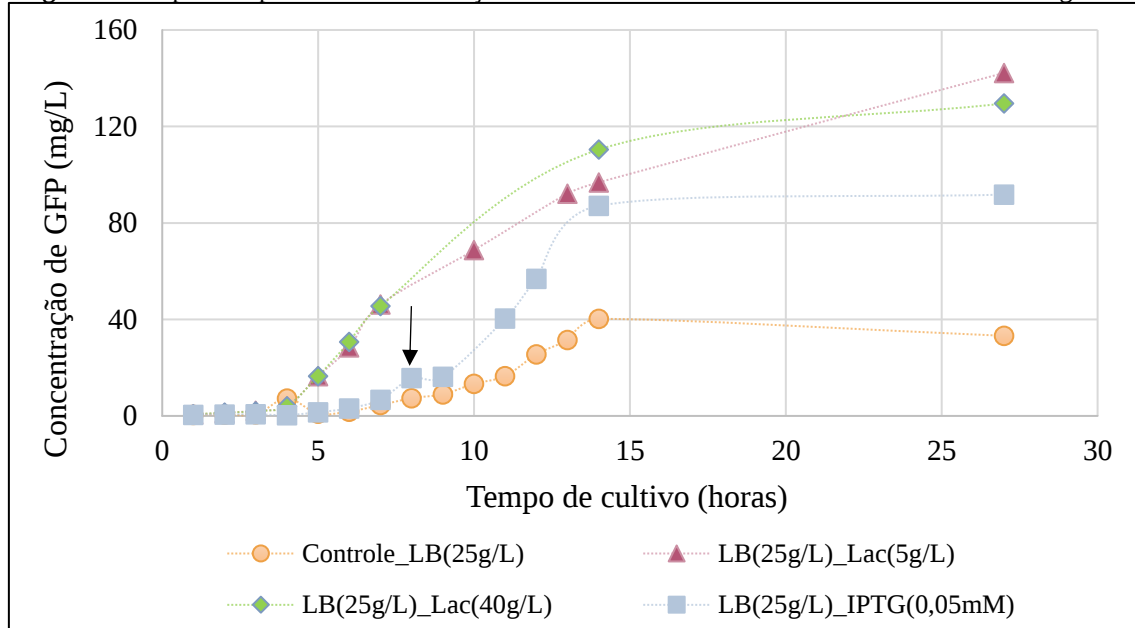
Meio LB na concentração de 25 g/L foi utilizado no grupo controle.

Os resultados obtidos para crescimento celular e concentração de GFP produzida são apresentados nas Figuras 13 e 14, respectivamente. A seta preta indica o momento em que foi realizada a indução com IPTG.

Figura 13. Curvas de crescimento celular frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em frasco agitado.



FONTE: dados da pesquisa.

Figura 14. Expressão proteica frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em frasco agitado.

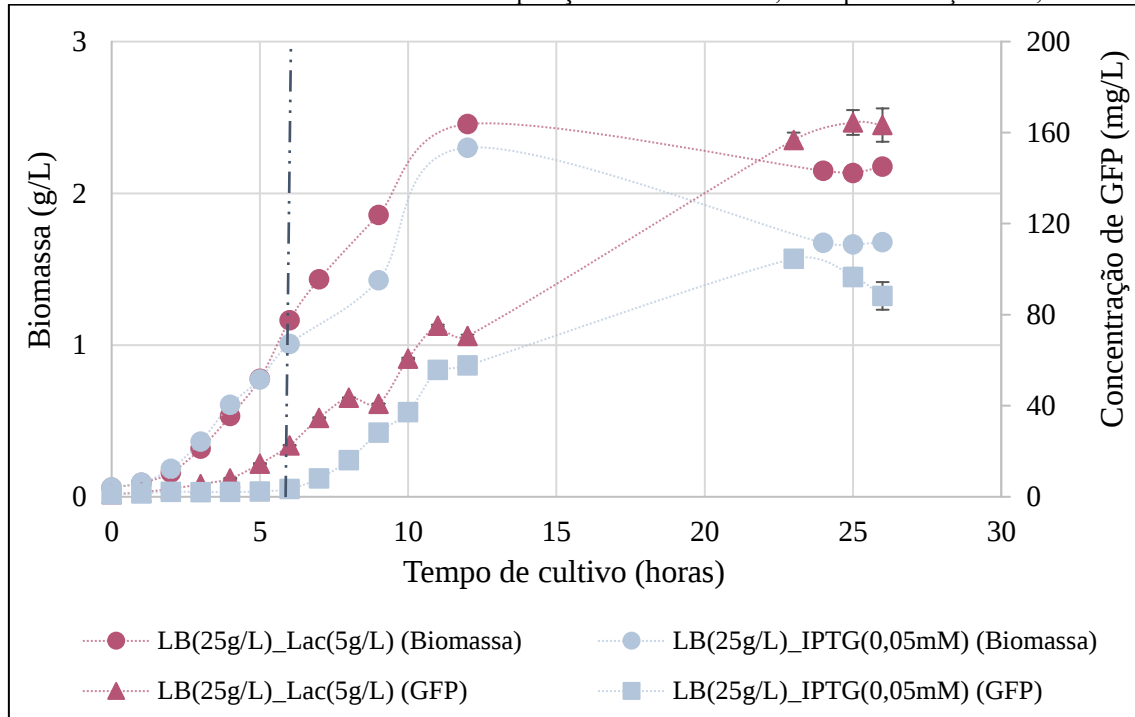
FONTE: dados da pesquisa.

O cultivo em biorreator foi realizado em modo de operação batelada utilizando-se meio LB adicionado de IPTG (0,05 mM) ou lactose (5 g/L), a 30°C, 300 rpm e aeração de 0,5 vvm. Foi preparado um inóculo como descrito no item 4.5.2 que foi utilizado para inocular o reator em quantidade suficiente para obtenção de DO_{600nm} inicial de 0,1. A indução com IPTG na concentração de 0,05 mM foi realizada quando atingida DO_{600nm} média de 2,44, com 6 horas de cultivo. Assim como no ensaio anterior, a lactose na concentração de 5 g/L esteve presente desde o início do cultivo.

Os antibióticos canamicina e cloranfenicol foram adicionados ao biorreator em quantidade suficiente para obtenção da concentração final de 50µg/mL.

A Figura 15 apresenta a comparação entre as curvas de crescimento celular e produção de GFP, observadas após utilização da lactose e do IPTG, além de indicar o momento no qual foi realizada a indução com IPTG (linha pontilhada).

Figura 15. Curvas de crescimento celular e expressão proteica frente a adição de lactose e IPTG em cultivo realizado em biorreator em modo de operação batelada a 30°C, 300 rpm e aeração de 0,5 vvm .



FONTE: dados da pesquisa.

A partir dos resultados apresentados pôde-se observar que a resposta para o crescimento celular, tanto em ensaio em frasco agitado como no ensaio realizado em biorreator, manteve a mesma relação observada no ensaio em microplaca, na qual a lactose promoveu maior crescimento bacteriano quando comparado ao IPTG. Entretanto, no caso da produção de GFP houve uma inversão dos resultados observados, onde a lactose levou a uma maior produção de GFP do que o IPTG.

No ensaio em frasco agitado a concentração máxima de biomassa formada nos cultivos utilizando-se lactose foi de 1,73 g/L (5 g/L) e 1,58 g/L (40 g/L), enquanto que para o que se utilizou IPTG a máxima biomassa observada foi de 1,43 g/L. No caso do biorreator, onde a concentração de lactose utilizada foi apenas a de 5 g/L, a concentração máxima de biomassa observada foi de 2,45 g/L, contra 2,30 g/L no biorreator induzido com IPTG.

Diferente do cultivo em microplaca, tanto no ensaio em frasco agitado quanto no biorreator, observa-se maior produção de GFP quando utilizada a lactose, e não o IPTG.

No ensaio em frasco agitado a produção de GFP foi de 142,21 mg/L quando utilizada lactose na concentração de 5 g/L, e 129,55 mg/L quando utilizada lactose na concentração de 40 g/L, contra 91,76 mg/L quando induzido com IPTG 0,05 mM. No caso do biorreator, a utilização de lactose na concentração de 5 g/L levou à produção de 164 mg/L, enquanto que a utilização de IPTG na concentração de 0,05 mM promoveu a

expressão de 105 mg/L de GFP.

Até 12 horas de cultivo no biorreator, ou seja, aproximadamente 6 horas após a indução com IPTG, nota-se as duas curvas (de lactose e de IPTG) com perfis e resultados bastante semelhantes, tanto para crescimento celular quanto para produção proteica. A partir de então pode-se observar uma diminuição no crescimento celular e, conseqüentemente, diminuição na inclinação da curva de produção proteica, sugerindo uma atividade inibitória no crescimento celular promovida pelo IPTG, condizente com alguns relatos da literatura (BENTLEY et al., 1991; STUDIER, 1991; XU et al., 2012).

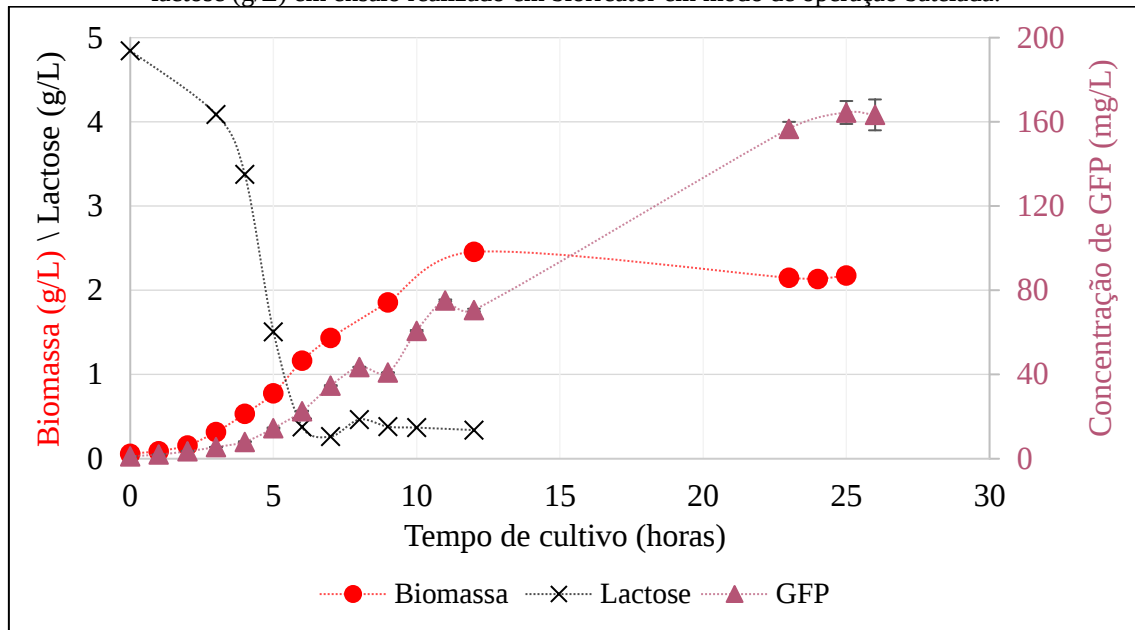
São relatados na literatura alguns resultados comparativos do uso de lactose e IPTG na produção de proteínas heterólogas utilizando-se *E. coli* como microrganismo recombinante. Em estudos publicados em 2002 e 2005, Menzella et al. (2002) e Silva (2005), descreveram produção proteica com resultados semelhantes quando utilizado IPTG ou lactose como agentes de indução (SILVA, 2005; MENZELLA et al., 2002). Utilizando *E. coli* BL21, Tomazetto (2006) relata que a lactose pode ser utilizada como agente indutor de expressão proteica em substituição ao IPTG (TOMAZETTO, 2006), além de ser capaz de promover o crescimento celular (NEUBAUER et al., 1991), característica que o IPTG não apresenta.

Mesmo em estudos nos quais a indução realizada utilizando-se IPTG levou a obtenção de maiores concentrações proteicas, a utilização de lactose ainda se apresentou mais vantajosa por levar à formação de menos metabólitos, promovendo assim maior estabilidade do plasmídeo (KILIKIAN et al., 2000).

Sendo assim, a Figura 16 apresenta as curvas de crescimento celular e produção de GFP quando utilizada lactose na concentração de 5 g/L versus a curva de consumo da mesma.

De acordo com o apresentado na Figura 16, pôde-se observar que com aproximadamente 4 horas de cultivo ocorre um brusco decaimento na concentração de lactose presente no meio, momento que coincide com um aumento na expressão de GFP e início da fase exponencial de crescimento. Entretanto, a lactose é praticamente toda consumida até esse momento, tornando-se presente no meio apenas em torno de 15% do tempo de cultivo.

Figura 16. Curva de crescimento celular (biomassa g/L) e produção de GFP (mg/L) versus consumo de lactose (g/L) em ensaio realizado em biorreator em modo de operação batelada.



FONTE: dados da pesquisa.

Em estudo utilizando-se *E. coli* para produção de penicilina acilase, Ramirez e colaboradores (RAMIREZ et al., 1994) observaram que um aumento na expressão proteica pode ser alcançado quando a indução é realizada ao longo de toda a fase exponencial do crescimento celular bacteriano. Portanto, pôde-se concluir que 5 g/L de lactose é uma quantidade insuficiente tornando-se fator limitante no cultivo.

Uma das preocupações é o fato da lactose estar presente já na preparação do meio de cultivo, podendo portanto exercer atividade indutora da expressão proteica desde o início do ensaio, comprometendo o crescimento bacteriano. É comum de se encontrar na literatura trabalhos com o objetivo de determinar qual o melhor momento para se realizar a indução, sendo este normalmente no meio da fase exponencial de crescimento. Entretanto, Penna e colaboradores (2004) relatam que quando a indução é realizada com DO_{600nm} de 0,01, utilizando-se IPTG, os maiores rendimentos de GFP funcional são atingidos (PENNA et al., 2004). No mesmo sentido, Chew e colaboradores (2012) descrevem que uma indução realizada no início da fase exponencial, também utilizando IPTG, não promove influência significativa no crescimento celular, diferente do esperado, já que com o início da expressão proteica o crescimento celular tende a desacelerar (CHEW et al., 2012).

De acordo com os resultados da literatura apresentados até então, a presença de lactose desde o início do crescimento bacteriano, realizando concomitantemente papel de fonte de carbono ao microrganismo e de agente indutor da expressão proteica, pode

levar a uma melhora na produção, ao contrário do que se pode imaginar inicialmente. Portanto, a lactose pode substituir o IPTG como agente indutor, levando muitas vezes a melhores resultados, além de apresentar vantagens como menor custo e ausência de toxicidade.

5.2 Determinação do meio de cultivo

A fim de avaliar a influência de diferentes meios de cultivo para o crescimento celular e para produção da proteína GFP, foram realizados ensaios em frasco agitado e em biorreator utilizando-se os meios MA_Lac (WANG et al., 2018), HCD (SILVA, 2011) e LB(25g/L)_Lac(20g/L)_Glico(10g/L)_Glice(60g/L).

5.2.1 Ensaio em frasco agitado

➤ Meio HCD

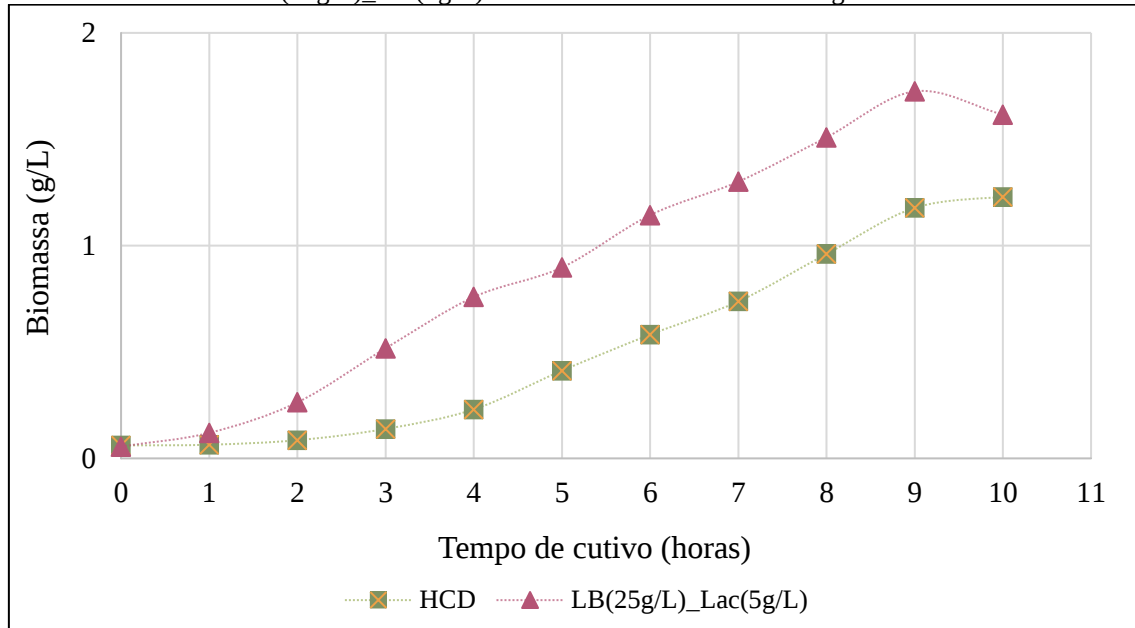
Estudos realizados por Carvalho et al. (2012) apresentam grande vantagem na utilização de glicerol como fonte de carbono e energia ao invés de glicose, frequentemente empregada (CARVALHO et al., 2012). Portanto, este experimento foi realizado com o objetivo de testar as condições de cultivo de *E. coli* utilizando glicerol, mencionadas na literatura (KORZ et al., 1995; SEEGER et al., 1995), e compará-las aos resultados obtidos utilizando-se a lactose.

Foi realizado pré-inóculo em meio LB(25g/L), como descrito no item 4.5.2. Posteriormente, foi realizado inóculo em meio HCD, utilizando-se o pré-inóculo para inoculá-lo em quantidade suficiente para obtenção de DO_{600nm} inicial de 0,1, mantido a 30°C e 150 rpm.

Todos os frascos receberam os antibióticos canamicina e cloranfenicol na concentração de 50 µg/mL.

As curvas de crescimento celular observadas para o meio HCD e controle (meio LB(25g/L)_Lac(5g/L)) são apresentadas na Figura 17.

Figura 17. Curvas de crescimento celular bacteriano observadas quando utilizado meio HCD e meio LB(25g/L)_Lac(5g/L) em ensaio realizado em frasco agitado.



FONTE: dados da pesquisa.

Enquanto o inóculo realizado utilizando-se meio LB(25 g/L) atinge DO_{600nm} em torno de 3 - 3,5 em aproximadamente 14 horas, o inóculo realizado utilizando-se HCD, nas mesmas condições, levou 36 horas pra chegar a DO_{600nm} de 2,6. Dessa forma, o cultivo foi iniciado com DO_{600nm} de 0,1 e mantido a 30°C e 250 rpm, levando a formação de 1,23 g/L de biomassa versus 1,73 g/L observado no grupo controle.

Após 8 horas de cultivo, quando a DO_{600nm} atingiu 1,99, foi realizada a indução com IPTG na concentração de 0,05 mM promovendo a expressão de GFP na concentração máxima de 40 mg/L.

Como descrito anteriormente, o melhor momento para indução foi determinado em ensaios prévios não apresentados.

Portanto, de acordo com os resultados apresentados, o uso do meio HCD não se justificou devido à dificuldade e aumento no tempo de cultivo até obtenção de um crescimento satisfatório. Além disso, não apresentou expressão de GFP que justificasse sua utilização.

5.2.2 Ensaio em biorreator

Em estudo publicado por Studier em 2005 é relatada a utilização de meio de autoindução contendo lactose, a partir do qual tornou-se possível produzir a proteína de interesse sem necessidade da adição de indutor em determinado momento (STUDIER, 2005).

Tal proposta é baseada na preferência da bactéria em consumir outras fontes de

carbono presentes no meio durante o crescimento e somente com o esgotamento da mesma se daria início ao consumo de lactose, promovendo assim a indução da expressão proteica (STUDIER, 2005; TYLER et al., 2005).

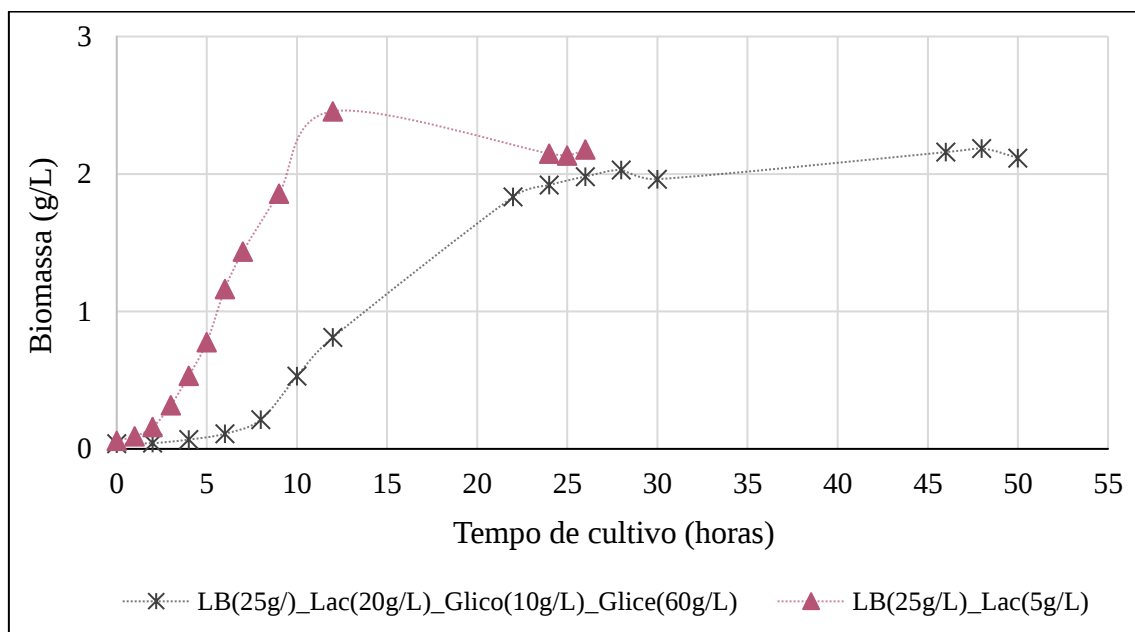
Dessa forma, foi realizado experimento a fim de avaliar o crescimento e produção proteica pela *E. coli*, utilizada no presente trabalho, frente a utilização do meio baseado no meio de autoindução. Neste caso, foi realizada uma adaptação, onde foram mantidas as concentrações de glicose, lactose e glicerol descritas por Studier, entretanto tais substâncias foram adicionadas diretamente ao meio LB(25g/L), sendo portanto aqui chamado de meio LB(25g/L)_Lac(20g/L)_Glico(10g/L)_Glice(60g/L).

Tal ensaio foi realizado em biorreator em modo batelada e não em frasco agitado devido a necessidade de controle do pH por conta da formação de acetato durante o metabolismo da glicose.

O reator foi preparado com 4 L de meio e mantido com aeração de 0,5 vvm, 25°C e 1000 rpm, e foi inoculado a partir de inóculo preparado como descrito no item 4.5.2 em quantidade suficiente para obtenção de DO_{600nm} de 0,1.

A curva de crescimento celular observada é apresentada na Figura 18. Juntamente está apresentada, apenas para fins comparativos, a curva de crescimento observada no reator utilizando-se meio LB(25g/L)_Lac(5g/L), descrito no item 5.1.

Figura 18. Curva de crescimento celular observadas em ensaios realizados em biorreator utilizando-se meio LB(25g/L)_Lac(20g/L)_Glico(10g/L)_Glice(60g/L) e LB(25g/L)_Lac(5g/L).



FONTE: dados da pesquisa.

Tal figura permite observarmos o resultado inferior obtido quando utilizado o

meio LB(25g/L)_Lac(20g/L)_Glico(10g/L)_Glucose(60g/L), em comparação ao biorreator utilizando meio LB(25g/L)_Lac(5g/L). Além disso, com aproximadamente 50 horas de cultivo foi realizada quantificação da glicose presente no meio, utilizando-se HPLC, a qual forneceu como resultado que a concentração de glicose ainda se encontrava em 5g/L.

Como a glicose ainda não havia sido completamente consumida para que se iniciasse o consumo de lactose, não foi observada expressão proteica durante o cultivo.

Apesar dos resultados bastante promissores apresentados na literatura, no presente trabalho a utilização do meio baseado no meio de autoindução não apresentou resultado superior ao meio LB contendo lactose, não justificando sua utilização.

5.3 Planejamento Experimental

Iniciando-se um ensaio é crucial que os resultados obtidos sejam coletados e analisados de forma correta. Uma maneira de se valorizar a pesquisa, diminuir o seu tempo de desenvolvimento e gastos é a utilização de ensaios previamente planejados estatisticamente (SEM; SWAMINATHAN, 1997).

O planejamento fatorial para a realização de processos fermentativos permite a avaliação de diversas variáveis, seus efeitos individuais e interações, com um número reduzido de ensaios.

Partindo-se de uma situação na qual não há conhecimento das variáveis interferentes do sistema a ser estudado, o primeiro passo é a realização de uma triagem das variáveis e eliminação das que não são significativas.

A partir dos resultados obtidos apresentados previamente, foi possível a determinação do meio de cultivo e da fonte de carbono, a fim de determinar-se as variáveis que interferem significativamente no crescimento da *E. coli* e no processo de produção de GFP, foi realizado um Planejamento Fatorial 2^4 , em duplicata e com 3 repetições no ponto central, totalizando 35 ensaios com cada agente de indução. Apesar da superioridade da lactose quando comparada ao IPTG, já observada até então, o estudo foi realizado também utilizando-se IPTG a fim de garantir que mesmo em condições otimizadas a utilização do IPTG não se apresentaria mais interessante.

As variáveis independentes empregadas foram temperatura do cultivo (X_1), agitação (X_2), preenchimento do frasco Erlenmeyer de 500 mL (X_3) e concentração do indutor (X_4), podendo ser esse, lactose ou IPTG.

Os resultados obtidos referentes a formação de biomassa são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Formação de biomassa observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizada a lactose como agente indutor.

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	Lactose (g/L)	Biomassa (g/L)
20	150	5	5	2,21
30	150	5	5	1,49
20	250	5	5	1,96
30	250	5	5	1,67
20	150	15	5	2,26
30	150	15	5	2,21
20	250	15	5	2,46
30	250	15	5	2,03
20	150	5	40	2,54
30	150	5	40	2,04
20	250	5	40	2,44
30	250	5	40	2,64
20	150	15	40	2,49
30	150	15	40	2,92
20	250	15	40	2,49
30	250	15	40	2,49
25	200	10	22,5	2,58

FONTE: dados da pesquisa.

Tabela 7. Formação de biomassa observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	IPTG (mM)	Biomassa (g/L)
20	150	5	0,05	1,33
30	150	5	0,05	0,96
20	250	5	0,05	1,36

*Continuação da Tabela 7. Formação de biomassa observada no planejamento experimental
Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.*

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	IPTG (mM)	Biomassa (g/L)
30	250	5	0,05	1,43
20	150	15	0,05	1,48
30	150	15	0,05	1,60
20	250	15	0,05	1,42
30	250	15	0,05	1,46
20	150	5	0,2	1,43
30	150	5	0,2	0,96
20	250	5	0,2	1,40
30	250	5	0,2	1,29
20	150	15	0,2	1,38
30	150	15	0,2	1,57
20	250	15	0,2	1,43
30	250	15	0,2	1,32
25	200	10	0,125	1,30

FONTE: dados da pesquisa.

Quando utilizada a lactose, a concentração de biomassa formada variou entre 1,49 g/L e 2,92 g/L, quando nas condições de 30°C, 150 rpm, 5% de preenchimento e 5 g/L de lactose, e 30°C, 150 rpm, 15% de preenchimento e 40 g/L de lactose, respectivamente. No caso da utilização do IPTG, os resultados observados para a biomassa variaram entre 0,96 g/L (30°C, 150 rpm, 5% de preenchimento e 0,05 mM e 0,2 mM de IPTG) e 1,60 g/L (30°C, 150 rpm, 15% de preenchimento e 0,05 mM de IPTG).

Com relação a expressão de GFP, os resultados observados são apresentados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Expressão de GFP observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizada a lactose como agente indutor.

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	Lactose (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)
20	150	5	5	385,98
30	150	5	5	175,49
20	250	5	5	355,13
30	250	5	5	174,20
20	150	15	5	376,96
30	150	15	5	216,64
20	250	15	5	461,73
30	250	15	5	152,11
20	150	5	40	466,95
30	150	5	40	195,32
20	250	5	40	433,08
30	250	5	40	212,86
20	150	15	40	475,39
30	150	15	40	198,79
20	250	15	40	476,39
30	250	15	40	173,83
25	200	10	22,5	335,57

FONTE: dados da pesquisa.

Tabela 9. Expressão de GFP observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	IPTG (mM)	Concentração de GFP (mg/L)
20	150	5	0,05	148,06
30	150	5	0,05	56,21

Continuação da Tabela 9. Expressão de GFP observada no planejamento experimental Planejamento fatorial 2⁴ quando utilizado IPTG como agente indutor.

Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	Preenchimento do frasco (%)	IPTG (mM)	Concentração de GFP (mg/L)
20	250	5	0,05	106,46
30	250	5	0,05	36,67
20	150	15	0,05	101,94
30	150	15	0,05	97,56
20	250	15	0,05	125,27
30	250	15	0,05	41,43
20	150	5	0,2	142,95
30	150	5	0,2	54,35
20	250	5	0,2	119,91
30	250	5	0,2	36,39
20	150	15	0,2	163,34
30	150	15	0,2	103,69
20	250	15	0,2	114,38
30	250	15	0,2	44,33
25	200	10	0,125	76,63

FONTE: dados da pesquisa.

A expressão de GFP variou de 152,11 mg/L (30°C, 250 rpm, 15% de preenchimento e 5 g/L de lactose) a 476,39 mg/L (20°C, 250 rpm, 15% de preenchimento e 40 g/L de lactose) quando utilizada a lactose como agente indutor, e entre 36,39 mg/L (30°C, 250 rpm, 5% de preenchimento e 0,2 mM de IPTG) e 163,34 mg/L (20°C, 150 rpm, 15% de preenchimento e 0,2 mM de IPTG) quando utilizado o IPTG.

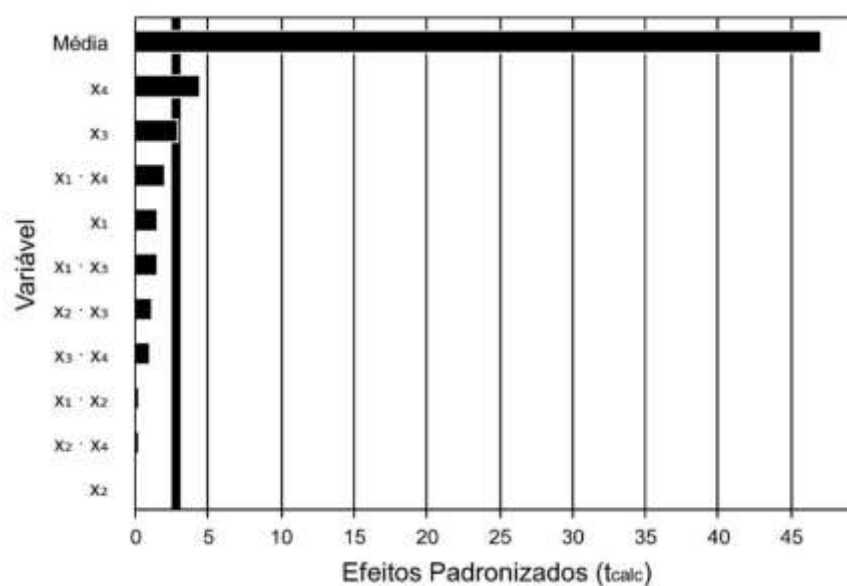
O momento da indução realizada pelo IPTG foi determinado em ensaios anteriores não apresentados neste trabalho, nos quais várias induções foram realizadas em diferentes DO_{600nm}, e observou-se que o melhor momento para tal era com DO_{600nm} de aproximadamente 2.

Os resultados observados no planejamento experimental foram condizentes com

os já relatados no item 5.1, nos quais o ganho promovido pela adição de lactose, tanto no crescimento celular bacteriano quanto na expressão proteica, foi evidente. Desta forma, serão apresentados e discutidos apenas os resultados estatísticos referentes ao planejamento experimental realizado utilizando-se a lactose como agente indutor.

O Diagrama de Pareto (Figura 19) apresenta os resultados observados para a resposta concentração de biomassa (g/L) quando utilizada lactose como agente indutor e fonte de carbono, considerando um nível de significância de 0,1.

Figura 19. Diagrama de Pareto referente a formação de biomassa quando utilizada a lactose.



FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

* X_1 = temperatura do cultivo; X_2 = agitação; X_3 = preenchimento do frasco Erlenmeyer; X_4 = concentração do indutor.

A Tabela 10 apresenta o erro padrão e o teste t de Student para a resposta concentração de biomassa (g/L) quando utilizada lactose.

Tabela 10. Erro Padrão e teste t de Student para a resposta concentração de biomassa, de acordo com o Planejamento fatorial 2^4 .

Variável	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	0,12	47,13	0,0000
X₁	0,12	-1,58	0,1272
X₂	0,12	0,13	0,8982
X₃	0,12	2,98	0,0066
X₄	0,12	4,50	0,0001

Continuação da Tabela 10. Erro Padrão e teste t de Student para a resposta concentração de biomassa, de acordo com o Planejamento fatorial 2⁴.

Variável	Erro Padrão	t calculado	p-valor
X ₁ .X ₂	0,12	0,31	0,7616
X ₁ .X ₃	0,12	1,48	0,1522
X ₁ .X ₄	0,12	2,07	0,0492
X ₂ .X ₃	0,12	-1,12	0,2723
X ₂ .X ₄	0,12	0,26	0,7961
X ₃ .X ₄	0,12	-1,04	0,3076

FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

Através da análise da Tabela 10 verifica-se que tanto o efeito do preenchimento do frasco Erlenmeyer (X₃) quanto o efeito da concentração de lactose adicionada ao meio (X₄) são estatisticamente significativos ao nível de confiança de 99%, uma vez que seus respectivos valores de t_{calc} (2,98 e 4,5, respectivamente) apresentaram-se maiores do que o t_{tab} para o nível de confiança de 99% e graus de liberdade desse estudo ($t_{tab} = 2,7284$).

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

O efeito das outras variáveis avaliadas e suas interações não foi estatisticamente significativo quando avaliados pelo teste t de Student uma vez que os valores de t_{calc} apresentaram-se inferiores aos valores de t_{tab} para o nível de confiança de 90% ($t_{tab} = 1,6909$).

Sendo assim, considerando-se um nível de significância de 0,1 ($p < 0,01$), o modelo ajustado com as variáveis codificadas e contendo apenas as condições estatisticamente significativas é expresso pela Equação 11 (Eq. 11).

$$Y_1 = 5,55 + 0,37X_3 + 0,55X_4 \quad \text{Eq. 11}$$

onde, Y₁ é a concentração de biomassa (g/L), X₃ o preenchimento do frasco Erlenmeyer e X₄ a concentração de lactose.

A Tabela 11 apresenta a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos, na qual podemos observar que a regressão foi altamente significativa (p -valor $< 0,0001$) e o F_{calc} foi aproximadamente 2,5 vezes maior que o F_{tab} ($F_{\text{calc}} = 13,1216$ e $F_{\text{tab}} = 5,39$).

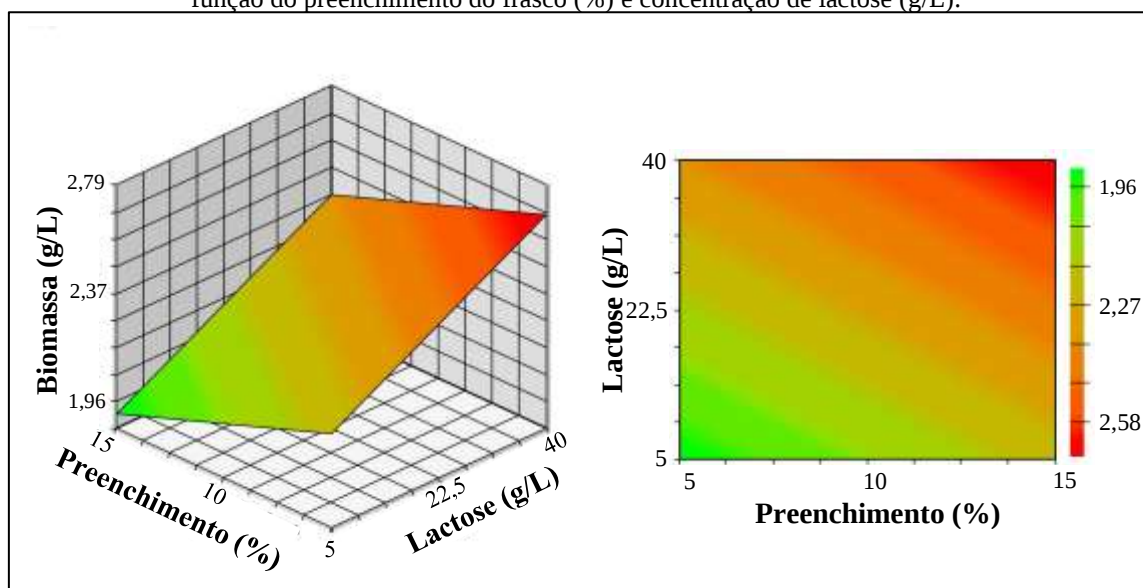
Tabela 11. ANOVA para a resposta concentração de biomassa (g/L), de acordo com planejamento fatorial 2^4 .

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p -valor
Regressão	14,1454	2	7,0727	13,1216	0,0000689
Resíduos	17,2483	32	0,5390		
Total	31,3938	34			

FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

Dessa forma, foi possível a construção das superfícies de resposta e curvas de contorno, ilustradas na Figura 20, referentes à concentração de biomassa (g/L) em função da concentração de lactose e preenchimento do frasco.

Figura 20. Superfície de resposta e curva de contorno para a resposta concentração de biomassa (g/L) em função do preenchimento do frasco (%) e concentração de lactose (g/L).



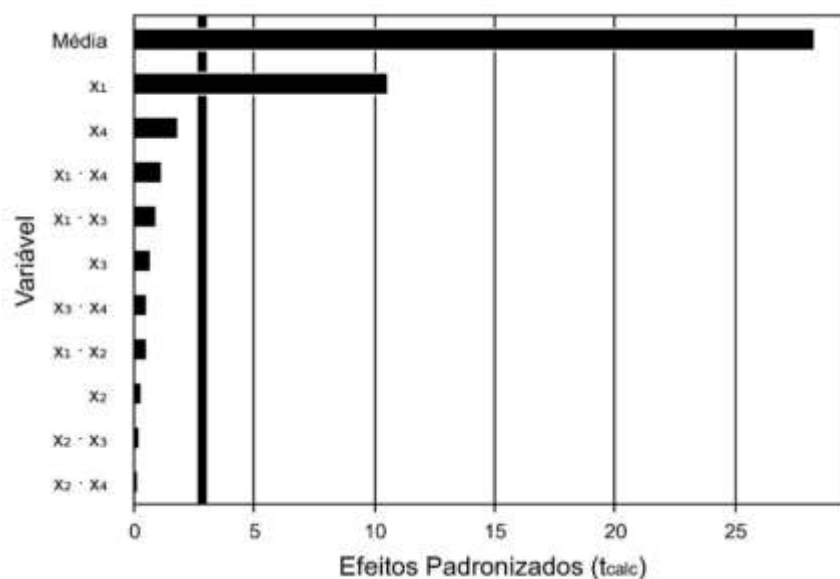
FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

Analisando a superfície de resposta e curvas de contorno, pôde-se verificar que um aumento nas duas variáveis significativas, preenchimento do frasco Erlenmeyer e concentração de lactose, acarretam um maior crescimento celular.

Para a resposta produção proteica expressa em concentração de GFP (mg/L), quando utilizada lactose como agente indutor e fonte de carbono, o erro padrão e o teste

t de Student podem ser observados na Tabela 12. O Diagrama de Pareto (Figura 21) apresenta os resultados observados considerando um nível de significância de 0,1.

Figura 21. Diagrama de Pareto referente a formação de biomassa quando utilizada a lactose.



FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

*X₁ = temperatura do cultivo; X₂ = agitação; X₃ = preenchimento do frasco Erlenmeyer; X₄ = concentração do indutor.

Tabela 12. Erro Padrão e teste t de Student para a resposta produção de GFP (mg/L), de acordo com o Planejamento fatorial 2⁴.

Variável	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	10,96	28,34	0,0000
X₁	11,46	-10,54	0,0000
X₂	11,46	-0,28	0,7784
X₃	11,46	0,72	0,4757
X₄	11,46	1,82	0,0807
X₁.X₂	11,46	-0,51	0,6117
X₁.X₃	11,46	-0,90	0,3747
X₁.X₄	11,46	-1,14	0,2641
X₂.X₃	11,46	0,24	0,8092
X₂.X₄	11,46	-0,15	0,8783
X₃.X₄	11,46	-0,55	0,5889

FONTE: dados obtidos utilizando-se o software *Protimiza Experimental Design*.

Observando-se a Tabela 12 verifica-se que apenas a temperatura (X_1) apresenta interferência estatisticamente significativa ao nível de confiança de 99%, uma vez que seu valor absoluto de t_{calc} (10,54) apresenta-se maior do que o t_{tab} para o nível de confiança de 99% e graus de liberdade desse estudo ($t_{\text{tab}} = 2,7284$).

O efeito da concentração de lactose (X_4) também apresentou significância estatística, entretanto, nesse caso, ao nível de confiança de 90% ($t_{\text{calc}} = 1,82$ e $t_{\text{tab}} = 1,6909$).

O efeito das outras variáveis avaliadas e suas interações não foi significativamente estatístico quando avaliados pelo teste t de Student uma vez que os valores absolutos de t_{calc} apresentaram-se inferiores aos valores de t_{tab} para o nível de confiança de 90% (1,6909).

Sendo assim, considerando-se um nível de significância de 0,1 ($p < 0,01$), o modelo ajustado com as variáveis codificadas e contendo apenas a condição estatisticamente significativa é expresso pela Equação 12 (Eq. 12).

$$Y_2 = 310,52 - 120,77X_1 \quad \text{Eq. 12}$$

onde, Y_2 é a concentração de GFP (mg/L) e X_1 é a temperatura.

A Tabela 13 apresenta a ANOVA dos resultados obtidos, na qual podemos observar que a regressão foi altamente significativa (p -valor $< 0,0001$) e o F_{calc} foi aproximadamente 15 vezes maior que o F_{tab} ($F_{\text{calc}} = 119,38$ e $F_{\text{tab}} = 7,56$).

Tabela 13. ANOVA para a resposta produção de GFP (mg/L), de acordo com Planejamento fatorial 2^4 .

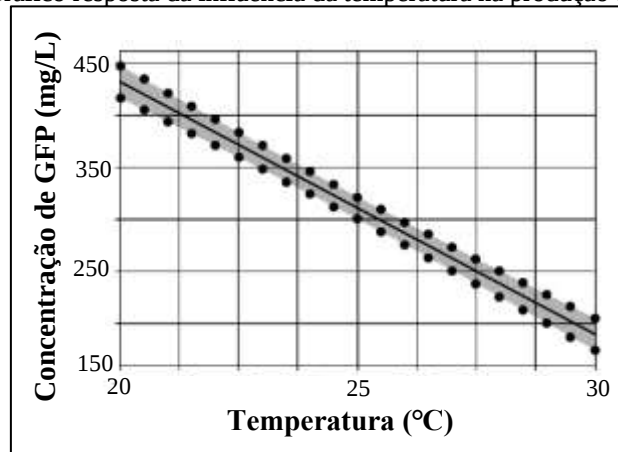
Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado	p-valor
Regressão	466761,5580	1	466761,5580	119,3852	$1,68 \cdot 10^{-12}$
Resíduos	129020,4399	33	3909,7103		
Total	595781,9980	34			

FONTE: dados obtidos utilizando-se o software Protimiza Experimental Design.

Dessa forma, foi possível a construção do gráfico de resposta apresentado na Figura 22, expresso em concentração de GFP (mg/L) em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$), onde fica evidente que temperaturas de cultivo mais amenas são capazes de promover

um aumento na fluorescência emitida.

Figura 22. Gráfico resposta da influência da temperatura na produção de GFP (mg/L).



FONTE: dados obtidos utilizando-se o software Protimiza Experimental Design.

Sabe-se que temperaturas mais baixas durante os cultivos favorecem a fluorescência emitida pela proteína GFP. Vera et al., (2007) descreveram que a fluorescência específica da proteína é inversamente proporcional a temperatura, chegando a ser 4 vezes maior a 16°C, se comparado a cultivos realizados a 30°C (VERA et al., 2007). Além disso, a redução da temperatura diminui a demanda celular de oxigênio permitindo a obtenção de altas densidades celulares sem a necessidade de adicionar-se oxigênio puro (CHEW et. al., 2012).

No presente trabalho pôde-se observar uma produção máxima de GFP quando a 20°C, fornecendo 476,39 mg/L de proteína. Nas mesmas condições (250 rpm, 15% e preenchimento e 40 g/L de lactose), entretanto utilizando a temperatura de 30°C, a produção observada foi de 173,83 mg/L.

Chew e colaboradores (2012) descrevem um estudo no qual o planejamento experimental foi realizado a fim de determinar as melhores condições para produção também de GFP, entretanto, relatam como sendo estatisticamente significativos a velocidade de agitação, temperatura e tempo de indução, já que foi utilizado IPTG como agente indutor de expressão proteica. Contudo, assim como no presente trabalho, a temperatura foi a variável que apresentou maior influência na produção da proteína de interesse (CHEW et. al., 2012).

Tais resultados apontando a melhora da fluorescência emitida pela GFP quando realizados cultivos em temperaturas mais amenas também foram observados utilizando-se *Lactobacillus casei* (30°C) (PEREZ-ARELLANO; PEREZ-MARTINEZ, 2003), *Lactococcus lactis* (30°C) (ODDONE et al., 2007), *Bacillus subtilis* (25°C) (WEBB et al., 1995) e *Saccharomyces cerevisiae* (15°C) (LIM et al., 1995).

Sabe-se que a GFP só é capaz de emitir fluorescência quando a proteína teve sua estrutura terciária formada corretamente (WALDO et al., 1999) o que pode ficar comprometido quando em temperaturas mais elevadas (SIEMERING et al., 1996) resultando na formação de corpos de inclusão na *E. coli* (KANE; HARTLEY, 1988). Sendo assim, 20°C foi a temperatura definida para dar prosseguimento aos ensaios.

A variação na concentração de lactose não apresenta interferência estatisticamente significativa para a expressão da proteína GFP quando em um nível de significância de 0,1. Entretanto, quando se trata do crescimento celular bacteriano, as concentrações de lactose apresentaram interferência significativa na resposta de modo que quanto maior a concentração, melhor o crescimento celular bacteriano observado. Além disso, pode-se observar que em ensaio realizado em biorreator utilizando-se 5g/L de lactose, a mesma foi completamente consumida em aproximadamente 5 horas. Tais resultados justificam a escolha da concentração de 40 g/L de lactose para realização dos ensaios subsequentes.

Após a realização do planejamento experimental pode-se observar um aumento expressivo na emissão de fluorescência pela GFP com resultados condizentes com a literatura. Anteriormente à otimização das variáveis, a máxima expressão de GFP observada foi de 91,76 mg/L, enquanto que após o planejamento foi possível obter 476,39 mg/L de GFP.

5.4 Variação de temperatura

Como já descrito, sabe-se que temperaturas mais amenas favorecem a produção da proteína alvo, entretanto, levam a perdas na velocidade de crescimento celular bacteriano. Além da interferência de temperaturas mais altas na emissão de fluorescência pela GFP, é sabido que tais temperaturas afetam também a estabilidade do plasmídeo (ZHANG et al., 2003). Dessa forma, a utilização de diferentes temperaturas durante o cultivo, de forma a fornecer condições iniciais favoráveis ao crescimento, com posterior diminuição da mesma durante a fase de indução, representa uma alternativa para se aumentar a produção proteica (SHOJAOSADATI et al., 2008).

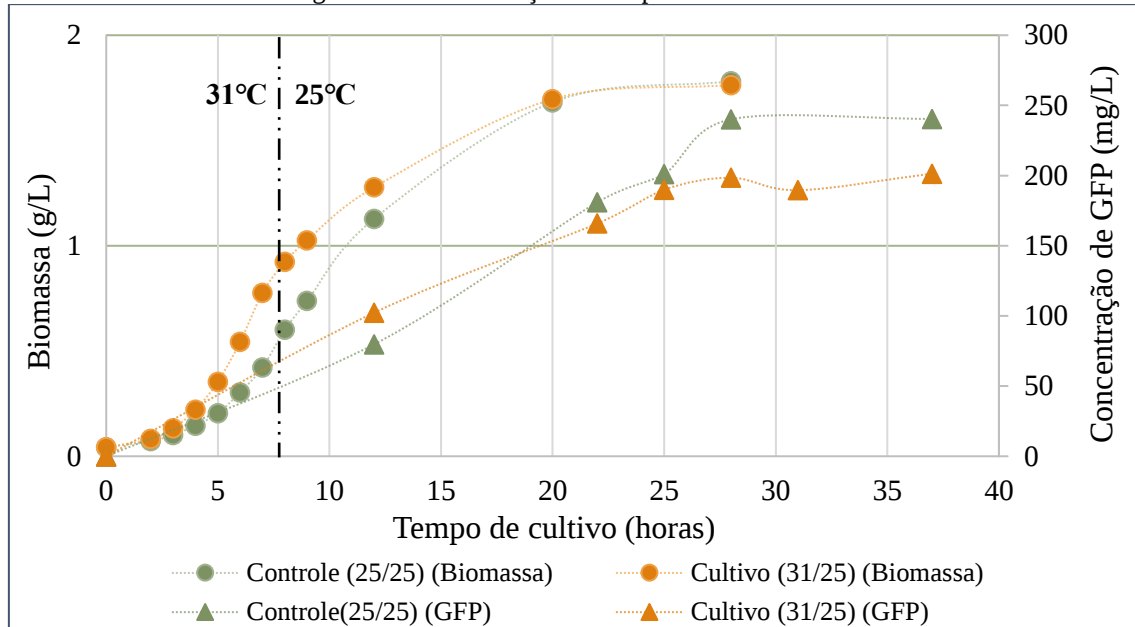
Sendo assim, foi realizado um ensaio em triplicata, em mesa incubadora rotativa a 200 rpm, utilizando-se meio LB(25g/L)_Lac(40g/L). Inicialmente o cultivo foi mantido a 31°C com posterior redução da temperatura para 25°C, enquanto o grupo controle foi mantido a 25°C durante todo o cultivo.

Apesar do presente trabalho não apresentar condições de se definir o momento exato em que se inicia a fase de indução, a temperatura foi alterada quando obtida uma

DO_{600nm} de aproximadamente 2,5 (9 horas de cultivo), valor esse que se encontra no meio da fase exponencial.

Os resultados observados para o crescimento celular (g/L) e expressão de GFP (mg/L) são apresentados na Figura 23.

Figura 23. Curvas de concentração de biomassa (g/L) e produção de GFP (mg/L) em ensaio realizado em frasco agitado frente a variação de temperatura durante o cultivo.



FONTE: dados da pesquisa.

As temperaturas selecionadas não foram as melhores condições observadas para crescimento e produção (37°C e 20°C, respectivamente) a fim de avaliar-se inicialmente o comportamento do microrganismo frente uma variação de temperatura mais branda.

A partir dos resultados apresentados pode-se observar que um aumento na temperatura inicial do cultivo não trouxe ganhos com relação ao crescimento celular e consequentemente, também não foi observada melhora na produção proteica.

Após o período de 9 horas no qual o cultivo foi mantido a 31°C, a concentração de biomassa observada foi de 1,02 g/L contra 0,74 g/L do grupo controle mantido a 25°C. Com relação a produção de GFP, após 12 horas o grupo controle apresentava concentração proteica de 79,77 mg/L, enquanto o grupo a 31°C apresentava 102,26 mg/L de GFP.

Apesar do resultado inicial promissor, no qual o cultivo a 31°C apresentava-se com melhores resultados de crescimento e produção, após a mudança de temperatura é possível observarmos uma redução na inclinação de ambas as curvas de forma que a partir de 20 horas de cultivo a biomassa se igualou ao grupo controle (aproximadamente 1,70 g/L) e a concentração de GFP foi superada pelo mesmo (165,83 mg/L de GFP no

grupo que teve a temperatura reduzida versus 180,93 mg/L no grupo controle).

Portanto, devido aos resultados insatisfatórios, sugerindo que a bactéria não consiga se recuperar de forma satisfatória após a variação da temperatura, não foi dada continuidade aos testes com variação de temperatura.

5.5 Biorreatores em modo de operação batelada

Partindo-se dos resultados obtidos nos ensaios anteriormente descritos, foram realizados 5 ensaios em biorreator no modo de operação batelada a fim de avaliar-se a influência da velocidade de agitação/aeração e temperatura.

As condições avaliadas estão descritas na Tabela 14.

Tabela 14. Condições de cultivo dos reatores de A a E realizado em modo de operação batelada.

Código	Agitação (rpm)	Vazão de ar (vvm)	Temperatura (°C)	Meio de cultura
A	600	0,75	20	LB(25g/L)_Lac(40g/L)
B	600	0,75	25	LB(25g/L)_Lac(40g/L)
C	400	0,5	25	LB(25g/L)_Lac(40g/L)
D	800	0,5	25	LB(25g/L)_Lac(40g/L)
E	1000	0,5	25	LB(25g/L)_Lac(40g/L)

FONTE: dados da pesquisa.

Inicialmente foram realizados os reatores A e B, com velocidade de agitação de 600 rpm, sendo um a 20°C e outro a 25°C, ambos com 0,75 vvm de aeração.

Durante o planejamento experimental foi observado que a diminuição da temperatura do cultivo leva a um ganho significativo em relação à fluorescência emitida pela GFP. Entretanto, os resultados absolutos obtidos quando realizados cultivos a 25°C (ponto central do Planejamento fatorial) foram bastante promissores. Dessa forma, o objetivo deste ensaio foi avaliar o comportamento do microrganismo, com relação ao crescimento bacteriano e produção de GFP, frente a essas diferentes temperaturas, em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado no modo de operação batelada.

A Tabela 15 apresenta os resultados máximos observados.

Tabela 15. Concentrações máximas de biomassa e GFP e parâmetros cinéticos dos reatores A e B realizados a 600 rpm e 0,75 vvm.

Biorreator	Temperatura (°C)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	Produtividade (mg/L.h)
A	20	1,49	368,14	0,0895	249,85	5,11
B	25	2,29	383,50	0,2196	169,55	8,34

FONTE: dados da pesquisa.

Observando-se os resultados apresentados pode-se perceber uma semelhança com relação a produção de GFP frente as duas temperaturas avaliadas (383,50 mg/L a 25°C enquanto que a 20°C obteve-se 368,14 mg/L). Entretanto, como era de se esperar, a temperatura mais elevada de 25°C levou a uma aceleração do cultivo fornecendo a máxima expressão proteica em 46 horas, entretanto a 20°C concentrações semelhantes foram obtidas apenas com 72 horas de cultivo. Tal resultado pode explicar a maior produtividade observada no cultivo realizado a 25°C (8,34 mg/L.h versus 5,11 mg/L.h do cultivo a 20°C).

A diminuição no tempo de cultivo pode ser explicada pela maior proximidade da temperatura ótima de crescimento bacteriano, favorecendo o metabolismo bacteriano e seu crescimento. A maior biomassa apresentada quando o cultivo foi realizado a 25°C é um dado a mais corroborando com tal hipótese.

Apesar de apresentar maior concentração da proteína desejada e uma velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{m\acute{a}x}$) maior (0,2196 h⁻¹ versus 0,0895 h⁻¹ a 20°C), o cultivo a 25°C apresentou menor produção específica ($Y_{p/x}$) (169,55 mg de GFP/g de células, enquanto a 20°C foi de 249,85 mg de GFP/g de células). Isso se deve ao fato de que ambos forneceram concentrações muito próximas de GFP, entretanto a biomassa formada a 20°C foi aproximadamente 35% menor do que a 25°C.

Vale ressaltar que a diferença do $Y_{p/x}$ entre os dois reatores sugere que a produção de GFP não está unicamente relacionada ao aumento da biomassa, já que o aumento no crescimento celular observado no cultivo realizado a 25°C não levou a um aumento na produção de GFP de maneira proporcional.

Dessa forma, levando-se em conta o $\mu_{m\acute{a}x}$ e as produtividades observadas, definiu-se 25°C como melhor temperatura de cultivo.

Foram então realizados novos ensaios em biorreator no modo de operação

batelada a fim de se avaliar a interferência da velocidade de agitação no crescimento e produção da proteína desejada.

A velocidade de agitação tem como papel principal no cultivo promover a melhora na transferência de massa e calor, além de influenciar na concentração e transferência do oxigênio, podendo, portanto, afetar o crescimento e expressão proteica pela célula bacteriana (CHEW et. al, 2012).

Sabendo-se disso, foram avaliadas as rotações de 400 rpm, 800 rpm e 1000 rpm, entretanto, nestes casos foi utilizada aeração de 0,5 vvm.

A Tabela 16 apresenta os resultados observados juntamente com os resultados do reator B (600 rpm, 25°C, 0,75vvm), apenas para fins comparativos.

Tabela 16. Concentrações máximas de biomassa e GFP e parâmetros cinéticos dos reatores realizados nas rotações de 400 rpm, 600 rpm, 800 rpm e 1000 rpm.

Rotação (rpm)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Yp/x (mg/g)	Produtividade (mg/L.h)
400	2,34	359,39	0,2888	154,90	7,81
600	2,29	383,50	0,2196	169,55	8,34
800	2,66	483,37	0,2095	184,84	9,30
1000	3,57*	529,70	0,2022	150,09*	11,52

FONTE: dados da pesquisa.

(*)Durante o ensaio a 1000 rpm houve um problema na malha de controle de nível e ocorreu uma grande adição de substância antiespumante no cultivo durante a noite, interferindo na leitura da DO_{600nm} a partir de 20 horas de cultivo, já que tal substância apresenta absorção no comprimento de onda utilizado. Sendo assim, os resultados de DO_{600nm} e consequentemente, de biomassa, não são confiáveis, necessitando que esse ensaio seja repetido. Entretanto, o cálculo do $\mu_{\max}$, a quantificação de GFP e, consequentemente, a produtividade, não foram comprometidos. O $\mu_{\max}$ foi calculado utilizando-se o intervalo de tempo do cultivo anterior à adição do antiespumante e a leitura da fluorescência não apresenta interferência pelo mesmo.

Quando comparados os reatores mantidos a 600 rpm e 800 rpm, pode-se observar que apesar da diminuição da aeração do meio (de 0,75 vvm a 600 rpm, para 0,5 vvm a 800 rpm) houve um aumento na expressão da proteína GFP com o aumento da velocidade de rotação (383,5 mg/L com 46 horas de cultivo a 600 rpm e 483,37

mg/L com 52 horas de cultivo a 800 rpm). Resultado semelhante pode ser observado quando comparamos os reatores de 400 rpm e 800 rpm, onde a aeração foi mantida, entretanto a produção de GFP diminuiu juntamente com a velocidade de rotação (de 483,37 mg/L caiu para 359,39 mg/L com 46 horas de cultivo a 400 rpm).

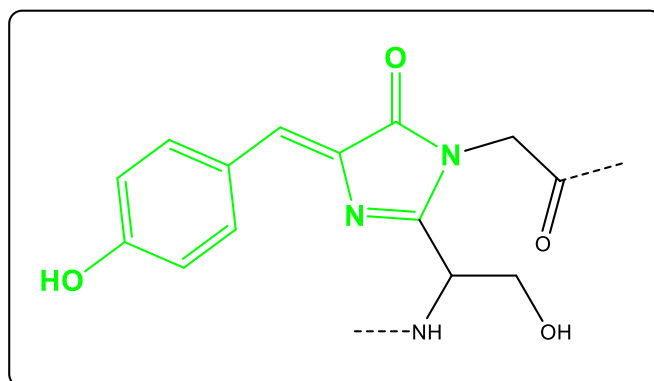
Apesar da diferença expressiva na produção de GFP apresentada entre os reatores, é possível observar-se uma similaridade na formação de biomassa entre os mesmos, com exceção do ensaio realizado a 1000 rpm. Portanto, podemos observar novamente, que a expressão proteica não apresenta relação direta com o aumento no crescimento celular bacteriano. Além disso, tais resultados sugerem pouca influência da velocidade de agitação no crescimento celular, como já havia sido observado no planejamento experimental.

Vale ressaltar, que apesar dos diferentes resultados observados entre os reatores, o consumo da fonte de carbono se manteve praticamente constante entre eles, sendo de aproximadamente 20 g/L de lactose.

O fato da expressão proteica não acompanhar a formação de biomassa de forma proporcional, e sim a velocidade de agitação, explica o $Y_{p/x}$ diferente entre os reatores e sugere que o aumento na taxa de transferência de oxigênio gerada pelo aumento na velocidade de agitação seja o responsável pelo ganho na concentração proteica.

Como descrito anteriormente, a biossíntese do grupamento cromóforo da proteína GFP se dá através da ciclização e oxidação dos resíduos de aminoácidos Serina65-Tirosina66-Glicina67 que leva à formação de um grupo *p*-hidroxi benzilideno imidazolidina, responsável pela fluorescência intrínseca da molécula (HEIM et. al, 1994) (Figura 24).

Figura 24. Estrutura química do grupamento cromóforo da GFP, *p*-hidroxi benzilideno imidazolidina, destacado em verde.



FONTE: adaptado de HEIM et al., 1994.

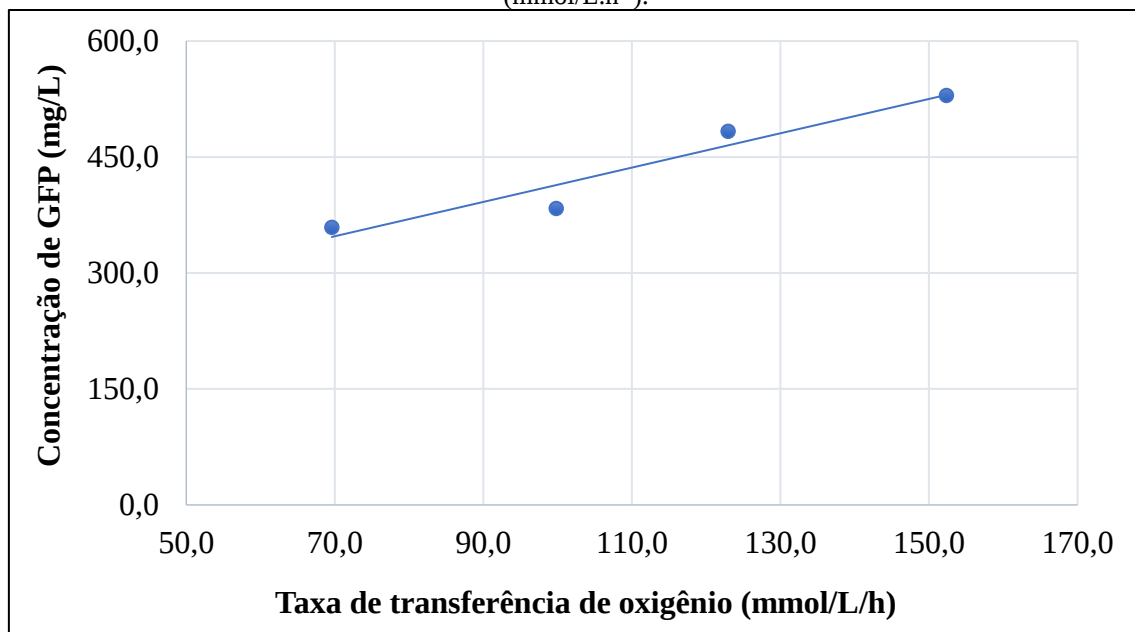
Sendo assim, a molécula de GFP não irá emitir fluorescência quando a

quantidade de oxigênio disponível na célula for insuficiente para a etapa de oxidação. Portanto, o aumento na velocidade de agitação, promovendo aumento na transferência de oxigênio do meio para a célula, pode explicar o ganho observado na produtividade.

O k_{La} das condições utilizadas nos ensaios em biorreator em modo de operação bateada (400, 800 e 1000 rpm na vazão de ar de 2 L/min ar - 0,5 vvm - e em 600 rpm com vazão de ar de 3 L/min - 0,75vvm) foi medido e através deste parâmetro pôde-se calcular a taxa de transferência de oxigênio (OTR) a fim de avaliar a relação entre o aumento da velocidade de agitação e a transferência de oxigênio.

A Figura 25 apresenta o resultado observado na relação entre a concentração de GFP (mg/L) e o valor de OTR.

Figura 25. Curva da concentração de GFP em função da OTR (taxa de transferência de oxigênio) (mmol/L.h⁻¹).



FONTE: dados da pesquisa.

Como pode ser visto na Figura 25, a relação entre OTR e concentração de GFP se deu de forma linear, dessa maneira é possível afirmar que, para as condições testadas, quanto maior a velocidade de agitação, melhor é a transferência de oxigênio no meio, levando a uma maior fluorescência da proteína de interesse.

A relação destas duas variáveis é apresentada pela Equação 13 (Eq. 13).

$$OTR = 2,2198 \cdot [GFP] + 192,17 \quad \text{Eq. 13}$$

onde, $[GFP]$ é a concentração de GFP em mg/L.

É interessante observar que durante o planejamento experimental realizado em

frasco agitado, descrito no item 5.3, a velocidade de agitação não apresentou interferência estatisticamente significativa para nenhuma das respostas, divergindo do resultado aqui descrito. A hipótese sugerida é de que a variação entre as velocidades de agitação empregadas durante o planejamento experimental não tenha sido suficiente para promover diferença expressiva na transferência de oxigênio de modo a alterar significativamente a concentração de GFP.

Apesar de tal divergência, vários relatos disponíveis na literatura corroboram com o observado no presente trabalho durante os ensaios realizados em biorreator.

Realizando um planejamento fatorial fracionado 2^{4-1} , utilizando *Aspergillus niger* recombinante para produção de GFP, Wang e colaboradores descrevem que a velocidade de agitação é a variável que mais afeta a produção de GFP, dentre as variáveis analisadas durante o estudo (WANG et. al, 2009). No mesmo sentido, Chew et. al. (2012) relatam que em estudo utilizando *E. coli* para produção de GFP, com IPTG como agente indutor, a produção de GFP apresentou ganho quando a velocidade de agitação passou de 100 rpm para 206 rpm, de forma que a produção de GFP passou de 0,025 g/L para 0,241 g/L (CHEW et. al, 2012).

Tais resultados observados sugerem que o oxigênio disponível no meio não está sendo um fator limitante na formação de GFP, e sim a taxa de transferência do mesmo entre o meio de cultivo e a célula bacteriana.

Sendo assim, utilizando apenas os valores observados para expressão de GFP, $\mu_{máx}$ e produtividade, para que o problema na malha de controle de nível não interfira na decisão, os reatores de 800 rpm e 1000 rpm foram selecionados como as condições mais promissoras para realização dos próximos ensaios.

A Figura 26 apresenta fotos do reator realizado a 1000 rpm em diferentes momentos do cultivo.

Figura 26. Fotos do reator realizado em modo batelada com velocidade de agitação de 1000 rpm nos tempos 0 horas, 36 horas e 48 horas de cultivo.



FONTE: dados da pesquisa.

Sabendo-se que o pH ótimo de crescimento da *E. coli* é de aproximadamente 7, foram realizados ensaios em biorreator convencional no modo batelada com as melhores velocidades de agitação observadas (800 rpm e 1000 rpm), entretanto, neste ponto foi feito o controle de pH utilizando-se soluções de ácido clorídrico 2M (HCl) e hidróxido de sódio 2M (NaOH).

Os resultados obtidos para concentração máxima de biomassa, concentração máxima de GFP e os parâmetros cinéticos calculados podem ser encontrados na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração de biomassa e GFP, parâmetros cinéticos e consumo de lactose observados em ensaio realizado em biorreator nas condições de 800 rpm e 1000 rpm com e sem controle de pH.

	Rotação (rpm)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h ⁻¹)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Produtividade (mg/L.h)	Consumo de lactose (g/L)
Sem controle de pH	800	2,66	483,37	0,2095	184,84	0,153	9,30	18,31
	1000	3,57*	529,70	0,2022	150,09*	0,200*	11,52	17,84
Com controle de pH	800	2,71	405,79	0,2057	147,24	0,143	7,25	18,92
	1000	3,10	481,50	0,2574	158,23	0,175	10,03	17,59

FONTE: dados da pesquisa.

A partir dos resultados apresentados pode-se observar que a manutenção do pH

em torno de 7 não trouxe ganho significativo durante o cultivo, pelo contrário, levou a uma diminuição dos valores da maioria dos parâmetros.

Analisando-se os ensaios realizados a 800 rpm é possível perceber uma queda em quase todos os parâmetros, com exceção da biomassa e $\mu_{\text{máx}}$, que se mantiveram praticamente constantes.

Para análise dos resultados obtidos nos ensaios realizados a 1000 rpm deve-se levar em consideração a excessiva adição de antiespumante relatada, o que compromete os resultados de biomassa, $Y_{x/s}$ e $Y_{p/x}$ do experimento onde não houve controle de pH. Nesse caso pode ser observado um aumento no $\mu_{\text{máx}}$, que de $0,2022 \text{ h}^{-1}$ passou para $0,2574 \text{ h}^{-1}$ e no consumo de lactose, entretanto, observa-se uma diminuição na expressão de GFP.

Sendo assim, os melhores resultados foram observados nos reatores a 800 rpm e 1000 rpm sem controle de pH, sendo escolhida para realização dos próximos experimentos a condição de 800 rpm sem o controle de pH.

Foi observado que em todas as velocidades de agitação e aeração testadas não foi obtido consumo total da lactose. Dessa forma, ensaios posteriores foram realizados a fim de definir o que poderia estar limitando o crescimento celular bacteriano já que a fonte de carbono ainda não havia se esgotado.

5.6 Suplementação do meio de cultivo

Sabe-se que o excesso de nutrientes pode prejudicar o crescimento bacteriano por inibição por substrato, porém sua limitação pode levar ao mesmo resultado, limitando a obtenção do produto final desejado.

Como observado no ensaio descrito anteriormente, a lactose adicionada ao meio de cultivo não estava sendo completamente consumida. A fim de determinar se poderia ter algum nutriente agindo como limitante, foram realizados ensaios nos quais diferentes substâncias foram adicionadas ao meio de cultivo com o objetivo de promover o consumo total da lactose.

Todos os ensaios descritos neste item foram realizados em frasco agitado a 25°C , 200 rpm, 15% de preenchimento do frasco, utilizando-se meio LB. A $\text{DO}_{600\text{nm}}$ inicial foi de 0,1 utilizando-se inóculo preparado como descrito no item 4.5.2.

As substâncias adicionadas ao meio LB, bem como suas concentrações, variaram de acordo com o ensaio a ser realizado, entretanto, todos eles tiveram a adição de lactose na concentração de 40 g/L.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

➤ *Concentração do meio LB*

Neste primeiro ensaio não houve preocupação em determinar qual o nutriente específico poderia estar limitando o crescimento celular e a produção proteica, e sim, apenas avaliar se realmente havia ausência de algum nutriente ou se algum outro fator externo poderia estar influenciando no cultivo. Sendo assim, foi realizado um ensaio onde diferentes concentrações de meio LB foram avaliadas.

Os resultados observados e as condições testadas estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Ensaio realizado em frasco agitado para avaliar a influência da concentração do meio LB no consumo de lactose pela célula bacteriana.

Concentração de LB (g/L)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	Consumo de lactose (g/L)
12,5	2,34	152,68	15,13
25 (controle)	2,29	340,61	23,65
37,5	2,66	457,05	33,63

FONTE: dados da pesquisa.

A partir dos resultados obtidos pôde-se perceber que a concentração de LB realmente exerce influência expressiva na produção de GFP (340 mg/L no grupo controle LB(25g/L)_Lac(40g/L) versus 457,05 mg/L no grupo LB(37,5g/L)_Lac(40g/L)) e no consumo de lactose (23,65 g/L de lactose consumida pelo grupo controle versus 33,63 g/L consumidos pelo grupo utilizando meio LB na concentração de 37,5 g/L). Dessa forma, sugere-se que realmente exista algum nutriente no meio LB que quando esgotado prejudique o crescimento bacteriano.

➤ *Fósforo*

Lima e colaboradores (LIMA, 1993) descrevem que a limitação de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos podem ser prejudiciais à estabilidade do plasmídeo além de, em alguns casos, limitar o metabolismo celular (SCHUHMACHER et. al, 2014). Como ensaios anteriores aqui descritos revelaram excesso na fonte de carbono, foi iniciada a pesquisa por outros macronutrientes que pudessem estar agindo como limitante ao crescimento e expressão proteica bacteriana. Para isso, o primeiro

elemento a ser avaliado foi o fósforo.

Sabe-se que o fósforo representa entre 2-3% da massa da *E. coli* (BAUER ; ZIV, 1976), entretanto, apesar de aparentar ser de baixa influência quando comparado, por exemplo, aos níveis observados de C, N e O, sua forma oxidada (fosfato) desempenha papel fundamental na manutenção do crescimento e geração de energia pela célula (MAKINO et al., 2003).

A interferência do fosfato foi avaliada através de um delineamento fatorial 2^2 no qual foi utilizado fosfato dissódico (Na_2HPO_4) em quantidade suficiente para fornecer 2 g/L de fosfato ao meio de cultivo.

A definição da concentração utilizada foi baseada em estudo publicado por Schuhmacher e colaboradores no qual, utilizando-se duas cepas de *E. coli* K12, foi observada limitação no crescimento e expressão proteica apenas em concentrações abaixo de 0,3 g/L de fosfato, não relatando limitação pela saturação com o nutriente (SCHUHMACHER et. al, 2014).

Juntamente à concentração de fosfato, foi variada a concentração do meio LB, desta vez utilizada a 50 g/L para avaliar se fornecia resultados superiores aos já observados com 37,5 g/L.

As condições analisadas e seus respectivos resultados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Delineamento fatorial 2^2 realizado em frasco agitado para avaliação da influência da concentração de fosfato e do meio LB no consumo de lactose pela célula bacteriana.

Níveis	Concentração do meio LB (g/L)	Fosfato (g/L)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)
(-1; 1)	25	2	2,40	287,48
(-1; -1)	25	-	2,44	368,28
(1; 1)	50	2	2,47	301,43
(1; -1)	50	-	2,79	389,91

FONTE: dados da pesquisa.

Quando observados os resultados obtidos com a adição de fosfato dentro do grupo contendo a mesma concentração de LB, pode-se perceber uma diminuição na formação de biomassa e na produção de GFP.

Avaliando-se o comportamento frente a adição de fosfato entre os grupos com diferentes concentrações de LB, pode-se perceber que o aumento na concentração do

meio complexo, quando em ausência do fosfato, leva a um ganho de biomassa (2,44 g/L quando utilizado LB(25g/L) e 2,79 g/L quando utilizado LB(50g/L)) e de GFP (368 mg/L versus 389,91 mg/L). Entretanto, quando o aumento da concentração de meio LB se dá na presença do fosfato, o ganho em biomassa e em concentração de GFP é menos expressivo.

Tais resultados sugerem que, neste caso, a suplementação do meio de cultivo com fosfato levou a uma diminuição de rendimento. Portanto, devido ao resultado insatisfatório, não foi realizada a quantificação de lactose.

➤ *Amônio*

O ensaio foi realizado adicionando-se sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ao meio LB em quantidade suficiente para fornecer 1 g/L e 2 g/L de amônio (REYES-RAMIREZ et al, 2001).

As condições avaliadas e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Ensaio realizado em mesa incubadora rotativa para avaliação da influência da concentração de amônio no consumo de lactose pela célula bacteriana

Amônio (g/L)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)
0 (controle)	1,49	199,20
1	1,61	231,60
2	1,44	233,90

FONTE: dados da pesquisa.

Os resultados obtidos evidenciam que a adição de amônio promoveu aumento na produção de GFP e na formação de biomassa, entretanto, não tão expressivos quanto os observados com o aumento na concentração do meio LB, sugerindo que não é ausência de amônio o fator limitante neste caso.

➤ *Extrato de levedura*

A utilização de meios complexos contendo extrato de levedura é bastante difundida pois fornece nutrientes necessários ao crescimento de uma grande variedade de cepas de *E. coli*, apresentando crescimento de 2 a 3 vezes maior quando comparado a utilização de meios quimicamente definidos composto apenas por sais e uma fonte de carbono (normalmente a glicose). Entretanto, uma grande variedade de metabólitos,

incluindo carboidratos complexos, e nutrientes é fornecida pelo extrato de levedura, tornando uma tarefa bastante difícil e cara definir com precisão qual substância está levando ao ganho de rendimento (STUDIER, 2005).

Apesar do extrato de levedura já estar presente no meio LB, adicionar uma maior concentração de tal substância pode levar a uma melhora nos resultados observados. Em estudo realizado utilizando-se *E. coli* BL21 (DE3), Studier relata que a adição de 0,5% de extrato de levedura ao meio levou à duplicação na concentração de biomassa (STUDIER, 2005).

Sendo assim, foi realizado ensaio onde houve adição de 2,5 g/L de extrato de levedura ao meio LB (LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)), utilizando-se meio LB(25g/L)_Lac(40g/L) como controle negativo e meio LB(37,5g/L)_Lac(40g/L) como controle positivo.

Quando realizado ensaio para avaliação da influência da concentração de LB, foi verificado que o meio LB(37,5g/L)_Lac(40g/L) levou a obtenção dos melhores resultados, dessa forma, a concentração de 2,5 g/L foi estabelecida a fim de fornecer ao meio a mesma quantidade de extrato de levedura presente no meio LB(37,5g/L)_Lac(40g/L), entretanto, sem haver aumento da concentração de triptona e cloreto de sódio presentes no meio LB.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência do aumento na concentração de extrato de levedura no consumo de lactose pela célula bacteriana.

Meio	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	Consumo de lactose (g/L)
LB(25g/L)_Lac(40g/L)	1,89	222,15	21,01
LB(37,5g/L)_Lac(40g/L)	3,42	394,45	31,28
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)	4,21	470,75	32,52

FONTE: dados da pesquisa.

Como pode ser observado pelos resultados apresentados na Tabela 18, a adição do extrato de levedura levou a um aumento na formação de biomassa de aproximadamente 2,5 vezes quando comparado ao grupo controle negativo (de 1,89 g/L passou para 4,21 g/L), onde não houve suplementação com o extrato de levedura. Quando comparado ao grupo controle positivo, o aumento foi de aproximadamente 1,2 vezes (de 3,42 g/L passou para 4,21 g/L).

Em relação a produção de GFP, o grupo controle negativo apresentou expressão de 222,15 mg/L, enquanto no grupo suplementado com extrato de levedura a concentração foi mais que o dobro, obtendo-se 470,75 mg/L de GFP.

Apesar do grupo controle positivo conter a mesma quantidade de extrato de levedura que o grupo teste, apresentou menor formação de biomassa e menor produção de GFP. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que neste caso o aumento da concentração de extrato de levedura foi acompanhado do aumento na concentração do sal presente no meio LB (NaCl). Essa variação pode ter provocado um aumento na pressão osmótica levando à lise celular.

Apesar de não ter sido observado consumo completo da lactose presente no meio, houve um aumento de aproximadamente 50% no consumo deste açúcar. No grupo controle foi observado aproximadamente 20 g/L de lactose presente no meio ao final do cultivo, em contrapartida, os grupos com aumento na concentração do extrato de levedura apresentaram aproximadamente 7 g/L. Dessa forma, novos ensaios foram realizados com maiores concentrações de extrato de levedura a fim de observar se o mesmo levaria ao consumo completo da fonte de carbono disponível no meio de cultivo, com consequente aumento na formação de biomassa e produção de GFP.

As concentrações de extrato de levedura avaliadas foram 2,5 g/L, 5,0 g/L, 7,5 g/L e 10 g/L. Frascos contendo meio LB na concentração de 25g/L acrescido de 40g/L de lactose foram utilizados como grupo controle.

As análises foram realizadas a cada 12 h durante 72 h e os resultados observados são apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura no consumo de lactose pela célula bacteriana.

Meio	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	Consumo de lactose (g/L)
LB(25g/L)_Lac(40g/L) - Controle	2,93	535,22	24,71
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)	4,95	964,60	34,15
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(5,0g/L)	5,56	683,74	30,22
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(7,5g/L)	5,71	682,15	30,74
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(10,0g/L)	5,77	654,04	31,05

FONTE: dados da pesquisa.

Como pode ser observado na Tabela 22, a utilização de todas as concentrações de extrato de levedura levou a um aumento tanto na formação de biomassa quanto na expressão de GFP, quando comparados ao grupo controle, entretanto, com o aumento da concentração do extrato pode ser observado aumento apenas na formação de biomassa. Entretanto, com relação à expressão de GFP e consumo de lactose, pode ser observada diminuição, sugerindo que o mesmo possa estar exercendo atividade inibitória em maiores concentrações.

Além disso, mais uma vez fica evidente a não relação entre a formação de biomassa e expressão de GFP, já que o aumento no crescimento celular não foi acompanhado do aumento na concentração de proteína formada.

Dessa forma, a concentração de 2,5 g/L de extrato de levedura apresentou maior formação de GFP e biomassa, e também maior consumo de lactose, portanto, o meio LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L) foi escolhido para dar continuidade aos ensaios a fim de obter-se consumo completo da lactose adicionada ao meio.

➤ *Sulfato de Magnésio*

A cepa de *E. coli* BL21(DE3), utilizada nesse trabalho, não apresenta crescimento quando em ausência de magnésio. Em estudo publicado em 2005, Studier relata que meios complexos conhecidos e bastante utilizados, como o meio LB, apresentam baixa concentração de magnésio, que se esgota ao longo do cultivo limitando o crescimento (STUDIER, 2005).

Ainda nesse estudo, Studier (2005) relata a suplementação de diferentes meios de cultivo com concentrações de sulfato de magnésio (MgSO_4) que variaram de 0,05 mM até 10 mM. Com a adição de apenas 1 mM de MgSO_4 , o autor relata ter conseguido dobrar a formação de biomassa (STUDIER, 2005).

Baseando-se no referido estudo, um ensaio foi conduzido a fim de avaliar a influência da suplementação de magnésio, utilizando-se MgSO_4 , na formação de biomassa e expressão de GFP. Dessa forma, frascos contendo meio LB na concentração de 25g/L acrescido de 40g/L de lactose e 2,5 g/L de extrato de levedura foram utilizados como grupo controle. As análises foram realizadas a cada 12 h durante 72 h e os resultados observados são apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Ensaio realizado em frasco agitado a fim de avaliar a influência de diferentes concentrações de sulfato de magnésio (MgSO_4) no consumo de lactose pela célula bacteriana.

Meio	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	Consumo de lactose (g/L)
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)	6,80	960,32	36,07
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_ MgSO_4 (0,5mM)	7,47	918,52	35,03
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_ MgSO_4 (1,0mM)	7,39	1103,84	36,16
LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_ MgSO_4 (2,0mM)	7,39	944,26	35,27

FONTE: dados da pesquisa.

A concentração mais baixa testada no estudo de Studier (2005), de 0,05 mM, foi suficiente para fornecer a quantidade de magnésio necessária para se atingir o máximo crescimento, não demonstrando ganho na formação de biomassa quando aumentada a concentração de MgSO_4 (STUDIER, 2005). Tal resultado foi o mesmo observado no presente trabalho, entretanto, nesse pode ser observado um ganho com relação a expressão da proteína GFP quando utilizado o sal na concentração de 1 mM, que levou a formação de aproximadamente 1,1 g de proteína.

Quando a concentração de MgSO_4 é aumentada para 2 mM, a formação de biomassa não se altera, como já apontado, entretanto, diferente do esperado, a concentração de GFP diminui. A hipótese sugerida é de que com o aumento na concentração do sal houve maior disponibilidade do extrato de levedura para a célula, já que as digestões enzimáticas do extrato estão diretamente relacionadas à presença de magnésio no meio (STUDIER, 2005). Tal resultado se mantém em linha com o resultado observado no ensaio anterior, onde o aumento na concentração de extrato de levedura promoveu uma diminuição na expressão proteica.

Apesar de não ter sido observado ganho no consumo de lactose presente no meio com a adição de 1 mM de MgSO_4 , o aumento na expressão de GFP justificou a continuidade da utilização do MgSO_4 como suplemento do meio de cultivo. Sendo assim, o meio escolhido para utilização nos próximos ensaios foi o LB(25g/L)_Lac(40g/L)_EL(2,5g/L)_ MgSO_4 (1,0mM).

5.7 Biorreator em modo de operação batelada alimentada

Apesar de não ter sido obtido o consumo completo do substrato ao longo dos cultivos, situação necessária para que fosse possível realizar-se a modelagem dos ensaios em modo de operação batelada alimentada com diferentes perfis de

alimentação, os experimentos foram conduzidos ainda assim a fim de se avaliar a hipótese de que um estado de equilíbrio no consumo de substrato pudesse ter sido atingido, no qual a concentração de lactose se mantém em uma concentração residual basal.

A alimentação foi iniciada em momentos diferentes, nos quais as concentrações de lactose remanescente no meio eram diferentes, a fim de avaliar a capacidade da célula bacteriana em consumir a lactose presente no meio frente à adição de mais substrato. Sendo assim, a alimentação foi iniciada com 30 horas de cultivo, quando o microrganismo ainda se encontrava em fase exponencial de crescimento e com alta concentração de lactose presente ainda no meio, e com 48 horas, quando já podia ser observado um platô no crescimento bacteriano e no momento em que a concentração de lactose já encontrava-se mais baixa.

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 24. Concentração de biomassa e GFP, parâmetros cinéticos e consumo de lactose observados em ensaio realizado em biorreator em modo de operação batelada alimentada.

Início da alimentação (h)	Biomassa (g/L)	Concentração de GFP (mg/L)	$Y_{p/x}$ (mg/g)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Produtividade (mg/L.h)	Concentração de lactose inicial (g/L)	Concentração de lactose final (g/L)
30	8,11	842,71	104,42	0,225	15,05	26,71	3,22
48	6,35	673,48	106,67	0,186	9,10	14,64	5,34

FONTE: dados da pesquisa.

Quando comparados os reatores com alimentação iniciada com 30 horas e 48 horas de cultivo, pôde-se observar que com o início tardio da alimentação, quando o crescimento do microrganismo já se encontrava em equilíbrio e com uma concentração menor de lactose no meio de cultivo (14,64 g/L), a introdução de mais substrato ao meio não trouxe ganho na formação de biomassa e, tampouco, na produção de GFP.

A concentração de células presentes no meio quando do início da alimentação era de 6,00 g/L, chegando apenas a 6,35 g/L 50 horas após o início da alimentação. Além disso, quando a alimentação foi iniciada, a concentração proteica era de 662,51 mg/L, permanecendo praticamente inalterada até o final do cultivo quando atingiu a concentração de 673,48 mg/L.

Quando comparado ao experimento com início de alimentação com 30 horas de

cultivo, o mesmo apresentou-se mais promissor. Quando do início da alimentação, durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo no qual a concentração de lactose presente no meio ainda era de 26,71 g/L, a biomassa formada até então era de 3,35 g/L de células chegando a 8,11 g/L ao final do experimento. Com relação a expressão de GFP, foi observado um aumento de aproximadamente 1,9 vezes, passando de 450,3 mg/L para 842,71 mg/L do início da alimentação até o final do experimento. Além disso, com o início da alimentação com 30 horas de cultivo foi observada produtividade aproximadamente 1,65 vezes maior do quando iniciada com 48 horas.

Com relação ao consumo do substrato, a alimentação iniciada mais precocemente levou a um maior consumo do mesmo, restando ao final do experimento apenas 3,22 g/L de lactose no meio, corroborando com a hipótese de que exista uma concentração basal de lactose que permanece no meio ao final do experimento, a qual não será consumida mesmo frente a adição de novos suplementos ao meio.

5.8 Enriquecimento com oxigênio

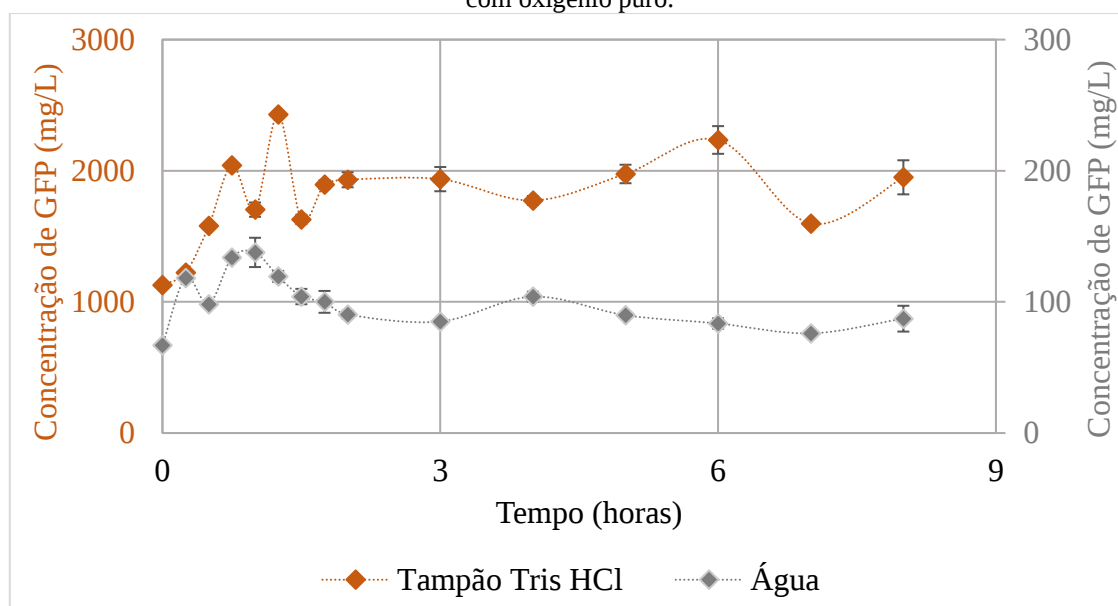
Ao longo dos ensaios foi possível observar uma grande influência da velocidade de agitação na produção de GFP, sugerindo que o aumento na transferência de oxigênio estivesse levando a uma melhora na fluorescência. Sabe-se que a proteína GFP pode se formar corretamente, entretanto não emitirá fluorescência se em condições de quantidades insuficientes de oxigênio presentes na célula, já que para fluorescer necessita de uma última etapa onde ocorre oxidação de sua molécula (HEIM et al., 1994).

Em estudo no qual Heim e colaboradores sugerem a biossíntese da GFP (1994), os autores afirmam que a ausência do oxigênio não interfere na biossíntese da molécula, apenas em sua fluorescência, de forma que é possível adicionar oxigênio puro ao final do cultivo, mantendo-se o mesmo a 22°C por 4 horas, e promover a fluorescência das proteínas já formadas (HEIM et al., 1994). Portanto, em ensaios nos quais a quantificação da proteína é realizada de forma indireta através da quantificação da fluorescência emitida, como ocorre no presente trabalho, a quantificação da proteína de interesse pode ficar subestimada.

Nesse sentido, a fim de identificar a presença de possíveis moléculas formadas e não oxidadas no meio de cultivo, um ensaio de enriquecimento do meio com oxigênio puro foi conduzido conforme descrito no item 4.6.5, utilizando-se água e tampão Tris-HCl para diluição das amostras.

A Figura 27 apresenta os resultados referente a concentração de proteína em função do tempo nas duas amostras.

Figura 27. Concentração de GFP em função do tempo em experimento realizado para enriquecimento com oxigênio puro.



FONTE: dados da pesquisa.

Como pode ser observado na Figura 27, durante as duas primeiras horas do experimento houve aumento expressivo na fluorescência emitida pelas moléculas presentes na amostra, sendo que quando diluída em tampão Tris-HCl a fluorescência emitida, na primeira hora de experimento, aumentou em aproximadamente 115%, enquanto que a amostra em água aumentou em aproximadamente 105.

Após uma hora e meia de experimento as concentrações tiveram uma queda e se mantiveram estáveis até o término do experimento, porém em nenhuma delas a concentração final de GFP foi menor ou igual a inicial.

Tais resultados corroboram com a hipótese previamente levantada de que haviam proteínas formadas porém com limitação de transferência de oxigênio para a célula, de maneira que não ocorria a etapa de oxidação não sendo possível, portanto, sua quantificação indireta através da emissão de fluorescência do cromóforo.

Sabendo-se que ao longo de todos os ensaios a quantidade de oxigênio dissolvido se manteve acima de 95%, sugere-se que o oxigênio não foi um fator limitante para os cultivos realizados em biorreator e sim que a transferência de oxigênio nos cultivos, mesmo nos casos em que as velocidades de agitação foram altas, não foi suficiente para fornecer o oxigênio necessário à oxidação completa de todas as moléculas presentes no meio.

6. CONCLUSÃO

A partir dos ensaios realizados ficou evidente a superioridade da utilização da lactose como fonte de carbono frente à glicose, e como agente indutor quando comparada ao IPTG. Após a análise estatística, pôde-se inferir que de todas as variáveis analisadas nesse estudo, apenas a temperatura foi estatisticamente significativa, exercendo grande influência na produção da proteína de interesse. Tal resultado apresentou-se condizente com o descrito na literatura e permitiu a definição das melhores condições de temperatura e agente indutor para produção da proteína GFP. A produção de GFP quando sob condições estabelecidas previamente a este estudo foi de aproximadamente 90 mg/L. Sob condições ótimas, foi observado aumento no rendimento de GFP de aproximadamente 12 vezes, em ensaios realizados em frasco agitado, e de aproximadamente 8 vezes quando em biorreator. A Tabela 25 apresenta os resultados observados e suas condições.

Tabela 25. Concentração de GFP (mg/L) observada nas condições otimizadas e não otimizadas em ensaios realizados em frasco agitado e em biorreator convencional em modo batelada.

Condições de cultivo	Frasco agitado		Biorreator	
	Pré estudo	Pós estudo	Pré estudo	Pós estudo
Temperatura	30°C	20°C	30°C	25°C
Agitação	150 rpm	250 rpm	300 rpm	800 rpm
Concentração de indutor	IPTG 0,05 mM	Lactose 40 g/L	IPTG 0,05 mM	Lactose 40 g/L
Concentração de GFP	91,76 mg/L	1103,84 mg/L	105 mg/L	842,71 mg/L

FONTE: dados da pesquisa.

Os cultivos realizados em biorreator em modo batelada alimentada sob condições ótimas levaram a uma produção de 842,71 mg/L de GFP. Essa é uma melhora bastante expressiva quando comparado ao resultado de 91,76 mg/L obtidos em condições prévias ao estudo.

Em estudo apresentado por Chew e colaboradores (2012) no qual foi realizada a otimização das condições de produção de GFP por *E. coli*, entretanto utilizando IPTG com agente indutor, foi relatada produção máxima da proteína desejada de 241 mg/L quando em ensaio realizado em frasco agitado, e de 315 mg/L quando em biorreator, também em modo de operação batelada (CHEW et al., 2012). Portanto, é possível

observar resultados superiores obtidos no presente trabalho.

Vale ressaltar que além do aumento observado após a realização do estudo a fim de estabelecer condições ótimas de cultivo, a adição de oxigênio puro à biomassa já formada levou a um aumento de aproximadamente 2,15 vezes quando diluído em tampão Tris-HCL e 2,05 vezes maior quando diluído em água, corroborando com a suspeita da expressão de maior número de moléculas do que foi indiretamente quantificado.

Sendo assim, frente a todos os resultados aqui apresentados, conclui-se que o aumento da concentração de GFP utilizando-se *Escherichia coli* recombinante, objetivo proposto no presente trabalho, foi alcançado de maneira satisfatória.

Dessa forma, propõe-se ainda para esse trabalho a realização de novos experimentos em biorreator no modo de operação batelada alimentada a fim de se avaliar maior número de variáveis com relação ao momento de início da alimentação e sua taxa. Além disso, a realização da quantificação direta das proteínas expressas e presentes no meio de cultivo a fim de obter uma concentração proteica real.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of Acid Proteinase Biosynthesis by the Fungus *Humicola lutea* 120-5 in an Air-Lift Bioreactor. ***Enzyme and Microbiology Technology***. v. 26, p. 402-405, 2000.
- ALNUAMI, A. A.; ZEEDI, B.; QADRI, S. M.; ASHRAF, S. S. Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. ***International journal of Biological Macromolecules***. v. 43, p. 182-186, 2008.
- ALTENBUCHNER, J.; MATTES, R. *Escherichia coli*. In: GELLISSEN, G. **Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems**. Weinheim: Wiley-VCH, p. 7-43, 2005.
- ASENJO, J. A.; MERCHUK, J. C. **Bioreactor System Design**. New York: Marcel Dekker, 1994.
- ASHRAF, K.; RAMALINGAM, S.; MUJEEB, M.; HAIDER, A. Recombinant protein production of abundant larvar transcript (alt-2) in *Escherichia coli*. ***Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences***. v. 2, n. 4, p. 2466-2480, 2013.
- AULICINO, J.; HERMIDA, M.; MEDINA, R.; SABAROTS, L.; DUCREY, L.; ORTI, E.; ROGERS, F. Developing an automatically controlled feeding process in an *E. coli* fermentation process for recombinant protein production. ***Biopharm International***. June, 2010.
- BABAEIPOUR, V.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N. Maximizing production of human interferon-gama in HCDC of recombinant *E. coli*. ***Iranian Journal of Pharmaceutical Research***. v. 12, n. 3, p. 563-572, 2013.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2nd. ed. Singapore: McGraw-Hill Book, 1986.
- BAUER, S.; ZIV, E. Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. ***Biotechnology and Bioengineering***. v. 18, p. 81-94, 1976.
- BELPAIRE, I. M.; BINDELS, F.; CORVINI, P.; GERIN, P. A. Method for monitoring the fate of green fluorescent protein added to aerobic and anaerobic wastewater sludge.

Water Research. v. 39, p. 4933-4940, 2005.

BENTLEY, W. E.; DAVIS, R. H.; KOMPALA, D. S. Dynamics of induced CAT expression in *E. coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 38, p. 749–760, 1991.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 40, n. 3, p. 257-274, 2013.

BERLEC, A.; TOMPA, G.; SLAPAR, N.; FONOVIC, U. P.; ROGELJ, I.; STRUKELJ, B. Optimization of Fermentation Conditions for the Expression of Sweet-Tasting Protein Brazzein in *Lactococcus lactis*. *Letters in Applied Microbiology*. v. 46, p. 227–231, 2008.

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

BLOMMEL, P. G.; BECKER, K. J.; DUVNJAK, P.; FOX, B. G. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition. *Biotechnology Progress*. v. 23, p. 585-598, 2007.

BOWERS, R. H. The mechanics of bubble formation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. v. 5, p. 542-548, 1955.

BREJC, K. A.; SIXMA, T. K.; KITTS, P. A.; KAIN, S. R.; TSIEN, R. Y.; ORMO, M.; REMINGTON, S. J. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. v. 94, p. 2306–2311, 1997.

ÇALIK, P.; CALIK, G.; TAKAÇ, S.; OZDAMAR, T. H. Metabolic flux analysis for serine alkaline protease fermentation by *Bacillus licheniformis* in a defined medium: effects of the oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 64, p. 151–167, 1999.

CARVALHO, R. J.; CABRERA-CRESPO, J.; TANIZAKI, M. M.; GONÇALVES, V. M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of

pneumococcal surface protein A in *E. coli* using different carbon sources and chromatography sequences. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. v. 94, n. 3, p. 683-694, 2012.

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

CHA, H. J.; WU, C. F.; VALDES, J. J.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: Monitoring protein expression and solubility. ***Biotechnology and Bioengineering***. v. 67, n. 5, p. 565-574, 2000.

CHAE, H. J.; DELISA, M. P.; CHA, H. J; WEIGAND, W. A; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. ***Biotechnology and Bioengineering***. v. 69, n. 3, p. 275-285, 2000.

CHALFIE, M.; KAIN, S. **Green Fluorescent Protein**—Properties, Applications, and Protocols., 2nd. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica ilustrada. 4. Ed. Artmed. Porto Alegre.

CHEW, F. N.; TAN, W. S.; BOO, H. C.; TEY, B. T. Statistical Optimization of Freen Fluorescent Protein Production from *Escherichia coli* BL21(DE3). ***Preparative Biochemistry and Biotechnology***. v. 42, p. 535–550, 2012.

CHEW, F. N.; TAN, W. S.; TEY, B. T. Fluorescent quantitation method for differentiating the nativity of green fluorescent protein. ***Journal of Bioscience and Bioengineering***. v. 111, n. 2, p. 246–248, 2011.

CHOU, C. P. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. v. 76, n. 3, p. 521–532, 2007.

CINELLI, R. A. G.; PELLEGRINI, V.; FERRARI, A.; FARACI, P.; NIFOSI, R.;

- TYAGI, M.; GIACCA, M.; BELTRAM, F. Green Fluorescent Proteins as Optically Controllable Elements in Bioelectronics. *Applied Physics Letters*. v. 79, p. 3353–3355, 2001.
- CODY, C. W.; PRASHER, D. C.; WESTLER, W. M.; PRENDERGAST, F. G.; WARD, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green fluorescent protein. *Biochemistry*, v. 32, p. 1212–1218, 1993.
- CORCHERO, J. L.; VILLAYERDE, A. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 58, p. 625-632, 1998.
- CRAYNEST, M.; BARBOTIN, J. N.; TRUFFAUT, N.; THOMAS, D. Stability of plasmid pHV1431 in free and immobilized cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 782, p. 311-322, 1996.
- DELISA, M. P.; CHAE, H. J.; WEIGAND, W. A.; VALDES, J. J.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Generic model control of induced protein expression in high cell density cultivation of *Escherichia coli* using on-line GFP-fusion monitoring. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. v. 24, n. 2, p. 83-91, 2001.
- DONG, X. Y.; CHEN, L. J.; SUN, Y. Effect of operating conditions on the refolding of Histagged enhanced green fluorescent protein by artificial chaperone-assisted metal affinity chromatography. *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 65–70 2009.
- DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: Optimizing Inducer and Culture Conditions for Expression of Foreign Proteins Under the Control of the lac Promoter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 16, p. 145–254, 1996.
- DUBENDORFF, J.W.; STUDIER, F.W. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *Journal of Molecular Biology*, v. 219, p. 45–59, 1991.
- EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 11, 530-536, 2006.

- ENOKI, S.; SAEKI, K.; MAKI, K.; KUWAJIMA, K. Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. **Biochemistry**. v. 43, p. 14238–14248, 2004.
- GAO, H.; GU, W. Optimization of Polysaccharide and Ergosterol Production from *Agaricus brasiliensis* by Fermentation Process. **Biochemical Engineering Journal**. v. 33, p. 202–210, 2007.
- GERDES, H. H.; KAETHER, C. Green fluorescent protein: Applications in cell biology. **FEBS Letters**. v. 389, n. 1, p. 44-47, 1996.
- GILL, R. T.; VALDES, J. J.; BENTLEY, W. E. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**. v. 2, n. 3, p. 178-189, 2000.
- GLICK, R. B. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**. v. 13, n. 2, p. 247-261, 1995.
- GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal of Biotechnology**. v. 60, p. 47-54, 1998.
- GOYAL, D.; SAHNI, G.; SAHOO, D. K. Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 4468-4474, 2009.
- HÄGG, P.; DePOHL, J. W.; ABDULKARIM, F.; ISAKSSON, L. A. A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**. v. 111, p.17-30, 2004.
- HEIM, R.; CUBITT, A. B.; TSIEN, R. Y. Improved green fluorescence. **Nature**. v. 373, p. 663-664, 1995.
- HEIM, R.; PRASHER, D. C.; TSIEN, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 91, p. 12501-12504, 1994.
- HEYLAND, J.; BLANK, L. M.; SCHMIDT, A. Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**.

v. 155, p. 178– 184, 2011.

HOFFMAN, B. J.; BROADWATER, J. A.; JOHNSON, P.; HARPER, J.; FOX, B. G.; KENEALY, W. R. Lactose fed-bath over expression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal incorporated, soluble protein. ***Protein Expression and Purification***. v. 6, p. 646-654, 1995.

HOLMS, W. H. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. ***Current Topics in Cellular Regulation***. v. 28, 69–105, 1986.

HU, S. Y.; WU, J. L.; HUANG, J. H. Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. ***Journal of Biotechnology***. v. 107, p. 161-171, 2004.

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

JIMÉNEZ-BANZO, A.; NONELL, S.; HOFKENS, FLORS, C. Singlet Oxygen Photosensitization by EGFP and its Chromophore HBDI. ***Biophysical Journal***. v. 94, n. 1, p. 168–172, 2008.

JONES, J. J.; BRIDGES, A. M.; FOSBERRY, A. P.; GARDNER, S.; LOWERS, R. R.; NEWBY, R.R.; JAMES, P.J.; HALL, R.M.; JENKINS, O. Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. ***Journal of Biotechnology***. v. 109, p. 201-211, 2004.

KANE, J. F.; HARTLEY, D. L. Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. ***Trends in Biotechnology***. v. 6, p. 95–101, 1988.

KANG, D. G.; KIM, Y. K.; CHA, H. J. Comparison of green fluorescent protein expression in two industrial *Escherichia coli* strains, BL21 and W3110, under coexpression of bacterial hemoglobin. ***Applied Microbiology and Biotechnology***. v. 59, p. 523-528, 2002.

- KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocess. In. *Comprehensive Biotechnology*, 1a edição, Pergamon Press, 2, 5-56, 1985.
- KAROW, E. O.; BARTHOLOMEW, W. H.; SFAT, M. R.; Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations. *Agricultural and Food Chemistry*. v. 1, n. 4, p. 302-306, 1953.
- KENTARO, O.; ZENICHIRO, K.; EIJI, M.; AILIAN, L.; KAZUYUKI, H.; YUTAKA, Y.; HIDENORI, O.; NAOMI, K. Systematic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. *Protein Expression and purification*. v. 36, p. 327-332, 2004.
- KILIKIAN, B. V.; SUÁREZ, I. D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*. v. 35, p. 1019-1025, 2000.
- KLEMMANN, G. L.; STROHL, W. R. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 5, p. 180-186, 1994.
- KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SNADERS, E. A.; DECKWER, W. D. Simple fed- batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. v. 39, n. 1, p. 59–65, 1995.
- KREMERS, G. J.; GOEDHART, J.; VAN DEN HEUVEL, D. J.; GERRITSEN, H. C.; GADELLA, T. W. Improved Green and Blue Fluorescent Proteins for Expression in Bacteria and Mammalian Cells. *Biochemistry*. v. 46, p. 3775-3783, 2007.
- KREMERS, G. J.; GOEDHART, J.; VAN MUNSTER, E. B.; GADELLA, T. W. Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius. *Biochemistry*. v. 45, p. 6570-6580, 2006.
- LEDUY, A.; MARSAN, A. A.; COUPAL, B.; A study of the rheological properties of a non-newtonian fermentation broth. *Biotechnology and bioengineering*, XVI: p. 61-76, 1974.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch

fermentations. **Biotechnology Advances**. v. 17, p. 29-48, 1999.

LEE, J.; SARASWAT, V.; KOH, I.; SONG, K. B.; PARK, Y. H.; RHEE, S. K. Secretory production of Artrobacter levan fructotransferase from recombinant *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 195, p. 127-132, 2001.

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

LEHNINGER, A. L. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LI, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lactose-induced production of human soluble B lymphocyte stimulator (hsBLys) in *E. coli* with different culture strategies. **Biotechnology Letters**. v. 28, p. 477-483, 2006.

LIM, C. R.; KIMATA, Y.; OKA, M.; NOMAGUCHI, K.; KOHNO, K. Thermosensitivity of Green Fluorescent Protein Fluorescence Utilized to Reveal Novel Nuclear-Like Compartments in a Mutant Nucleoporin NSP1. **Journal of Biochemistry**. v. 118, p. 13–17, 1995.

LIM, H. C.; SHIN, H. S. **Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors**. Cambridge: Cambridge University Press, 2013. 457 p. ISBN: 978-0-521-51336-4.

LOZANO, D. C. **Estudo da caracterização das propriedades reológicas de caldos de fermentação**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola/UNICAMP, 1982.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparasion of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56, p. 1004-1011, 1990.

MAKINO, W.; COTNER, J. B.; STERNER, R. W.; ELSER, J. J. Are bacteria more like plantsor animals? Growth rate and resource dependence of bacterial C:N:P stoichiometry. **Functional Ecology**. v. 17, p. 121–130, 2003.

MARCH, J. C.; RAO, G.; BENTLEY, W. E. Biotechnological Application of Green

Fluorescent Protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 62, p. 303–315, 2003.

MARGOLIN, W. Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods*. v. 20, p. 62-72, 2000.

MARISCH, K.; BAYER, K.; CSERJAN-PUSCHMANN, M.; LUCHNER, M.; STRIEDNER, G. Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production. *Microbial cell factories*, v. 12, n.58, p. 1-11, 2013.

MARTÍNEZ-ALONSO, M.; GARCÍA-FRUITÓS, E.; VILLAYERDE, A.; Yield, Solubility and Conformational Quality of Soluble Proteins Are Not Simultaneously Favored in Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 101, p. 1353-1358, 2008.

MAZZOLA, P. G.; ISHII, M.; CHAU, E.; CHOLEWA, O.; PENNA, T. C. V. Stability of green fluorescent protein (GFP) in chlorine solutions of varying pH. *Biotechnology Progress*. v. 22, p. 1702–1707, 2006.

MELNIK, B. S.; POVARNITSYNA, T. V.; MELNIK, T. N. Can the fluorescence of green fluorescent protein chromophore be related directly to the nativity of protein structure? *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 390, p. 1167–1170, 2009.

MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* D train Allows Efficient Recombinant Protein Production Using Lactose as Inducer. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 82, n. 7, p. 809-817, 2002.

MERTEN, O. W.; MATTANOVICH, D.; LANG, C.; LARSSON, G.; NEUBAUER, P.; PORRO, D.; POSTMA, P.; TEIXEIRA, M. J.; COLE, J. A: Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells. In: A Comparative View on Host Physiology. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2001.

MOFFATT, B. A.; STUDIER, F. W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. *Cell*. v. 49, p. 221-227, 1987.

- MOROWVAT, M. H.; BABAEIPOR, V.; MEMARI, H. R.; VAHIDI, H. Metabolic changes of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) during overexpression of recombinant human interferon beta in HCDC. **International Journal of Biological Sciences**. v. 4, n. 4, p. 131-138, 2014.
- NAGAI, T.; IBATA, K.; PARK, E. S.; KUBOTA, M.; MIKOSHIBA, K.; MIYAWAKI, A. A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. **Nature Biotechnology**. v. 20, p. 87-90, 2002.
- NEIDHARDT, F. C.; INGRAHAM, J. L.; SCHAECHTER, M. **Physiology of the bacterial cell** – a molecular approach. Sunderland: Sinauer Associates, 1990.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica**. 4ª ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
- NEUBAUER, P.; WOLFF, C.; HECKER, M.; HOFFMANN, K. MEYER, KRUSCHKE, L.; HEINRICH, H. W. Introduction of the tac-promoter by lactose under fermentation conditions. **Acta Biotechnologica**. v. 11, p. 23-29, 1991.
- NIKEREL, I. E.; ONER, E. T.; KIRDAR, B.; YILDIRIM, R. Optimization of Medium Composition for Biomass Production of Recombinant *Escherichia coli* cells Using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32, p. 1–6, 2006.
- NISWENDER, K. D.; BLACKMAN, S. M.; ROHDE, L.; MAGNUSON, M. A.; PISTON, D. W. Quantitative Imaging of Green Fluorescent Protein in Cultured Cells: Comparison of Microscopic Techniques, Use in Fusion Proteins and Detection Limits. **Journal of Microscopy**. v. 180, p. 109–116, 1995.
- NORSYAHIDA, A.; RAHMAH N.; AHMAD, R. M. Y. Effects of feeding and induction strategy on the production of BmR1 antigen in recombinant *E. coli*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 49, p. 544–550, 2009.
- NOVAES, L. C. L.; MAZZOLA, P. G.; PESSOA Jr, A.; PENNA, T. C. V. Effect of Polyethylene Glycol on the Thermal Stability of Green Fluorescent Protein. **Biotechnology Progress**. v. 26, n. 1, p. 252-256, 2010.

NOVAGEN. pET system Manual, 11. Ed. 2005.

ODDONE, G. M.; LAN, C. Q.; RAWSTHORNE, H.; MILLS, D. A.; BLOCK, D. E. Optimization of Fed-Batch Production of the Model Recombinant Protein GFP in *Lactococcus lactis*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 96, p. 1127–1138, 2007.

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

ÖZTÜRK, S.; ÇALIK, P.; ÖZDAMAR, T. H. Fed-Batch Biomolecule Production by *Bacillus subtilis*: A State of the Art Review. **Trends in Biotechnology**. v. 34, n. 4, p. 329-345, 2016.

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 22–32, 2014.

PARKER, C. & DiBIASIO, D. Effect of growth rate and expression level on plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 29, p. 215-221, 1987.

PENNA, T. C. V.; ISHII, M. Selective Permeation and Organic Extraction of Recombinant Green Fluorescent Protein (gfpuv) from *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**. v. 2, n. 7, 2002.

PENNA, T. C. V.; ISHII, M.; CHOLEWA, O.; DE SOUZA, L. C. Thermal characteristics of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) extracted from *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 38, p. 135–139, 2004.

PENNA, T. C. V.; ISHII, M.; PESSOA, A. JR.; CHOLEWA, O. Thermal stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) at various pH values. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113, p. 469–483, 2004(a).

PENNA, T. C. V.; ISHII, M.; SOUZA, L. C.; CHOLEWA, O. Expression of Green Fluorescent Protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5-a, Under Different Growth Conditions. **African Journal of Biotechnology**. v. 3, p. 105–111, 2004.

PEREZ-ARELLANO, I.; PEREZ-MARTINEZ, G. Optimization of the Green

Fluorescent Protein (GFP) Expression from a Lactose-Inducible Promoter in *Lactobacillus casei*. **FEMS Microbiology Letters**. v. 222, p. 123–127, 2003.

PHILLIPS, G. N. Structure and dynamics of green fluorescent protein. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 7, p. 821-827, 1997.

POPPENBORG, L.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. **Journal of Biotechnology**. v. 58, n. 2, p. 79-88, 1997.

PSOMAS, S. K.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A. Optimization Study of Xanthan Gum Production Using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35, p. 273–280, 2007.

RAMIREZ, O. T.; ZAMORA, R.; ESPINOSE, G.; MERINO, E.; BOLIVAR, F.; QUINTERO, R. Kinetic Study of Penicillin Acrylase Production by Recombinant *E. coli* in Batch Cultures. **Process Biochemistry**. v. 29, p. 197–206, 1994.

RANDERS-EICHHORN, L.; ALBANO, C. R.; SIPIOR, J.; BENTLEY, W. E.; RAO, G. Online green fluorescent protein sensor with LED excitation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 6, p. 921-926, 1997.

REISCHER, H.; SCHOTOLA, I.; STRIEDNER, G.; POTTSCHACHER, F.; BAYER, K. Evaluation of the GFP signal and its aptitude for novel on-line monitoring strategies of recombinant fermentation processes. **Journal of Biotechnology**. v. 108, n. 2, p. 115-125, 2004.

REYES-RAMIREZ, F.; LITTLE, R.; DIXON, R. Role of *Escherichia coli* Nitrogen Regulatory Genes in the Nitrogen Response of the *Azotobacter vinelandii* NifL-NifA Complex. **Journal of Bacteriology**. v. 183, n. 10, p. 3076–3082, 2001.

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

RIESENBERG, D. High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 2, p. 380 – 384, 1991.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51, n. 4, p. 422 – 430, 1999.

ROCHA, I. C. A. P. Model-based Strategies for Computer-aided Operation of a Recombinant E. coli Fermentation. Tese de doutorado. Departamento de Engenharia Biológica. Escola de Engenharia. Universidade do Minho. Braga, 2003.

RÜCKER, E.; SCHNEIDER, G.; STEINHÄUSER, K.; LÖWER, R.; HAUBER, J.; STAUBER, R. H. Rapid Evaluation and Optimization of Recombinant Protein Production Using GFP Tagging. *Protein Expression and Purification*. v. 21, p. 220 – 223, 2001.

SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2, Engenharia Bioquímica, São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

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

SCHUHMACHER, T.; LÖFFLER, M.; HURLER, T.; TAKORS, R. Phosphate limited fed-batch processes: Impact on carbon usage and energy metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. v. 20, n. 190, p. 96-104, 2014.

SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; MC CARTHY, J. E. G.; DECKWER, W. D.; RINAS, U. Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. v. 17, n. 10, p. 947-953, 1995.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. S. Application of Response-Surface Methodology to Evaluate the Optimum Environmental Conditions for the Enhanced Production of Surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 47, p. 358-363, 1997.

SHI, R.; PAN, Q.; GUAN, Y.; HUA, Z.; HUANG, Y.; ZHAO, M.; LI, Y. Imidazole as a catalyst for in vitro refolding of enhanced green fluorescent protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 459, p. 122–128, 2007.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective

on method development – review. **Biotechnology Advances**. v. 23, p. 345-357, 2005.

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

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

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess Engineering: basic concepts. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2002.

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

SILVA, A. J. Vacinas Recombinantes contra Erisipela suína: Desenvolvimento Integrado de Bioprocesso, da Biologia Molecular ao Biorreator. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos. p. 188, 2011.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking culture. **Protein Expression and Purification**. v. 41, p. 313-322, 2005.

STUDIER, F. W. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. **Journal of Molecular Biology**, v. 219, p. 37–44, 1991.

SU, W. W. Fluorescent proteins as tools to aid protein production. **Microbial Cell Factories**. v. 4, n. 12, 2005.

TIMMONS, L.; BECKER, J.; BARTHMAIER, P.; FYRBERG, C.; SHEARN, A.; FYRBERG, E. Green fluorescent protein/beta-galactosidase double reporters for visualizing Drosophila Gene expression patterns. **Developmental Genetics**. v. 20, p. 338-347, 1997.

TOMAZETTO, G. Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL 21 utilizando lactose como indutor.

Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS. Porto Alegre. p.72. 2006.

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

TYLER, R. C.; SREENATH, H. K.; SINGH, S.; ACETI, D. J.; BINGMAN, C. A.; MARKLEY, J. L.; FOX, B. G. Auto-induction medium for the production of [U-15N] and [U-13C, U-15N]-labeled proteins for NMR screening and structure determination. **Protein Expression and Purification**. v. 40, p. 268-278, 2005.

VERA, A.; GONZÁLEZ-MONTALBÁN, N.; ARÍS, A.; VILLAYERDE, A. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins is Enhanced at Low Growth Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 96, n. 6, p. 1101-1106, 2007.

WAEGERMAN, H.; De LAUSNAY, S.; BEAUPREZ, J.; MAERTENS, J.; De MEY, M.; SOETAERT, W. Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering. **New biotechnology**. v. 30, n. 2, p. 255-261, 2013.

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

WANG, J.; WAN, W. Experimental Design Methods for Fermentative Hydrogen Production: A Review. **International Journal of Hydrogen Energy**. v. 34, p. 235–244, 2009.

WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Effects of Process Parameters on Heterologous Protein Production in *Aspergillus niger* Fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 78, p. 1259–1266, 2003.

WANG, Q. I.; YU, H.; WANG, M.; YANG, H.; SHEN, Z. Enhanced biosynthesis and characterization of surfactin isoforms with engineered *Bacillus subtilis* through promoter replacement and *Vitreoscilla* hemoglobin co-expression. **Process Biochemistry**. v. 70, p. 36–44, 2018.

WARD, W. W.; CODY, C. W.; HART, R. C.; CORMIER, M. J. Spectrophotometric

identity of the energy transfer chromophores in Renilla and Aequorea green-fluorescent proteins. **Photochemistry and Photobiology**. v. 31, P. 611-615, 1980.

WEBB, C. D.; DECATUR, A.; TELEMAN, A.; LOSICK, R. Use of Green Fluorescent Protein for Visualization of Cell-Specific Gene Expression and Subcellular Protein Localization During Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**. v. 177, p. 5906–5911, 1995.

XU, J.; BANERJEE, A.; PAN, S. H.; LI, Z. J. Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. **Protein Expression and Purification**. v. 83, p. 30-36, 2012.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial processes. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. v. 30, p. 147–194, 1984

YAMANE, T.; HIBINO, W.; ISHIHARA, K.; KADOTANI, Y.; KOMINAMI, M. Fed-batch culture automated by uses of continuously measured cell concentration and culture volume. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 39, p. 550–555, 1992.

YAZDANI, S. S.; MUKHERJEE, K. J. Continuous-culture studies on the stability and expression of recombinant streptokinase in *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. v. 24, p. 314-346, 2002.

YIM, S. C.; JEONG, K. J.; CHANG, H. N.; LEE, S. Y. High-level secretory production of human granulocyte-colony stimulation factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess Biosystems Engineering**. v. 24, p. 249-254, 2001.

ZHANG, C.; XING, X. H. Quantification of specific bacterial strain in an anaerobic mixed culture for biohydrogen production by the aerobic fluorescence recovery (AFR) technique. **Biochemical Engineering Journal**. v. 39, p. 581-585, 2008.

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

ZHANG, Y.; TAIMING, L.; LIU, J. Low temperature and glucose enhanced T7 RNA

polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. ***Protein Expression and Purification***, v. 29, n. 1, p. 132–139, 2003.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Neste apêndice são apresentadas as curvas de calibração referentes aos diferentes métodos analíticos descritos no item 4.

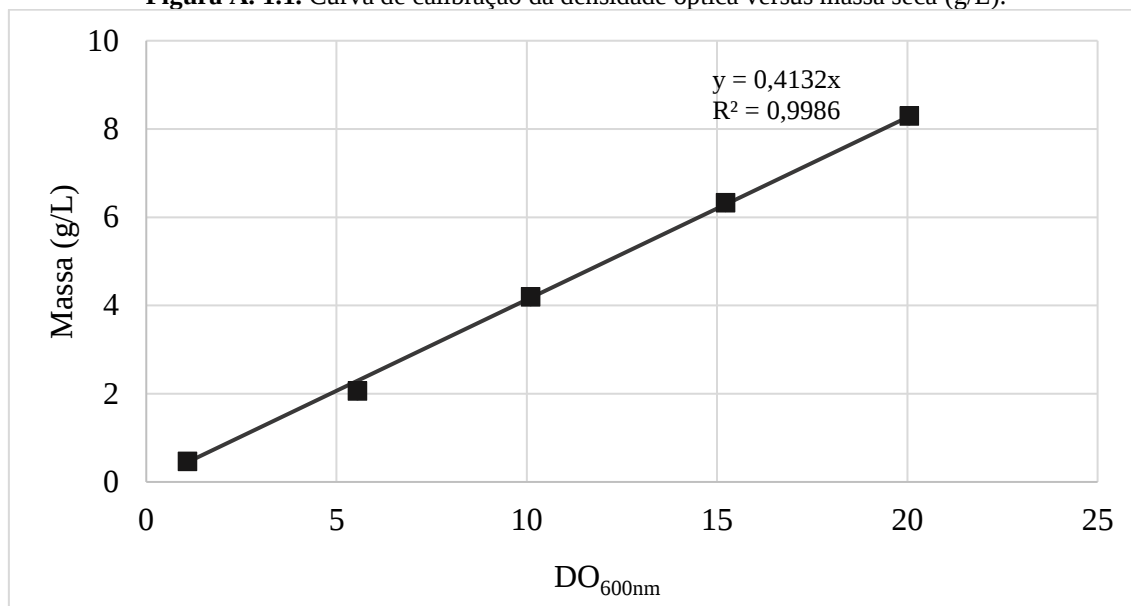
A.1. Curva de calibração de biomassa.

A curva de calibração da densidade óptica versus massa seca para a biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica de suspensões, em duplicata, obtidas por diluição de uma suspensão de células de densidade óptica e de concentração em peso seco conhecidas. A densidade óptica destas suspensões está compreendida entre 1,085 e 20,05 unidades de absorvância (Tabela A.1.1).

Tabela A. 1.1. Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L).

DO _{600nm}			Massa Seca (g/L)			
Repetição	Média		Repetição	Média		
1,09	1,08	1,08	0,50	0,40	0,50	0,46
5,10	6,00	5,55	2,10	2,00	2,10	2,06
9,70	10,50	10,10	4,10	4,30	4,30	4,20
14,90	15,55	15,22	6,30	6,30	6,40	6,33
19,60	20,50	20,05	8,30	8,30	8,30	8,30

FONTE: dados da pesquisa.

Figura A. 1.1. Curva de calibração da densidade óptica versus massa seca (g/L).

FONTE: dados da pesquisa.

A.2. Curva de calibração para conversão de Unidades de Fluorescência (UF) em concentração de GFP (mg/L)

A curva de calibração da unidade de fluorescência (UF) versus concentração de GFP foi determinada pela leitura da UF em leitor de placas Multimode Plate Reader PERKINELMER ENSPIRE® em comprimento de onda de excitação de 488 nm e de emissão de fluorescência de 507 nm. Foi utilizado padrão para preparo das soluções de concentração conhecida de GFP, compreendidas entre 0 e 3,2 mg/L.

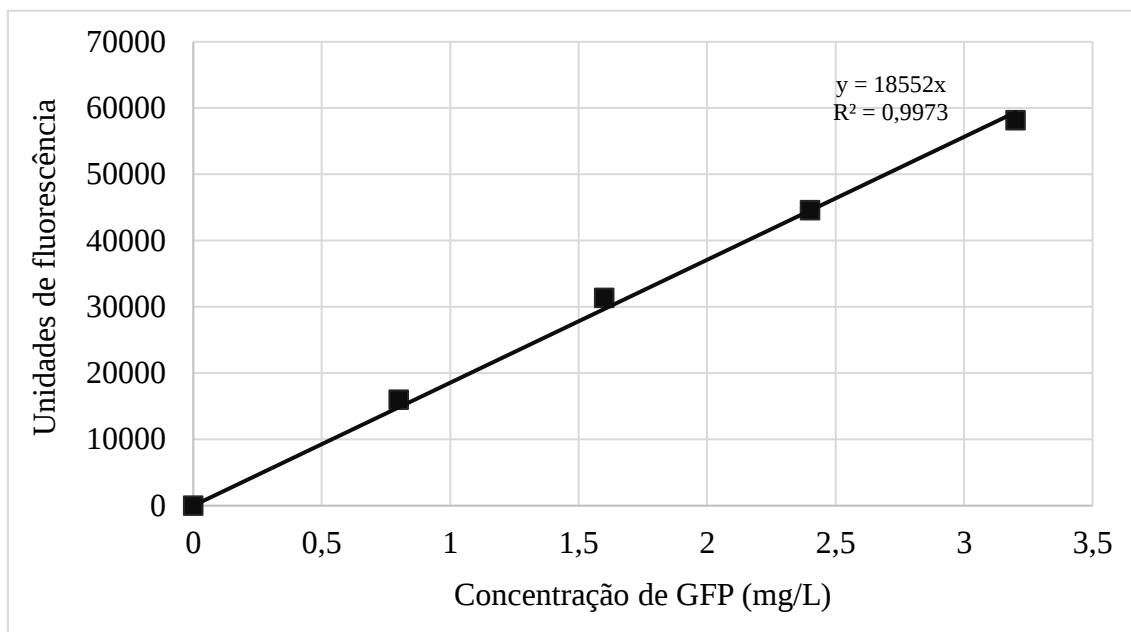
Os resultados obtidos são apresentados na Tabela A.2.1.

Tabela A. 2.1. Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de GFP (mg/L) versus a unidade de fluorescência emitida.

GFP (mg/L)	UF
0	9
0,8	16022
1,6	31362
2,4	44592
3,2	58182

FONTE: dados da pesquisa.

Figura A. 2.1. Curva de calibração da concentração de GFP (mg/L) versus a unidade de fluorescência emitida.



A.3. Curva de calibração da lactose

A curva de calibração da concentração de lactose versus a área sob a curva foi realizada em HPLC através do preparo de 5 soluções de concentrações conhecidas lactose em água.

A lactose foi previamente seca, pesada e diluída em água em quantidade suficiente para fornecer as concentrações 0,125 g/L, 0,250 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L. As leituras foram realizadas em triplicata e apresentaram tempo de retenção de 10,8 minutos.

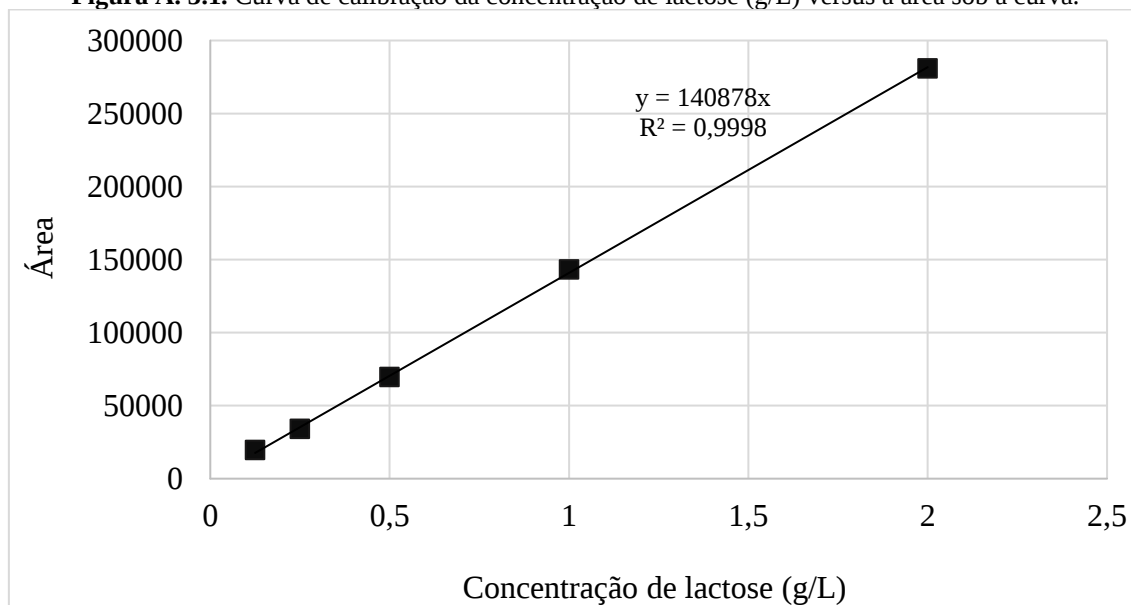
Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela A.3.1.

Tabela A. 3.1. Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de lactose (g/L) versus a área sob a curva.

Concentração de lactose (g/L)	Area ₁	Area ₂	Area ₃	Média	Desvio Padrão
0,125	20517	18018	20035	19523,3	1325,7
0,250	34067	34076	34271	34138,0	115,3
0,500	68468	70713	69607	69596,0	1122,5
1,000	140644	146116	142595	143118,3	2773,3
2,000	276710	287282	278591	280861,0	5639,7

FONTE: dados da pesquisa.

Figura A. 3.1. Curva de calibração da concentração de lactose (g/L) versus a área sob a curva.



FONTE: dados da pesquisa.

A.4. Curva de calibração da glicose

A curva de calibração da concentração de glicose versus a área sob a curva foi realizada em HPLC através do preparo de 5 soluções de concentrações conhecidas glicose em água.

A glicose foi previamente seca, pesada e diluída em água em quantidade suficiente para fornecer as concentrações 0,125 g/L, 0,250 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L.

As leituras foram realizadas em triplicata e apresentaram tempo de retenção de 8,31 minutos.

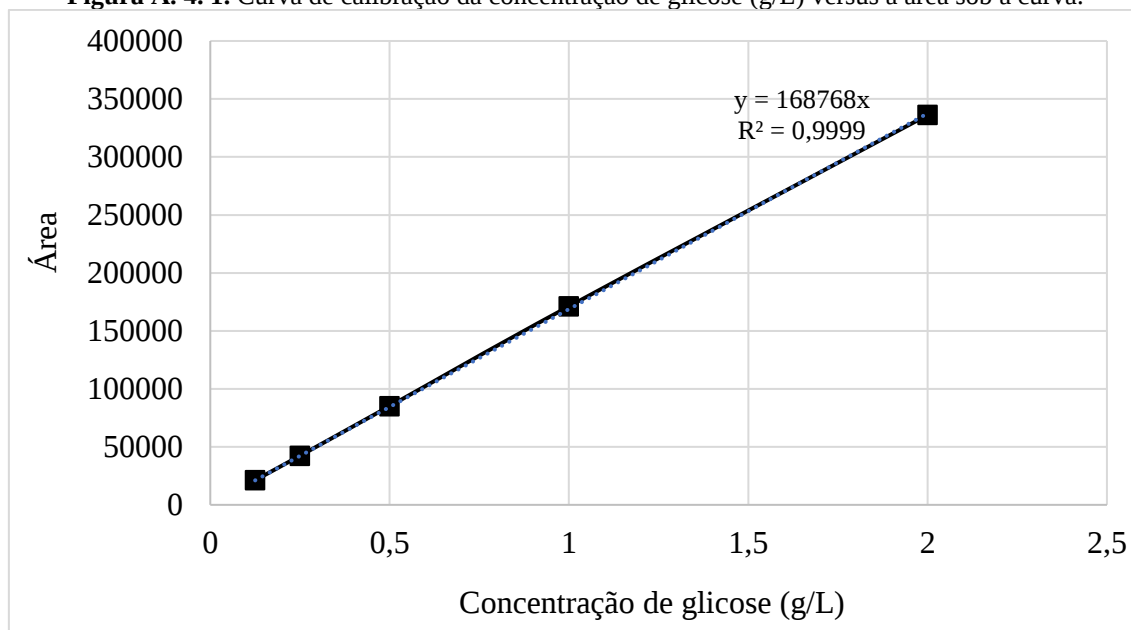
Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela A.4.1.

Tabela A. 4.1. Resultados obtidos em ensaio realizado para construção da curva de calibração da concentração de glicose (g/L) versus a área sob a curva.

Concentração de glicose (g/L)	Area ₁	Area ₂	Area ₃	Média	Desvio Padrão
0,125	21278	21083	21326	21229	97,33
0,250	41644	41864	43421	42309,7	740,89
0,500	88079	82979	84313	85123,7	1970,22
1,000	171112	170890	171452	171151	200,44
2,000	333450	337450	337512	336137	1791,56

FONTE: dados da pesquisa.

Figura A. 4. 1. Curva de calibração da concentração de glicose (g/L) versus a área sob a curva.



FONTE: dados da pesquisa.