



**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**

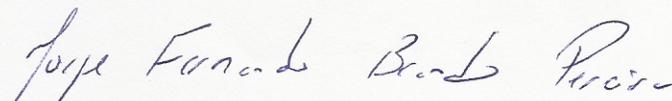
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** Da produção da proteína verde fluorescente à sua extração utilizando sistemas aquosos bifásicos

**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. Construímos 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.

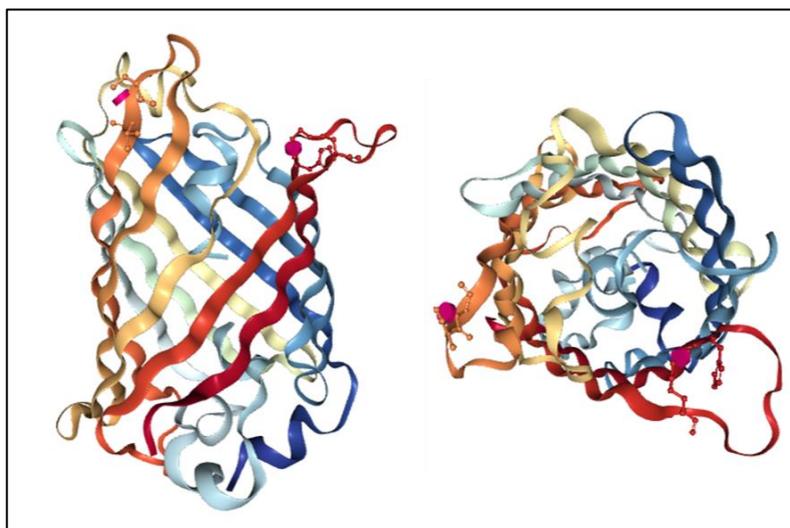
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Proteína Verde Fluorescente

A GFP foi isolada em 1962 a partir de águas vivas da espécie *Aequorea victoria*, surgindo como uma descoberta de grande relevância, visto que revelou um novo tipo de sistema bioluminescente (SHIMOMURA; H. JOHNSON; SAIGA, 1962). Após sua descoberta, os avanços nas pesquisas com a GFP progrediram com o sequenciamento de seu gene realizada por Prasher e colaboradores (1992) e a possibilidade de expressão da GFP em outros organismos (CHALFIE et al., 1994; INOUE; TSUJI, 1994).

Estruturalmente, a GFP é uma proteína globular, composta por 238 aminoácidos e peso molecular de 27 kDa (PENNA, ISHII, 2002), sendo representada pela Figura 1. Sua estrutura cristalina é o conjunto de dois monômeros dispostos em 11 fitas formadas por folhas  $\beta$ -pregueadas que se ordenam formando um cilindro, que abriga em seu centro geométrico o grupo fluoróforo, ligado ao cilindro por  $\alpha$ -hélices (YANG; MOSS; PHILLIPS JR, 1996). Este fluoróforo é formado pela ciclização autocatalítica do tripeptídeo -Ser65-Tyr66-Gly67- (WEBB et al., 1995).

A GFP pode ser quantificada por fluorimetria, com comprimentos de onda de excitação e emissão em uma faixa entre 395-510 nm (JAIN; TEOTIA; GUPTA, 2004), tendo os valores de excitação e emissão com seus picos de absorção variáveis devido a alguns fatores como o gene que originou a GFP, a estrutura da proteína e o efeito do pH e da temperatura (TSIEN, 1998).



**Figura 1.** Estrutura da GFP de *Aequorea victoria* expressa por *Escherichia coli*. Disponível em: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EMA>

Shimomura (1962) destacou que observada a olho nu, a GFP exibe em luz solar um aspecto pouco esverdeado, já sob a luz de tungstênio, sua coloração é amarelada e quando iluminada com luz ultravioleta exibe intensa fluorescência esverdeada. Devido à essa natural fluorescência, esta proteína é extremamente vantajosa visto que não necessita da adição de nenhum cofator para manifestar a sua fluorescência (POPPENBORG; FRIEHS; FLASCHEL, 1997). Desse modo, a facilidade na detecção e quantificação da GFP possibilita o seu amplo uso como biomarcador (POPPENBORG; FRIEHS; FLASCHEL, 1997). Este fato faz da GFP uma das proteínas mais amplamente estudadas e utilizadas em biologia celular e molecular (CABANTOUS; WALDO, 2006; CHEW et al., 2012; COLEMAN et al., 2004). Particularmente, ao utilizar a GFP como ligante é possível visualizar eventos celulares dinâmicos e monitorar a localização de proteínas (LIPPINCOTT-SCHWARTZ; SNAPP; KENWORTHY, 2001). É importante salientar que este acompanhamento pode ser realizado em tecidos vivos, sem lise celular ou necessidade de deformação do tecido Chiu e colaboradores publicaram em 1996, o primeiro experimento utilizando a GFP para monitorar a produção de proteínas. Fusionada com a enzima cloranfenicol acetil transferase (CAT), o estudo mostrou uma relação direta entre a intensidade de fluorescência da GFP com a atividade funcional e a quantidade de CAT. Este trabalho proporcionou base para o uso da GFP como gene repórter para aumentos de escala e otimização de processos na produção de proteínas recombinantes.

No entanto, as aplicações da GFP não se restringem ao seu uso como biomarcador, visto que esta proteína pode também atuar como um biossensor (BIZZARRI et al., 2009; BRAKEMANN et al., 2011; CHOI; SWANSON; GILROY, 2012). A função de um biossensor difere da função de um biomarcador por não se apresentar ligado à expressão de um produto gênico; os biossensores de GFP contêm substituições de aminoácidos e são capazes de detectar mudanças de pH, íons específicos, espécies de oxigênio reativo, entre outros (CRONE et al., 1996). A alta estabilidade química e térmica da proteína em questão permite que seja utilizada na validação de ausência de atividade biológica nas proximidades da GFP, de forma a demonstrar a eficácia no tratamento de desinfecção ou descontaminação na ausência de fluorescência (MAZZOLA et al., 2006). Ainda como biossensor, Wolsk, Clark e Blanch (2011) utilizaram a GFP para monitorar a atividade enzimática *in situ* em sistemas aquosos com LIs para a hidrólise de lignocelulose, observando

em alguns casos, a preservação de 50% ou mais da fluorescência em presença de frações com 75% de líquido iônico.

Outros autores sugerem que a GFP quando expressa em fusão com outra proteína, além de repórter de expressão, pode também assumir como função o auxílio no enovelamento e aumento da solubilidade relativa através da redução de interações hidrofóbicas, comportamento característico de chaperonas (COUTARD et al., 2008; JAPRUNG et al., 2005).

## 2.2 Produção de GFP por *E. coli*

A produção da GFP foi demonstrada em diversos 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 utilização de sistemas heterólogos de expressão (JOHANSSON et al., 2008; LOPES et al., 2011). Dentre estes, a bactéria *Escherichia coli* é o sistema de expressão procariótico mais frequentemente aplicado (WANG et al., 2014), por gerar altos rendimentos, o microrganismo apresenta rápido crescimento e meio de cultivo relativamente simples e baratos quando comparado a outros sistema de expressão heterólogo (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; SANTOS et al., 2017).

Devido ao vasto emprego da *E. coli* como sistema de expressão heterólogo para a produção de proteínas heterólogas, vários estudos vêm sendo realizados a fim de avaliar a influência de diversos parâmetros físico-químicos no crescimento celular e na produção das biomoléculas. As variáveis mais estudadas são a composição do meio nutricional, pH, densidade celular do inóculo, taxas de agitação, aeração e/ou oxigenação, tempo de indução, concentração do composto indutor, temperatura e tempo de cultivo (AUCOIN et al., 2006; CHEW et al., 2012; WANG et al., 2003). Particularmente, quando utilizada a *E. coli* na produção de GFP, há diversos trabalhos reportados na literatura avaliando tais variáveis.

Vera e colaboradores (2007) estudaram a influência da temperatura de crescimento da *E. coli* BL21 na qualidade conformacional da GFP insolúvel. Estes autores verificaram que em cultivos realizados em temperaturas inferiores às ótimas de crescimento favorecem a solubilidade da proteína alvo devido ao menor índice de formação de agregados protéicos. Chew e colaboradores (2012) utilizaram métodos estatísticos para avaliar a significância de seis variáveis de processo na produção de GFP utilizando *E. coli* BL21. As variáveis sob estudo foram: taxa de agitação,

temperatura, pH inicial do meio; a concentração do composto indutor; a  $DO_{600nm}$  no momento de indução; e a densidade do inóculo. Os autores alcançaram um aumento de, aproximadamente, 10 x na concentração de GFP produzida (0,025 g/L para 0,241 g/L) ao realizar a fermentação com os parâmetros significantes otimizados, sendo a melhor condição: taxa de agitação de 206 rpm, temperatura de 31°C e indução com  $DO_{600nm}$  1,04 UA.

Em sua dissertação de mestrado, Carvalho (2009) otimizou as condições de fermentação em biorreator para maximizar a produção de GFP em *E. coli* M15, avaliando o efeito da concentração de oxigênio dissolvido e a influência da variação da temperatura de fermentação, verificando também em qual fase de crescimento da bactéria deve ser realizada a indução da produção da proteína alvo; seu trabalho obteve os maiores valores de unidades de fluorescência em torno de 70577 UF ao induzir a produção de GFP no meio da fase exponencial de crescimento, com 40% de oxigênio dissolvido.

No trabalho desenvolvido por Aucoin e colaboradores (2006) foi investigada a produção de GFP por *E. coli* pDN-GFP, em biorreator de 20L variando a temperatura de cultivo, o ponto de indução, a duração da indução e o número de induções; obtendo a melhor produção da biomolécula ao cultivar a *E. coli* a 37°C, realizando a indução às 5 h e 9 h de cultivo, durante 30 min. Estas condições otimizadas levaram a uma produção de GFP de 273,13 mg/L, aproximadamente 5,5 vezes superior à produção observada nos cultivos não otimizados.

Empregando a *E. coli* DH5- $\alpha$ , Penna e colaboradores (2004b) avaliou a produção de GFP sob diferentes condições de crescimento, utilizando 4 variáveis de condições de cultivo em 2 níveis: (i) efeito do armazenamento do meio a 4°C antes da incubação (durante 24 h e 48 h); (ii) efeito da velocidade de agitação (100 rpm e 200 rpm); (iii) efeito da concentração de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (0,05 mM e 0,5 mM) e; (iv) densidade celular no momento de indução ( $DO_{660}$  0,01 e 0,8). Os cultivos com o armazenamento do meio durante 24 h, velocidade de agitação de 100 rpm e adição de IPTG com  $DO_{660}$  de 0,01 obtiveram o melhor resultado para a produção de GFP, com uma concentração final de 14,87 mg/L.

A expressão de proteínas heterólogas em *E. coli* pode ser realizada com a inserção de um gene num vetor plasmídico de cópias múltiplas sob o controle transcripcional de um promotor regulável, proporcionando a capacidade de "ativar" a expressão de um gene estrangeiro, variando um fator ambiental (DONOVAN;

ROBINSON; GLICK, 1996). Por exemplo, o promotor *lac*, de *E. coli*, é induzido na presença de lactose ou IPTG (NEUBAUER et al., 1992).

No presente trabalho foi estudada a bactéria *Escherichia coli* BL21(DE3) com os plasmídeos pET28(a) e pLysS que conferem resistência aos antibióticos canamicina e cloranfenicol, respectivamente. O plasmídeo pET28(a) é responsável pela produção da GFP, enquanto o pLysS é um plasmídeo utilizado para limitar o escape da expressão de proteínas; mecanismo vantajoso quando se trata de proteínas tóxicas e, para garantir a produção de proteínas heterólogas apenas após a indução, mantendo os ciclos de proliferação celular e produção distintos (BENOIT et al., 2007). Neste caso, as variáveis de cultivo utilizadas para avaliar a produção de GFP utilizando a *E. coli* BL21(DE3) foram a taxa de agitação, o tempo de indução e a concentração do composto indutor.

### **2.3 Extração de GFP utilizando Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas**

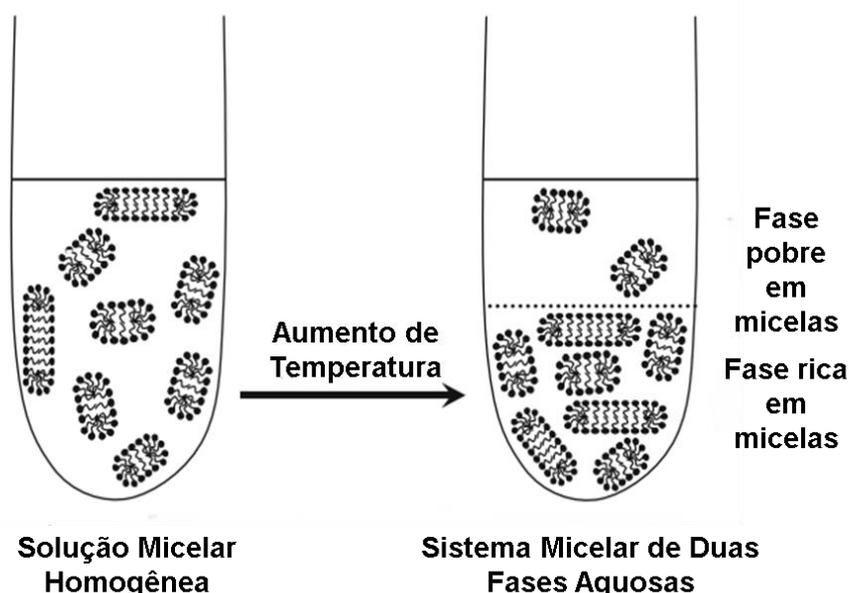
Embora a expressão de proteínas e outras biomoléculas utilizando *E. coli* seja muito vantajoso, conforme destacado nos parágrafos anteriores, os bioprodutos-alvo podem ser produzidos como formas extracelulares solúveis, formas intracelulares solúveis, como constituintes de membrana ou em corpos de inclusão. No caso particular da *E. coli*, geralmente os bioprodutos de interesse são produzidos intracelularmente, gerando a necessidade de uso de procedimentos de ruptura da célula para a recuperação da biomolécula de interesse (LOPES et al., 2011). Atualmente, vários métodos são utilizados para realizar o rompimento celular e estes são classificados como: (i) físicos mecânicos ou físicos não-mecânicos; (ii) métodos químicos; (iii) métodos biológicos com enzimas digestivas; ou a combinação de mais de uma técnica das citadas anteriormente (PENNA; ISHII, 2002).

A utilização da GFP para aplicações *in vivo* e *in vitro* conduz a uma necessidade de isolamento da proteína com altas taxas de purificação, preferencialmente superiores a 99%. Para alcançar estes elevados níveis de purificação os métodos mais empregados são os cromatográficos, os quais encarecem drasticamente os custos do processamento *downstream* (HEKMAT et al., 2015). Além da aplicação de etapas de cromatografia, a purificação da GFP pode ser realizada através de integração de processo, por exemplo, o método de *three-phase partitioning* (TPP) seguido de uma etapa cromatografia de interação

hidrofóbica (PENNA et al., 2004b). Porém, até a integração de um processo de extração com uma etapa de cromatografia resulta em baixas concentrações de GFP e apresenta ainda assim custos de processo consideráveis (MAZZOLA et al., 2006). Com objetivo de desenvolver processos de separação e purificação de baixo custo, que possibilitem altos rendimentos na etapa de *downstream* da GFP, a aplicação de processos de extração líquido-líquido utilizando sistemas duas fases aquosas (SDFA) vem sendo estudada como alternativa (JAIN; SINGH; GUPTA, 2004) .

Os SDFA são caracterizados pela formação de duas fases aquosas imiscíveis a partir da mistura em água de dois ou mais componentes, como por exemplo, sais, polímeros, líquidos iônicos, etc. Estes sistemas são uma técnica de extração líquido-líquido onde pode ocorrer um processo de concentração e extração da molécula de interesse em uma das fases do sistema (SANTOS et al., 2011), sendo que proteínas e outras biomoléculas podem se distribuir de forma desigual entre as fases. Dentre as diversas vantagens na utilização dos SDFA quando comparado com as técnicas de extração convencionais, destacam-se a sua biocompatibilidade (adequado para biomoléculas sensíveis), baixo custo, capacidade de operação contínua e facilidade de aumento de escala (IQBAL et al., 2016).

Dentre os SDFA comumente utilizados, se encontram os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), os quais são compostos por pelo menos um agente tensoativo (surfactante), oferecendo um ambiente favorável para a partição de biomoléculas e permitindo a seletividade destas de acordo com as propriedades específicas dos compostos presentes na amostra (RANGEL-YAGUI; PESSOA-JR; BLANKSCHTEIN, 2004). Os tensoativos são moléculas anfífilas que acima de sua concentração micelar crítica (CMC) formam micelas. Estas ao serem submetidas a condições específicas de temperatura se separam em duas fases aquosas líquidas e imiscíveis formando então os SMDFA. Após a separação das fases, será formada uma fase rica em micelas e outra pobre em micelas (LIU; NIKAS; BLANKSCHTEIN, 1996). Um dos tensoativos não-iônicos mais empregados em SMDFA é o Triton X-114, no qual a separação de fases é induzida pelo aumento da temperatura resultando em uma fase inferior rica em micelas e uma fase superior pobre em micelas, como apresentado na Figura 2 (KAMEI, 2001).



**Figura 2.** Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosas antes e após a separação de fases devido ao aumento de temperatura ( baseado em Lopes et al., 2013).

O fenômeno de separação das fases pode ser representado por uma curva denominada de *curva binodal* ou *curva de coexistência*, a qual apresenta concavidade para baixo quando a separação de fases é induzida pelo aumento da temperatura e concavidade para cima quando induzida pela redução da temperatura (NIKAS et al., 1992).

Bordier (1981) foi o primeiro a demonstrar a possibilidade de extração de proteínas empregando SMDFA composto por Triton X-114. O autor observou que a partição de proteínas hidrofílicas se dá predominantemente para a fase pobre em micelas enquanto que as proteínas hidrofóbicas se encontravam na fase rica em micelas. Especificamente a partição da GFP já foi estudada por Lopes e colaboradores (2011). Estes autores avaliaram diferentes concentrações de Triton X-114 e temperaturas de extração a fim de extrair GFP e remover simultaneamente lipopolissacarídeo (LPS) do meio fermentado de *E. coli*. Nesse trabalho foram realizados ensaios com GFP pura e a partir do meio fermentado, em ambos os casos a GFP migrou preferencialmente para a fase pobre em micelas enquanto o LPS para a fase rica em micelas. Wang e colaboradores (2014) avaliaram o comportamento de partição da GFP com calda de histidina em SMDFA a partir do lisado celular de *E. coli* e utilizando como tensoativo o Triton X-114 e o Triton X-114 com quelato de níquel (TX-Ni). Os resultados provaram uma forte interação entre o

TX-Ni e a GFP, sendo observados alterações no comportamento de partição, já que a GFP se concentra na fase pobre em micelas quando não há TX-Ni na composição.

Ambos os trabalhos supracitados demonstram o potencial do SMDFA para remover GFP do meio fermentado, porém, maiores rendimentos e taxas de pureza são de interesse. Sabe-se que a separação de fases e a extração de biomoléculas em SMDFA é dependente de um equilíbrio termodinâmico no sistema. A presença de sais e surfactantes iônicos pode acarretar em um desequilíbrio neste sistema gerando diferentes temperaturas de *cloud point* (temperaturas de separação das fases) e de atração das moléculas de interesse pelos componentes das fases. Dessa maneira, a adição de sais ou outras moléculas aos SMDFA pode aumentar a recuperação de biomoléculas, como realizado no trabalho de Wang e colaboradores (2014).

Nos últimos anos, têm sido reportados na literatura o emprego de LIs na formação de sistemas de duas fases aquosas (SDFA) como adjuvantes e/ou co-surfactantes em sistemas poliméricos e micelares. Os LIs são sais constituídos geralmente por um cátion orgânico associado a uma ou mais cadeias alquílicas substituintes e um ânion inorgânico (ou orgânico). Estes compostos apresentam uma grande diversidade de propriedades atrativas, como: baixos pontos de fusão; grande estabilidade térmica e química; alta condutividade térmica; baixas pressões de vapor, entre outros (DOMAŃSKA, 2006; TSENG; TSENG; CHU, 2009). No entanto, a grande vantagem da utilização de LIs reside na possibilidade de alteração de sua estrutura química e conseqüente mudança de suas propriedades físico-químicas, tais como densidade, viscosidade e solubilidade em água. Esta versatilidade confere aos LIs um adicional quando aplicados na formação de SDFA, visto que permite o controle e melhoramento da extração da molécula desejada, baseado numa seleção adequada do par iônico constituinte (FREIRE et al., 2012). Nesse sentido, na última década estudos têm vindo a demonstrar a efetividade dos SMDFA baseados em LI para a extração de diversos tipos de biomoléculas a partir de meios fermentados, como por exemplo, proteínas (VICENTE et al., 2014).

Assim, um sistema composto por tensoativos com a adição de LI pode resultar na partição preferencial da GFP para uma das fases do sistema, o que pode ser a base para um processo seletivo de extração desta biomolécula. Partindo dessas considerações, o presente trabalho propôs estudar a produção de GFP por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a) e sua posterior extração utilizando SMDFA.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de GFP utilizando a bactéria recombinante *Escherichia coli* BL21(DE3) [pET28(a); pLysS] e avaliar o uso de sistemas micelares de duas fases aquosas com líquidos iônicos (SMDFA-LIs) como adjuvantes para sua extração do lisado celular.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o crescimento bacteriano de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] em agitador rotativo;
- b) Produzir GFP a partir da fermentação de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] em agitador rotativo;
- c) Avaliar as variáveis: velocidade de agitação, concentração de indutor e tempo de indução sob a produção de GFP por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] em mesa incubadora rotativa;
- d) Produzir GFP a partir da fermentação de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] em biorreator tanque agitado;
- e) Rompimento das células de *E. coli* e liberação da GFP intracelular;
- f) Avaliar o efeito de diferentes condições de temperatura e pH na estabilidade da GFP;
- g) Determinar as melhores condições para extração da GFP a partir do sobrenadante do lisado celular utilizando SMDFA-LIs.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismo e Meio de Cultura

A cepa utilizada no presente estudo, *Escherichia coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] contendo o gene da GFP<sub>uv</sub>, foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Para o cultivo da bactéria, todos os ensaios foram realizados em meio Luria-Bertani (LB) da marca Difco™, com adição dos antibióticos canamicina e cloranfenicol (50 µg/mL, para ambos) da marca Sigma®. O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0. As fermentações ocorreram em agitador rotativo com temperatura de cultivo controlada a 30°C.

Para o início de todas as fermentações, foram preparados pré-inóculos, sendo retirada a cepa a partir de um criotubo previamente armazenado em ultrafreezer a -80°C. Assim, uma amostra deste estoque foi inserida em frascos do tipo Erlenmeyer® com volume de 500 mL, contendo 100 mL meio LB (20% (v/v)) e os antibióticos citados anteriormente. Este cultivo foi incubado em agitador rotativo durante um período de 12 h a 30°C, para promover o crescimento e adaptação do microrganismo. O crescimento celular foi determinado de acordo com a densidade óptica com leitura da absorbância a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) utilizando espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 pro UV/Vis (GE Healthcare). A DO<sub>600nm</sub> inicial de todos os inóculos foi de 0,05 Unidades de Absorbância (UA). Para a produção de GFP foi utilizada a indução com o composto IPTG, adquirido da marca Sigma®.

### 4.2 Curvas de Crescimento da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)]

As curvas de crescimento foram obtidas para determinar os tempos de início, meio e fim da fase exponencial da cepa de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)]. Assim, na primeira etapa foram obtidas as curvas de crescimento celular a 30°C nas rotações de 100, 150, 200 e 250 rpm com amostragens a cada 2 h, durante um tempo total de 24 h de cultivo. Para tal, o microrganismo foi inoculado em frascos do tipo Erlenmeyer® de 500 mL contendo 100 mL do meio LB acrescido de 50 µg/mL dos antibióticos canamicina e cloranfenicol. O crescimento celular foi avaliado por medição da densidade óptica do cultivo em espectrofotômetro Ultrospec™ 2100 pro UV/Vis (GE Healthcare®) em comprimento de onda de 600 nm

(DO<sub>600nm</sub>), ao obter valores superiores a 0,8 UA, as amostras foram diluídas e novamente analisadas pelo equipamento. As curvas de crescimento celular nas diferentes agitações foram determinadas e o respectivo tempo de indução foi definido como o meio da fase exponencial de crescimento do microrganismo.

#### **4.3 Avaliação da Produção de GFP em *E.coli* BL21(DE3) [pET28(a); pLysS]**

Visando a obtenção do melhor rendimento do processo de produção da GFP recombinante, o mesmo foi avaliado sob três diferentes parâmetros: *i*) taxa de agitação; *ii*) concentração de composto indutor (IPTG); *iii*) tempo de indução. Primeiramente, foram realizados ensaios de produção de GFP nas taxas de agitação de 100, 150, 200 e 250 rpm, sendo analisada a sua produção após indução com 0,5 mM de IPTG. A produção de GFP utilizando *E. coli* BL21 (DE3) foi realizada a 30°C durante 12 h, as amostras foram recolhidas no instante anterior à indução e, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 e 12 h após a indução. As amostras foram analisadas para obtenção da DO<sub>600nm</sub> e a concentração de GFP produzida (item 4.6). Após determinar a melhor taxa de agitação para a produção da GFP, foi avaliado o efeito da concentração do composto indutor (IPTG) e do tempo de indução, seguindo os mesmos pontos de amostragem e análises realizadas, citadas acima. Foram avaliados o efeito de três concentrações de IPTG, 0,25, 0,5 e 0,75 mM na produção de GFP, em três diferentes momentos de indução, particularmente, com indução realizada às 2, 6 e 10 h de cultivo (respectivamente, o início, meio e fim da fase exponencial de crescimento bacteriano). Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrão determinados.

#### **4.4 Determinação da concentração de IPTG mínima para indução da produção de GFP**

Após os ensaios descritos no item 4.3, foram realizados cultivos da *E. coli* BL21 a 150 rpm e 30°C, sendo efetuada a indução da produção de GFP após 6 h e 10 h de cultivo com as seguintes concentrações de IPTG (mM): 0; 0,125; 0,25. A produção de GFP foi avaliada a cada 2 h, durante 20 h de cultivo total, por análise da concentração de GFP, conforme descrito abaixo no item 4.6.

#### 4.5 Produção de GFP em biorreator

A produção de GFP por *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] em biorreator foi realizada em biorreator Minifors 2 (INFORS-HT) com dorna de 5 L. Assim, o biorreator foi preenchido com 3,8 L de meio de cultivo e 0,2 L de inóculo, sendo o cultivo realizado a uma velocidade de agitação de 200 rpm e aeração de 2 vvm (volume de ar/volume de meio). Não foi realizado o controle de pH durante o processo, iniciando-se a fermentação com pH 7. O cultivo foi induzido com 0,125 mM de IPTG após 6 h de fermentação. Os experimentos foram conduzidos durante 25 horas, a 30°C, com amostragens nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 23, 24 e 25 h de cultivo, para análise de DO<sub>600nm</sub> e concentração de GFP produzida (item 4.6).

#### 4.6 Quantificação da GFP para fermentações

A concentração de GFP produzida durante as fermentações foi determinada por análise indireta de fluorescência das células de *E. coli* ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em um comprimento de onda de excitação em 395 nm e emissão em 510 nm utilizando o leitor de microplacas (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®). A concentração de GFP (mg/L) foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente determinada (Apêndice A), utilizando o Kit de Quantificação de GFP da marca BioVision.

#### 4.7 Rompimento Celular de *E. coli* BL21

As células de *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] obtidas após 22 h de cultivo a 150 rpm e 30°C e com indução realizada ao fim de 6 h de cultivo com 0,25 mM de IPTG, foram recuperadas para realização dos ensaios posteriores de rompimento celular, estabilidade e extração da GFP. Desse modo, após o cultivo, 40mL de suspensões celulares de *E. coli* BL21 foram centrifugadas em tubos de centrífuga com capacidade de 50mL a 5000 xg durante 20 min a 4°C, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* de células foi homogeneizado em 20 mL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). O homogenato celular foi submetido a um processo de rompimento celular aplicando diferentes ciclos de congelamento/descongelamento. O congelamento do homogenato celular foi realizado em freezer a -20°C durante 24 h. Após este período, os tubos foram então descongelados em banho termostatizado a 40°C durante um período de 3 h.

Para o rompimento total das células de *E. coli* e consequente liberação de GFP para o meio extracelular, foram realizados 4 ciclos de congelamento/descongelamento. A análise da eficiência do processo de ruptura celular foi realizada em cada ciclo. Para tal, amostras de 1 mL foram retiradas a cada ciclo e centrifugadas a 5000 xg durante 20 min a 4°C. O sobrenadante do lisado celular foi separado dos *debris* celulares, e a eficiência da técnica de rompimento avaliada pela quantificação de GFP presente no sobrenadante conforme descrito na seção 4.6.

#### **4.8 Avaliação da Estabilidade da GFP**

Os testes de estabilidade da GFP foram realizados utilizando o sobrenadante do lisado celular (item 4.7), obtido após o rompimento celular e remoção dos *debris* celulares por centrifugação. Para tal, foram preparadas soluções tampão com valores de pH variáveis de 3 a 12. As soluções tampões para pHs de 3 a 7 foram preparadas com Tampão McIlvaine e as soluções de pH 7 a 12 foram preparadas com Tampão Fosfato 50 mM (MORITA, 1968). Em seguida, em tubos de ensaio de 10 mL, foram adicionadas as alíquotas da amostra e tampão (na proporção de 0,05 mL de sobrenadante para 4,95 mL de tampão). As soluções de GFP a diferentes pHs foram então mantidas a temperatura ambiente, sendo retiradas alíquotas após 0, 1 e 2 h de exposição, para determinar a estabilidade do cromóforo da GFP, por determinação de sua fluorescência relativa. Após avaliar a estabilidade da GFP em diferentes pHs, foi estudado o efeito da temperatura na fluorescência da GFP. Assim, três soluções aquosas de GFP nos pHs de 6, 8 e 11 foram então mantidas a 25°, 37° e 50°C em banho termostaticado SOLAB. Foi avaliada a variação da fluorescência relativa da GFP durante 2 horas de exposição, com amostragens a cada meia hora. Neste ensaio de estabilidade da GFP, as análises de fluorescência foram realizadas o item 4.10.

#### **4.9 Extração de GFP utilizando SMDFA-LIs**

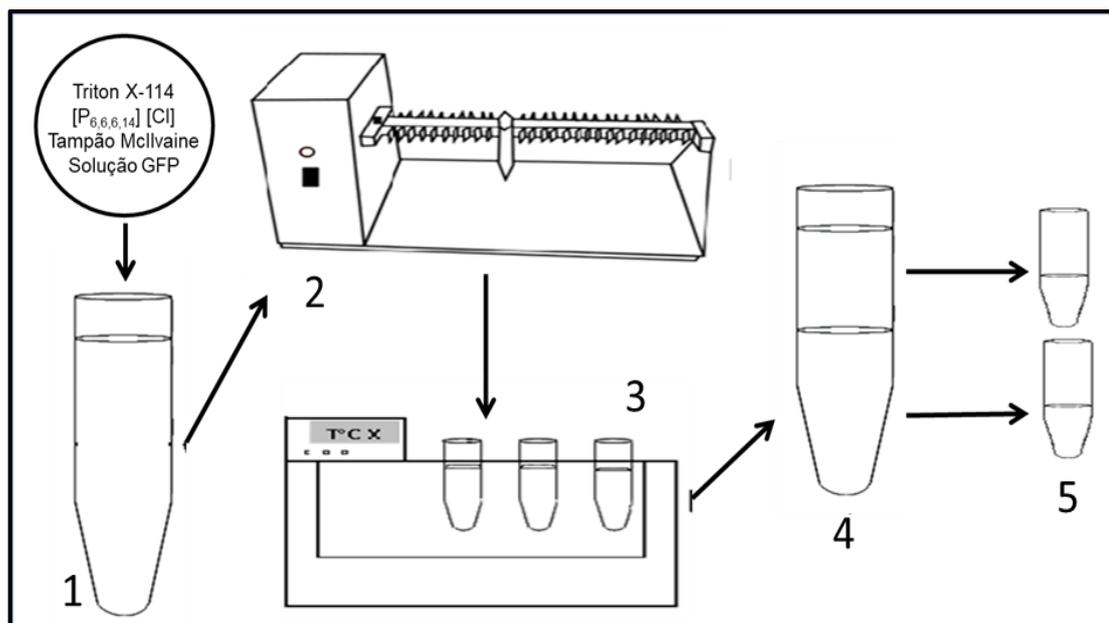
Os SMDFA foram preparados em tubos de vidro graduados de 15 mL, por meio da adição por pesagem do surfactante (1,1,3,3-Tetrametilbutil)fenil-polietileno glicol (Triton X-114) obtido da Sigma® e do líquido iônico, cloreto de trihexyl(tetradecil)fosfônio ([P<sub>6,6,6,14</sub>]Cl) fornecido pela CYTEC®, tampão McIlvaine

(pH 7,0) e a solução contendo GFP (recuperada após processo de rompimento celular). Seis sistemas foram preparados, em triplicata, com uma massa total de 10 g, de acordo com composições apresentadas na Tabela 1. Para todos os sistemas foi preparado um sistema branco onde a solução de GFP foi substituída por solução de tampão. Este foi utilizado para eliminar interferências na quantificação da GFP, e, posteriormente, nos respectivos coeficientes de partição.

**Tabela 1.** Composição dos ensaios realizados para analisar a partição de GFP presente no lisado celular utilizando SMDFA.

Sistema	Triton X-114 (% m/m)	[P <sub>66614</sub> ]Cl (% m/m)	Tampão McIlvaine pH 7,0 (% m/m)	Lisado celular (% m/m)
1	2,5	0,5	97,0	10
2	5,0	0,5	94,5	10
3	7,5	0,5	92,0	10
4	2,5	-	97,5	10
5	5,0	-	95,0	10
6	7,5	-	92,5	10

Após a adição dos componentes, os tubos foram homogeneizados em agitador orbital a 8 rpm durante 1 h. Após essa etapa, os tubos foram transferidos para um banho termostatizado SOLAB®, com temperatura de 40°C, e deixados em repouso durante 12 h para permitir a separação das fases e completa partição da GFP. Após a separação, os volumes das fases de topo e fundo foram aferidos e as fases cuidadosamente separadas com o auxílio de seringas e agulhas, conforme ilustrado na Figura 3.



**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 termostatzado a  $40^{\circ}C$ , durante 12 h. 4- Tubo contendo sistema bifásico. 5- Tubos contendo as fases topo e fundo do SMDFA já separada ((SANTOS-EBINUMA, 2009).

A concentração de GFP em cada uma das fases foi determinada diretamente conforme descrito no item 4.10. Com a finalidade de analisar a extração da GFP nos sistemas estudados, os resultados obtidos foram avaliados segundo o coeficiente de partição da GFP ( $K_{GFP}$ ) e a recuperação da GFP ( $R(\%)_{GFP}$ ), os quais foram calculados segundo as equações 1 e 2 descritas abaixo:

$$K_{GFP} = \frac{[GFP]_{FR}}{[GFP]_{FP}} \quad (\text{equação 1})$$

Em que,  $[GFP]_{FR}$  e  $[GFP]_{FP}$  correspondem as concentrações (mg/L) da GFP na fase rica (inferior) e na fase pobre (superior) em micelas, respectivamente.

$$R(\%)_{FASE\ TOPO} = \frac{[GFP]_{FT} \cdot V_{FT}}{[GFP]_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (\text{equação 2})$$

$$R(\%)_{FASE\ FUNDO} = \frac{[GFP]_{FF} \cdot V_{FF}}{[GFP]_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (\text{equação 3})$$

Em que,  $[GFP]_{FT}$  corresponde a concentração de GFP na fase topo do sistema,  $[GFP]_{FF}$  corresponde a concentração de GFP na fase fundo do sistema,  $V_{FT}$  corresponde ao volume da fase topo,  $V_{FF}$  corresponde ao volume da fase fundo

$[GFP]_i$  corresponde a concentração inicial de GFP presente no sistema e  $V_i$  corresponde ao volume total do sistema.

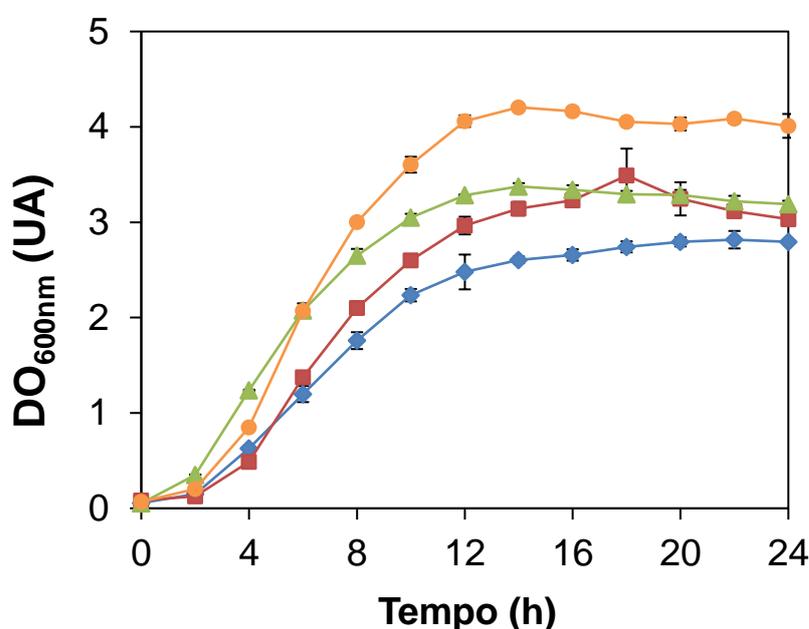
#### **4.10 Quantificação da GFP após lise celular**

A quantidade de GFP no lisado celular foi determinada por análise de fluorescência para um comprimento de onda de excitação em 488 nm e emissão em 510 nm utilizando o espectrofluorofotômetro RF-6000 (SHIMADZU®). A concentração de GFP (mg/L) foi determinada utilizando uma curva de calibração previamente determinada (Apêndice B), utilizando o Kit de Quantificação de GFP da marca BioVision®.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Crescimento celular da bactéria *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)]

Inicialmente, com objetivo de obter as condições nas quais a bactéria *E. coli* BL21 (DE3) [pLysS; pET28(a)] apresenta as maiores taxas de crescimento, foi avaliado o padrão de seu crescimento perante quatro taxas de agitação (100 , 150 , 200 e 250 rpm) a 30°C sob condições aeróbias (Figura 4). Importa referir, que todos os cultivos foram iniciados com uma  $DO_{600nm}$  de, aproximadamente, 0,05 UA para que no início da fermentação existisse aproximadamente a mesma quantidade de células.



**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.

Conforme apresentado na Figura 4, foi observado um perfil de crescimento semelhante para a bactéria em todas as taxas de agitação em estudo, embora, os valores de crescimento máximo da *E. coli* tenham sido diferentes. Os maiores valores de crescimento foram obtidos numa rotação de 250 rpm, com uma  $DO_{600nm}$ , aproximadamente, de 4,2 UA. Conforme esperado, a diminuição da agitação conduziu a taxas menores de crescimento, sendo obtidos para as rotações de 200 rpm e 150 rpm, valores de  $DO_{600nm}$  cerca de 3,4 UA, e para a rotação de 100 rpm uma  $DO_{600nm}$  de 2,8 UA.

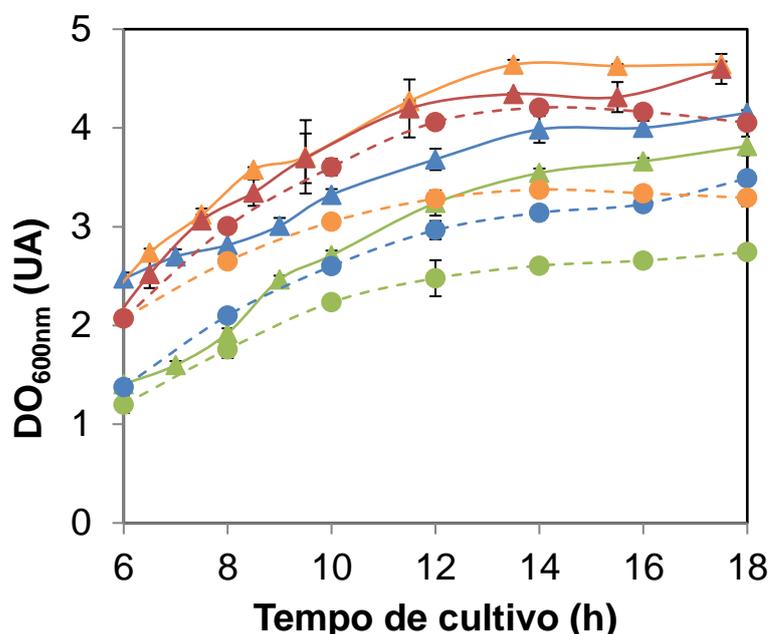
Pela análise das curvas de crescimento, foi também possível aferir para cada rotação os tempos de início e fim da fase exponencial de crescimento da *E. coli*. Aproximadamente, o início da fase exponencial sob as condições de agitação estudadas foi observado no tempo de 2 h. Por outro lado, o fim da fase exponencial para rotações de 100 e 150 rpm foi atingido no tempo de 12 h, enquanto que sob condições de maior agitação, 200 e 250 rpm, o final da fase exponencial foi antecipado, tendo a *E. coli* atingido máximos de  $DO_{600nm}$  após 11 h de cultivo a 30°C.

No estudo realizado por Robichon e colaboradores (2011) a curva de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) em meio LB, com temperatura de cultivo de 30°C apresentou uma fase de adaptação inferior a 1 h, ao atingir a fase exponencial a bactéria foi capaz de alcançar  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 5 UA. Larentis e colaboradores (2014) avaliaram o crescimento de *E. coli* BL21(DE3) em meio TB (composto por extrato de levedura, triptona,  $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ , com pH 7,2), com adição de 1% (m/m) de glicose e 0,4 % (m/m) de glicerol, com taxa de agitação em agitador rotativo de 200 rpm, em diferentes temperaturas de crescimento, 28°C e 37°C. O cultivo a 28°C apresentou uma fase *lag* ligeiramente superior e se manteve na fase *log* por mais tempo. Apesar deste atraso em relação ao cultivo de 37°C, o cultivo de 28°C permitiu obter os mesmos valores de  $DO_{600nm}$ , aproximadamente 4,5 UA, valores próximos aos observados para o cultivo com agitação de 250 rpm neste presente estudo.

## 5.2 Efeito da agitação na produção de GFP

Após a determinação da fase exponencial para cada condição de crescimento bacteriano, e com objetivo de determinar a melhor condição de agitação na produção da GFP, foram preparados novos cultivos nas mesmas condições de agitação estudadas anteriormente. Cada cultivo foi então incubado a 30°C e a produção de GFP realizada por adição do composto indutor (IPTG) numa concentração de 0,5 mM no tempo referente à metade da respectiva fase exponencial para cada taxa de agitação analisada. Assim, os cultivos com agitação de 100 e 150 rpm foram induzidos com 6 h de fermentação e os cultivos com agitação de 200 e 250 rpm foram induzidos com 5 h e 30 min de fermentação. No momento imediatamente anterior à indução, e durante as 12 horas seguintes (de 1

em 1 h) foram retiradas alíquotas para determinar a curva de crescimento bacteriano e a produção da GFP, conforme apresentado nas Figuras 5 e 6, respectivamente.



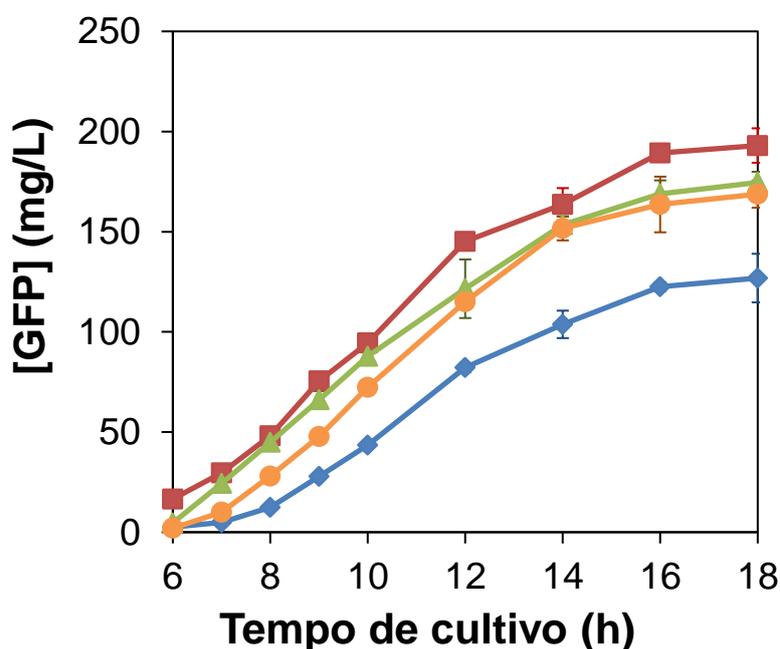
**Figura 5.** Curva de crescimento microbiano da bactéria *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)], induzida com 0,5 mM de IPTG, a 30°C, sob diferentes agitações (rpm): linha contínua (-▲-) 100; (-▲-) 150; (-▲-) 200; (-▲-) 250 e, sem indução, sob diferentes agitações: linha tracejada (-●-) 100; (-●-) 150; (-●-) 200; (-●-) 250. As curvas de crescimento correspondem à média de 3 ensaios independentes com o respectivo desvio padrão.

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que a *E. coli* BL21 apresenta após a indução um perfil de crescimento celular semelhante ao observado no cultivo sem indução. Esta evidência contrasta com estudos anteriores reportados na literatura que mostraram uma queda no padrão do crescimento celular de *E. coli* BL21(DE3) com a adição do IPTG (OMOYA et al., 2004; WYRE; OVERTON, 2014). A manutenção da cinética de crescimento celular será discutida com maior detalhe posteriormente quando se avaliar o efeito da concentração de IPTG na produção de GFP (seção 5.3 e 5.4).

Apesar da similaridade do perfil cinético do crescimento bacteriano, com e sem indução, a análise da Figura 5, permite verificar que o crescimento da *E. coli* varia de acordo com a agitação empregada, o que pode estar relacionado com a aeração do meio de cultivo (maior agitação proporciona uma maior aeração do meio de cultivo). Os resultados mostram que após a indução de IPTG as menores taxas de crescimento foram obtidas a 100 rpm, com uma DO<sub>600nm</sub> aproximadamente de 3,8 UA. Este resultado confirma a menor taxa de crescimento para o cultivo sem a adição de IPTG, onde a DO<sub>600nm</sub> máxima foi de 2,7 UA. No entanto, em condições de

agitação superiores, 150, 200 e 250 rpm, as taxas de crescimento bacteriano foram muito semelhantes entre si, e ao longo de todo o processo de incubação. Porém, quando comparadas com o cultivo na presença do IPTG, estas apresentaram um maior valor de  $DO_{600nm}$ .

Apesar das diferenças em termos de perfis cinéticos de crescimento celular, esta primeira etapa teve como objetivo avaliar se as diferentes taxas de agitação impactavam na produção da GFP (Figura 6), verificando se a produção total de GFP pode ser incrementada por um simples controle de agitação.



**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.

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram que a produção de GFP é dependente da condição de agitação sob a qual a bactéria é incubada. Os dados mostram que a concentração de GFP aumenta de acordo com a seguinte tendência de agitação: 100 rpm < 250 rpm < 200 rpm < 150 rpm. Assim, é evidente que um pequeno aumento da agitação favorece a produção da GFP (de 100 para 150 rpm), no entanto, para taxas de agitação superiores o aumento da agitação causa uma redução da produção de GFP. Assim, independentemente do tempo de cultivo, a maior produção ocorre nos cultivos realizados a 150 rpm, seguida de 200 rpm e depois 250 rpm. Os resultados obtidos mostram que 12 h após a indução com IPTG

a GFP produzida variou entre 127 e 193 mg/L, respectivamente, para 100 rpm e 150 rpm.

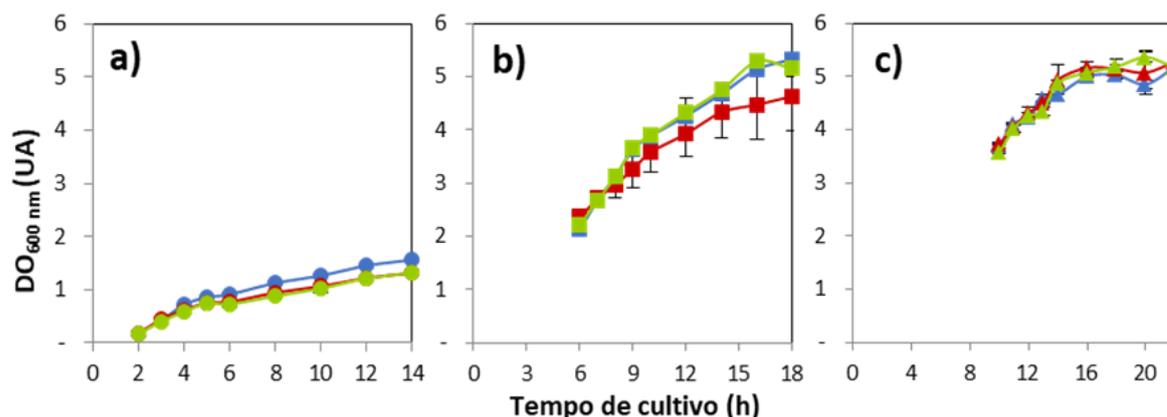
Apesar da produção de GFP estar intimamente ligada à quantidade de células presente no cultivo, como já demonstrado em diversos trabalhos (AUCOIN et al., 2006; WYRE; OVERTON, 2014), a  $DO_{600nm}$  obtida nos cultivos de 200 e 250 rpm foi maior que a  $DO_{600nm}$  para o cultivo de 150 rpm, porém a produção de GFP foi favorecida ao utilizar a taxa de agitação menor. Embora pareça que essa redução dos índices de produção de GFP por *E. coli* em altas taxas de agitação seja algo inesperado, esse comportamento já foi anteriormente reportado (KAO et al., 2007). Chew e colaboradores (2012) observaram que a otimização da taxa de agitação durante o processo de cultivo oferece melhores taxas de transferência de massa e calor, permitindo uma maior dissolução da concentração de oxigênio no meio de cultivo e conseqüentemente no crescimento da *E. coli* e produção da GFP. No entanto, foi ressaltado que taxas de agitação superiores aos níveis ótimos, podem ter um efeito negativo devido ao *stress* provocado pelas taxas de cisalhamento elevadas no crescimento celular. Por outro lado, é importante ressaltar que a diminuição das taxas de agitação do cultivo, provoca uma queda no metabolismo celular, favorecendo diretamente o correto enovelamento das proteínas produzidas pela bactéria (GEORGIU; VALAX, 1996). Este favorecimento pode justificar as melhores taxas de produção obtidas a 150 rpm em comparação com as produtividades em maiores concentrações celulares (taxas de 200 e 250 rpm).

Os resultados da Figura 6 demonstram a significância da taxa de agitação, conseqüentemente da aeração, na produção de GFP. No entanto, e de acordo com trabalhos anteriores, (BENOIT et al., 2007; PENNA et al., 2004a) é evidente que outras variáveis de processo, como por exemplo, temperatura de cultivo, pH inicial, concentração de IPTG, tempo de indução e densidade do inóculo, podem ser significantes para a produção da proteína de interesse. Desse modo, no seguimento do trabalho foram avaliadas a influência de concentração de indutor e momento de indução na produção da GFP.

### **5.3 Efeito da concentração de indutor e tempo de indução na produção de GFP**

Após o estudo inicial para se definir a melhor condição de agitação, 150 rpm, foram realizados uma série de experimentos com objetivo de estudar o efeito de duas variáveis importantes do processo: concentração de indutor e tempo no qual é

efetuada a indução da produção. Para tal, foram testadas três concentrações de composto indutor (0,25, 0,50 e 0,75 mM) e avaliado o efeito da adição do IPTG no início, meio e final da fase exponencial de crescimento microbiano. Os resultados da média de três ensaios independentes (e respectivos desvios padrões) para o crescimento celular ( $DO_{600nm}$ ) e a produção de GFP nas várias condições testadas estão apresentados nas Figuras 7 e 8, respectivamente.



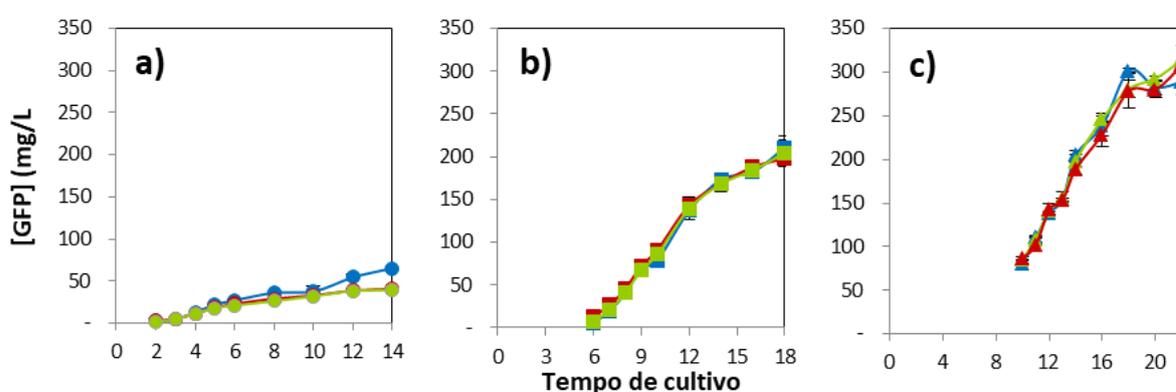
**Figura 7.** Cinética de crescimento microbiano (a) a 30°C da *E. coli* BL21(DE3) [plysS; pET28(a)], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): **a)** (-●-) 2 / 0,25; (-●-) 2 / 0,50; (-●-) 2 / 0,75; **b)** (-■-) 6 / 0,25; (-■-) 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.

A Figura 7 mostra que a concentração de composto indutor não altera a cinética de crescimento bacteriano. Por outro lado, os dados da Figura 7 mostram que o momento no qual é realizada a indução é muito significativo, visto que quando a mesma é realizada no início da fase exponencial, devido à baixa densidade celular, ocorre uma inibição do crescimento após a adição do composto indutor. O mesmo comportamento foi anteriormente reportado por Omya e colaboradores, 2004, onde foi verificado a inibição da produção da proteína-alvo para uma indução por IPTG para uma  $DO_{600nm}$  inicial de 0,5. Nesse caso, o *stress* metabólico imposto às células para a produção de proteínas recombinantes prejudica a cinética de crescimento microbiano; 12 h após a indução no início da fase exponencial a  $DO_{600nm}$  máxima foi de, aproximadamente, 1,5 UA.

No entanto, quando a indução é realizada no meio ou fim da fase exponencial, as taxas de crescimento celular são similares e bastante superiores às obtidas sem adição de IPTG. Em ambos os casos, 12 h após a indução, foram obtidas densidades celulares de, aproximadamente, 5,1 UA, quando na ausência de

IPTG (Figura 5) os valores máximos de  $DO_{600nm}$  foram apenas de 3,2 UA. Embora o aumento da concentração celular não seja esperado, alguns autores já reportaram que a adição do indutor pode não alterar o ciclo de crescimento celular bacteriano (CHEW et al., 2012; PENNA et al., 2004a), também deve-se ressaltar que os cultivos foram realizados em datas diferentes, o que pode eventualmente ocasionar em algumas variações no comportamento das culturas, devido ao armazenamento da cepa, umidade do ambiente, armazenamento do meio, etc.

Os resultados de produção de GFP, apresentados na Figura 8, mostram que a adição de 0,25, 0,50 ou 0,75 mM de IPTG, não altera a  $DO_{600nm}$  do cultivo e a produção de proteína recombinante. O efeito insignificante da concentração do composto indutor na produção de GFP é muito interessante, visto que o custo elevado do IPTG é um dos fatores limitantes do processo. Esses resultados, vão de encontro ao que foi anteriormente observado por Chew e colaboradores (2012), onde foi relatado que a não significância da concentração de IPTG na produção da proteína. Nesse caso, as variáveis significantes para produção de GFP foram a taxa de agitação, a temperatura do cultivo e o tempo de indução. Nesse sentido, considerando que a redução da concentração de composto indutor não altera a cinética de crescimento microbiano e a produção de GFP, de forma a determinar a concentração mínima de indutor necessária para se obter índices da proteína alvo significativos, na seção 5.4, será realizado um estudo mais aprofundado desta variável.



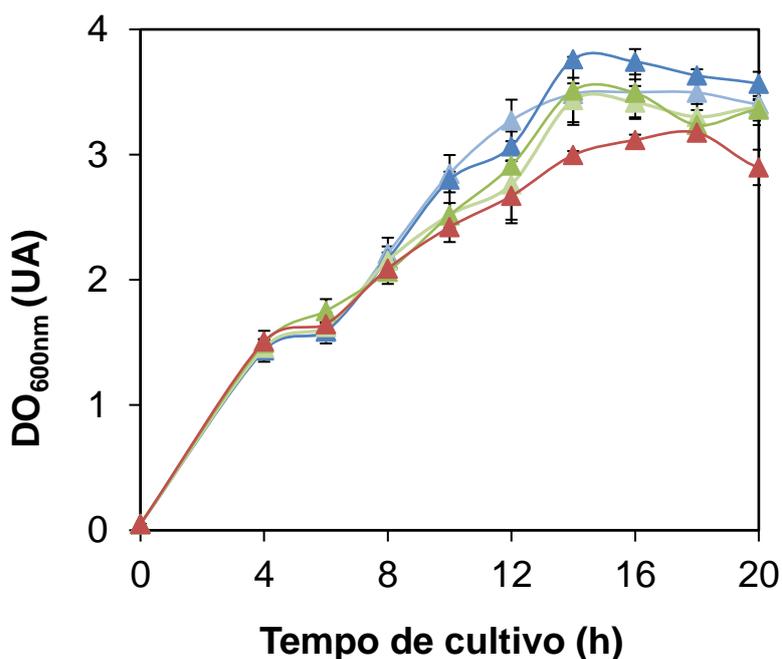
**Figura 8.** Concentração de GFP (mg/L) produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28], a 30°C e 150 rpm, após indução com IPTG nas seguintes condições (tempo de indução (h) / concentração de indutor (mM IPTG)): **a)** (-●-) 2 / 0,25; (-●-) 2 / 0,50; (-●-) 2 / 0,75; **b)** (-■-) 6 / 0,25; (-■-) 6 / 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.

Por outro lado, os resultados relativos ao momento de adição do indutor são bastante diferentes, demonstrando que é muito importante a definição do tempo no qual é realizada a indução, tanto no controle do crescimento bacteriano, como na obtenção de índices de produção satisfatórios. Similarmente ao observado para o crescimento microbiano, os dados da Figura 8 mostram a adição do composto indutor 2 h após o início do cultivo não favorece a produção de GFP, visto que a baixa densidade celular levou a uma menor produção de GFP, na ordem dos 60,35 mg/L. Quando a indução foi realizada no meio da fase exponencial, o meio de cultivo já apresenta uma maior quantidade de células ( $DO_{600nm}$  inicial de cerca de 2,3 UA), e nesse caso, a produção 12 h após a indução (18 h de cultivo) atingiu uma concentração de 205 mg/L. Embora esse aumento significativo tenha sido observado para indução no meio da exponencial, as maiores concentrações de GFP foram obtidas quando a indução foi efetuada no fim da fase exponencial ( $DO_{600nm}$  de 3,5 UA). Nesse caso, indiferente da concentração de indutor adicionado, 12 h após a indução foram atingidos valores máximos de produção de 314 mg/L de GFP recombinante.

Apesar da produção de GFP ter sido superior com indução no fim da fase exponencial, não foi observado para a indução no meio da exponencial a estabilização da produção, sugerindo que um aumento no tempo total de cultivo pode conduzir a índices de produtividade idênticos ou superiores. Desse modo, como relatado anteriormente, é importante referir que a indução tardia da produção de proteínas recombinantes pode estimular a produção e atividade de proteases (WYRE; OVERTON, 2014), o que pode não só diminuir o rendimento de produção da GFP, mas também aumentar o número de contaminantes presentes na amostra, dificultando e encarecendo as etapas posteriores de purificação. Estas evidências foram verificadas anteriormente por Carvalho (2009), um estudo onde foi avaliado o efeito de induções no início, meio e fim da fase exponencial, pela coleta de amostras para realização de *Western Blotting* após 6 e 21 h de indução. Os resultados obtidos por este autor mostraram a presença de uma banda de GFP maior e mais fluorescente com a indução realizada no meio da fase exponencial, comprovando a maior eficiência e seletividade do processo de produção de GFP quando esse é induzido a meio da fase exponencial.

#### 5.4 Determinação da concentração mínima de IPTG para indução da produção de GFP

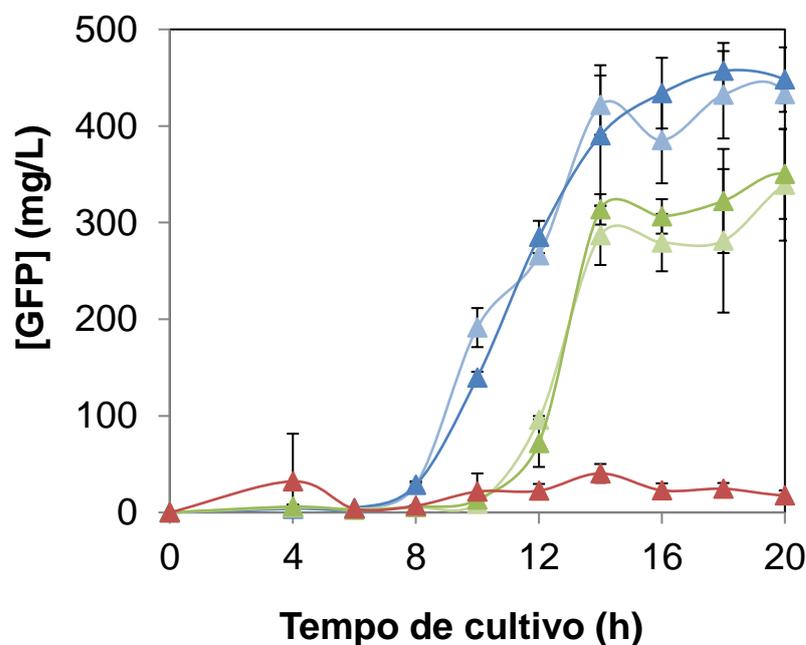
Para estudar com maior detalhe o efeito da variação de IPTG na produção de GFP por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] foram realizados cultivos com menores concentrações de IPTG (0, 0,125 e 0,25 mM), sendo estas comparadas ao cultivo na ausência do composto indutor. Todos os cultivos foram avaliados para uma indução no tempo de 6 e 10 h após o início do cultivo (correspondendo respectivamente ao meio e fim da fase exponencial). Para avaliar o crescimento foram realizadas amostragens no início da incubação, e a partir da quarta hora de cultivo, tendo sido retirados amostras de 2 em 2 h até a um tempo total de 20 h de cultivo. Estas amostras foram analisadas perante a  $DO_{600nm}$  e concentração de GFP, com os resultados apresentados nas Figuras 9 e 10, respectivamente.



**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.

Os resultados da Figura 9 mostram que a adição de diferentes concentrações de IPTG não afetam o crescimento celular da *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)], tendo sido obtido um perfil de crescimento semelhante ao cultivo bacteriano sem composto indutor. Estes resultados estão assim de acordo com o

mostrado na seção anterior, demonstrando que no nosso caso, o IPTG não afeta significativamente o crescimento celular. No entanto, a questão que se coloca é como os índices produtivos são afetados pela concentração do composto indutor, particularmente, quando a concentração de células é, aproximadamente, a mesma.



**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.

Conforme apresentado na Figura 10, pode-se notar que mesmo sem indução as células de *E. coli* BL21 apresentam uma pequena capacidade para produzir GFP, o que pode caracterizar escape de expressão. No processo de produção com adição de 0,25 mM ou 0,125 mM de IPTG a proteína alvo foi produzida sem variações na sua concentração. No entanto, é importante notar que a produção de GFP foi dependente do momento em que ocorreu a indução, sendo observado que ao induzir o cultivo com 6 h (meio da fase exponencial) ocorre uma maior produção da proteína-alvo, fato que já havia sido reportado por Carvalho, 2009. Considerando estas evidências, os ensaios posteriores de recuperação e extração da GFP foram realizados com GFP obtida de um lote de *E. coli* incubada a 30°C e 150 rpm após 20 h totais de cultivo. Neste cultivo a indução da expressão da proteína foi realizada com a 0,125 mM IPTG após 6 h de incubação (meio da fase exponencial). No entanto, é importante realçar que os resultados obtidos sugerem que a adição de

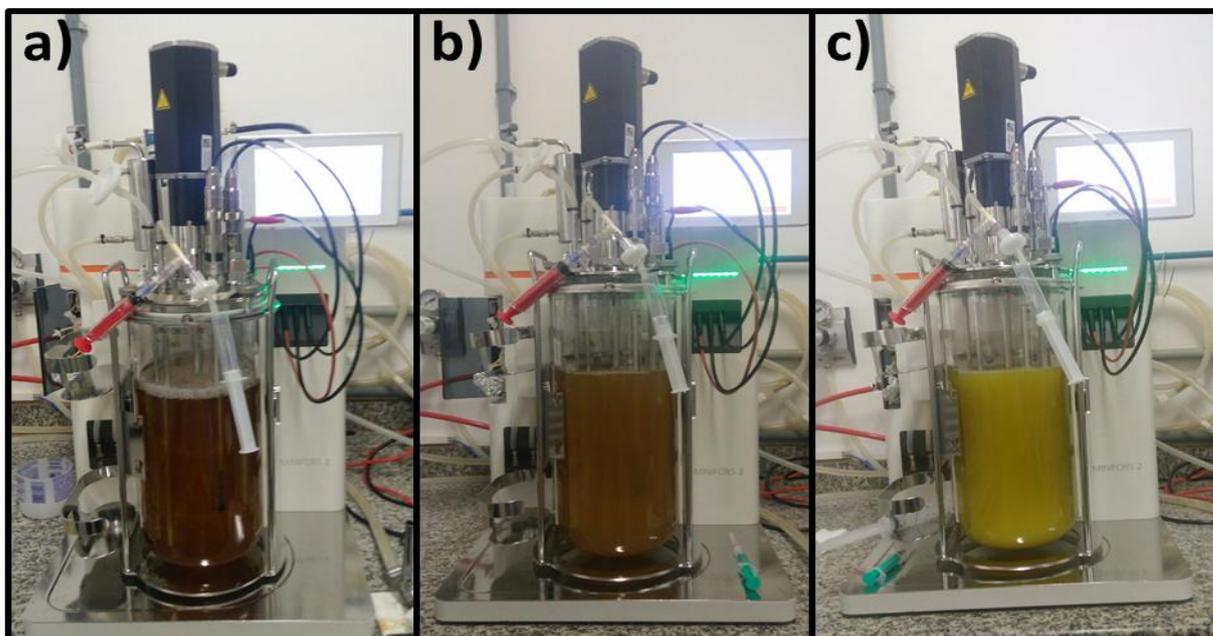
menores concentrações de IPTG podem ainda obter índices satisfatórios de produção. Nesse caso, devem ser realizados ensaios posteriores para determinar a concentração mínima de IPTG necessária para se obter altos índices de produção de GFP, visto que como mostrado na Figura 10, a concentração de indutor exerce pouca influência na produção de GFP.

De acordo com os resultados anteriores, e considerando que mesmo em baixas concentrações de IPTG (0,125 mM) ocorrem altas taxas de produção de GFP, ocorreu a incerteza sobre a correta inserção dos plasmídeos pLysS e pET28(a) na bactéria, visto que o pLysS é um plasmídeo que impede o vazamento de expressão (BENOIT et al., 2007; SØRENSEN; MORTENSEN, 2005; SOUNDRARAJAN et al., 2016). Assim, para validar o sistema de heterólogo de expressão em estudo, foi realizado o sequenciamento do DNA plasmidial do microrganismo pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielli Biscaro Pedrolli do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFar-UNESP. O sequenciamento de DNA foi realizado no equipamento ABI PRISM® 3130 *Genetic Analyzer*, e as sequências geradas analisadas pelo *Sequence Scanner Software 2.0* e comparadas no software *SerialCloner 2.6.1*. Os resultados gerados pela análise demonstraram a efetiva presença das sequências correspondentes aos plasmídeos pLysS e pET28(a) na bactéria em estudo. Desse modo, os resultados apresentados na Figura 10, confirmam que a produção de GFP só ocorre após a indução por IPTG, sendo o plasmídeo pET28(a) responsável por produzir a proteína alvo e o plasmídeo pLysS responsável pelo controle do escape da produção de proteínas, neste caso, a GFP.

### **5.5 Produção de GFP por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pEt29(a)] em Biorreator**

Após definir as melhores condições de crescimento em mesa incubadora rotativa, e tendo em vista um aumento da escala de produção da GFP, foi realizada uma produção em biorreator, cuja imagem do início, meio e fim do processo estão representadas pela Figura 11. O biorreator tanque agitado operou em modo batelada, com agitação de 200 rpm, aeração de 2 vvm. A velocidade de agitação e a aeração foram estabelecidos de acordo com protocolos reportados em literatura para este tipo de ensaio em biorreator (AUCOIN et al., 2006; CARVALHO, 2009; CHEW et al., 2012; WYRE; OVERTON, 2014), o tempo de indução e a concentração

de composto indutor foram utilizadas segundo o estudo realizado neste trabalho, para fermentação em agitador rotativo.

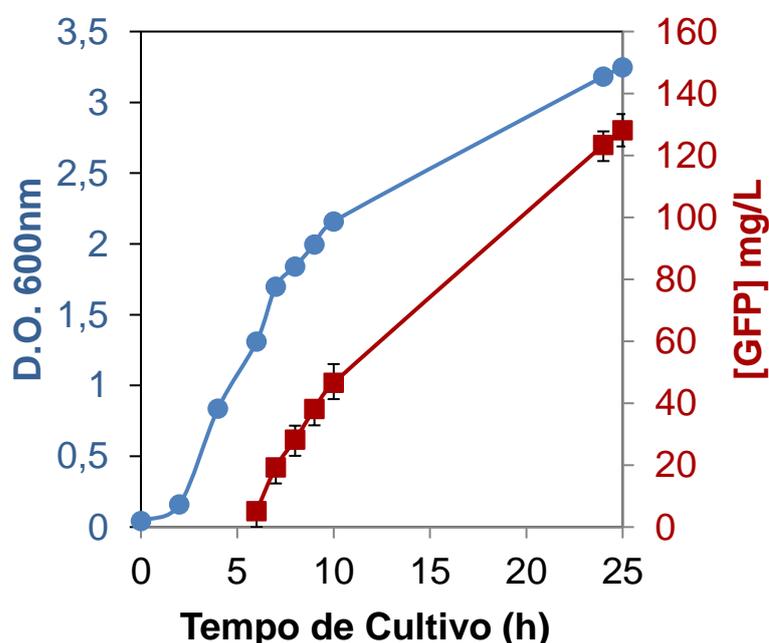


**Figura 11.** Fotos do biorreator MINIFORS 2 com cultivo de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] em: **a)** início do cultivo; **b)** momento da indução (6h de fermentação) e **c)** final da fermentação (25h de fermentação).

Na Figura 11 é ilustrado o aspecto visual do biorreator em diferentes momentos de seu cultivo. Assim, a Figura 11 a) retrata o momento de início de cultivo em biorreator, no qual o meio de cultivo se apresenta ainda relativamente translúcido, visto que tem uma pequena quantidade de células em seu interior. Por outro lado, a Figura 11 b) é relativa ao momento em que foi realizada o processo de indução, quando o cultivo apresenta já uma quantidade significativa de células, visível pela turbidez do reator, no entanto, ainda sem produção visível de GFP (aspecto esverdeado). Por fim, na Figura 11 c), onde está apresentado o momento final do cultivo (25 h), é possível notar a evidente mudança de coloração do meio de uma tonalidade marrom para um amarelo esverdeado, confirmando a presença de GFP no final do cultivo.

A análise da fermentação foi monitorada por determinação dos parâmetros de crescimento celular e concentração de GFP. O crescimento bacteriano ( $DO_{600nm}$ ) do cultivo foi monitorado desde o início da fermentação, até sua conclusão nos tempos de 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 24 e 25 h de cultivo. A produção de GFP foi avaliada desde o momento anterior à indução (6 h de cultivo) e depois nos tempos de 7, 8, 9, 10, 24

e 25 h. Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho são exibidos na Figura 12. Para o experimento realizado nesta etapa do trabalho, é importante ressaltar que os parâmetros de agitação e tempo de indução, anteriormente avaliados para uma produção máxima de GFP não são válidos para a utilização em biorreator, visto que o processo de cultivo é distinto, particularmente, no modo em que é realizada a homogeneização do meio e, principalmente, a aeração do cultivo. Dessa forma, o perfil da curva de crescimento bacteriano poderá ser alterado e conseqüentemente, os tempos de suas fases de crescimento.



**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 e indução com 6h de cultivo. Os resultados correspondem à média de 3 amostras com respectivo desvio padrão.

Analisando os resultados apresentados na Figura 12, é possível observar a similaridade do perfil das curvas de  $DO_{600nm}$  e de concentração de GFP produzida, o que indica que a produção de GFP é diretamente proporcional à concentração celular do cultivo, como já foi descrito por outros autores (AUCOIN et al., 2006; CHEW et al., 2012; WYRE; OVERTON, 2014). Os resultados também ilustram que a  $DO_{600nm}$  do cultivo realizado em biorreator atingiu valores máximos de 3,24 UA, valores menores do que o observado em agitador rotativo. Estes valores são da mesma ordem de grandeza do cultivo realizado em agitador rotativo, mas é importante destacar, que é possível favorecer o crescimento celular em biorreator com o ajuste apropriado dos parâmetros do bioprocesso. A produção de GFP após

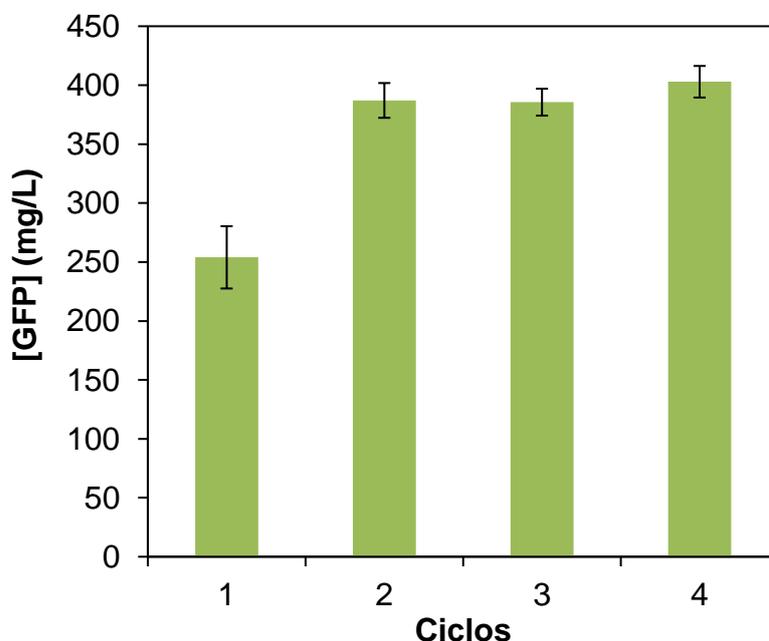
25 h de cultivo foi de 128,13 mg/L, valor muito similar ao obtido pela fermentação em agitador rotativo a 100 rpm de agitação (127 mg/L), no entanto, inferior aos valores de produção obtidos com os vários cultivos realizados com uma agitação de 150 rpm. Assim, as evidências dos ensaios em escala laboratorial levam a acreditar que é necessária a otimização do cultivo para que produção de GFP em biorreator tenha índices produtivos satisfatórios.

Vários estudos reportam a produção de GFP em biorreator, e como esperado, estes são muito distintos e dependentes das condições processuais em estudo. Como exemplo, Chew e colaboradores (2012) obtiveram valores de produção de GFP de 241 mg/L utilizando a bactéria *E. coli* BL21(DE3) em condições otimizadas para biorreator com taxa de agitação de 206 rpm, temperatura de cultivo de 30,7° C e tempo de indução quando a DO<sub>600nm</sub> atingiu 1,04 UA. Aucoin e colaboradores (2006) mostraram que é possível produzir aproximadamente 250 mg/L utilizando como indução o choque de temperatura quando cultivada a 30° C e submetida a choques de 30 min elevando-se a temperatura a 42°C às 5 e às 9 h de cultivo, em biorreator. Interessantemente, é perceptível que mesmo sem otimização, os índices de produção obtidos no nosso trabalho estão relativamente próximos das produções de GFP já reportadas em literatura. Por outro lado, Carvalho (2009) também otimizou a produção da GFP em biorreator, no entanto, apenas apresentou os índices de produção em fluorescência, tendo obtido valores superiores a 57 mil UF (unidades de fluorescência) realizando a indução no meio da fase exponencial de crescimento, com DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 3 UA. Os dados obtidos no experimento comprovam a viabilidade da produção de GFP em biorreator, necessitando de estudos posteriores para avaliar/otimizar os parâmetros de cultivo.

### **5.6 Rompimento das células de *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)]**

Uma das limitações do uso de *E. coli* como sistema heterólogo de expressão, é que a GFP é produzida no interior das células bacterianas. Assim, é necessário adicionar uma etapa de rompimento celular para promover a liberação da GFP para o meio extracelular e assim proceder às etapas seguintes de extração e purificação da proteína. Desse modo, o processo de rompimento celular realizado no presente trabalho foi o de congelamento/descongelamento das células de *E. coli* recuperadas do meio de cultivo. Para avaliar a eficiência desse procedimento, foi determinada a concentração de proteína alvo liberada no sobrenadante do lisado celular

recuperado após cada ciclo de congelamento/descongelamento. A Figura 13 apresenta as concentrações de GFP (mg/L) liberadas a cada ciclo aplicando esta técnica de rompimento, para um total de 4 ciclos.

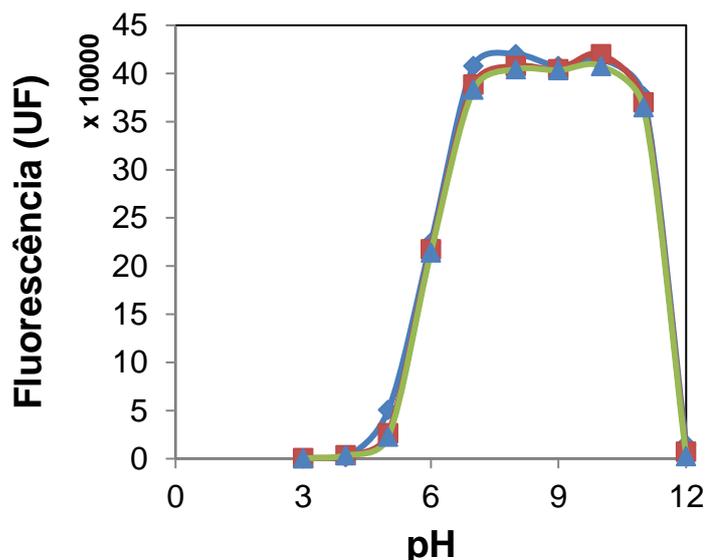


**Figura 13.** Concentração de GFP (mg/L) presente no sobrenadante do lisado celular, submetido a diferentes ciclos de rompimento celular por congelamento ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) / descongelamento ( $40^{\circ}\text{C}$ ).

Os resultados da Figura 13 mostram que o método de rompimento por congelamento/descongelamento foi eficiente para a liberação da GFP intracelular, tendo sido verificado que logo após dois ciclos de congelamento/descongelamento ocorre uma estabilização na concentração de GFP no sobrenadante. Importante destacar, que após esses dois ciclos os *pellets* contendo os detritos celulares já não apresentam fluorescência intrínseca, comprovando a total liberação da molécula alvo. Estes resultados estão de acordo com o anteriormente reportado por Benov; Al-Ibraheem (2002), os quais realizaram a lise celular de diferentes cepas de *E. coli* utilizando 1,0 mL de suspensão celular por meio do congelamento/descongelamento com ciclos de 10 min de congelamento em freezer a  $-24^{\circ}\text{C}$  e descongelamento em banho termostatizado a  $30^{\circ}\text{C}$ . Nesse trabalho, foram realizados 20 ciclos e observou-se que a liberação de proteínas foi estabilizada no décimo ciclo. Assim, podemos considerar que os nossos resultados são ainda mais promissores, visto que a proteína é totalmente recuperada após 2 ciclos, demonstrando que a técnica de congelamento/descongelamento pode ser adotada para o rompimento celular da bactéria e liberação da GFP recombinante.

### 5.7 Estudo da estabilidade da GFP em diferentes pHs e temperaturas

Para analisar a estabilidade do fluoróforo da GFP, a proteína foi exposta a vários tampões com diferentes valores de pH (3 a 12), e a sua estabilidade avaliada durante 2 h de exposição pela quantificação das unidades de fluorescência (UF) após excitação a 488 nm e emissão a 510 nm, conforme exibido na Figura 14.



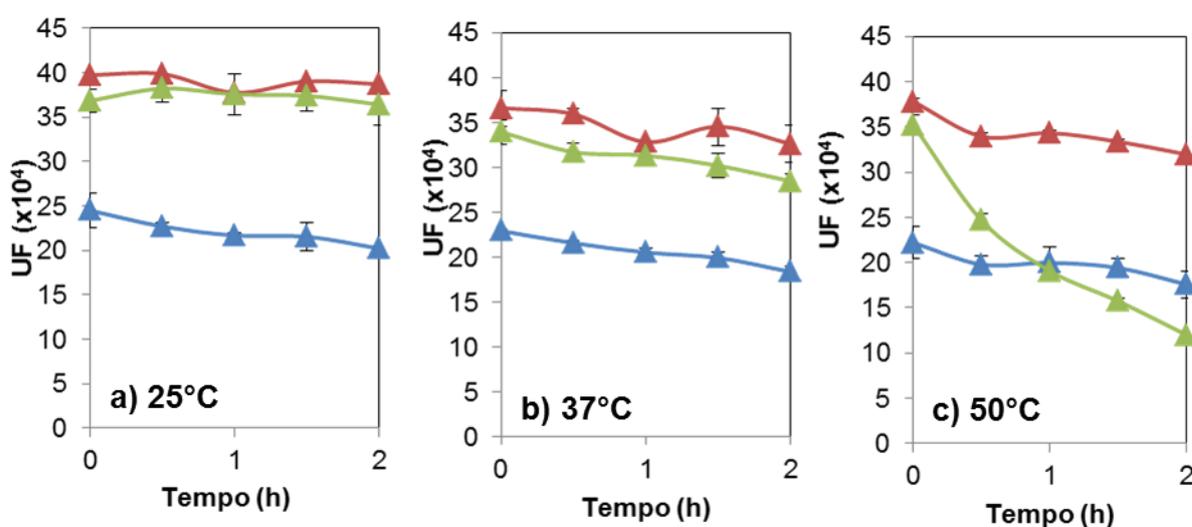
**Figura 14.** Estabilidade da fluorescência da GFP [UF (Ex 488 nm / Em 510 nm)] produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)] a temperatura ambiente e exposta a diferentes pHs: (-●-) 0h de exposição, (-■-) 1h de exposição e (-▲-) 2h de exposição e (-▲-) pH 10, (-▲-) pH 11, (-▲-) pH 12.

A análise da Figura 14 permite avaliar a estabilidade do fluoróforo da GFP, tendo os resultados mostrado que ocorre uma perda quase total da fluorescência para a GFP solubilizada em soluções tampão de pH 3, 4 e 12, atingindo valores mínimos de 300, 3400 e 2500 unidades de fluorescência (UF), respectivamente. A pH 5 a GFP também perde mais de 95% de sua fluorescência apresentando apenas 23000 UF. Este conjunto de resultados permite indicar que a exposição da GFP a condições extremas de pH, ácidas ou básicas, causam uma alteração da estrutura do fluoróforo. Quando presente em tampão de pH 6, a GFP exibiu uma fluorescência de 215000 UF, revelando uma perda de aproximadamente metade da fluorescência de seu cromóforo. Este resultado mostra que apesar de ser extremamente instável em condições extremas de pH, a instabilidade da estrutura é superior para condições ácidas. No entanto, apesar da instabilidade da proteína em condições extremas de pH, soluções tamponadas com pHs de 7 e 11 permitem uma maior

manutenção da fluorescência da GFP, com emissão de 383008 e 364739 UF, respectivamente. No entanto, a completa manutenção da fluorescência da GFP, correspondente à manutenção e estabilidade do fluoróforo, foi observada para os pHs 8, 9 e 10, nos quais foram obtidos valores superiores a 400000 UF.

Os resultados obtidos estão de acordo com os anteriormente reportados, os quais descrevem que a GFP permanece estável e fluorescente entre pHs 5,5 e 8,5. (DE LENCASTRE NOVAES et al., 2011; PENNA et al., 2004b). No nosso caso, a gama de estabilidade se situou em uma região um pouco mais alcalina, observada entre os pHs de 7 a 11. A diferença pode ser devido ao tipo de GFP produzida, visto que dependendo do sistema heterólogo ou do tipo de gene para a expressão da GFP, esta pode apresentar uma estrutura de fluoróforo um pouco distinto. No trabalho realizado por Penna e colaboradores (2004b) foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$ , transformadas com o plasmídeo pGFPuv, no presente trabalho, a cepa empregada foi a *E. coli* BL21(DE3) transformada com os plasmídeos pLysS e pET28(a).

Os resultados de estabilidade da GFP frente a diversos pHs, mostraram que a GFP inicia sua perda de estabilidade em condições ácidas, próxima a um pH de 6 e em condições básicas acima de pH 11. Assim, para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade da GFP, as soluções tampão com pH 6, 8 e 11, foram utilizadas para analisar o comportamento da fluorescência do fluoróforo mediante exposição a diferentes temperaturas (25, 37 e 50°C). Os valores de fluorescência obtidos no estudo apresentados nas Figuras 15 a), b) e c).

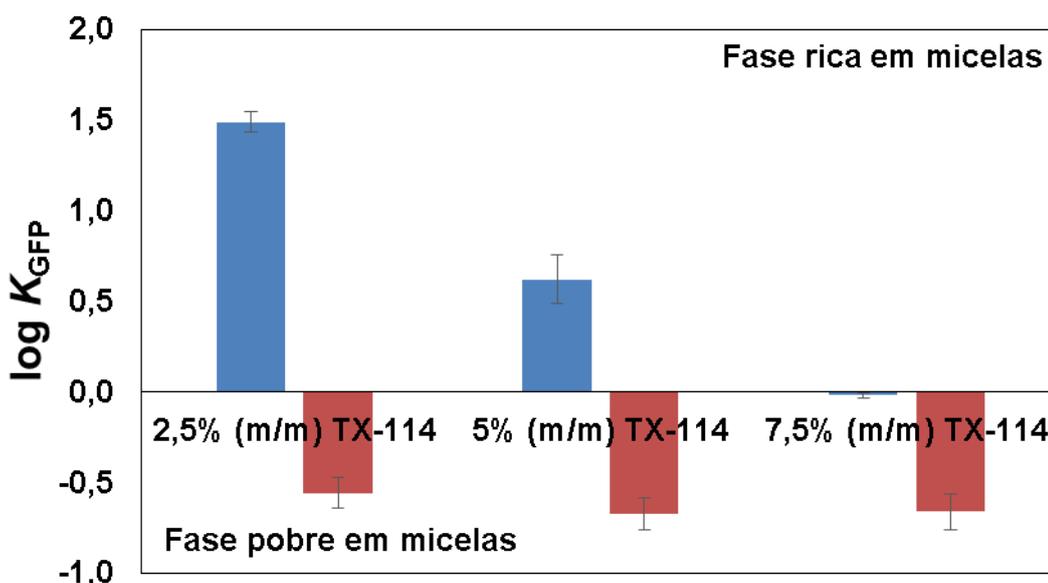


**Figura 15.** Estabilidade da fluorescência da GFP [UF (Ex 488 nm / Em 510 nm)] da GFP produzida por *E. coli* BL21(DE3) [pLysS; pET28(a)], exposta a diferentes condições de pH ((-▲-) pH 6; (-▲-) pH 8 e (-▲-) pH 11) e sob três diferentes condições de temperatura: **a)** 25°C; **b)** 37°C; **c)** 50°C.

A análise das Figuras 15 a) e b), referentes aos testes de estabilidade térmica da GFP nas temperaturas de 25 e 37°C, mostraram uma similaridade em termos de fluorescência, demonstrando que a GFP mantém seu fluoróforo estável a essas temperaturas, conforme o que está descrito na literatura (ISHII et al., 2007). Por outro lado, a análise da Figura 15 c) mostra que a pH 11 ocorre uma diminuição da fluorescência total da solução de GFP recombinante, no qual ao final de duas horas de exposição houve uma perda de aproximadamente 65% em relação à fluorescência inicial, com valores de UF inferiores aos da GFP em soluções com pHs de 6 e 8. Estes resultados mostram que a temperatura acaba por ter um efeito superior em condições alcalinas do que sob condições neutras e/ou pouco ácidas. É importante referir que, na literatura, é relatado que a GFP apresenta estabilidade até temperaturas de aproximadamente 80°C, em pH 7,5 (NAGY et al., 2004), o qual não foi verificado neste trabalho. No entanto, e tal como relatado acima, diferenças no sistema heterólogo de expressão geram a produção de GFP recombinante com características um pouco distintas e com estabilidades diferentes. No trabalho desenvolvido por Nagy e colaboradores (2004) foi utilizada a EGFP, e neste trabalho, a GFPuv, e desse modo, considerando a diferença do gene de inserção para expressão da proteína, esta podem ter estabilidades um pouco diferentes tanto em condições de pH como de temperatura.

### **5.8 Extração de GFP utilizando SMDFAs**

A última etapa do projeto teve como objetivo extrair e separar a GFP do lisado celular empregando SMDFA compostos por Triton X-114 e  $[P_{6,6,6,14}][Cl]$  como adjuvante. A Figura 16 apresenta os dados referentes ao logaritmo do coeficiente de partição da GFP ( $\log K_{GFP}$ ) e a Figura 17 contem os dados do rendimento de recuperação da GFP ( $R(\%)$ ) das fases topo e fundo.

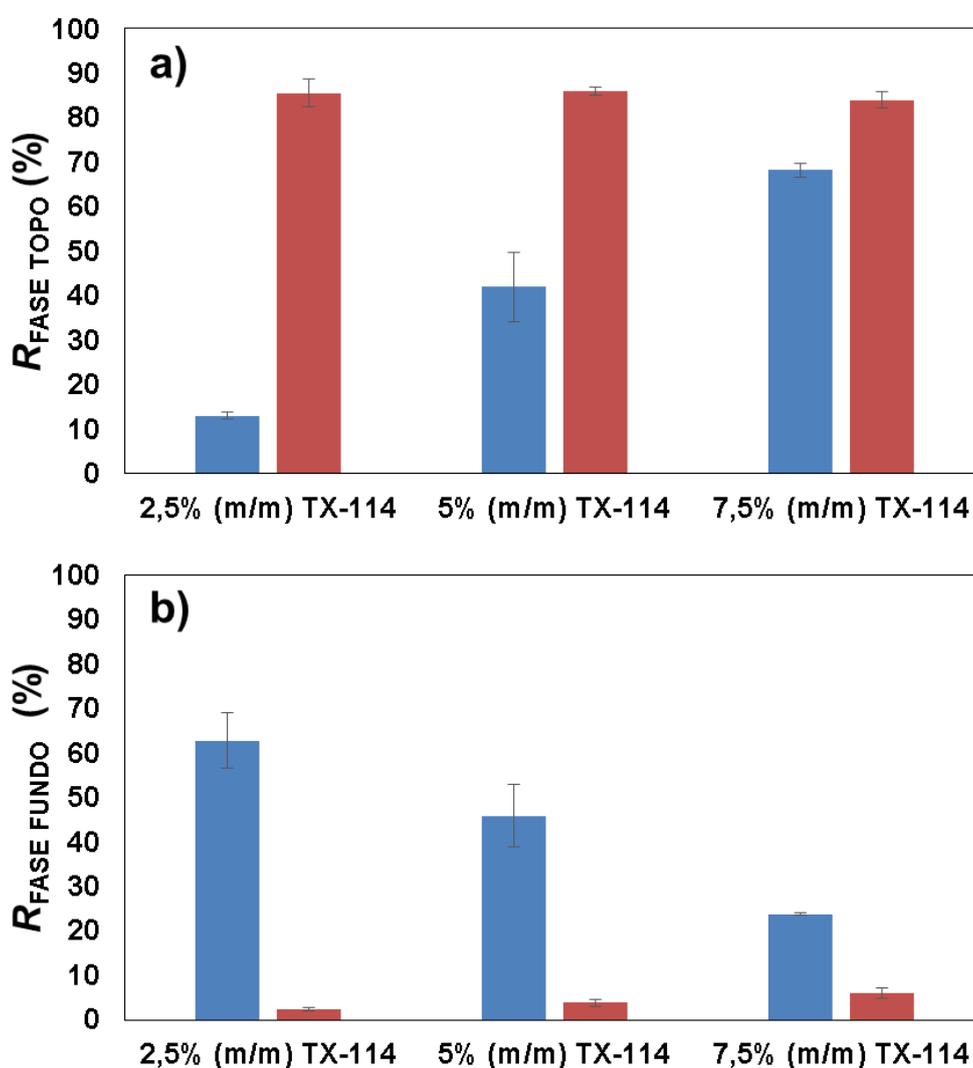


**Figura 16.** Logaritmo dos coeficientes de partição da GFP ( $\log K_{GFP}$ ) obtido a 40°C em SMDFA compostos por: 2,5; 5 e 7,5 % (m/m) de Triton X-114. As barras azuis correspondem aos sistemas com 0,5 % (m/m) de  $[P_{6,6,6,14}]Cl$  e as barras vermelhas são os sistemas formados na ausência do LI.

É possível constatar pela Figura 16 que, com exceção do sistema composto por 7,5 % (m/m) de Triton X-114 e 0,5 % (m/m) de  $[P_{6,6,6,14}]Cl$ , que apresentou um valor de  $K$  um pouco inferior a 1, em todos os sistemas estudados a GFP foi particionada preferencialmente para uma das fases. O sistema que exibiu maior coeficiente de partição para a GFP neste estudo foi o sistema composto por 2,5 % (m/m) de Triton X-114 e 0,5 % (m/m) de  $[P_{6,6,6,14}]Cl$ , onde a GFP foi preferencialmente particionada na fase rica em micelas (fundo). Similarmente, no sistema composto com 5 % (m/m) de Triton X-114 e 0,5 % (m/m) de LI, a GFP foi também concentrada na fase rica em micelas, mas com um menor valor de  $\log K_{GFP}$  (1,49). No entanto, o SDMFA com 7,5 % (m/m) de Triton X-114 e de 0,5 % (m/m) de LI apresentou  $\log K_{GFP}$  de -0,2, demonstrando uma concentração de GFP quase idêntica em ambas as fases, comprovando uma menor eficiência na partição ao aumentar a concentração de Triton X-114 no sistema. Em baixas concentrações de Triton X-114 e na presença do LI, os valores de  $K_{GFP}$  são superiores. Observa-se que ao aumentar a concentração de Triton X-114 na presença de LI, o  $\log K_{GFP}$  vai diminuindo.

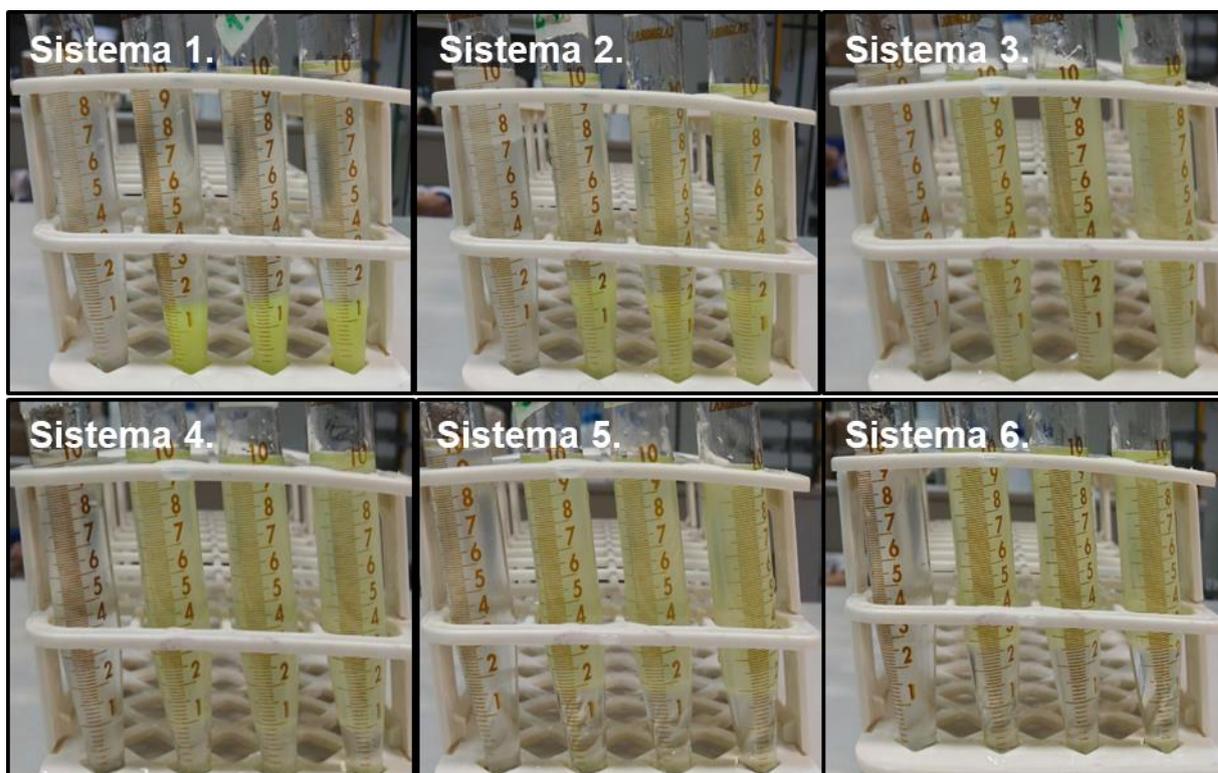
Nos sistemas compostos apenas por 2,5; 5 e 7,5 % (m/m) de Triton X-114, os  $\log K_{GFP}$  obtidos foram de  $-0,56 \pm 0,08$ ;  $-0,67 \pm 0,09$  e  $-0,66 \pm 0,1$ , respectivamente

demonstrando que a GFP foi particionada preferencialmente para a fase pobre em micelas, o mecanismo de partição pode ser explicado pelo fato de a GFP apresentar características de uma proteína hidrofílica (LOPES et al., 2011, 2013). Por outro lado, o comportamento de partição da proteína para os SDMFA com 2,5 e 5 % (m/m) de Triton X-114 e na presença de 0,5 % (m/m) de  $[P_{6,6,6,14}]Cl$  é completamente distinto, resultado de outros tipos de interação (VICENTE et al., 2014). Os resultados obtidos levam a entender que a partição da GFP é direcionada pela presença do LI e pelas forças resultantes do sistema (como interações eletrostáticas e forças de van der Waals).



**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 SMDFA 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  $[P_{6,6,6,14}]Cl$  e as barras vermelhas são os sistemas formados na ausência do LI.

Conforme apresentado na Figuras 17 a) e b) é possível notar que as taxas de recuperação de GFP ( $R(\%)$ ) foram superiores nos sistemas onde não houve a adição de LIs. Os sistemas 1, 2 e 3 (com LI), que apresentaram os melhores valores de  $K_{GFP}$ , não resultaram em valores de recuperação da GFP tão significativos para a fase rica em micelas (fase fundo), sendo estes de apenas:  $62,8 \pm 6,17$ ;  $45,88 \pm 7,15$ ;  $23,84 \pm 0,26$  (respectivamente para os sistemas 1, 2 e 3). Contrariamente, apesar dos menores valores de  $K_{GFP}$  observados nos sistemas 4, 5 e 6 (sem LI), estes apresentaram as maiores capacidades de recuperação de GFP na fase pobre em micelas (fase topo), com valores de, respectivamente:  $85,44 \pm 3,1$ ;  $85,94 \pm 0,88$ ;  $83,93 \pm 1,84$ . Os maiores porcentagens de recuperação de GFP obtidos nos sistemas sem a adição de LI estão de acordo com os já retratados na literatura (LOPES et al., 2011), onde aproximadamente 93% da proteína GFP tinha sido recuperada com a utilização de um SDMFA com 4 % (m/m) de Triton X-114 e temperatura de partição de  $37,3^{\circ}\text{C}$ . A Figura 18 apresenta os sistemas em triplicata e seu respectivo branco, sem a adição de GFP.



**Figura 18.** Fotos dos Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SDMFA) após a incubação a  $40^{\circ}\text{C}$ . 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)  $[P_{6,6,6,14}]\text{Cl}$ ; **Sistema 2.** 5 % (m/m) TX-114 + 0,5 % (m/m)  $[P_{6,6,6,14}]\text{Cl}$ ; **Sistema 3.** 7,5 % (m/m) TX-114 + 0,5 % (m/m)  $[P_{6,6,6,14}]\text{Cl}$ ; **Sistema 4.** 2,5 % (m/m) TX-114; **Sistema 5.** 5 % (m/m) TX-114; **Sistema 6.** 7,5 % (m/m) TX-114.

Visualmente a Figura 18, mostra que a adição de LI permite a inversão da partição da GFP da fase pobre em micelas (topo) para a fase rica em micelas (fundo), o que foi observado nos sistemas 1 e 2.

## 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. 535–50, 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.

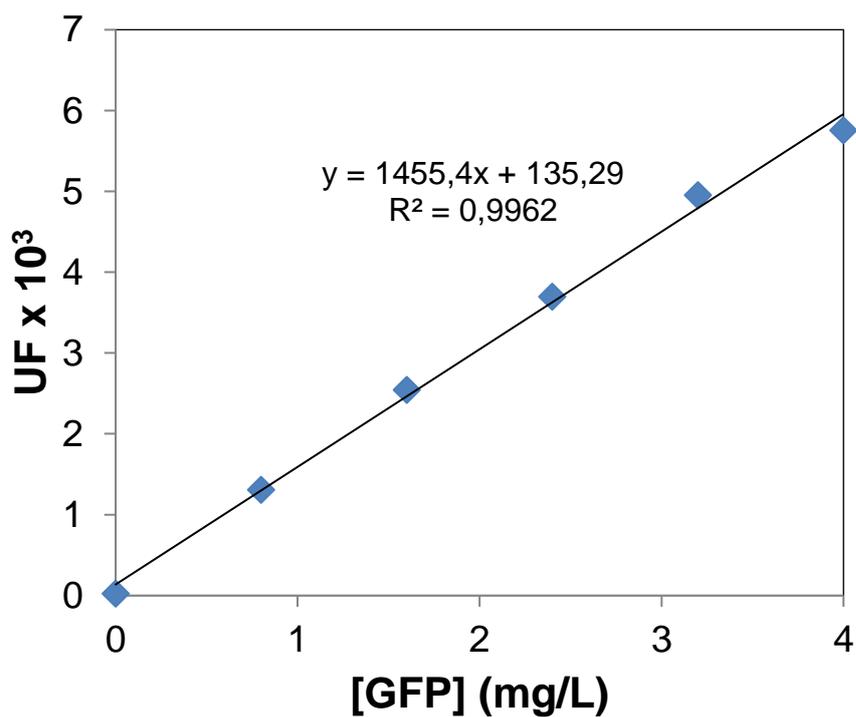
WYRE, C.; OVERTON, T. W. Use of a stress-minimisation paradigm in high cell density fed-batch *Escherichia coli* fermentations to optimise recombinant protein production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1391–1404, 2014.

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.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A

Curva de Calibração da Concentração de GFP x Unidades de Fluorescência, com comprimento de onda de excitação em 395 nm e emissão em 510 nm utilizando o leitor de microplacas (EnSpire® Multimode Plate Reader, PerkinElmer®)



**APÊNDICE B**

Curva de Calibração da Concentração de GFP x Unidades de Fluorescência, com comprimento de onda de excitação em 488 nm e emissão em 510 nm utilizando espectrofluorimetro RF-600 (SHIMADZU®)

