

CAROLINE MATOS DE MELLO

**Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-
X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1**

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

CAROLINE MATOS DE MELLO

Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1

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 Ciências.

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)

Matos de Mello, Caroline

Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 - Rec1 / Caroline Matos de Mello; orientadora Rosane Aparecida Moniz Piccoli. -- São Paulo, 2018.

74 p.

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

1. Amblyomin-X. 2. *Escherichia coli*. 3. Proteína recombinante. 4. Bioprocesso. 5. Batelada alimentada. I. Aparecida Moniz Piccoli, Rosane, orientador. II. Título.



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 **760/15** referente ao projeto intitulado: "*Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria Escherichia coli BL21DE3 - Nativa*" sob a responsabilidade de **Caroline Matos de Mello**, 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 CEPESH- 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 CEPESH - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Caroline Matos de Mello

Título da Dissertação: Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Aparecida Moniz Piccoli

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ____/____/_____, considerou a candidata:

Aprovada Reprovada

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador (a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, pois a conclusão deste trabalho só foi possível graças a Ele. Pois só Deus sabe o quanto foi difícil, o quanto pensei diversas vezes em desistir e o quanto só ele nos dá forças para continuar.

Gostaria de agradecer a minha mãe Vanilda, meu irmão Junior, meu pai Edevaldo e meu namorado Rodrigo, por todo o incentivo durante todo o processo, desde a prova para entrar neste mestrado até este momento final de entrega do trabalho. Pelas diversas vezes que eu chorei, estressei, pensei em desistir e eles sempre com uma palavra, um colo ou um simplesmente me ouvindo, não me deixaram desistir.

A minha orientadora Rosane, que desde o início acreditou em mim, no meu potencial e me deu a oportunidade de realizar este mestrado. A ela devo todo meu conhecimento adquirido e também um super agradecimento pela paciência em me ensinar e transmitir todo seu conhecimento. Você é TOP!

Aos meus amigos de mestrado Telma, Natália e Murilo por dividirem comigo os melhores e piores momentos dessa fase, dos cafés na copa, das noites em claro, das pizzas, das aulas, dos congressos, enfim, foram tantos momentos juntos, que faltariam palavras pra agradecer todos eles. Obrigada por todos os momentos compartilhados até aqui.

As minhas amigas Rose e Alininha por sempre me ouvirem e também por me ajudar sempre que precisei nas atividades e correções deste trabalho.

Ao meu querido amigo Régis, que também sempre acreditou no meu potencial, me incentivou desde o início e não mediu esforços para sempre transmitir todo seu conhecimento. E também pelas pizzas e cafés depois de noites de trabalho e as reflexões incansáveis de tudo que acontecia.

Ao meu amigo Valter que também compartilhou e nos ajudou muito na realização dos ensaios no laboratório.

A todos os técnicos do laboratório: Alice, Antônio, Jonas, Luiz, Renato, Saturnino e Sandra que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho.

A todos os pesquisadores envolvidos no projeto: Patrícia, Sérgio, Débora, Filomena, Rosa, Thomaz, Danidza, Eliza, Henrique, Alfredo e Elda pelos conhecimentos e ensinamentos partilhados.

A Natália e Adriano por todo incentivo e apoio.

Por fim agradeço ao BNDES (Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social) pelo financiamento do projeto.

RESUMO

MELLO, C. M. **Estudo cinético da produção da proteína recombinante Amblyomin-X pela bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1**. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2018.

O câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. Está entre as doenças de maior taxa de mortalidade e é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo. Uma proteína denominada Amblyomin-X foi obtida a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma Cajennense* e expressa na bactéria *Escherichia coli* BL21DE3. Essa proteína é capaz de induzir a morte de células tumorais, além de ter pouca ou nenhuma atividade contra células normais, diminuindo assim os efeitos colaterais nos pacientes em tratamentos contra o câncer. Através deste trabalho foi possível elaborar um protocolo para obtenção de elevadas concentrações celulares e produção da proteína recombinante Amblyomin-X em biorreatores com capacidade total de 15 L. Uma vez que a proteína é intracelular, foram estudados alguns parâmetros e estratégias de cultivo do microrganismo para obtenção de alta concentração celular, tais como: composição do meio de cultura, identificação dos substratos limitantes e inibitórios e vazão de alimentação da fonte de carbono. Foi definido um meio de cultura adequado para atingir elevadas concentrações celulares na etapa de crescimento da *E. coli*, visando garantir elevadas concentrações de produto recombinante. Ensaio conduzidos em biorreatores com esse meio resultaram em concentrações celulares e densidade ótica (DO_{600nm}) iguais a 40,0 g/L e 76,6, respectivamente, para a etapa de crescimento celular e 59,8 g/L e 161, respectivamente, no final da etapa de produção da proteína de interesse. Os ensaios conduzidos em reatores mostraram que concentrações de ácido acético acima de 0,4 g/L causam inibição do crescimento celular, portanto, foi elaborada uma estratégia eficaz de alimentação exponencial dos substratos limitantes (fontes de carbono e magnésio) na etapa de crescimento dessa bactéria para atingir elevadas concentrações celulares, mantendo-se a velocidade específica de crescimento (μ_x) menor que $0,2\text{ h}^{-1}$, abaixo do valor máximo, com a finalidade de evitar a formação de ácido acético. Este trabalho permitiu também conhecer os parâmetros cinéticos para a produção da proteína Amblyomin-X, tais como, a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), a produtividade celular global ($P_{xglobal}$), a produtividade celular máxima ($P_{xmáx}$) e o fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) na etapa de batelada alimentada, cujos valores foram, respectivamente, de $0,30\text{ h}^{-1}$, 13,8 g de célula/h, 14,1 g de célula/h e 0,37 g de célula/g de substrato. Para a avaliação da biossíntese da proteína recombinante foram realizadas análises de gel de poliacrilamida por eletroforese e a quantificação foi feita pela análise de Bradford. A concentração de proteína Amblyomin-X no final da etapa de síntese alcançou 8,57 g/L.

Palavras-chave: Amblyomin-X. *Escherichia coli*. Proteína recombinante. Bioprocesso. Batelada alimentada.

ABSTRACT

MELLO, C. M. Kinetic study of recombinant protein Amblyomin-X in bacterium *Escherichia coli* BL21DE3 - Rec1. 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas, São Paulo, 2018.

Cancer is a public health problem, especially among developing countries. It is among the diseases with the highest mortality rate and accounts for more than 12% of all causes of death in the world. A protein called Amblyomin-X was obtained from a cDNA library of *Amblyomma Cajennense* tick salivary glands and it was expressed in the bacterium *Escherichia coli* BL21DE3. This protein is able to induce death of tumor cells, as well as having little or no activity against normal cells, thus reducing the side effects in patients on cancer treatments. In this work it was possible to elaborate a protocol for obtaining high cellular concentrations and production of the recombinant Amblyomin-X protein in bioreactors with a total capacity of 15 L. Since the protein is intracellular, some parameters and strategies of culture of the microorganism for obtaining a high cell concentration, were : composition of the culture medium, identification of limiting and inhibitory substrates and feed rate of the carbon source. A culture medium suitable for achieving high cell concentrations in the growth stage of *E. coli* was defined in order to guarantee high concentrations of recombinant product. Experiments conducted in bioreactors with this medium resulted in cellular concentrations and optical density (DO_{600nm}) of 40.0 g / L and 76.6, respectively, for the cell growth step and 59.8 g / L and 161, respectively, at the end of the production stage of the protein of interest. Experiments conducted in reactors showed that acetic acid concentrations higher than 0.4 g/L cause inhibition of cell growth, therefore, an effective strategy of exponential feeding of the limiting substrates (carbon and magnesium sources) was elaborated in the growth stage of this bacteria to reach high cellular concentrations, maintaining the specific growth rate (μ_x) less than 0.2 h^{-1} , below the maximum value, in order to avoid the formation of acetic acid. This work also allowed to know the kinetic parameters for Amblyomin-X protein production, such as the maximum specific growth rate (μ_{max}), the overall cellular productivity ($P_{xglobal}$), the maximum cellular productivity (P_{xmax}) and the conversion factor of substrate in cell ($Y_{x/s}$) in the fed batch stage, whose values were respectively 0.30 h^{-1} , 13.8 g cell/h, 14.1 g cell/h and 0.37 g of cell/g of substrate. For the evaluation of recombinant protein biosynthesis, polyacrylamide gel analyzes were performed by electrophoresis and quantification was done by the Bradford analysis. The Amblyomin-X protein concentration at the end of the synthesis step reached 8.57 g/L.

Keywords: Amblyomin-X. *Escherichia coli*. Recombinant protein. Bioprocess. Fed Batch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formação de um tumor de células cancerígenas.....	16
Figura 2 – Carrapato <i>Amblyomma Cajennense</i>	17
Figura 3 – A bactéria <i>Escherichia coli</i>	19
Figura 4 – Faixas de temperatura ótima para diferentes microrganismos.....	20
Figura 5 – A via de formação de ácido acético (3) e as vias de anabolismo (flechas pretas) de <i>E. coli</i>	21
Figura 6 – Preparo do pré-inóculo e inóculo.....	37
Figura 7 – Perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) dos ensaios R1 e R2.....	45
Figura 8 – Perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) do ensaio R3.....	46
Figura 9 – Cinética de crescimento em meio de crescimento I (Inóculo)	47
Figura 10 – Perfis da concentração celular, glicose e ácido acético ao longo do tempo no ensaio R4.	48
Figura 11 – Variáveis monitoradas ao longo do tempo no ensaio R4.	49
Figura 12 – Comparação do perfil de concentração celular e densidade ótica ($DO_{600\text{ nm}}$) ao longo do tempo para os ensaios R5, R6, R7, R8 e R9.	52
Figura 13 – Perfil de produção de proteínas dos ensaios R5, R6, R9 e R7 sob a temperatura de 30 °C.....	52
Figura 14 – Perfil de produção de proteínas pela linhagem <i>E. coli</i> – Rec1 e Rec2, sob a temperatura de 37 °C ou 30 °C durante o período de indução com IPTG.....	53
Figura 15 – Perfil da porcentagem de oxigênio dissolvido (%pO ₂), consumo de base (mL) e formação de ácido acético (g/L) nos ensaios R10 e R11.....	55
Figura 16 – Perfil da concentração celular, glicose e ácido acético ao longo do tempo dos ensaios R14, R15 e R16.....	56
Figura 17 – Dados do MFCS, crescimento celular e cálculo da vazão da bomba de alimentação do ensaio R15.....	57
Figura 18 – Cálculo da vazão da bomba de alimentação da solução de glicose (F).	59
Figura 19 – Velocidade específica de crescimento na etapa de batelada alimentada (lnX vs Tempo (h)).....	59
Figura 20 – Perfil de OUR (gO ₂ /L.h), CER (gCO ₂ /L.h) e Densidade Ótica ao longo do tempo no reator 15.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos principais modos de operação de biorreatores	25
Tabela 2 – Dados experimentais dos ensaios R1 e R2.	45
Tabela 3 – Dados experimentais do ensaio R3.	46
Tabela 4 – Dados experimentais dos ensaios R4, R5, R6 e R7.	50
Tabela 5 – Dados experimentais dos ensaios R8 e R9.	51
Tabela 6 – Concentrações de glicose e ácido acético dos ensaios R10 e R11.	55
Tabela 7 – Dados experimentais do ensaio R13.	57
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos dos ensaios R12, R13 e R14.	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	JUSTIFICATIVA	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	O câncer	16
3.2	Amblyomin-X	17
3.3	Tecnologia do DNA Recombinante	18
3.4	Sistema de expressão em <i>Escherichia coli</i>	19
3.5	Metabolismo da bactéria <i>E. coli</i> e a formação de ácido acético	20
3.6	Meios de cultura para cultivos de <i>E. coli</i>	23
3.7	Modos de operação dos biorreatores para obtenção de altas concentrações celulares e estratégias de cultivo	24
4	OBJETIVO	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	Materiais	29
5.1.1	<i>Linhagens</i>	29
5.1.2	<i>Antibióticos</i>	29
5.1.3	<i>Meios de cultura</i>	30
5.1.4	<i>Soluções</i>	31
5.2	Métodos	32
5.2.1	<i>Preparo do banco de trabalho e preservação</i>	32
5.2.2	<i>Preparo dos biorreatores</i>	34
5.2.3	<i>Avaliação dos meios de cultura</i>	34
5.2.4	<i>Determinação da melhor temperatura de indução</i>	37
5.2.5	<i>Estratégia de cultivo e produção da proteína recombinante</i>	38
5.2.6	<i>Determinação da concentração celular por medida de massa seca</i>	40
5.2.7	<i>Determinação do teor de glicose e ácido acético</i>	40

5.2.8	<i>Etapa de separação das células</i>	41
5.2.9	<i>Tratamento dos dados experimentais</i>	41
6	RESULTADOS	45
6.1	Avaliação dos meios de cultura	45
6.1.1	<i>Meio Terrific-Broth (TB)</i>	45
6.1.2	<i>Meio Luria Bertani (LB)</i>	46
6.1.3	<i>Meio de crescimento I (Inóculo)</i>	47
6.2	Ensaio cinético para determinação da temperatura de expressão da proteína	53
6.3	O ácido acético e a inibição do crescimento celular	54
6.4	Estratégia de cultivo e produção da proteína recombinante	56
6.4.1	<i>Monitorando a produção de ácido acético ao longo do tempo</i>	59
6.4.2	<i>Conhecendo os parâmetros de bioprocesso</i>	61
7	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	68
	ANEXO A	68
	ANEXO B	74

1 INTRODUÇÃO

A tecnologia do DNA recombinante permitiu um rápido crescimento na área de biotecnologia, sendo aplicada industrialmente na produção de proteínas recombinantes para a saúde humana e animal. Diversas proteínas recombinantes, tais como, insulina humana, hormônios de crescimento, vacinas e enzimas, são produzidas por microrganismos geneticamente modificados (NASCIMENTO et al., 2003; GOMBERT; KILIKIAN, 1997; BALAMURUGAN et al., 2006; GOMES et al., 2016).

Esta tecnologia consiste em isolar o DNA de interesse, produtor da proteína desejada, inseri-lo em uma bactéria ou célula, isolando e purificando as proteínas produzidas nesse processo (REIS et al., 2009).

A bactéria *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados na produção de proteínas recombinantes, devido ao extenso conhecimento da sua fisiologia e genética (CHOI; LEE, 2004; BABAEIPOUR; SHOJAOSADATI; MAGHSOUDI, 2013).

Na produção de proteínas heterólogas é importante não somente o desenvolvimento das cepas, que carregam os genes exógenos, como também o desenvolvimento do processo de produção. Nesse sentido, o estudo das condições adequadas de cultivo em biorreator é um requisito essencial para viabilidade do processo (ROSSI, 2001).

Uma das alternativas para aumentar a produtividade de proteínas recombinantes é o uso de cultivos com elevadas concentrações celulares, porém, é necessário desenvolver meios de cultura adequados que contenham todos os nutrientes necessários para atingir a concentração celular desejada, evitando inibições por altas concentrações de algum nutriente, ou o inverso, a ausência ou limitação de algum elemento essencial ao metabolismo celular, prejudicando o crescimento microbiano.

Além do estudo da composição dos meios de cultura, o modo de operação do biorreator, bem como a vazão de alimentação do substrato para controlar a velocidade específica de crescimento são estratégias que têm sido estudadas para atingir altas densidades celulares (SARGO, 2011; KILIKIAN, et al., 2000).

A batelada alimentada, também chamada de “fed-batch”, é a estratégia de processo mais utilizada para atingir altas concentrações celulares (ROSANO,

CECCARELLI, 2014; YIM et al, 2001). Uma das principais vantagens da batelada alimentada é controlar a produção de subprodutos indesejados como o ácido acético, o qual é um composto prejudicial ao metabolismo celular e é o principal produto das vias fermentativas de *E. coli*, quando se utiliza glicose como substrato (SUÁREZ; LIRIA; KILIKIAN, 1998; BAUER et al., 1990).

Estudos realizados por pesquisadores do Instituto Butantan (IB), a partir da genética do carrapato *Amblyomma cajennense*, permitiram identificar uma proteína com ação anticoagulante e potencialmente antitumoral, codificada por um gene proveniente das glândulas salivares desse carrapato. Esse gene foi clonado no microrganismo *Escherichia coli*, que passou a expressar a proteína de interesse, sendo assim denominada *E. coli* BL21DE3 – Rec1. O Instituto Butantan utilizou a proteína expressa pela bactéria *E. coli* BL21DE3 – Rec1 para realizar os primeiros testes pré-clínicos em camundongos, porém houve uma demanda de maiores quantidades dessa proteína para realização dos testes pré-clínicos em coelhos e a definição de um protocolo de produção em reatores se fez necessária. Em 2014 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 IBu – Instituto Butantan, o IPT – Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo e a indústria farmacêutica União Química, detentora da patente dessa proteína. Este trabalho está inserido neste projeto e sendo desenvolvido no IPT. Através do mesmo foi possível elaborar um protocolo para obtenção de elevadas concentrações celulares e produção da proteína recombinante Amblyomin–X expressada na bactéria *E. coli* BL21DE3 – Rec1 em reatores com capacidade total de 15 L.

O escopo desse projeto contempla as seguintes etapas:

Instituto Butantan (IBu)

- a. Clonagem Molecular e Desenvolvimento de Sistemas de Expressão
- b. Separação e Purificação
- c. Ensaio para o Controle de Qualidade
- d. Ensaio de Biologia Celular
- e. Ensaio Funcionais (*in vitro* e *in vivo*)
- f. Análises por Informática
- g. Aplicação de Princípios de Boas Práticas de Laboratório (BPL)

- h. Contratação de Ensaio Pré-Clínicos para Registro

Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT)

- a. Estudo cinético da etapa de crescimento do microrganismo**
- b. Estudo cinético da etapa de biossíntese do produto – Proteína Recombinante**
- c. Implantação da Quantificação da Expressão Gênica
- d. Proposição do Modelo Matemático fenomenológico estruturado
- e. Proposição de Modelos Metabólicos
- f. Otimização Matemática baseada nos modelos matemáticos propostos
- g. Protocolo do Processo de Produção da proteína recombinante**
- h. *Scale-up* (LBI - biorreatores de 10, 50 e 100 L). Aplicação de técnicas de CFD (Computational Fluid Dynamics)
- i. Pré-viabilidade econômica do processo

As etapas destacadas estão inseridas neste trabalho e a partir dos dados experimentais provenientes das etapas (a) e (b) foi definido um Protocolo de Produção da Proteína Amblyomin-X (g).

Para tal, o processo de produção desta proteína recombinante é constituído por três etapas distintas: batelada (etapa 1), batelada alimentada (etapa 2) e fase de indução – síntese da proteína (etapa 3). Para todo o processo foi utilizada glicose como fonte de carbono, visto que a glicose é facilmente assimilada pela *E. coli* resultando em uma elevada velocidade específica de crescimento (SARGO, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O trabalho proposto foi viabilizado pela necessidade de um protocolo de produção da proteína recombinante Amblyomin-X expressada na bactéria *E. coli* BL21DE3 – Rec1 em biorreatores com capacidade total de 15 L empregado na produção de diversos lotes de proteínas nos testes pré-clínicos em coelhos e cachorros pelo IBu. Este protocolo servirá também como base para a produção em escala piloto dessa proteína recombinante pela indústria União Química para testes clínicos.

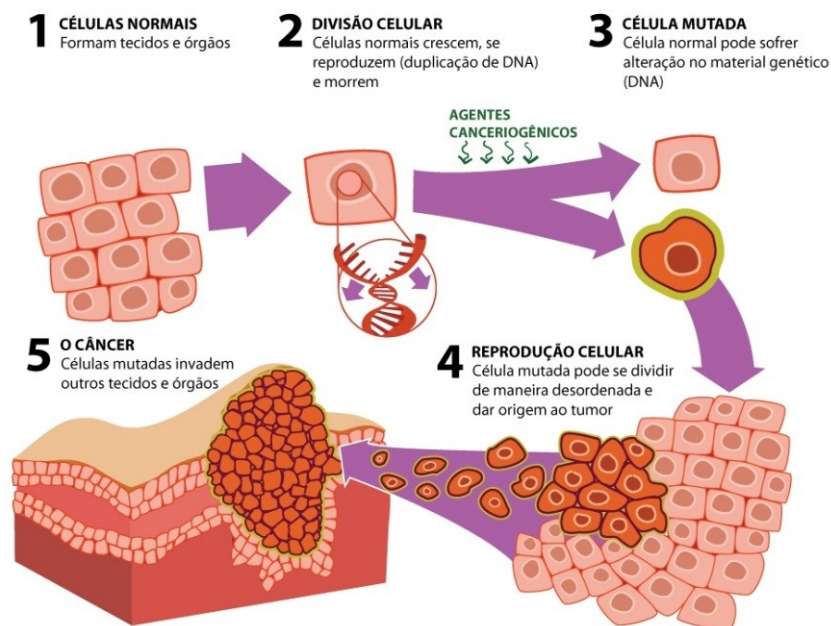
3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O câncer

O câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento. Uma estimativa mundial realizada em 2012 pelo projeto Globocan/International Agency for Research on Cancer (Iarc) apontou que dos 14 milhões de casos estimados (exceto câncer de pele não melanoma), mais de 60% ocorreram nesses países. O câncer está entre as doenças de maior taxa de mortalidade e é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo. A estimativa aponta a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos de câncer no Brasil em 2016 e 2017 (INCA, 2015).

O câncer é formado pelo crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase) (**Figura 1**). Dividindo-se rapidamente, essas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, resultando na formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) (MS, 2014).

Figura 1 – Formação de um tumor de células cancerígenas



O tratamento do câncer pode ser feito através de radioterapia, quimioterapia, cirurgia ou transplante de medula óssea. Porém, alguns tipos de câncer, como o carcinoma de células renais (CCR), o adenocarcinoma pancreático e o melanoma são resistentes aos dois primeiros citados (CHUDZINSKI-TAVASSI et al, 2010; ZAMPOLLI, 2011). Outro problema enfrentado pelos pacientes com câncer são os efeitos colaterais causados pelos tratamentos disponíveis.

Recentemente, um grupo de pesquisadores do Instituto Butantan (IBU), identificou uma proteína com ação anticoagulante e potencialmente antitumoral, denominada Amblyomin-X.

Estudos experimentais com esta proteína têm mostrado sua capacidade de interferir com o sistema da coagulação, prolongando esse tempo (BATISTA et al., 2010), e induzindo a morte celular por apoptose em diferentes linhagens tumorais, como as de melanomas murino e humano, além de possuir efeito antitumoral *in vivo* (DREWES, 2011).

3.2 Amblyomin-X

O carrapato *Amblyomma Cajennense* (**Figura 2**) é classificado como um membro da família dos carrapatos *Ixodidae*, subfamília *Amblyomminae*, popularmente conhecido como carrapato-estrela, e pertence a uma das espécies mais importante, devido à sua capacidade de se alimentar de todas as classes de vertebrados, incluindo o homem (CHUDZINSKI-TAVASSI et al, 2010).

Figura 2 – Extração da saliva do carrapato-estrela (*Amblyomma Cajennense*)



Fonte: Instituto Butantan (IBu).

Uma proteína denominada Amblyomin-X (***Amblyomma Cajennense*** inibidor do Fator **Xa**), caracterizada como um inibidor de protease, foi obtida a partir de uma biblioteca de cDNA das glândulas salivares do carrapato *Amblyomma Cajennense* e expressa na bactéria *E. coli*. Essa proteína é capaz de inibir o fator de coagulação Xa (FXa) e demonstrou induzir a morte de células tumorais, incluindo o carcinoma de células renais (CCR), o adenocarcinoma pancreático e o melanoma, além de ter pouca ou nenhuma atividade contra células normais, diminuindo assim os efeitos colaterais nos pacientes em tratamentos contra o câncer (AKAGI et al., 2012; BATISTA et al., 2008; BATISTA et al., 2010; BRANCO et al., 2016; VENTURA et al., 2013; DREWS et al., 2012).

3.3 Tecnologia do DNA Recombinante

A tecnologia do DNA recombinante surgiu a partir do desenvolvimento de um protocolo para a manipulação de DNA de células visando à orientá-las para a produção de proteínas específicas. Consistia em isolar o DNA de interesse – produtor da proteína desejada –, inserí-lo em uma bactéria ou célula e, produzir, isolar e purificar as proteínas produzidas nesse processo (REIS et al., 2009).

Atualmente, com o avanço da biotecnologia e da engenharia genética, os cultivos celulares foram os sistemas encontrados para a produção dos biofármacos, que são proteínas recombinantes com fins terapêuticos, obtidos através de processos biotecnológicos (STRYJEWSKA et al., 2013).

Essa tecnologia pode ser usada para estudar os mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação da sequência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica (NASCIMENTO et al., 2003; GOMBERT; KILIKIAN, 1997). Por causa de suas vastas possibilidades, a tecnologia do DNA recombinante é muitas vezes referida como a pedra fundamental da biotecnologia moderna (REIS et al., 2009).

As proteínas recombinantes podem ser expressas utilizando como hospedeiros: bactérias, leveduras, fungos, e células de insetos, de animais e plantas ou de mamíferos. A escolha do hospedeiro é de fundamental importância para a produção bem sucedida da proteína desejada e tal escolha deve levar em consideração a estrutura, funcionalidade e a complexidade da proteína, assim como a produtividade a ser alcançada (EINSFELDT, 2014).

3.4 Sistema de expressão em *Escherichia coli*

Sistemas de expressão bacterianos são amplamente utilizados para expressão de proteínas recombinantes (GOMES et al., 2016). A bactéria *Escherichia coli* (**Figura 3**) é um dos microorganismos mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes em escala industrial, pois oferece diversas vantagens, tais como: elevados níveis de expressão de proteína recombinante, rápida multiplicação celular e requer meios de cultivo simples e baratos (BALAMURUGAN et al., 2006; PEREZ, 2015; GOMES et al., 2016; CHOI; KEUM; LEE, 2006; SAHDEV; KHATTAR; SAINI, 2007; GUPTA; SHUKLA, 2017; LEONE et al., 2015).

Figura 3 – A bactéria *Escherichia coli*



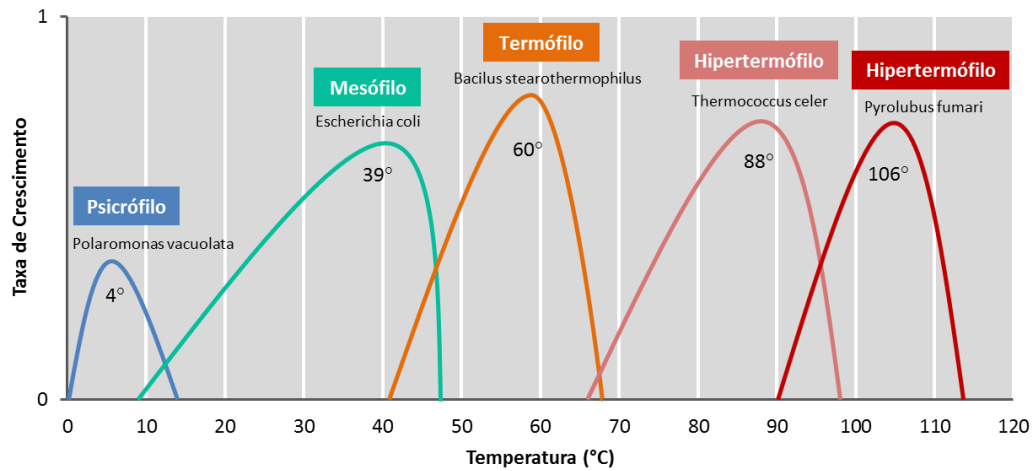
Fonte: <http://www.cadenagramonte.cu/articulos/ver/60485>.

Algumas enzimas industriais (renina, amilases, proteases e celulases) e algumas proteínas terapêuticas (insulina, hormônios de crescimento e interferons) são exemplos de proteínas recombinantes produzidas em *E. Coli*. (EITEMAN; ALTMAN, 2006; SARGO, 2011).

O vasto conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética. Genes estranhos ao seu genoma podem ser introduzidos em plasmídeos ou até no seu próprio genoma com relativa facilidade e previsibilidade (LIMA, 2004; GOMES et al., 2016).

A *E. Coli* é uma bactéria mesófila, podendo crescer a temperaturas entre 8 a 48 °C (**Figura 4**). No entanto, sua temperatura ótima de crescimento está entre 37° e 39 °C. Segundo Neidhardt et al. (1990), ela cresce bem em ambientes próximos da neutralidade, isto é, a um pH entre 6 a 8 (SARGO, 2011).

Figura 4 – Faixas de temperatura ótima para diferentes microrganismos



Fonte: Adaptado de <http://slideplayer.com.br/slide/4199614/>.

3.5 Metabolismo da bactéria *E. coli* e a formação de ácido acético

Uma das vantagens da utilização de glicose como fonte de carbono é que ela é facilmente assimilada pela *E. coli* resultando em uma elevada velocidade específica de crescimento. Em contrapartida, um dos obstáculos encontrados na utilização de *E. coli* como sistema de expressão, utilizando glicose como fonte de carbono, é a produção de acetato, tanto na etapa de crescimento celular como na etapa de indução da proteína, pois concentrações elevadas de acetato inibem o crescimento celular (SARGO, 2011; EINSFELDT, 2014).

Um grande desafio na produção de proteínas recombinantes com elevadas concentrações celulares é o acúmulo de acetato, que é prejudicial ao crescimento celular (TRIPATHI et al., 2009). O acetato é principalmente produzido quando a bactéria *E. coli* é cultivada em condições anaeróbias ou limitantes de oxigênio. No entanto, o excesso de glicose no meio de cultura também pode produzir acetato, mesmo sob condições aeróbias (TRIPATHI et al., 2009; LULI; STROHL, 1990; ELMANSI; HOLMS, 1998; KLEMMANN; STROHL, 1994).

Para entender melhor a formação de metabólitos celulares em *E. coli*, faz-se necessário analisar o metabolismo microbiano (**Figura 5**).

O princípio de conversão de substratos em biomassa e energia consiste no transporte da fonte de carbono para dentro da célula e depois no seu catabolismo em moléculas mais simples e incorporação nas vias metabólicas centrais (anabolismo). A conversão de compostos intermediários na bactéria *E. coli* é catalisada por enzimas organizadas em vias catabólicas como a glicólise, via das pentoses e o ciclo do ácido cítrico. Estas vias conduzem à produção de energia, sob a forma de ATP (adenosina trifosfato), assim como coenzimas reduzidas, como o NADH (hidrogeno-nicotinamida adenina dinucleótido) e o FADH₂ (hidrogeno-flavina adenina dinucleótido) (VELOSO, 2006; SARGO, 2011).

Essa descrição geral se aplica para a maioria dos microrganismos, assim como para *E. coli*. Da mesma forma, para muitos organismos aeróbios facultativos, a ocorrência do chamado “metabolismo overflow” é uma característica do processamento de algumas fontes de carbono pela via glicolítica (RIESEBERG, 1991). O “metabolismo overflow” ocorre quando o fluxo de glicose catabolizado a piruvato e posteriormente oxidado a acetil-CoA pela ação da enzima piruvato desidrogenase, ativa somente em condições de aerobiose, supera a capacidade de assimilação do acetil-CoA pela via do ácido cítrico e/ou cadeia transportadora de elétrons. Neste caso o acetil-CoA é transformado em acetato e secretado para o meio de cultura (EITEMAN; ALTMAN, 2006; SARGO, 2011).

Alguns autores (SIMÕES, 1994; GOMBERT; KILIKIAN, 1997; RIESENBERG et al., 1991) afirmam que concentrações de ácido acético em torno de 0,9 a 1,5 g/L, prejudicam a expressão da proteína recombinante e que valores acima de 5 g/L reduzem a velocidade de crescimento celular, o rendimento celular e conseqüentemente as concentrações celulares máximas atingíveis. Este composto tende a ser formado quando a velocidade específica de crescimento celular ultrapassa 0,20 h⁻¹, quando em meio de cultura complexo, e 0,35 h⁻¹, quando em meio de cultura definido (RIESENBERG et al., 1991; TRIPATHI et al., 2009; EINSFELDT, 2014). Porém todos estes valores devem ser considerados apenas como referência, pois as concentrações inibitórias de crescimento parcial ou total dependem muito das cepas e dos meios de cultura utilizados (SUÁREZ; LIRIA; KILIKIAN, 1998; LULI; STROHL, 1990; EINSFELDT, 2014).

Portanto um estudo mais aprofundado da linhagem, na composição do meio de cultura, na fonte de carbono utilizada, na temperatura de cultivo e nas estratégias

de alimentação deve ser realizado para conhecer as concentrações inibitórias por ácido acético em cada processo e também para maximizar o rendimento da proteína recombinante.

3.6 Meios de cultura para cultivos de *E. coli*

Segundo Tripathi (2009), na produção de proteínas recombinantes, a composição do meio de cultivo empregado tem grande influência sobre o metabolismo da *E. coli* e sobre a expressão da proteína.

Podemos classificar os meios de cultura como: i) definidos ou sintéticos, cuja composição química é completamente conhecida e pode ser reproduzida a qualquer instante; ou ii) meios de culturas complexos, que levam em sua formulação compostos como extrato de levedura (autolisado de leveduras), extrato de carne, extrato de malte, peptona (hidrolisado de proteínas) (SCHIMIDELL et al., 2001) etc.

Alguns meios de cultura complexos utilizados para o crescimento de *E. coli* são: Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB), Super Broth (SB), que são constituídos por triptona ou peptona e extrato de levedura em diferentes concentrações e com adição de diferentes sais (TRIPATHI et al., 2009).

Dentre as vantagens da utilização dos meios de cultura complexos, podemos citar que esse tipo de meio suporta o crescimento de várias linhagens de *E. coli* e a velocidade de crescimento é geralmente maior que em meios de cultura definidos, devido à presença da triptona, que fornece os aminoácidos e pequenos peptídeos à bactéria, enquanto que o extrato de levedura supre a demanda de nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos (SARGO, 2011; EINSFELDT, 2014).

Porém é importante ressaltar que meios de cultura definidos são mais baratos, permitem um melhor controle e monitoramento do processo, evitando a presença de componentes que podem estar em concentrações inibitórias para o metabolismo da *E. coli* ou para a expressão da proteína recombinante, e além disso, facilitam o processo de purificação de proteínas recombinantes (*downstream*) (LIMA, 2004; TRIPATHI et al., 2009).

Riesenberg (1991) apresentou concentrações inibitórias de diferentes nutrientes para o crescimento celular de *E. coli*, entre eles, glicose > 50 g/L; amônia > 3 g/L; fósforo > 10 g/L; magnésio > 8,7g/L; molibdênio > 0,8 g/L; boro > 44 mg/L;

cobre > 4,2 g/L; manganês > 68 mg/L; cobalto > 0,5 mg/L; zinco > 38 mg/L e ferro > 1,15 g/L.

Um dos grandes desafios encontrados para atingir altas concentrações celulares é desenvolver meios de cultura adequados que contenham todos os nutrientes necessários para atingir a concentração celular desejada, evitando inibições por altas concentrações de algum nutriente, ou a ausência ou limitação de algum elemento essencial ao metabolismo celular, prejudicando o crescimento microbiano.

A glicose é o substrato mais utilizado no crescimento de *E. coli*, já que é simultaneamente fonte de carbono e de energia, ser de baixo custo, além de facilmente metabolizada pela *E. coli* resultando em uma elevada velocidade específica de crescimento. Porém, conforme mencionado anteriormente, o uso da glicose em excesso pode fazer com que o cultivo se acidifique, inibindo ou até mesmo interrompido o crescimento microbiano (EINSFELDT, 2014; SARGO, 2011).

Segundo Lima (2004), alterações na composição do meio de cultura, principalmente na fonte de carbono utilizada para o cultivo celular, podem minimizar a formação de acetato. Uma das alternativas é utilizar o glicerol como fonte de carbono para o crescimento de *E. coli*, pois esta fonte de carbono é mais lentamente assimilada, levando a um crescimento mais lento, porém com menor acúmulo de acetato.

3.7 Modos de operação dos biorreatores para obtenção de altas concentrações celulares e estratégias de cultivo

A obtenção de altas concentrações celulares em biorreatores é necessária para maximizar a produtividade de proteínas recombinantes e várias estratégias têm sido desenvolvidas utilizando *E. coli* para essa finalidade (TRIPATHI et al., 2008; RIESENBERG; GUTHKE, 1999; GOMBERT; KILIKIAN, 1997; RIESENBERG et al., 1991).

No entanto, uma série de dificuldades aparece quando se pretende atingir altas concentrações celulares, como por exemplo, baixa solubilidade do oxigênio no meio de cultura, inibições pelo substrato e produção de subprodutos metabólicos indesejáveis ao processo (RIESENBERG et al., 1991).

O biorreator pode operar em modo descontínuo (batelada), semi-contínuo (batelada alimentada) ou contínuo. A produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico, nas quais as boas práticas de fabricação requerem alta qualidade de produto final e reprodutibilidade de processamento, tem utilizado largamente bioprocessos em batelada alimentada, no intuito de atingir alta concentração celular, com elevada produtividade do sistema, levando a baixos investimentos e custos de produção (LIMA, 2004).

O processo em batelada alimentada é definido como uma estratégia de condução na qual um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo enquanto os produtos permanecem até o final do cultivo. É um dos principais modos de cultivo utilizado para atingir altas concentrações celulares, uma vez que permite controlar a vazão de alimentação do substrato, diminuindo ou até mesmo impedindo a formação de acetato durante o cultivo. Geralmente, processos conduzidos em batelada alimentada alcançam concentrações superiores a 50 g/L de massa seca de células (LIMA, 2004; SARGO, 2011; RIESENBERG et al., 1991).

Esse modo de cultivo permite controlar a adição da fonte de carbono e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento (μ_x) a fim de minimizar a ocorrência do “metabolismo overflow” (SARGO, 2011).

A **Tabela 1** mostra as principais vantagens e desvantagens desses modos de operação.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens dos principais modos de operação de biorreatores

Modo de Operação	Vantagens	Desvantagens
Decontínuo (Batelada)	<ul style="list-style-type: none"> - Forma mais simples de condução de ensaios; - Adequado para produção em baixa escala; - Adequado para a formação de produto associado ao crescimento; - Redução do esforço experimental, tempo e consumo de reagentes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Longo tempo de espera para limpeza, enchimento e descarga do biorreator (existência de tempos mortos); - Variação das condições de reação com o tempo; - Não há uniformidade de produto de uma batelada para outra, podendo afetar o processo de recuperação do produto; - Não é apropriado para atingir altas concentrações celulares.

<p>Semi-Contínuo (Batelada Alimentada)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Permite o controle da oferta do substrato às células, evitando a inibição por substrato; - Permite obtenção de elevadas concentrações celulares; <p>Adequado para formação de produto associado ou não ao crescimento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Necessita de estratégia de alimentação definida para alcançar a concentração desejada de substrato e produto; - Necessita de equipamentos e de <i>software</i> para a alimentação dos substratos; - Dificuldade de manutenção das condições de assepsia por longos períodos de tempo; - Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas durante o longo período de fermentação; - Necessita de esforço experimental, tempo e gastos de consumíveis.
<p>Contínuo</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Permite elevada produção; - Redução de tempos “mortos” ou não produtivos; - Obtenção de produto uniforme devido às condições constantes de operação; - Adequado para estudos cinéticos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer manutenção de condições de assepsia por longos períodos de tempo; - Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas durante o longo período de fermentação; - Dificuldade de manutenção de homogeneidade no fermentador, quando se trabalha com baixas vazões ou meios muito viscosos; - Grande esforço experimental, tempo e gastos de consumíveis;

Fonte: Adaptado de SARGO, 2011 e VELOSO, 2006.

No caso da produção de proteínas heterólogas por *E. coli* recombinante, os cultivos podem ser divididos basicamente em três etapas distintas: Cultivo descontínuo (batelada), Cultivo semi-contínuo (batelada alimentada) e fase de indução (síntese da proteína recombinante).

Na primeira etapa (batelada) não há limitação da fonte de carbono e essa etapa é caracterizada pelo consumo do substrato inicialmente adicionado no meio de cultura para o crescimento do microrganismo, ou seja, espera-se velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{x\text{máx}}$) caso a concentração de substrato esteja acima dos valores limitantes. Na segunda etapa (batelada alimentada), a alimentação do substrato (glicose) é calculada para resultar em limitação da fonte de

carbono, evitando o acúmulo de glicose no meio, e conseqüentemente evitando a formação de subprodutos inibitórios. Por essa razão, a velocidade específica de crescimento celular (μ_x) deve ser mantida abaixo do seu valor máximo ($\mu_{x\text{máx}}$), através da manipulação da vazão da bomba de alimentação do substrato (RIESENBERG et al., 1991; KORZ et al., 1995; MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003). E por fim, a terceira etapa (fase de indução) é caracterizada pela produção da proteína recombinante, com $\mu_x < \mu_{x\text{máx}}$, para se evitar a formação de metabólitos intermediários e permitir apenas a biossíntese celular concomitante à biossíntese da proteína de interesse.

Outro substrato limitante muito importante no crescimento aeróbico da bactéria *E. coli* é o oxigênio. Segundo Piccoli (1995), estratégias que utilizam a bactéria *E. coli* para atingir altas concentrações celulares devem manter a concentração de oxigênio dissolvido acima da sua concentração crítica, controlar a vazão de alimentação da fonte de carbono para evitar excesso de substrato no meio de cultivo, e controlar a velocidade específica de crescimento celular.

Riesenber et al. (1991) propôs um método de cultivo em batelada alimentada para *E. coli*, com controle da velocidade específica de crescimento (μ_x) abaixo de seu valor máximo ($\mu_{x\text{máx}}$) e manutenção da porcentagem de oxigênio dissolvido no meio (%pO₂) em valor constante e acima do seu valor crítico de 4% (0,26 mg/L) (SCHIMIDELL et al., 2001). Essa estratégia possibilitou atingir elevadas concentrações celulares (acima de 110 g/L) e evitou a formação de subprodutos metabólicos inibitórios ao processo.

4 OBJETIVO

Objetivo geral

- ✓ Elaborar um protocolo para obtenção de elevadas concentrações celulares e síntese da proteína recombinante Amblyomin-X expressada na bactéria *E. coli* BL21DE3 – Rec1 em biorreatores com capacidade total de 15 L.

Objetivos específicos

- ✓ Definir um meio de cultura para o crescimento do microrganismo e para a produção da proteína heteróloga;
- ✓ Definir um modo de condução do bioprocesso em biorreatores;
- ✓ Elaborar uma estratégia de alimentação dos substratos limitantes na etapa de crescimento microbiano;
- ✓ Conhecer os parâmetros cinéticos do processo, tais como, fatores de conversão substrato em produto e a produtividade celular.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Linhagens

Os microrganismos empregados nos experimentos foram: i) a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1 e; ii) a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec2. Ambas se diferem por suas construções plasmidiais. A primeira construção plasmidial visou à expressão da proteína Amblyomin, enquanto que a segunda foi resultado de uma modificação para favorecer as etapas de separação e purificação (*downstream*) do processo industrial, mais especificamente, evitar a formação de agregados protéicos.

Ambas as linhagens foram fornecidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan. Esses microrganismos foram utilizados nos ensaios em agitador rotativo (*shaker*) e biorreatores.

5.1.2 Antibióticos

A resistência específica aos antibióticos foi determinada e informada pelo Instituto de origem. Para a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec1 utilizou-se o antibiótico ampicilina (100 mg/mL) e para a bactéria *Escherichia coli* BL21DE3 – Rec2 utilizou-se o antibiótico canamicina (50 mg/mL).

Solução de Ampicilina

Ampicilina (C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S)	1 g
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 10 mL

Solução de Canamicina

Canamicina (C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁)	0,5 g
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 10 mL

5.1.3 Meios de cultura

Os meios de culturas e soluções utilizados em todos os ensaios foram preparados seguindo as boas práticas de laboratório (BPL). Os componentes e as quantidades utilizadas nos meios de cultura são apresentados em seguida.

Luria-Bertani – LB (SAMBROOK et al., 1989)

Triptona	10 g
Extrato de Levedura	5 g
Cloreto de Sódio (NaCl)	10 g
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 1000 mL

Meio de crescimento I (Inóculo) (Suárez; Liria; Kilikian, 1998)

Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g
Fosfato Monobásico de Potássio (KH ₂ PO ₄)	13 g
Fosfato Dibásico de Potássio (K ₂ HPO ₄)	10 g
Fosfato Dibásico de Amônio ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	3 g
Fosfato Monobásico de Sódio Hidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	4,6 g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,46 g
Extrato de Levedura	1 g
Cloreto de Ferro (III) Hexahidratado (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	123,42 mg
Sulfato de Zinco Heptahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8,19 mg
Cloreto de Cobalto Hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	6 mg
Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	73,8 mg
Cloreto de Cobre (II) (CuCl ₂)	3 mg
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	1,5 mg
Sulfato de Alumínio hidratado (Al ₂ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O)	4,8 mg
Sulfato de Manganês Hidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	20,4 mg
Molibdato de Sódio Hidratado (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	6,0 mg
Ácido Clorídrico 37% (HCl)	0,3 mL
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 1000 mL

Terrific Broth – TB

Caseína	12 g
Extrato de Levedura	24 g
Fosfato Monobásico de Potássio (KH ₂ PO ₄)	2,2 g
Fosfato Dibásico de Potássio (K ₂ HPO ₄)	9,4 g
Glicerol (C ₃ H ₈ O ₃)	4 g
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 1000 mL

Meio de crescimento II (Reator) (Adaptado de SUÁREZ; LIRIA; KILIKIAN, 1998)

Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	3 g
Fosfato Monobásico de Potássio (KH ₂ PO ₄)	13 g
Fosfato Dibásico de Potássio (K ₂ HPO ₄)	10 g
Fosfato dibásico de Amônio ((NH ₄) ₂ HPO ₄)	3 g
Fosfato monobásico de Sódio Hidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	4,6 g
Sulfato de Magnésio Heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	2,0 g
Extrato de Levedura	1 g
Cloreto de Ferro (III) Hexahidratado (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	123,42 mg
Sulfato de Zinco Heptahidratado (ZnSO ₄ ·7H ₂ O)	8,19 mg
Cloreto de Cobalto Hexahidratado (CoCl ₂ ·6H ₂ O)	6 mg
Cloreto de Cálcio Dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	73,8 mg
Cloreto de Cobre (II) (CuCl ₂)	3 mg
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	1,5 mg
Sulfato de Alumínio hidratado (Al ₂ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O)	4,8 mg
Sulfato de Manganês Hidratado (MnSO ₄ ·H ₂ O)	20,4 mg
Molibdato de Sódio Hidratado (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	6,0 mg
Ácido Clorídrico 37% (HCl)	0,3 mL
Água Destilada (H ₂ O)	q.s.p. 1000 mL

5.1.4 Soluções**Glicose para alimentação**

Glicose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	600 g
--	-------

Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 25,9 g
Água Destilada (H_2O) q.s.p. 1000 mL

Hidróxido de amônio

Hidróxido de Amônio (NH_4OH) 400 mL
Água Destilada (H_2O) 270 mL

Ácido sulfúrico

Ácido Sulfúrico Fumegante 37% (H_2SO_4) 200 mL
Água Destilada (H_2O) q.s.p. 1000 mL

Ácido tricloroacético (TCA) 250g/L

Ácido Tricloroacético (CCl_3COOH) 250 g
Água Destilada (H_2O) q.s.p. 1000 mL

Glicerol 40%

Glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) 40 mL
Água Destilada (H_2O) 60 mL

IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside) 1mM

IPTG ($\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5\text{S}$) 0,25 g
Água Destilada (H_2O) 10 mL

Solução protetora

Leite Desnatado 10 mL
Glutamato de Sódio ($\text{C}_5\text{H}_8\text{NNaO}_4$) 5 mL
Água Destilada (H_2O) q.s.p 100 mL

5.2 Métodos

5.2.1 Preparo do banco de trabalho e preservação

Todas as linhagens obtidas foram preservadas pelo Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do IPT por congelamento e liofilização.

a) Congelamento

Para a preservação, descongelou-se a suspensão criopreservada da linhagem de interesse e inoculou-se 500 μ L de suspensão da linhagem em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 50 μ L da solução de antibiótico. Foram incubados 2 frascos no agitador rotativo por um período de 10 horas, a 37 °C e 200 rpm.

Após o período de 10 horas, transferiu-se 500 μ L do cultivo para cada frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 50 μ L da solução de antibiótico. Foram incubados 2 frascos no agitador rotativo por um período de 4 horas, a 37 °C e 200 rpm.

Após o período de 4 horas, alíquotas de 600 μ L foram transferidas para microtubos estéreis. O mesmo volume de solução de glicerol 40% estéril foi adicionado para uma concentração final de 20%. O congelamento foi realizado inicialmente em freezer -20 °C e depois armazenado em um freezer -80 °C. Para cada uma das linhagens foram preparados bancos de trabalho distintos.

b) Liofilização

Para a liofilização, primeiramente centrifugou-se o cultivo em fase exponencial em meio de cultura LB por 10 min, a 4 °C e 20.600xg e descartou-se o sobrenadante.

Ressuspendeu-se o material decantado em solução protetora esterilizada. O volume foi adequado para concentrar o material em cerca de 20 vezes (para 200 mL de cultura centrifugada, utilizou-se 10 mL de solução protetora).

Homogeneizou-se cuidadosamente a suspensão de células e cerca de 100 μ L foram distribuídos em ampolas de vidro. O congelamento foi realizado lentamente (aproximadamente a 1 °C/min) em liofilizador até a temperatura de -40 °C.

Após a conclusão do processo, as ampolas foram fechadas sob o vácuo utilizando o sistema "*Manifold*" do liofilizador.

5.2.2 Preparo dos biorreatores

Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Industrial (LBI) do IPT e conduzidos em biorreatores Sartorius Biostat C plus de 15 L, com volume útil inicial que variou entre 5 e 10 L. Esse biorreator é aerado e agitado mecanicamente e possui controle automático das variáveis temperatura, pH e oxigênio dissolvido. O preparo inicial para todos os ensaios seguiu as etapas:

- i) A sonda de pO_2 foi calibrada na ausência de O_2 (zero), utilizando N_2 e no máximo da concentração de O_2 dissolvido no meio de cultura (100%) utilizando agitação e aeração.
- ii) A sonda de pH foi calibrada em dois valores de referência, pH = 4,0 e pH = 7,0 respectivamente, e posteriormente conectada ao biorreator.
- iii) O meio de cultura foi esterilizado no biorreator a 121 °C, por 20 minutos, agitado e aerado de acordo com a condição inicial do ensaio.
- iv) A temperatura de todos os experimentos durante a etapa de crescimento foi controlada em 37 °C.
- v) Para o monitoramento de algumas variáveis importantes ao longo dos ensaios foi utilizado o *software* MFCS (Multi Fermenter Computer System).

5.2.3 Avaliação dos meios de cultura

a) Meio Terrific Broth (TB) – Condições e preparação dos ensaios

Inóculo

Para reativação, inoculou-se 1000 μ L de suspensão da linhagem em cada frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 100 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 40 μ L da solução de ampicilina. Foram incubados 4 frascos no agitador rotativo por um período de 4 horas e 30 minutos, a 37 °C e 200 rpm.

Retiraram-se os frascos do agitador rotativo e utilizou-se 250 mL para inocular o biorreator. Separou-se um frasco para análises de pH, da concentração celular por massa seca e densidade ótica (DO_{600nm}).

Preparo do biorreator

Esterilizou-se o biorreator com 5 L de meio de cultura TB e antes de inocular, adicionou-se com auxílio de uma seringa e agulha estéreis, 10 mL da solução de ampicilina.

Inoculou-se o biorreator com o auxílio de um frasco tipo “Marriot” (arataca) que continha 250 mL do inóculo previamente preparado.

b) Meio Luria Bertani (LB) – Condições e preparação dos ensaios

Para este ensaio o Instituto Butantan forneceu as suspensões microbianas em 5 (cinco) microtubos, 20 mL de solução de ampicilina (100 mg/mL) e 20 mL de solução de IPTG 1M em frascos apropriados.

Inóculo

Esterilizou-se 500 mL de meio de cultura LB em um frasco de 1000 mL. Após resfriar a temperatura ambiente, adicionou-se 500 µL de solução de ampicilina.

Inoculou-se essa solução com 500 µL da suspensão microbiana (03 microtubos) homogeneizou-se por agitação e distribuiu-se em 5 frascos do tipo Erlenmeyer de 500 mL de volume (100mL em cada Erlenmeyer). Foram incubados os frascos no agitador rotativo por um período de 18 horas, a 37 °C e 200 rpm.

Retiraram-se os frascos do agitador rotativo e utilizou-se 250 mL para inocular o biorreator. Separou-se um frasco para análises de pH, da concentração celular por massa seca e densidade ótica (DO_{600nm}).

Preparo do biorreator

Esterilizou-se o biorreator com 9,75 L de meio de cultura LB e antes de inocular, adicionou-se com auxílio de uma seringa e agulha estéreis 10 mL da solução de ampicilina.

Inoculou-se o biorreator com o auxílio de um frasco tipo “Marriot” (arataca) que continha 250 mL do inóculo previamente preparado.

Na etapa de expressão da proteína recombinante, 10 mL de IPTG 1M (volume para concentração final de 1 mM) foi adicionado com auxílio de uma seringa e agulha estéreis. A agitação do biorreator foi aumentada de maneira a permitir que

a porcentagem de oxigênio dissolvido dentro do biorreator nunca permanecesse inferior a 30%. Essa etapa de produção demandou 4 (quatro) horas.

De hora em hora, durante as 4 (quatro) horas da etapa de expressão da proteína, foram retiradas amostras para análise de concentração celular por massa seca e densidade ótica (DO_{600nm}). No mesmo tempo de amostragem foram centrifugadas, em duplicata, quantidades de caldo correspondente a D.O. de 1 (uma) unidade em microtubos, por 5 minutos e 20.600xg. Essas amostras, empregadas posteriormente para análise em SDS-PAGE, foram armazenadas em freezer -20 °C.

c) Meio biorreator – Condições e preparação dos ensaios

Determinação do tempo de incubação do inóculo

Para a reativação do microrganismo, inoculou-se 250 µL de suspensão da linhagem em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 25 µL da solução de ampicilina. Foram incubados 2 frascos no agitador rotativo por um período de 10 horas, a 37 °C e 200 rpm.

Após o período de 10 horas, transferiu-se 6 mL do cultivo para um frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 600 mL do meio de crescimento I (Inóculo) e adicionou-se 600 µL da solução de ampicilina.

Transferiu-se 25 mL em cada um dos 22 frascos Erlenmeyers de 125 mL estéreis e esses incubados no agitador rotativo por um período total de 6 horas e 30 minutos, nas mesmas condições descritas na reativação, retirando-se uma amostra a cada 30 minutos para medida de densidade ótica (DO_{600nm}), massa seca e pH. Foram então determinadas as fases e velocidades de crescimento.

Pré-Inóculo (Reativação)

Inoculou-se 500 µL de suspensão da linhagem em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 50 µL da solução de antibiótico. Foram incubados 2 frascos no agitador rotativo por um período de 10 horas, a 37 °C e 200 rpm. Ao final do período de reativação, separou-se um frasco para a etapa de inóculo.

Inóculo

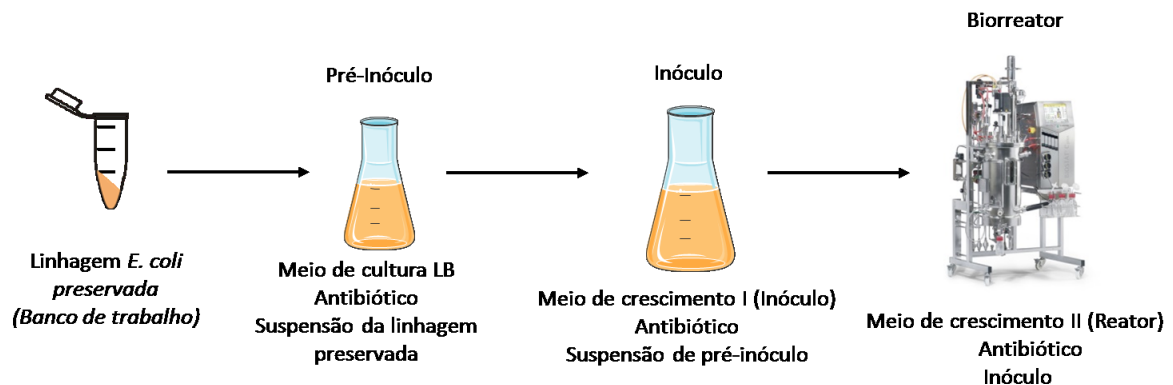
Inoculou-se 2 mL da suspensão de pré-inóculo em 5 frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL do meio de crescimento I (Inóculo) e adicionou-se 200 µL da solução de ampicilina. Foram incubados os frascos no agitador rotativo por um período de 3 horas, nas mesmas condições descritas para o pré-inóculo.

Retiraram-se os frascos do agitador rotativo e utilizou-se 700 mL para inocular o biorreator. Separou-se um frasco para análise de densidade ótica (DO_{600nm}).

Preparo do biorreator

Esterilizou-se o biorreator com 5,3 L de meio de crescimento II (Reator). Adicionaram-se as soluções de fosfatos e glicose do meio biorreator, que foram esterilizadas separadamente, juntamente com a solução de ampicilina. Logo após, inoculou-se o biorreator com o auxílio de um frasco tipo “Marriot” (arataca) que continha 700 mL (10%) do inóculo.

Figura 6 – Preparo do pré-inóculo e inóculo



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Determinação da melhor temperatura de indução

Para reativação do microrganismo, inoculou-se 500 µL de suspensão de cada linhagem em cada frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura LB e adicionou-se 50 µL da solução de antibiótico apropriada.

Foram incubados 4 frascos (sendo 2 frascos de *E. coli* – Rec2 e 2 frascos de *E. coli* – Rec1) no agitador rotativo por um período de 4 horas, a 37 °C e 200 rpm.

Após o período de 4 horas, transferiu-se 2 mL do cultivo para frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL do meio de crescimento I (Inóculo) e adicionou-se 200 µL da solução de antibiótico. Homogeneizou-se bem.

Incubaram-se 4 frascos (sendo 2 frascos de *E. coli* – Rec1 e 2 frascos de *E. coli* – Rec2) em agitador rotativo, a 37 °C e 200 rpm.

Periodicamente, foram retiradas amostras para determinação de densidade ótica (DO_{600nm}), até que se atingissem valores entre 0,6 e 0,8, o que levou cerca de 4 horas. Este momento foi considerado como T0 (tempo inicial), sendo imediatamente anterior à adição de IPTG para a concentração final de 1 mmol/L.

Dando continuidade, dos 2 frascos contendo o cultivo de *E. coli* – Rec1 em meio de crescimento I (Inóculo), um deles foi incubado sob temperatura de 30 °C e o outro a 37 °C. Da mesma forma, cada frasco de cultivo de *E. coli* – Rec2 foi incubado à 30 °C e 37 °C. A agitação foi mantida constante durante todo o ensaio. De hora em hora, foram retiradas amostras (T1, T2, T3 e T4) para determinação de densidade ótica (DO_{600nm}) e armazenamento em duplicata (material centrifugado a partir de 1 mL de cultivo).

5.2.5 *Estratégia de cultivo e produção da proteína recombinante*

O processo de produção desta proteína recombinante foi constituído por três etapas distintas: batelada, batelada alimentada e fase de indução.

Batelada – Crescimento do microrganismo sem limitação na fonte de carbono.

Batelada alimentada – Crescimento do microrganismo com limitação da fonte de carbono.

Fase de indução – Produção da proteína recombinante com limitação da fonte de carbono.

a) Processo de batelada

A primeira etapa de crescimento do microrganismo foi caracterizada por um processo de batelada, onde houve o consumo principal da fonte de carbono (glicose), sais presentes no meio e nitrogênio fornecido através do controle de pH.

Depois de consumida toda a fonte de carbono (glicose) disponível no meio, foram adicionados três pulsos de 10 g da solução de glicose de alimentação de maneira a propiciar o crescimento exponencial das células.

b) Processo de batelada alimentada por vazão exponencial limitada

Tanto na etapa de crescimento do microrganismo, como na etapa de indução da proteína, a presença de uma fonte abundante de glicose provoca a formação de subprodutos indesejados, principalmente o ácido acético.

Portanto, fez-se necessária uma estratégia de alimentação exponencial dos substratos (fonte de carbono e magnésio), porém que resultasse em valores de μ_x menor que $\mu_{x\text{máx}}$, visando maximizar o crescimento celular e minimizar a produção do subproduto inibidor.

A segunda etapa de crescimento foi, portanto, caracterizada por um processo de batelada alimentada com limitação da fonte de carbono, em crescimento exponencial, porém não em velocidade específica máxima de crescimento celular.

A vazão de alimentação da solução de glicose durante a etapa de crescimento exponencial foi calculada da Equação 1 (GOMBERT; KILIKIAN, 1997):

Equação 1

$$F = \frac{X_0 \cdot V_0 \cdot \mu_x \cdot \exp(\mu_x \cdot t)}{S_0 \cdot Y_{x/s}}$$

No qual,

F = Vazão de alimentação do substrato (mL/h)

X_0 = Concentração celular no início do período de alimentação (g/L)

V_0 = Volume do biorreator no início do período de alimentação (L)

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

S_0 = Concentração da solução de glicose (g/mL)

$Y_{x/s}$ = Fator de conversão de glicose em células ($\text{g}_{\text{célula}}/\text{g}_{\text{glicose}}$)

t = Tempo (h)

c) Produção da proteína Amblyomin-X

Após a obtenção da densidade óptica desejada, ou seja, a obtenção de determinada concentração celular, desligou-se a bomba de alimentação do substrato, de maneira a garantir o consumo total de glicose dentro do biorreator, ajustou-se a temperatura do biorreator para essa etapa do processo e fez-se a indução da biossíntese da proteína, adicionando determinada quantidade de IPTG (calculada segundo o volume estimado do biorreator naquele momento). Após a adição de IPTG, esperou-se cerca de 2 minutos e ligou-se novamente a bomba de alimentação da solução de glicose, dando início à etapa de biossíntese da proteína Amblyomin-X. A duração dessa etapa de processo foi de 4 horas.

5.2.6 Determinação da concentração celular por medida de massa seca

A concentração de biomassa total foi determinada centrifugando-se alíquotas de volumes variados (5 ou 10 mL) por 10 min, a 4 °C e 11.900xg. O sobrenadante foi filtrado em membranas Millipore de poro 0,45 µm e armazenado para análises posteriores. A biomassa foi ressuspensa em um pequeno volume de água destilada e filtrada nessa mesma membrana para posterior pesagem. A membrana e as células foram mantidas em estufa a 105 °C por 4 horas.

5.2.7 Determinação do teor de glicose e ácido acético

As concentrações de glicose e ácido acético foram determinadas no sobrenadante (5.2.6) por cromatografia de fase líquida (HPLC). Previamente foi necessário desproteínizar as amostras para injeção no cromatógrafo.

Para a análise de açúcares 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 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 H₂SO₄ 0,05N como fase móvel, fluxo de 1,0 mL/min. A

calibração do aparelho foi realizada utilizando uma solução de ácido acético com diluições na faixa de 0,1 a 10,0 g/L.

5.2.7.1 Desproteinização

Em um microtubo, pipetou-se 1 mL do sobrenadante previamente filtrado (contendo proteína solubilizada) e adicionou-se 0,2 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) (250 g/L) e 0,8 mL de água ultrapura. Agitou-se e centrifugou-se o microtubo por 10 min, a 4 °C e 18.900xg. Filtrou-se o sobrenadante em filtros tipo Millipore de poro 0,45 µm em *vials*.

5.2.8 Etapa de separação das células

No final do processo de produção, o volume foi centrifugado em frascos de 250 mL com 200 g de meio de cultivo, por 10 minutos, a 4 °C e 4600xg. O sobrenadante foi descartado e a biomassa armazenada em *freezer* a temperatura de -20 °C

5.2.9 Tratamento dos dados experimentais

a) Cálculo de velocidades específicas de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento celular (μ_x) foi calculada a partir da

Equação 2:

Equação 2

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \frac{r_x}{X}$$

Na qual,

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

X = Concentração celular (g/L)

t = Tempo (h)

Portanto,

$$r_x = \mu_x \cdot X \rightarrow \frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X$$

Integrando-se os termos, temos:

$$\int \frac{dX}{X} = \int \mu_x \cdot dt$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x \cdot (t - t_0)$$

Supondo $t_0 = 0$, então:

$$X = e^{(\mu_x \cdot t)} \cdot X_0$$

$$\ln X = \mu_x \cdot t + \ln X_0$$

Assim, num gráfico $\ln X$ vs tempo t , podemos obter o valor de μ_x (coeficiente angular) que representa a velocidade específica de crescimento da bactéria durante a etapa exponencial do processo.

b) Fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$)

Para calcular o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) foi utilizada a Equação 3:

Equação 3

$$Y_{x/s} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

No qual,

$Y_{x/s}$ = Conversão de substrato em célula (g de célula / g de substrato)

X_f = Concentração celular final (g/L)

X_0 = Concentração celular inicial (g/L)

S_0 = Concentração de substrato inicial (g/L)

S_f = Concentração de substrato final (g/L)

c) Produtividade global em células (P_x)

A produtividade global celular pode ser calculada a partir da **Equação 4**:
Equação 4

$$P_x = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0}$$

No qual,

P_x = Produtividade global celular (g de célula/(L · h))

X_f = Concentração celular final (g/L)

X_0 = Concentração celular inicial (g/L)

t_f = Tempo final (h)

t_0 = Tempo inicial (h)

d) Produtividade máxima em células ($P_{x\text{máx}}$)

A produtividade máxima de células é o maior valor encontrado para a **Equação 5**, quando calculada para todos os pontos experimentais:

Equação 5

$$P_{x\text{máx}} = \frac{X_i - X_0}{t_i - t_0}$$

No qual,

$P_{x\text{máx}}$ = Produtividade máxima celular (g de célula/L · h)

X_i = Concentração celular no instante i (g/L)

X_0 = Concentração celular inicial (g/L)

T_i = Tempo no instante i (h)

t_0 = Tempo inicial (h)

e) Balanço gasoso

Medidas de CO_2 e O_2 foram anotadas a cada amostragem para o cálculo da quantidade de oxigênio utilizada na respiração microbiana e da quantidade de CO_2 liberada durante as etapas de crescimento do microrganismo e de produção da proteína. Para tal, foi acoplado um analisador de gases (CO_2 e O_2) da marca Hartmann & Braun para o cálculo dos valores de Oxygen Uptake Rate (OUR) e Carbon Dioxide Evolution Rate (CER) ao longo do tempo nos ensaios.

A velocidade de consumo de oxigênio, OUR (em $\text{gO}_2/\text{L}\cdot\text{h}$), foi calculada de acordo com a Equação 6.

Equação 6

$$\text{OUR} = \left[\frac{\% \text{O}_2_{\text{entrada}} \cdot \text{Vazão}_{\text{Ar}}}{V_{\text{biorreator}}} \right] - \left[\frac{\% \text{O}_2_{\text{saída}} \cdot \text{Vazão}_{\text{Ar}}}{V_{\text{biorreator}}} \right] \cdot \left[\frac{\% \text{N}_2_{\text{entrada}}}{\% \text{N}_2_{\text{saída}}} \right] \cdot [\text{K}] \cdot 10^{-3} \cdot \text{MM}_{\text{O}_2}$$

No qual,

$\%O_{2\text{entrada}} = O_2$ na entrada do biorreator (%)

V_{Ar} = Vazão de ar de entrada no biorreator (L/min)

$V_{\text{biorreator}}$ = Volume do biorreator (L)

$\%O_{2\text{saída}} = O_2$ na saída do biorreator (%)

$\%N_{2\text{entrada}} = N_2$ na entrada do biorreator (%)

$\%N_{2\text{saída}} = N_2$ na saída do biorreator (%)

K = Constante de conversão igual a 26,44 min·mmol/L·h

A velocidade de formação de dióxido de carbono (CO_2), CER (g CO_2 /L·h), foi calculada de acordo com a **Equação 7**.

Equação 7

$$CER = \left[\frac{\%CO_{2\text{entrada}} \cdot V_{\text{Ar}}}{V_{\text{biorreator}}} \right] - \left[\frac{\%CO_{2\text{saída}} \cdot V_{\text{Ar}}}{V_{\text{biorreator}}} \right] \cdot \left[\frac{\%N_{2\text{entrada}}}{\%N_{2\text{saída}}} \right] \cdot [K] \cdot 10^{-3} \cdot MM_{CO_2}$$

No qual,

$\%CO_{2\text{entrada}} = CO_2$ na entrada do biorreator (%)

V_{Ar} = Vazão de ar de entrada no biorreator (L/min)

$V_{\text{biorreator}}$ = Volume do biorreator (L)

$\%CO_{2\text{saída}} = CO_2$ na saída do biorreator (%)

$\%N_{2\text{entrada}} = N_2$ na entrada do biorreator (%)

$\%N_{2\text{saída}} = N_2$ na saída do biorreator (%)

K = Constante de conversão igual a 26,44 min·mmol/L·h

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação dos meios de cultura

Primeiramente foi necessário estudar o meio de cultura mais adequado para o crescimento e a produção da proteína Amblyomin-X. Três meios de cultura foram testados e a seguir os resultados obtidos.

6.1.1 Meio Terrific-Broth (TB)

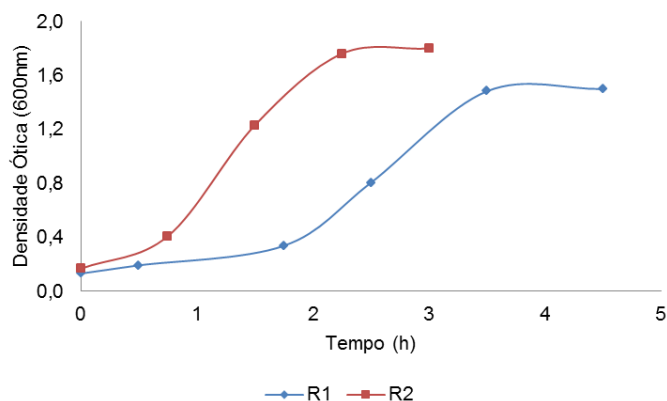
Foram realizados dois ensaios denominados R1 e R2 em biorreator Sartorius C Plus de 15 L, com a finalidade de testar o meio de cultura TB para o crescimento da *E. coli* – Rec2 e produção da proteína Amblyomin-X, seguindo um protocolo desenvolvido pelo IBu, conforme descrito no item 5.2.3 – item (a). Os cálculos de produtividade celular desses ensaios são apresentados na **Tabela 2** e o perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) ao longo do ensaio é apresentado na **Figura 7**. Os dados experimentais utilizados para os cálculos estão no ANEXO A.

Tabela 2 – Dados experimentais dos ensaios R1 e R2

Ensaio	Concentração Celular Máxima (g/L)	Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) Máxima	Produtividade Global Celular (g de célula/L·h)	Produtividade Máxima Celular (g de célula/L·h)
R1	1,86	1,5	0,10	0,10
R2	1,97	1,8	0,61	1,13

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) dos ensaios R1 e R2



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização destes dois ensaios, verificou-se que o crescimento celular atingido nos dois ensaios foi muito baixo 1,86 g/L e 1,97g/L e, portanto seria necessário testar um novo meio de cultura para atingir concentrações celulares maiores. Por este motivo não foi realizada a etapa de produção de proteína.

6.1.2 Meio Luria Bertani (LB)

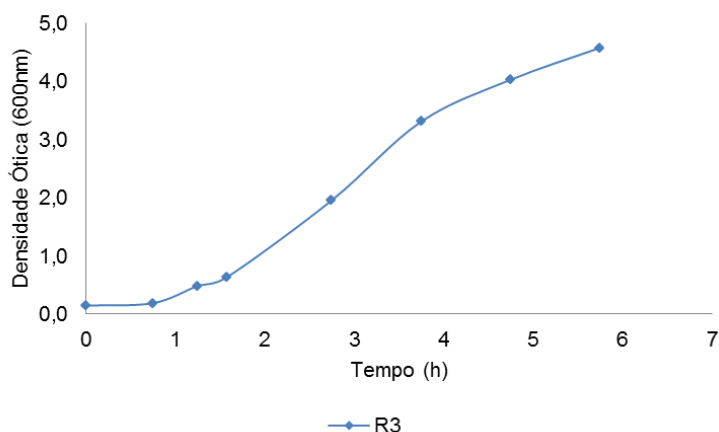
Foi realizado um ensaio denominado R3 em biorreator Sartorius C Plus de 15 L, sendo 10 litros de volume útil, com a finalidade de testar o meio de cultura LB para crescimento da *E. coli*, seguindo um protocolo desenvolvido pelo IB descrito no item 5.2.3 – item (b). Os cálculos de produtividade celular desse ensaio são apresentados na **Tabela 3** e o perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) ao longo do ensaio é apresentado na **Figura 8**. Os dados experimentais utilizados para os cálculos estão no ANEXO A.

Tabela 3 – Dados experimentais do ensaio R3

Ensaio	Concentração Celular Máxima (g/L)	Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) Máxima	Produtividade Global Celular (g de célula/L·h)	Produtividade Máxima Celular (g de célula/L·h)
R3	1,54	4,58	0,11	0,16

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 – Perfil de Densidade Óptica ($DO_{600\text{ nm}}$) do ensaio R3



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos também não foram satisfatórios, pois a concentração celular obtida foi muito baixa e então um novo meio de cultura foi proposto.

6.1.3 Meio de crescimento I (Inóculo)

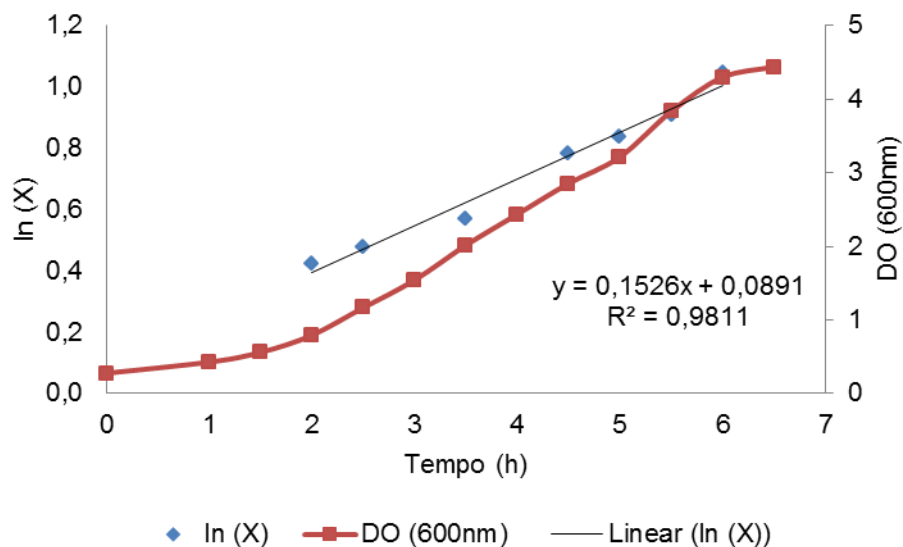
Um novo meio de cultura, denominado meio de crescimento I (Inóculo), foi testado empregando um protocolo de produção de literatura proposto por Gombert e Kilikian (1997).

6.1.3.1 Determinação do melhor tempo de incubação do inóculo

Primeiramente a reativação (pré-inóculo) foi feita em meio de cultura LB por um período de 10 horas, este tempo de incubação foi realizado conforme procedimento descrito no trabalho de Gombert e Kilikian (1997).

Um ensaio de cinética de crescimento em meio de crescimento I (Inóculo) foi realizado para determinar o melhor tempo de incubação do inóculo, seguindo o protocolo descrito no item 5.2.3 – item (c). O resultado do ensaio cinético é apresentado na **Figura 9**. Os dados experimentais utilizados para os cálculos estão no ANEXO B.

Figura 9 – Cinética de crescimento em meio de crescimento I (Inóculo)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Através dessa cinética, foi possível verificar que entre 2 e 6 horas o inóculo estava na velocidade específica de crescimento igual a $0,15 \text{ h}^{-1}$. Qualquer tempo que compreendesse entre este intervalo, poderia ser utilizado para inocular o reator, visto que o microrganismo estava na fase de crescimento exponencial. Portanto,

determinou-se que o tempo de incubação do inóculo seria de 3 horas, onde seria possível garantir que o inóculo estaria no meio da fase exponencial de crescimento e desta forma não teríamos um inóculo com baixa concentração celular e também não teríamos problema em utilizar um inóculo na sua fase de morte.

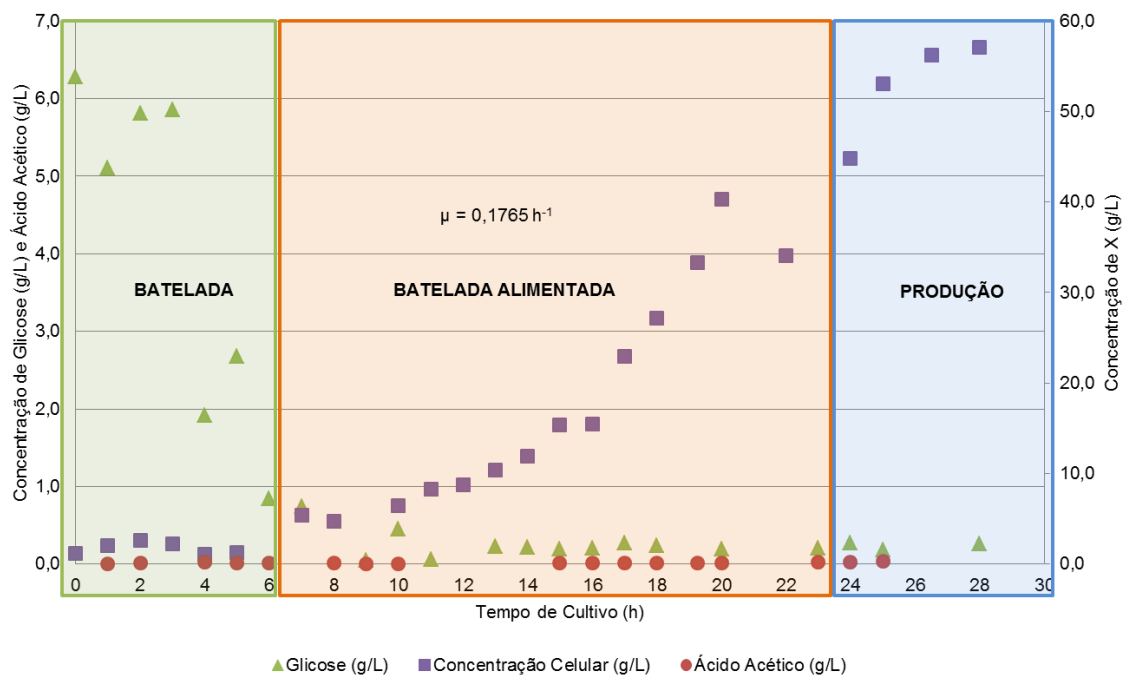
6.1.3.2 Ensaio em biorreatores

Após determinar o melhor tempo de incubação do inóculo, foram realizados quatro ensaios (R4, R5, R6 e R7) em biorreator para testar esse novo meio de cultura.

A estratégia de condução do ensaio R4 se baseou nos trabalhos de Riesenber et al. (1991) e Simões (1994) e foi orientada para que não houvesse fonte de carbono em excesso, de maneira a evitar a formação de ácido acético, mas com suprimento suficiente da fonte de carbono para que atingisse elevada concentração de biomassa.

As concentrações de glicose e ácido acético, bem como o perfil de concentração celular ao longo do tempo do ensaio R4 são apresentadas na **Figura 10**.

Figura 10 – Perfis da concentração celular, glicose e ácido acético ao longo do tempo no ensaio R4

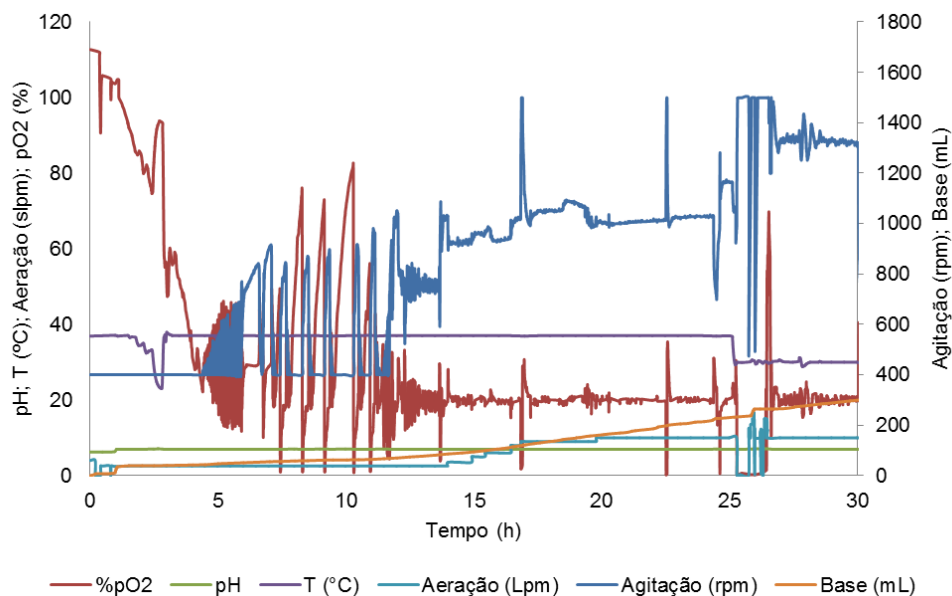


Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 10** mostra que nas primeiras 6 horas de ensaio houve o consumo da glicose adicionada inicialmente no meio de cultura (batelada). Após esse período foram adicionados pulsos sucessivos de 10g da solução de glicose, com a finalidade de aumentar a concentração celular (essa estratégia de pulsos sucessivos foi necessária, pois a vazão mínima da bomba de alimentação de glicose era maior que a necessária para o consumo inicial de glicose da população microbiana naquele momento). Após o período de 6 horas, e adicionados 3 pulsos de solução de glicose, iniciou-se a etapa em batelada alimentada com limitação da fonte carbono. Na mesma figura é possível observar que as concentrações de ácido acético foram quase nulas durante toda a etapa de crescimento limitado, devido à não disponibilidade de glicose no meio de cultura.

A **Figura 11** mostra os perfis das variáveis porcentagem de oxigênio dissolvido (%pO₂), pH, temperatura, aeração, agitação e volume da base NH₄OH adicionada ao longo do tempo do ensaio R4 e que foram monitoradas pelo *software* Multi Fermentor Control System (MFCS).

Figura 11 – Variáveis monitoradas ao longo do tempo no ensaio R4



Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses perfis nos auxiliaram na condução dos ensaios, pois: i) o súbito aumento da %pO₂ indicava o término da fonte de carbono, demandando um novo pulso da solução de glicose ou o início da alimentação programada (bomba de

alimentação); ii) o perfil da base NH_4OH adicionada se mostrou bastante similar ao perfil do crescimento celular, portanto, a existência de patamares nessa adição indicava a interrupção no crescimento celular, possivelmente por falta de glicose ou excesso de ácido acético.

As variáveis de aeração e agitação foram controladas de forma a manter os valores de $\%p\text{O}_2$ em torno de 20%, pois conforme descrito por Schmidell et al., 2001, para não haver a formação de ácido acético é recomendado manter a porcentagem de oxigênio dissolvido no meio ($\%p\text{O}_2$) em valor constante e acima do seu valor crítico de 4% (0,26 mg/L).

A etapa de indução da proteína foi realizada com a adição de IPTG na concentração de 1mM e temperatura de 30 °C para biossíntese da proteína. As condições de indução (IPTG 1mM e 30 °C) foram adotadas a partir da experiência dos pesquisadores envolvidos no projeto. Nesse ensaio, a etapa de indução teve duração de 4 horas.

No final desse ensaio, após as 4 horas de produção de proteína, todo o meio foi centrifugado, descartou-se o sobrenadante e a biomassa foi enviada ao Instituto Butantan para a separação e purificação da proteína. A proteína purificada apresentou atividade e quantidade suficiente para a continuidade dos testes pré-clínicos.

O sucesso do protocolo foi então repetido nos ensaios denominados R5, R6 e R7. A **Tabela 4** apresenta e compara os resultados obtidos nesses ensaios na etapa de crescimento e produção. Os dados experimentais utilizados para os cálculos estão no ANEXO A.

Tabela 4 – Dados experimentais dos ensaios R4, R5, R6 e R7

Ensaio	μ_{xmax} (h^{-1})	Tempo total de cultivo (h)	Etapa de Crescimento			Etapa de Produção		
			Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Densidade Óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$)	Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Densidade Óptica ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$)
R4	0,22	29,8	23,0	39,5	76,6	6,8	59,8	161,2
R5	0,31	21,5	16,5	35,6	86,3	5,0	41,8	114,8
R6	0,30	20,5	15,0	34,0	94,8	5,5	41,4	132,0
R7	0,32	20,3	16,0	33,5	83,9	4,3	41,9	112,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos esses ensaios realizados com esse meio de cultura foram considerados bem sucedidos, pois as concentrações celulares foram bastante

similares entre os ensaios repetidos e foram vinte vezes maiores que os resultados obtidos anteriormente com o emprego do meio de cultura LB e TB.

Uma vez estabelecido um primeiro protocolo de produção de Amblyomin-X (R4, R5, R6 e R7) os pesquisadores do IBu solicitaram ao IPT a produção de lotes experimentais utilizando a bactéria *E. coli* – Rec1, empregando o mesmo protocolo já definido para a *E. coli* – Rec2. Essa demanda foi necessária, pois os testes pré-clínicos tinham sido iniciados com a proteína Amblyomin-X proveniente dessa linhagem de *E. coli* – Rec1 e não seriam conclusivos caso fosse alterada a linhagem produtora.

Foram então realizados dois ensaios (R8 e R9) empregando o mesmo protocolo de produção estabelecido para a bactéria *E. coli* – Rec2, utilizando a bactéria *E. coli* – Rec1. Os resultados obtidos nesses ensaios na etapa de crescimento e produção são apresentados na **Tabela 5**. Os dados experimentais utilizados para os cálculos estão no ANEXO A.

Tabela 5 – Dados experimentais dos ensaios R8 e R9

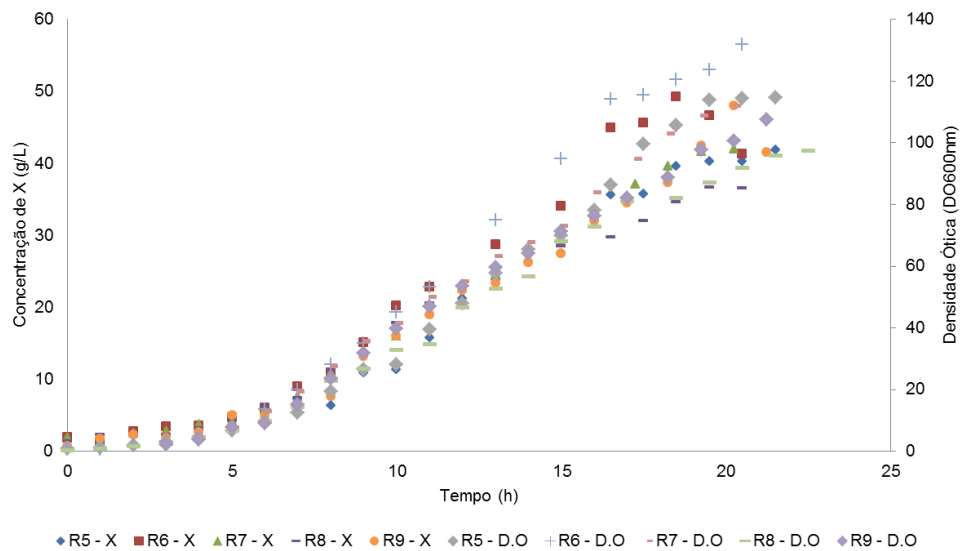
Ensaio	μ_{xmax} (h ⁻¹)	Tempo total de cultivo (h)	Etapa de Crescimento			Etapa de Produção		
			Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Densidade Óptica (DO _{600 nm})	Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Densidade Óptica (DO _{600 nm})
R8	0,31	22,5	17,0	36,7	81,0	5,5	43,4	97,4
R9	0,32	21,3	17,0	34,5	82,2	4,0	41,5	107,6

Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando os resultados obtidos entre as duas bactérias *E. coli* Rec2 e Rec1, as concentrações de biomassa e as densidades óticas dos ensaios R5, R6 e R7 resultaram em perfis muito semelhantes aos dos ensaios R8 e R9, conforme apresentado na **Figura 12**. Esse resultado já era esperado, pois as duas linhagens tinham uma construção plasmidial muito similar, a diferença estava na produção da proteína recombinante, ou seja, após o momento da indução.

No entanto, os resultados dos géis de poliácridamida (**Figura 13**), metodologia que identifica as bandas da proteína Amblyomin-X (em torno de 14 kDa) em amostras retiradas no final do ensaio mostraram que apenas os ensaios com a bactéria *E. coli* Rec2 (R5, R6 e R7) sintetizaram a proteína Amblyomin-X, enquanto que nos ensaios com a bactéria *E. coli* Rec1 (R9) não houve síntese da proteína.

Figura 12 – Comparação do perfil de concentração celular e densidade ótica ($DO_{600\text{nm}}$) ao longo do tempo para os ensaios R5, R6, R7, R8 e R9

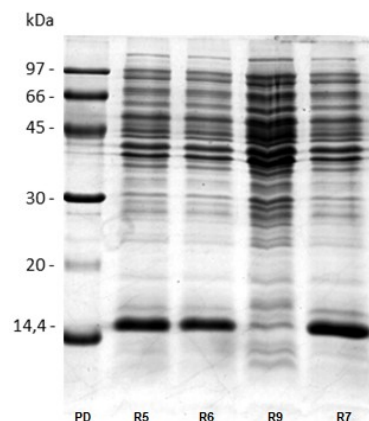


Fonte: Elaborado pelo autor.

Analisando-se as condições de processo, decidimos estudar a temperatura de indução da proteína, pois através da literatura, vimos que a temperatura de indução é um fator que interfere na expressão da proteína.

Sendo assim, um estudo em agitador rotativo foi realizado para avaliar as temperaturas de indução da proteína em diferentes temperaturas, pois esses resultados nos mostraram que embora o perfil de crescimento tenha sido muito semelhante, o ensaio realizado com a bactéria *E. coli* Rec1 não expressou a proteína na temperatura de 30 °C.

Figura 13 – Perfil de produção de proteínas dos ensaios R5, R6, R9 e R7 sob a temperatura de 30 °C.



Fonte: Imagem cedida pelo Instituto Butantan (IBu).

A **Figura 13** mostra que os ensaios R5, R6 e R7 realizados com a linhagem *E. coli* Rec2 e induzidos na temperatura de 30 °C, expressaram a proteína Amblyomin (14,4 KDa), enquanto o ensaio R9 realizado com a linhagem *E. coli* Rec1, não apresentou síntese da proteína.

6.2 Ensaio cinético para determinação da temperatura de expressão da proteína

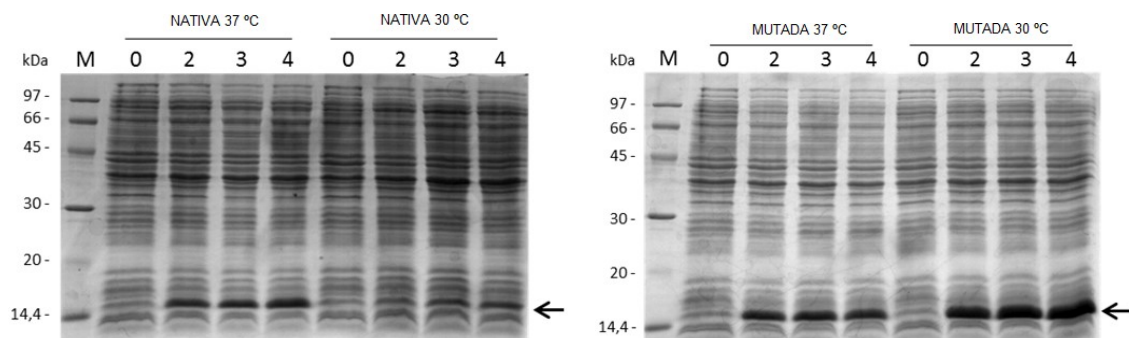
Para determinar a temperatura adequada para a expressão da proteína Amblyomin foi realizado um ensaio cinético em agitador rotativo com as duas linhagens, *E. coli* Rec1 e *E. coli* Rec2.

As imagens dos géis resultantes desses ensaios são apresentadas na **Figura 14**, onde o ponto 0 indica o momento de indução, ou seja, de adição do IPTG.

A produção da proteína de interesse foi avaliada qualitativamente por meio de separação em gel de poliacrilamida por eletroforese, realizada no IBu.

Como se pode observar na **Figura 14**, a produção sob a temperatura de 37 °C durante o período de indução foi mais eficiente para os ensaios com a linhagem *E. coli* Rec1. De maneira inversa, a produção da proteína de interesse pela linhagem *E. coli* Rec2 teve melhor eficiência sob a temperatura de indução de 30 °C. Sendo assim, durante o processo com a linhagem *E. coli* Rec2, adotou-se como protocolo baixar a temperatura de 37 °C para 30 °C, imediatamente antes da adição de IPTG, enquanto que para a *E. coli* Rec1 manteve-se a temperatura em 37 °C.

Figura 14 – Perfil de produção de proteínas pela linhagem *E. coli* – Rec1 e Rec2, sob a temperatura de 37 °C ou 30 °C durante o período de indução com IPTG.



Fonte: Imagem cedida pelo Instituto Butantan (IBu).

6.3 O ácido acético e a inibição do crescimento celular

Alguns autores (TRIPATHI et al., 2009; LULI; STROHL, 1990; EL-MANSI; HOLMS, 1998; KLEMMANN; STROHL, 1994) afirmam que o acetato é principalmente produzido quando a bactéria *E. coli* é cultivada em condições anaeróbias ou limitantes de oxigênio. No entanto, o excesso de glicose no meio de cultura também pode produzir acetato, mesmo sob as condições de aerobiose.

Um dos grandes desafios deste trabalho foi estabelecer uma estratégia de cultivo da bactéria, evitando a formação de subprodutos indesejados, principalmente o ácido acético. Tanto na etapa de crescimento do microrganismo, como na etapa de biossíntese da proteína, a presença abundante de glicose, provoca a formação de ácido acético. O ácido acético é um dos principais subprodutos da fermentação, causando inibição do crescimento celular.

Conforme descrito por Luli e Strohl (1990), a concentração acima da qual o ácido acético inibe o crescimento de *E. coli* depende tanto da linhagem como das condições de cultura.

Os ensaios R10 e R11 indicaram que a linhagem estudada (*E. coli* Rec1) foi inibida na presença de concentração de ácido acético superior a 0,4 g/L, formado ainda na etapa de batelada.

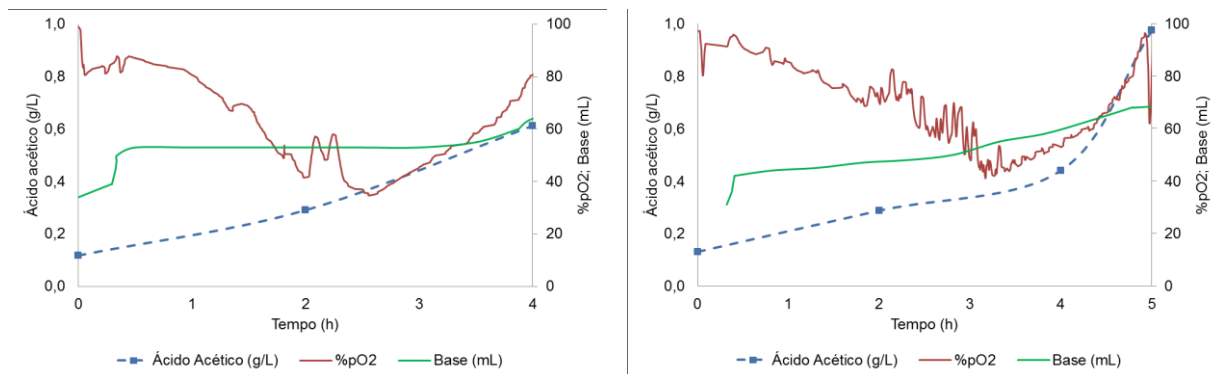
As concentrações de glicose e ácido acético são apresentadas na **Tabela 6** enquanto que a **Figura 15** mostra a alteração do perfil da porcentagem de oxigênio dissolvido (%pO₂) resultante da formação de ácido acético no meio de cultivo. A elevação da %pO₂ durante a etapa de batelada indicava diminuição na respiração microbiana, situação contrária à esperada. Como a fonte de carbono nessa etapa estava presente no meio (etapa em batelada) e a concentração de oxigênio dissolvida era bastante superior a crítica, os resultados indicaram que provavelmente a quantidade inicial de glicose (5 g/L) adicionada no meio de cultura era muito elevada, causando a formação de ácido acético (acima de 0,4 g/L) e assim inibindo o crescimento celular. Essa formação de ácido resultou na perda de vários ensaios (dados não mostrados). Os dados experimentais desses ensaios estão no ANEXO A.

Tabela 6 – Concentrações de glicose e ácido acético dos ensaios R10 e R11

Tempo (h)	R10		R11	
	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
0,0	6,879	0,118	5,687	0,130
2,0	5,765	0,291	4,733	0,287
4,0	4,407	0,613	2,378	0,440
5,0	-	-	0,000	0,974

Fonte: Elaborado pelo autor.

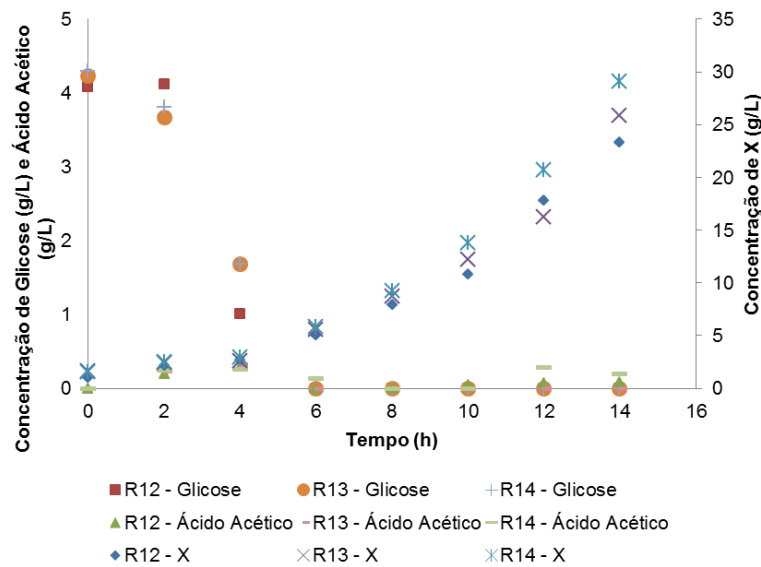
Figura 15 – Perfil da porcentagem de oxigênio dissolvido (%pO₂), consumo de base (mL) e formação de ácido acético (g/L) nos ensaios R10 e R11



Fonte: Elaborado pelo autor.

Então foram realizados três novos ensaios, denominados ensaios R12, R13 e R14, diminuindo-se a concentração inicial de glicose de 5 g/L para 3 g/L no meio de cultura com a finalidade de evitar a formação de ácido acético ainda nessa etapa de batelada. É importante ressaltar que os valores iniciais (tempo = 0h) de glicose apresentados foram superiores a 3 g/L, pois parte dessa quantidade de glicose era proveniente do inóculo (aproximadamente 1,2 g/L). As concentrações de glicose e ácido acético, bem como o perfil de concentração celular ao longo do tempo são apresentadas na **Figura 16**. Os dados experimentais desses ensaios estão no ANEXO A.

Figura 16 – Perfil da concentração celular, glicose e ácido acético ao longo do tempo dos ensaios R12, R13 e R14



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados desses três ensaios mostram que iniciando o biorreator com 3 g/L de glicose no meio de cultura, houve a formação de uma pequena quantidade de ácido acético, que variou entre 0,2 e 0,3 g/L, concentração não inibitória. A partir destes resultados, adotou-se como protocolo essa quantidade inicial de glicose no meio de cultura do biorreator para realização dos próximos ensaios.

6.4 Estratégia de cultivo e produção da proteína recombinante

Após definida a etapa de batelada, fez-se necessário estabelecer uma estratégia de crescimento na etapa de batelada alimentada. Portanto esta etapa foi caracterizada por uma alimentação limitada dos nutrientes (fonte de carbono e magnésio), com perfil exponencial, porém para crescimento celular com velocidade específica inferior à máxima, visando maximizar o crescimento celular e minimizar a produção do ácido acético. Também foram controladas as variáveis de agitação e aeração de forma a manter a %pO₂ em 30%, atingindo-se um valor máximo de agitação de 1200 rpm e aeração de 10 slpm, respectivamente.

Os ensaios R12, R13 e R14 foram realizados nas condições adotadas como protocolo padrão, temperatura de indução de 37 °C, concentração celular no

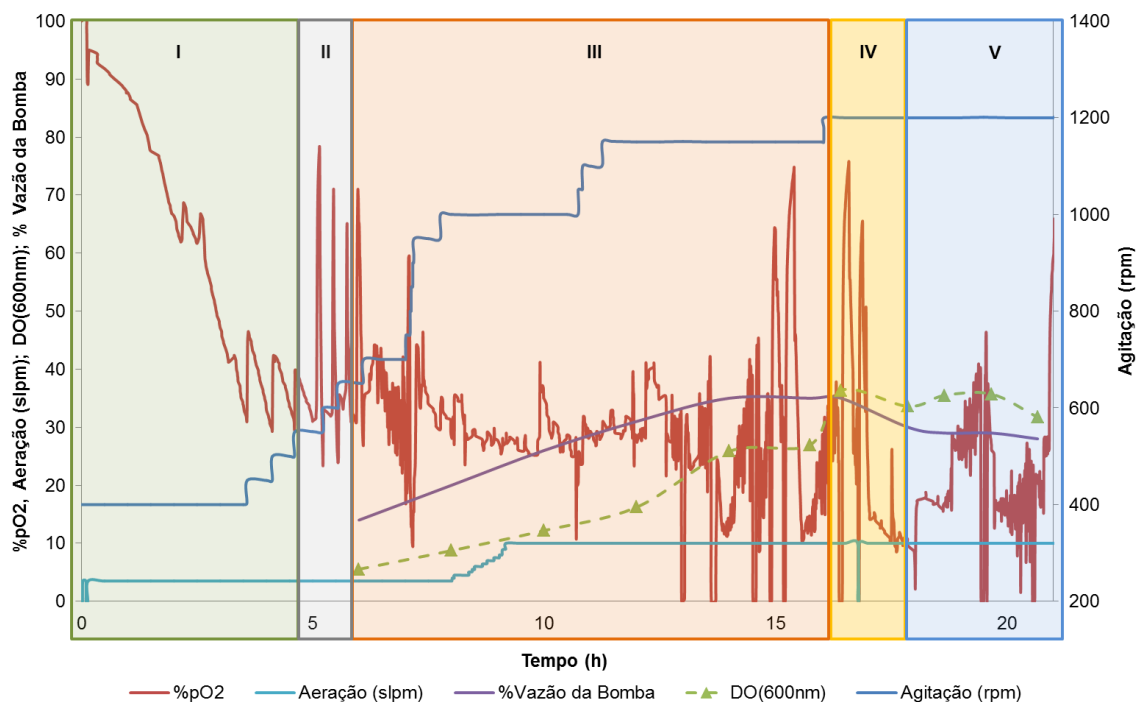
momento da indução de 30 g/L e concentração do indutor (IPTG) de 1,05 mM. Na **Tabela 7** e **Figura 17** são apresentados os dados experimentais do ensaio R13.

Tabela 7 – Dados experimentais do ensaio R13

Tempo (h)	%pO2	Agitação (rpm)	Aeração (slpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm
0,0	95,4	400	3,5	6,45	20,95	0,05	1,65	0,44
2,0	67,8	400	3,5	6,96	20,50	0,54	2,42	1,41
4,0	41,9	500	3,5	7,02	19,50	1,54	2,63	3,87
6,0	35,6	700	3,5	7,00	17,50	3,22	5,53	8,74
8,0	31,8	1000	4,5	7,02	16,85	4,36	8,73	19,70
10,0	30,9	1000	10	7,00	18,40	2,72	12,19	33,80
12,0	29,4	1151	10	7,03	17,85	3,26	16,22	45,60
14,0	21,3	1150	10	6,95	17,20	3,96	25,85	59,10
15,8	15,5	1150	10	6,94	17,15	4,00	26,97	69,90
16,4	51,2	1201	10	6,95	18,10	2,58	29,62	73,00
17,9	2,6	1200	10	6,96	16,20	4,88	33,60	83,20
18,7	19,7	1200	10	6,97	17,25	3,86	35,48	89,00
19,7	20,6	1200	10	7,02	17,05	3,98	37,04	92,10
20,7	27,1	1200	10	7,03	17,10	3,98	38,41	95,60

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 – Dados do MFCS, crescimento celular e cálculo da vazão da bomba de alimentação do ensaio R13



Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 17** mostra que entre 0 e 5 horas de ensaio ocorreu a etapa de batelada (I), onde houve o consumo da glicose inicial. Após o final dessa etapa, observado pelo aumento brusco da %pO₂, o biorreator foi alimentado por três pulsos de 10 g da solução de glicose, período entre 5 e 6 horas (II). A partir de 6 horas de ensaio a bomba de alimentação da solução de glicose foi ligada e mantida em vazão com perfil exponencial até alcançar a máxima velocidade de transferência de oxigênio (OTR)(III), etapa essa caracterizada pela máxima agitação e aeração permitida pelo biorreator. A partir dessa etapa (III) a vazão de alimentação da bomba manteve-se constante (IV) até o final do ensaio, ou seja, durante toda a etapa de síntese da proteína (V). Dessa maneira, o protocolo para atingir maiores concentrações celulares caracterizou-se pela extensão da etapa IV, ou seja, a etapa de máxima transferência de oxigênio. Nesse caso, manteve-se constante a vazão de alimentação de glicose, mesmo ciente da velocidade específica de crescimento celular decrescente.

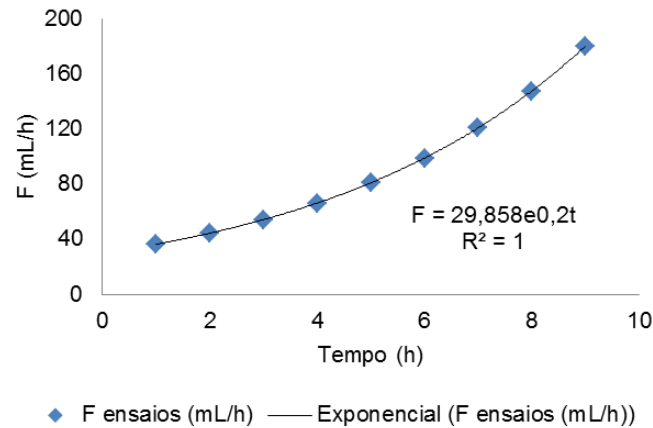
Nesse ensaio R13, as concentrações celulares das etapas de crescimento e síntese proteica alcançaram, respectivamente, 29,62 g/L e 38,41 g/L. Esse crescimento celular permitiu obter uma concentração de proteína no final da etapa de síntese igual a 8,57 g/L.

Observa-se ainda na **Figura 17** que houve a necessidade de diminuir a vazão constante da bomba de alimentação da glicose durante o início da etapa de síntese da proteína (V). Isso ocorreu devido à formação de espuma e consequente adição de antiespumante, que ao quebrar a espuma e bolhas, provoca a diminuição da concentração de oxigênio dissolvido no meio.

A vazão de alimentação dessa solução de glicose durante a etapa limitada de crescimento exponencial (III) foi calculada utilizando a Equação 1.

Para padronizar o crescimento celular nos ensaios, determinou-se que a velocidade específica de crescimento (μ_x) seria mantida em torno de $0,2 \text{ h}^{-1}$, menor que seu valor máximo ($\mu_{x\text{máx}}$). O perfil da vazão da bomba de alimentação do ensaio R13 é apresentado na **Figura 18**.

Figura 18 – Cálculo da vazão da bomba de alimentação da solução de glicose (F)

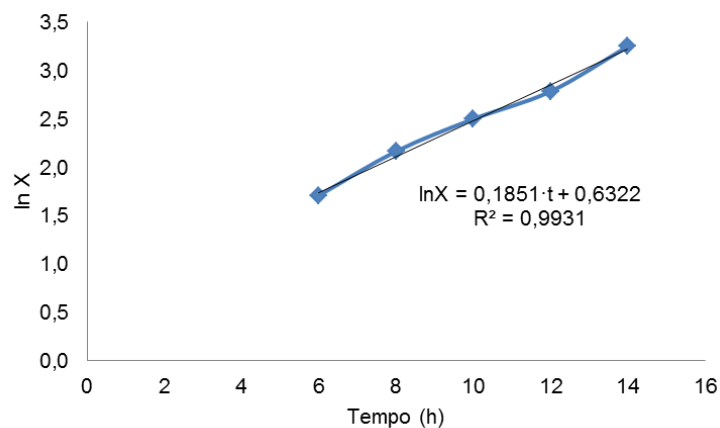


$$X_0 = 4,5 \text{ g/L}; V_0 = 6,97 \text{ L}; \mu_x = 0,2 \text{ h}^{-1}; S_0 = 0,6 \text{ g/mL}; Y_{x/s} = 0,35 \text{ g/g}; t = \text{variável independente}$$

Fonte: Elaborado pelo autor.

A **Figura 19** mostra a manutenção da velocidade específica de crescimento abaixo de $0,2 \text{ h}^{-1}$ ao longo do tempo para o ensaio R13 a partir do cálculo de vazão empregado. Essa estratégia impediu a formação de ácido acético durante a condução do ensaio R13.

Figura 19 – Velocidade específica de crescimento na etapa de batelada alimentada ($\ln X$ vs Tempo (h))



Fonte: Elaborado pelo autor.

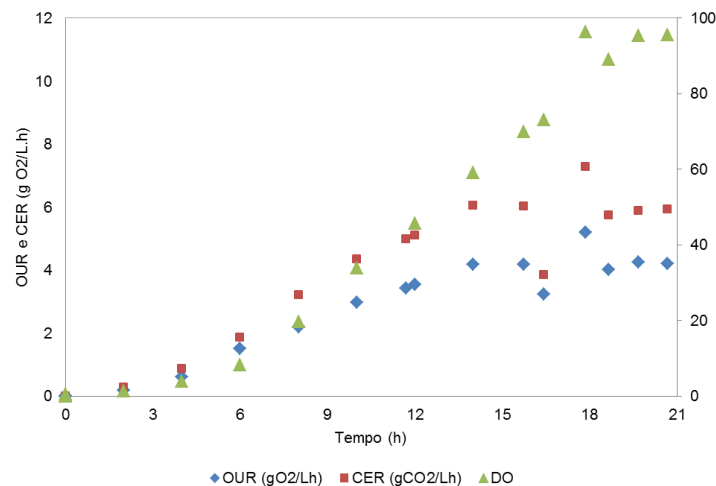
6.4.1 Monitorando a produção de ácido acético ao longo do tempo

A análise por cromatografia líquida nos permitiu acompanhar o consumo de glicose e formação de ácido acético ao longo do tempo nos ensaios, porém levava-se em média uma hora para obter o resultado dessas análises. Percebemos que

para o nosso processo precisávamos de outra forma para monitorar a formação do ácido acético, pois pequenas quantidades do mesmo poderia inibir o crescimento celular. Então uma forma encontrada foi calcular os valores de OUR e CER ao longo do tempo. Para tal, medidas da %CO₂ e %O₂ (v/v) foram anotadas a cada amostragem para o cálculo da quantidade de oxigênio utilizada na respiração microbiana e da quantidade de CO₂ produzido durante as etapas de crescimento e produção da proteína.

Os perfis de OUR, CER e densidade ótica do ensaio R13 ao longo do tempo são apresentados na **Figura 20** e neles é possível verificar que o crescimento (densidade ótica) é muito similar ao perfil de OUR e CER, quando não há formação de ácido acético, ou seja, nenhum fator inibitório ou limitante. Então um indicativo de formação de ácido acético no meio de cultivo era a mudança desse perfil, onde havia inicialmente um aumento significativo da OUR, CER e da densidade ótica, ou seja, glicose não limitante resultando na formação de ácido acético.

Figura 20 – Perfil de OUR (gO₂/L.h), CER (gCO₂/L.h) e Densidade Ótica ao longo do tempo no ensaio R13



Fonte: Elaborado pelo autor.

Essa estratégia possibilitou a tomada de decisão em desligar a bomba de alimentação da solução de glicose ao longo do ensaio, religando somente quando os valores de %pO₂ começassem a aumentar, indicando o total consumo da glicose pela população microbiana do meio de cultivo, ou seja, a ausência de glicose no meio de cultura. Além disso, o cálculo da OUR em tempo real permitiu uma

estimativa de μ_x em tempo real, o que possibilitou manter os valores de μ_x inferiores ao valor adotado como máximo, de $0,2 \text{ h}^{-1}$ (MELLO et al., 2017).

6.4.2 Conhecendo os parâmetros de bioprocesso

Conhecer os parâmetros de processo foi necessário, pois esse protocolo foi a base para a condução de ensaios em BPL (Boas Práticas de Laboratório), cujos resultados não são mostrados, em biorreatores de maior volume útil do Instituto Butantan (IBu). A partir desses ensaios (R12, R13 e R14) foi possível calcular a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), produtividade celular global (P_{xglobal}), produtividade celular máxima ($P_{\text{xmáx}}$) e fator de conversão de substrato em célula ($Y_{x/s}$) na etapa de batelada alimentada. Os resultados são apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos dos ensaios R12, R13 e R14

Ensaio	$\mu_{\text{xmax}} (\text{h}^{-1})$	Tempo total de cultivo (h)	Etapa de Crescimento		Etapa de Produção		Parâmetros de Processo		
			Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	Tempo (h)	Concentração Celular (g/L)	P_{xglobal} (g célula/h)	$P_{\text{xmáx}}$ (g célula/h)	$Y_{x/s}$ Batelada Alim. g célula / g substrato
R12	0,27	20,8	16,0	31,4	4,8	35,3	13,0	14,5	0,47
R13	0,30	20,7	16,4	29,6	4,3	38,4	13,8	14,1	0,37
R14	0,29	20,2	16,0	35,4	4,2	45,1	17,0	17,0	0,40
Média	0,29 +/- 0,007	-	-	-	-	-	-	-	0,41 +/- 0,023

Fonte: Elaborado pelo autor.

O cálculo das máximas velocidades específicas ($\mu_{\text{máx}}$) foram realizados nos tempos correspondentes aos pulsos de glicose, enquanto que o cálculo dos fatores de conversão ($Y_{x/s}$) foram realizados na etapa limitada de crescimento microbiano (com vazão exponencial de alimentação).

Nestes ensaios é possível verificar que a média de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) do processo foi de $0,41 \pm 0,023 \text{ g célula / g substrato}$. No trabalho de Riesenber (1991) com *E. coli* foi encontrado valores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) de $0,42 \pm 0,015 \text{ g célula / g substrato}$ na etapa de batelada alimentada, corroborando com este trabalho.

7 CONCLUSÕES

Através do desenvolvimento deste trabalho foi possível:

- i) Definir um meio de cultura para atingir elevadas concentrações celulares da bactéria *E. coli* para a produção da proteína Amblyomin-X;
- ii) Definir uma estratégia de cultivo da bactéria *E. coli* – Rec1 caracterizada por etapas distintas de crescimento celular, que permitem atingir elevadas concentrações celulares, independentemente da máxima transferência de oxigênio permitida pelo biorreator (OTR);
- iii) Maximizar o crescimento celular de maneira a minimizar a produção do ácido acético e de subprodutos inibitórios;
- iv) Conduzir o ensaio R4 cujas concentrações celulares máximas foram de 39,5 e 59,8 g/L no final da etapa de crescimento;
- v) Obter elevada concentração da proteína Amblyomin no final das etapas de separação e purificação igual a 8,57 g/L, após 4 horas de indução (ensaio R15).
- vi) Definir a temperatura para síntese da proteína Amblyomin para as bactérias *E. coli* Rec1 e Rec2 iguais a 30 e 37°C, respectivamente;
- vii) Definir diferentes estratégias de monitoramento da formação de ácido acético para evitar a inibição do crescimento microbiano para ambas as linhagens de *E. coli* Rec1 e Rec2;
- viii) Conhecer os parâmetros de processo de produção da proteína Amblyomin, de maneira a possibilitar a condução desse protocolo em biorreatores de diferentes volumes e diferentes transferências de massa (OTRs).

REFERÊNCIAS

- AKAGI, E. M.; DE-SÁ-JUNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; BELLINI, M. H.; BARRETO, S. A.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma “*in vitro*”. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 66, p. 64-69, 2012.
- BABAEIPOUR, V.; SHOJAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N. Maximizing production of human interferon-gamma in HCD of recombinant *E. coli*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 563-572, 2013.
- BALAMURUGAN, V.; SEN, A.; SARAVANAN, P.; SINGH, R. K. Biotechnology in the production of recombinant vaccine or antigen for animal health. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 5, n. 6, p. 487-495, 2006.
- BATISTA, I. F. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivary glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, p. 823-834, 2008.
- BATISTA, I. F. C.; RAMOS, O. H. P.; VENTURA, J. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A new Factor Xa inhibitor from *Amblyomma cajennense* with a unique domain composition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 493, p. 151-156, 2010.
- BAUER, K. A.; BEN-BASSAT, A.; DAWSON, M.; DE LA PUENTE, V. T.; NEWAY, J. O. Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1296-1302, 1990.
- BRANCO, V. G.; IQBAL, A.; ALVAREZ-FLORES, M. P.; SCIANI, J. M.; ANDRADE, S. A.; IWAI, L. K.; SERRANO, S. M. T.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. Amblyomin-X having a Kunitz-type homologous domain, is a noncompetitive inhibitor of FXa and induces anticoagulation *in vitro* and *in vivo*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1864, p. 1428-1435, 2016.
- CHOI, J. H.; LEE, S. Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 64, n. 5, p. 625-635, 2004.
- CHOI, J. H.; KEUM, K. C.; LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *E. coli*. **Chemical Engineering Science**; v. 61, p. 876-885, 2006.
- CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; DE-SÁ-JUNIOR, P. L.; SIMONS, S. M.; MARIA, D. A.; VENTURA, J. S.; P. L.; BATISTA, I. F. C.; FARIA, F.; DURÃES, E.; REIS, E. M.; DEMASI, M. 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**, v. 56, p. 1145-1154, 2010.

DREWES, C. C. **Investigação dos mecanismos de ação do Amblyomin-X sobre a angiogênese *in vivo* induzida pelo VEGF**. 2011. 124f. Dissertação (Mestre em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2011.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y. S.; HEBEDA, C. B.; SIMONS, S. M.; BARRETO, S. A.; FERREIRA JUNIOR, J. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARSKY, S. H. P. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon**, v. 60, p. 333-340, 2012.

EINSFELDT, K. **Desenvolvimento de uma nova l-asparaginase recombinante de *Zymomonas Mobilis* para aplicação como biofármaco**. 2014. 143f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Programa de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2014.

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

EL-MANSI, E. M; HOLMS, W. H. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *Journal of General Microbiology*, v. 135, p. 2875-2883, 1989.

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, 1997.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, M.; BALAMURUGAN, V. An overview of heterologous expression host system for the production of recombinant proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, p. 346-356, 2016.

GUPTA, S.K.; SHUKLA, P. Sophisticated cloning, fermentation, and purification Technologies for an enhanced therapeutic protein production: A review. *Frontiers in Pharmacology*, v.8, p. 1-17, 2017.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016 – Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2015.

KILIKIAN, B. V.; SUÁREZ, I. D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1019-1025, 2000.

KLEMMANN, G. L.; STROHL, W. R. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5; 180-186, 1994.

KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A.; DECKWER, W.-D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59-65, 1995.

LEONE, S.; SANNINO, F.; TUTINO, M. L.; PARRILLI, E.; PICONE, D. Acetate: friend or foe? Efficient production of a sweet protein in *Escherichia coli* BL21 using acetate as a carbon source. **Microb Cell Fact**, 14:106, 2015.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**. 2004. 158f. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas, 2004.

LULI, G. W; STROHL, W. R.; Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004-1011, 1990.

MELLO, C. M.; MARTELETO, N. B.; MARQUES, T. O., OLIVEIRA, V., RODRIGUES, M. F. A. R.; PICCOLI, R. A. M. Acetic acid formation in *escherichia coli* cultivation using the oxygen uptake rate as response. 2017.

MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 809-817, 2003.

MS, Ministério da Saúde. Portal da Saúde. Câncer, 25 de Abril de 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/814-sas-raiz/daet-raiz/doencas-cronica/l1-doencas-cronica/12341-destaques-doencas-cronicas> acesso em: 15 de Dezembro de 2016.

NASCIMENTO, A. A. C; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. 2003. 86f. Universidade de São Paulo – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2003.

NEIDHARDT, F.C., INGRAHAM, J.L. e SCHAECHTER, M., *Physiology of the bacterial cell – a molecular approach*, **Sinauer Associates**. Sunderland, USA, 1990.

PICCOLI, R. A. M. **Cultivo em altas concentrações e altas produtividades da bactéria *Alcaligenes eutrophus* DSM 545**. 1995. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Programa Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, 1995.

PEREZ, F. S. A. **Influência da temperatura de cultivo na expressão de proteínas recombinantes de interesse terapêutico no espaço periplasmático bacteriano, utilizando o promotor lambda pl**. 2015. 87f. Tese (Doutor em Tecnologia Nuclear - Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, 2015.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. L.; FILHO, P. L. P.; PIERONI, J. P.; BARROS, J. O.; SILVA, L. G. Biotecnologia para saúde humana: **tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 29, p. 359-392, mar. 2009. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/2641/1/BS%2029_Biotecnologia%20para%20saúde%20humana_P.pdf Acesso em: 24 de Outubro de 2016.

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

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

RIESENBERG, D.; SCHULZ, V.; KNORRE, W. A.; POHL, H. D.; KORZ, D.; SANDERS, E. A.; ROB, A.; DECKWER, W. D. High cell density cultivation of *E.coli* at controlled specific growth rate. **Journal of Biotechnology**, v. 20, p. 17-28, 1991.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol**, v. 5, p. 172, 2014.

ROSSI, M. **Desenvolvimento do Processo de Cultivo de *Escherichia coli* RR1**. 2001. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2001.

SAHDEV, S.; KHATTAR, S. K.; SAINI, K. S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. **Mol Cell Biochem**, v. 307, p. 249–264, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, **Cold Spring Harbor Labor**. Press; New York, 1989.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de Cultivos de Alta Densidade Celular de *rE.coli* utilizando Glicerol como Fonte de Carbono**. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E; BORZANI, W. Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2, cap. 14, p. 277-331.

SIMÕES, D. A. **Croissance d' *Escherichia coli* a hautes concentrations cellulaires pour la production et l'excretion d'une proteine heterologue**. These (Doctorat spécialité Microbiologie - Biotechnologie) – Ingénieur en Génie Chimique. L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. Toulouse, France, 1994.

STRYJEWSKA, A.; KIEPURA, K.; LIBROWSKI, T.; LOCHYNSKI, S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 1075-1085, 2013.

SUÁREZ, D. C.; LIRIA, C. W.; KILIKIAN, B. V. Effect of yeast on *Escherichia coli* growth and acetic acid production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 331-335, 1998.

TRIPATHI, N. K.; BABU, J. P.; SHRIVASTVA, A.; PARIDA, M.; JANA, A. M.; RAO, P. V. L. Production and characterization of recombinant dengue virus type 4 envelope domain III protein. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 278-286, 2008.

TRIPATHI, N. K.; SATHYASEELAN, K.; JANA, A. M.; RAO, P. V. L. High yield production of heterologous proteins with *Escherichia coli*. **Defence Science Journal**, v. 59, n. 2, p. 137-146, 2009.

VENTURA, J. S.; FARIA, F.; BATISTA, I. F. C.; SIMONS, S. M.; OLIVEIRA, D. F. L.; MORAIS, K. L. P.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. A Kunitz-type FXa inhibitor affects tumor progression, hypercoagulable state and triggers apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 67, p. 192-196, 2013.

VELOSO, A. C. A. **Optimização de estratégias de alimentação para a identificação de parâmetros de um modelo de *E. coli*. Utilização do modelo em monitorização e controlo.** 2006. Tese (Doutor em Engenharia Química e Biológica). Universidade do Minho – Escola de Engenharia, 2006.

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

ZAMPOLLI, H. C. **Avaliação dos efeitos antineoplásicos do Amblyomin-X em carcinoma de células renais.** 2011. Tese (Doutor em Biotecnologia) – Programa Interunidades em Biotecnologia. Universidade de São Paulo, 2011.

ANEXOS

ANEXO A – Dados experimentais dos ensaios analisados neste trabalho.

Ensaio R1.

Amostra	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	X (g/L)	D.O 600nm	Ácido Acético (g/L)
0	0,0	300	2,5	7,24	1,41	0,132	0,124
1	0,5	300	2,5	7,19	1,38	0,193	0,155
2	1,0	300	2,5	7,19	1,25	-	0,172
3	1,8	300	2,5	7,14	-	0,338	0,278
4	2,5	300	2,5	7,10	-	0,806	0,552
5	3,5	347	2,5	7,03	-	1,484	0,685
6	4,5	347	2,5	7,00	1,86	1,500	0,779

Ensaio R2.

Amostra	Tempo (h)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	X (g/L)	D.O 600nm
1	0,00	300	4,0	-	0,59	0,168
2	0,75	300	4,0	-	1,44	0,409
3	1,50	500	4,0	7,15	1,74	1,232
4	1,83	400	4,0	7,17	1,50	-
5	2,25	400	4,0	7,16	1,97	1,762
6	3,00	400	4,0	7,14	-	1,800

Ensaio R3.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	X (g/L)	D.O 600nm
0	0,00	33,0	87,6	300	3,0	7,3	0,89	0,147
1	0,75	8,0	-	-	-	-	-	0,188
2	1,25	30,0	62,4	300	3,0	7,14	0,95	0,482
3	1,58	13,0	-	-	-	-	-	0,635
4	1,75	32,0	36,9	300	3,0	7,15	1,07	-
5	2,75	20,0	28,3	421	3,0	7,29	1,26	1,956
6	3,75	-	30,5	301	3,0	-	1,50	3,310
7	4,75	25,0	30,5	300	3,0	7,15	1,51	4,030
8	5,75	25,0	52,4	300	3,0	7,15	1,54	4,580

Ensaio R4.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
1	0,0	19,0	92,1	400	2,5	6,36	20,95	0,05	1,22	0,06	6,276	0,000
2	1,0	13,5	94,3	400	2,5	7,06	-	-	2,03	1,10	5,109	0,063
3	2,0	26,0	76,4	400	2,5	7,15	-	-	2,61	1,62	5,810	0,147
4	3,0	25,0	52,4	400	2,5	7,06	-	-	2,27	2,13	5,860	0,000
5	4,0	22,0	27,0	405	2,5	7,22	19,85	1,28	1,11	1,66	1,920	0,184
6	5,0	17,0	30,2	418	2,5	7,18	19,30	1,84	1,23	3,03	2,675	0,145
7	6,0	17,0	23,2	798	2,5	7,08	18,40	2,86	-	4,54	0,845	0,118
8	7,0	22,0	48,0	400	2,5	-	20,45	1,20	5,38	6,78	0,745	0,000
9	8,0	18,0	18,6	713	2,5	7,1	19,2	1,24	4,77	8,25	0,000	0,075
10	9,0	22,0	27	489	2,5	7,16	17,85	3,3	5,59	8,9	0,052	0,053
11	10,0	20,0	12,1	708	2,5	7,15	18,6	1,32	6,41	12,14	0,447	0,049
12	11,0	20,0	26,3	400	2,5	-	20,15	1,7	8,24	13,84	0,062	0,000
13	12,0	20,0	25,4	680	2,5	7,15	16,75	4,8	8,75	15,56	0,000	0,000
14	13,0	22,0	20,2	745	2,5	-	16,60	4,94	10,36	26,70	0,224	0,000
15	14,0	18,0	20,1	400	3,5	-	16,55	5,16	11,87	34,10	0,211	0,000
16	15,0	20,0	20,2	956	5,0	7,15	17,00	4,70	15,38	36,05	0,193	0,086
17	16,0	23,0	20,0	940	6,0	7,25	17,10	4,60	15,46	32,30	0,199	0,105
18	17,0	24,0	19,6	-	6,0	-	17,70	4,04	22,96	50,00	0,276	0,112
19	18,0	25,0	19,4	-	6,0	7,07	17,65	4,12	27,14	67,10	0,240	0,082
20	19,3	24,0	20,5	990	9,0	-	17,45	4,36	33,30	80,00	0,000	0,167
21	20,0	23,0	20,3	999	10,0	-	17,50	4,26	40,27	-	0,193	0,120
22	22,0	20,0	19,5	1013	10,0	7,05	17,40	4,42	34,10	62,00	0,000	0,000
23	23,0	20,0	19,9	1025	10,0	7,03	17,30	4,56	39,46	76,60	0,208	0,181
24	24,0	20,0	19,6	1029	10,0	-	17,25	4,52	44,82	128,00	0,276	0,261
25	25,0	22,0	19,7	1059	10,0	-	18,30	3,36	53,08	131,00	0,186	0,338
26	26,5	16,0	22,2	1303	10,0	7,05	16,30	5,58	56,18	137,00	0,000	0,000
27	28,0	15,0	19,6	1319	10,0	-	16,00	5,76	57,06	152,60	0,265	0,000
28	29,8	24,0	20,9	1307	10,0	6,91	15,95	5,92	59,80	161,20	0,000	0,173

Ensaio R5.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	-	-	-	-	-	-	-	-	2,84	1,46	-	-
0	0,0	21,0	94,0	400	2,5	6,33	-	-	1,83	0,69	6,581	0,000
1	1,0	23,0	87,0	400	2,5	7,35	-	-	1,63	1,12	6,239	0,121
2	2,0	25,0	56,4	400	2,5	7,04	20,90	0,80	2,10	1,85	5,852	0,175
3	3,0	22,0	26,0	400	2,5	7,04	20,45	1,42	1,29	2,91	5,088	0,235
4	4,0	15,0	20,7	519	2,5	7,04	19,55	2,38	2,47	4,19	4,325	0,282
5	5,0	22,0	19,2	647	2,5	6,99	18,75	3,20	4,49	6,56	1,950	0,267
6	6,0	22,0	51,3	400	2,5	7,02	20,25	2,40	5,25	9,51	0,000	0,080
7	7,0	23,0	19,0	1055	2,5	6,98	15,55	6,68	5,24	12,58	0,919	0,000
8	8,0	30,0	20,0	1170	2,5	6,91	14,50	8,10	6,25	19,45	0,000	0,000
9	9,0	27,0	19,6	1159	2,5	6,94	14,80	8,24	10,84	26,40	0,000	0,000
10	10,0	21,0	19,0	1272	2,5	6,98	13,80	8,88	11,28	28,00	0,000	0,000
11	11,0	20,0	19,4	1385	2,5	6,93	13,00	9,94	15,65	39,60	0,000	0,000
12	12,0	35,0	19,1	1143	6,0	6,95	19,65	3,26	21,10	48,00	0,000	0,000
13	13,0	18,0	20,0	1185	6,0	6,94	17,40	5,20	23,68	57,80	0,000	0,000
14	14,0	24,0	20,1	1299	6,0	6,93	16,85	5,86	26,10	65,50	0,000	0,000
15	15,0	18,0	20,0	1269	6,0	6,94	16,80	5,86	27,34	70,00	0,000	0,000
16	16,0	30,0	21,0	1217	6,0	6,89	16,60	6,28	33,48	78,20	0,000	0,000
17	16,5	80,0	19,1	1070	6,0	6,9	17,40	5,18	35,56	86,30	0,000	0,000
18	17,5	90,0	18,6	1236	5,8	6,91	16,55	5,98	35,64	99,60	0,000	0,000
19	18,5	90,0	18,6	1502	4,9	6,91	15,00	7,70	39,52	105,80	0,000	0,000
20	19,5	110,0	18,9	1554	5,0	6,82	14,75	7,90	40,16	114,00	0,000	0,000
21	20,5	90,0	21,2	1460	4,9	6,8	15,20	7,58	40,22	114,40	0,000	0,000
22	21,5	84,0	11,3	1320	5,3	6,78	15,80	7,22	41,80	114,80	0,000	0,000

Ensaio R6.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	1,94	0,86	8,652	0,273
0	0,0	15,0	90,3	300	4,0	6,31	-	-	1,96	0,67	6,601	0,000
1	1,0	25,0	88,9	400	4,0	6,88	-	-	1,28	0,58	5,757	0,000
2	2,0	15,0	69,1	400	3,0	6,88	-	-	2,78	1,90	5,507	0,000
3	3,0	17,0	32,8	400	3,0	6,85	-	-	3,36	3,14	4,572	0,000
4	4,0	20,0	21,1	651	3,0	6,87	-	-	3,58	4,92	4,758	0,000
5	5,0	21,0	19,8	631	3,0	6,85	-	-	4,67	7,85	1,786	0,000
6	6,0	28,0	26,0	833	5,0	6,85	-	-	6,07	13,48	0,000	0,000
7	7,0	14,0	18,9	1126	5,0	6,82	-	-	8,98	19,90	0,000	0,285
8	8,0	14,0	19,5	1049	6,0	6,84	-	-	10,91	28,10	0,000	0,033
9	9,0	13,0	18,5	1230	6,0	6,85	-	-	15,06	34,90	0,000	0,030
10	10,0	15,0	21,1	1272	6,0	6,84	-	-	20,18	44,95	0,000	0,045
11	11,0	15,0	19,8	1393	6,0	6,85	-	-	22,78	53,30	0,000	0,035
12	13,0	15,0	20,4	1360	6,0	6,84	-	-	28,74	74,90	0,000	0,037
13	15,0	103,0	20,9	1492	6,0	6,95	-	-	34,03	94,80	0,000	0,097
14	16,5	92,0	18,9	1499	7,7	6,93	-	-	44,97	114,20	0,000	0,097
15	17,5	100,0	19,4	1500	7,9	6,74	-	-	45,67	115,60	0,000	0,101
16	18,5	105,0	17,1	1500	8,4	6,74	-	-	49,23	120,60	0,000	0,084
17	19,5	100,0	20,1	1500	8,2	6,75	-	-	46,67	123,60	0,000	0,065
18	20,5	100,0	22,0	1499	8,2	6,74	-	-	41,37	132,00	0,000	0,040

Ensaio R7.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,54	-	-
0	0,0	15,0	91,1	300	4,0	6,57	-	-	1,82	0,53	5,554	-
1	1,0	20,0	70,9	300	4,0	6,88	-	-	1,09	0,95	0,000	-
2	2,0	17,0	34,6	300	4,0	6,87	-	-	2,34	1,51	5,320	-
3	3,0	18,0	37,9	400	4,0	6,87	-	-	2,71	2,63	0,000	-
4	4,0	17,0	23,8	500	4,0	6,98	-	-	3,59	4,41	4,585	-
5	5,0	26,0	26,7	651	6,0	6,93	-	-	4,08	7,82	0,000	-
6	6,0	17,0	16,0	800	6,0	6,92	-	-	5,64	13,02	0,000	-
7	7,0	14,0	16,2	950	7,0	6,93	18,10	3,04	7,45	19,35	0,000	-
8	8,0	15,0	19,2	950	7,5	6,94	18,20	2,98	10,84	27,50	0,000	-
9	9,0	25,0	15,8	949	7,5	6,94	18,20	2,96	13,64	35,65	0,000	-
10	10,0	14,0	15,0	950	7,5	6,94	18,10	3,10	15,88	41,50	0,000	-
11	11,0	17,0	14,3	950	7,5	6,93	18,60	2,90	19,33	50,10	0,000	-
12	12,0	15,0	14,4	949	7,5	6,93	18,05	3,14	22,62	55,00	0,000	-
13	13,0	22,0	16,3	949	7,5	6,95	18,15	3,00	24,48	63,20	0,000	-
14	14,0	22,0	15,8	989	8,3	6,94	18,00	3,18	26,72	67,80	0,000	-
15	15,0	23,0	15,9	990	8,3	6,93	17,95	3,26	29,22	73,20	0,000	-
16	16,0	16,0	16,5	999	8,6	6,94	17,85	3,34	33,52	83,90	0,000	-
17	17,3	55,0	15,7	969	6,0	6,85	16,90	4,32	37,02	94,80	0,000	-
18	18,3	65,0	18,7	990	8,0	6,84	17,55	3,76	39,52	103,00	0,000	-
19	19,3	57,0	16,4	990	8,0	6,84	17,50	3,68	41,56	108,80	0,000	-
20	20,3	60,0	15,8	990	8,0	6,97	17,35	3,84	41,91	112,00	0,000	-

Ensaio R8.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	1,50	1,61	6,273	0,214
1	0,0	23,0	85,0	300	4,0	6,54	-	-	1,34	0,36	5,755	-
2	1,0	23,0	92,0	400	4,0	6,95	20,50	0,18	2,29	0,82	6,329	-
3	2,0	25,0	67,3	400	4,0	6,97	19,95	0,40	2,50	1,56	5,876	0,155
4	3,0	25,0	30,0	400	2,5	6,94	19,20	1,00	2,30	2,43	4,204	0,171
5	4,0	27,0	18,8	541	2,5	6,93	18,15	1,94	3,20	4,27	3,567	0,179
6	5,0	17,0	18,5	741	2,5	6,89	16,30	3,46	4,43	6,68	1,560	0,189
7	6,0	23,0	12,2	846	3,0	6,91	17,66	3,08	6,22	9,93	0,000	0,175
8	7,0	25,0	19,5	1257	4,0	6,92	14,10	5,36	7,41	14,38	1,385	0,410
9	8,0	30,0	24,0	1415	8,0	6,95	15,40	4,56	11,39	22,78	0,000	0,232
10	9,0	17,0	19,9	1134	8,0	6,89	16,75	3,26	15,06	26,90	0,000	0,000
11	10,0	19,0	22,7	1014	8,0	6,89	16,95	3,14	17,82	32,80	0,000	0,099
12	11,0	18,0	19,6	960	8,0	6,90	16,75	3,30	20,52	34,60	0,000	0,000
13	12,0	33,0	22,8	864	9,0	6,89	16,45	3,56	25,38	46,50	0,000	0,000
14	13,0	18,0	22,0	913	9,0	6,91	16,40	3,60	28,52	52,70	0,208	0,000
15	14,0	14,0	21,5	960	8,0	-	16,20	3,72	29,74	56,60	0,000	0,000
16	15,0	18,0	17,4	1300	9,0	6,89	16,15	3,76	31,98	68,10	0,346	0,000
17	16,0	24,0	23,1	1300	9,0	6,90	15,95	3,92	34,64	72,90	0,000	0,000
18	17,0	117,0	43,0	1300	9,0	6,88	15,50	4,50	36,70	81,00	0,123	0,050
19	18,5	105,0	16,3	1100	9,0	6,87	16,30	3,66	36,60	82,20	0,323	0,035
20	19,5	105,0	17,4	1200	9,0	6,88	15,70	4,14	42,47	87,20	-	0,050
21	20,5	102,0	13,6	1200	9,0	6,84	15,55	4,30	41,93	91,80	0,000	0,081
22	21,5	108,0	12,3	1200	9,0	6,81	15,40	4,46	43,13	95,80	-	-
23	22,5	106,0	12,1	1200	9,0	6,82	15,40	4,52	43,43	97,40	0,000	0,078

Ensaio R9.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	OD (%)	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	0,98	-	-	-
0	0,0	19	91,3	300	4,0	6,47	-	-	0,73	-	6,340	0,000
1	1,0	13,0	73,8	300	4,0	6,65	20,75	0,24	1,69	-	5,999	0,118
2	2,0	13,0	49,5	300	4,0	7,02	20,60	0,40	2,30	-	5,786	0,162
3	3,0	20,0	41,4	350	4,0	7,02	20,30	0,72	1,78	2,08	5,052	0,246
4	4,0	18,0	60,6	500	4,0	6,97	19,75	1,28	2,66	3,72	3,413	0,284
5	5,0	19,0	24,7	651	4,0	6,88	18,85	2,32	4,95	7,79	0,344	0,099
6	6,0	18,0	18,7	710	4,0	6,89	19,20	1,18	4,87	9,13	0,349	0,055
7	7,0	20,0	21,2	992	4,0	6,85	16,80	4,52	5,85	15,03	0,000	0,051
8	8,0	20,0	20,7	902	4,0	6,85	16,80	4,60	7,66	23,72	0,000	0,025
9	9,0	22,0	20,2	859	4,0	6,84	16,65	4,74	13,17	31,70	0,000	0,019
10	10,0	20,0	20,3	840	4,0	6,85	16,60	4,84	16,06	39,84	0,000	0,037
11	11,0	22,0	20,4	832	4,0	6,86	16,55	4,90	18,93	46,80	0,000	0,012
12	12,0	23,0	20,0	825	4,0	6,87	16,50	4,92	22,37	53,40	0,000	0,025
13	13,0	19,0	19,7	879	4,0	6,85	16,00	5,48	23,43	59,50	0,000	0,028
14	14,0	18,0	20,1	882	4,0	6,85	15,95	5,52	26,24	64,00	0,000	0,050
15	15,0	19,0	21,1	942	5,0	6,84	16,05	5,42	27,48	71,20	0,000	0,054
16	16,0	18,0	20,1	980	5,0	6,85	15,80	5,68	31,96	76,30	0,000	0,065
17	17,0	56,0	26,1	807	5,0	6,82	15,80	5,52	34,54	82,20	0,000	0,084
18	18,2	60,0	20,8	929	5,0	6,80	16,65	4,68	37,30	88,80	0,000	0,082
19	19,3	58,0	20,2	917	5,0	6,78	16,50	4,94	42,42	97,80	0,000	0,080
20	20,3	56,0	19,8	949	5,0	6,84	16,15	5,30	47,98	100,60	0,000	0,074
21	21,3	52,0	28,3	827	5,0	6,84	16,30	5,74	41,50	107,60	0,000	0,134

Ensaio R10.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	%pO ₂	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O2 (%)	CO2 (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
0	0,0	35,0	83,3	300	4	6,75	-	-	-	0,55	6,879	0,118
1	2,0	32,0	41,7	300	4	6,92	-	-	-	0,77	5,765	0,291
2	4,0	30,0	74,6	300	4	6,85	-	-	-	3,34	4,407	0,613

Ensaio R11.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	%pO ₂	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0	-	-	-	-	-	-	-	-	2,03	-	-
0	0,0	45,0	95,0	400	4	6,75	20,95	0,05	1,18	0,69	5,687	0,130
1	2,0	32,0	69,8	400	4	6,98	21,00	0,06	2,15	1,78	4,733	0,287
2	4,0	67,0	53,0	400	4	6,98	19,90	1,26	3,34	3,95	2,378	0,440
CTR 1	5,0	15,0	-	-	-	-	-	-	-	6,05	0,000	0,974

Ensaio R12.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	%pO ₂	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	-	-	-	-	-	-	-	-	1,63	1,48	9,917	0,379
0	0,0	49,0	92,4	400	3,5	6,76	20,95	0,05	1,04	0,49	4,086	0,000
1	2,0	31,0	29,9	400	3,5	6,95	20,60	0,40	2,16	1,58	4,115	0,189
2	4,0	26,5	25,0	500	3,5	6,92	19,90	1,14	2,69	3,85	1,010	0,298
3	6,0	26,0	63,0	700	3,5	6,98	19,85	1,18	5,05	8,52	0,000	0,000
4	8,0	34,0	31,0	1000	3,5	6,95	17,65	3,52	7,89	16,64	0,000	0,000
5	10,0	35,0	28,8	1000	3,5	6,96	16,20	5,06	10,81	26,00	0,000	0,046
6	12,0	62,0	27,7	1100	5,0	6,97	15,65	5,94	17,84	40,80	0,000	0,075
7	14,0	37,0	35,8	1100	9,0	6,98	17,30	3,88	23,31	53,00	0,000	0,084
8	16,0	77,0	32,2	1100	10,0	6,94	17,15	3,98	31,40	72,80	0,000	0,113
9	17,8	73,0	27,0	1100	10,0	6,95	17,50	3,76	31,42	82,00	0,000	0,157
10	18,8	64,0	25,4	1100	10,0	6,94	17,40	3,86	35,68	95,20	0,000	0,192
11	19,8	56,0	21,9	1100	10,0	6,95	16,75	4,34	34,77	90,40	0,000	0,131
12	20,8	69,0	15,0	1100	10,0	6,91	17,95	3,24	35,27	100,60	0,000	0,218

Ensaio R13.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	%pO ₂	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,23	-	-
0	0,0	38,0	95,4	400	3,5	6,45	20,95	0,05	1,65	0,44	4,225	0,000
1	2,0	44,0	67,8	400	3,5	6,96	20,50	0,54	2,42	1,41	3,664	0,232
2	4,0	39,0	41,9	500	3,5	7,02	19,50	1,54	2,63	3,87	1,687	0,318
3	6,0	37,0	35,6	700	3,5	7,00	17,50	3,22	5,53	8,74	0,000	0,000
4	8,0	43,0	31,8	1000	4,5	7,02	16,85	4,36	8,73	19,70	0,000	0,000
5	10,0	37,0	30,9	1000	10	7,00	18,40	2,72	12,19	33,80	0,000	0,000
6	12,0	55,0	29,4	1151	10	7,03	17,85	3,26	16,22	45,60	0,000	0,000
7	14,0	58,0	21,3	1150	10	6,95	17,20	3,96	25,85	59,10	0,000	0,000
8	15,8	78,0	15,5	1150	10	6,94	17,15	4,00	26,97	69,90	0,000	0,000
9	16,4	75,0	51,2	1201	10	6,95	18,10	2,58	29,62	73,00	0,059	0,000
10	17,9	76,0	2,6	1200	10	6,96	16,20	4,88	33,60	83,20	0,085	0,000
11	18,7	76,0	19,7	1200	10	6,97	17,25	3,86	35,48	89,00	0,081	0,000
12	19,7	70,0	20,6	1200	10	7,02	17,05	3,98	37,04	92,10	0,091	0,000
13	20,7	155,0	27,1	1200	10	7,03	17,10	3,98	38,41	95,60	0,096	0,000

Ensaio R14.

Amostra	Tempo (h)	Vol. Amostra (mL)	%pO ₂	Agitação (rpm)	Aeração (lpm)	pH	O ₂ (%)	CO ₂ (%)	X (g/L)	D.O 600nm	Glicose (g/L)	Ácido Acético (g/L)
Inóculo	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,41	-	-
0	0,0	45,0	98,5	400	3,5	6,42	20,90	0,10	1,55	0,44	4,288	0,000
1	2,0	48,0	69,9	400	3,5	6,96	20,50	0,56	2,54	1,53	3,803	0,241
2	4,0	40,0	45,9	500	3,5	6,97	19,40	1,62	2,90	4,10	1,685	0,259
3	6,0	40,0	34,9	700	3,5	6,98	17,00	3,82	5,80	10,16	0,000	0,132
4	8,0	33,0	25,9	1000	5,5	6,96	16,75	4,50	9,24	21,15	0,000	0,000
5	10,0	37,0	32,6	1050	10	6,96	18,00	3,16	13,81	37,10	0,000	0,000
6	12,0	73,0	10,1	1150	10	7,00	17,70	3,48	20,66	52,20	0,000	0,278
7	14,0	63,0	46,0	1150	10	6,95	17,40	3,80	29,09	64,70	0,000	0,199
8	16,0	88,0	28,0	1200	10	6,96	16,65	4,28	35,44	78,00	0,037	0,000
9	17,4	78,0	23,3	1200	10	6,97	16,15	4,96	34,82	86,80	0,051	0,000
10	18,2	81,0	36,0	1200	10	6,90	16,65	5,12	39,28	102,00	0,071	0,000
11	19,2	82,0	27,9	1200	10	7,02	16,20	4,80	41,54	109,40	0,058	0,000
12	20,2	148,0	19,6	1200	10	7,02	16,20	4,82	45,13	114,00	0,077	0,000

ANEXO B – Dados da cinética de crescimento em meio de crescimento I (Inóculo) da linhagem *E. coli* – Rec1.

Tempo (h)	D.O 600nm	X (g/L)	ln (X)
0,0	0,276	1,23	0,2070
1,0	0,427	1,23	0,2070
1,5	0,559	1,38	0,3221
2,0	0,792	1,53	0,4253
2,5	1,166	1,61	0,4762
3,0	1,540	1,32	-
3,5	2,015	1,77	0,5710
4,0	2,435	1,78	-
4,5	2,855	2,19	0,7839
5,0	3,215	2,31	0,8372
5,5	3,835	2,48	0,9083
6,0	4,300	2,85	1,0473
6,5	4,440	2,74	1,0080