TELMA DE OLIVEIRA MARQUES

Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2018

TELMA DE OLIVEIRA MARQUES

Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profª Drª Rosane Aparecida Moniz Piccoli

Versão original

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

de Oliveira Marques, Telma
Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria Escherichia coli BL21DE3 / Telma de Oliveira Marques; orientadora Rosane Aparecida Moniz Piccoli. -- São Paulo, 2018.
72 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Amblyomin-X. 2. Escherichia coli. 3. Cinética de Crescimento Celular. 4. Planejamento experimental. 5. Proteínas recombinantes. I. Moniz Piccoli, Rosane Aparecida, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Telma de Oliveira Marques

Título da dissertação: Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3

Orientador:

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ___/___/_____, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....

Nome:.....

Instituição:.....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **759/15** referente ao projeto intitulado: "*Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin pela bactéria Escherichia coli BL21DE3 - Mutada*" sob a responsabilidade de **Telma de Oliveira Marques**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Rosane Aparecida Moniz Piccoli**, do Instituto Butantan, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A ZANOTTO
Coordenador da CEPSH - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu esposo Alex, pelo incentivo, apoio e compreensão em todos os momentos, meus pais, Manuel e Shirley, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e aconselhando, aos meus irmãos André, Tânia e Tainá, que sempre acreditaram no meu trabalho. Agradeço a todos familiares e amigos que acompanharam de perto meu desenvolvimento profissional através deste trabalho.

Agradeço aos amigos de pós-graduação, Caroline, Natalia, Murilo, Roseli, por toda ajuda durante os ensaios deste trabalho, a toda equipe de técnicos do Laboratório de Biotecnologia Industrial do IPT, em especial, Alice, Aline e Valter, agradeço também a equipe de pesquisadores do IPT, Rosa, Filomena, Sérgio, Patrícia, Débora, Henrique, Danitza, Elisa, Thomas, Alfredo, Elda, sou grata por todos os ensinamentos que partilharam comigo.

Agradeço imensamente, minha querida orientadora Prof. Dra. Rosane Aparecida Moniz Piccoli, que ao longo do mestrado além de orientadora, se tornou amiga e confidente, sua forma de viver me fez perceber a vida de uma forma muito mais simples e leve.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de estudos no período de outubro de 2015 a março de 2016, ao BNDES (Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social) pelo financiamento do projeto.

“Depois do esforço virá a recompensa”

(Frase de um biscoito chinês, que abri no início de um dos ensaios deste trabalho)

RESUMO

MARQUES, T. O. **Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3**. 2018. 72 páginas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A produção de biofármacos segue um crescente interesse industrial e social. Atualmente existem vários tipos de tratamento contra o câncer, porém, a maioria desses tratamentos não atua unicamente no alvo terapêutico. Um estudo realizado por pesquisadores do Instituto Butantan identificou uma proteína com ação anticoagulante e antitumoral, codificada por um gene proveniente das glândulas salivares do carrapato *Amblyoma cajennense.* Esse gene foi inserido em um plasmídeo e expresso com sucesso na bactéria *Escherichia coli* BL21DE3. Estudos pré-clínicos mostraram que a injeção *in vivo* de Amblyomin-X reduziu a formação de massa tumoral induzida por células de melanoma B16F10 em camundongos. Este trabalho contempla o estudo das condições de cultivo para obtenção da proteína Amblyomin-X com a linhagem *Escherichia coli* BL21DE3 recombinante em biorreatores. Para se determinar a melhor condição de biossíntese da proteína recombinante Amblyomin-X estabeleceu-se uma estratégia de cultivo para a etapa de crescimento do microrganismo e estudaram-se três diferentes fatores na etapa posterior à do crescimento microbiano, ou seja, na etapa de biossíntese da proteína: i) a concentração do indutor IPTG (Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo) no momento de indução da proteína; ii) a temperatura de cultivo durante a etapa de biossíntese da proteína; e iii) a concentração celular no início da etapa de biossíntese da proteína. Para a realização dos ensaios foi proposto um planejamento experimental – delineamento composto central rotacional (DCCR) – escolhido para os três fatores em estudo e resultou na condução de 17 diferentes ensaios. Os ensaios foram realizados com a estratégia de condução proposta, mantendo o valor de μ_x entre 0,20 e 0,23 h^{-1} na etapa de batelada alimentada, o que possibilitou atingir a concentração celular desejada com a formação de ácido acético em concentrações não inibitórias. Como resultado do planejamento experimental, a obtenção dos valores ótimos dos fatores para a etapa de produção da proteína: temperatura de 38°C, concentração celular de 35,27 g/L e concentração do indutor IPTG de 0,10 mM resultou em um protocolo de processo que obteve 8,07 g/L de proteína recombinante, valor máximo obtido e validado até então.

Palavras chave: Amblyomin-X, *Escherichia coli*, Cinética de crescimento celular, Planejamento experimental, Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

MARQUES, T. O. **Kinetic study of the production of the recombinant protein Amblyomin-X by the bacterium Escherichia coli BL21DE3**. 2018. 72 pages. Dissertation (Master in Biotechnology) - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

The production of biopharmaceuticals follows an increasing industrial and social interest. Currently there are several types of cancer treatment, however, most of these treatments do not only act on the therapeutic target. A study by researchers at the Butantan Institute identified a protein with anticoagulant and antitumor action, encoded by a gene from the salivary glands of the Amblyoma cajennense tick. This gene was inserted into a plasmid and successfully expressed on the bacterium *Escherichia coli* BL21DE3. Preclinical studies have shown that the in vivo injection of Amblyomin-X reduced the tumor mass formation induced by B16F10 melanoma cells in mice. This work includes the study of the culture conditions to obtain Amblyomin-X protein with the recombinant *Escherichia coli* strain BL21DE3 in bioreactors. In order to determine the best biosynthesis condition of the recombinant Amblyomin-X protein, a culture strategy was established for the growth stage of the microorganism and three different factors were studied in the post-microbial growth stage, that is, in the biosynthesis stage of the protein: i) the concentration of the IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) inducer at the time of induction of the protein; ii) the culture temperature during the protein biosynthesis step; and iii) the cell concentration at the beginning of the protein biosynthesis step. For the accomplishment of the tests it was proposed an experimental design - central rotational compound design (DCCR) - chosen for the three factors under study and resulted in the conduction of 17 different tests. The tests were performed with the proposed conduction strategy, maintaining the value of μx between 0.20 and 0.23 h-1 in the fed batch stage, which allowed to reach the desired cellular concentration with the formation of acetic acid in non-concentrated concentrations inhibitors. As a result of the experimental design, obtaining the optimum values of the factors for the protein production step: temperature of 38°C, cell concentration of 35.27 g/L and concentration of the IPTG inductor of 0.10 mM resulted in a process protocol which obtained 8.07 g / L of recombinant protein, maximum value obtained and validated until then.

Key words: Amblyomin-X, Escherichia coli, Cellular growth kinetics, Experimental design, Recombinant proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Reações do metabolismo aeróbico da bactéria *Escherichia coli* 22
Figura 2 Metabolismo Fermentativo anaeróbico da *Escherichia coli* 25
Figura 3 Monitoramento do Ensaio 12 em tempo real (MFCS) 42
Figura 4 Perfis de densidade óptica - DO (600nm) e concentração celular X (g/L) ao longo do tempo para o Ensaio 12..... 43
Figura 5 Perfis das concentrações de glicose e ácido acético e da vazão da bomba de alimentação da solução de glicose..... 44
Figura 6 Perfil da quantidade de glicose consumida e das massas residuais de glicose e ácido acético ao longo do tempo para o Ensaio 12 45
Figura 7 Resultados experimentais para o Ensaio 1 do planejamento experimental..... 46
Figura 8 Resultados experimentais para o Ensaio 2 do planejamento experimental..... 47
Figura 9 Resultados experimentais para o Ensaio 3 do planejamento experimental..... 48
Figura 10 Resultados experimentais para o Ensaio 4 do planejamento experimental..... 49
Figura 11 Resultados experimentais para o Ensaio 5 do planejamento experimental..... 50
Figura 12 Resultados experimentais para o Ensaio 6 do planejamento experimental..... 51
Figura 13 Resultados experimentais para o Ensaio 7 do planejamento experimental..... 52
Figura 14 Resultados experimentais para o Ensaio 8 do planejamento experimental..... 53
Figura 15 Resultados experimentais para o Ensaio 9 do planejamento experimental..... 54
Figura 16 Resultados experimentais para o Ensaio 10 do planejamento experimental..... 55
Figura 17 Resultados experimentais para o Ensaio 11 do planejamento experimental..... 56
Figura 18 Resultados experimentais para o Ensaio 13 do planejamento experimental..... 57
Figura 19 Resultados experimentais para o Ensaio 14 do planejamento experimental..... 58
Figura 20 Resultados experimentais para o Ensaio 15 do planejamento experimental..... 59
Figura 21 Resultados experimentais para o Ensaio 16 do planejamento experimental..... 60
Figura 22 Resultados experimentais para o Ensaio 17 do planejamento experimental..... 61
Figura 23 Concentração de IPTG vs Concentração celular..... 64
Figura 24 Concentração de IPTG vs Temperatura de biossíntese da proteína 64
Figura 25 Concentração celular vs Temperatura de biossíntese da proteína..... 65
Figura 26 Valores dos fatores para a obtenção da máxima concentração de proteína 65
Figura 27 Dados experimentais do Ensaio 18 – otimizado 66
Figura 28 Concentrações celular e de proteína após a indução por IPTG. 67
Figura 29 Géis de poliacrilamida das amostras purificadas dos pontos centrais..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis independentes 40
Tabela 2 Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional 40
Tabela 3 Resultados experimentais dos 17 ensaios para projeto experimental 62
Tabela 4 ANOVA – Análise de Variância dos dados experimentais dos 17 ensaios 63
Tabela 5 Concentrações celular e de proteína após a indução por IPTG 67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 JUSTIFICATIVA 18

3 OBJETIVO 19

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20

4.1 Processo de cultivo da bactéria *Escherichia coli* 21

4.2 Produção de Proteínas Heterólogas em *Escherichia coli* 26

4.3 A Regulação Gênica Bacteriana 27

4.4 Indução do produto de interesse 27

4.5 A produção de proteínas recombinantes em microrganismos 28

4.6 A proteína Amblyomin-X 30

4.7 Otimização do processo de produção de Amblyomin-X 31

5 MATERIAIS E MÉTODOS 33

5.1 Microrganismo 33

5.2 Meios de Cultura 33

5.3 Antibiótico 33

5.4 Preparo do Pré-Inóculo 33

5.5 Preparo do Inóculo 34

5.6 Cultivo em biorreator 34

5.7 Métodos Analíticos 34

5.8 Concentração Celular (X) 35

5.9 Determinação da concentração de glicose e ácido acético 35

5.10 Quantificação da proteína Amblyomin-X 35

5.11 Tratamento dos Dados Experimentais 36

5.11.1 *Velocidades instantâneas* 36

5.11.2 *Velocidades específicas* 36

5.11.3 *Fator de Conversão Substrato em Célula* 37

5.11.4 *Fatores de Conversão Substrato em Produto* 37

5.11.5 *Produtividade em células (P_X) e produtividade em produto (Pp)* 37

5.12 Calculo da vazão de alimentação 38

5.13 Planejamento experimental - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 39

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

6.1 Ensaios em biorreatores para o planejamento experimental 41

6.2 Análise das superfícies de resposta 63
7 CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS 69

1 INTRODUÇÃO

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, a produção de proteínas recombinantes tornou-se uma ferramenta importante nos estudos da estrutura, função e identificação de novas proteínas, principalmente com finalidades terapêuticas, possibilitando a fabricação de drogas capazes de controlar certas doenças ou utilizando as proteínas purificadas diretamente no tratamento de certas doenças como diabetes (insulina), nanismo (hormônio do crescimento) dentre outra (ROSSANA; VAZ, 2008). O desenvolvimento dessas técnicas tornou possível expressar qualquer gene em organismos hospedeiros, desde bactérias, fungos filamentosos, leveduras e insetos, até plantas e mamíferos transgênicos, sendo necessário, para isso, o desenvolvimento de vetores específicos para tal finalidade (SCHMIDELL et al., 2001; VIANA ARAÚJO CHAVES, 2009).

Microrganismos geneticamente modificados são utilizados industrialmente para a produção de hormônios, antibióticos, enzimas e proteínas em geral. Na produção de moléculas heterólogas, o desenvolvimento das cepas que carregam os genes exógenos torna-se uma etapa importante, assim como também o desenvolvimento do processo de produção. Nesse sentido, o estudo das condições adequadas de cultivo em biorreator é um requisito essencial para a viabilidade do processo (ROSSI, 2001).

O fato de ser o melhor hospedeiro caracterizado e com muitos sistemas de expressão disponíveis (CHOI; LEE, 2004) a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* tem sido por muitos anos o principal hospedeiro procariótico para a síntese de proteínas heterólogas. Recentes avanços têm sido feitos na expressão de proteínas complexas como moléculas solúveis, funcionais, completas com grupos prostéticos, ligações dissulfeto e estrutura quaternária. O desenvolvimento de estratégias alternativas de indução tem melhorado as opções disponíveis para manipular as condições de expressão, que são frequentemente críticos para o produto solúvel (WEICKERT et al., 1996). No entanto, a bactéria *Escherichia coli* não é capaz de produzir algumas proteínas contendo ligações dissulfeto complexas ou proteínas de mamíferos que requerem modificações pós-traducionais. Por outro lado, muitas proteínas recombinantes foram produzidas com sucesso utilizando a bactéria *Escherichia coli*. As proteínas expressas são frequentemente produzidas na forma de corpos de inclusão, a partir dos quais as proteínas biologicamente ativas só podem ser recuperadas por processos complicados e dispendiosos de desnaturação e renaturação (CHOI; LEE, 2004). Além disso, os rendimentos

finais destas proteínas solúveis renaturadas são normalmente muito baixos, devido principalmente à agregação de proteínas resultante de interações entre as regiões hidrofóbicas das proteínas (CHOI; LEE, 2004). Contudo, ainda existem vantagens na produção de proteínas sob a forma de corpos de inclusão, sendo a facilidade de isolamento e o fato da proteína não prejudicar o hospedeiro por estar na forma inativa (CHOI; KEUM; LEE, 2006; VIANA ARAÚJO CHAVES, 2009).

Sabe-se que produtos extraídos de fontes naturais como plantas, ervas e outros organismos vivos são conhecidos por possuírem eficácia no tratamento de diversas doenças, dentre elas o câncer. A saliva de carrapato contém uma ampla gama de moléculas fisiologicamente ativas que participam de vários processos, tais como coagulação e fibrinólise, imunidade à inflamação e angiogênese (BATISTA et al., 2010; HOVIUS; LEVI; FIKRIG, 2008).

Pesquisadores do Instituto Butantan (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010) estudaram o carrapato *Amblyomma cajennense*. Esta espécie pertence à família Ixodidae, subfamília Ammblyomminae e possui importância médica e veterinária no Brasil por ser parasita de cavalos, gado e cães (DREWES, 2011). O mesmo grupo de pesquisa descreveu uma biblioteca de ESTs (*expressed sequence tags*) (BATISTA et al., 2008) representando os genes presentes nas glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense* e, a partir desta biblioteca, foi estabelecido o perfil dos genes transcritos mais expressos pela glândula do carrapato (DREWES, 2011). Amblyomin-X é um inibidor de serinoprotease do tipo *Kunitz* obtido a partir dessa biblioteca. Dados preliminares mostraram que a aplicação *in vivo* de Amblyomin-X reduziu a formação de massa tumoral induzida por células de melanoma B16F10 em camundongos (DREWES, 2011).

Amblyomin-X é uma proteína de cadeia única de 13.491 Da que contém sete resíduos de cisteína. O gene codificador de Amblyomin-X foi clonado no microrganismo *Escherichia coli* BL21DE3, que passou a expressar a proteína de interesse inicialmente em cultivos com meio de cultura adequado, em incubador rotativo (BATISTA et al., 2010).

Esta molécula já possui patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial, (INPI, PI 0406057-1), e é protegida pelo PCT (Tratado multilateral que permite requerer a proteção patentária de uma invenção, simultaneamente, num grande número de países, por intermédio do depósito de um único pedido internacional de patente), baseada em suas atividades como inibidor do Fator Xa de coagulação, antitumoral, anti-metastática e provável

antiangiogênica. A proteína Amblyomin-X encontra-se licenciada para a União Química Farmacêutica Nacional (ZAMPOLLI, 2011).

Em 2013 foi aprovado o projeto intitulado "Desenvolvimento do Processo de Obtenção de Amblyomin-X: Uma nova proteína para o tratamento do câncer e desordens hemostáticas", financiado pelo BNDES, tendo como parceiros o Instituto Butantan, o IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo e a empresa farmacêutica União Química.

O escopo deste projeto foi dividido com base nas capacitações dos institutos envolvidos no projeto.

O Instituto Butantan ficou responsável pelas etapas de clonagem molecular e desenvolvimento de sistemas de expressão, separação e purificação, ensaios para o controle de qualidade, ensaios de biologia celular, ensaios funcionais (in vitro e in vivo), análises por Informática e contratação de ensaios pré-clínicos.

O Instituto de Pesquisas Tecnológicas ficou responsável pelo estudo cinético da etapa de crescimento do microrganismo e biossíntese do produto (proteína recombinante) em biorreatores, protocolo do processo de produção da proteína recombinante e *scale-up* (biorreatores de 10, 50 e 100 Litros), e a otimização do processo.

Como o Instituto Butantan já havia realizado os testes pré-clínicos em camundongos com a proteína Amblyomin-X Nativa proveniente da *Escherichia coli*, obtendo resultados satisfatórios, o próximo passo então seria os testes clínicos em coelhos, para validar a ação da proteína.

Na intenção de se evitar a formação de agregados proteicos o plasmídeo que contém a proteína Ambyomin-X Nativa foi alterado, alteração essa que trocou uma cisteína por uma serina através de mutação pontual no plasmídeo. Dessa forma, a proteína Amblyomin-X denominada Mutada também passou a ser estudada juntamente com a proteína Amblyomin-X Nativa. Testes feitos pelo Instituto Butantan mostraram que a proteína Amblyomin-X Mutada apresentou bom desempenho no cultivo e melhores resultados na etapa de separação e purificação em relação à proteína nativa.

Assim, o Instituto Butantan e a União Química solicitaram ao IPT que priorizasse a elaboração de um protocolo otimizado de produção da proteína Amblyomin-X mutada.

Como a produção da proteína Amblyomin era associada ao crescimento celular, para a produção em grande quantidade dessa proteína estabeleceu-se inicialmente um protocolo de

obtenção de elevadas concentrações celulares e analisaram-se os principais fenômenos e variáveis envolvidas nessa biossíntese.

Esse trabalho permitiu estabelecer um protocolo ótimo de processo de produção da proteína Amblyomin-X escolhendo e analisando três importantes variáveis envolvidas nessa biossíntese: i) a concentração celular no momento da indução, ou seja, no início da produção da proteína; ii) a concentração do indutor IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) e iii) a temperatura de cultivo na etapa de indução da proteína Amblyomin-X.

2 JUSTIFICATIVA

O presente estudo se justifica pela necessidade de um protocolo industrial do processo de produção da proteína Amblyomin-X. Essa proteína tem mostrado ser um potencial medicamento contra o câncer, pois estudos pré-clínicos realizados em camundongos e coelhos mostraram que a proteína levou a regressão de tumores renais, de pâncreas e do tipo melanoma, além de reduzir metástases pulmonares derivadas desses tipos de câncer. Uma vez aprovado nos testes clínicos, a sua produção industrial demandará a definição de um protocolo de processo que permita elevadas concentrações da proteína. A otimização do processo permite obter elevada concentração da proteína em menor tempo, ou seja, elevada produtividade do produto que resulte em um menor custo de produção para a proteína Amblyomin-X.

3 OBJETIVO

O objetivo principal deste trabalho foi definir um protocolo otimizado de produção da proteína Amblyomin-X mutada empregando a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 recombinante em biorreatores.

Os objetivos específicos foram analisar e estudar os diferentes fenômenos e variáveis na etapa de biossíntese da proteína Amblyomin-X: i) temperatura na etapa de produção da proteína; ii) concentração do indutor IPTG na etapa de produção da proteína; iii) concentração da bactéria *Escherichia coli* no momento de indução da proteína.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Até meados dos anos setenta, a bactéria *Escherichia coli* não tinha grande importância industrial. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, essa perspectiva mudou, principalmente, porque grande parte desta tecnologia foi desenvolvida utilizando este microrganismo (NOGUEIRA LIMA, 2004). O profundo conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética (JANA; DEB, 2005; NOGUEIRA LIMA, 2004; VAZ, 2011).

A *Escherichia coli* é o microrganismo preferido para expressar proteínas heterólogas para uso terapêutico, uma vez que cerca de 30% das proteínas terapêuticas aprovadas estão sendo produzidas atualmente usando-as como hospedeiras. Devido ao seu rápido crescimento, alto rendimento do produto, custo-efetividade e fácil processo de escalonamento, a *Escherichia coli* é uma hospedeira de expressão de escolha na indústria de biotecnologia para produção em larga escala de proteínas, particularmente proteínas não glicosiladas, para uso terapêutico (MOHAMED N. BAESHEN, 2014).

A *Escherichia coli* foi o primeiro hospedeiro de expressão utilizado para a fabricação de um produto biofarmacêutico, que resultou na aprovação regulatória da insulina humana em 1982 para o tratamento do diabetes. A aprovação do hormônio de crescimento bovino (bGH) em 1994 estabeleceu um novo padrão para a fabricação de proteínas heterólogas a partir de *Escherichia coli* para uso terapêutico (MOHAMED N. BAESHEN, 2014). Vários outros produtos são expressos através do cultivo com *Escherichia coli*. (BABAEIPOUR et al., 2007) produziram Interferon-gama humano (hIFN-γ) a partir de *Escherichia coli* BL21(DE3), utilizando uma estratégia de alimentação exponencial para o cultivo em batelada alimentada, alcançaram produtividade em concentração celular e proteína recombinante de 2,8-2,82 vezes maior em comparação a resultados obtidos anteriormente por outros autores. (GUO et al., 2016) desenvolveram uma estratégia para clonar, expressar e purificar LRSAM1, uma ubiquitina ligase, que tem papel importante nos processos de sinalização celular, e está envolvido no controle de doenças, a LRSAM1 foi produzida sob forma de corpos de inclusão e recuperado na forma solúvel, com uma pureza de 95%, e rendimento final de 6 mg/L de cultura. (LEE et al., 2018) desenvolveram cepas recombinantes de *Escherichia coli* para a produção de 1,3 propanodiol a partir de glicose, a melhor cepa desenvolvida apresentou rendimento de 0,47 mol/mol de glicose.

Como a *Escherichia coli* faz parte da micro-flora comum no intestino grosso, está acostumada a um pH de 7-8 e a temperatura corporal de 37ºC. Como a glicose é absorvida no intestino delgado, a *Escherichia coli* a utiliza em baixas concentrações. No entanto, como a glicose ($C_6H_{12}O_6$) é sua fonte de energia, se o excesso de glicose estivesse disponível para consumo, seria de se esperar que a *Escherichia coli* a utilizasse e crescesse em um ritmo mais rápido. O sal (NaCl) é absorvido no cólon, então a quantidade de sal à qual a *Escherichia coli* é exposta depende da quantidade de sal consumida pelo organismo hospedeiro. No entanto, devido ao mecanismo de osmose, níveis extremamente altos, bem como ausência completa de sal, podem ser letais para a bactéria *Escherichia coli* (HUB, 2014).

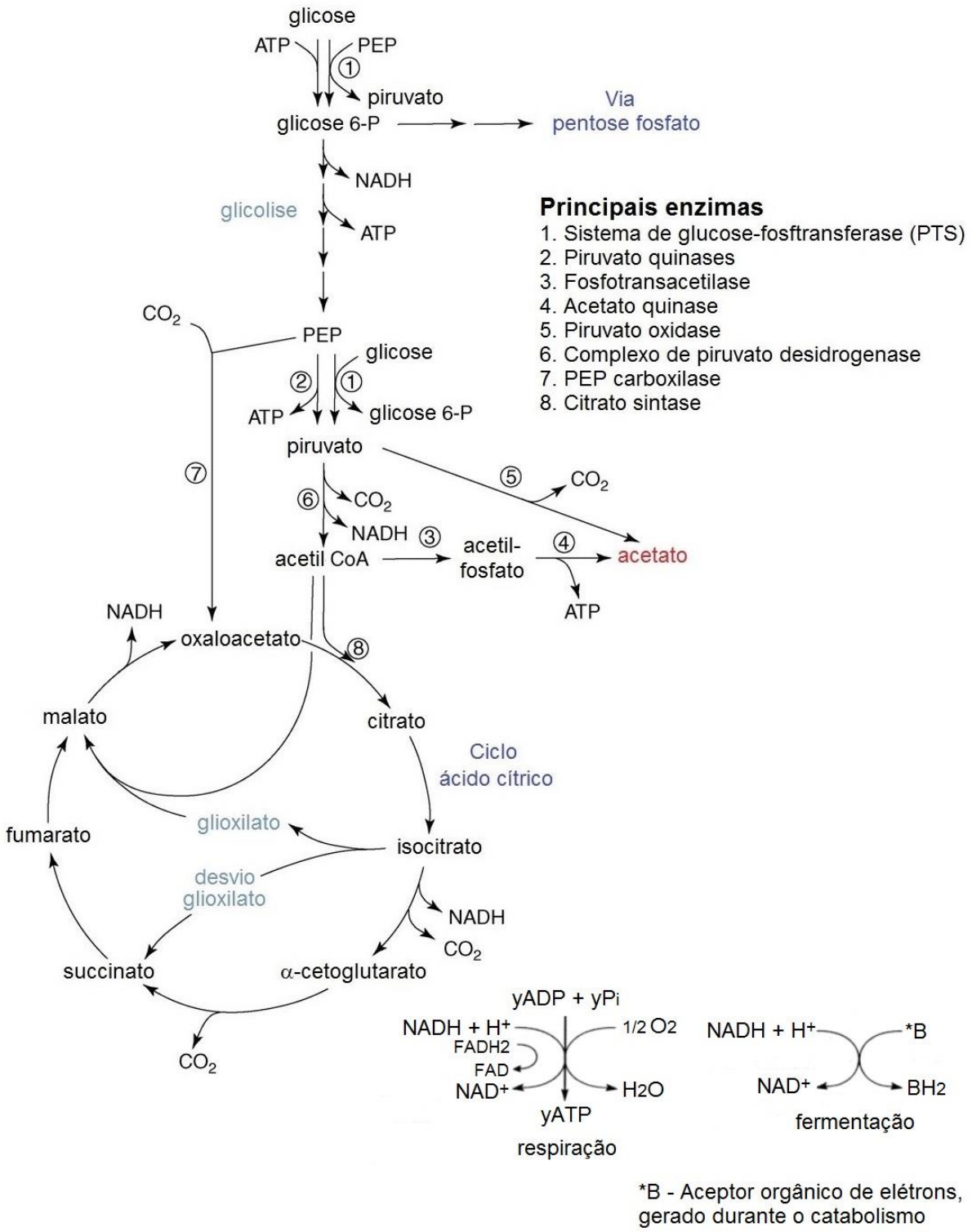
4.1 Processo de cultivo da bactéria *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* apresenta metabolismo aeróbio facultativo, ou seja, em condições de aerobiose a fonte de carbono é utilizada no ciclo de Krebs para crescimento celular, no entanto, em condições de anaerobiose a fonte de carbono é fermentada com produção de subprodutos, tais como: etanol, acetatos, lactatos, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido propiônico e ácido isobutírico (VIANA ARAÚJO CHAVES, 2009). Isso torna a transferência de oxigênio um fator limitante quando se deseja alta concentração celular (GOMBERT; KILIKIAN, 1997).

Nos cultivos microbianos, os microrganismos podem ser classificados de acordo com sua necessidade de oxigênio para crescimento celular, ou seja, em aeróbios, anaeróbicos e anaeróbios facultativos. Os processos aeróbios são empregados para a produção de concentração celular, antibióticos, vitaminas, enzimas, aminoácidos, alguns ácidos orgânicos, e os anaeróbios para a produção de ácido lático, solventes orgânicos, metano, etanol, entre outros (VITOLO et al., 2015).

A Figura 1 mostra as principais vias bioquímicas em *Escherichia coli* envolvidas no consumo aeróbio de glicose e na síntese de acetato, CO_2 e célula. *Escherichia coli* consome glicose principalmente por um sistema fosfotransferase (PTS), que simultaneamente gera piruvato a partir de PEP (PhosfoEnolPiruvato). O acetato é formado a partir de piruvato por piruvato-oxidase e fosfotransacetilase/acetato-quinase. PEP carboxilase é a principal via anaplerótica (reação de preenchimento) necessária para repor os intermediários do ciclo do ácido cítrico consumidos para a formação de célula (EITEMAN; ALTMAN, 2006).

Figura 1 Reações do metabolismo aeróbico da bactéria *Escherichia coli*



Adaptado de (EITEMAN; ALTMAN, 2006; ROSSI, 2001).

Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das

coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da glicólise e do ciclo de Krebs) e, ainda, permitindo o armazenamento de energia através da transformação as moléculas de ADP para ATP. Essas últimas, por sua vez, irão participar necessariamente nas reações de síntese de moléculas, para a sobrevivência e o surgimento de novas células, no processo de proliferação da concentração celular microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia (LIMA et al., 2001).

O oxigênio é pouco solúvel em água, sendo a concentração de oxigênio dissolvido na saturação na ordem de 7 mgO2/L (7 ppm). Observa-se ainda que a concentração de oxigênio dissolvido diminui com o aumento da temperatura, assim como diminui com o aumento da concentração de um determinado sal dissolvido (LIMA et al., 2001).

Dessa maneira, a extensão de um processo descontínuo aeróbio e, por conseguinte, a obtenção de elevadas concentrações do produto desejado, depende enormemente da capacidade de se transferir o O_2 da fase gasosa para a fase líquida, especialmente nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular pode ser elevada. Torna-se óbvio então a necessidade de se agitar e aerar um meio de cultivo, para que o processo de transferência seja eficiente (LIMA et al., 2001).

Em relação à composição de meios de cultivo, há uma grande variedade de opções para formular meios quimicamente definidos e complexos disponíveis na literatura, tanto para cultivos em frascos agitados como para cultivos de altas concentrações de *Escherichia coli* em biorreator (SANTOS et al., 2012; STUDIER, 2005). Durante o crescimento em meio rico, tal como os meios vulgarmente utilizados Luria Bertani ou *Terrific Broth*, as células não precisam sintetizar a maioria das moléculas precursoras (por exemplo, aminoácidos) pois elas já estão presentes no meio. Assim, as células podem gastar mais recursos para produzir as macromoléculas necessárias para sua própria proliferação e podem crescer mais rapidamente em comparação com as células que crescem em meio mineral definido. Notavelmente, *Escherichia coli* BL21 também secreta níveis baixos mas detectáveis de acetato durante o crescimento rápido em meio rico, mesmo na ausência de condições limitantes de oxigênio (LI; NIMTZ; RINAS, 2014).

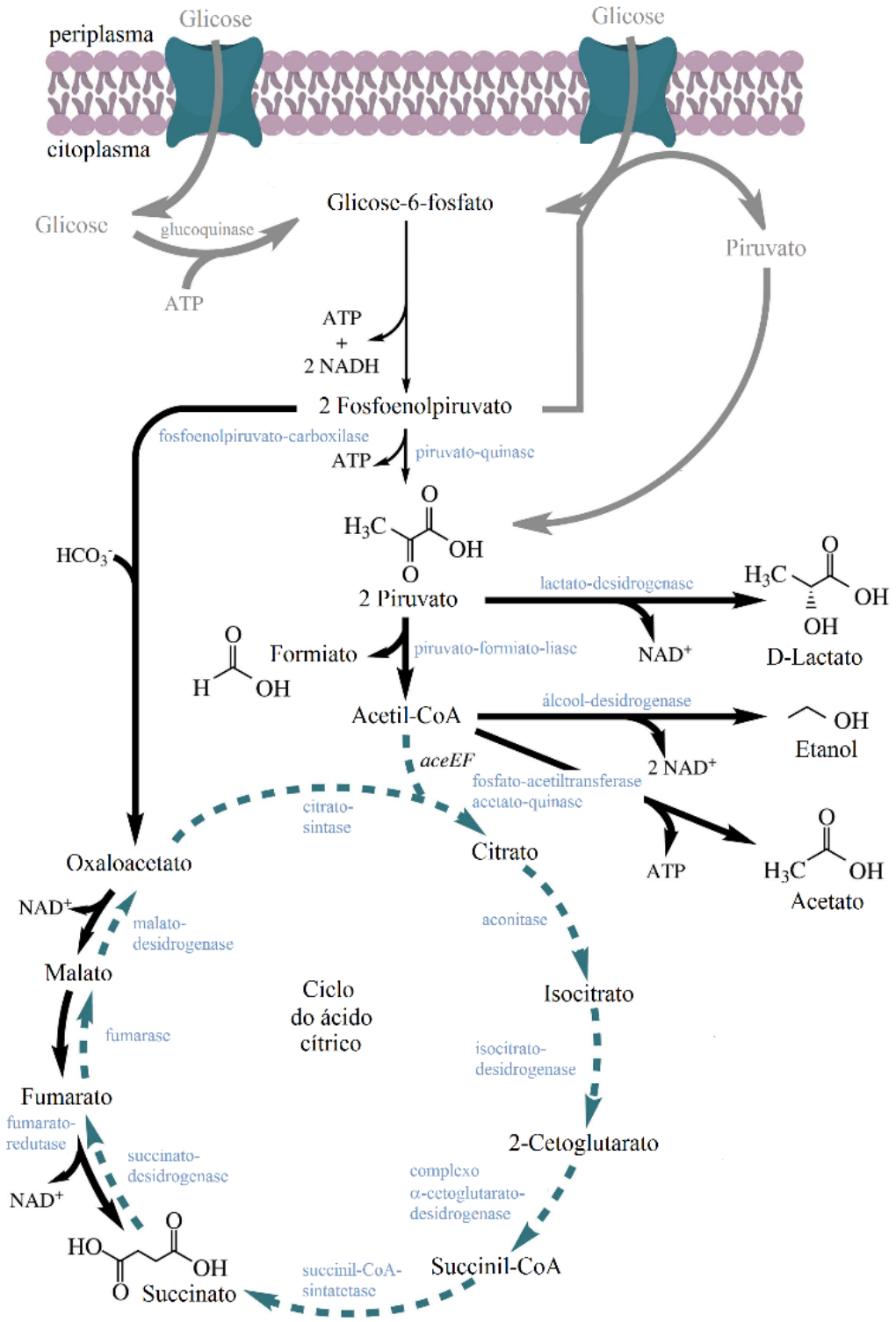
As vantagens de cultivo de alta concentração celular são as seguintes: i) volumes de reator reduzidos; ii) menos esforços no processamento *upstream* e *downstream*; iii) produtividades volumétricas de produto essencialmente mais elevadas; iv) melhor rendimento na

recuperação do produto; v) redução das águas residuais; vi) menores custos de produção de investimento em equipamentos confinados (RIESENBERG et al., 1991).

Por outro lado, quando se deseja altas concentrações celulares de *Escherichia coli* surge imediatamente uma série de dificuldades, como, por exemplo, concentrações iniciais elevadas de componentes do meio de cultivo e a baixa solubilidade de oxigênio. Adicionalmente, as culturas sofrem inibição pelo substrato, bem como pelo aparecimento de subprodutos metabólicos indesejáveis, como o etanol, o acetato e o lactato, que são produzidos sob as condições limitantes de determinados substratos. Para evitar tais efeitos prejudiciais são necessárias estratégias específicas de cultivo (RIESENBERG et al., 1991).

Apesar do grande conhecimento acerca do cultivo com *Escherichia coli* como hospedeiro, a realidade apresenta alguns entraves no que diz respeito à formação de subprodutos indesejáveis. A fermentação que resulta na formação de acetato ao longo do cultivo é um dos maiores problemas (JANA; DEB, 2005).

Figura 2 Metabolismo Fermentativo anaeróbico da *Escherichia coli*



Adaptado de (FÖRSTER; GESCHER, 2014)

Nota: Nessa figura: i) as setas em negrito de cor cinza mostram o sistema de transporte de glicose; ii) as setas finas de cor preta fina mostram a glicólise; iii) as setas em negrito de cor preta mostram as reações fermentativas e iv) as setas tracejadas mostram o ciclo do ácido cítrico.

A formação de acetato tem efeitos negativos no crescimento celular e na produção de proteínas. Ao longo dos últimos anos, esforços substanciais de investigação têm sido realizados para reduzir o acúmulo desse subproduto durante o crescimento aeróbico de *Escherichia coli* com glicose. Desde o início ficou claro que essa busca não seria simples. A deleção simples da via acetativa reduziu a acumulação de acetato, mas outros subprodutos foram formados (DE MEY et al., 2007).

Observopu-se que uma cultura de *Escherichia coli* irá gerar acetato quando as células superarem uma determinada velocidade específica de consumo de glicose, independentemente da disponibilidade de oxigênio para a cultura (EITEMAN; ALTMAN, 2006). Na literatura existem várias estratégias de cultivo para diminuir a sua formação, dentre elas as estratégias de alimentação de glicose, limitação da velocidade de crescimento, utilização de fontes de carbono alternativas à glicose, como por exemplo, o glicerol (DE MEY et al., 2007).

O ácido acético é o principal subproduto da fermentação e as concentrações inibitórias de ácido acético dependem da estirpe e das condições de cultivo. Para a *Escherichia coli* BL21(DE3) foi percebido que o crescimento foi inibido com concentrações de ácido acético acima de 0,9 g/L (GOMBERT; KILIKIAN, 1997).

O excesso de glicose no meio implica na ocorrência de processo fermentativo pelo microrganismo em paralelo com o processo oxidativo, o que demanda menor consumo de oxigênio e resulta na formação de subprodutos (Efeito *Crabtree*) (GOMBERT; KILIKIAN, 1997; VIANA ARAÚJO CHAVES, 2009).

4.2 Produção de Proteínas Heterólogas em *Escherichia coli*

A produção de proteínas heterólogas em *Escherichia coli* é influenciada pelas condições de cultivo, destacando-se a temperatura, a composição do meio de cultivo, o modo de operação, as condições de aeração e o indutor empregado como os principais fatores para estudos conduzidos em biorreator.

A quantidade do indutor é também um fator crítico, tanto em termos de custo, como de potencial inibição do rendimento celular, influenciando a produtividade volumétrica da enzima, a produtividade total da concentração celular, e o fator de conversão de substrato em célula (OLAOFE et al., 2010).

As condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução de proteínas recombinantes são fatores importantes para viabilizar a sua síntese (ROSSANA; VAZ, 2008).

4.3 A Regulação Gênica Bacteriana

O metabolismo celular é controlado de forma coordenada, evitando assim a síntese desnecessária de metabólitos e consequente desperdício energético e o acúmulo intracelular de metabolitos tóxicos.

Por exemplo, no caso da *Escherichia coli* que possui aproximadamente 4000 genes em seu genoma, nem todos eles são expressos ao mesmo tempo. A expressão ocorre em níveis variáveis, com exceção dos genes denominados constitutivos, que são expressos constantemente (MARZZOCO, ANITA; TORRES, 1999).

4.4 Indução do produto de interesse

Muitos dos princípios da expressão gênica bacteriana foram primeiramente definidos por estudo do metabolismo da lactose em *Escherichia coli* e realizados por dois pesquisadores, François Jacob e Jacques Monod, cujo trabalho foi publicado no *Proceeding* da Academia Francesa de Ciências em 1960. Hoje se sabe que o metabolismo da lactose depende de genes adjacentes regulados coordenadamente: o gene lacZ que codifica a β-galactosidase, enzima que hidrolisa a lactose em galactose e glicose, o gene lacY da galactosídio permease, que transporta a lactose para dentro da célula e o gene lacA que codifica a tiogalactosídio transacetilase (NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL; M. COX, 2014).

A transcrição do *operon lac* de *Escherichia coli* não depende somente da presença de lactose, mas da presença de glicose no meio também. A máxima transcrição desse *operon* é encontrado quando há ausência de glicose e a lactose passa então a ser a fonte de carbono principal. Na presença de glicose, a transcrição é diminuída em 50 vezes e esse decréscimo na taxa de transcrição do *operon lac* é chamado de repressão catabólica. A repressão catabólica ocorre em todos os *operons* que codificam enzimas catabólicas (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2003).

A expressão do gene da proteína de interesse em sistemas baseados no *operon lac* depende da presença de um indutor, pois o gene heterólogo é inserido no plasmídeo sob o controle de um derivado do *operon lac* no lugar dos genes estruturais lacZ, lacY e lacA, enquanto que no genoma da bactéria o *operon lac* permanece intacto. Em laboratório, normalmente utiliza-se o isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose, como indutor para as construções derivadas do *operon* da lactose (ABBAS SHOJAOSADATI; VAREDI KOLAEI, SEYEDEH MARJAN BABAEIPOUR; FARNOUD, 2008; SANTOS, 2012).

A produção da proteína heteróloga durante a fase de indução causa um elevado estresse metabólico na célula, que é forçada a direcionar parte significativa da energia e dos aminoácidos gerados para atender a demanda de síntese. Isso acarreta aumento na manutenção celular e desaceleração do crescimento (SANTOS, 2012).

A temperatura ótima de crescimento de *Escherichia coli* (37 – 39 °C) coincide com a temperatura ótima de indução do *operon lac*. O uso de temperaturas menores reduz alterações metabólicas indesejáveis, como a síntese de proteases ou "Proteínas de choque térmico", aumentando o rendimento do produto-alvo, e ainda, contribui para aumentar a solubilidade, isto é, reduz a formação de corpos de inclusão. A redução da temperatura melhora ainda a capacidade de excreção da proteína, contribuindo para a conformação adequada e redução da lise celular (DONOVAN; ROBINSON; CLICK, 1996; ROSSI, 2001).

Quando a expressão da proteína heteróloga é controlada por um promotor reprimido, elevadas concentrações celulares se faz necessário para melhorar a produtividade do produto heterólogo. Segundo GOMBERT; KILIKIAN, 1997, várias estratégias de cultivo foram propostas na literatura, porém, a maioria dessas estratégias é baseada em monitoramento através de equipamentos caros, que podem restringir o desenvolvimento do processo. GOMBERT & KILIKIAN, 1997 propuseram uma estratégia simples de cultivo, baseado no monitoramento da concentração de glicose por meio de estratégia de alimentação exponencial determinada a partir do balanço de massa e na manutenção da concentração de oxigênio dissolvido no meio acima do valor crítico. Para o cultivo utilizaram uma linhagem de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS e com essa simples estratégia conseguiram alcançar elevadas concentrações celulares e alta produtividade celular no biorreator.

4.5 A produção de proteínas recombinantes em microrganismos

A preferência pelo uso de microrganismos na fabricação de compostos de interesse comercial frente às fontes animal, vegetal ou por síntese química, deve-se, sobretudo, à possibilidade de se obter alta quantidade de produto, por meio de manipulação das condições de cultivo e das características genéticas das células. Embora os microrganismos sejam potenciais produtores de uma ampla variedade de substâncias, eles as produzem nas quantidades necessárias para a sua subsistência. Ou seja, ao longo da evolução, eles desenvolveram mecanismos regulatórios, que impedem a superprodução de metabólitos, quer sejam primários ou secundários. Porém, do ponto de vista industrial o interesse reside, justamente

no fato de a célula microbiana produzir e excretar determinada substância de valor econômico. Para tanto, os mecanismos regulatórios devem ser sobrepujados por meio da variação das condições de cultivo, de mutações induzidas (provocadas por agentes químicos ou físicos) e/ou da manipulação pontual do genoma por meio da técnica do DNA recombinante (VITOLO et al., 2015). No contexto do parque biotecnológico, a indústria de fermentação ocupa um lugar de grande proeminência. Provavelmente, tal condição resulta, entre outras, nas características tais como (DEMAIN, 2007; VITOLO et al., 2015):

A grande razão área por volume apresentadas pelos microrganismos, que facilita a captação de nutrientes do meio de cultura, elevando a taxa metabólica e biossintética do agente catalisador do processo;

- ✓ A grande variedade de reações que o microrganismo é capaz de realizar simultaneamente;
- ✓ A fácil adaptação do microrganismo às condições de cultivo, permitindo que a cepa possa ser transferida da natureza para um frasco com meio de cultura – do tipo sintético ou complexo – e, deste, para um biorreator onde é capaz de crescer em meio constituído por fontes de carbono e nitrogênio baratas, mas que propiciam a célula a produzir substâncias de maior valor agregado;
- ✓ A facilidade com que as células microbianas podem ser submetidas à mutação – quer *in vivo* quer *in vitro* – visando ao aumento da produtividade da substância desejada;
- ✓ A capacidade do microrganismo para produzir substâncias enantioméricas dextrógiras ou levógiras, diferentemente da síntese química tradicional, que sempre leva à mistura racêmica, da qual o enantiômero desejado é de difícil separação e com rendimento pífio (do ponto de vista da escala industrial).

Os venenos animais possuem uma variedade de componentes, que incluem substâncias inorgânicas e orgânicas, e atuam no sentido de imobilizar a presa e digeri-la após a ingestão. Desta forma, estes componentes exercem seus efeitos em diferentes sistemas e tecidos da presa, como no sistema de coagulação, tecidos cardiovasculares, nervoso, renal entre outros. Por essas habilidades, a compreensão dos mecanismos de ação dos venenos e suas toxinas, bem como a utilização desses como ferramentas cientificas, têm contribuído efetivamente para o esclarecimento das bases fisiopatológicas dos envenenamentos e de diferentes doenças. Ademais, a caracterização das ações de toxinas isoladas tem permitido seus empregos como modelos para o desenho de novas moléculas com finalidade terapêutica.

Dentre os diversos animais estudados encontram-se os carrapatos. A saliva destes hematófagos apresenta diversos componentes, como por exemplo, os inibidores e ativadores de proteases. Essas enzimas ganham destaque, pois têm sido amplamente estudadas como interferentes da cascata da coagulação, agentes fibrinolíticos, inflamatórios e formadores de metástases (DREWES, 2011).

4.6 A proteína Amblyomin-X

Amblyomin-X é uma proteína com ação anticoagulante e antitumoral, codificada por um gene proveniente das glândulas salivares do carrapato *Amblyoma cajennense*. Esta espécie pertence à família *Ixodidae*, subfamília *Ammblyomminae* e possui importância médica e veterinária no Brasil por ser parasita de cavalos, gado e cães (DREWES, 2011). Um grupo de pesquisadores do Instituto Butantan descreveu uma biblioteca de ESTs (*expressed sequence tags*) representando os genes presentes nas glândulas salivares do carrapato *Amblyomma cajennense* e, a partir desta biblioteca, foi estabelecido o perfil dos genes transcritos mais expressos pela glândula do carrapato. Amblyomin-X é um inibidor de serina protease do tipo *Kunitz* obtido a partir dessa biblioteca (BATISTA et al., 2008).

Batista et al., 2010 estudaram o uso de Amblyomin-X como inibidor do fator X na cascata de coagulação. DREWES (2011) investigou os mecanismos de ação de Amblyomin-X sobre a angiogenese *in vivo* induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), obtendo resultados promissores. MARIA et al., 2013, apesar de não definirem os mecanismos pelos quais ocorrem a ação apoptótica de Amblymin-X sobre células tumorais, conseguiram definir quais ações que promovem o efeito apoptótico sobre o carcinoma renal murino (RENCA), além de observarem ação seletiva sobre estas, não apresentando ação qualquer sobre células sadias. CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010 estudaram a atividade citotóxica de Amblyomin-X em células tumorais e células normais, observando que após o tratamento com Amblyomin-X a expressão de vários genes relacionados ao ciclo celular foram alteradas. Além disso, o tratamento *in vivo* induziu uma regressão da massa tumoral em um modelo de melanoma murino de rato (B16F10), diminuindo o número de eventos metastáticos. Concluíram ainda a ação seletiva de Amblyomin-X sobre células tumorais.

Amblyomin-X é uma proteína de cadeia única de 13.491 Da que contém sete resíduos de cisteína. O gene codificador de Amblyomin-X foi clonado no microrganismo *Escherichia coli*

BL21DE3, que passou a expressar a proteína de interesse, inicialmente em cultivos com meio de cultura adequado em incubador rotativo (BATISTA et al., 2010).

Para essa clonagem, foram elaboradas duas diferentes linhagens com construções plasmideal distintas de *Escherichia coli* BL21(DE3). A primeira construção corresponde a proteína denominada Nativa, que contém a sequência de proteína heteróloga recombinante semelhante à sequência selvagem, possui promotor T5 induzido por IPTG, genes de resistência a ampicilina e origem de replicação Ori_pUC. A segunda construção corresponde a proteína denominada Mutada que contém a sequência de proteína heteróloga recombinante modificada pela troca de uma cisteína por uma serina (para evitar a formação de agregados protéicos, favorecendo a etapa de *dowstream* sem alterar a função da proteína). Essa construção possui promotor T7 induzido por IPTG, genes de resistência a canamicina e origem de replicação Ori_pUC. (Informação verbal – Noticia fornecida por Juliana Mozer Sciani – Instituto Butantan).

4.7 Otimização do processo de produção de Amblyomin-X

A otimização de experimentos biológicos, por exemplo, otimização da condição de crescimento tem importância crescente nos dias de hoje. A razão é que a otimização torna os experimentos eficientes no tempo, recursos e custos (TESAROVA, 2010).

Segundo CAMPANO, 2010, os fatores mais comumente otimizados na produção de proteínas recombinantes são: i) a concentração de IPTG; ii) a temperatura de indução e iii) a temperatura de crescimento. Alguns autores obtiveram respostas significativas ao estudarem diferentes concentrações de IPTG. PAREKH; PATEL, 2012 obtiveram resultados satisfatórios testando diferentes concentrações de IPTG para a produção de proteína recombinante com *Escherichia coli*. LARENTIS et al., 2014 concluíram que o indutor IPTG comumente utilizado na concentração de 1mM pode ser usada numa concentração dez vezes menor, mantendo a expressão em níveis semelhantes, causando menor dano ao crescimento celular.

A variação de diversos fatores e várias condições para cada fator simultaneamente leva à necessidade de um maior número de experiências para abranger a mesma informação do que seria necessário usando o projeto experimental (LARENTIS et al., 2011). Na otimização, o planejamento experimental é claramente preferível a métodos que variam uma variável de cada vez, já que com uma abordagem de variável única é provável que o experimentador termine em um quase-ótimo (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008).

O planejamento experimental é um método adequado para projetos complexos de experimentos parcialmente ou totalmente controlados, onde a incerteza ocorre. É um conjunto de regras e métodos que efetivamente conduzem e analisam todo o experimento desde o seu projeto até sua realização. Pode-se detectar influência da variável aleatória ao resultado do experimento, correlação entre fatores e criação de descrição matemática dessas influências. Entre as etapas gerais do planejamento experimental, estão: a análise do problema, a determinação de fatores dependentes e independentes, combinação variada de fatores, quantidade de observação, redesenho, criação de descrição matemática e verificação de resultados (TESAROVA, 2010).

O planejamento composto central rotacional é uma das técnicas que consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos, que podem ser usados no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). É uma técnica estatística baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, que, desde então, tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

A tecnica de planejamento experimental para a otimização da expressão de proteína recombinante é ainda pouco empregado para a análise de variaveis relacionadas com a expressão da proteína alvo. Porém, existem alguns grupos de pesquisas que utilizam o planejamento experimental para a expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*, avaliando os efeitos das variaveis no momento de indução, tais como, a temperatura de indução, tempo de pós-indução, concentração celular, concentração do indutor, tipo de cepa e plasmideo, além de outras veriaveis relacionadas ao meio de cultura (LARENTIS et al., 2011).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Microrganismo

O microrganismo empregado nos experimentos foi a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 que carrega o plasmídeo pjexpress411:113147-KPL2_C73S_OptEc_T7, cedido pelo Instituto Butantan.

5.2 Meios de Cultura

Para a etapa de crescimento da bactéria foram utilizados os meios descritos a seguir:

Meio LB (Luria Bertani) de reativação (shaker) (em g L-1): Triptona, 10,0; Extrato de levedura, 5,0; NaCl, 10,0.

Meio do inóculo (em g L-1): Glicose, 10,0; KH2PO4, 13,0; K2HPO4, 10,0; (NH4)2HPO4, 3,0; NaH2PO4.H2O, 4,6; MgSO4.7H2O, 0,46; Extrato de levedura, 1,0; 3 ml de uma solução de micronutrientes contendo (g l-1): FeCl3.6H2O, 41,14; ZnSO4.7H2O, 2,73; CoCl2.6H2O, 2,0; Na2MoO4.2H2O, 2,0; CaCl2.2H2O, 24,6; CuCl2.2H2O, 1,27; H3BO3, 0,5; Al2(SO4)3.16H2O, 1,6; MnSO4.H2O, 6,8; 100 ml de HCl 37%.

Meio de Crescimento (em g L-1): Glicose, 3,0; KH2PO4, 13,0; K2HPO4, 10,0; (NH4)2HPO4, 3,0; NaH2PO4.H2O, 4,6; MgSO4.7H2O, 2,0; extrato de levedura, 1,0; e 3 mL de uma solução de micronutrientes contendo (g L-1): FeCl3.6H2O, 41,14; ZnSO4.7H2O, 2,73; CoCl2.6H2O, 2,0; Na2MoO4.2H2O, 2,0; CaCl2.2H2O, 24,6; CuCl2.2H2O, 1,27; H3BO3, 0,5; Al2(SO4)3.16H2O, 1,6; MnSO4.H2O, 6,8; 100 ml de HCl 37%.

Solução de Alimentação (em g L-1): Glicose, 600,0; MgSO4·7H2O, 25,90.

5.3 Antibiótico

Utilizou-se canamicina (INLAB) na concentração final de 50 µg/mL, filtrada em membrana 0,22µm estéril em fluxo laminar, para o meio LB, Meio de Inóculo e Meio de Crescimento.

5.4 Preparo do Pré-Inóculo

Inoculou-se 500µL de suspensão de *Escherichia coli* (conservada em freezer a -80°C) em dois frascos do tipo Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio LB de reativação. Os frascos foram colocados em um incubador rotativo (*shaker*) a 37°C e 200 rpm durante 10 horas.

5.5 Preparo do Inóculo

Inoculou-se quatro frascos tipo Erlenmeyer de 1L com 2 mL de suspensão do pré-inóculo em 200 mL de Meio de Crescimento. Os frascos foram colocados em incubador rotativo por 3 horas a 37°C e 200 rpm. Após esse tempo, inoculou-se o reator com 700 mL de inóculo (10% v/v).

5.6 Cultivo em biorreator

Os ensaios em biorreator foram conduzidos em um biorreator Biostat C plus (15 L) aerado e agitado mecanicamente com volume útil inicial de 7 L. Esse reator dispõe de controle automático das variáveis temperatura, pH e oxigênio dissolvido. Foi acoplado a ele um analisador de gases (CO_2 e O_2) da marca *Hartmann Braun*.

A temperatura do biorreator durante a etapa de crescimento da *Escherichia coli* foi controlada em 37°C e o pH em 7,0. O controle do pH foi realizado com a adição de NH_4OH (1:1) e H_2SO_4 4N. O biorreator foi agitado e aerado de acordo com a demanda de oxigênio necessária para cada ensaio, partindo-se de 3,5 vvm e 400 rpm até 10 vvm e 1200 rpm.

A estratégia de alimentação seguiu o modelo de GOMBERT; KILIKIAN, 1997 que seguiram com uma estratégia simples baseado no controle de glicose a partir de balanço de massa e na manutenção da concentração de oxigênio dissolvido acima de um valor mínimo.

5.7 Métodos Analíticos

Durante a realização dos ensaios foram retiradas amostras de material a cada duas horas a partir do momento de inoculação no biorreator (etapa de crescimento celular) e a cada hora a partir do momento de indução (etapa de biossíntese da proteína) para a realização das seguintes análises: glicose, ácido acético, concentração celular e proteína. Medidas da porcentagem de CO_2 e O_2 na vazão de gás de saída do reator foram anotadas a cada meia hora para o cálculo da quantidade de oxigênio consumida na respiração microbiana e da quantidade de CO_2 produzida e liberada durante as etapas de crescimento e produção da proteína.

5.8 Concentração Celular (X)

A concentração celular foi determinada pela medida de massa seca em g/L de célula. Volumes conhecidos de amostras foram filtradas em membrana 0,22 µm (Millipore®) de massa conhecida, que foram mantidas em estufa a 105°C até massa constante.

5.9 Determinação da concentração de glicose e ácido acético

As concentrações de glicose e ácido acético foram determinadas no sobrenadante por cromatografia de fase líquida (HPLC).

Para a análise de glicose foi utilizado um cromatógrafo da marca *Waters*, com detector de índice de refração e uma coluna *Shodex* SC 1011. O tempo de corrida foi de 30 minutos, utilizando EDTA-Ca (0,187 g/L) como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min. A curva de calibração do aparelho foi realizada utilizando uma solução de glicose com diluições na faixa de 0,1 a 10,0 g/L.

Para a análise de ácidos foi utilizado um cromatógrafo da marca *Waters*, com detector de índice de refração e uma coluna *Shodex* SH 1011. O tempo de corrida foi de 20 minutos, utilizando H_2SO_4 0,05N como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min. A curva de calibração do aparelho foi realizada utilizando uma solução de ácido acético com diluições na faixa de 0,1 a 10,0 g/L.

5.10 Quantificação da proteína Amblyomin-X

As amostras dos ensaios em biorreatores foram tratadas por método químico utilizando uma solução detergente (Bugbuster® *Protein Extraction Reagent*), uma vez que a proteína de interesse estava na forma de copos de inclusão, a extração e purificação da proteína foi realizada de acordo com as indicações do fabricante.

A concentração da proteína recombinante Amblyomin-X foi quantificada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Para confirmar que o resultado da quantificação da proteína realizada pelo método de Bradford se referia apenas à proteína recombinante, algumas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que mostraram apenas a banda de Amblyomin-X, confirmando que a metodologia de purificação foi eficiente.

Todos os ensaios foram tratados em triplicatas.

5.11 Tratamento dos Dados Experimentais

5.11.1 Velocidades instantâneas

As definições das velocidades instantâneas de transformação são definidas pelas expressões abaixo:

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad r_S = \frac{-dS}{dt} \quad r_P = \frac{dP}{dt}$$

r_X → Velocidade instantânea de crescimento celular (g/L.h)

r_S → Velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L.h)

r_P → Velocidade instantânea de formação de produto (g/L.h)

d_X → Variação de crescimento celular (g/L)

d_S → Variação de consumo de substrato (g/L)

d_P → Variação de formação de produto (g/h)

d_t → Variação do tempo (h)

5.11.2 Velocidades específicas

Devido ao aumento da concentração celular durante o cultivo, que por consequência aumenta a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato S no produto P, fez-se necessário analisar os valores das velocidades instantâneas em relação à referida concentração celular, especificando-as de acordo com o valor dessa naquele instante:

$$\mu_X = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} \quad \mu_S = \frac{1}{X}\left(\frac{-dS}{dt}\right) \quad \mu_P = \frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$$

μ_X → Velocidade especifica de crescimento celular (h-1)

μ_S → Velocidade especifica de consumo de substrato (gsubstrato/(gcélula.h)

μP → Velocidade especifica de formação de produto (gproduto/gcélula.h)

Integrando a equação de velocidade específica de crescimento celular obtemos,

$$ln\frac{X}{X_0} = \mu_X.(t - t_0)$$

Onde, num gráfico de $ln_{(X/X0)}$ pelo tempo, é possível o ajuste de retas com o coeficiente angular igual à μ_X. O intervalo de tempo em que se observa a reta com maior inclinação corresponde ao $\mu_{Xmáx}$ (fase exponencial de máximo crescimento celular).

5.11.3 Fator de Conversão Substrato em Célula

Define-se o termo $Y_{X/S}$ como o fator de conversão substrato em célula, calculado como a razão entre a variação da quantidade de célula (X) formada pela variação da quantidade do substrato (S) consumido.

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta_m célula}{\Delta_m substrato}$$

$Y_{X/S}$ → Fator de conversão de substrato em célula (gcélula/gsubstrato)

Dm $_{célula}$ → Variação da quantidade de célula (g)

Dm $_{substrato}$ → Variação da quantidade de substrato consumido (g)

5.11.4 Fatores de Conversão Substrato em Produto

Define-se o termo YP/S como o fator de conversão substrato em produto, calculado como a razão entre a variação da quantidade de produto (P) formado pela variação da quantidade do substrato (S) consumido.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta_m produto}{\Delta_m substrato}$$

YP/S → Fator de conversão de substrato em produto (gproduto/gsubstrato)

Dm $_{produto}$ → Variação da quantidade de produto (g)

Dm $_{glicose}$ → Variação da quantidade de substrato consumido (g)

5.11.5 Produtividade em células (P_X) e produtividade em produto (Pp)

A produtividade em células no biorreator é definida como a razão entre a concentração celular pelo tempo de reação, expressa em g/L.h.

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{T_f - T_0}$$

P_X → Produtividade em células (g/L.h)

X_m → Concentração final de células (g/L)

X_0 → Concentração inicial de células (g/L)

T_f → Tempo final ou total (h)

T_0 → Tempo inicial (h)

A produtividade do produto no biorreator é definida como a razão entre a concentração do produto pelo tempo de reação, expressa em g/(L.h).

$$P_P = \frac{P_m - P_0}{T_{fP}}$$

Px → Produtividade do produto (g/L.h)

Pm → Concentração final do produto (g/L)

P0 → Concentração inicial do produto (g/L)

TfP → Tempo total entre o inicio e o término da produção do produto (h)

5.12 Calculo da vazão de alimentação

Balanço de massa para substrato no biorreator

$$\frac{dS}{dt} = \frac{F}{V}.(S_i - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}}$$

Multiplicando tudo pelo Volume líquido do biorreator:

$$\frac{V.dS}{dt} = F.(S_i - S) - \frac{\mu X.V}{Y_{X/S}}$$

Para manter a vazão F exponencial de maneira a impor uma velocidade específica de crescimento menor que a máxima, denominada de μ_{lim}:

$$VX = V_0.X_0.e^{\mu lim.t}$$

$$S = S_0 \therefore \frac{dS}{dt} = 0$$

Onde S_0 corresponde à concentração de substrato no início da alimentação e S corresponde à concentração de substrato no biorreator durante a alimentação.

Supondo uma vazão exponencial do tipo:

$$F = Ae^{Bt}$$

Então:

$$F(S_i - S) = \frac{\mu XV}{Y_{X/S}}$$

$$Ae^{Bt}(S_i - S) = \frac{\mu lim.X_0.V_0.e^{\mu lim.t}}{Y_{X/S}}$$

Para que a igualdade acima seja válida:

$$A = \frac{\mu lim.X_0.V_0}{Y_{\frac{X}{S}}.(S_i - S)}$$

$$B = \mu lim$$

Chegando à equação final:

$$F = \frac{X_0 . V_0 . \mu lim . e^{\mu lim . t}}{S_i . Y_{X/S}}$$

X_0 → Concentração celular no início da alimentação (o valor foi estimado a partir da relação da DO e concentração celular de ensaios anteriores, onde foi obtida uma equação da reta que permitiu calcular em tempo real um valor de X_0 próximo do valor real).

µlim → Velocidade especifica de crescimento celular pré-fixada.

$Y_{X/S}$ → Valor estimado do fator de conversão substrato em célula a partir de ensaios anteriores (gcélula/gsubstrato).

S_i → Concentração de glicose da solução de alimentação (g mL^{-1}).

F → Vazão de alimentação no reator na etapa de batelada alimentada (mL h^{-1}).

V → Volume do reator calculado no início da alimentação (L).

A equação gerou uma curva e após a sua discretização, foi possível impor valores de vazão da bomba de alimentação para cada 10 minutos durante toda a etapa de batelada alimentada.

5.13 Planejamento experimental - Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Para a definição da melhor condição de produção da proteína Amblyomin-X, foram estudados três fatores independentes durante a etapa posterior à indução da produção da proteína recombinante: concentração de concentração celular (X), concentração de IPTG [IPTG] e temperatura (T).

O delineamento composto central rotacional é utilizado para experimentos onde k(fatores) ≥ 2. Contém pontos da parte cúbica codificados para (± 1), pontos axiais codificados para (± α, onde $\alpha = (2k)^{1/4}$) para testar o modelo de segunda ordem e o ponto central codificado para (0), geralmente com 3 repetições. Assim, o número de tratamentos possui: fatorial 2^k + 3 pontos centrais + 2k pontos axiais. Nesse caso, $2^3 + 3 + 2*3 = 17$ tratamentos.

Aos três fatores foram aplicados cinco níveis codificados e três repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios. A variável dependente para esse estudo foi a concentração de proteína recombinante obtida ao final de 4 horas da etapa posterior à indução com IPTG.

A Tabela 1 mostra os níveis codificados na primeira coluna e os níveis reais nas demais colunas das variáveis independentes (fatores a serem estudados no processo, que podem ser controladas).

Tabela 1 Níveis codificados e reais das variáveis independentes

Níveis	T	X	[IPTG]
-1,68	26,0	12,0	0,10
-1	28,4	19,3	0,49
0	32,0	30,0	1,05
1	35,6	40,7	1,61
1,68	38,0	48,0	2,00

A Tabela 2 mostra os valores os valores atribuídos a cada um dos 17 ensaios.

Tabela 2 Quadro de ensaios do planejamento composto central rotacional

Ensaios	Temperatura (°C)	Concentração celular (g/L)	Concentração de IPTG (mM)
1	28,4	19,3	0,49
2	28,4	19,3	1,61
3	28,4	40,7	0,49
4	28,4	40,7	1,61
5	35,6	19,3	0,49
6	35,6	19,3	1,61
7	35,6	40,7	0,49
8	35,6	40,7	1,61
9	26,0	30,0	1,05
10	38,0	30,0	1,05
11	32,0	12,0	1,05
12	32,0	48,0	1,05
13	32,0	30,0	0,10
14	32,0	30,0	2,00
15	32,0	30,0	1,05
16	32,0	30,0	1,05
17	32,0	30,0	1,05

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para encontrar a melhor condição de condução do processo de produção da proteína Amblyomin-X foi necessária a condução de 17 diferentes ensaios em biorreatores. O item 6.1 mostra os resultados experimentais da condução desses 17 ensaios enquanto o item 6.2 apresenta e discute as superfícies da resposta, nesse caso, a influência dos fatores concentração celular, temperatura e concentração do indutor IPTG na etapa de produção da proteína recombinante.

6.1 Ensaios em biorreatores para o planejamento experimental

No item 5.13 de Materiais e Métodos a Tabela 2 mostra todos os ensaios conduzidos para a elaboração do projeto experimental. Mostra também que o Ensaio 12 foi programado para obter a maior concentração celular no início da etapa de indução: 48 g/L. Como uma das variáveis independentes do projeto experimental era a concentração celular no momento da indução, ou seja, no início da etapa de biossíntese da proteína, buscou-se uma estratégia única de crescimento celular que pudesse ser estendida a todos os ensaios, qualquer que fosse a concentração celular no início da etapa de biossíntese da proteína. Essa estratégia de condução aplicada em todos os ensaios é explicada a seguir para o Ensaio 12, cujos resultados experimentais são mostrados nas Figuras 3, 4, 5 e 6.

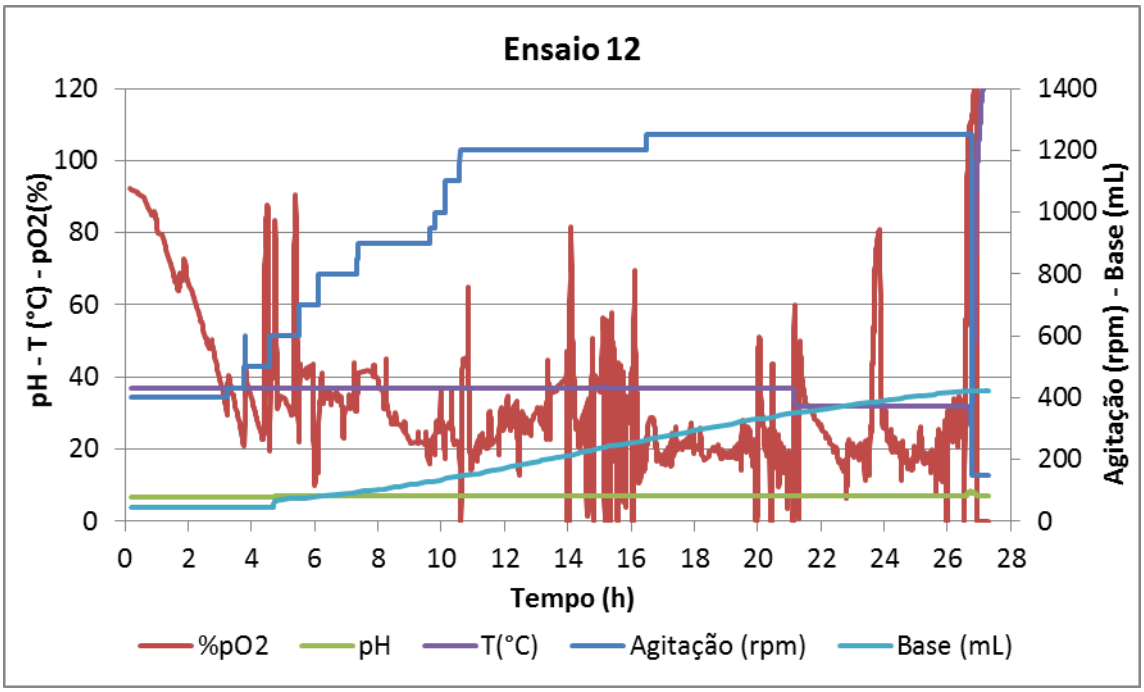
Os ensaios iniciaram-se com uma etapa de crescimento em batelada com concentração de glicose em torno de 4 g/L. Nesse momento, a %pO2 era 100%, a agitação do reator era igual a 400 rpm, a temperatura do reator 37°C, o pH ajustado em 6,8, a razão entre o volume de ar e volume do reator de 0,5 vvm. Devidamente preparados, os reatores eram então inoculados com 10% do volume de inóculo e a etapa de crescimento microbiano iniciada (Figura 3).

Seguia-se então essa etapa até o consumo total da glicose no meio, tempo esse que variava entre 4 e 5 horas, dependendo da concentração inicial do inóculo. A estratégia inicialmente proposta era de crescimento celular dividido em apenas duas etapas: uma batelada (cujo crescimento não limitado resultaria na produção de ácido acético) e outra batelada alimentada, necessária para manter a concentração de glicose em valores próximos de zero, de maneira a evitar a formação de ácido acético, inibidor do crescimento celular.

Porém, como a vazão mínima requerida da solução de glicose (para a população microbiana daquele momento) era menor que a mínima proporcionada pela bomba, optou-se por dar alguns pequenos pulsos da solução de glicose, de maneira a aumentar a concentração celular,

até possibilitar a utilização da bomba com perfil exponencial calculado de adição da solução de glicose. Dessa maneira, após o término da glicose, foram realizados 3 pulsos de 10 g de glicose, adições essas norteadas pelo aumento da %pO_2, e, então, ligada a bomba de alimentação da solução de glicose em vazão exponencial específica para o consumo microbiano daquele momento. Uma vez iniciada a vazão da solução de glicose, esta era modificada manualmente a cada 10 minutos, de maneira a resultar em um perfil exponencial com velocidade específica igual a 0,2 h^{-1}. À medida que a concentração celular, bem como a vazão de alimentação aumentavam, primeiramente a agitação e posteriormente a aeração eram aumentadas progressivamente pelo controlador do reator, de maneira a manter a %pO2 em valores sempre acima de 20%. Dependendo da concentração celular desejada (coluna 3 da Tabela 2), e para o Ensaio 12 a concentração celular desejada era de 48 g/L, estabelecia-se uma agitação máxima de 1200 rpm e aeração máxima de 1,5 vvm (máxima velocidade de transferência de oxigênio (OTR)) e uma vez atingida essa máxima velocidade de transferência, mantinha-se a vazão de alimentação de glicose fixa até a obtenção da concentração celular desejada. As variáveis monitoradas pelo MFCS (Multi Fermentor Computer System): %pO2, temperatura, pH, agitação, aeração e adição de base para o controle de pH eram lidas e gravadas em tempo real (Figura 3).

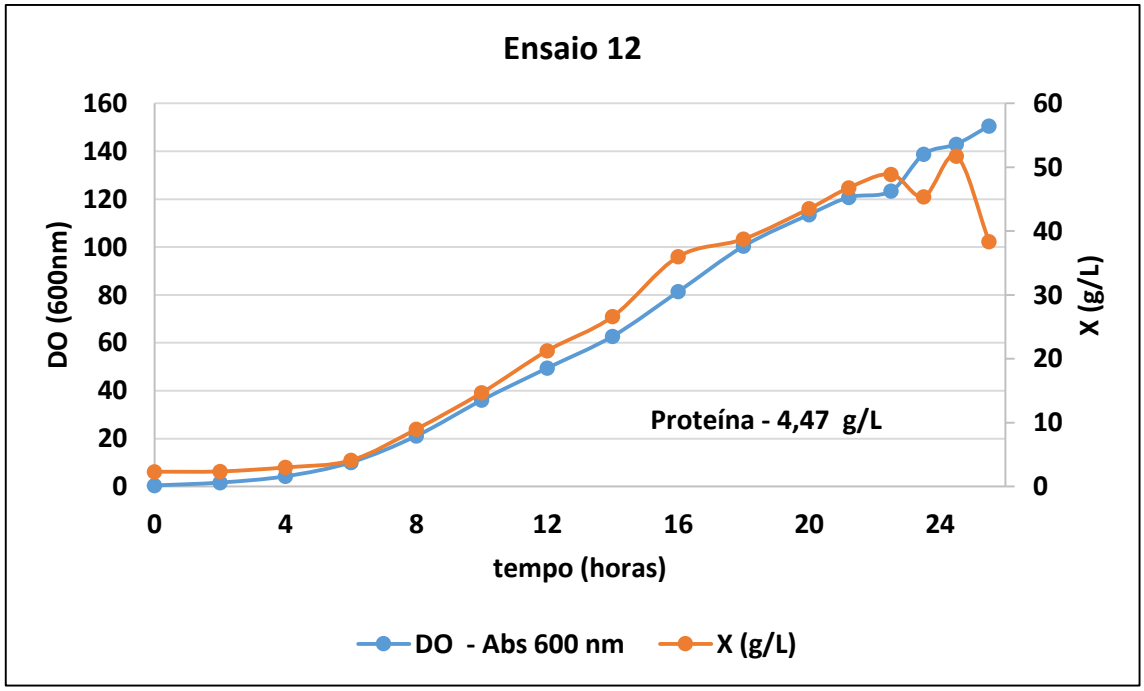
Figura 3 Monitoramento do Ensaio 12 em tempo real (MFCS)



Esse monitoramento foi bastante útil na avaliação da vazão de alimentação, bem como no controle da produção de ácido acético. Observa-se na Figura 3 o perfil de consumo de base bastante semelhante ao perfil de crescimento celular. Dessa maneira, quando se observava a formação de um patamar no consumo de base, verificou-se acúmulo de glicose (vazão de alimentação maior que o consumo) e posterior acúmulo de ácido acético. A observação desses patamares resultava em cessar a alimentação (desligava-se a bomba de alimentação) e religar apenas no momento em que o consumo de base voltasse a acontecer, com consequente aumento rápido da %pO_2 para valores elevados, significando o término do substrato glicose dentro do reator.

Essa estratégia possibilitou alcançar 46,8 g/L em 21,2 horas, tempo esse da adição do IPTG (indução da proteína) e início da etapa de 4 horas de biossíntese da proteína Amblyomin (Figura 4).

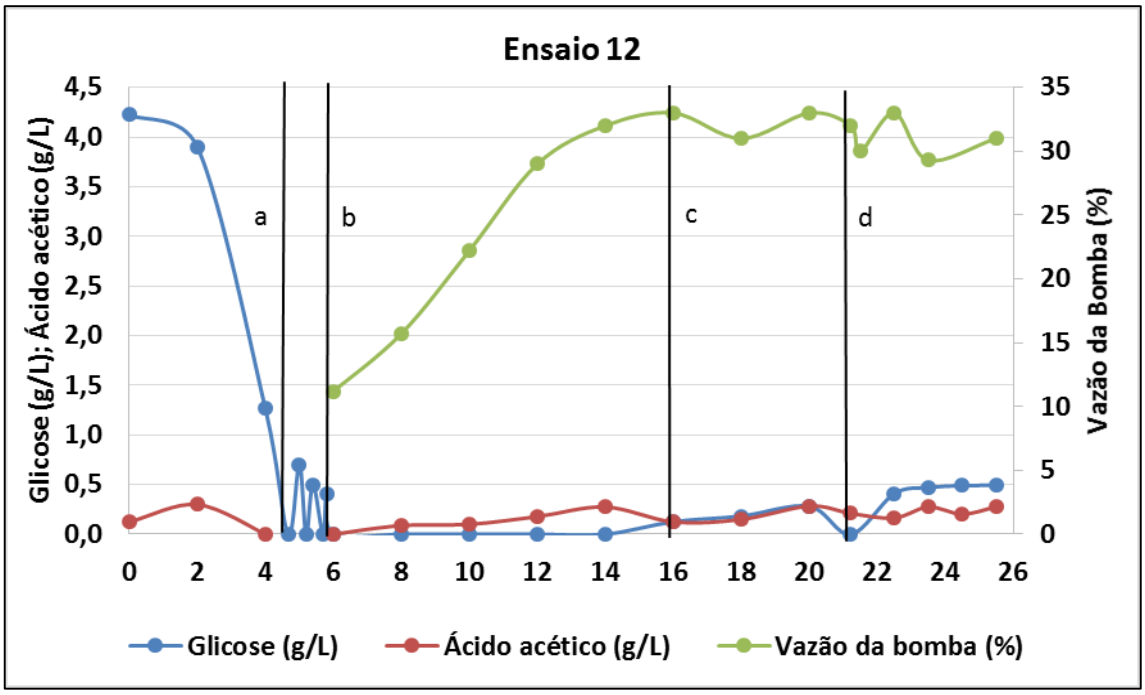
Figura 4 Perfis de densidade óptica - DO (600nm) e concentração celular X (g/L) ao longo do tempo para o Ensaio 12



A Figura 5 mostra os 5 diferentes estágios que caracterizaram a estratégia de condução de processo adotada para ensaios do planejamento experimental. Do início do processo (inoculação) até a linha “a” caracterizou-se a etapa em batelada. Entre as linhas “a” e “b” foi o período caracterizado pela adição dos três pulsos de glicose. Entre as linhas “b” e “c” foi o período caracterizado pela alimentação exponencial da solução de glicose até alcançar a

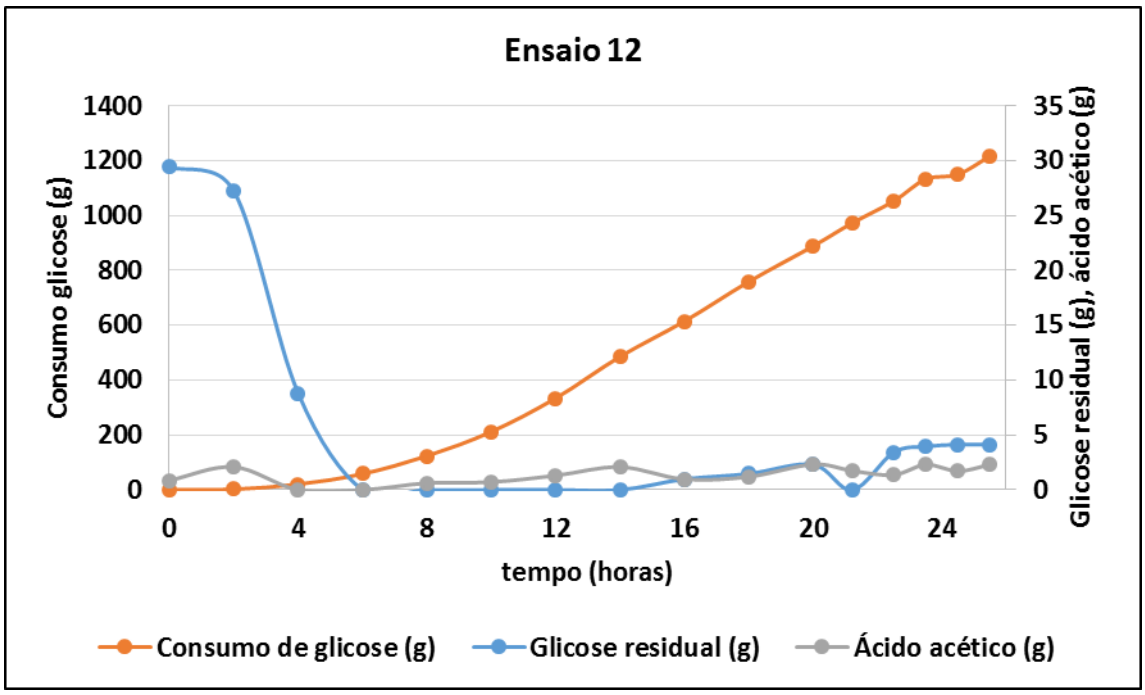
máxima velocidade de transferência de oxigênio (OTR) para o biorreator e as condições empregadas (máxima agitação e aeração). Entre as linhas “c” e “d” foi o período de vazão constante de alimentação (mantendo %pO2 acima de 20%) até a obtenção da concentração celular desejada e, finalmente a linha “d” mostrou o momento de adição do indutor IPTG. Minutos antes dessa adição era desligada a bomba de alimentação da solução de glicose, esperava-se o aumento da $\%pO_2$, indicando o consumo completo da glicose no meio de cultivo e então era adicionada a quantidade de IPTG necessária para a concentração específica de cada ensaio (Tabela 2). Esperava-se cerca de dois minutos para homogeneização completa da solução de IPTG adicionada e então ligada novamente a bomba de alimentação da solução de glicose, na porcentagem em que esta se encontrava antes da indução. Durante as 4 horas de biossíntese que se seguiam, amostras eram coletadas a cada 1 hora para análise de concentração celular, densidade óptica, pH e concentração da proteína.

Figura 5 Perfis das concentrações de glicose e ácido acético e da vazão da bomba de alimentação da solução de glicose



Como o ensaio caracterizou-se pela variação de volume do reator ao longo do tempo, todos os cálculos de fatores de conversão foram realizados em massa (Figura 6). A estimativa do volume do reator ao longo do tempo considerava o volume inicial, os volumes das amostradas retiradas e os volumes adicionados das soluções de glicose e de NH_4OH (para a manutenção do pH).

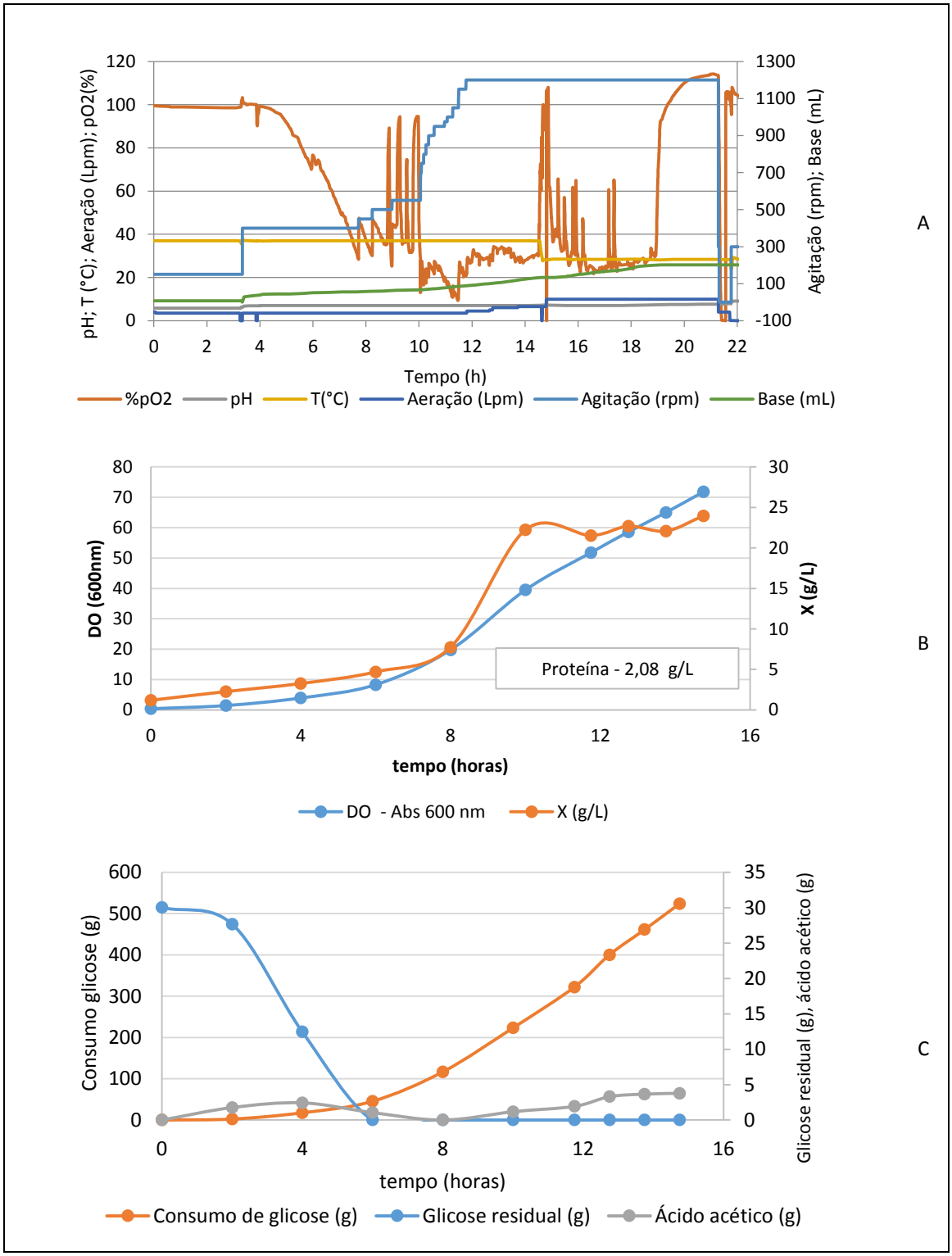
Figura 6 Perfil da quantidade de glicose consumida e das massas residuais de glicose e ácido acético ao longo do tempo para o Ensaio 12



Essa estratégia explicada no Ensaio 12 foi estendida a todos os ensaios do planejamento experimental e os resultados experimentais mostrados nas Figura 3, Figura 4 e Figura 6 para o Ensaio 12 são mostrados nas Figura 7 a Figura 22 (A, B e C, respectivamente) para os demais ensaios do planejamento experimental.

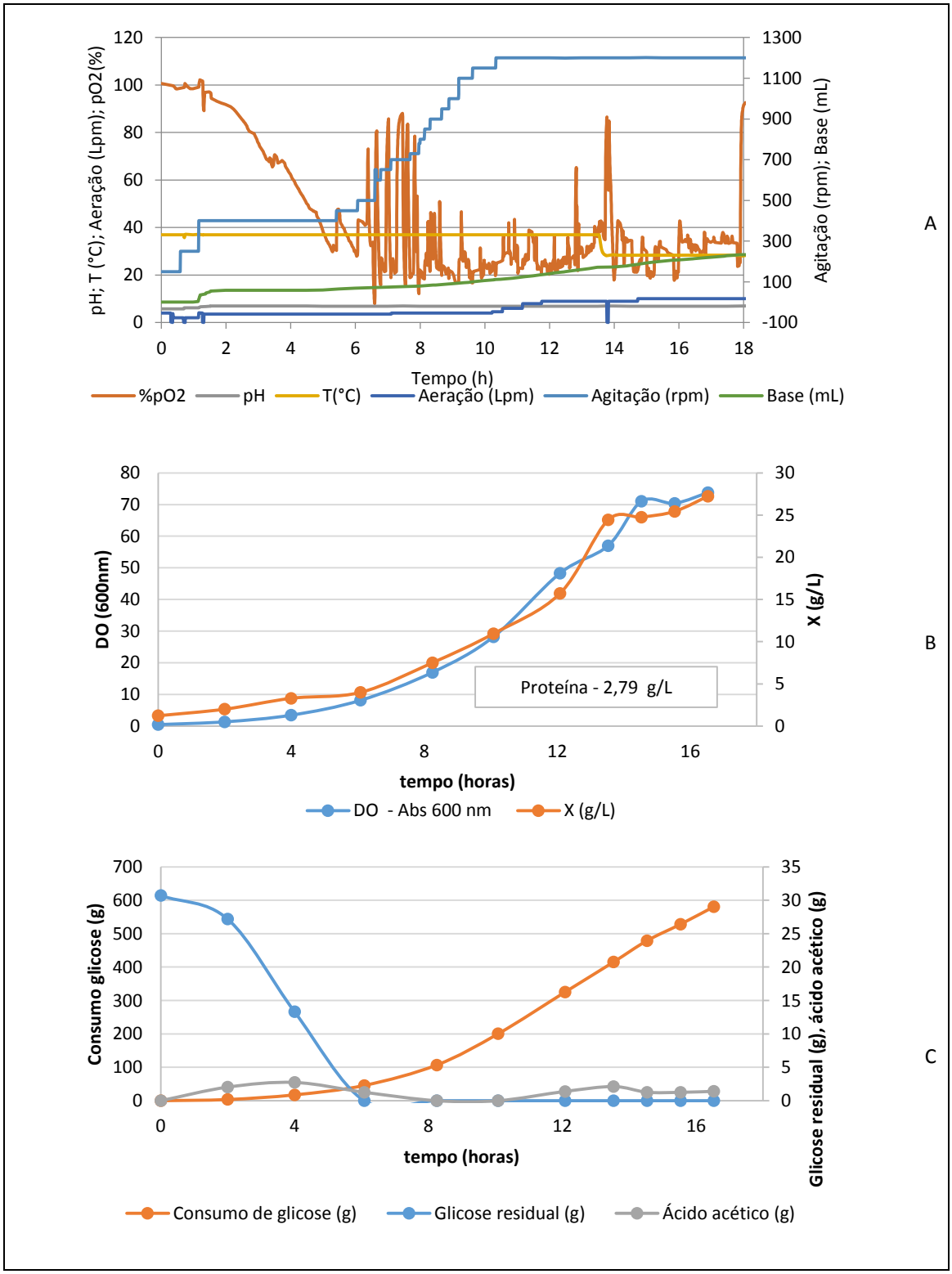
A Figura 7 refere-se ao ensaio 1 do planejamento experimental, induzido a 28,4°C, com concentração celular de 19,30 g/L e IPTG 0,50 mM.

Figura 7 Resultados experimentais para o Ensaio 1 do planejamento experimental



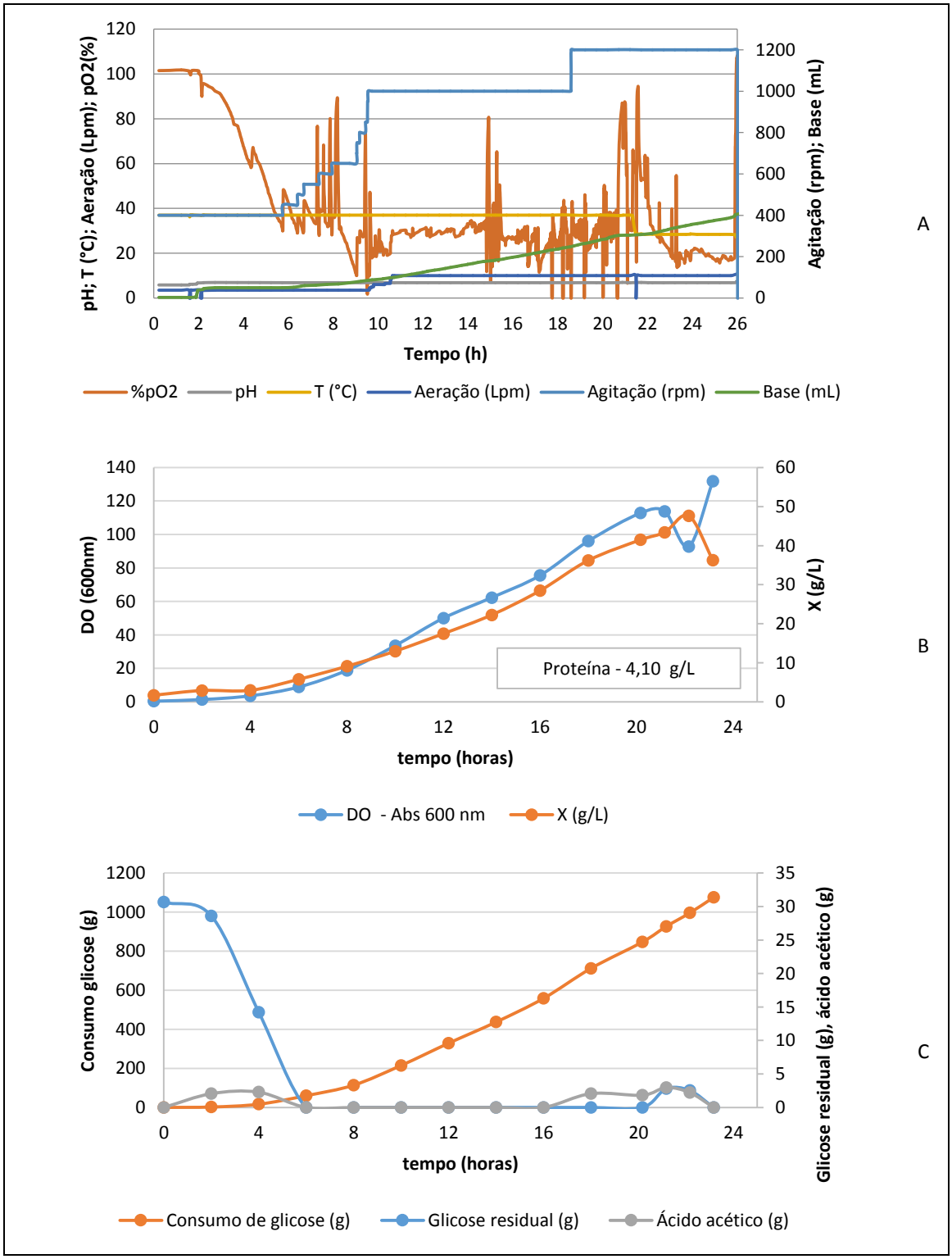
A Figura 8 refere-se ao ensaio número 2 do planejamento experimental, induzido a 28,4°C, com concentração celular de 19,30 g/L e IPTG 1,60 mM.

Figura 8 Resultados experimentais para o Ensaio 2 do planejamento experimental



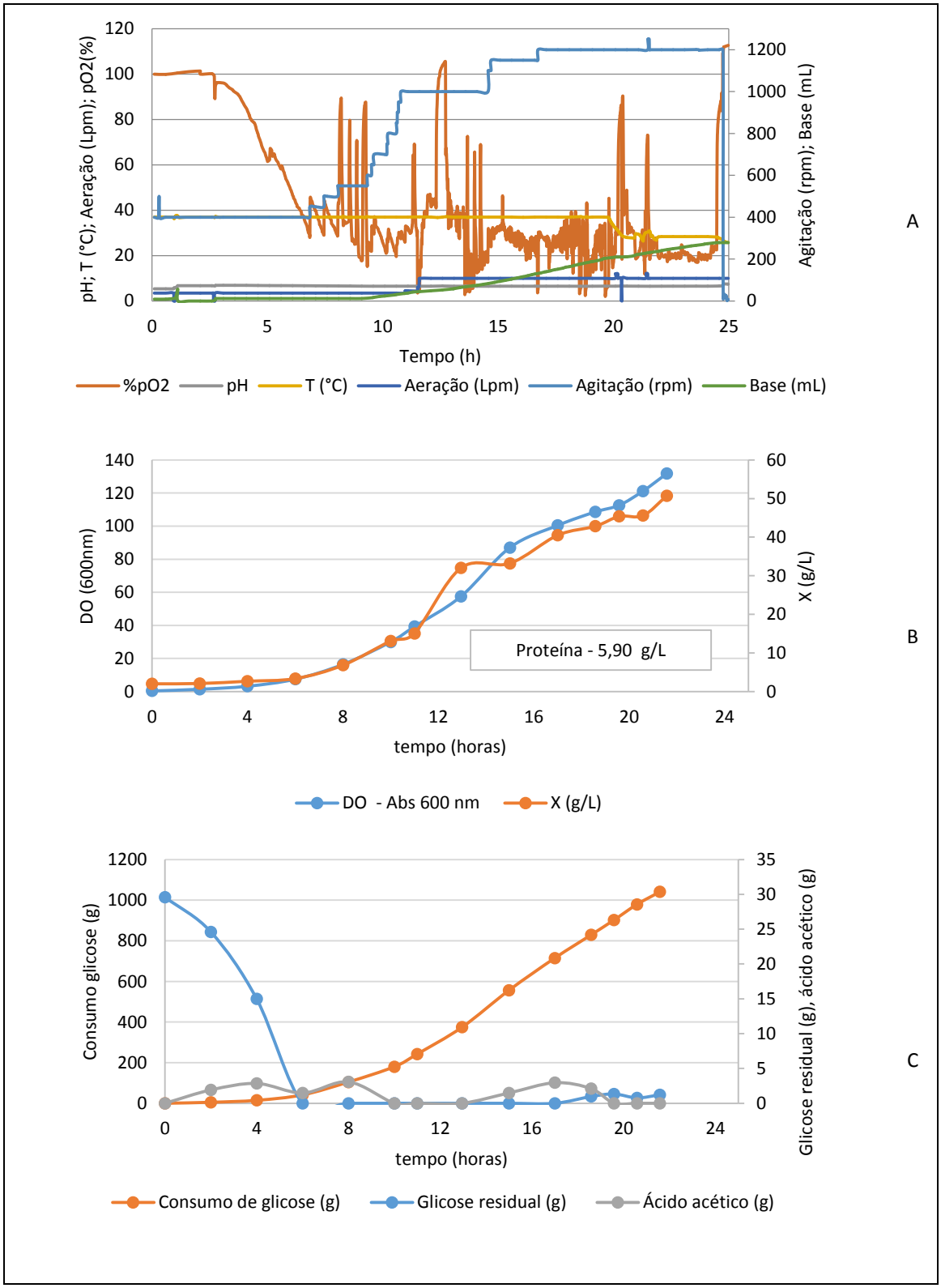
A Figura 9 refere-se ao ensaio número 3 do planejamento experimental, induzido a 28,4°C, com concentração celular de 40,70 g/L e IPTG 0,50 mM.

Figura 9 Resultados experimentais para o Ensaio 3 do planejamento experimental



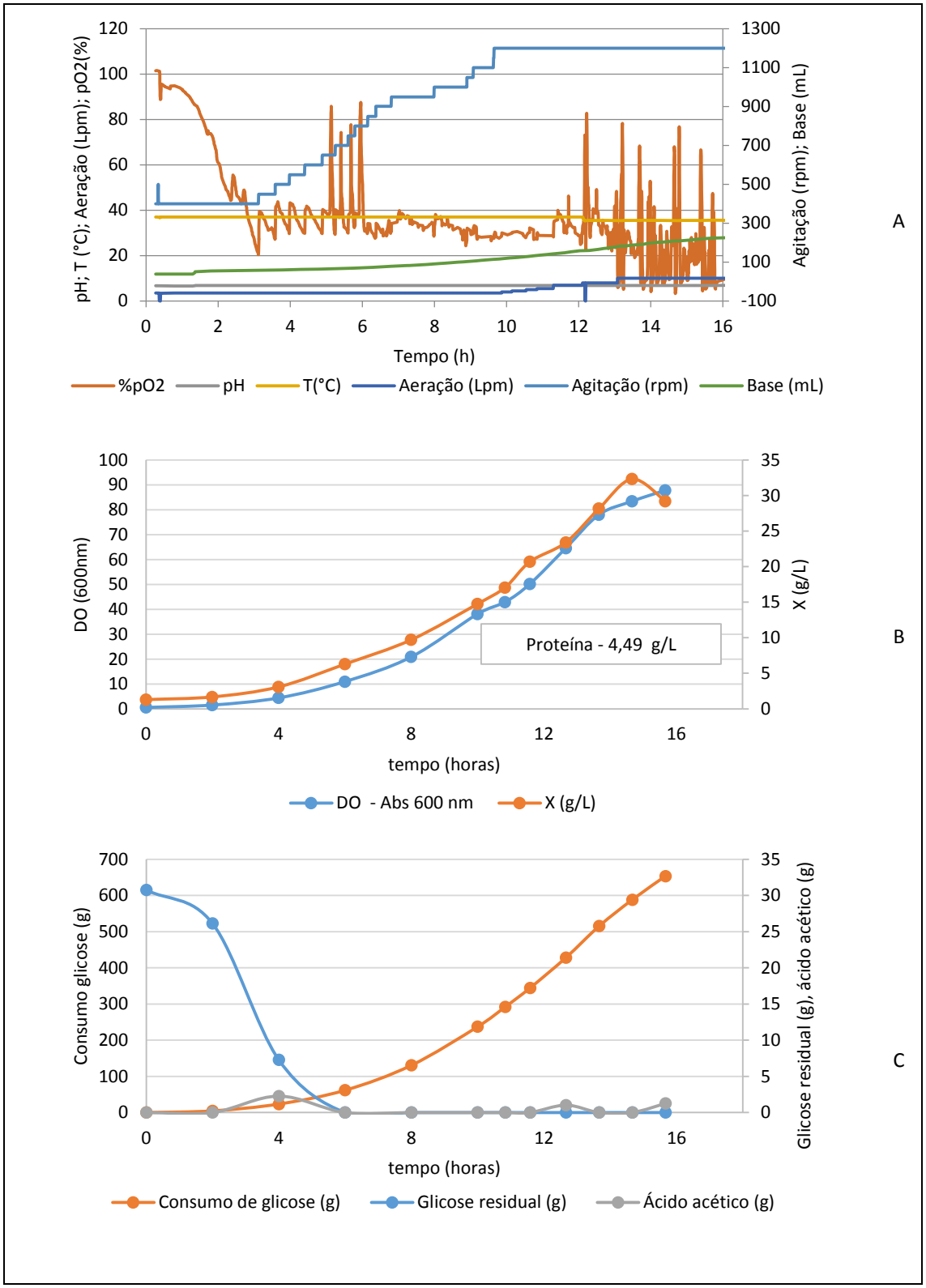
A Figura 10 refere-se ao ensaio número 4 do planejamento experimental, induzido a 28,4°C, com concentração celular de 40,70 g/L e IPTG 1,60 mM.

Figura 10 Resultados experimentais para o Ensaio 4 do planejamento experimental



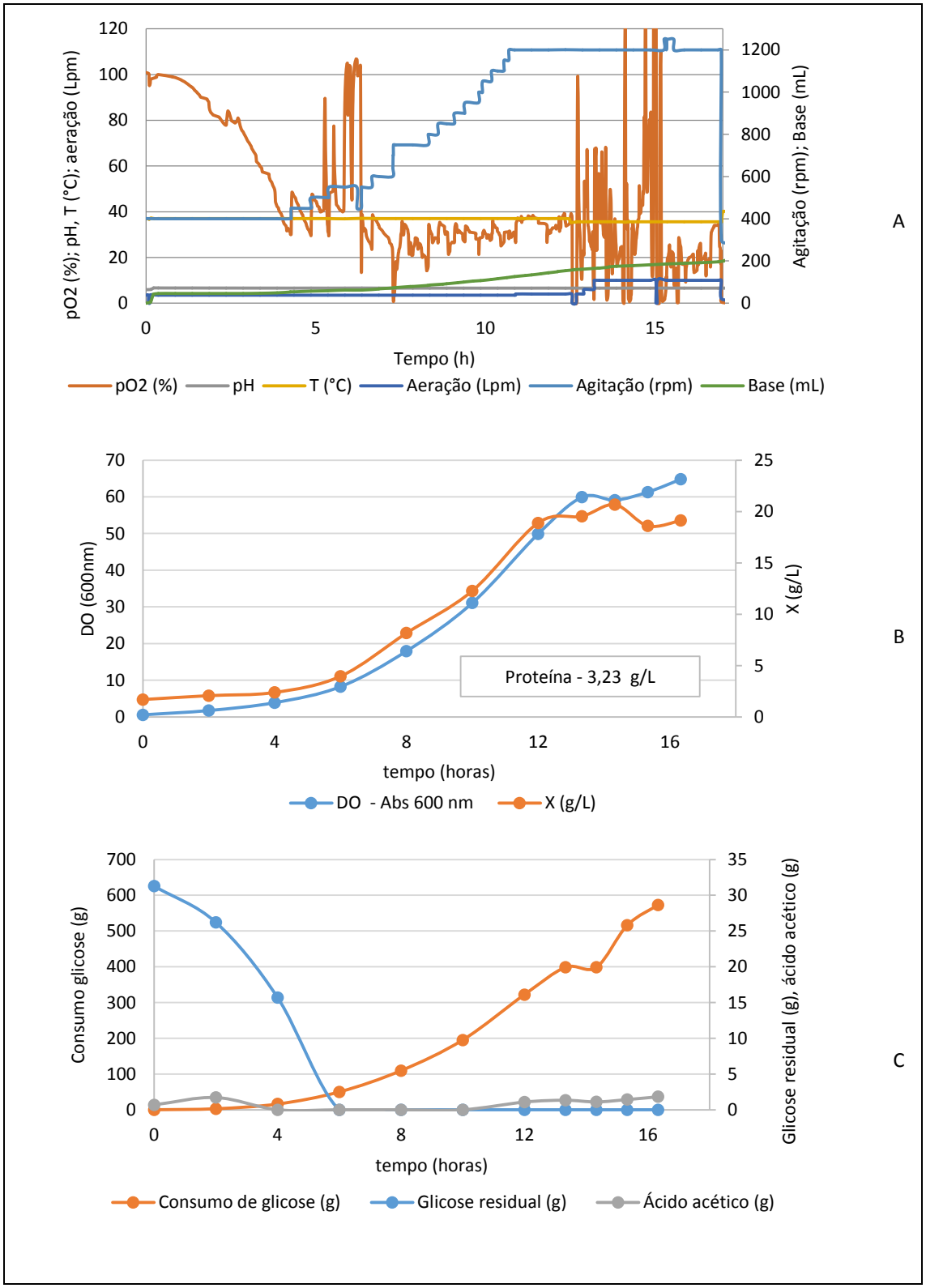
A Figura 11 refere-se ao ensaio número 5 do planejamento experimental, induzido a 35,6°C, com concentração celular de 19,30 g/L e IPTG 0,50 mM.

Figura 11 Resultados experimentais para o Ensaio 5 do planejamento experimental



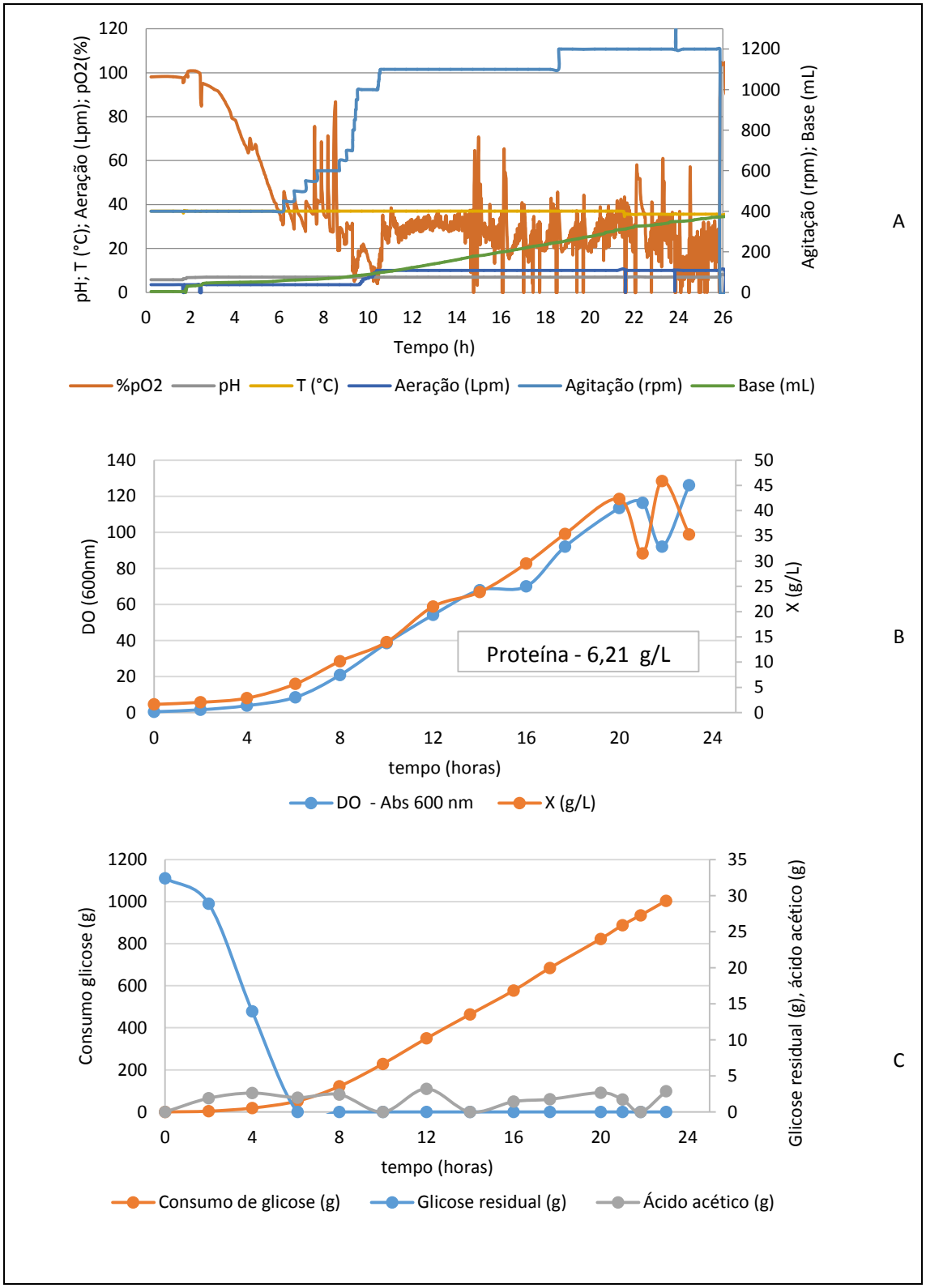
A Figura 12 refere-se ao ensaio número 6 do planejamento experimental, induzido a 35,6°C, com concentração celular de 19,30 g/L e IPTG 1,60 mM.

Figura 12 Resultados experimentais para o Ensaio 6 do planejamento experimental



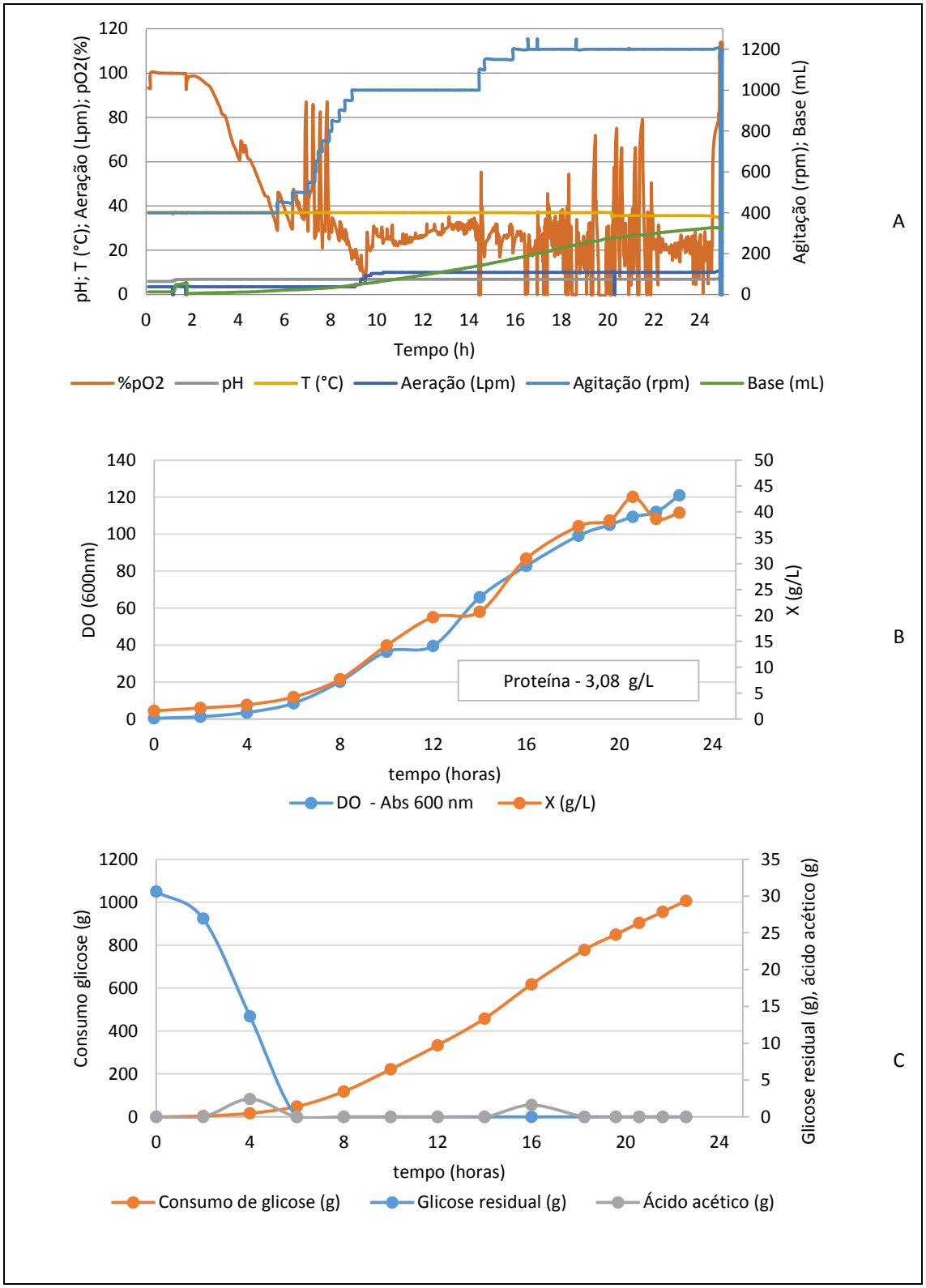
A Figura 13 refere-se ao ensaio número 7 do planejamento experimental, induzido a 35,6°C, com concentração celular de 40,70 g/L e IPTG 0,50 mM.

Figura 13 Resultados experimentais para o Ensaio 7 do planejamento experimental



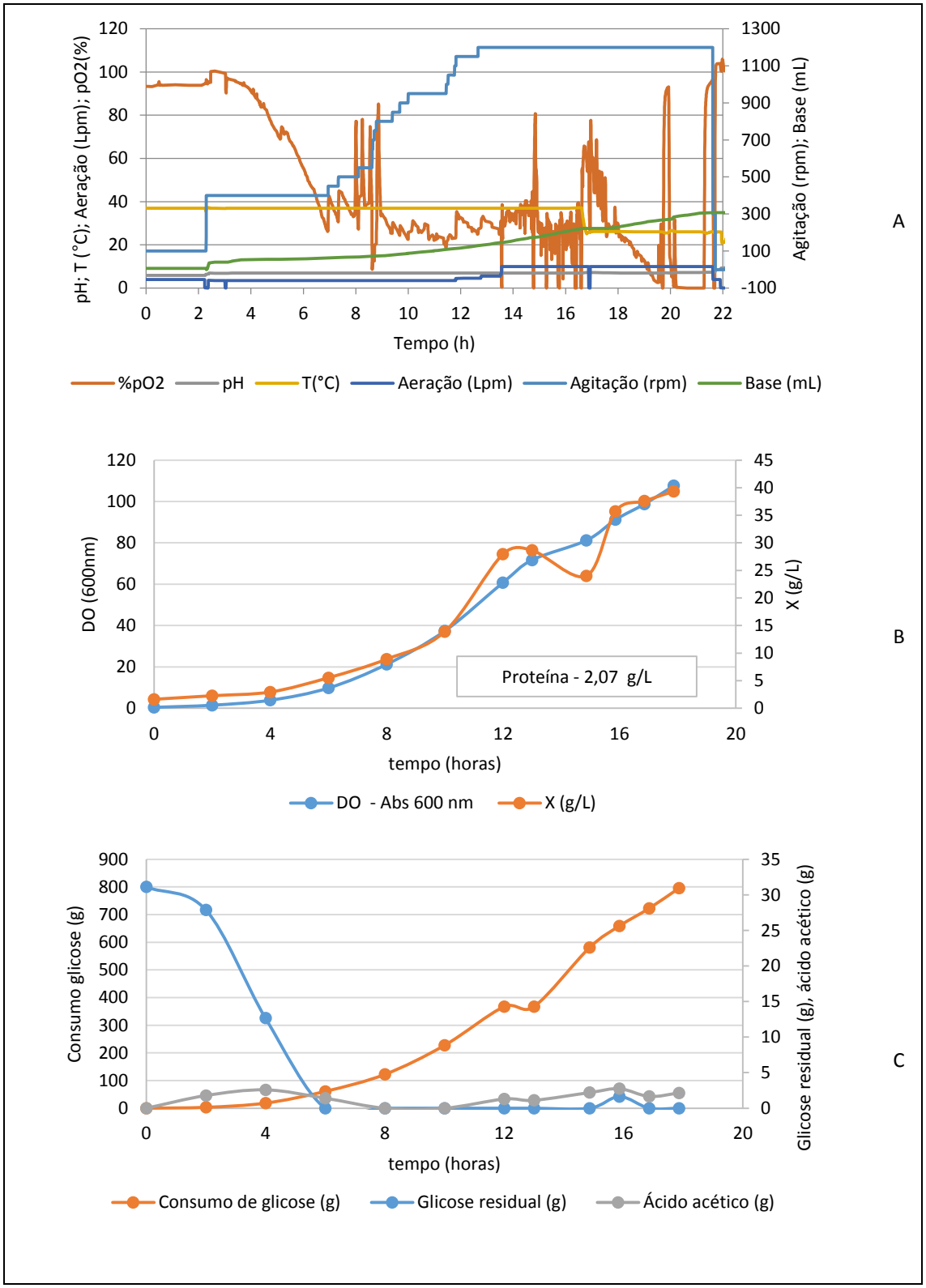
A Figura 14 refere-se ao ensaio número 8 do planejamento experimental, induzido a 35,6°C, com concentração celular de 40,70 g/L e IPTG 1,60mM.

Figura 14 Resultados experimentais para o Ensaio 8 do planejamento experimental



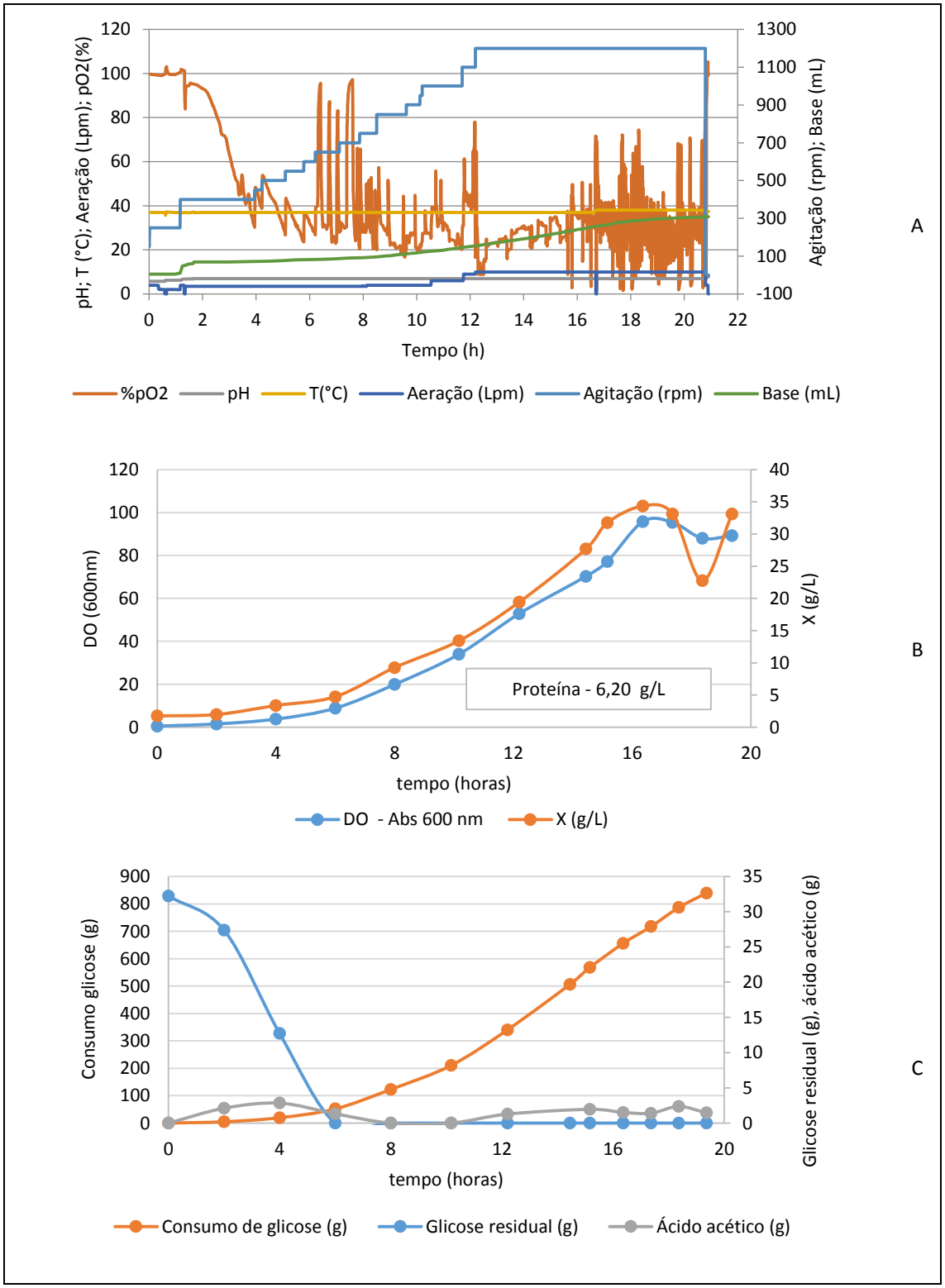
A Figura 15 refere-se ao ensaio número 9 do planejamento experimental, induzido a 26,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 15 Resultados experimentais para o Ensaio 9 do planejamento experimental



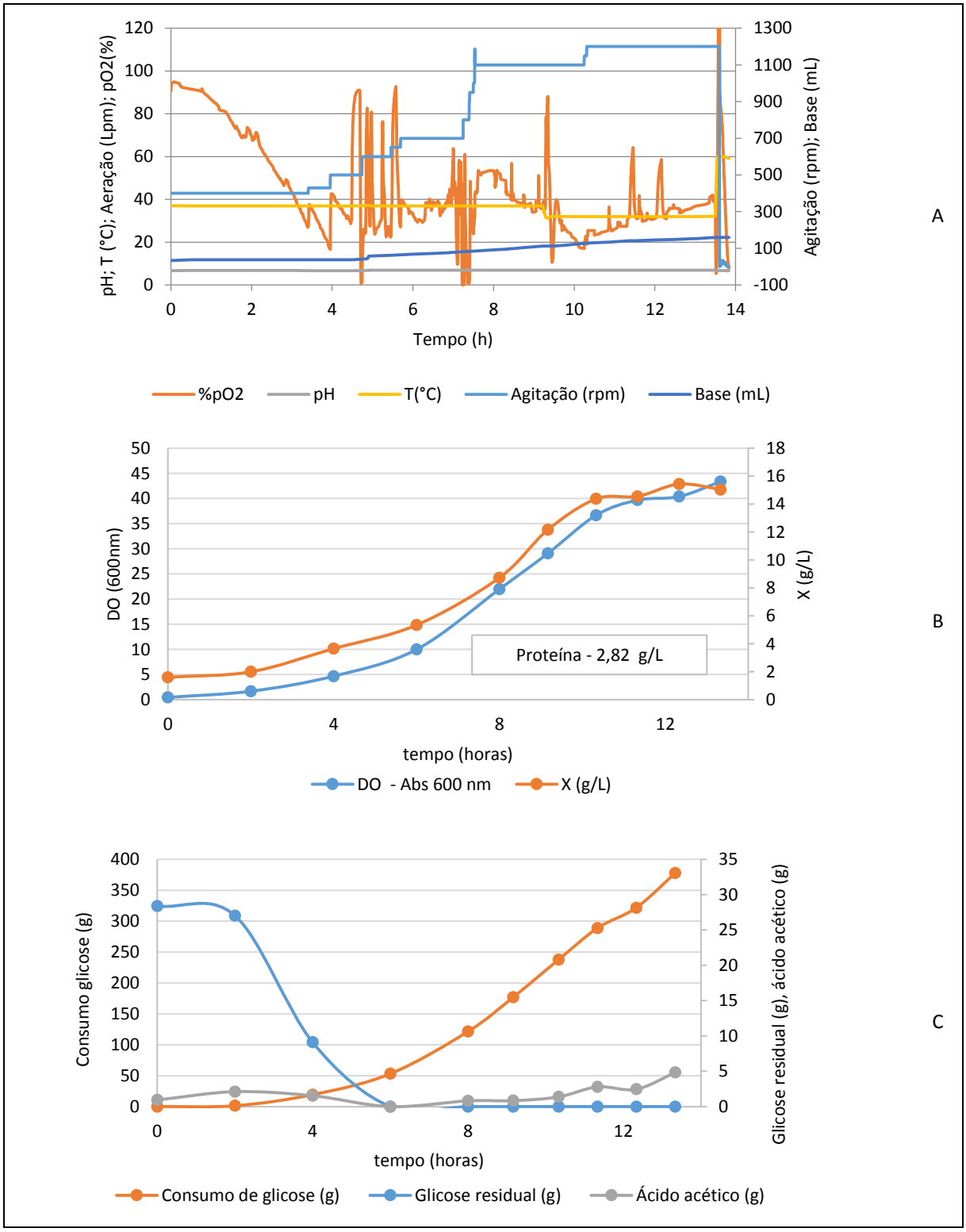
A Figura 16 refere-se ao ensaio número 10 do planejamento experimental, induzido a 38,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 1,10mM

Figura 16 Resultados experimentais para o Ensaio 10 do planejamento experimental



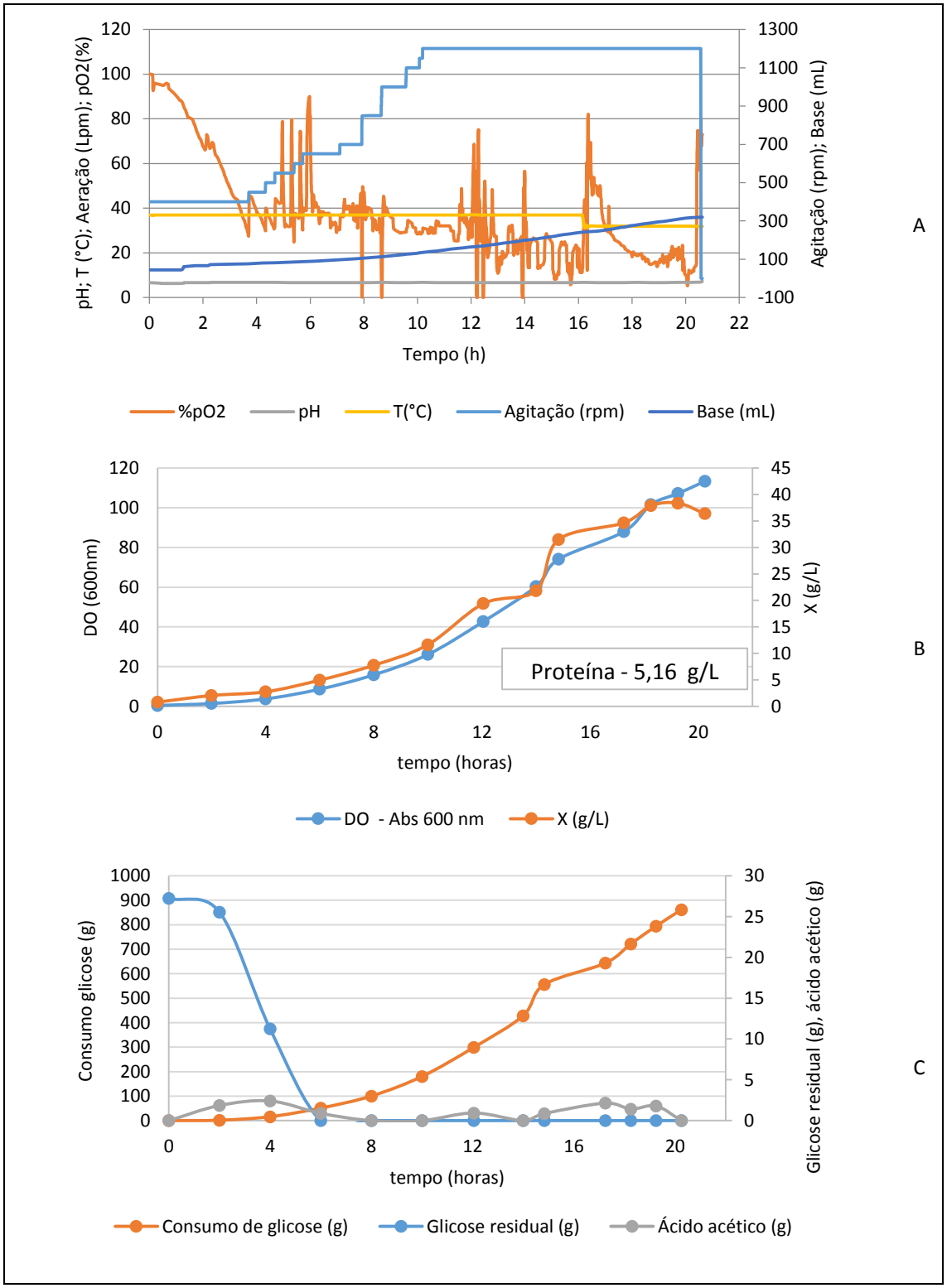
A Figura 17 refere-se ao ensaio número 11 do planejamento experimental, induzido a 32,0°C, com concentração celular de 12,0 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 17 Resultados experimentais para o Ensaio 11 do planejamento experimental



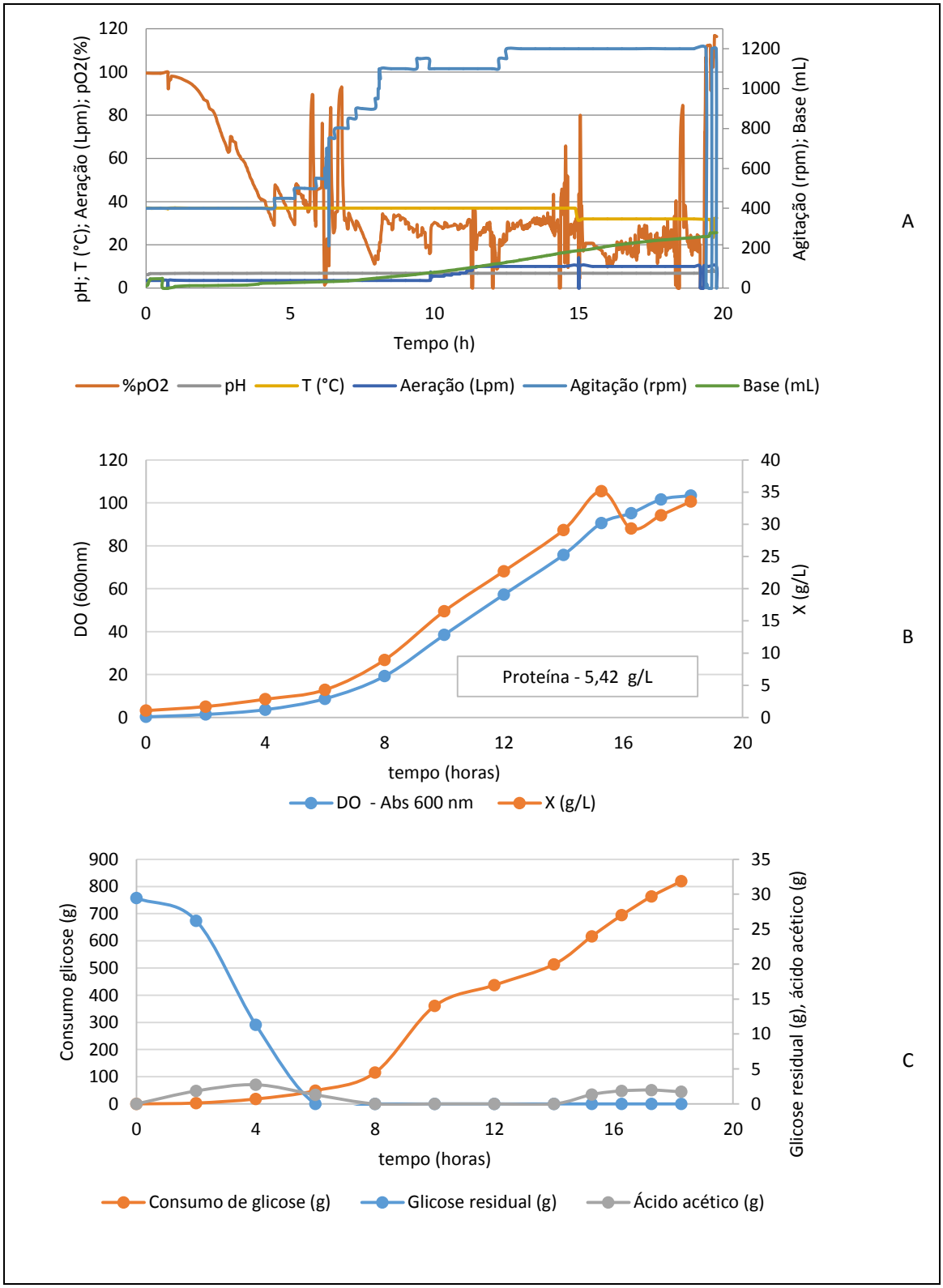
A Figura 18 refere-se ao ensaio número 13 do planejamento experimental, induzido a 32,00°C, com concentração celular de 48,00 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 18 Resultados experimentais para o Ensaio 13 do planejamento experimental



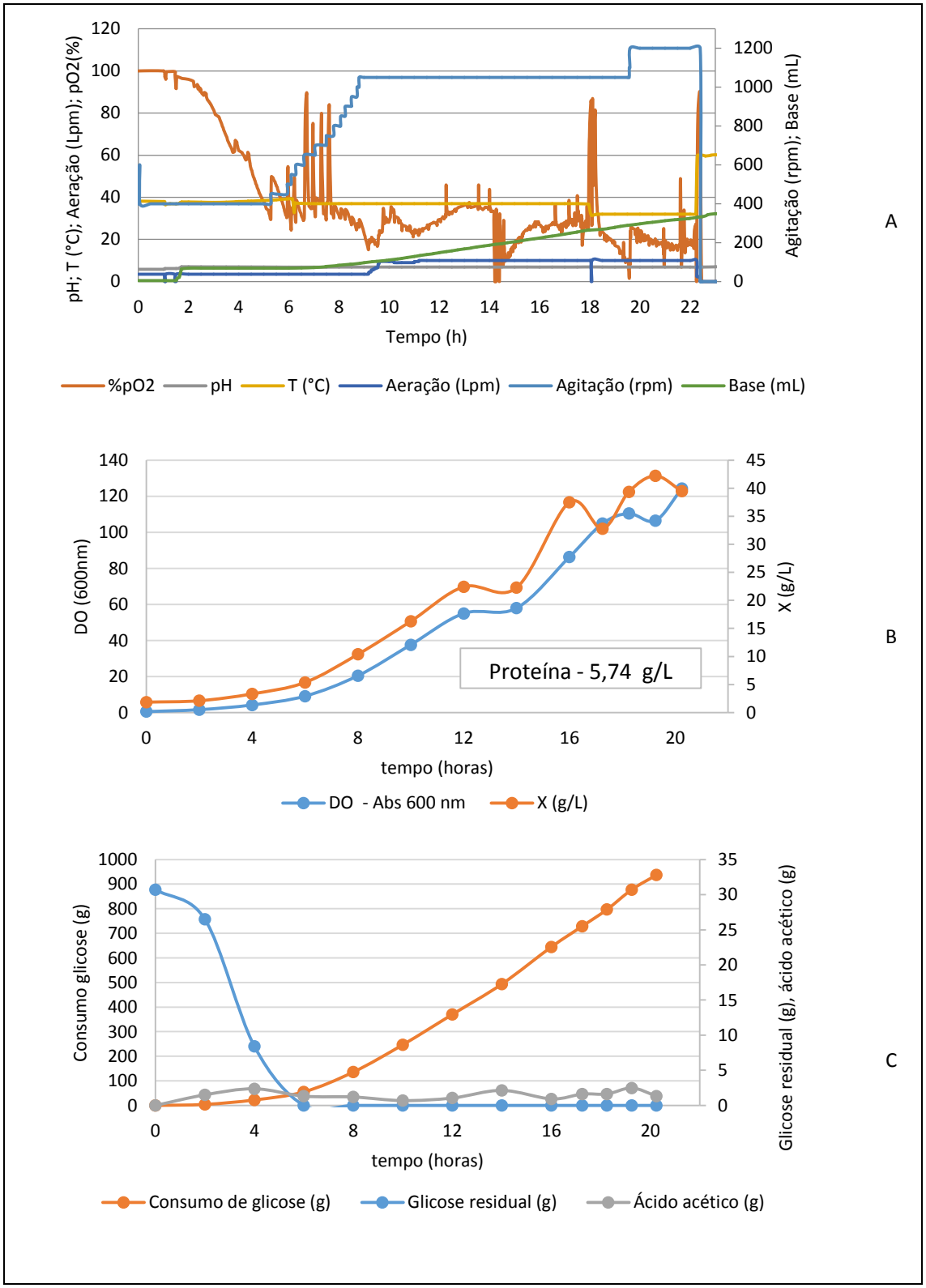
A Figura 19 refere-se ao ensaio número 14 do planejamento experimental, induzido a 32,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 2,00mM.

Figura 19 Resultados experimentais para o Ensaio 14 do planejamento experimental



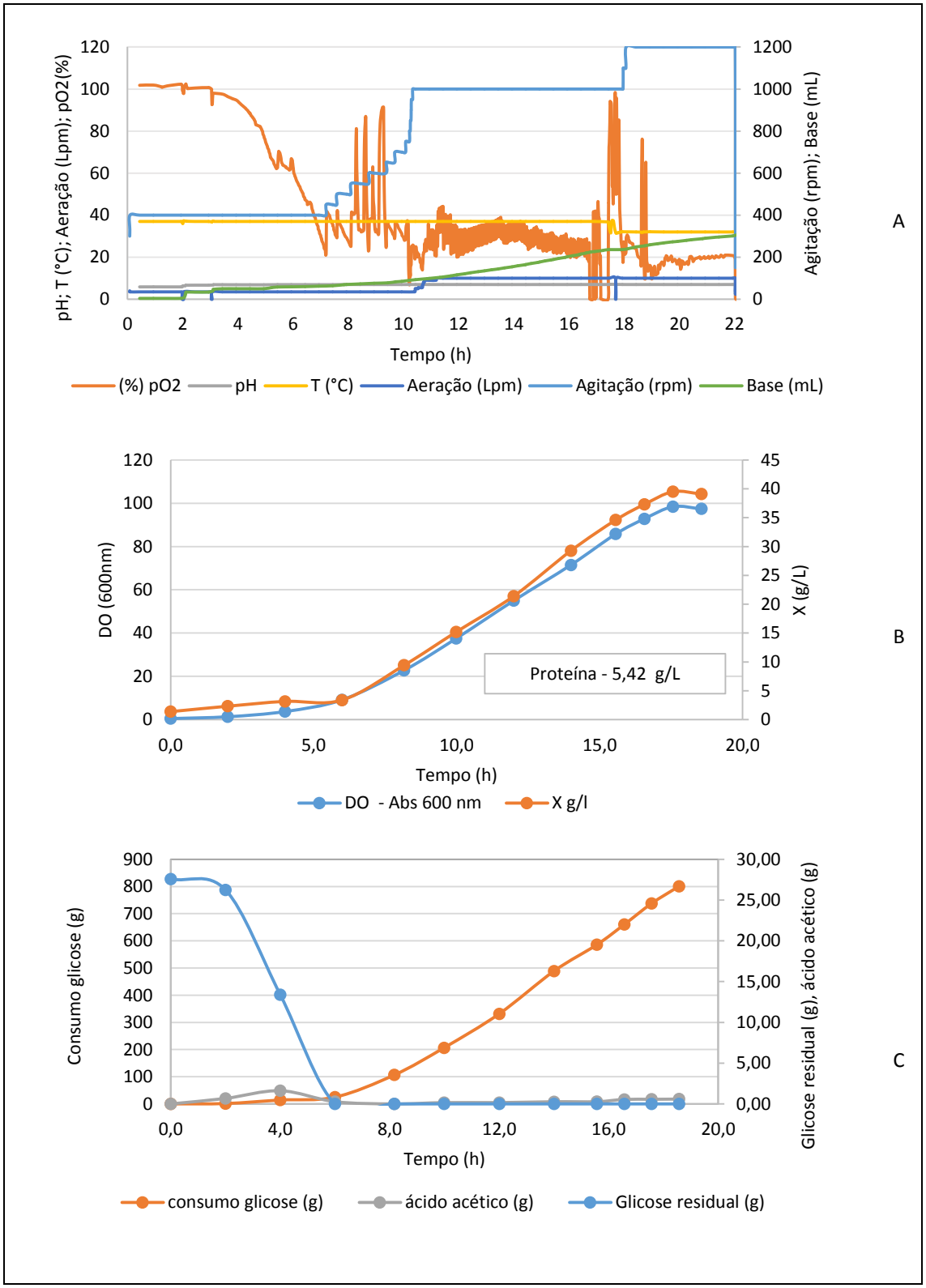
A Figura 20 refere-se ao ensaio número 15 do planejamento experimental, induzido a 32,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 20 Resultados experimentais para o Ensaio 15 do planejamento experimental



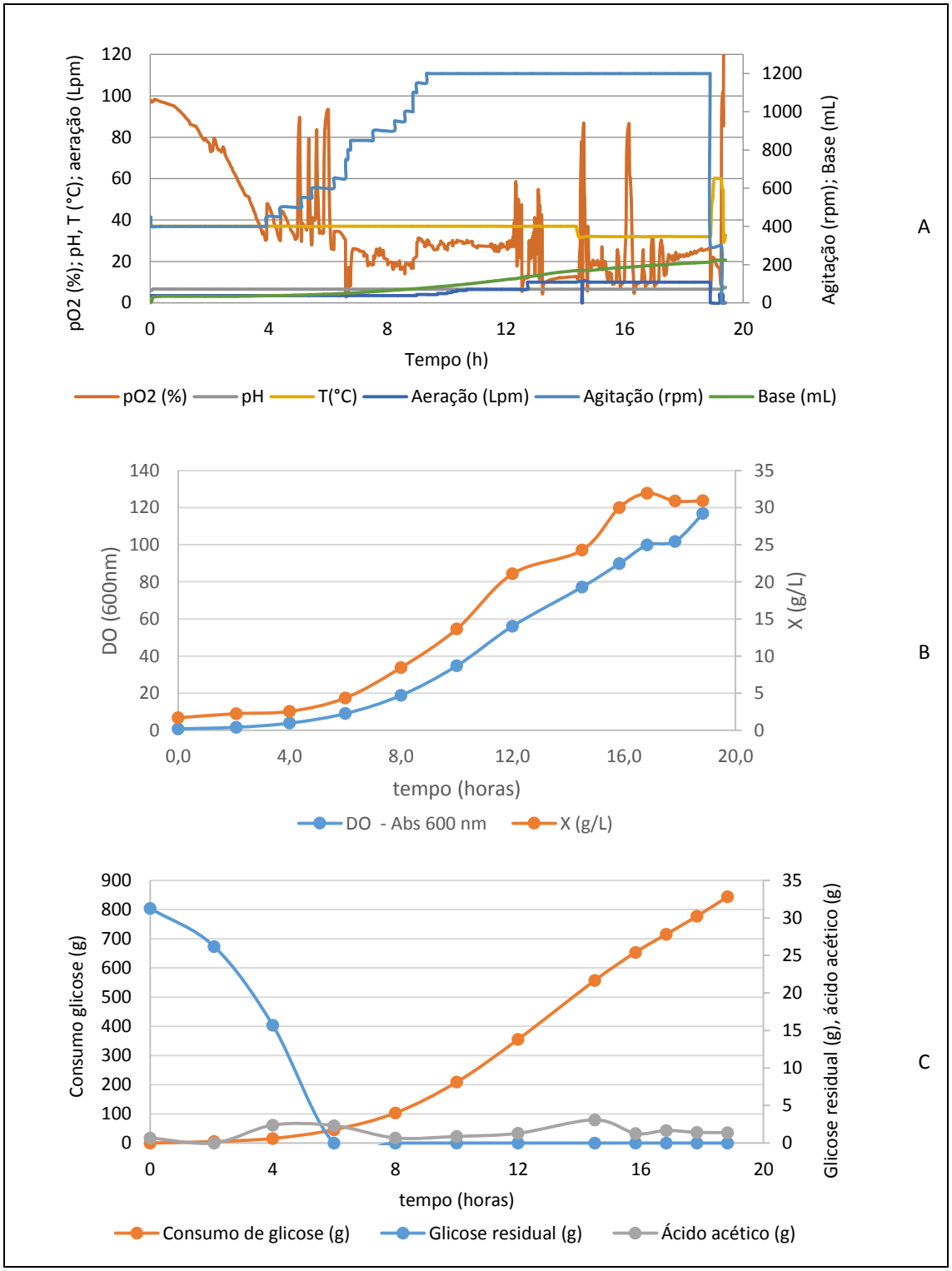
A Figura 21 refere-se ao ensaio número 16 do planejamento experimental, induzido a 32,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 21 Resultados experimentais para o Ensaio 16 do planejamento experimental



A Figura 22 refere-se ao ensaio número 17 do planejamento experimental, induzido a 32,0°C, com concentração celular de 30,0 g/L e IPTG 1,10mM.

Figura 22 Resultados experimentais para o Ensaio 17 do planejamento experimental



Os resultados das concentrações de proteína obtidas para os 17 ensaios no final de quatro horas de processo, após a indução com IPTG são mostrados na Tabela 3. Nesta tabela também são mostrados os valores das velocidades específicas de crescimento celular e fatores de conversão calculados durante a etapa de batelada alimentada e produtividades: celular e do produto obtidas ao longo de todo o ensaio.

Tabela 3 Resultados experimentais dos 17 ensaios para projeto experimental

Ensaio	T ºC (X1)	X g/L (X2)	IPTG Mm (X3)	Proteína (P) g/L	µ máx (h^{-1})	Y x/s (g/g)	Prod X (g/L.h)	Y p/s (g/g)	Prod P (g/L.h)
1	28,4	19,3	0,5	2,08	0,22	0,33	1,09	0,05	0,14
2	28,4	19,3	1,6	2,79	0,23	0,33	1,16	0,08	0,17
3	28,4	40,7	0,5	4,10	0,21	0,35	1,76	0,09	0,18
4	28,4	40,7	1,6	5,90	0,23	0,48	2,14	0,15	0,21
5	35,6	19,3	0,5	4,49	0,22	0,38	1,55	0,11	0,29
6	35,6	19,3	1,6	3,23	0,22	0,40	1,26	0,10	0,20
7	35,6	40,7	0,5	6,21	0,21	0,37	1,64	0,16	0,27
8	35,6	40,7	1,6	3,08	0,20	0,36	1,91	0,11	0,14
9	26,0	30,0	1,1	2,07	0,23	0,50	1,92	0,04	0,12
10	38,0	30,0	1,1	6,20	0,20	0,39	1,82	0,18	0,32
11	32,0	12,0	1,1	2,82	0,23	0,38	1,19	0,16	0,34
12	32,0	48,0	1,1	4,47	0,21	0,40	2,07	0,15	0,18
13	32,0	30,0	0,1	5,16	0,21	0,37	1,63	0,13	0,25
14	32,0	30,0	2,0	5,42	0,23	0,39	1,81	0,14	0,30
15	32,0	30,0	1,1	5,74	0,21	0,34	1,57	0,16	0,28
16	32,0	30,0	1,1	5,42	0,20	0,44	1,75	0,14	0,29
17	32,0	30,0	1,1	5,59	0,23	0,40	1,78	0,15	0,30

Uma vez obtido a variável resposta – concentração da proteína, buscou-se analisar estatisticamente os dados experimentais e propor um modelo matemático para o processo de produção da proteína recombinante.

Para o teste de significância do modelo, realiza-se a análise de variância dos dados experimentais (ANOVA). É um procedimento empregado para comparar três ou mais tratamentos.

Calculando-se a razão entre a média quadrática dos termos de regressão e a média quadrática do erro, encontra-se a estatística F, que comparada com o valor crítico de F para um dado nível de significância, permite avaliar a significância do modelo. Se F for maior que F crítico então o modelo é adequado (MONTGOMERY, 2001).

A Tabela 4 mostra os resultados da análise de variância dos dados experimentais dos 17 ensaios conduzidos no projeto experimental.

Tabela 4 ANOVA – Análise de Variância dos dados experimentais dos 17 ensaios

Fonte	Grau de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	Estatística F	Valor de P
Modelo	9	28,5168	3,16854	4,24	0,035
Linear	3	13,3686	4,45621	5,96	0,024
T (C)	1	6,4344	6,43443	8,61	0,022
[X] g/L	1	6,1936	6,19357	8,28	0,024
[IPTG] (mM)	1	5,8819	5,88191	7,87	0,026
Quadrado	3	8,1752	2,72506	3,64	0,072
T (C)*T (C)	1	3,7818	3,78181	5,06	0,059
[X] g/L*[X] g/L	1	6,3349	6,33490	8,47	0,023
[IPTG] (mM)*[IPTG] (mM)	1	0,3132	0,31316	0,42	0,538
Interação com 2 Fatores	3	7,6115	2,53717	3,39	0,083
T (C)*[X] g/L	1	1,5842	1,58420	2,12	0,189
T (C)*[IPTG] (mM)	1	5,9512	5,95125	7,96	0,026
[X] g/L*[IPTG] (mM)	1	0,0761	0,07605	0,10	0,759
Erro	7	5,2334	0,74763		

A Tabela 4 mostra também que algumas interações entre dois fatores, como Temperatura vs X e [IPTG] vs X, bem como a interação quadrática [IPTG] vs [IPTG] não são estatisticamente significantes, ou seja, os valores de p foram maiores que 0,10 (90%).

Dessa maneira, a equação de regressão obtida é apresentada a seguir:

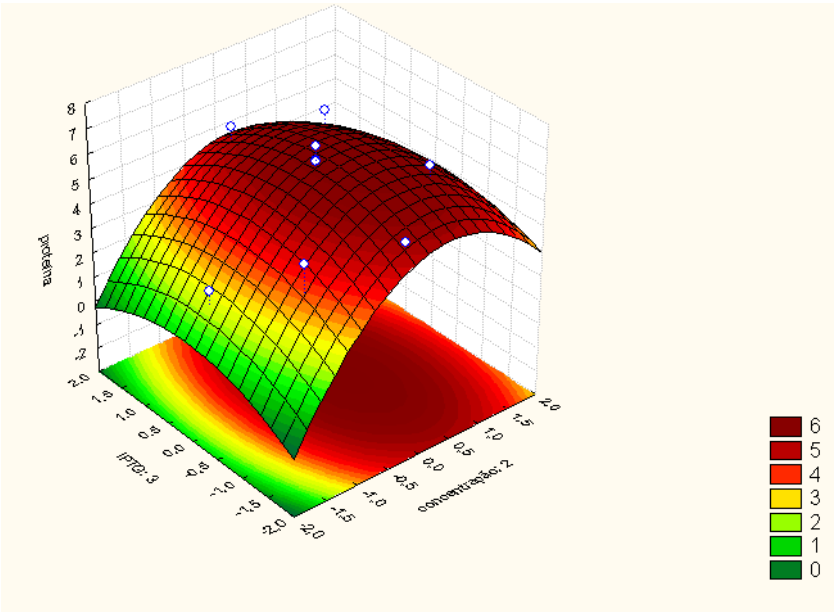
P = - 64,7 + 3,29(X1) + 0,432(X2) + 13,50(X3) – 0,0415(X1)2 – 0,00611(X2)2 – 0,428(X1)*(X3)

6.2 Análise das superfícies de resposta

De posse do modelo matemático as Figuras 23, 24 e 25 mostram as superfícies de resposta para os dados estatisticamente significativos.

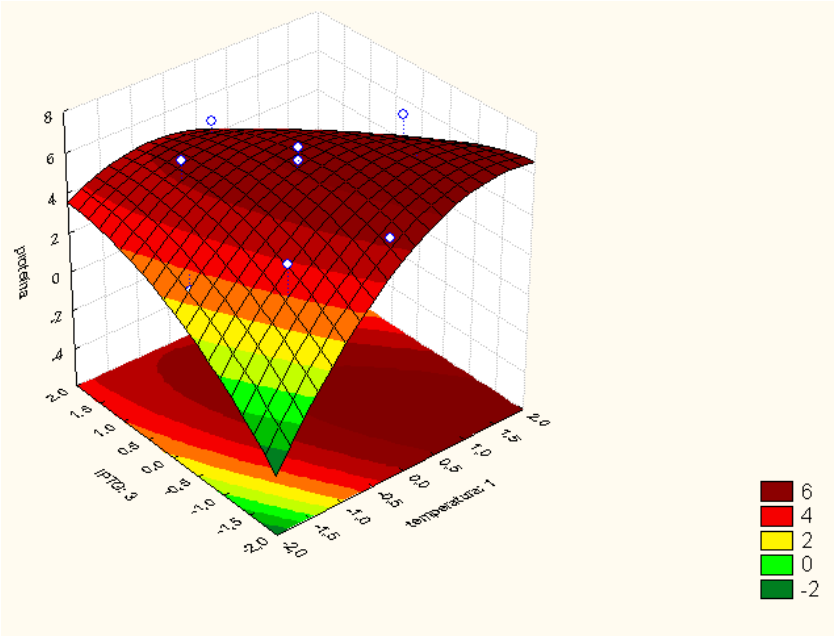
A Figura 23 mostra os valores obtidos da resposta proteína para os diferentes valores de concentração celular vs concentração do indutor IPTG. Mostra que a concentração de IPTG não tem influência na produção de proteína quando relacionada com a concentração celular, ou seja, não importa qual seja a concentração de IPTG aplicada no momento de indução e sim, a concentração celular.

Figura 23 Concentração de IPTG vs Concentração celular



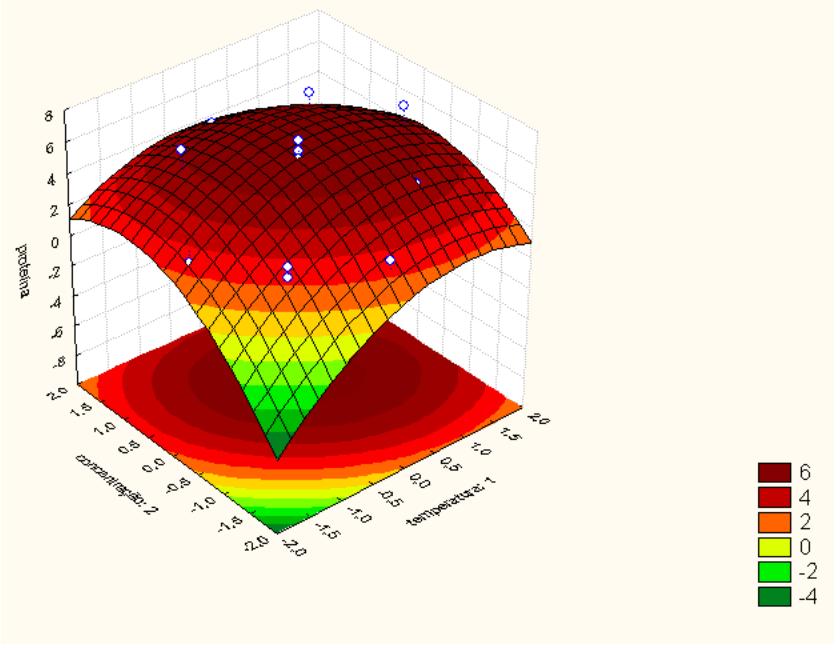
A Figura 24 mostra que a temperatura na etapa de biossíntese da proteína tem forte influência sobre a produção da mesma, uma vez que comparada às concentrações de IPTG, grande quantidade de proteína pode ser obtida com uma quantidade mínima do indutor.

Figura 24 Concentração de IPTG vs Temperatura de biossíntese da proteína



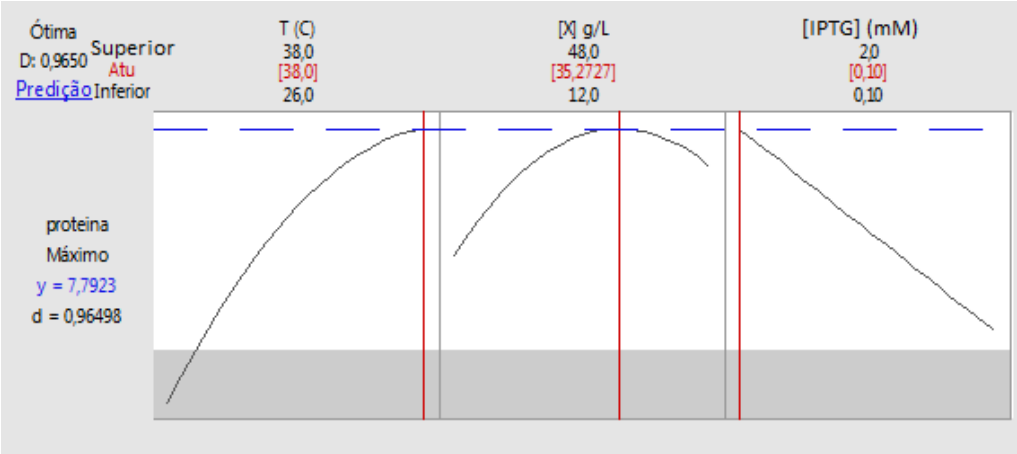
A Figura 25 mostra que existem escalas diferentes de concentração de proteína para valores de ambos os fatores: temperatura e concentração celular, ou seja, há forte interação entre os dois fatores e uma região de máxima concentração de proteína.

Figura 25 Concentração celular vs Temperatura de biossíntese da proteína



Empregando o modelo para encontrar os valores dos três fatores: temperatura na etapa de produção, concentração celular no momento da indução e concentração do indutor que resultem no valor máximo da concentração de proteína: ponto ótimo, obtemos a Figura 26.

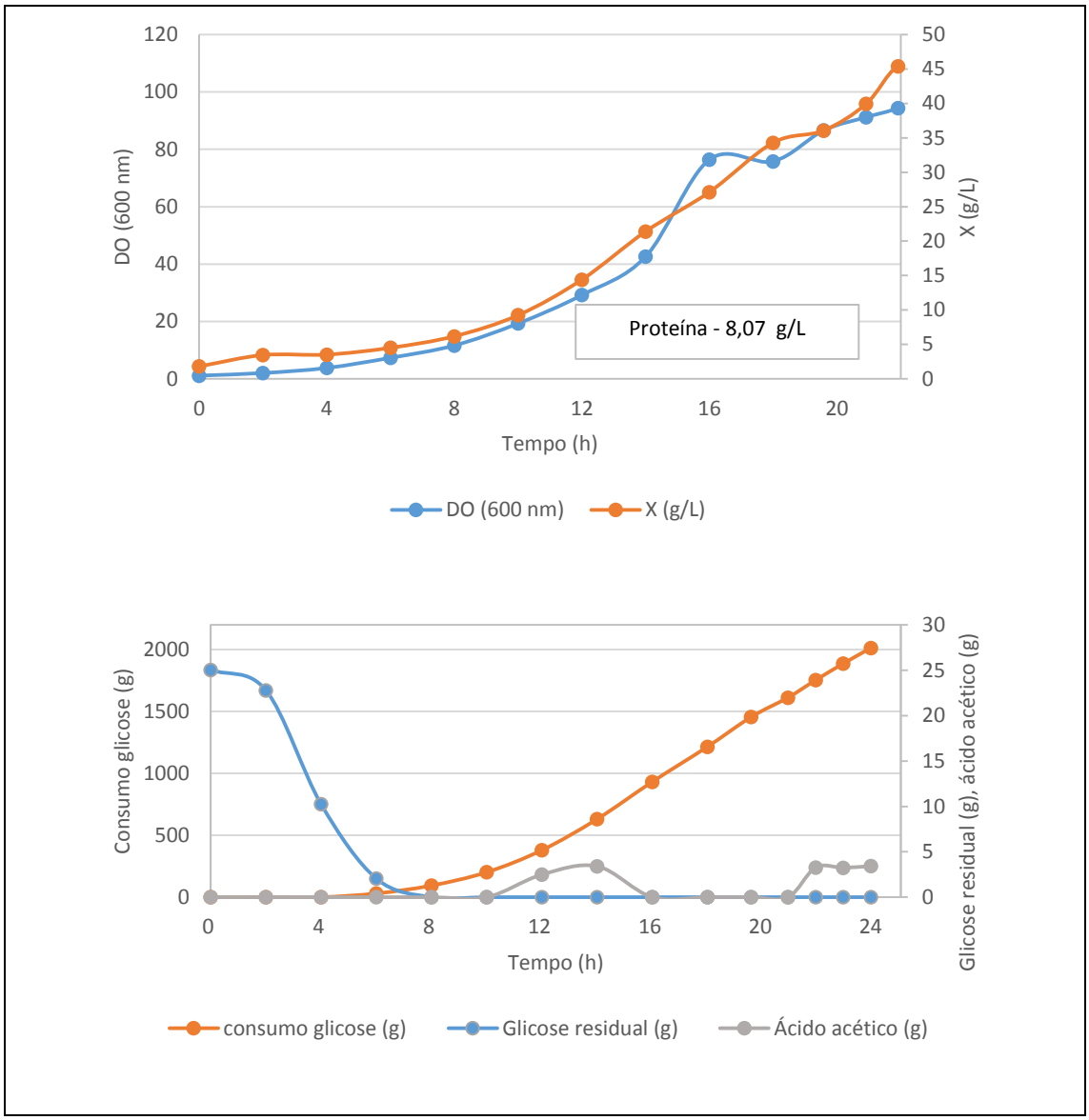
Figura 26 Valores dos fatores para a obtenção da máxima concentração de proteína



A Figura 26 mostra que o valor ótimo da temperatura que resulte numa maior concentração de proteína é 38ºC, o maior valor de temperatura empregado no projeto experimental. Mostra também que o valor ótimo da concentração celular é de 35,27 g/L, enquanto que o valor ótimo da concentração do indutor IPTG é de 0,10mM, ou seja, o menor valor empregado no projeto experimental.

Para validar esse resultado, foi conduzido o Ensaio 18, mostrado na Figura 27.

Figura 27 Dados experimentais do Ensaio 18 – otimizado



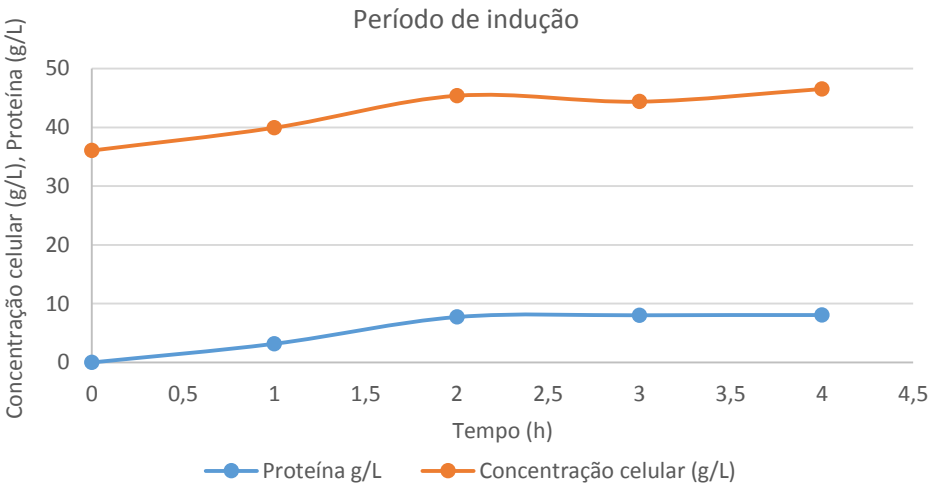
A Figura 27 mostra que a etapa de crescimento celular acompanhou a estratégia de processo adotada para os ensaios do projeto experimental, com vazão de alimentação da solução de glicose ideal para o crescimento celular, porém sem a produção inibitória de ácido acético.

A Tabela 5 e a Figura 28 mostram que as condições ótimas impostas na etapa de produção da proteína recombinante: temperatura de 38ºC, concentração celular de 35,27 g/L e concentração do indutor IPTG de 0,10mM resultou em uma concentração de proteína de 8,07 g/L, maior concentração de proteína até então alcançada. Logo nas primeiras duas horas de indução, uma alta concentração de proteína é observada, como mostra a Tabela 5 e a Figura 28.

Tabela 5 Concentrações celular e de proteína após a indução por IPTG

Período (h)	Proteína (g/L)	Concentração celular (g/L)
0	0	36,06
1	3,18	39,94
2	7,73	45,38
3	8,03	44,37
4	8,07	46,53

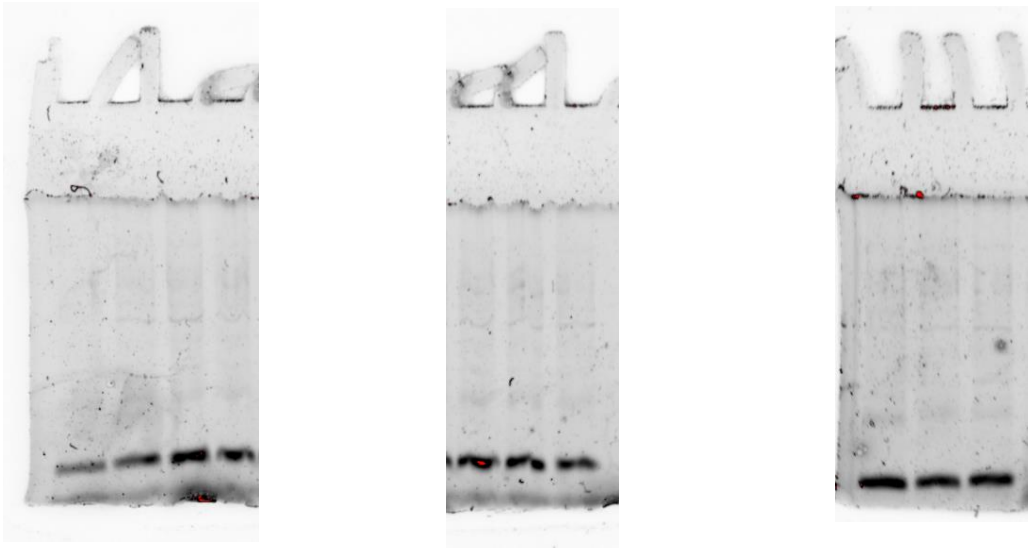
Figura 28 Concentrações celular e de proteína após a indução por IPTG.



Segundo PAREKH; PATEL, 2012 a melhor concentração de IPTG encontrada foi de 0,5 mM, juntamente com a sua estratégia de indução. O ensaio 18 alcançou o melhor resultado de produção com a menor concentração de IPTG (0,10 mM) utilizada no planejamento experimental. Observando os valores da ANOVA, pode-se concluir que a concentração de IPTG é o fator de menor influência em relação aos demais fatores.

Por outro lado, tanto a temperatura da etapa de produção como a concentração celular no momento da indução apresentaram grande significado estatístico ao planejamento experimental. Esse valor ótimo da temperatura para a máxima produção da proteína Amblyomin-X (Figura 26) foi o mesmo valor encontrado por DOS SANTOS, 2018. Esse autor verificou que maiores temperaturas favorecem a velocidade de síntese de RNAm, contribuindo para a formação dos corpos de inclusão. Já temperaturas menores resultam em menores velocidades de RNAm e portanto, não favorecem a formação de corpos de inclusão, porém favorecem a solubilização da proteína recombinante sintetizada.

Figura 29 Géis de poliacrilamida (SDS-Page) das amostras purificadas dos pontos centrais



A B C

A imagem A da Figura 29 refere-se à triplicata da amostra retirada após 4 horas de indução do ensaio 15: a primeira coluna refere-se ao padrão de Amblyomin-X e as demais colunas a triplicata das amostras. As imagens B e C da Figura 29 referem-se à triplicata da amostra retirada após 4 horas de indução dos ensaios 16 e 17, respectivamente.

As imagens provam que a purificação por método químico com Bugbuster® foi eficiente, ou seja, mostram que a proteína formada e purificada é a proteína Amblyomin-X.

7 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu diversas conclusões:

Foi possível adotar um protocolo de cultivo para a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 recombinante de maneira a permitir diferentes concentrações celulares no momento da indução da biossíntese da proteína Amblyomin-X;

Foi possível conduzir 17 diferentes ensaios em biorreatores com sucesso, de maneira a obter a biossíntese de proteína (fator resposta) para a análise do projeto experimental;

A análise de superfície de resposta permitiu encontrar: i) a concentração celular ótima no momento da indução por IPTG; ii) a temperatura ótima no momento de indução; e iii) a concentração ótima do indutor IPTG;

O valor ótimo da concentração celular no momento de indução foi 35,27 g/L, o valor ótimo da temperatura na etapa de produção da proteína Amblyomin-X foi 38ºC e o valor ótimo da concentração do indutor IPTG foi 0,10mM. Esses valores foram validados em ensaio de produção que resultou na concentração final de 8,07 g/L de proteína Amblyomin-X.

A purificação da proteína Amblyomin-X pelo método químico com Bugbuster® foi eficiente e comprovou a biossíntese da proteína Amblyomin-X.

REFERÊNCIAS*

BABAEIPOUR, V. et al. Over-production of human interferon-γ by HCDC of recombinant Escherichia coli. Process Biochemistry, 2007.

BATISTA, I. F. C. et al. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae). Toxicon, 2008.

BATISTA, I. F. C. et al. A new Factor Xa inhibitor from Amblyomma cajennense with a unique domain composition. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 493, n. 2, p. 151–156, 2010.

CAMPANO, A. L. Q. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE ESCHERICHIA COLI PARA LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES. [s.l.] Universidade de Chile, 2010.

CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of Escherichia coliChemical Engineering Science, 2006.

CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using Escherichia coliApplied Microbiology and Biotechnology, 2004.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. Toxicon, 2010.

DE MEY, M. et al. Minimizing acetate formation in E. coli fermentationsJournal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2007.

DOS SANTOS, M. M. Quantificação da expressão gênica de Amblyomin-X clonado em Escherichia coli BL21 (DE3) e correlação com sua síntese proteica. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2018.

DREWES, C. C. Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a angiogênese in vivo induzida pelo VEGF. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in Escherichia coli recombinant protein fermentations. Trends in Biotechnology, v. 24, n. 11, p. 530–536, 2006.

FÖRSTER, A. H.; GESCHER, J. Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Mixed-Acid Fermentation End Products. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 2, n. May, p. 1–12, 2014.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. A simple way of achieving a high cell concentration in recombinant Escherichia coli cultivation. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 14, n. 2, p. 1–6, 1997.

GUO, Y. et al. Expression in Escherichia coli, purification and characterization of LRSAM1, a LRR and RING domain E3 ubiquitin ligase. 2016.

HOVIUS, J. W. R.; LEVI, M.; FIKRIG, E. Salivating for knowledge: Potential pharmacological agents in tick saliva. PLoS Medicine, v. 5, n. 2, p. 0202–0208, 2008.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

HUB, S. L. E. coli comes from our digestive tract. Disponível em: <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/1899-e-coli-the-biotech-bacterium>. Acesso em: 1 jul. 2018.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coliApplied Microbiology and Biotechnology, 2005.

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. 1, p. 671, 2014.

LEE, J. H. et al. Production of 1,3-Propanediol from Glucose by Recombinant Escherichia coli BL21(DE3). Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 23, n. 2, p. 250–258, 2018.

LI, Z.; NIMTZ, M.; RINAS, U. The metabolic potential of Escherichia coli BL21 in defined and rich medium. Microbial Cell Factories, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2014.

LIMA, U. A. et al. Biotecnologia industrial: Fundamentos. 1º Edição ed. [s.l.] EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA, 2001. v. I

MANDENIUS, C.; BRUNDIN, A. REVIEW : BIOCATALYSTS AND BIOREACTOR DESIGN Optimization, Bioprocess Methodology, Using Design-of-experiments. Biotechnol Progr, v. 24, p. 1191–1203, 2008.

MARIA, D. A. et al. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. Investigational New Drugs, 2013.

MARZZOCO, ANITA; TORRES, B. B. Livro Bioquimica Basica, 1999. Disponível em: <http://paginapessoal.utfpr.edu.br/lbracht/bioquimica-geral/Livro Bioquimica Basica -Anita-Copy.pdf/view>

MOHAMED N. BAESHEN. Productoion of biopharmaceuticals in E. coli: current scenario and future perspectives. Journal of microbiolgy and biotechnology, v. 25, n. 7, p. 1–24, 2014.

NOGUEIRA LIMA, W. J. Produção de proteínas recombinantes utilizando E coli em cultivos em alta densidade celular. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2004.

OLAOFE, O. A. et al. Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant Escherichia coli. Biochemical Engineering Journal, 2010.

PAREKH, T.; PATEL, G. EFFECT OF IPTG INDUCTION ON PRODUCTION OF FCE-BIK -A NEW APPROACH FOR ASTHMA AND ALLERGY IN RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI. Life sciences Leaflets, v. 4297, p. 50–55, 2012.

RIESENBERG, D. et al. High cell density cultivation of Escherichia coli at controlled specific growth rate. Journal of Bwtechnolo, v. 20, p. 17–28, 1991.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos. Primeira E ed. Campinas - SP: Casa do Pão Editora, 2005.

ROSSANA, M.; VAZ, F. Estudo do cultivo de dois clones de Escherichia coli recombinatnes para a expressão de antigenos da Leishmania chagasi. Dissertação de Mestrado, 2008.

ROSSI, M. DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE CULTIVO DE Escherichia coli RR1. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.

SANTOS, C. A. et al. A novel protein refolding protocol for the solubilization and purification of recombinant peptidoglycan-associated lipoprotein from Xylella fastidiosa overexpressed in Escherichia coli. Protein Expression and Purification, v. 82, n. 2, p. 284–289, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL ENGENHARIA BIOQUÍMICA. 1º Edição ed. [s.l.] EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA, 2001.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

TESAROVA, M. Optimization of growth condition Escherichia coli culture by method Design of experiments to produce optimal amount of studied genetically insert protein. University of South Bohemia, Institute of Physical Biology, Zamek, v. 136, n. 373, p. 33, 2010.

VAZ, M. R. F. INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE Leishmania i. chagasi UTILIZANDO Escherichia coli M15 CULTIVADA EM INCUBADOR ROTATIVO E BIORREATOR. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

VIANA ARAÚJO CHAVES, R. Avaliação de dois clones de Escherichia coli recombinante quanto ao crescimento e expressão de antígenos de Leishmania chagasi (kmp11 e P36)". p. 80, 2009.

VITOLO, M. et al. Biotecnologia FARMACÊUTICA: Aspectos sobre aplicação industrial. 1º Edição ed. [s.l.] EDITORA EDGARD BLÜCHER LTDA, 2015.

WEICKERT, M. J. et al. Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli. Current Opinion in Biotechnology, v. 7, p. 494–499, 1996.

ZAMPOLLI, H. DE C. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DO AMBLYOMIN-X EM CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIS. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.