

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/07/2018.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
CAMPUS ARARAQUARA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA  
APLICADAS À FARMÁCIA**

**CAMILA LOPES**

**DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE À SUA EXTRAÇÃO  
UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS**

**Araraquara - SP**

**2018**

**CAMILA LOPES**

**Da produção da proteína verde fluorescente à sua extração  
utilizando sistemas aquosos bifásicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Fernando Brandão Pereira  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Valéria de Carvalho dos Santos Ebinuma

**Araraquara, SP**

**2018**

### Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**L864d** Lopes, Camila  
Da produção da proteína verde fluorescente à sua extração utilizando sistemas aquosos bifásicos / Camila Lopes. – Araraquara, 2018.  
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Jorge Fernando Brandão Pereira.

Coorientadora: Valéria de Carvalho dos Santos Ebinuma.

1. Proteína Verde Fluorescente. 2. Biomarcador. 3. Produção. 4. Extração. 5. Sistemas micelares de duas fases aquosas. I. Pereira, Jorge Fernando Brandão, orient. II. Ebinuma, Valéria de Carvalho dos Santos, coorient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por Maria Irani Coito CRB-8/4.440

**CAPES: 40300005**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

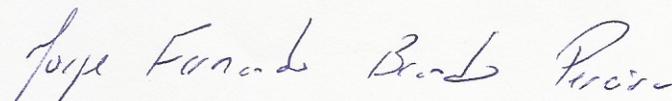
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Da produção da proteína verde fluorescente à sua extração utilizando sistemas aquosos bifásicos

**AUTORA:** CAMILA LOPES

**ORIENTADOR:** JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA

**COORIENTADORA:** VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA, área: ANÁLISES CLÍNICAS pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JORGE FERNANDO BRANDÃO PEREIRA

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Dr. JOÃO VITOR DUTRA MOLINO

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Universidade de São Paulo

(Membro participante por vídeo-conferência)



Prof. Dr. MARCEL OTÁVIO CERRI

Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 26 de janeiro de 2018.

*Dedico este trabalho a minha família,  
vocês são a base de tudo para mim.*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Jorge pela oportunidade, paciência, ensinamentos valiosos, confiança e pela orientação.

À professora Valéria por toda a colaboração durante a realização do trabalho.

Ao grupo de pesquisas BioPPuL e todos os seus integrantes pelo companheirismo, pelas risadas, pelos palpites e sugestões. Todos vocês são especiais!

Aos técnicos do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia por serem sempre solícitos a ajudar.

A todos os integrantes do laboratório de Biologia Celular e Molecular pela assistência no trabalho e às meninas Angélica, Tati Maria, Mel, Bianca, Graci e Milca pelo carinho que me receberam todas as vezes que precisei de ajuda.

Aos alunos, técnicos do laboratório de Saúde Pública e ao professor Adriano Mondini por ceder-nos espaço para trabalhar, serem sempre simpáticos e pacientes com todos os alunos do BioPPuL.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia pelo excelente serviço prestado à pesquisa e educação do Brasil.

A todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, cada bom dia, cada sorriso e os cafezinhos regados a boas conversas fizeram meus dias mais felizes.

A Agnes Magri por dividir todas as alegrias e angustias comigo durante essa jornada. Construimos uma bela amizade ao ceder forças uma a outra sempre que necessário, espero que esse companheirismo continue conosco mesmo a distância.

A Josiane pelas caronas, abraços, conselhos e pela paciência de escutar minhas lamúrias.

Aos amigos de longa data Vinícius, Débora, Carol, Tatiana, Carmem, Vanessa, Ana Luiza e Natalia que presentes ou não me apoiaram, criticaram e elogiaram, em especial ao Gabriel que foi meu maior companheiro, dividindo histórias, reclamações, comida e até mesmo a família. Eu amo vocês.

Aos meus pais, Denise e Rodolfo, que nunca deixaram de acreditar em mim e são meus maiores exemplos de amor e compreensão, e aos meus irmãos, Vitor e Juninho por esbanjarem ternura e companheirismo.

A vó Thereza pela paciência de todos os dias, pelo cuidado e apreço imenso. A senhora é um exemplo de vida para todos que a conhecem.

A tia Andreia por ter ocupado com muito carinho o papel de mãe em minha vida, nos momentos em que a minha estava longe.

Ao tio Donato por acreditar em mim incondicionalmente, pelas oportunidades que me ofereceu e por ser o melhor exemplo de ser humano que eu pude conhecer.

A vó Edna, ao vô João e a tia Darlene por sempre me incentivarem a buscar ser cada dia melhor.

A FAPESP pelo financiamento do projeto (Processo nº 2014/19793-3) e a CAPES pelo fornecimento da bolsa.

*“...Desejo também que você plante uma semente,  
Por mais minúscula que seja,  
E acompanhe o seu crescimento,  
Para que você saiba de quantas  
Muitas vidas é feita uma árvore.  
...”*

(Victor Hugo)

## RESUMO

LOPES, C. **Da produção da proteína verde fluorescente à sua extração utilizando sistemas aquosos bifásicos.** 2018. 64 F. Dissertação (Mestrado em Bioprocessos e Biotecnologia)- Faculdade de ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2018.

A proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) é um biomarcador utilizado na produção de proteínas de fusão, amplamente empregado *in vivo* e *in vitro*. Este trabalho avaliou a produção da GFP expressa em *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] em mesa incubadora rotativa e biorreator, e sua posterior extração utilizando Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA). Na etapa de produção em mesa incubadora rotativa, estudou-se a influência da taxa de agitação, tempo de indução e concentração do composto indutor, isopropil- $\beta$ -1-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), sobre a produção da GFP, e apenas a variação da taxa de agitação e o tempo de indução alteraram a produção de GFP. A melhor produção de GFP (314,59 mg/L) foi obtida a 30°C após 22 h de cultivo a uma agitação de 150 rpm, induzindo com 0,5 mM de IPTG realizada 10 h após o início do cultivo (meio da fase exponencial de crescimento). Posteriormente, avaliou-se menores concentrações de IPTG (0,25; 0,125 mM) na produção de GFP e observou-se que os níveis de produção foram mantidos. Estes estudos iniciais, foram a base para as condições empregadas em biorreator tanque agitado, que operou no modo batelada a uma agitação de 200 rpm, aeração de 2 vvm (volume de ar/ volume de meio) e indução com 0,125 mM de IPTG após 6 h de cultivo. Nas condições citadas, obteve-se apenas uma produção de 128,13 mg/L de GFP, desse modo, apesar da potencialidade da ampliação de escala na produção desta biomolécula, estudos posteriores são ainda necessários. Após os estudos de produção, realizou-se o rompimento das células bacterianas por ciclos continuados de congelamento/descongelamento. A GFP do lisado celular foi então submetida a estudos de sua estabilidade perante diferentes pHs (3 - 12) e temperaturas (25°, 37° e 50°C), mostrando-se estável entre os pHs 7 a 11 e em temperaturas de 25°C e 37°C, mas não estável a uma temperatura de 50°C. Nos estudos de extração foram utilizados os SMDFA compostos por tampão McIlvaine pH 7, Triton X-114, e o líquido iônico [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl como adjuvante. O melhor coeficiente de partição ( $K = 30,91$ ) foi obtido no sistema formado por 2,5 % (m/m) de Triton X-114; 0,5% (m/m) de [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl. Os resultados obtidos demonstraram que uma escolha apropriada das melhores condições de cultivo permitem um aumento da produção de GFP utilizando a cepa de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)]. Além disso, os estudos com SMDFA mostraram alta influência dos seus componentes na partição da GFP, demonstrando a potencialidade de sistemas aquosos na purificação da GFP.

**Palavras-chave:** Proteína Verde Fluorescente. Biomarcador. Produção. Extração. sistemas micelares de duas fases aquosas.

## ABSTRACT

LOPES, C. **From the production of green fluorescent protein up to their purification using aqueous biphasic systems.** 2018. 64 F. Dissertation (Master degree in Bioprocess and Biotechnology)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2018.

Green Fluorescent Protein (GFP) is a *in vivo* and *in vitro* biomarker widely used in the production of fusion proteins. This work evaluated the production of GFP expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28 (a)] in shaker and bioreactor, and its subsequent extraction using Aqueous Micellar Two-Phase Systems (AMTPS). The influence of the agitation rate, induction time and concentration of the inductor, isopropyl- $\beta$ -1-D-thiogalactopyranoside (IPTG), on GFP production, was studied using a shaker. The results shown that only the agitation rate and the induction time have affect the GFP production. The best GFP production (314.59 mg/L) was obtained at 30°C after 22 h of culture at 150 rpm, induced with 0.5 mM IPTG after 10 h after of the start of cultivation (at half of exponential growth). Subsequently, lower IPTG concentrations (0.25, 0.125 mM) were evaluated for the GFP production, being maintained the production levels. From these conditions, a cultivation using agitated tank bioreactor was then carried out. The bioreactor operated in batch mode at 200 rpm with a 2 vvm aeration (air volume / volume of medium), being the GFP production induced with 0.125 mM IPTG after 6 h of microorganism' growth. Under that conditions, a production of 128.13 mg/L of GFP was obtained. Thus, despite the potential of scale-up in the production of this biomolecule, further studies are still required. After the GFP production studies, the bacterial cells were disrupted using continuous freezing / thawing cycles. GFP recovered from the cell lysate was then used to perform stability studies at different pHs (3 - 12) and temperatures (25°, 37° and 50°C). The stability studies shown that GFP was stable between pHs 7 to 11 and at temperatures of 25°C and 37°C, but not stable at a temperature of 50°C. Afterwards, liquid-liquid extraction studies using AMTPS composed of McIlvaine buffer (pH 7), Triton X-114, and the ionic liquid [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl as an adjuvant, were performed. The best partitioning coefficient (K = 30.91) was obtained with the system composed of 2.5% (w/w) of Triton X-114 and 0.5% (w/w) of [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl. The set of results have demonstrated that a proper choice of the cultivation conditions allows the increase of GFP production using the *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] strain. Furthermore, the partitioning studies using AMTPS have shown a high influence of their phase-forming components in the GFP partitioning, demonstrating the potentiality of AMTPS in the GFP extraction and purification.

**Keywords:** Green fluorescent protein. Biomarker. Production. Extraction. Aqueous micellar two-phase systems.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura da GFP de *Aequorea victoria* expressa por *Escherichia coli*.....15
- Figura 2.** Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas antes e após a separação de fases devido ao aumento de temperatura.....21
- Figura 3.** Esquema ilustrativo do procedimento experimental para extração de GFP utilizando SMDFA. 1- Tubo de vidro graduado contendo os componentes do sistema: tampão Mcllvaine (pH 7), Triton X-114, solução de GFP e  $[P_{6,6,6,14}]Cl$ . 2- Homogeneização do sistema a 8 rpm durante 1 h. 3- Incubação em banho termostatizado a 40°C, durante 12 h. 4- Tubo contendo sistema bifásico. 5- Tubos contendo as fases topo e fundo do SMDFA já separada.....29
- Figura 4.** Curva de crescimento microbiano da bactéria *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)] a 30°C, em condições aeróbias, e sob diferentes agitações (rpm): (-◆-) 100; (-■-) 150; (-▲-) 200; (-●-) 250. As curvas de crescimento correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.....31
- Figura 5.** Curva de crescimento microbiano da bactéria *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)], induzida com 0,5 mM de IPTG, a 30°C, sob diferentes agitações (rpm): linha contínua (-▲-) 100; (-▲-) 150; (-▲-) 200; (-▲-) 250 e, sem indução, sob diferentes agitações: linha tracejada (-●-) 100; (-●-) 150; (-●-) 200; (-●-) 250. As curvas de crescimento correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.....33
- Figura 6.** Concentração de GFP (mg/L) produzida por *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)] a 30°C, após indução com IPTG a meio da fase exponencial, sob diferentes agitações (rpm): (-◆-) 100; (-■-) 150; (-▲-) 200; (-●-) 250. Os resultados correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.....34
- Figura 7.** Cinética de crescimento microbiano (a) a 30°C da *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): a) (-●-) 2 / 0,25; (-●-) 2 / 0,50; (-●-) 2 / 0,75; b) (-■-) 6 / 0,25; (-■-) 6 / 0,50; (-■-) 6 / 0,75 e c) (-

▲-) 10 / 0,25; (-▲-) 10 / 0,50; (-▲-) 10 / 0,75. Os resultados correspondem à média de 3 ensaios independentes com respectivo desvio padrão.....36

**Figura 8.** Concentração de GFP (mg/L) produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): **a)** (-●-) 2 / 0,25; (-●-) 2 / 0,50; (-●-) 2 / 0,75; **b)** (-■-) 6 / 0,25; (-■-) 6 / 0,50; (-■-) 6 / 0,75; **c)** (-▲-) 10 / 0,25; (-▲-) 10 / 0,50; (-▲-) 10 / 0,75. Os resultados correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.....37

**Figura 9.** Cinética de crescimento microbiano *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): (-▲-) 6 / 0,25; (-▲-) 6 / 0,125; (-▲-) 10 / 0,25; (-▲-) 10 / 0,125. Para efeitos de comparação é apresentada a cinética de crescimento sem adição de composto indutor (-▲-). Os resultados correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.....39

**Figura 10.** Concentração de GFP (mg/L) produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): (-▲-) 6 / 0,25 ; (-▲-) 6 / 0,125; (-▲-) 10 / 0,25; (-▲-) 10 / 0,125. Para efeitos de comparação é apresentada a produção de GFP (mg/L) sem adição de composto indutor (-▲-). Os resultados correspondem à média de 3 ensaios independentes com respectivo desvio padrão.....40

**Figura 11.** Fotos do biorreator MINIFORS 2 com cultivo de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] em: a) início do cultivo; b) momento da indução (6h de fermentação) e c) final da fermentação (25h de fermentação).....42

**Figura 12.** Cinética de crescimento microbiano de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] (-●-) e sua respectiva produção de GFP em mg/L (-■-) com cultivo realizado em biorreator com 25 h de fermentação. Os resultados correspondem à média de 3 amostras com respectivo desvio padrão.....43

**Figura 13.** Concentração de GFP (mg/L) presente no sobrenadante do lisado celular, submetido a diferentes ciclos de rompimento celular por congelamento (-20°C) / descongelamento (40°C).....45

**Figura 14.** Estabilidade da fluorescência da GFP [UF (Ex 488 nm / Em 510 nm)] produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] a temperatura ambiente e

exposta a diferentes pHs: (-●-) 0h de exposição, (-■-) 1h de exposição e (-▲-) 2h de exposição e (-▲-) pH 10, (-▲-) pH 11, (-▲-) pH 12.....46

**Figura 15.** Estabilidade da fluorescência da GFP [UF (Ex 488 nm / Em 510 nm)] da GFP produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)], exposta a diferentes condições de pH ((-▲-) pH 6; (-▲-) pH 8 e (-▲-) pH 11) e sob três diferentes condições de temperatura: a) 25°C; b) 37°C; c) 50°C.....48

**Figura 16.** Logaritmo dos coeficientes de partição ( $\log K$ ) da GFP obtido a 40°C em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por: 2,5; 5 e 7,5 % (m/m) de Triton X-114. As barras azuis correspondem aos sistemas com 0,5 % (m/m) de [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl e as barras vermelhas são os sistemas formados na ausência do LI.....49

**Figura 17.** Taxas de Recuperação da GFP ( $R_{GFP}(\%)$ ) a) na fase topo do sistema (fase pobre em micelas) e b) na fase fundo do sistema (fase rica em micelas); obtidas a 40°C em sistemas micelares de duas fases aquosas compostos por: 2,5; 5 e 7,5 % (m/m) de Triton X-114. As barras azuis correspondem aos sistemas com 0,5 % (m/m) de [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl e as barras vermelhas são os sistemas formados na ausência do LI.....51

**Figura 18.** Fotos dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA) após a incubação a 40°C. Cada sistema possui uma triplicata realizada com amostra de lisado celular contendo GFP e um sistema branco, onde não há amostra de GFP. Sistema 1. 2,5 % (m/m) TX-114 + 0,5 % (m/m) [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl; Sistema 2. 5 % (m/m) TX-114 + 0,5 % (m/m) [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl; Sistema 3. 7,5 % (m/m) TX-114 + 0,5 % (m/m) [P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl; Sistema 4. 2,5 % (m/m) TX-114; Sistema 5. 5 % (m/m) TX-114; Sistema 6. 7,5 % (m/m) TX-114.....52

**LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

<b>[P<sub>6,6,6,14</sub>]CI</b>	Cloreto de Trihexil(tetradecil)fosfônio
<b>CAT</b>	Cloranfenicol Acetil Tranferase
<b>CMC</b>	Concentração Micelar Crítica
<b>DO<sub>600nm</sub></b>	Densidade Ótica a 600 nm
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
<b>LIs</b>	Líquidos Iônicos
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>Meio LB</b>	Meio Luria-Bertani
<b>SDFA</b>	Sistemas de Duas Fases Aquosas
<b>SMDFA</b>	Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas
<b>TX-114</b>	(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol
<b>UA</b>	Unidades de Absorbância
<b>UF</b>	Unidades de Fluorescência

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 Proteína Verde Fluorescente .....	15
2.2 Produção de GFP por <i>E. coli</i> .....	17
2.3 Extração de GFP por Sistemas Aquosos Micelares Bifásicos .....	19
3 OBJETIVOS .....	23
3.1 Objetivo Geral .....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Microrganismo e Meio de Cultura .....	24
4.2 Curvas de Crescimento da bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)].....	24
4.3 Avaliação da Produção de GFP em <i>E.coli</i> BL21(DE3) [pET28(a); pLysS].....	25
4.4 Determinação da concentração de IPTG mínima para indução da produção de GFP.....	25
4.5 Produção de GFP em biorreator .....	26
4.6 Quantificação da GFP para fermentações .....	26
4.7 Rompimento Celular de <i>E. coli</i> BL21 .....	26
4.8 Avaliação da Estabilidade da GFP.....	27
4.10 Quantificação da GFP após lise celular .....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5.1 Crescimento celular da bactéria <i>E. coli</i> BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)].....	31
5.2 Efeito da agitação na produção de GFP .....	32
5.3 Efeito da concentração de indutor e tempo de indução na produção de GFP .	35
5.4 Determinação da concentração mínima de IPTG para indução da produção de GFP.....	39
5.5 Produção de GFP por <i>E. coli</i> BL21(DE3) [pLysS; pEt29(a)] em Biorreator.....	41
5.6 Rompimento das células de <i>E. coli</i> BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)].....	44
5.7 Estudo da estabilidade da GFP em diferentes pHs e temperaturas.....	46
5.8 Extração de GFP utilizando SMDFAs .....	48
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	54
APÊNDICES.....	59
APÊNDICE A.....	59

APÊNDICE B.....60

## 1 INTRODUÇÃO

Os diversos avanços da indústria biotecnológica com pesquisas de tecnologia do DNA recombinante permitiram o surgimento de distintas oportunidades na produção de biomoléculas em larga escala, a partir da fermentação de microrganismos. Este progresso proporcionou o desenvolvimento e utilização de proteínas como terapias inovadoras e vitais para o tratamento de doenças complexas, como por exemplo, a diabetes. (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Seguindo o mesmo progresso, o desenvolvimento e a pesquisa de novos biomarcadores são fundamentais para a detecção de doenças específicas (PARIKH; VASAN, 2007) e para a identificação e controle da produção de biofármacos (RÜCKER et al., 2001). Dentre os biomarcadores fluorescentes, um representante de destaque é a proteína verde fluorescente (GFP, do inglês *Green Fluorescent Protein*) (PÉREZ-ARELLANO; PÉREZ-MARTÍNEZ, 2003).

A GFP é uma proteína globular de 27 kDa que possui intensa e natural fluorescência verde e é muito utilizada como biomarcador e biossensor. Sua expressão já foi demonstrada para uma larga gama de microrganismos, como por exemplo, *Aspergillus niger* e *Lactobacillus casei* (DONNELL et al., 2001; PÉREZ-ARELLANO; PÉREZ-MARTÍNEZ, 2003). No entanto, a sua produção se destaca pela sua utilização em sistemas heterólogos de expressão, particularmente utilizando a bactéria *Escherichia coli*, o qual é o sistema de expressão procariótico mais frequentemente aplicado (JOHANSSON et al., 2008; LOPES et al., 2011; WANG et al., 2014). Nos processos fermentativos de produção de proteínas heterólogas, é de suma importância que os parâmetros de cultivo sejam estudados de modo a maximizar a produção da proteína alvo, no caso a GFP, para a obtenção de valores apreciáveis (BERLEC et al., 2008).

Devido sua aplicação como biomarcador e biossensor, a comercialização da GFP exige altos índices de pureza, o que requer a aplicação de uma série de metodologias de purificação que encarecem o produto final, sendo os processos de purificação responsáveis por cerca de 80% dos custos totais de produção (WALSH, 2010). Com o intuito de diminuir os custos de processo associados às etapas cromatográficas e assim aumentar o rendimento de produção, a utilização de extração líquido-líquido utilizando sistemas micelares de duas fases aquosas

(SMDFA) pode ser aplicada de modo a permitir a extração e concentração de proteínas (LOPES et al., 2013).

Desse modo, considerando todos os pressupostos apresentados, o presente trabalho visou avaliar a produção da GFP a partir de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] de forma a aumentar sua produção e posteriormente, utilizar a metodologia de extração líquido-líquido, em particular utilizando sistemas micelares de duas fases aquosos com líquidos iônicos (LIs), para a extração e concentração de GFP. Esta abordagem tem como objetivo confirmar a efetividade deste tipo de sistemas como uma metodologia alternativa mais sustentável e biocompatível para a extração de proteínas.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho permitiram concluir que, para o crescimento bacteriano da *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET 28(a)], a melhor condição de agitação observada foi de 250 rpm, onde foram alcançados os maiores valores de  $DO_{600nm}$ , apresentando um aumento de 50% quando comparado com os valores obtidos para o cultivo a 100 rpm. Porém, para a produção da GFP, foram obtidas maiores concentrações da biomolécula alvo empregando a taxa de agitação de 150 rpm, ao confrontar a produção de GFP com 150 rpm de rotação, à condição de 250 rpm, houve um aumento de 15% nessa produção. Ao variar o ponto de indução do cultivo, o melhor resultado obtido foi no meio da fase exponencial de crescimento, onde há um número satisfatório de células viáveis e observou-se a não interferência da concentração do composto indutor na concentração final de GFP produzida, sendo a concentração de IPTG adicionada ao cultivo reduzida ao valor de 0,125 mM, sem o comprometimento da produção de GFP.

O rompimento foi realizado pelo método de congelamento/descongelamento, verificando-se a total liberação da proteína para o meio extracelular em apenas dois ciclos. A estabilidade da GFP recuperada no lisado celular foi avaliada, tendo se concluído que a GFP mantém sua fluorescência entre os pHs 7 e 11 e nas temperaturas de 25, 37 e 50°C, apresentando uma ligeira perda de fluorescência ao longo do tempo na temperatura de 50°C, sob condições mais básicas (pH 11).

Os ensaios de partição de GFP em SMDFA mostraram que esta técnica pode ser utilizada como uma plataforma válida na separação e concentração da GFP, tendo sido obtidos altos valores para o coeficiente de partição ( $K=30,91 \pm 3,90$ ) para o sistema composto por 2,5% (m/m) TX-114 e 0,5% (m/m) [P<sub>6,6,6,14</sub>][Cl], e uma recuperação de  $62,8\% \pm 6,17$ , observando-se a inversão no comportamento da partição da GFP ao adicionar o LI.

Desta maneira, os resultados observados neste trabalho apresentam um aumento na produção de GFP, quando comparada as fermentações iniciais, através da análise dos parâmetros de fermentação e, os SMDFA se mostraram viáveis para

a extração da GFP produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)]. Os promissores resultados observados no trabalho devem servir de apoio para futuros estudos, como por exemplo: aumento de escala da produção, com a otimização da produção de GFP em biorreator; estudo de purificação da GFP em SMDFA, com a variação das concentrações de tensoativos e LIs, bem como a alteração do LI utilizado.

## REFERÊNCIAS

- AUCOIN, M. G. et al. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. **Microbial cell factories**, v. 5, n. 1, p. 27, 2006.
- BENOIT, I. et al. Expression in *Escherichia coli*, refolding and crystallization of *Aspergillus niger* feruloyl esterase A using a serial factorial approach. **Protein Expression and Purification**, v. 55, n. 1, p. 166–174, 2007.
- BENOV, L.; AL-IBRAHEEM, J. Disrupting *Escherichia coli*: A Comparison of Methods. **Journal of biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 4, p. 428–431, 2002.
- BERLEC, A. et al. 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.
- BIZZARRI, R. et al. Green fluorescent protein based pH indicators for *in vivo* use: A review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 4, p. 1107–1122, 2009.
- BORDIER, C. Phase Separation of Integral Membrane Proteins in Triton X-114 Solution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 256, n. 4, p. 1604–1607, 1981.
- BRAKEMANN, T. et al. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 942–947, 2011.
- CABANTOUS, S.; WALDO, G. S. *In vivo* and *in vitro* protein solubility assays using split GFP. **Nature Methods**, v. 3, n. 10, p. 845–854, 2006.
- CARVALHO, S. M. G. **Monitorização e Modelação da Fermentação de E. coli Recombinante**. Universidade do Minho, 2009.
- CHALFIE, M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802–805, 1994.
- CHEW, F. N. et al. Statistical optimization of green fluorescent protein production from *Escherichia coli* BL21(DE3). **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 535–550, 2012.
- CHIU, W. et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants. **Current biology : CB**, v. 6, n. 3, p. 325–330, 1996.
- CHOI, W. G.; SWANSON, S. J.; GILROY, S. High-resolution imaging of Ca<sup>2+</sup>, redox status, ROS and pH using GFP biosensors. **Plant Journal**, v. 70, n. 1, p. 118–128, 2012.
- COLEMAN, M. A. et al. High-throughput, fluorescence-based screening for soluble protein expression. **Journal of Proteome Research**, v. 3, n. 5, p. 1024–1032, 2004.
- COUTARD, B. et al. Green fluorescent protein and factorial approach: An effective partnership for screening the soluble expression of recombinant proteins in

*Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 61, n. 2, p. 184–190, 2008.

CRONE, D. E. et al. GFP-Based Biosensors. 1996.

DE LENCASTRE NOVAES, L. C. et al. Investigation of charged polymer influence on green fluorescent protein thermal stability. **New Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 391–395, 2011.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DOMAŃSKA, U. Thermophysical properties and thermodynamic phase behavior of ionic liquids. **Thermochimica Acta**, v. 448, n. 1, p. 19–30, 2006.

DONNELL, D. O. et al. Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, p. 187–193, 2001.

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**, v. 16, p. 145–154, 1996.

FREIRE, M. G. et al. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquids. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 14, p. 4966, 2012.

GEORGIU, G.; VALAX, P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 190–197, 1996.

HEKMAT, D. et al. Non-chromatographic preparative purification of enhanced green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 194, p. 84–90, 2015.

INOUYE, S.; TSUJI, F. I. *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. **FEBS letters**, v. 341, n. 2–3, p. 277–280, 1994.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system ( ATPS ): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, p. 1–18, 2016.

ISHII, M. et al. Study on the thermal stability of green fluorescent protein (GFP) in glucose parenteral formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 337, n. 1–2, p. 109–117, 2007.

JAIN, S.; SINGH, R.; GUPTA, M. N. Purification of recombinant green fluorescent protein by *three-phase partitioning*. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 83–86, 2004.

JAIN, S.; TEOTIA, S.; GUPTA, M. N. Purification of green fluorescent protein overexpressed by a mutant recombinant *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 36, n. 1, p. 76–81, 2004.

JAPRUNG, D. et al. A simple dual selection for functionally active mutants of *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase with improved solubility. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 18, n. 10, p. 457–464, 2005.

JOHANSSON, H. O. et al. Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly(acrylate) aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 62, n. 1, p. 166–174, 2008.

KAMEI, D. T. **Protein and Viral Partitioning in Two-Phase Aqueous Micellar Systems**. Massachusetts Institute of Technology, 2001.

KAO, P. M. et al. Effects of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 172–178, 2007.

LARENTIS, A. L. et al. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 671, 2014.

LEADER, B.; BACA, Q. J.; GOLAN, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 1, p. 21–39, 2008.

LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J.; SNAPP, E.; KENWORTHY, A. Studying protein dynamics in living cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 2, n. June, p. 444–456, 2001.

LIU, C.; NIKAS, Y. J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel Bioseparations Using Two-Phase Aqueous Micellar Systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 52, p. 185–192, 1996.

LOPES, A. M. et al. Green fluorescent protein extraction and LPS removal from *Escherichia coli* fermentation medium using aqueous two-phase micellar system. **Separation and Purification Technology**, v. 81, n. 3, p. 339–346, 2011.

LOPES, A. M. et al. LPS-protein aggregation influences protein partitioning in aqueous two-phase micellar systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 14, p. 6201–6209, 2013.

MAZZOLA, P. G. et al. Affinity-Tagged Green Fluorescent Protein ( GFP ) Extraction From a Clarified *E. coli* Cell Lysate Using a Two-Phase Aqueous Micellar System. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 93, n. 5, p. 998–1004, 2006.

NAGY, A. et al. Thermal stability of chemically denatured green fluorescent protein (GFP) A preliminary study. **Thermochimica Acta**, v. 410, p. 161–163, 2004.

NEUBAUER, P. et al. Applied Microbiology Biotechnology Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 739–744, 1992.

NIKAS, J. et al. Protein Partitioning in Two-Phase Aqueous Nonionic Micellar Solutions. **Macromolecules**, v. 25, p. 4797–4806, 1992.

OMOYA, K. et al. Systematic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. **Protein Expression and Purification**, v. 36, n. 2, p. 327–332, 2004.

- PARIKH, N. I.; VASAN, R. S. Assessing the clinical utility of biomarkers in medicine. **Biomarkers in medicine**, v. 1, n. 3, p. 419–436, 2007.
- PENNA, T.C. ISHII, M. Selective Permeation and Organic Extraction of Recombinant Green Fluorescent Protein (gfpuv) from *Escherichia coli*. **BMC Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 7, 2002.
- PENNA, T. C. V. et al. Expression of green fluorescent protein (GFPuv) in *Escherichia coli* DH5-a, under different growth conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 105–111, 2004a.
- PENNA, T. C. V. et al. Thermal stability of recombinant green fluorescent protein (GFPuv) at various pH values. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 113–116, p. 469–83, 2004b.
- PÉREZ-ARELLANO, I.; PÉREZ-MARTÍNEZ, G. Optimization of the green fluorescent protein (GFP) expression from a lactose-inducible promoter in *Lactobacillus casei*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 123–127, 2003.
- POPPEBORG, 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.
- PRASHER, D. C. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. **Gene**, v. 111, p. 229–233, 1992.
- RANGEL-YAGUI, C. O.; PESSOA-JR, A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems - an alternative method for protein purification. **Brasilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 4, p. 531–544, 2004.
- ROBICHON, C. et al. Engineering *Escherichia coli* BL21 ( DE3 ) Derivative Strains To Minimize E . coli Protein Contamination after Purification by Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4634–4646, 2011.
- RÜCKER, E. et al. Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. **Protein expression and purification**, v. 21, n. 1, p. 220–3, 2001.
- SANTOS-EBINUMA, V. C. **Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas mistos de duas fases aquosas**. Universidade de São Paulo - USP, 2009.
- SANTOS, N. V. et al. Liquid-Liquid Extraction of Biopharmaceuticals from Fermented Broth: Trends and Future Prospects. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, 2017.
- SANTOS, V. C. et al. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 1–2, p. 75–83, 2011.
- SHIMOMURA, O.; H. JOHNSON, F.; SAIGA, Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. **Journal of Cellular and Comparative Physiology**, v. 1353, n. 165, p.

223–239, 1962.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005.

SOUNDRARAJAN, N. et al. Green fluorescent protein as a scaffold for high efficiency production of functional bacteriotoxic proteins in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20661, 2016.

TSENG, M.-C.; TSENG, M.-J.; CHU, Y.-H. Affinity ionic liquid. **Chemical communications (Cambridge, England)**, n. 48, p. 7503–7505, 2009.

TSIEN, R. Y. The Green Fluorescent Protein. **Annual Reviews in Biochemistry**, v. 67, n. 509, p. 44, 1998.

VERA, A. et al. The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins Is Enhanced at Low Growth Temperatures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 6, p. 1101–1106, 2007.

VICENTE, F. A. et al. Design of novel aqueous micellar two-phase systems using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of ( bio ) molecules. **Separation and Purification Technology**, v. 135, p. 259–267, 2014.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 9, p. 917–926, 2010.

WANG, L. et al. Effects of process parameters on heterologous protein production in *Aspergillus niger* fermentation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 78, n. 12, p. 1259–1266, 2003.

WANG, S. et al. Partitioning behavior of enhanced green fluorescent protein in nickel-chelated affinity-based aqueous two-phase micellar system and its purification from cell lysate. **Separation and Purification Technology**, v. 133, p. 149–154, 2014.

WEBB, C. D. et al. 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, n. 20, p. 5906–5911, 1995.

WOLSKI, P. W.; CLARK, D. S.; BLANCH, H. W. Green fluorescent protein as a screen for enzymatic activity in ionic liquid–aqueous systems for in situ hydrolysis of lignocellulose. **Green Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 3107, 2011.

WYRE, C.; OVERTON, T. W. Use of a stress-minimisation paradigm in high cell density fed-batch *Escherichia coli* fermentations to optimise recombinant protein production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1391–1404, 2014.

YANG, F.; MOSS, L. G.; PHILLIPS JR, G. N. The molecular structure of green fluorescent protein. **Nature Biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 1246–1251, 1996.