



Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
Centro de Tecnologia  
Departamento de Engenharia Química  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química



## **TESE DE DOUTORADO**

# **INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania i.chagasi* UTILIZANDO *Escherichia coli* M15 CULTIVADA EM INCUBADOR ROTATIVO E BIORREATOR**

Michelle Rossana Ferreira Vaz

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Daniella Regina Arantes Martins

Natal/RN

Dezembro/2011

**Michelle Rossana Ferreira Vaz**

INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO  
DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania i.Chagasi*  
UTILIZANDO *Escherichia Coli* M15 CULTIVADA EM  
INCUBADOR ROTATIVO E BIORREATOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Química, sob a orientação da Profa. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo e co-orientação da Profa. Dra. Daniella Regina Arantes Martins.

Natal/RN

Dezembro/2011

Catálogo da Publicação na Fonte.  
UFRN / CT / PPGEQ  
Biblioteca Setorial “Professor Horácio Nicolas Solimo”.

Vaz, Michelle Rossana Ferreira.

Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator / Michelle Rossana Ferreira Vaz. - Natal, 2011.

112 f.: il.

Orientadora: Gorete Ribeiro de Macedo.

Co-orientadora: Daniella Regina Arantes Martins.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.  
Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

1. Antígenos – Produção - Tese. 2. Leishmaniose – Tratamento - Tese. 3. *Escherichia coli* - Hospedeiro - Tese. 4. Proteínas recombinantes - Produção - Tese. 5. *Leishmania i. chagasi* - Tese. I. Macedo, Gorete Ribeiro de. II. Martins, Daniella Regina Arantes. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BSEO

CDU 616-097.1(043.2)

**VAZ, Michelle Rossana** – Influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 cultivada em incubador rotativo e biorreator. Tese de Doutorado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, – PPGEQ, Áreas de Concentração: Engenharia de Processos, Natal/RN, Brasil.

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo

**Co-orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniella Regina Arantes Martins

---

**RESUMO:** A *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para produção de proteínas recombinantes tanto em escala de laboratório como em escala industrial desde o advento da tecnologia do DNA recombinante. Apesar do avanço expressivo dos estudos da biologia molecular e da imunologia das infecções, não existe, atualmente, nenhuma droga profilática capaz de prevenir o calazar. Desta forma, existe uma grande necessidade de identificação de antígenos específicos para o desenvolvimento de vacinas e *kits* para diagnósticos contra a Leishmaniose visceral. Com base no exposto, o presente trabalho tem como foco principal avaliar a influência das condições de cultivo na produção dos antígenos de *Leishmania i. chagasi* em cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator. Para atingir o objetivo proposto, vários ensaios foram realizados a fim de se avaliar o comportamento cinético dos clones (648, 503) de *Leishmania i. chagasi* em duas diferentes composições de meio (2xTY, TB), com e sem adição de indutor em incubador rotativo. Para melhorar a expressão, ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada com as melhores condições obtidas em incubador rotativo, além da avaliação da influência da velocidade de agitação. Com base nos resultados obtidos, pode-se observar que a elevada complexidade do meio de cultivo favoreceu a cinética de crescimento dos clones (648, 503), no entanto, ao se tratar dos ensaios submetidos ao procedimento de indução por IPTG, a elevada complexidade do meio de cultivo não favoreceu a expressão das proteínas recombinantes. Pode-se observar que a expressão dos antígenos 648 e 503 apresentam um comportamento associado ao crescimento e que em termos de localização, as proteínas 648 e 503, são armazenadas intracelularmente. A lactose pode ser o indutor mais adequado na expressão das proteínas tendo em vista os fatores, custo, toxicidade e estabilidade. A elevada agitação pode aumentar o crescimento celular do clone 503, entretanto, pode não acarretar em altas concentrações da proteína de interesse. Por outro lado, foram obtidos resultados positivos para todos os clones recombinantes (648, 503) testados, confirmada através do perfil eletroforético.

---

**Palavras – Chave:** Indução, *Escherichia coli* Recombinante, *Leishmania chagasi*

---

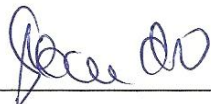
**Michelle Rossana Ferreira Vaz**

**Título da Tese de Doutorado**

**INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS  
RECOMBINANTES DE *Leishmania i.chagasi* UTILIZANDO *Escherichia coli* M15  
CULTIVADA EM INCUBADOR ROTATIVO E BIORREATOR**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química - PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Aprovado (a) em 29/ 12/2011



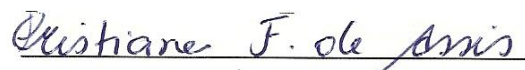
Prof. Dra. Gorete Ribeiro de Macedo  
Orientador(a) – UFRN



Prof. Dra. Daniella Regina Arantes Martins  
Co-orientador (a) - UFRN



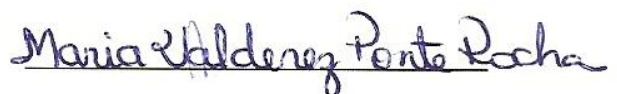
Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos  
Membro Interno – UFRN



Prof. Dra. Cristiane Fernandes de Assis  
Membro Interno - UFRN



Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Membro Externo – UFRPE



Prof. Dra. Maria Valderez Ponte Rocha  
Membro Externo - UFC

**ABSTRACT:** *Escherichia coli* has been one of the most widely used hosts in recombinant protein production, in both laboratory and industrial scale since the advent of recombinant DNA technology. Despite the substantial progress of studies on the molecular biology and immunology of infections, there is currently no medication-based prophylaxis capable of preventing leishmaniasis. As such, there is a great need to identify specific antigens for the development of vaccines and diagnostic kits against visceral leishmaniasis. Thus, the primary goal of the present study is to assess the influence of cultivation conditions on the production of *Leishmania chagasi* antigens, carried out in a rotating incubator and bioreactor. To that end, several assays were conducted to evaluate the kinetic behavior of antigens (648, 503) of *Leishmania. i. chagasi* in two different compositions of media (2xTY, TB), with and without an inducer. In order to improve expression, assays were performed in a benchtop bioreactor using the best conditions obtained in a rotating incubator, in addition to assessing the influence of stirring speed. Results show that high complexity of the cultivation medium favored kinetic growth of clones (648, 503). However, in assays submitted to induction by IPTG, this elevated complexity did not promote the expression of recombinant proteins. Expression of antigens 648 and 503 exhibited behavior associated with growth and, in terms of location, proteins 648 and 503 are intracellularly stored. Lactose may be the most adequate inducer in protein expression, when considering factors, cost, toxicity and stability. Elevated stirring may increase cell growth in clone 53, although it may not result in high concentrations for the protein of interest. On the other hand, positive results were obtained for all recombinant clones (648, 503) tested, confirmed by the electrophoretic profile.

**Key-words:** Induction; Recombinant *Escherichia coli*, *Leishmania chagasi*

## DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada:

À Deus, por ter me proporcionado a oportunidade de realizar e concluir este trabalho.

Dedico aos meus pais, por toda a ajuda dada em todos os momentos da minha vida. A minha querida irmã Cíntia Vaz pelo carinho e apoio. Em especial dedico ao meu sobrinho e afilhado Vinícius Vaz, que abrilhantou meu caminho com sua alegria. Amo-te demais. E ao meu noivo Israel que também esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela presença constante em minha vida, por ter me dado saúde e disposição para os estudos. E por ter me dado a oportunidade de uma vida nova com estômago reduzido.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra Gorete Ribeiro Macedo, pela orientação, apoio e dedicação de sempre. Obrigada pela sinceridade e conselhos, sempre a terei como inspiração e respeito pela profissional. Agradeço de todo o meu coração.

A minha co-orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniella Regina Arantes Martins, pela sua receptividade em seu laboratório e que esteve sempre à disposição em todos os momentos da minha tese, em particular, quando mais precisei.

Ao Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos que mesmo não sendo meu orientador ou co-orientador sempre esteve à disposição em discutir o meu trabalho, seus questionamentos foram fundamentais, não apenas na realização dos ensaios como também na elaboração de artigos e finalização da minha tese.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>ª</sup>. Dra Cristiane Fernandes de Assis, Prof<sup>ª</sup>. Dra Maria Valderez Ponte Rocha, Prof<sup>ª</sup> Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto e Prof. Dr. Everaldo Silvino dos Santos pela disposição em discutir o trabalho e por seus questionamentos.

Aos meus pais por sempre acreditarem no meu potencial.

Ao meu amado sobrinho e afilhado Vinícius Vaz (Rouxinol) que abrilhantou minha vida após seu nascimento.

Em especial ao meu querido amigo, companheiro de todas as horas, Francisco Canindé por estar presente em todos os momentos da minha tese contribuindo não apenas com sua visão acadêmica na realização dos ensaios, artigos, enfim, somos parceiros de muitos momentos especiais e, principalmente, na vida pessoal sendo amigo sincero!!! Obrigada por tudo e pode contar sempre comigo.

Ao meu amigo Alexandre Guilherme (Xande), que mais do que nunca, sempre contribuiu com sua visão acadêmica e esteve me animando mesmo nos momentos mais difíceis.

A Nathalia Araújo, Rodrigo Guedes, Valéria Nogueira, Fabiano Avelino, Ruthnéia Jéssica por toda experiência profissional compartilhada e amizade.

Amigos do LEB estes de todas as horas... tão especiais...que só tenho a agradecer a Deus, por ter convivido com vocês ..... tudo foi muito bom!!! e espero dar continuidade do meu trabalho na presença dos mesmos.

À Mazinha pelo carinho e atenção.

À Sirtys Lessa de Andradre e Ricardo França por ter contribuído no início dos ensaios.

Em especial a pupila Letícia Maia Resende Costa pela grande colaboração, o qual não poupou esforços nem tempo em me ajudar na realização dos experimentos em laboratório.

À Paulo Dantas e Stephanie Bivar que muito contribuíram na finalização das purificações e em todos os momentos os quais precisei.

Ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

# Sumário

Capítulo 1 .....	i
Introdução Geral .....	i
1.    Introdução .....	2
2.    Revisão da Literatura .....	7
2.2 – Engenharia genética e a Biotecnologia moderna .....	8
2.2.1 – Clonagem .....	8
2.3 – <i>Escherichia coli</i> como sistema de expressão de proteínas recombinantes .....	9
2.4 – Estabilidade do plasmídeo .....	11
2.5 – Considerações sobre o meio de cultivo .....	11
2.6 – Influência da agitação e aeração .....	12
2.7 – Expressão gênica em procariontes .....	13
2.8 – Estratégias de cultivos em incubador rotativo e biorreator .....	15
2.9 – Formação do ácido acético em <i>Escherichia coli</i> .....	24
Capítulo 3 .....	26
Material e Métodos .....	26
3.    Material e métodos .....	27
3.1- Micro-organismo .....	27
3.2- Meios de cultivos utilizados nos ensaios em incubador rotativo e biorreator .....	28
3.2.1- Antibióticos .....	28
3.3 - Determinação da estabilidade do plasmídeo .....	29
3.4 - Preparo do Inóculo .....	29
3.5 - Cultivos em incubador rotativo .....	29
3.6 - Cultivos em biorreator de bancada .....	30
3.7 – Indução em cultivos descontínuo realizados em incubador rotativo e biorreator de bancada .....	31
3.8- Procedimento de indução .....	32
3.9 – Métodos de Análises .....	32
3.9.1 – Determinação da concentração celular (X) .....	33
3.9.2 – Carbono orgânico total (TOC) .....	34
3.9.3 – Rompimento da parede celular .....	34
3.9.4 – Quantificação do Ácido Acético e Lactose .....	34
3.9.5 - Purificação em batelada de antígenos 648 e 503 de <i>Leishmania i. chagasi</i> sob condições desnaturantes .....	35
3.9.6 – Determinação das proteínas totais .....	36
3.9.6.1 –Eletroforese de Proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) .....	36
Capítulo 4 .....	38
Resultados e Discussão .....	38
4.    Resultados e Discussão .....	39
4.1 – Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento dos clones 648 e 503 em duas diferentes composições de meios de cultivo sem indução .....	39
4.1.1 – Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento dos clones 648 e 503 .....	39
4.1.2 – Ensaios em incubador rotativo com indução por IPTG visando analisar a expressão da proteína .....	46
4.1.3 – Ensaios com indução por IPTG em biorreator de bancada .....	54
4.1.4 – Ensaios com indução por Lactose visando analisar a expressão da proteína em incubador rotativo .....	57
4.1.5 - Ensaios com indução por Lactose em biorreator de bancada .....	69

4.1.6 - Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento do clone 503 em biorreator de bancada sob diferentes velocidades de agitação.....	76
4.1.7 - Ensaios induzidos por Lactose para a expressão do antígeno 503 em biorreator de bancada sob diferentes velocidades de agitação.....	83
Capítulo 5 .....	44
Conclusão .....	44
Capítulo 6 .....	44
Referências bibliográficas .....	94
ANEXO .....	99
ANEXO I.....	108

# Lista de Figuras

Figura 1 - Clonagem e expressão de genes exógenos em <i>E. coli</i> (Fonte: Brown, 2003). .....	9
Figura 2. Esquema ilustrando o funcionamento do Operon <i>lac</i> . .....	15
Figura 3- Procedimento dos processos fermentativos realizados em incubador rotativo e biorreator. ....	30
Figura 4 - Ilustra o biorreator de bancada onde foram realizadas as fermentações.....	31
Figura 5 - Fluxograma do procedimento analítico. ....	33
Figura 6 – Procedimento da purificação por cromatografia de afinidade dos antígenos 648 e 503 de <i>L. i. chagasi</i> .....	36
Figura 7 - Representação esquemática da eletroforese.....	37
Figura 8- Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 648 no meio 2xTY, a 37°C e 200 rpm, não induzido.....	40
Figura 9 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 648 no meio TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido .....	40
Figura 10 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 503 no meio 2xTY, a 37°C e 200 rpm, não induzido.....	41
Figura 11 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 503 no meio TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido .....	41
Figura 12 - Concentração de ácido acético para o clone 648 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido.....	44
Figura 13 - Concentração de ácido acético para o clone 503 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido.....	44
Figura 14 - Produtividade em células para o clone 648 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido. ....	45
Figura 15 - Produtividade em células para o clone 503 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido. ....	45
Figura 16 - Perfil do crescimento celular (▲), consumo de substrato (■) e proteína total (Δ) para o clone 648 cultivado no meio 2xTY em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.....	47
Figura 17 – Perfil do crescimento celular (▲) consumo de substrato (■) e proteína total (Δ) para o clone 648 cultivado no meio TB em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG. ....	48
Figura 18 – Perfil do crescimento celular (▲) consumo de substrato (■) proteína total (Δ) para o clone 503 cultivado no meio 2xTY em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.....	49
Figura 19 - Comportamento do crescimento celular (▲) consumo de substrato (■) e proteína total (Δ).....	50
Figura 20 - Produção da proteína intra (□) e extracelular (○) induzido por IPTG em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm : (A) ensaio F01 (648/2xTY), (B) ensaio F02 (648/TB), (C) ensaio F13 (503/2xTY), (D) ensaio F14 (503/TB). ....	53
Figura 21 - Comportamento do crescimento celular (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína 648 intracelular (▽) em biorreator a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG : (A) ensaio F05 (648/2xTY), (B) ensaio F06 (648/TB). ....	55
Figura 22 - Comportamento do crescimento celular (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína total 503 (Δ) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por Lactose : (A) ensaio F15 (503/2xTY), (B) ensaio F16 (503/TB).....	58
Figura 23 - Produção da proteína intracelular (□) e extracelular (○) induzido por lactose em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm (A) ensaio F15 (503/2xTY), (B) ensaio F16 (503/TB). 60	

Figura 24 - Produtividades em células dos ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648( induzido por IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503( induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	61
Figura 25- Produtividade das proteínas 648 e 503 dos ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648 (induzido por IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503( induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503( induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	63
Figura 26 - Velocidade específica de produção das proteínas 648 e 503 ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648 (induzido por IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503 (induzido por IPTG), F15/F16- 2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	65
Figura 27- Velocidades específicas de crescimento dos ensaios F13/F14 -2xTY-TB/503 (induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	66
Figura 28- Velocidades específicas de formação de ácido acético dos ensaios F01/F02-648, F13/F14-503, F15/F16-503 (induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503(induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	67
Figura 29- Concentração de ácido acético dos ensaios F01/F02 (648-2xTY/TB)-(induzido por IPTG) , F13/F14-(503/2xTY/TB)( induzido por IPTG), F15/F16-(503/2xTY/TB)- (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm. ....	69
Figura 30- Comportamento do crescimento celular (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína 648 intracelular (▽) no Meio 2xTY (induzido por Lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm. ....	70
Figura 31- Curvas de crescimento (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína 648 intracelular (▽) no Meio TB ( induzido por Lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm. ...	72
Figura 32- Produtividades em células ensaios F05/F06-2xtY/TB-648( induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648 ( induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm. ....	74
Figura 33 - Produtividade da proteína 648 ensaios F05/F06-2xtY/TB-648( induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648 (induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm. ....	75
Figura 34- Concentração de ácido acético ensaios F05/F06-2xtY/TB-648 (induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648( induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm. ....	76
Figura 35- Influência da agitação no crescimento celular do clone 503 (não induzido) em biorreator. ....	77
Figura 36- Influência da agitação no consumo do substrato do clone 503 (não induzido) em biorreator. ....	78
Figura 37 - Produtividade em células do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação (200, 400 e 600 rpm). ....	79
Figura 38 - Velocidade específica de crescimento (não induzido) em biorreator sob diferentes frequências de agitação. ....	80
Figura 39 – Concentração do ácido acético do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação. ....	81
Figura 40 - Influência da agitação no crescimento celular do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator. ....	84
Figura 41 - Consumo do substrato do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação. ....	85
Figura 42 - Velocidade específica de crescimento do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator. ....	85
Figura 43 - Influência da agitação na produção do antígeno 503 (induzido por lactose) em biorreator. ....	86
Figura 44 - Produtividade da proteína 503 (induzido por lactose) em biorreator. ....	87
Figura 45 – Concentração de ácido acético do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator. ....	88
Figura 46 - Concentração de lactose ao longo da etapa de indução em biorreator. ....	89

Figura 47- SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 648 de <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido por IPTG no meio 2xTY. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas não ligadas à resina, Linhas (3-6): amostras não induzidas, Linhas (7 e 8): proteína eluída. Gel revelado por nitrato de prata.....	91
Figura 48 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 648 da <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido por IPTG no meio TB. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas não ligadas à resina, Linhas (3-6): amostras não induzidas, Linha (7): proteína eluída. Gel revelado por nitrato de prata. A eficácia da indução por IPTG, confirmando a expressão da proteína 648 no meio TB com massa molecular de 24 kDa. ....	92
Figura 49 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido no meio 2xTY. Linha (1): Marcador; Linhas (2, 4, 6, 8): Proteínas eluídas induzidas por Lactose, Linhas (3, 5, 7): Proteínas eluídas induzida por IPTG. ....	93
Figura 50- SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> induzido por Lactose no meio 2xTY sob diferentes velocidades de agitação. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas totais, Linha (3): proteínas não ligadas à resina, Linha (4): proteína eluída a 200 rpm, Linha (5): proteína eluída a 400 rpm, Linha (6): proteína eluída a 600 rpm, Linha (7): proteína total, Linha (8): proteínas não ligadas a resina, Linha (9): amostra extracelular.....	94
Figura 51 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da <i>Leishmania i. chagasi</i> em <i>E. coli</i> . Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas totais, Linha (3): proteínas não ligadas à resina, Linhas (4 e 9): amostras não induzidas, Linhas (5 e 7) proteína eluída no meio 2xTY induzida por Lactose, Linhas (6 e 8) proteína eluída no meio TB induzida por IPTG. ....	95

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição dos meios de cultivo 2xTY e TB.....	28
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios sem indução em incubador rotativo. .	42
Tabela 3- Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por IPTG em incubador rotativo.....	51
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por IPTG em biorreator. ..	56
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por lactose em incubador rotativo.....	59
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por lactose em biorreator.	73
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios não induzidos em biorreator a 37°C sob diferentes velocidades de agitação. ....	82
Tabela 8 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios com indução por lactose em biorreator. ....	90

# Lista de nomenclaturas

IPTG	Isopropiltiogalactosídeo
IMAC	Cromatografia de afinidade por metal imobilizado
KDa	Quilo daltons (1000 daltons)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
$X_{\max}$	Concentração celular máxima ( $\text{g.L}^{-1}$ )
S	Substrato ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$t_{X_{\max}}$	Instante de concentração máxima de células (h)
$X_{\max}$	Concentração celular máxima ( $\text{g.L}^{-1}$ )
$\mu_X$	Velocidade específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_P$	Velocidade específica de formação de produto ( $\text{g/g.h}$ )
$\mu_{x_{\max}}$	Velocidade máxima específica de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_x$	Velocidade específica de crescimento no instante de indução ( $\text{h}^{-1}$ )
$\mu_{\text{Ac máx}}$	velocidade específica de formação de ácido acético ( $\text{g/g.h}$ )
$P_x$	Produtividade em células ( $\text{g/L.h}$ )
$P_p$	Produtividade da proteína ( $\text{g/L.h}$ )
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em biomassa ( $\text{g.g}^{-1}$ )
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio
Ac. Acético	A concentração máxima de ácido acético
$P_{p/x}$	Produção específica da proteína
$[\text{Proteína intra}]_{\text{Max}}$	Máxima concentração da proteína

---

# **Capítulo 1**

## **Introdução Geral**

---

# 1. Introdução

A Leishmaniose é um termo utilizado genericamente para definir um complexo de doenças clinicamente diferentes, causadas pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania* (Ordem *Kinetoplastidae*, família *Trypanosomatidae*). Os membros da família são parasitos de insetos, aracnídeos, plantas e vertebrados diversos. Esses parasitos são dimórficos, com a forma extracelular denominada promastigota e a forma intracelular denominada de amastigota. A forma promastigota é flagelada e encontrada no trato intestinal do vetor; enquanto a forma amastigota é ovalada, sem flagelos aparentes, e é exclusiva do hospedeiro vertebrado, no qual, geralmente é encontrada no interior dos macrófagos e de outras células fagocíticas. De acordo com a espécie de *Leishmania*, o indivíduo pode apresentar manifestações cutâneas, mucocutâneas, cutâneas difusas e viscerais. A *Leishmaniose visceral americana* (LVA) é a forma mais grave da doença. Os vetores da LVA são insetos da família *Psycodidae*, subfamília *Plebotominae*, denominados de flebotomíneos, também conhecidos popularmente no Brasil como birigui, mosquito palha, asa dura e tatuquira (Braz *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2005; Rey, 2008).

LVA é uma doença com um amplo espectro de manifestações clínicas, classificada em três tipos: 1) forma assintomática, caracterizada por sorologia positiva para *Leishmania* sem qualquer manifestação clínica, 2) forma oligossintomática, caracterizado por sorologia positiva e presença de sinais e/ou sintomas leves como febre, hepatomegalia e/ou esplenomegalia leves; 3) forma clássica ou completa da doença, caracterizada por hepatoesplenomegalia, febre, pancitopenia hipergamaglobulinemia significativas, e grave comprometimento da saúde geral. As manifestações podem progredir para: diarreia, náuseas, vômitos, dor abdominal, tosse não produtiva e progressiva perda de peso, indicando estágios avançados da doença: dores de cabeça, a desnutrição, edema dos membros inferiores, icterícia, hemorragias e ascite. Quando não tratada, pode levar a morte em um ou dois anos após o aparecimento dos sintomas (Jerônimo *et al.*, 2004, Drumond e Costa, 2011, Costa *et al.*, 2011).

A doença possui ampla distribuição geográfica, principalmente, em regiões tropicais e subtropicais do mundo. Estima-se que existam em todo o mundo 12 milhões de pessoas infectadas com as diversas formas da doença, e cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção (Jerônimo *et al.*, 1995; Davies *et al.*, 2003; Ettinger *et al.*, 2009; Frank *et al.*, 2010). A leishmaniose é considerada a quinta doença infectoparasitária de maior importância

em todo mundo, sendo classificada como de nível 1 de prioridade em virtude da ocorrência de novos surtos em diversas partes do mundo (World Health Organization, 2009).

No Brasil, e em particular na região Nordeste, a Leishmaniose atinge quase duas mil pessoas por ano, além de ser responsável por 92% dos casos. O aumento do número de pessoas que correm o risco de serem infectadas pode ser explicado pelas condições geográficas, sobretudo, climáticas, representada pela alta pluviosidade, que favorece a proliferação do mosquito do gênero *Lutzomyia* (Jerônimo *et al.*, 2004; Selvapandiyan *et al.*, 2012).

Atualmente, a droga de escolha para o tratamento da Leishmaniose é o Glucantime, porém, devido à elevada toxicidade requer cuidados especiais quando empregadas no tratamento (Selvapandiyan *et al.*, 2012). Devido ao elevado custo e a toxicidade das drogas utilizadas para diagnóstico e cura da leishmaniose, faz-se necessário buscar alternativas mais eficazes e menos agressivas ao organismo humano (Selvapandiyan *et al.*, 2012). Apesar dos avanços expressivos dos estudos da biologia molecular e da imunologia das infecções, não existe, atualmente, nenhuma droga capaz de prevenir essa doença, o que justifica a necessidade a produção de antígenos recombinantes através de micro-organismos recombinantes para a produção de vacinas e *kits* para diagnóstico de elevada acessibilidade. Essa produção se tornou possível com advento da engenharia genética, que permite expressar qualquer gene em organismos hospedeiros, desde bactérias, fungos filamentosos, leveduras e insetos, até plantas e mamíferos transgênicos, sendo necessário, para isso, o desenvolvimento de vetores específicos para tal finalidade (Borzani *et al.*, 2001; Valdez-cruz *et al.*, 2010 ).

Desde o advento da tecnologia do DNA recombinante, a *Escherichia coli* é um dos hospedeiros mais utilizados para produção de proteínas recombinantes tanto em escala de laboratório como em escala industrial, principalmente por apresentar vantagens como facilidade de manipulação genética, grande disponibilidade de informação genética, crescimento rápido e alto nível de expressão do micro-organismo em meios de baixo custo (Zhang *et al.*, 2010). Entretanto, a excreção do ácido acético durante os cultivos de *E.coli* pode ser considerada como uma limitação para a utilização desse micro-organismo. Este composto é prejudicial à produção de proteína heterólogas sendo o principal produto das vias fermentativas da *E. coli* (Kilikian *et al.*, 2000; Eiteman & Auteman., 2006; Xue *et al.*, 2010).

Vários parâmetros influenciam no rendimento final de proteína recombinante, incluindo a composição do meio de cultivo, a taxa de crescimento específico no instante de indução, a produção de ácido acético, o tipo de molécula indutora (IPTG ou lactose). Dentre

esses parâmetros, o tipo de indutor exerce efeito significativo na expressão de proteínas recombinantes (Kilikian *et al.*, 2000; Piralek *et al.*, 2011).

A utilização de micro-organismos recombinantes na indústria de bioprocessos é cada vez mais comum na produção de hormônios, antibióticos, enzimas e proteínas em geral. Na produção de bioprodutos heterólogos, não somente o desenvolvimento de cepas que carregam os genes exógenos é uma etapa importante, como também o desenvolvimento do processo de produção em si. Nesse sentido, o estudo das condições adequadas de cultivo em reator é um requisito essencial para a viabilidade e sucesso deste tipo de bioprocessos (Rossi, 2001; Gupta *et al.*, 2009; Hortsch & Weuster-Botz., 2011).

Com base no exposto, o presente trabalho tem como foco principal avaliar a influência das condições de cultivo na produção de antígenos de *Leishmania i. chagasi* utilizando a *Escherichia coli* como hospedeiro em cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator.

Para atingir o objetivo proposto, um primeiro conjunto de ensaios foi realizado com o intuito de avaliar o comportamento cinético dos antígenos (648, 503) de *i. chagasi* em duas diferentes composições de meio (2xTY, TB), sem adição do indutor, verificando-se qual o meio mais favorável ao crescimento dos dois clones e qual dos clones apresentou melhor comportamento cinético.

Para avaliar a influência da composição do meio de cultivo e do tipo de indutor na indução da expressão das proteínas (648, 503) de *Leishmania i. chagasi*, um segundo conjunto de ensaios foi realizado em incubador rotativo procedendo-se a adição por IPTG ou lactose a fim de verificar a comparação entre estes indutores e verificar o meio de cultivo mais adequado na síntese de proteína. No sentido de melhorar a expressão, um terceiro conjunto de ensaios foi conduzido em biorreator de bancada, com o meio de cultivo e clone que apresentaram resultados mais satisfatórios no segundo conjunto de ensaios, nas mesmas condições de temperatura, pH e velocidade de agitação utilizados em incubador rotativo. Posteriormente, em um quarto conjunto de ensaios foi realizado a fim de avaliar a influência da velocidade de agitação no crescimento e na expressão da proteína 503, utilizando-se o clone que apresentou melhores resultados no terceiro conjunto de ensaios, o meio de cultivo mais adequado para expressão e o indutor que induziu uma maior expressão de proteína.

Para uma melhor compreensão, a presente tese foi dividida em capítulos.

No capítulo I apresenta-se uma introdução geral do tema em estudo.

O capítulo II apresenta a revisão da literatura da tese abordando vários conceitos importantes para o entendimento do tema em estudo. Portanto, neste capítulo são

apresentados os aspectos teóricos referentes ao processo de expressão de proteínas heterólogas, as vantagens e algumas limitações na utilização da *Escherichia coli* como hospedeiro, metabolismo da *Escherichia coli*, estabilidade do plasmídeo, considerações sobre meios de cultivo, influência da agitação e aeração, procedimento de indução por IPTG ou lactose e as estratégias de cultivos em incubador rotativo e biorreator. Descreve-se, neste capítulo, vários estudos realizados por diversos autores, as metodologias empregadas e os respectivos resultados obtidos.

No capítulo III, por sua vez, descrevem-se o procedimento experimental incluindo os materiais utilizados, os equipamentos e as condições experimentais empregados na realização deste trabalho.

No capítulo IV são apresentados os resultados e a discussão.

As conclusões obtidas são apresentadas no capítulo V.

Por fim, apresenta-se as referências bibliográficas citadas ao longo da presente tese e dados anexos como complementação dos assuntos abordados no corpo do texto.

---

## **Capítulo 2**

### **Revisão da Literatura**

---

## 2. Revisão da Literatura

Neste capítulo estão apresentados tópicos que abordam as etapas envolvidas no presente trabalho que têm como foco principal estudar a influência das condições de cultivo na produção de antígenos recombinantes (648 e 503) de *Leishmania i. chagasi* utilizando *Escherichia coli* M15 como hospedeiro em cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator. Os itens aqui contemplados estão relacionados ao tema da tese e servirão de base para explicar os fenômenos observados durante o processo de produção de antígenos recombinantes.

### 2.1 – Antígenos da *Leishmania visceral*

A *Leishmania visceral* (LV) é uma doença parasitária causada por protozoário, fatal na ausência de tratamento. Embora o tratamento com drogas exista para *Leishmania visceral*, alternativas para o controle dessa doença (controle do vetor, imunoterapêutica, quimioterapêutica e vacinas) são ainda necessárias. Estudos imunológicos de mecanismos de patogênese bem como estudos imunoterapêuticos da *Leishmaniose visceral* indicam mecanismos sítios específicos no tecido (para baço, fígado e nódulos linfáticos). Conseqüentemente, uma das mudanças no desenvolvimento de vacinas contra LV é a indução de proteção de sítios múltiplos e distintos nos tecidos (Costa *et al.*, 2011).

LeIF, um gene da espécie de *Leishmania* com homologia para proteína ribossomal eucariótica eIFF4A, (43 kDa), é um potente estimulador da produção de interferon gama (INF –  $\gamma$ ) pelos linfócitos dos nódulos linfáticos (Martins *et al.*, 2006). Uma vacina contendo coquetel de LeIF entre outros fatores de transcrição induz proteção em modelos humanos e modelos não humanos contra *Leishmaniose cutânea*.

O LACK (*Leishmania* análogo dos receptores ativados por proteína quinase C), (36kDa) é altamente conservado entre espécies de *Leishmania* e expresso por ambas formas do parasita promastigota e amastigota. Estudos indicam que o código do DNA para o antígeno promove proteção contra *Leishmania major*. Entretanto, a vacina LACK DNA, embora altamente imunogênica, falha na proteção contra LV em infecções intradermal e intravenosa, sugerindo que LACK não pode ser usado como antígeno para uma vacina baseada em DNA contra *Leishmaniose* (Selvapandiyan *et al.*, 2012). Por outro lado, é possível aperfeiçoar testes de diagnósticos podendo produzir uma mistura de antígenos para induzir ou detectar uma

resposta imune, uma vez que algumas pessoas quando expostas a antígenos podem ser assintomáticas (Martins *et al.*, 2006).

O antígeno 648 apresenta 97% de identidade entre os resíduos de aminoácidos 44 e 297 da sequência do gene A2. Com relação ao antígeno 503 (fator de alongamento 1- $\gamma$ ) observou-se um maior nível de expressão do RNAm na fase logarítmica. Os antígenos recombinantes 648 e 503 foram clonados em vetor de expressão pQE-30 e purificados. Posteriormente, as proteínas foram analisadas em gel SDS-PAGE apresentando o tamanho correto. Os antígenos 648 e 503 foram determinados o tamanho das proteínas com massa molecular de 24 e 56 kDa, respectivamente. Em seguida, as proteínas foram submetidas a ensaios imunológicos (Martins *et al.*, 2006).

## **2.2 – Engenharia genética e a Biotecnologia moderna**

A engenharia genética cresceu muito nos últimos anos, tendo como objetivo prático viabilizar a síntese de produtos complexos, que não são facilmente obtidos por processos convencionais. O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, iniciou-se na década de 1970, quando os bioquímicos Berg, Boyer e Cohen mostraram que os genes podiam ser transferidos de um organismo para outro. Diante da capacidade de transferência de genes foi verificado que a sequência de DNA heteróloga inserida podia recombinar-se com o DNA do micro-organismo hospedeiro, tendo sido criados os primeiros organismos geneticamente modificados, tornando-se, dessa maneira, uma ferramenta muito potente para obtenção de proteínas de interesse em diversas áreas (Alberts, 2005).

Neste contexto, o emprego de técnicas mais eficientes, como a do DNA recombinante, abre portas para um estudo detalhado da estrutura e função de proteínas, principalmente, a produção de proteínas recombinantes em sistema procarioto como hospedeiro (Larson *et al.*, 2007).

### **2.2.1 – Clonagem**

O fundamento central da metodologia do DNA recombinante é a clonagem gênica, a qual consiste no isolamento e propagação de moléculas de DNA idênticas. A clonagem gênica compreende pelo menos dois estágios importantes: primeiro, o fragmento do DNA de interesse chamado de inserto é ligado a uma molécula de DNA chamada de plasmídeo para

formar a molécula do DNA recombinante; a molécula do DNA recombinante é introduzida numa célula hospedeira compatível, num processo chamado transformação. A célula hospedeira que adquiriu a molécula do DNA recombinante é agora chamada de transformante ou célula transformada. A origem do termo clonagem vem da Genética Bacteriana que considera uma colônia de bactérias como um clone, pois todas as células são geneticamente idênticas a bactéria inicial (Linden, 2010).

A capacidade de clonar genes implica que um gene que codifica uma proteína importante de um animal ou planta pode agora ser retirado de seu hospedeiro normal, inserido em um vetor de clonagem e introduzido em uma bactéria. Se as manipulações forem executadas corretamente, o gene será expresso e a proteína será sintetizada pela célula bacteriana (Brown, 2003). Na Figura 1, ilustram-se as principais etapas envolvidas na obtenção de micro-organismos geneticamente modificados.

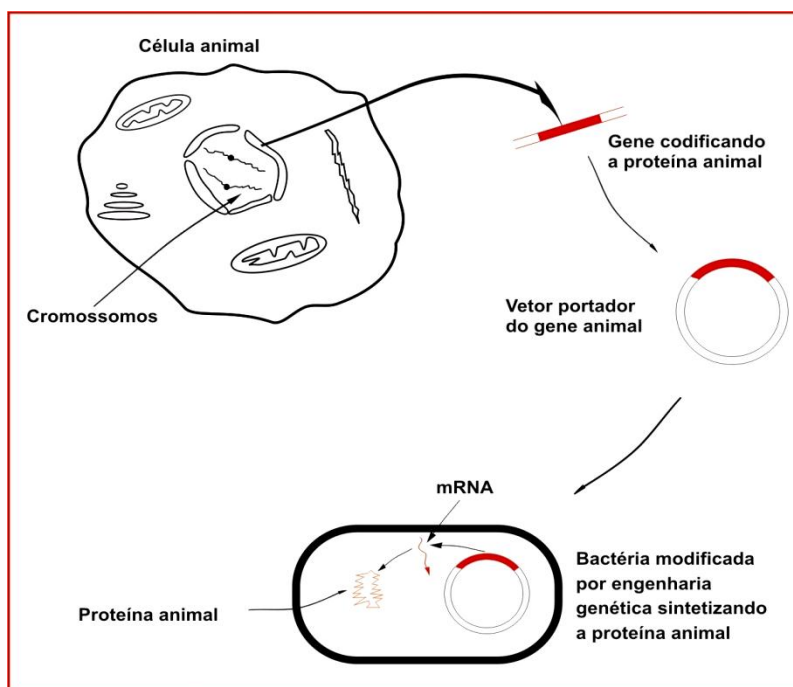


Figura 1 - Clonagem e expressão de genes exógenos em *E. coli* (Fonte: Brown, 2003).

### 2.3 – *Escherichia coli* como sistema de expressão de proteínas recombinantes

Até meados dos anos setenta, a *Escherichia coli* não tinha grande importância industrial. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, essa perspectiva mudou,

principalmente, porque grande parte desta tecnologia foi desenvolvida com estudos utilizando este micro-organismo (Lima, 2004).

A *Escherichia coli* é o micro-organismo mais bem estudado e explorado na atualidade, atua, principalmente, na produção de proteínas recombinantes. O profundo conhecimento da sua fisiologia e organização genética permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética (Jana & Deby, 2005; Manderson *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2011). Entretanto, apesar de todo o conhecimento acumulado sobre a *E. coli*, isto não irá garantir um sistema de expressão eficiente para todas as proteínas recombinantes. Foram observadas algumas limitações no sistema de expressão em que a *E. coli* é utilizada como hospedeiro, tais como:

- As proteínas são produzidas na forma insolúvel, biologicamente inativadas em corpos de inclusão, sendo que a atividade biológica dessa proteína pode ser reconstituída através de complexos processos adicionais que aumentam os custos e diminuem a produtividade;
- A incapacidade de realizar modificações pós-traducionais, comuns em eucariotos;
- Ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura (Tomazetto *et al.*, 2007).

Os cultivos são geralmente realizados em condições aeróbias porque o crescimento anaeróbio fornece menos energia para o metabolismo efetuar síntese proteica, estimulando a formação de acetato (Ahamed & Vermette, 2010). A fim de se garantir que o suprimento de oxigênio não se transforme como limitante, a estratégia descontínua-alimentada é usada extensivamente nos cultivos (Pei *et al.*, 2011).

A temperatura ótima de crescimento da *E. coli* (37 a 39°C) coincide com a temperatura ótima de indução do operon *lac*. O uso de temperaturas menores reduz as alterações metabólicas indesejáveis, como a síntese de proteases aumentando, dessa forma, o rendimento do produto de interesse, e ainda, contribuindo para aumentar a solubilidade da proteína, isto é, reduzindo a formação dos corpos de inclusão. A redução da temperatura melhora ainda a capacidade de excreção da proteína, contribuindo para a conformação adequada e redução da *lise* celular (Donovan *et al.*, 1996; Tomazetto *et al.*, 2007; Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

## **2.4 – Estabilidade do plasmídeo**

A produtividade de um biorreator contendo clones recombinantes é afetada pela taxa em que as células sem plasmídeos são geradas e propagadas. Este fenômeno foi observado na literatura e é responsável por dificuldades no escalonamento requerido para comercialização de produtos recombinantes (Lima, 2004). A perda de plasmídeo por distribuição defeituosa dos membros entre células filhas durante a divisão celular é chamada de instabilidade segregativa. Outra fonte de instabilidade é originada de mudanças estruturais como mutação pontual, deleção, inserção e arranjo do DNA do plasmídeo. Este tipo de instabilidade recebe o nome de instabilidade estrutural. As células resultantes, sem plasmídeo ou alteradas estruturalmente, são improdutivas e contribuem para uma menor produtividade do processo (Tomazetto *et al.*, 2007). No intuito de aumentar a estabilidade do plasmídeo, a estratégia adotada pode ser chamada de método seletivo. Estes métodos incluem a manutenção da pressão seletiva por incorporação de antibióticos no meio de cultura (Vidal *et al.*, 2005).

## **2.5 – Considerações sobre o meio de cultivo**

A composição do meio de cultivo deve ser cuidadosamente formulada e monitorada, porque pode ter efeitos expressivos tanto nas células quanto na produção da proteína (Jana & Deby, 2005). A composição de nutrientes e a definição de variáveis de cultivo tais como temperatura, pH e outros parâmetros podem afetar atividade proteolítica, secreção e os níveis de produção (Hoffmann *et al.*, 2004).

Para a obtenção de alta densidade celular é necessário o desenvolvimento de meios de cultivo que contenham todos os nutrientes necessários para suportar o crescimento celular (Makrides, 1996). Entre esses componentes nutricionais requeridos pela bactéria estão a fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, manganês, zinco e cobre (Hortsch & Weuster-Botz *et al.*, 2011). O meio definido, onde as concentrações dos nutrientes estão estabelecidas e controladas durante o processo, é geralmente utilizado para obtenção de alta concentração celular (Tomazetto *et al.*, 2007). Riesenber *et al.* (1990) estabeleceram a concentração máxima de alguns nutrientes presentes no meio de cultivo que a *E.coli* pode suportar. Esses nutrientes e concentrações são: glicose (50 g/L), amônia (3 g/L), ferro (1,15 g/L), magnésio (8,7 g/L), fósforo (10 g/L) e zinco (0,038 g/L). Além disso, durante a preparação do meio de cultivo ou mesmo durante o cultivo, deve-se evitar a formação de complexos insolúveis,

devido à concentração de vários ânions (fósforo, cloreto) e cátions (magnésio, amônia), o que pode interferir no processo de fermentação (Valdez-cruz *et al.*, 2010).

No entanto, os cultivos de alta densidade celular, apesar do alto nível de eficiência na produção de diferentes proteínas, apresentam vários problemas, como limitação na capacidade de transferência de oxigênio, o qual pode diminuir a velocidade específica de crescimento e estimular a formação de acetato, redução na eficiência da homogeneização do meio de cultivo e na dissipação de calor (Jana & Deby, 2005; Tomazetto *et al.*, 2007; Hortsch & Weuster-Botz *et al.*, 2011).

Modificações na composição do meio de cultivo também podem atuar de forma positiva na capacidade de produção de células, como é o caso da suplementação com aminoácidos durante a fase de crescimento, ou na fase de síntese de produtos heterólogos, desfavorecendo assim o estabelecimento de condições de estresse da célula, fenômeno conhecido “*metabolic burden*” (Hoffmann *et al.*, 2004).

Em meios de cultivo complexo, a quantidade de nutrientes (disponível sob a forma de aminoácidos e vitaminas, presente no extrato de levedura ou triptona) faz com que o micro-organismo consuma estes compostos para biosíntese e a fonte de carbono (glicose) para a obtenção de energia, utilizando as vias fermentativas como forma de regulação do fluxo de nutrientes presentes. Uma maior concentração de extrato de levedura pode acarretar uma maior concentração de subprodutos no meio de cultivo como, por exemplo, o ácido acético (Kilikian *et al.*, 2000; Valdez-cruz *et al.*, 2010).

## **2.6 – Influência da agitação e aeração**

O estudo da agitação e aeração em processos fermentativos também é essencial para o desenvolvimento das melhores condições de crescimento do micro-organismo considerado.

Para micro-organismos facultativos, o oxigênio tem crucial importância em todo o metabolismo porque ele participa da geração de energia através da cadeia respiratória dentro da mitocôndria, que é fundamental para uma obtenção de uma velocidade específica de crescimento acentuada (Ahamed & Vermette, 2010).

De acordo com os estudos realizados por Mulinari (2004), constatou-se um baixo rendimento da produção do Jaburetox-2Ec obtido através do cultivo realizado em incubador rotativo. A fim de dar continuidade ao estudo e determinar a expressão desse peptídeo recombinante em biorreatores, Tomazetto *et al.* (2007) estudaram a produção da proteína recombinante jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL21 e as variáveis analisadas destacam-se:

a transferência de oxigênio, controle do pH e utilização da lactose como indutor em substituição do IPTG com o objetivo de otimizar a proteína de interesse utilizando a *Escherichia coli* BL21 como hospedeiro. Os autores observaram que as variáveis estudadas influenciaram de maneira positiva na expressão da proteína recombinante Jaburetox-2Ec. Além disso, analisou-se o impacto da utilização de lactose como indutor em substituição ao IPTG e o instante de indução era a fase exponencial de crescimento microbiano ( $DO_{590nm}$  entre 0,4 - 0,5). A influência da aeração na indução e da estabilidade do plasmídeo foi um parâmetro estudado dos quais duas velocidades de agitação e as taxas de fluxo de ar foram testados: 400 rpm e 2 vvm; 500 rpm e 5 vvm. Sob a maior condição de oxigenação (500 rpm, 5 vvm), a expressão da recombinante peptídeo atingiram valores 1µg/mg de proteína total, representando uma diminuição de sete vezes quando comparado a agitação de 400 rpm e 2 vvm (5,9 µg/mg de proteína total). Com base nesses estudos, conclui-se que a diminuição na taxa de oxigênio dissolvido teve um efeito positivo na produção de proteína. Em todas as bateladas, após atingir a máxima expressão do peptídeo, essa concentração diminui provavelmente devido à ação das proteases causando a degradação do peptídeo recombinante.

Bajaj & Singhal (2010) estudaram os efeitos da aeração e agitação na produção e peso molecular do ácido  $\gamma$ -glutâmico poli (PGA) em batelada por micro-organismo *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. A alta taxa de aeração e velocidade de agitação aumentaram o crescimento de *B. licheniformis* NCIM 2324, mas, nem sempre levam à produção elevada de PGA. Além disso, a produção de PGA diminuiu a taxas muito elevadas de aeração e velocidades de agitação. A máxima concentração de PGA foi  $40.5 \pm 0.91$  g/L obtida a 750 rpm e 1 vvm.

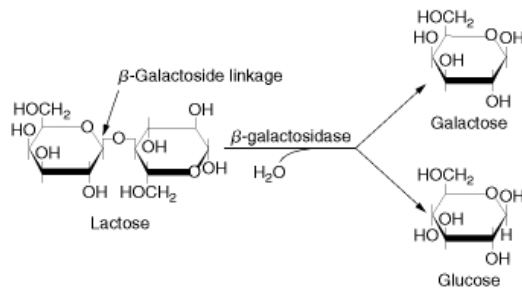
## **2.7 – Expressão gênica em procariontes**

A descoberta de promotores e repressores específicos do genoma de *E.coli*, permitiu a manipulação da expressão das proteínas e a clonagem de genes sob controle de um dado promotor, cuja expressão pode ser indutível ou contínua. O primeiro é mais comumente usado, sistema de expressão de proteínas heterólogas em *E.coli* é baseado no operon lac (Ettinger *et al.*, 2009).

Considerando a necessidade que as bactérias possuem em apresentar uma rápida resposta ao meio ambiente é natural que genes que atuam sobre um mesmo composto sejam

co-traduzidos. No caso do operon *lac* o controle de transcrição é feita pela seqüência operadora *o*, que está adjacente ao sítio de início de transcrição e ao sítio ao qual a RNA polimerase se liga, ou seja, a região promotora *p*. A seqüência operadora está sob regulação do produto gênico do gene *i*, que reprime o operador. O repressor *i* pode ser desativado na presença de lactose, através de uma ligação da lactose com a proteína repressora *i*. Assim, ao final, na presença de lactose o operon estará ativo e os três genes serão traduzidos, na ausência de lactose, o repressor *i* se ligará ao operador e impedirá a transcrição do operon.

Mutações na seqüência operadora também podem acarretar na expressão constitutiva do operon, pois essa seqüência deixaria de responder ao repressor *i*. Assim, o operon *lac* é um grupo de genes estruturais que especificam enzimas do metabolismo de lactose. Estes genes são controlados por seqüências promotoras e operadoras (Tian *et al.*, 2011). A atividade dessas regiões, por sua vez, é determinada por uma proteína repressora codificada por um gene fora do operon. A proteína repressora é inibida na presença de lactose no meio. É comum encontrar em procariotos genes agrupados por terem função na mesma via metabólica, agrupados, inclusive, na mesma seqüência que eles atuam (Pei *et al.*, 2011).



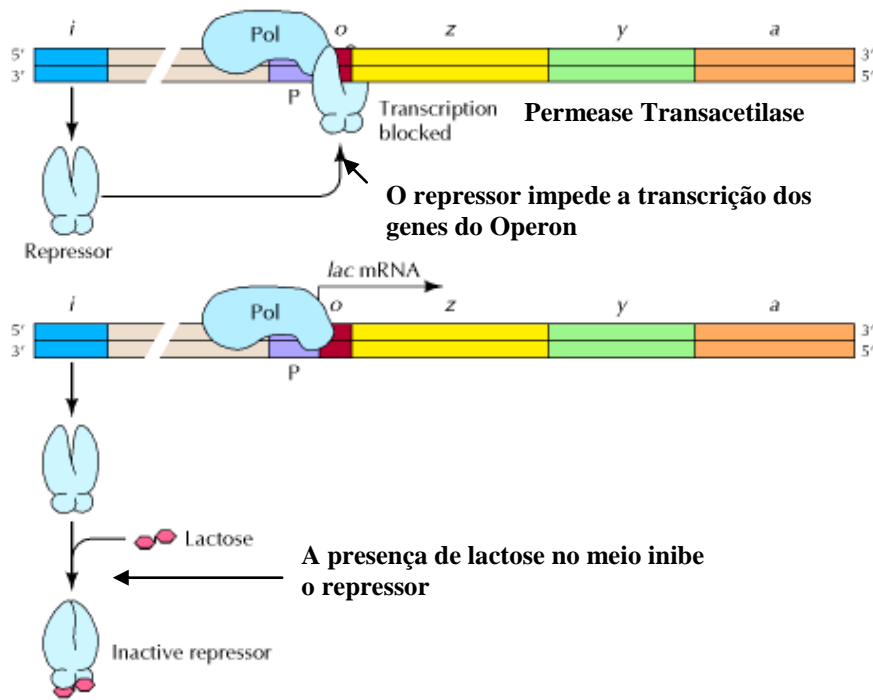


Figura 2. Esquema ilustrando o funcionamento do Operon *lac*.

## 2.8 – Estratégias de cultivos em incubador rotativo e biorreator

Dentre as formas tradicionais de se conduzir um processo bioquímico (descontínua, descontínua alimentada e contínua), a descontínua alimentada é a mais utilizada e difundida na literatura na obtenção de altas concentrações celulares com altas produtividades em reator. Este tipo de processo oferece vantagens em relação ao processo descontínuo simples, principalmente, quando envolve fenômenos inibitórios estão na medida em que é possível controlar o fornecimento de substrato e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento (Hiss, 2001). O processo contínuo apresenta em relação ao descontínuo alimentado a desvantagem de não permitir a obtenção de concentrações celulares tão elevadas devido à constante retirada de meio do reator, sendo interessante sua utilização nos casos em que as operações subseqüentes (purificação) também podem ser conduzidas de forma contínua. Além disto, o risco de perda de informação genética contida em plasmídeos aumenta com o tempo de cultivo.

Diferentes estratégias de cultivo têm sido investigadas para processos de produção de proteínas recombinantes, como, adição de meios complexos, rico em extrato de leveduras, peptona ou triptona, isoladamente ou em mistura, e a adição de inibidores de proteases (Valdez-cruz *et al.*, 2010).

Para um processo industrial recombinante é preciso à obtenção de altas densidades celulares. Usualmente, utilizam-se estratégias de alimentação de nutrientes para alcançar elevadas concentrações celulares em fermentações (Rienzenberg *et al.*, 1990; Pinsach *et al.*, 2008; Voulgaris *et al.*, 2011). A estratégia mais utilizada para alcançar altas densidades celulares é a descontínua - alimentada (Gombert & Kilikian, 1997; Sharma *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2010; Alfasi *et al.*, 2011). Durante a fase de alimentação, um ou mais nutrientes são continuamente adicionados ao fermentador em quantidades limitantes para controlar as condições de cultivo, tais como acúmulo de componentes tóxicos, metabolismo celular e disponibilidade de oxigênio (Lima, 2004). A limitação no crescimento em fermentações descontínuo-alimentada pode ser resultado de diversos fatores, entre eles: a construção do plasmídeo, a cepa hospedeira utilizada, o meio de cultivo e a proteína recombinante. Porém, o principal fator limitante é creditado ao acúmulo de produtos metabólicos da fermentação que produzem efeitos inibitórios, especialmente, o ácido acético (Luli & Strohl, 1990; Wong *et al.*, 2008; Casey *et al.*, 2010).

Em cultivos de *Escherichia coli*, o máximo rendimento volumétrico de um produto heterólogo não é função exclusiva da concentração celular, dependendo também do rendimento celular específico do produto. Por este motivo, dois fatores devem ser considerados no desenvolvimento de um processo que objetiva maximizar o rendimento volumétrico de um produto heterólogo: estratégias de obtenção de elevada concentração celular e estudo da influência das condições de cultivo no rendimento celular específico do produto (Riesenberg *et al.*, 1990). A velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) nos instantes prévios a indução da síntese de produto recombinante é uma variável bastante estudada, na medida em que reflete de certa forma o estado fisiológico das células dentro do reator.

Tendo em vista o metabolismo aeróbio facultativo da *Escherichia coli* em cultivos em biorreatores é importante:

- Manter a concentração baixa de glicose (próxima da nulidade);
- Oxigênio dissolvido acima de 20%;
- Controle da velocidade específica de crescimento (Tomazetto *et al.*, 2007).

Os parâmetros citados acima são considerados formas de controle do processo que objetivam a obtenção de altas concentrações celulares de *Escherichia coli* e da formação da proteína recombinante, procurando-se desta maneira evitar o acúmulo de subprodutos inibitórios do meio de cultura, sendo o principal deles o ácido acético (Luli & Strohl, 1990; Gombert & Kilikian, 1997; Wang *et al.*, 2010).

Costa (1993) realizou estudos acerca da cinética de crescimento da bactéria *E.coli* em processo descontínuo propondo um meio de cultura com glicose como fonte de carbono e uma rotina analítica para o tratamento das amostras. Além disto, realizou estudos prévios de indução da síntese de troponina C (TnC) utilizando IPTG ou lactose como molécula indutora. Harrison *et al.*, (1997) estudaram diferentes estratégias de cultivo que têm sido investigadas para produção ideal de proteína recombinante como, a adição de meios complexos (rico em extrato de leveduras e triptona), isoladamente ou em mistura. Conforme Lim & Jung (1998) outros fatores que também podem ser controlados para melhorar a produtividade do produto de interesse são a temperatura de indução, duração da indução e a taxa de crescimento específico antes ou depois da indução. Diferentes processos de cultivo tais como descontínuo e descontínuo alimentado têm sido utilizados para investigar a relação entre taxa de crescimento específico e produção de proteína. Processos de cultivo como descontínuo alimentado pode permitir um controle mais adequado da fase de crescimento, atingindo alta densidades celulares e um aumento de 23 vezes na final concentração da proteína de interesse interferon- $\alpha$ .

Liria (1995) a partir de trabalhos prévios iniciou o desenvolvimento do processo descontínuo alimentado com o objetivo de obter maior concentração celular em relação ao processo descontínuo, estudando ainda a influência de variáveis de cultivo na etapa de indução por IPTG concomitantemente analisando a estabilidade do plasmídeo.

Gombert (1996) estudou as condições adequadas de cultivo que favorecessem a expressão de TnC utilizando-se a lactose como molécula indutora e obtenção de alta concentração celular. Os cultivos foram realizados em reator de volume inicial de 1,5 a 4 L, sendo dividido em três etapas: descontínua com 5 g/L de glicose, descontínua alimentada com vazão exponencial e/ ou linear, pré-calculada por equação derivada de balanço de massa e indução com pulsos de lactose. Dando continuidade a linha de pesquisa, Castillo (1997) iniciou o estudo da obtenção de alta densidade celular e da indução por IPTG com o objetivo de obter alta concentração celular, estudar a indução da síntese de troponina C por lactose, representando uma alternativa para o IPTG, indutor de custo muito elevado e tóxico.

Hoffman *et al.* (1995) investigaram o método para produção de proteína recombinante em escala piloto utilizando a glicose como fonte de carbono em processo *fed-batch* em que a glicose, seguida da adição da lactose, foi adicionada como molécula indutora durante a fase de indução. A cepa utilizada no decorrer das fermentações foi a *Escherichia coli* BL21 (DE3), durante a fase de indução, a fase exponencial tornou-se favorável a produção da proteína heteróloga ferredoxina (2Fe<sub>2</sub>S). Dentre os processos de cultivo, o descontínuo alimentado

apresentou-se mais eficiente uma vez que a produtividade do produto recombinante adquiriu valor 12 vezes maior em relação aos processos de cultivo descontínuo. O processo descontínuo alimentado caracterizou-se pela adição de glicose, previamente monitorada na concentração de 0,5 g/L a fim de evitar a formação de sub-produtos da fermentação, tais como o ácido acético, considerado principal metabólito inibidor do crescimento e expressão do produto recombinante. O procedimento da fermentação foi realizado utilizando-se o Biorreator (New Brunswick Scientific) com capacidade de 60 L. O pH mantido em  $7 \pm 0,1$  pela adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A concentração de oxigênio dissolvido foi mantido em 20% acima da saturação, agitação (55 a 470 rpm), a vazão de ar por (40 a 70 L/min), a pressão (0-10 psi) e o nível de espuma controlado por antiespumante.

Liria (1995) cultivou *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS contendo o plasmídeo pET codificado para a produção da proteína recombinante troponina C (TnC) em processos descontínuos e descontínuos alimentados em reator de 4L de volume útil. Para a condição de concentração de glicose total igual a 40 g/L, o processo descontínuo alimentado mostrou-se ligeiramente superior ao descontínuo, obtendo valores superiores de concentração celular ( $X$ ) e fator de conversão substrato a células ( $Y_{x/s}$ ) em 5 e 9%, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos por Liria (1995) a concentração de proteína troponina C em processos descontínuo foi de 811 mg/L correspondendo a uma produção específica de 105 mg/L e produtividade em produto de 406 mg/L.h. Para os processos descontínuo alimentado a concentração de proteína foi de 1408 mg/L ( $\mu_x = 0,4 \text{ h}^{-1}$ ,  $p/x = 158 \text{ mg/L}$  e  $P_p = 704 \text{ mg/L.h}$ ) e de 966 mg/L ( $\mu_x = 0,35 \text{ h}^{-1}$ ,  $p/x = 78 \text{ mg/L}$  e  $P_p = 483 \text{ mg/L.h}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  e 700 rpm com pH monitorado em 7,0. O cultivo do micro-organismo sob valor controlado de velocidade específica ( $\mu_x$ ) em processo descontínuo- alimentado é interessante para a indução (Hellmuth *et al*, 1994). A indução de *E.coli* para a produção de algumas proteínas é mais eficiente sob  $\mu_x$  controlado em valores inferiores a máxima (Riensenberg, 1990). O ácido acético, produto da fermentação anaeróbia, é produzido também durante o processo indutivo (Mc Donald, 1990) e sua presença inibe a expressão de produtos recombinantes.

Gombert (1996) estudou a expressão da proteína heteróloga (TnC) através da indução por lactose, os mesmos indicam que o prologamento da etapa descontínua alimentada nestes cultivos levaria ao acúmulo de ácido acético acima do valor crítico. Além disto, o estado fisiológico das células não pôde ser bem caracterizado através de  $\mu$  constante, já que houve flutuações no valor desta variável ao longo da etapa descontínua alimentada e queda no valor do mesmo ao final desta etapa, o que ocorre, provavelmente, devido a diminuição gradativa verificada para  $Y_{x/s}$  com o aumento da concentração celular ( $X$ ). Uma etapa descontínua

inicial com 4 pulsos de 4 g/L de glicose seguida de uma curta etapa descontínua alimentada com  $\mu_x$  pré-fixado em  $0,1 \text{ h}^{-1}$  através de equação de alimentação de meio, que teve com o objetivo forçar as células a consumirem o ácido acético que se acumularia até então. Após esta etapa, que teve cerca de 50 minutos de duração, seguiu-se uma etapa descontínua alimentada com  $\mu_x = 0,4 \text{ h}^{-1}$ , conforme os ensaios anteriores.

Gombert & Kilikian (1997) estudaram diferentes estratégias de cultivo para obtenção de alta concentração celular e produção específica da proteína troponina C (TnC), através de cultivo da *Escherichia coli* BL21. As condições de cultivo foram: temperatura mantida em  $37^\circ\text{C}$ , pH monitorado por um eletrodo e controlado em  $7 \pm 0,2$ , velocidade de agitação de 700 rpm e concentração de oxigênio dissolvido mantido acima de 30% da saturação. As estratégias de cultivo estudadas foram descontínua e descontínua alimentada. Na descontínua alimentada, o meio de alimentação foi transferido ao reator através de uma bomba controlada pelo *Software* AFS. Nos casos em que era desejado promover uma vazão exponencial de alimentação foi desenvolvida uma equação derivada do balanço de massa de glicose no reator, supondo-se que este nutriente seja limitante para o crescimento celular. Os resultados mostraram que a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração de glicose e a velocidade específica de crescimento são considerados parâmetros importantes para a otimização do processo (Gombert & Kilikian, 1997).

Donovan *et al.* (1996) realizaram uma revisão sobre os fatores que influenciam a expressão de proteínas heterólogas em *E.coli* sob controle dos promotores tipo *lac* e *tac*, em cultivos descontínuos e descontínuos alimentados em biorreator, discutindo condições para maximizar a produção dessas proteínas. Especificamente, foram discutidas a influência da concentração do IPTG, temperatura e composição do meio. Concluíram que a concentração do indutor influencia na localização do acúmulo de proteínas (extra ou intracelular), observando eficácia semelhante da lactose e do IPTG para a indução da produção da proteína recombinante, contudo, a lactose deve ser fornecida em condições apropriadas, por servir de substrato para o micro-organismo. Sistemas que excretam a proteína no espaço periplasmático parecem beneficiar-se de temperatura ótimas de crescimento ( $20\text{-}30^\circ\text{C}$ ) durante a fase de indução, podendo haver uma melhora na expressão de proteína solúvel com uma indução em temperaturas mais baixas, bem como uma redução na degradação proteolítica.

Gombert & Kilikian (1998) investigaram o efeito de estratégias de indução durante cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) *plysS* para a produção da proteína troponina C (TnC) utilizando a lactose como a molécula indutora. Duas variáveis devem ser consideradas como as mais importantes no desenvolvimento das estratégias adequadas de indução: a quantidade

específica de lactose adicionada e a maneira na qual esse indutor é transferido para o reator na forma de pulsos, e o intervalo entre dois pulsos consecutivos. Levando-se em consideração os resultados apresentados, parece que a concentração residual de lactose e a adição do extrato de levedura junto com o segundo e terceiro pulsos de lactose exercem um efeito positivo na expressão de proteína recombinante. Além disso, descrevem uma concentração de lactose como indutor da expressão de troponina C (TnC) entre 20-55 g/L. Os ensaios foram conduzidos em três fases: primeira fase descontínua, segunda fase descontínua alimentada e terceira fase de indução, caracterizada por três pulsos de lactose, adicionando extrato de levedura no segundo e terceiro pulsos de lactose. A introdução de uma fonte rica em nutrientes (extrato de levedura) foi considerada uma tentativa bastante eficaz na produção da Troponina C (TnC). Portanto, os resultados apresentados nesse estudo comprovam que a lactose pode ser usada como indutor, com a vantagem em relação ao IPTG de ser de baixo custo, menos tóxica e dispensar uma fonte de carbono e energia. Esses autores também verificaram em seus experimentos que a inibição do crescimento começava quando a concentração de ácido acético no meio atingia valores acima de 0,9 g/L.

Panda *et al.* (1999) estudaram processos descontínuos e descontínuos-alimentados objetivando maximizar a produtividade do hormônio de crescimento ovino (r-oGH) em *Escherichia coli* M15, sob indução de IPTG, tendo obtido a formação de corpos de inclusão. Com este processo alcançou-se, em 16 horas de cultivo descontínuo-alimentado, 3,2 g/L de r-oGH com uma densidade celular de 124 g/L (produtividade de 0,2 g/L.h). A alimentação de nutrientes (glicose e extrato de levedura) durante a fase descontínuo-alimentada mostrou que o componente extrato de levedura colaborou para manter alto o rendimento específico de proteínas na célula, e, por conseguinte, um alto rendimento da molécula alvo. O instante de indução foi considerado um parâmetro muito discutido na literatura por exercer forte influência nos níveis específicos de proteínas de interesse. A fase exponencial foi considerada o instante de indução adequado por obter uma elevada concentração celular e produtividade do hormônio de crescimento ovino (r-OGH). Independente do instante de indução, a expressão do hormônio de crescimento ovino durante o processo descontínuo caracterizou-se pela queda da velocidade máxima específica de crescimento ( $\mu_x$ ) e durante o processo descontínuo-alimentado caracterizou-se pela adição do extrato de levedura. A adição desse nutriente de composição complexa colaborou para manter alto o rendimento específico de proteína pela célula.

Kilikiam *et al.* (2000) testaram o IPTG e a lactose como indutor para expressão da proteína troponina C e observaram que o rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ) foi três vezes maior

quando se utiliza lactose como indutor ao invés do IPTG, significando o efeito tóxico do IPTG no metabolismo celular, ou seja, a carga metabólica é mais pronunciada quando se utiliza o IPTG do que lactose. A carga metabólica é maior quando se têm altos valores de velocidades específicas de produção, que foi observado quando se utiliza o IPTG.

Kweon *et al.* (2001) estudaram a produção da proteína PIP (*Phytolacca insularis*) usando a *Escherichia coli* TG1 como vetor em processos descontínuos e descontínuo-alimentado com o objetivo de alcançar elevadas concentrações celulares e rendimento específico do produto de interesse. Realizou-se estratégias eficientes de indução e métodos que minimizem a formação do ácido acético. Diferentes composições de meio foram avaliadas a fim de determinar qual a composição ótima que favorece elevada concentração celular e níveis de expressão da proteína PIP. Pode-se observar que a adição de extrato de levedura teve efeito positivo na produção da PIP. Inicialmente misturou-se quantidades de lactose e IPTG na concentração final de 1 mM. Porém, quando 1mM de lactose foi utilizado sozinho o rendimento da proteína heteróloga foi de 55%. Os autores concluíram que as condições do processo otimizadas resultou em elevada concentração da PIP (466,5 g/L) correspondendo 17 vezes maior quando comparado com o cultivo descontínuo. Além disso, a suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura e a substituição do IPTG pela lactose foram parâmetros importantes para aumentar o rendimento da proteína de interesse.

Kotik *et al.* (2004) estudaram a expressão da proteína recombinante piranose oxidase (P<sub>2</sub>O) utilizando a *Escherichia coli* BL21(DE3) como vetor em cultivos realizados em incubador rotativo. Um planejamento experimental permitiu otimizar a composição do meio de cultivo a fim de aumentar o nível de expressão. O baixo custo e toxicidade da lactose tornam-se atrativo o uso desse indutor para o cultivo em biorreatores, além disso, foi utilizada como fonte de carbono e molécula indutora. O sistema de expressão foi estudado detalhadamente em cultivos em descontínuo e descontínuo-alimentado com o objetivo de aumentar o nível de expressão da proteína de interesse utilizando uma estratégia de baixo custo e eficiente produção P<sub>2</sub>O em *E. coli*. Durante a fase descontínuo-alimentada em cultivos de alta densidade celular a lactose foi adicionada intermitentemente resultando no aumento da concentração de biomassa e produtividade volumétrica em relação aos cultivos em batelada. O monitoramento da velocidade específica de crescimento em baixos níveis também foi considerado como parâmetro importante na otimização da piranose oxidase (P<sub>2</sub>O).

Lima (2004) propôs o uso do cultivo de *E. coli* recombinante em biorreatores com o objetivo de estudar e desenvolver um processo robusto para obtenção de elevadas densidades celulares, identificando importantes parâmetros cinéticos para as fases de crescimento celular

e indução da proteína recombinante, a pró-insulina humana (r-IH). Foram estudadas diversas estratégias de cultivo para obtenção de elevada densidade celular, no intuito de desenvolver uma tecnologia de fermentação robusta que permitisse: elevados níveis de biomassa em peso seco de células por litro, determinar a melhor estratégia de fermentação para atingir elevadas concentrações celulares, entre as quais, descontínuo-alimentado com corte, descontínuo-alimentado cíclico em dois estágios fermentações com reciclo e microfiltração. As fermentações foram realizadas em bioreatores de bancada de capacidade útil de 4 L e 12 L (NBS E INCELTECH). Foram medidas as concentrações de biomassa, glicose, acetato e proteína recombinante. Os estudos cinéticos das diferentes estratégias mostraram incrementos em biomassa e em proteína de fusão, sendo que o melhor resultado foi obtido para fermentações com reciclo total de células, microfiltração do meio e alimentação exponencial de nutrientes, as quais obtiveram produtividade celular igual a  $P_R = 6,437 \text{ g/L/h}$ . A concentração final em peso seco de células foi 173,8 g/L, com porcentagem de expressão da proteína de fusão em 17,8%. Os incrementos obtidos em biomassa e em proteína de fusão, em relação à batelada-alimentada tradicional, foram respectivamente 341% e 328%. A técnica mostrou-se adequada para remoção de inibidores no meio de cultura permitindo maior produtividade e, conseqüentemente, maior crescimento celular, sendo até 3,5 vezes superiores aos cultivos em descontínuo-alimentado tradicional.

Vidal *et al.* (2005) estudaram o efeito da adição do IPTG em diferentes concentrações e modos de operação (descontínuo e descontínuo-alimentado) a fim de otimizar a produção da proteína recombinante ramnulose 1- fosfato aldolase (RhuA) utilizando *Escherichia coli* M15 como vetor. Processo descontínuo-alimentado a uma vazão de alimentação exponencial e uma velocidade específica de crescimento ( $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ) foi a estratégia utilizada para obter elevadas concentrações celulares e rendimento do produto recombinante.

Jana & Deby (2005) observaram que a máxima produção da proteína DNA polimerase em *E. coli* pode ser obtida através de processos descontínuo, descontínuo-alimentado e contínuo. A estratégia utilizada a fim de otimizar a produção da proteína foi: a composição do meio de crescimento. A temperatura da fermentação, pH e outros parâmetros podem afetar a atividade proteolítica, secreção e os níveis de produção. Manipulações específicas do meio de cultura têm sido realizadas para aumentar a liberação de proteínas no meio. Assim, suplemento com glicina do meio de cultivo aumenta a liberação de proteínas para o periplasma, sem causar *lise* celular significativa. Sistemas de cultivos de células de alta densidade sofrem de vários inconvenientes, incluindo a disponibilidade limitada de oxigênio dissolvido em alta densidade celular, os níveis de carbono podem diminuir as taxas de

crescimento e estimular a formação de acetato, redução da eficiência de mistura do fermentador e geração de calor (Jana & Deby, 2005).

Gonçalves *et al.* (2008) avaliaram a produção de rPspA1 em meio definido utilizando o processo descontínuo alimentado com vazão exponencial a diferentes velocidades específicas de crescimento celular e investigaram a viabilidade de diminuir a concentração do indutor IPTG, que é caro e tóxico, empregando a lactose. A alimentação exponencial de meio levam à obtenção de alta densidade celular nos três ensaios em batelada alimentada realizados. A vazão que impôs a menor velocidade específica de crescimento ( $0,12 \text{ h}^{-1}$ ) possibilitou um melhor controle da concentração de  $\text{O}_2$  dissolvido no meio e levou à obtenção da maior concentração celular (56 g massa seca/L) e da menor produção de acetato (0,49 g/L) antes da indução. As maiores produção (2,0 g/L) e produtividade (74 mg/L/h) da proteína rPspA1 são obtidas quando a alimentação com glicose prossegue durante a indução feita com 0,5 mM de IPTG e 20 g/L de lactose.

Balderas- Hernandez *et al.* (2008) estudaram a otimização da produção da proteína interferon- $\alpha$  em *E.coli* utilizando a análise de superfície de resposta. As variáveis estudadas foram temperatura, concentração de biomassa e a concentração de NaCl como indutor. As condições ótimas de expressão foram à temperatura de  $32,6^\circ\text{C}$ , a concentração de biomassa de 0,31 g/L e 0,3 M de NaCl em meio mínimo. A máxima concentração da biomassa foi obtida em 7 horas de cultivo no valor de 2,96 g/L e a máxima concentração da proteína foi obtida em 12 horas de cultivo. O meio de cultivo mínimo mostrou-se mais adequado a produção da proteína. Além disso, concluiu-se que o meio suplementado com extrato de levedura afetou negativamente na síntese proteica. Observou-se que a concentração da proteína é afetada pelas condições de cultivo. A concentração da proteína sob condições otimizadas foi 13 vezes maior que sob condições não otimizadas.

Conforme discutido por Wang *et al.* (2010) as temperaturas ótimas para o crescimento celular podem ser prejudiciais para expressão da proteína uma vez que uma maior taxa de crescimento levaria a uma maior probabilidade de perda de plasmídeos. Temperaturas mais baixas e, correspondentemente, menores taxas de crescimento são normalmente associados com maior produção de proteínas solúveis, dependendo das características da proteína heteróloga.

Larentis *et al.* (2011) avaliaram a influência das condições de indução no nível de expressão da proteína recombinante PsaA (rPsaA) (*Pneumococcal surface adhesin A*) em *Escherichia coli*. Os ensaios foram conduzidos em incubador rotativo utilizando o planejamento experimental a fim de verificar a influência de três variáveis: concentração de

IPTG (0,1 e 1 mM), temperatura (20 e 37°C) e tempo de indução (4 e 22 h). Observou-se o aumento da expressão da proteína nas seguintes condições de indução: concentração de 1mM de IPTG, a temperatura ótima de expressão 20°C e o tempo de indução ideal de indução de 4 horas.

Pei *et al.* (2011) estudaram a produção do 2-deoxiribose-5-fosfato aldolases (DERA) em *Escherichia coli* BL21 utilizando a lactose como molécula indutora. Uma estratégia de alimentação exponencial foi implantada, controlando-se a taxa de crescimento específico em 0,15 h<sup>-1</sup>. Os resultados indicaram que a concentração de lactose na alimentação afeta diretamente a expressão da proteína de interesse. Observou-se que o processo descontínuo-alimentado conseguiu manter a concentração do inibidor ácido acético inferior a 0,5 g/L, não exercendo o seu efeito inibitório.

## 2.9 – Formação do ácido acético em *Escherichia coli*

A excreção e acúmulo de ácidos orgânicos é um problema no cultivo de muitas linhagens bacterianas. Dentre uma variedade de metabólitos, o ácido acético tem provado ser o principal componente responsável pela redução do desempenho do processo. Ele inibe o crescimento celular e a síntese de proteína quando se acumula acima de certa concentração (Luli & Strohl, 1990). Conforme estudos realizados por Xue *et al.* (2010) concentrações de ácido acético de 0,9 a 1,5 g/L são inibitórias para o crescimento celular e para expressão de proteínas recombinantes. Entretanto, estes valores devem ser tomados apenas como indicativos, pois o nível de produção de ácido acético e a concentração inibitória que inibem parcial ou completamente o crescimento dependem da cepa de *E. coli* utilizada.

O acetato é o principal produto das vias fermentativas de *E. coli*, mas é um inibidor do crescimento e da síntese de proteína heteróloga. Alguns autores citam que a formação de acetato é mais acentuada em meios de cultivo complexo do que em definido. Uma maior concentração de extrato de levedura pode acarretar numa maior concentração de subprodutos no meio de cultivo, como por exemplo, o ácido acético (Rossi, 2001; Casey *et al.*, 2010).

Conforme Suárez & Kilikian (2000) destacaram a concentração de glicose, oxigênio dissolvido e a velocidade específica de crescimento como fatores-chaves para a formação de ácido acético que podem ser controlados empregando processos batelada alimentada, que são utilizados para atingir alta concentração celulares, controlando a velocidade específica de crescimento, evitando a redução do oxigênio dissolvido e a formação de produtos fermentativos. A formação de acetato bem como sua atividade inibidora tem sido evitada com

sucesso pelo controle da concentração da fonte de carbono no caldo fermentativo a níveis limitantes utilizando estratégias, tais como: a alimentação exponencial de nutrientes, controle da concentração do oxigênio dissolvido, monitoramento da concentração da fonte de carbono. Sob limitação da fonte de carbono não apenas a formação de acetato é suprimida como as células também assimilam o ácido acético e o convertem em massa celular, resultando em baixas concentrações (Gombert & Kilikian, 1997; Wang *et al.*, 2010). O acetato é produzido quando o fluxo de carbono pelo caminho metabólico principal excede a demanda biossintética e a capacidade de geração de energia da célula. Concentrações de acetato acima de 0,5 g/L reduzem a taxa de crescimento, o rendimento em biomassa e a máxima concentração atingível em cultivos de altas densidades celulares. Além disso, o acetato tem efeito deletério maior em culturas recombinantes que em culturas não recombinantes e a produção de proteínas recombinantes é significativamente reduzida pelo seu acúmulo (Hoffmann *et al.*, 2004; Jana & Deby, 2005; Eiteman & Alteman, 2006; Tian *et al.*, 2011).

Existe uma relação inversa entre a concentração de oxigênio no meio de cultivo e a formação de acetato. Esse acúmulo de acetato reduz o gradiente eletroquímico em torno da membrana da bactéria, necessário para síntese de ATP. Assim, concluíram que a deficiência de oxigênio é um fator importante na excreção de ácido acético, pois o mesmo forçará a glicose a ir para o caminho fermentativo e o ácido acético é formado quando o fluxo de carbono excede a capacidade do caminho fermentativo. Consequentemente, contribuindo para inibição do crescimento celular e produção da proteína recombinante (Gombert & Kilikian, 1998; Zhang *et al.*, 2010).

Segundo Tian *et al.* (2011) existe a possibilidade de se utilizar uma resina de troca iônica para remover o ácido acético dos cultivos em *Escherichia coli* com o objetivo de aumentar a produção da proteína Interferon alpha-2b. Desta forma, muitas técnicas de engenharia têm sido aplicativos para diminuir a excreção e acúmulo de ácido acético, incluindo diálises, método que remove fisicamente o ácido acético do meio de cultivo. Destaca-se que esse método não é apropriado para aplicação industrial devido ao elevado custo e dificuldades práticas em realizar esse processo. Outra técnica é estabilizar o oxigênio dissolvido pelo controle do suprimento de oxigênio.

---

## **Capítulo 3**

### **Material e Métodos**

---

### 3. Material e métodos

Neste capítulo são apresentadas as metodologias utilizadas para a realização dos ensaios experimentais propostos neste trabalho. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para alcançar o objetivo central, estudar a influência das condições de cultivo na produção de antígenos (648 e 503) de *Leishmania i. chagasi* em cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator, foi necessário realizar ensaios inicialmente em incubador rotativo nas condições de cultivo encontradas na literatura. Após a definição do melhor meio para o crescimento dos clones e a partir do clone que apresentou melhor comportamento cinético, realizou-se o procedimento de indução por IPTG ou lactose, a fim de comparar a ação desses indutores e determinar o meio mais adequado na expressão de antígenos recombinantes (648 e 503). Posteriormente, os estudos foram realizados em biorreator de bancada, em condições similares a obtidas em incubador rotativo. Em seguida, definiu-se o indutor e meio mais adequado para síntese da proteína de interesse. Finalmente, realizou-se um estudo da influência da velocidade de agitação em biorreator de bancada nas melhores condições estudadas preliminarmente, clone 503 cultivado no meio 2xTY induzido por lactose. Os cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator foram efetuados a fim de serem realizadas as análises para determinação da concentração celular (X), da concentração do substrato pelo Método carbono orgânico total (TOC) (Apha, 1988), concentração de ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), concentração de proteína intra e extracelular pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), bem como para a avaliação da expressão da proteína de interesse por eletroforese (Laemmli, 1970).

#### 3.1- Micro-organismo

No presente trabalho utilizou a cepa de *Escherichia coli M15* que contém o plasmídeo pQE-30 (Qiagen, Valencia, CA) para expressão de antígenos de *L. i. chagasi*, apresentando uma cauda (“tag”) de seis resíduos de histidina em sua terminação.

A cepa *Escherichia coli M15* contendo, os antígenos 648 e 503, utilizados nesse estudo foi gentilmente cedida pela Dra. Mary Wilson (University of Iowa, U. S. A). De acordo com a literatura, o peso molecular do antígeno 648 é de 24 kDa, e a do antígeno 503 é de 56 kDa (Martins *et al.*, 2006).

### 3.2- Meios de cultivos utilizados nos ensaios em incubador rotativo e biorreator

Todos os meios de cultivo abaixo descritos foram preparados usando-se água destilada, esterilizados em autoclave a 120°C, durante 20 minutos, e depois suplementados com antibióticos (Item 3.2.1), conforme Hortsch & Weuster-Botz (2011). A composição desses meios pode ser verificada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultivo 2xTY e TB.

Nutrientes	Composição (g.L <sup>-1</sup> )	
	Meio de cultivo 2xTY	Meio de cultivo TB
Triptona	16,00	12,00
Extrato de levedura	10,00	24,00
NaCl	5,00	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	2,31
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	12,54
Glicerol (mL)	-	4,00
pH	7,0	7,0

\* - (Ausente)

#### 3.2.1- Antibióticos

As soluções de antibióticos foram preparadas com água deionizada e esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm em condições de assepsia. Após esterilização, estas soluções foram armazenadas a -20°C.

- Ampicilina- estoque 100 mg/mL (concentração de trabalho: 100µg/mL);
- Kanamicina- estoque 25 mg/mL (concentração de trabalho: 25µg/mL).

### 3.3 - Determinação da estabilidade do plasmídeo

A estabilidade do plasmídeo foi determinada em diferentes tempos do cultivo. A amostra da suspensão celular retirada do incubador rotativo ou do biorreator de bancada foi diluída adequadamente em solução salina (NaCl 0,85%) e 100 µL foi semeado para uma placa LB/ágar sem antibiótico. Após 24 h, repicaram-se o número de colônias que cresceram, para uma placa com 25 mg/L de kanamicina e para outra placa sem kanamicina (controle), as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Calculou-se então, 60% das colônias que cresceram na placa com o antibiótico em relação às colônias que cresceram na placa sem antibiótico (Losen *et al.*, 2004; Vidal *et al.*, 2005).

### 3.4 - Preparo do Inóculo

O estoque das cepas de *Escherichia coli* M15 (648 e 503) contendo os antígenos 648 e 503 foi armazenado a -80°C em microtubos com glicerol a 50%. Para ativação do microorganismo, 200 µL desse microtubo foi transferido assepticamente para 50 mL do meio (2xTY ou TB), previamente esterelizado e suplementado com antibióticos em frascos de Erlenmeyer 250 mL. Esse cultivo inicial foi realizado em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, por 12 horas. Esta suspensão constituiu o inóculo dos ensaios conduzidos em incubador rotativo e biorreator.

### 3.5 - Cultivos em incubador rotativo

Nos ensaios em incubador rotativo, 45 mL dos dois meios de cultivo estudados (2xTY ou TB, pH 7,0), em Erlenmeyer de 250 mL, foram inoculados com 5 mL do inóculo e incubados a 200 rpm e 37°C por 14 horas. Amostras foram coletadas a cada hora, em seguida, análises da concentração de biomassa, substrato e proteína foram realizadas.

A Figura 3 ilustra o esquema do processo fermentativo realizado em incubador rotativo e biorreator de bancada.

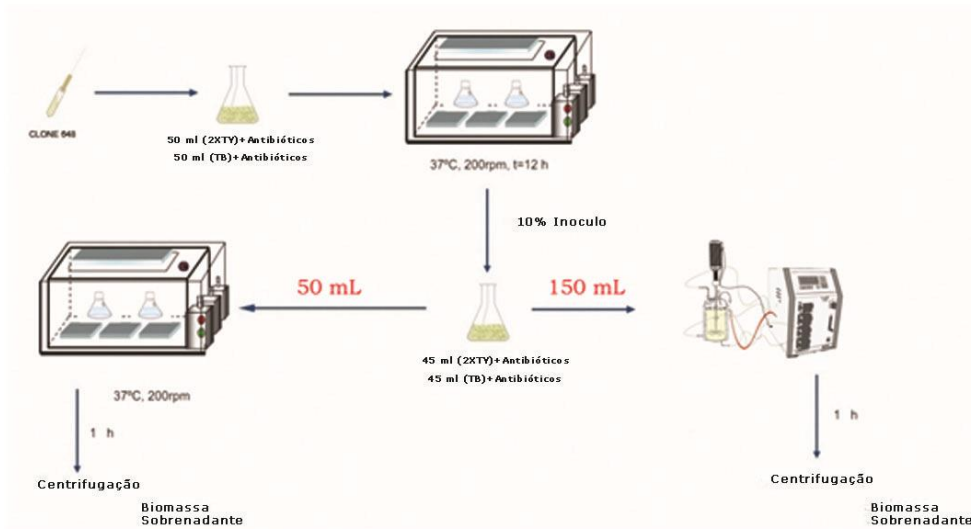


Figura 3- Procedimento dos processos fermentativos realizados em incubador rotativo e biorreator.

### 3.6 - Cultivos em biorreator de bancada

Foram realizados cultivos descontínuos, primeiramente, em incubador rotativo com velocidade de agitação, temperatura e pH controlado, conforme a literatura (200 rpm, 37°C e pH 7). Posteriormente, reproduziu-se as condições dos ensaios em biorreator de bancada Biostat B (B. Braun Biotech International) de volume útil 1,5 L, providos de sistemas de controle de temperatura, pH, velocidade de agitação e vazão de aeração (Figura 3). Para os ensaios em biorreator, 1350 mL dos dois meios de cultivo estudados (2xTY ou TB) foram inoculados com 150 mL de inóculo na fase exponencial de crescimento. No cultivo, o pH do meio foi mantido em 7,0 através da adição automática de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  25% ou HCl 1N. Para todos os ensaios conduzidos em bioreator a vazão de aeração foi mantida constante de 1-1,5 vvm. Após o inóculo, as amostras foram coletadas de hora em hora durante o período de aproximadamente 14 horas, em seguida, analisou-se as concentrações de substrato, biomassa e proteína. A Figura 4 ilustra o biorreator de bancada onde foram realizadas as fermentações.



Figura 4 - Ilustra o biorreator de bancada onde foram realizadas as fermentações.

### 3.7 – Indução em cultivos descontínuo realizados em incubador rotativo e biorreator de bancada

Para entender o efeito de indução por IPTG ou lactose sobre o crescimento e expressão dos antígenos 648 e 503 de *Leishmania i. chagasi*, os cultivos foram induzidos pela adição de uma concentração final de 1mM IPTG ou adição da lactose na concentração final de 10 g.L<sup>-1</sup> (Tomazetto *et al.*, 2007), no mesmo instante de indução, início da fase exponencial de crescimento quando a densidade óptica (OD<sub>590 nm</sub>) atingiu 0,5 (fase log) (Ma *et al.*, 2006; Sereikaite *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2010). Amostras foram coletadas de hora em hora, do incubador rotativo ou do biorreator, no período de aproximadamente 14 horas.

Posteriormente, as células foram separadas por centrifugação (centrífuga Eppendorf 5415 D) a 13.400 g por 30 minutos. O precipitado foi determinado por peso seco a 80°C até obter peso constante, sendo em seguida rompidas para análise da proteína intracelular, o sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteína extracelular, sendo a as proteínas intracelular e extracelular quantificadas pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) e concentração de ácido acético por cromatografia líquida de alta performance (CLAE) utilizando a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co., Japan ) com detector de índice de refração – IR a uma temperatura de 65°C . A solução de ácido sulfúrico 0,005 M foi utilizada como fase móvel sob fluxo de 1 mL/min (Lu *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2011).

Em seguida, os ensaios foram realizados utilizando-se o biorreator de bancada Biostat B (B. Braun Biotech International) de volume útil de 1,5 L. As características de operação do processo de todos os ensaios conduzidos em biorreator foram: a temperatura foi mantida constante a 37°C, o pH mantido em  $7 \pm 0,1$  pela adição de NH<sub>4</sub>OH 25% ou HCl 1N, sendo a fração do inóculo correspondente a 10% deste volume. A velocidade de agitação foi mantida a 200 rpm, a concentração de oxigênio dissolvido foi monitorado por um eletrodo polarográfico na faixa de 30% da saturação e o fluxo de ar dentro do biorreator variou de 1 a 1,5 L/min. O polipropileno glicol (PPG) foi utilizado como anti-espumante quando necessário (Lima, 2004).

### **3.8- Procedimento de indução**

A expressão da proteína recombinante deste trabalho foi induzida pela adição do indutor IPTG (isopropil- $\beta$ -tiogalactosídeo) na concentração de 1mM ao meio de cultivo, sendo o instante de indução na fase exponencial de crescimento quando atingia-se a densidade ótica (DO<sub>590nm</sub> entre 0,4 -0,5) (Ma *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010). Este procedimento foi realizado para todos os ensaios em que se realizou a indução. O indutor (IPTG) foi dissolvido em água deionizada de modo a se obter uma solução de concentração igual a 1mM. Esta solução era esterilizada por filtração através de membrana 0,22  $\mu$ m e estocada em congelador.

Com base nos estudos realizados por Tomazetto *et al.* (2007), a lactose, na concentração 10 g/L, foi o suficiente para induzir a expressão da proteína de interesse do nosso estudo. Posteriormente, os ensaios do presente trabalho foram submetidos a uma estratégia de indução por lactose, da mesma forma que foi realizada a indução por IPTG, a fim de verificar a influência da lactose no crescimento e expressão de antígenos (648 e 503) da *L. i. chagasi*. Este procedimento foi realizado para os ensaios conduzidos em incubador rotativo ou biorreator.

### **3.9 – Métodos de Análises**

Durante os ensaios em incubador rotativo e em biorreator, de hora em hora, uma alíquota era retirada a fim de serem realizadas as análises para determinação da concentração celular (X), da concentração do substrato pelo Método TOC (carbono orgânico total) (Apha, 1988), concentração de ácido acético (CLAE), concentração de proteína intra e

extracelular pelo método de Lowry (Lowry *et al.*,1951), bem como para a avaliação da expressão da proteína de interesse por eletroforese (Laemmli, 1970).

O Fluxograma da Figura 5 apresenta as rotinas de tratamento analítico das amostras retiradas periodicamente do incubador rotativo ou biorreator durante o cultivo dos ensaios realizados.

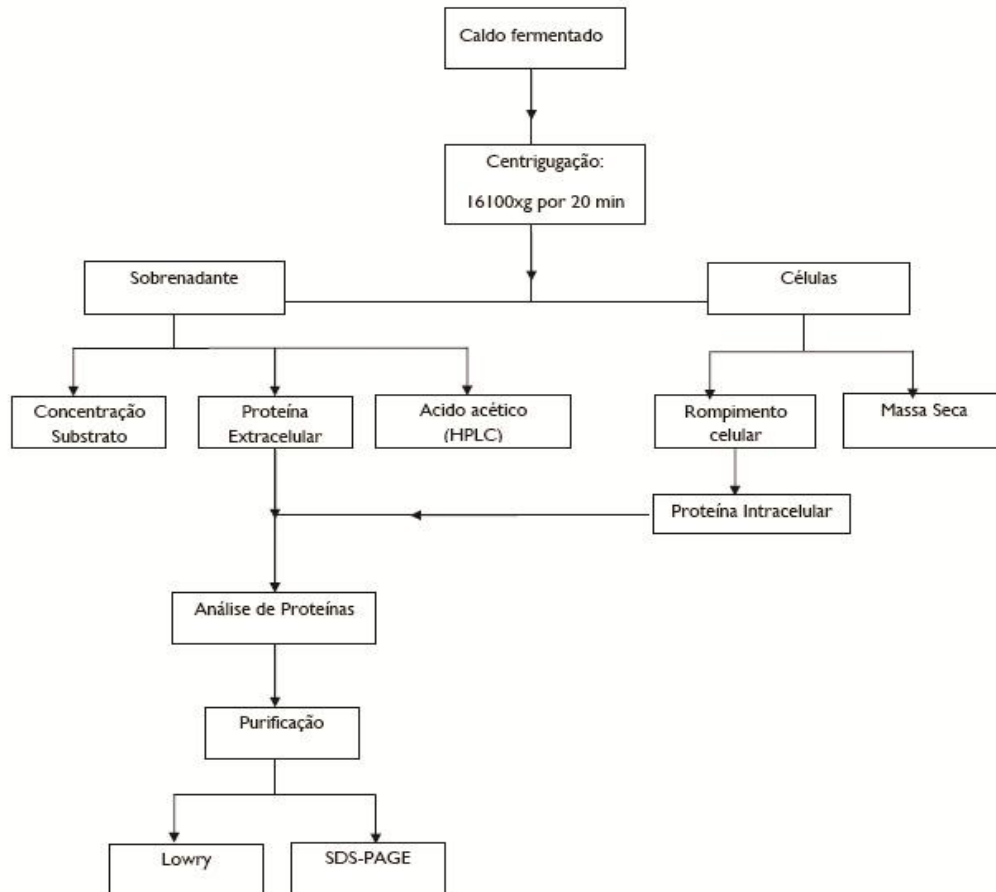


Figura 5 - Fluxograma do procedimento analítico.

### 3.9.1 – Determinação da concentração celular (X)

O monitoramento do crescimento celular nos processos fermentativos foi realizado através de leitura da absorbância a 590 nm em espectrofotômetro. O procedimento consiste em diluir uma alíquota da suspensão contendo as células dos micro-organismos em meio de cultivo sem inóculo e realização da leitura da absorbância contra um branco com o caldo de fermentação na mesma diluição. Para se correlacionar a absorbância com a massa seca

celular, foi construída uma curva de calibração através da determinação do peso seco das células, seguido de diluição segundo procedimento descrito por Rodrigues *et al.* (2003).

### **3.9.2 – Carbono orgânico total (TOC)**

Para acompanhar o consumo de substrato nos dois meios de cultivos estudados (2xTY e TB) durante o cultivo dos dois clones (648 e 503), os conteúdos de carbono foram obtidos através de análises TOC por combustão a alta temperatura com detector infravermelho não dispersivo (NDIR), utilizando o sistema TOC-VCPH da marca Shimadzu (Columbia, MD,USA).

### **3.9.3 – Rompimento da parede celular**

Para o rompimento da parede celular foi utilizado um tampão de *lise* a base de uréia, cuja composição é: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, urea 8 M, Tris-Cl 10 mM a pH 8.0. A composição dos tampões pode ser verificada no Anexo I. Primeiramente, as células foram armazenadas em banho de gelo por 15 minutos; em seguida, ressuspendeu-se em tampão de *lise* a base de uréia e homogeneizou-se por 15 a 60 minutos em vórtex a 25°C. Para remover os resíduos foi realizada a centrifugação (Eppendorf centrifuge 5415 D) a 16100x g por 30 minutos. As proteínas intracelulares presente no sobrenante foram transferidas para *Eppendorfs* e analisadas posteriormente.

### **3.9.4 – Quantificação do Ácido Acético e Lactose**

A produção do metabólito ácido acético e do substrato lactose – foram quantificados por CLAE. As alíquotas do caldo fermentado foram centrifugadas a 13.400 xg por 30 min. O sobrenadante foi filtrado com membrana 0,22 µm antes de ser analisado em CLAE. As análises do ácido acético e lactose foram conduzidas utilizando a coluna Shim-Pack SCR-101H (Shimadzu Co., Japan ) com detector de índice de refração – IR a uma temperatura de 65°C . A solução de ácido sulfúrico 0,005 M foi utilizada como fase móvel sob fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção na coluna foi de 20 µL. O ácido acético foi quantificado utilizando uma curva padrão (Anexo 3) (0,1– 1,2 g/L) de acordo com Lu *et al* (2009) e a lactose foi quantificada utilizando uma curva padrão (0,5– 10 g/L).

### **3.9.5 - Purificação em batelada de antígenos 648 e 503 de *Leishmania i. chagasi* sob condições desnaturantes**

A sequência de nucleotídeos codificante da proteína de interesse foi inserido no vetor (pQE-30) (Qiagen, Valencia, CA). A expressão das proteínas fusionadas em cauda de histidina permitiu a purificação dos antígenos (648 e 503) por cromatografia de afinidade. Desta forma, o processo de purificação foi realizado por cromatografia de afinidade por metal imobilizado (IMAC) (Qiagen, Valencia, CA) utilizando a resina Níquel Sepharose (GE HEALTHCARE).

#### **3.9.5.1- Cromatografia de Afinidade por Metal imobilizado (IMAC)**

O procedimento para a purificação foi o seguinte: 2 mL do caldo fermentado foi primeiramente centrifugado a 13.400 xg por 30 minutos. Para a purificação das proteínas extracelulares, as amostras foram usadas diretamente. Para o procedimento da purificação das proteínas intracelulares as células foram lisadas conforme descrito no item 3.9.3

Primeiramente 0,5 mL da resina Níquel Sepharose foi adicionada a 2 mL do lisado (sobrenadante) e homogeneizados em incubador rotativo (velocidade de agitação 200 rpm por 30 minutos) a temperatura ambiente. A resina e a amostra foram cuidadosamente transferidas para a coluna vazia com a parte inferior atachada. Posteriormente, o atachado foi removido e as amostras coletadas em fluxo contínuo. Para então serem submetidas à análise SDS-PAGE. O eluído foi lavado duas vezes com 4 mL de Tampão C (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M urea, 10 mM Tris-Cl, pH 6.3). A proteína foi eluída quatro vezes com 0,5 de Tampão D (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8 M urea, 10 mM Tris-Cl, pH 4.5). Posteriormente, a fração eluída foi submetida à análise SDS-PAGE.

A Figura 6 ilustra o procedimento da purificação por cromatografia de afinidade dos antígenos 648 e 503 de *L. i. chagasi*.

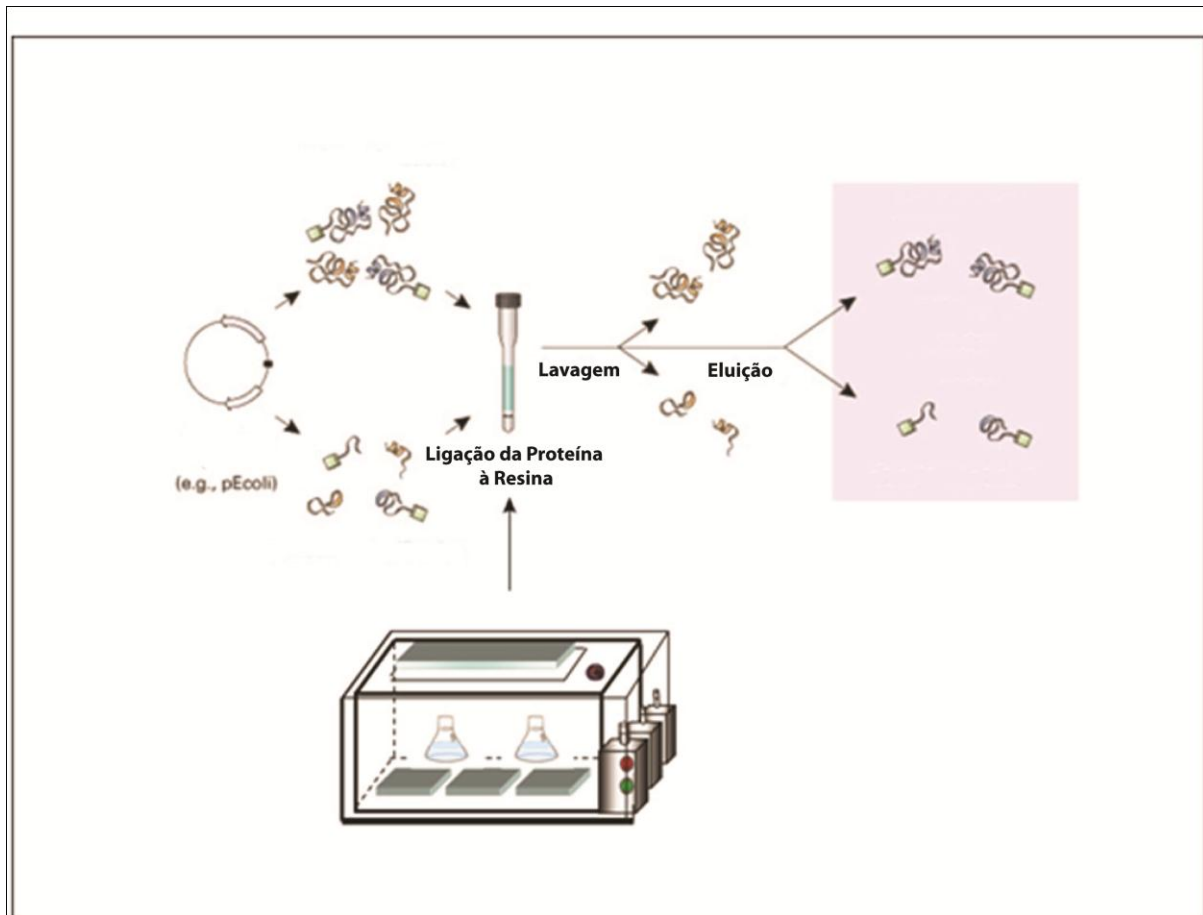


Figura 6 – Procedimento da purificação por cromatografia de afinidade dos antígenos 648 e 503 de *L. i. chagasi*.

### 3.9.6 – Determinação das proteínas totais

A quantificação da proteína do extrato celular e da proteína purificada intra e extracelular foi realizada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). O padrão de proteína utilizado foi albumina de soro bovino (MERCK) na concentração de 20 a 420 mg/mL visualizada no Anexo 2.

#### 3.9.6.1 – Eletroforese de Proteínas sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).

A avaliação da expressão da proteína de interesse foi determinada por eletroforese, conforme descrito por Laemmli (1970).

As amostras antes de serem aplicadas no gel concentrador foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 12 mmol/L (pH=6,8), glicerol 25%, SDS 0,4%, 2-mercaptoetanol 2 mmol/L e azul de bromofenol 0,02%) na presença de agentes desnaturantes (SDS) e redutores

( $\beta$ -mercaptoetanol) que quebram as ligações dissulfeto. Dessa forma, todos os complexos SDS-polipeptídeo possuem densidade de cargas idênticas e migram em géis de poliacrilamida com porosidade adequada estritamente em função da massa molecular. Assim, as proteínas são separadas em função do seu tamanho e as amostras aplicadas no gel migram em direção ao eletrodo positivo (Silva Júnior, 2001). A concentração do gel separador foi de 15% e foi preparado pela adição de 5 mL de solução estoque de acrilamida (29,2% de acrilamida e 0,8% de bis-acrilamida), 2,5 mL de Tris-HCl 1,5 mol/L (pH= 8 ), 300  $\mu$ L de SDS 10%, 150  $\mu$ L persulfato de amônio 10%, 10  $\mu$ L de Temed e H<sub>2</sub>O destilada para um volume final de 10 mL. O gel empilhador continha 0,6 mL de solução estoque de acrilamida, 1mL de Tris-HCl 0,5 mol/L (pH=6,8), 240  $\mu$ L de SDS 10%, 75  $\mu$ L de Persulfato de amônio 10%, 4  $\mu$ L de Temed e água destilada para um volume final de 4 mL. As amostras misturadas a esse tampão foram desnaturadas por aquecimento a cerca de 90°C e 5 minutos. As corridas foram realizadas a 150 V por 1 hora em tampão de corrida (Tris 25 mmol/L, Glicina 192 mmol/L e SDS 0,1%, pH= 8,3). Após o término da corrida, o gel obtido foi revelado pelo método de nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987). A Figura 7 representa a esquemática da eletroforese.

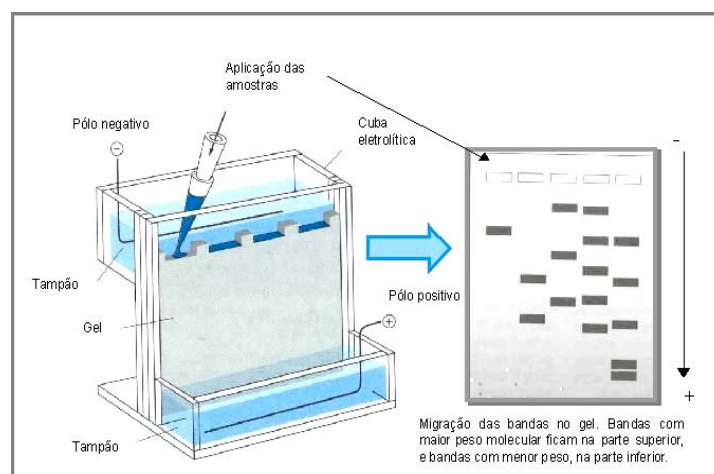


Figura 7 - Representação esquemática da eletroforese

---

## **Capítulo 4**

### **Resultados e Discussão**

---

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 – Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento dos clones 648 e 503 em duas diferentes composições de meios de cultivo sem indução

#### 4.1.1 – Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento dos clones 648 e 503

Um primeiro conjunto de ensaios foi realizado com o objetivo de se conhecer o comportamento cinético dos dois clones recombinantes (648 e 503) em dois meios de cultivo com diferentes composições complexas (2xTY, TB) suplementados com antibióticos para garantir o crescimento dos clones que contêm o plasmídeo, sem adição do indutor, a fim de avaliar o comportamento da cinética de crescimento. Posteriormente, verificou-se qual desses dois meios se apresenta mais favorável ao crescimento de cada clone. Analisou-se, assim, qual dos dois clones apresentou melhor comportamento, em termos de crescimento, nos respectivos meios. A partir desses experimentos, pode-se também avaliar o melhor instante de indução para se realizar o procedimento de indução nos ensaios que tiveram o objetivo de avaliar a expressão das proteínas (648 e 503).

Os ensaios foram conduzidos em incubador rotativo (*shaker*) adotando-se uma temperatura de 37°C, frequência de agitação de 200 rpm, pH inicial 7, em Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 50 mL dos respectivos meios de cultura.

Os comportamentos da concentração celular e consumo de substrato, ensaios F03, F04, F11 e F12 estão representados nas Figuras 8 a 11.

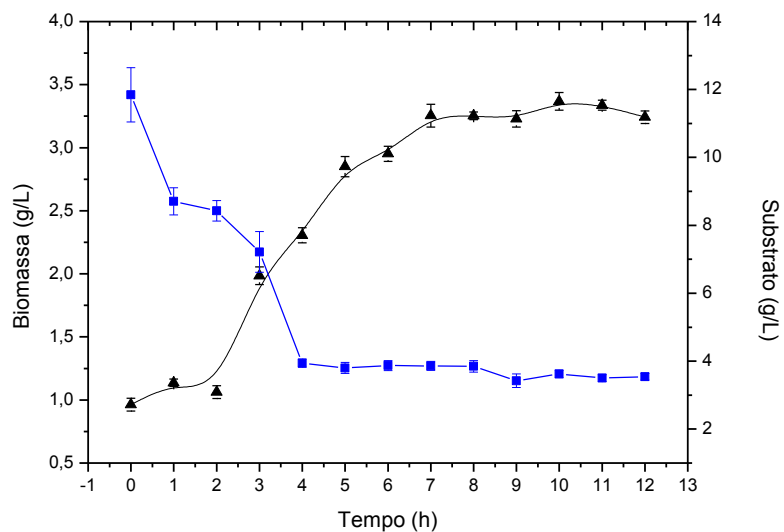


Figura 8- Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 648 no meio 2xTY, a 37°C e 200 rpm, não induzido.

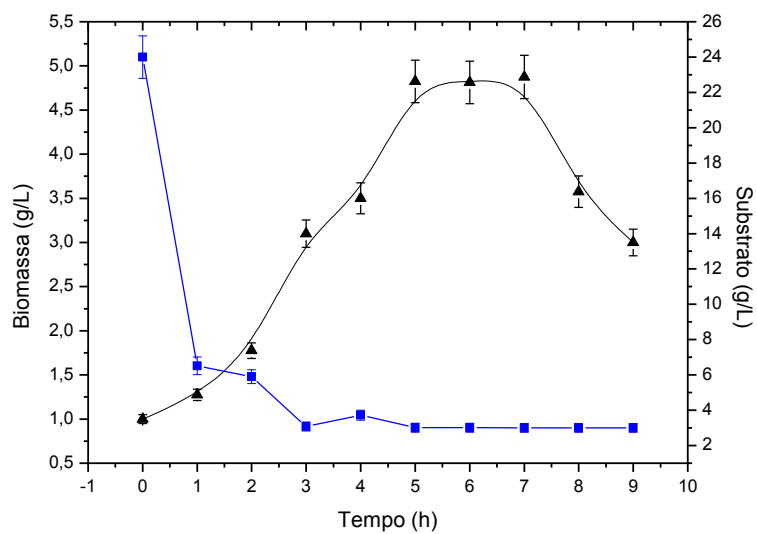


Figura 9 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 648 no meio TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido

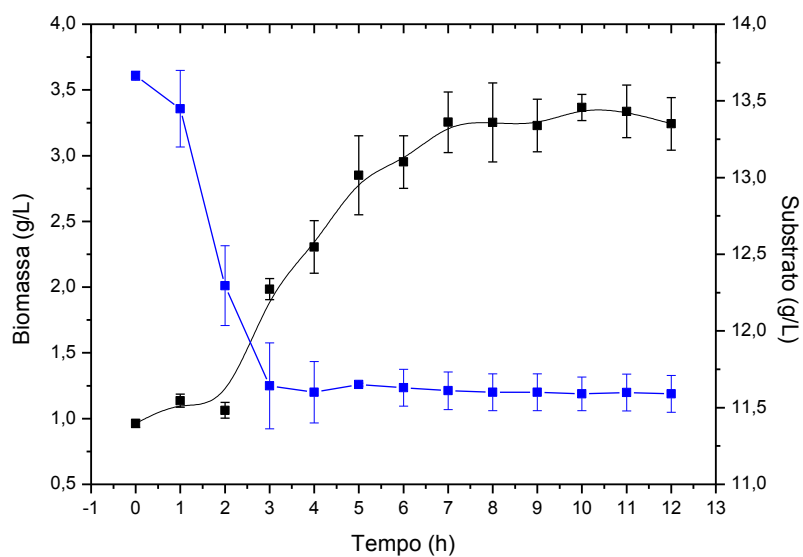


Figura 10 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 503 no meio 2xTY, a 37°C e 200 rpm, não induzido.

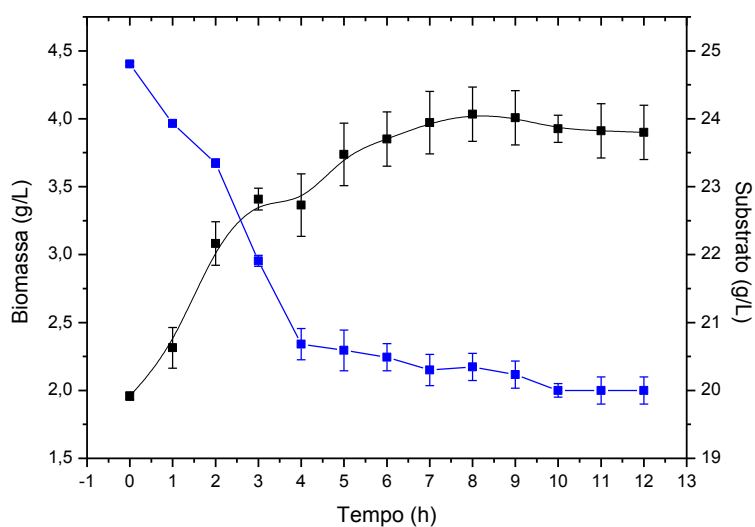


Figura 11 - Perfil do crescimento celular (▲) e consumo de substrato (■) para o clone 503 no meio TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido

A partir dos resultados obtidos dos ensaios, não induzidos, F03/F04-648 2xTY/TB e F11/F12-503 2xTY/TB, foram obtidos os parâmetros cinéticos, cujo valores são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios sem indução em incubador rotativo.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	$t_{xm\acute{a}x}$ (h)	$S_o$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$(S_o - S_f)$ (g/L)	$\mu_{xmax}$ (h <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g/L.h)	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Ac. Acético (g/L)
F03 648/2xTY	3,25	7	10,8	3,42	7,38	0,17	1,65	2,77	3,54
F04 648/TB	4,82	7	24,0	3,00	21,00	0,28	1,27	4,77	3,80
F11 503/2xTY	3,36	10	13,66	11,60	2,06	0,20	1,13	3,23	0,55
F12 503/TB	4,28	8	24,80	20,23	4,57	0,19	2,31	3,62	2,12

\*Ácido acético-Metabólito inibidor

\*  $t_{xm\acute{a}x}$  -Tempo para atingir a máxima concentração celular

\*  $P_x$ - Produtividade no instante de indução

Observando-se o perfil de crescimento dos clones 648 e 503 no meio 2xTY (Figuras 8 e 10), nota-se a presença de uma fase “lag” diferentemente do comportamento no meio TB (Figuras 9 e 11), no qual verifica-se a ausência de fase “lag”, sugerindo uma boa adaptação do metabolismo dos clones 648 e 503 quando cultivados no meio TB. Com relação ao consumo de substrato pelos dois diferentes clones, observa-se que tanto o 648 como o 503 apresentaram um rápido consumo do substrato nas primeiras quatro horas de cultivo para os dois meios, 2xTY e TB, o que coincide com a duração da fase exponencial de crescimento. Após as três horas de cultivo a concentração de substrato não apresenta grandes variações de concentração, sugerindo baixo consumo de substrato até atingir a fase estacionária. Entretanto, o clone 648, no meio TB, apresentou um maior fator de conversão de substrato à célula  $Y_{x/s}$  (4,77 g.g<sup>-1</sup>) quando comparado ao clone 503 no mesmo meio (3,62 g.g<sup>-1</sup>).

Para o clone 648, ensaios F03 (Meio 2xTY) e F04 (Meio TB), nota-se que a mudança de composição do meio de cultivo acarretou um incremento de 48% na concentração celular de (3,25 g/L) para (4,82 g/L), com fator de conversão de substrato a células (4,77 g.g<sup>-1</sup>) e velocidade específica máxima de crescimento (0,28 h<sup>-1</sup>) superior ao valor obtido no meio 2xTY. A maior concentração celular alcançada no meio TB pode ser atribuída ao fato do meio ser rico em extrato de levedura, sais de fosfato, além do glicerol como fonte extra de carbono quando comparado ao meio de cultivo 2xTY, pois a alta concentração de fosfato pode ser importante para a obtenção de altas densidades celulares em cultivos de *E. coli*, tornando-se um nutriente limitante quando presente em baixas concentrações. Além de proporcionar uma fonte de fosfato, como os sais de fosfato, favorecendo a capacidade de tamponamento e evitando flutuações de pH que podem afetar negativamente a atividade metabólica da *E.coli* (Krause *et al.*, 2010).

Para o clone 503, ensaios F11 (Meio 2xTY) e F12 (Meio TB), nota-se que a mudança de composição do meio de cultivo acarretou um incremento de 27,3% na concentração celular de (3,36 g/L) para (4,28 g/L), com fator de conversão de substrato a células (3,62 g.g<sup>-1</sup>) e produtividade em células (2,31 g/L.h) superior a valores obtidos no meio 2xTY onde obteve-se fator de conversão no valor de (3,23 g.g<sup>-1</sup>) e produtividade em células (1,13 g/L.h).

Mais uma vez reforçando a importância do glicerol, presente no meio TB, que sendo uma fonte de carbono mais facilmente assimilável, pode ter contribuído no crescimento desses clones. O meio 2xTY, caracterizado pela ausência do glicerol provavelmente possui menor quantidade de precursores para a síntese de macromoléculas, assim as células têm de sintetizá-las requerendo mais energia para um determinado valor da concentração celular. Avaliando o comportamento dos clones (648 e 503) nos meios de cultivos estudados (2xTY e TB), o meio TB apresentou-se mais favorável ao crescimento dos dois clones, talvez por possuir uma maior quantidade de carbono e fósforo (maior concentração de extrato de levedura, além do glicerol).

Comparando-se os quatro ensaios (F03, F04, F11, F12), foi observado que o ensaio F04 (clone 648 meio TB) apresentou maior valor de concentração máxima ( $X_{m\acute{a}x}$ ) 4,82 g/L, fator de conversão de substrato à célula de 4,77 g.g<sup>-1</sup> e velocidade específica máxima de crescimento de 0,28 h<sup>-1</sup>, pode-se observar que apesar dos parâmetros cinéticos indicarem que o clone 648 apresentou melhor comportamento, em termos de crescimento, entretanto, a elevada produção do ácido acético, conhecido como forte inibidor, pode ser considerado uma fator limitante, principalmente nos ensaios onde se adicionava indutor a fim de avaliar processo de síntese das proteínas heterólogas.

É importante ressaltar que por mais que sejam empregadas modernas estratégias em cultivos aeróbios de *E. coli*, ocorre à excreção para meio de cultivo de produtos da fermentação, dentre estes, o principal é o ácido acético, cujo acúmulo ocasiona inibição do crescimento celular e da formação de proteínas heterólogas (Luli & Strohl, 1990; Suarez & Kilikiam, 2000; Vougaris *et al.*, 2011).

Xue *et al.* (2010) demonstram que os níveis de excreção de ácido acético e a inibição por este produto são dependentes da cepa de *E.coli* e das condições do meio empregadas, havendo em cada caso uma concentração limite acima da qual estes efeitos são observados.

No presente estudo, a formação e acúmulo do ácido acético pelo metabolismo da *E. coli* pode ser verificada nas Figuras 12 e 13, dos clones 648 e 503 nos dois meios de cultivo (2xTY e TB).

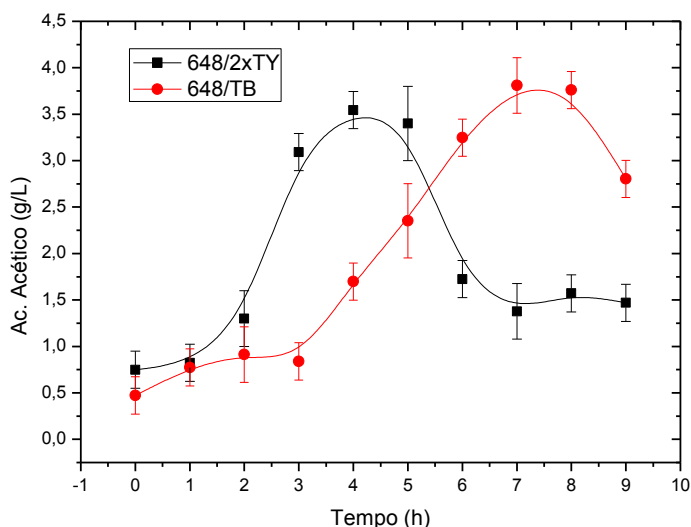


Figura 12 - Concentração de ácido acético para o clone 648 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido.

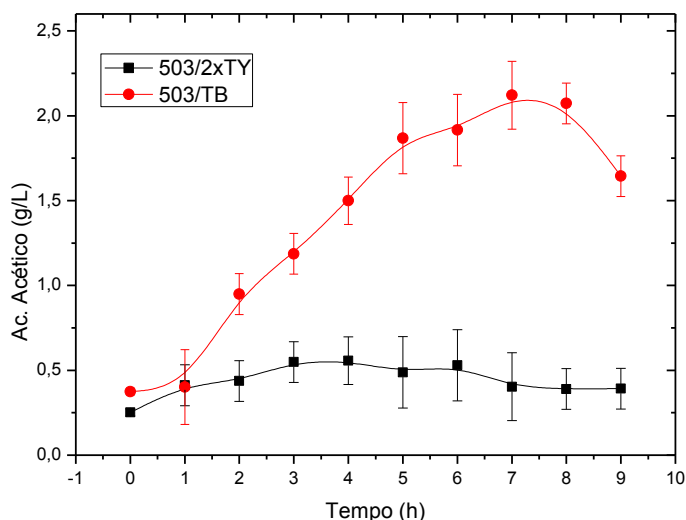


Figura 13 - Concentração de ácido acético para o clone 503 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm, não induzido.

Na Figura 12, observa-se que a máxima concentração de ácido acético atingiu o valor de 3,8 g/L no meio TB, para o clone 648, o que ocorreu às 7 horas do cultivo, final da fase exponencial. Correlacionando o perfil de crescimento celular (Figura 9) com o acúmulo de ácido acético (Figura 12) do clone 648 no meio TB, observa-se que ocorreu inibição do crescimento celular a partir de 7 horas de cultivo, instante que coincide com a máxima concentração de ácido acético. Neste mesmo instante, Figura 13, o clone 503 também atingiu a máxima concentração de ácido acético 2,2 g/L, só que 58% inferior em relação ao clone 648. A alta complexidade do meio TB associada à elevada concentração de extrato de

levedura (24 g/L) quando comparado com o meio 2xTY (10 g/L), pode ser o fator responsável pela produção acentuada de ácido acético.

As Figuras 14 e 15 ilustram um comportamento semelhante para o perfil de produtividade em células dos clones (648 e 503) para todos os ensaios não induzidos.

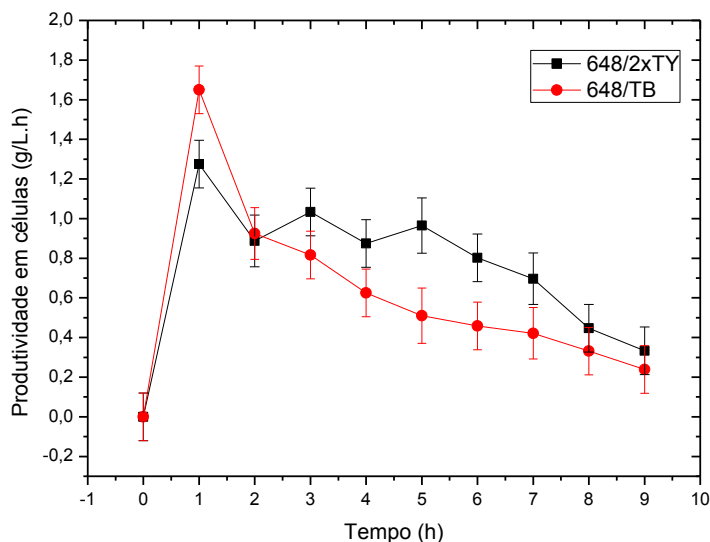


Figura 14 - Produtividade em células para o clone 648 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm , não induzido.

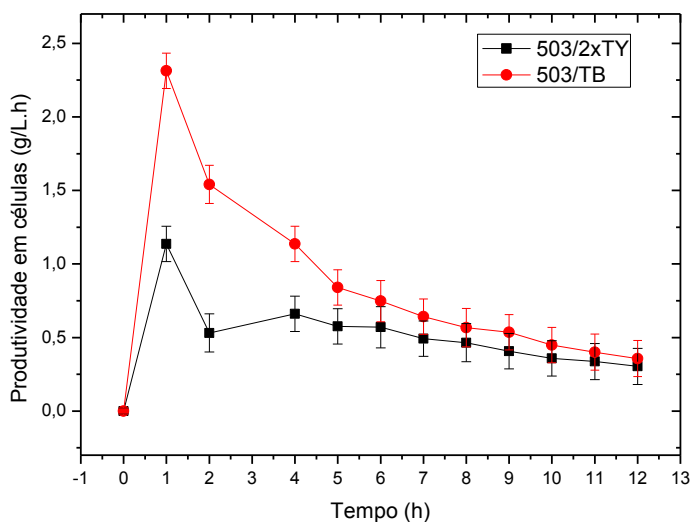


Figura 15 - Produtividade em células para o clone 503 cultivado no meio 2xTY e TB, a 37°C e 200 rpm , não induzido.

Para o clone 648 (Figura 14) pode-se observar que para a produtividade em células do ensaio F03 (clone 648 meio 2xTY) :  $P_x$  (1,65 g/L.h) foi 29% superior quando comparado ao

ensaio F04 (clone 648 meio TB) :  $P_x$  (1,27 g/L.h). Com relação ao clone 503 cultivado nos dois meios (2xTY e TB) (Figura 15) houve um acréscimo em aproximadamente 88% na produtividade em células do ensaio F11 (clone 503 meio 2xTY) com  $P_x$  (1,13 g/L.h) quando comparado ao ensaio F12 (clone 503 meio TB) que apresentou produtividade em células com  $P_x$  (2,31 g/L.h). A presença do glicerol, nutriente particular ao meio TB, além do fosfato parece favorecer o crescimento destes clones (Krause *et al.*, 2010).

#### **4.1.2 – Ensaios em incubador rotativo com indução por IPTG visando analisar a expressão da proteína**

A partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores (item 4.1.1), no segundo conjunto de ensaios foi realizado o procedimento de indução por IPTG, para uma concentração final no meio de 1mM, nas mesmas condições dos ensaios sem indução com velocidade de agitação, temperatura e pH controlados (200 rpm, 37°C, 7,0) conduzidos em incubador rotativo.

A expressão das proteínas recombinantes 648 e 503 deste trabalho foram induzidas pela adição ao meio de cultivo do indutor IPTG, sendo o instante de indução escolhido o início da fase exponencial ( $t = 1$  h) correspondendo a densidade ótica ( $DO_{590nm}$  entre 0,4 - 0,5) (Ma *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010). Este procedimento foi realizado para todos os ensaios em que se realizou a indução.

Neste contexto, a fim de verificar a influência da composição dos meios testados (2xTY e TB) na expressão de antígenos recombinantes (648 e 503) de *Leishmania i. chagasi* foram realizados quatro ensaios.

O comportamento do crescimento, consumo de substrato e a proteína total para os ensaios F01, F02, F13, F14 estão representados nas Figuras 16 a 19.

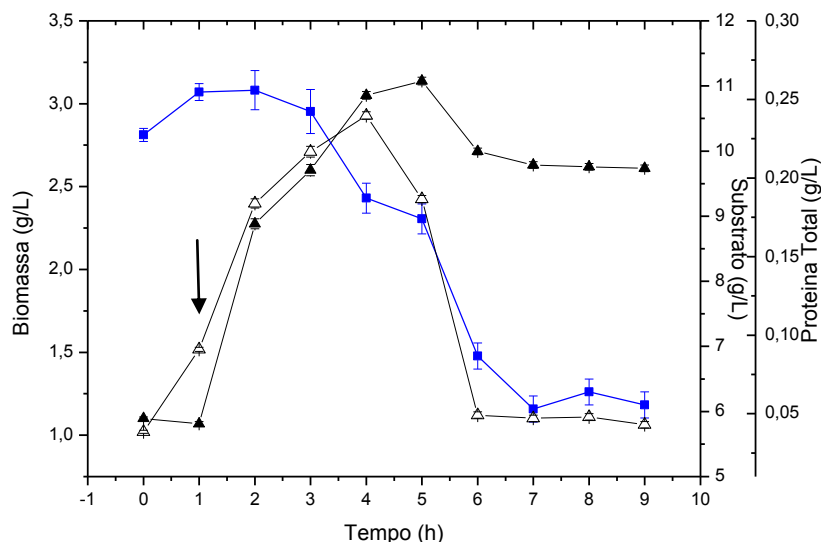


Figura 16 - Perfil do crescimento celular ( $\blacktriangle$ ), consumo de substrato ( $\blacksquare$ ) e proteína total ( $\triangle$ ) para o clone 648 cultivado no meio 2xTY em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.

A Figura 16 apresenta o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e proteína total (intra e extracelular) para o ensaio F01 (Meio 2xTY clone 648). A concentração máxima de proteína total (intra e extracelular) atingida no cultivo do clone 648 no meio 2xTY foi de 0,21 g/L. A expressão da proteína total apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) no valor de ( $0,06 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) no instante de 6 horas de cultivo, correspondendo à máxima fração de proteína que a célula pode acumular antes de iniciar a lise (Larentis *et al.*, 2011). Esta diminuição da concentração da proteína 648 poderia ser explicada pelo fato de que a célula, ao ter limitada sua fonte de carbono e outros nutrientes no meio, ativa suas proteases, hidrolisando as proteínas internas para satisfazer suas necessidades energéticas e nutricionais (Tomazetto *et al.*, 2007).

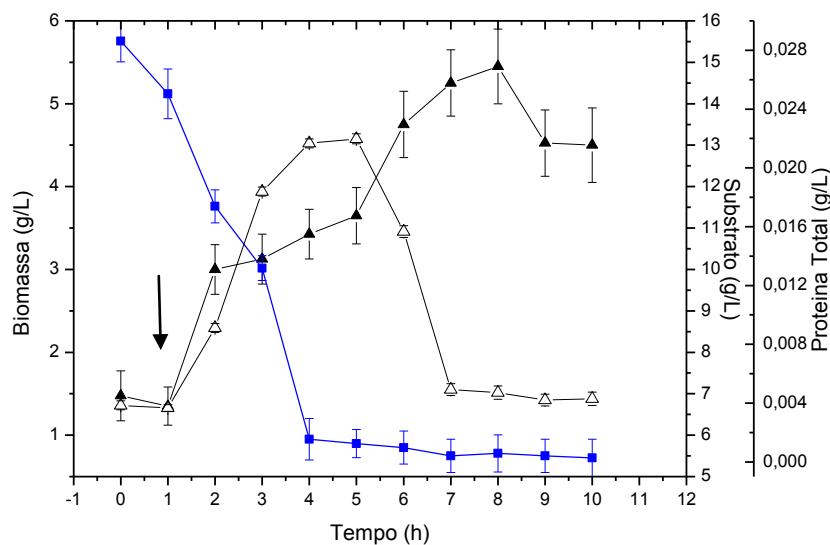


Figura 17 – Perfil do crescimento celular ( $\blacktriangle$ ) consumo de substrato ( $\blacksquare$ ) e proteína total ( $\triangle$ ) para o clone 648 cultivado no meio TB em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.

A Figura 17 apresenta o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e proteína total (intra e extracelular) para o ensaio F02 (Meio TB clone 648). A concentração máxima de proteína total (intra e extracelular) atingida no cultivo do clone 648 no meio TB foi de 0,021 g/L. No meio TB, observou-se para o clone 648 uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) no valor de (0,005  $\text{g.g}^{-1}$ ) no instante de 5 horas de cultivo, outra vez, a *lise* celular, deve estar associada ao acúmulo da proteína e a ausência de um sistema de secreção para uma eficiente liberação da proteína recombinante para o meio de cultura. Esta diminuição, de aproximadamente 10 vezes, na concentração da proteína 648 podendo ser atribuída a ação das proteases ativadas pela limitação da fonte de carbono e outros nutrientes (Tomazetto *et al.*, 2007), comportamento similar ao observado no ensaio F01 (Meio 2xTY clone 648). O efeito da composição do meio TB parece provocar um comportamento diáuxico deslocamento o metabolismo de síntese para formação da biomassa.

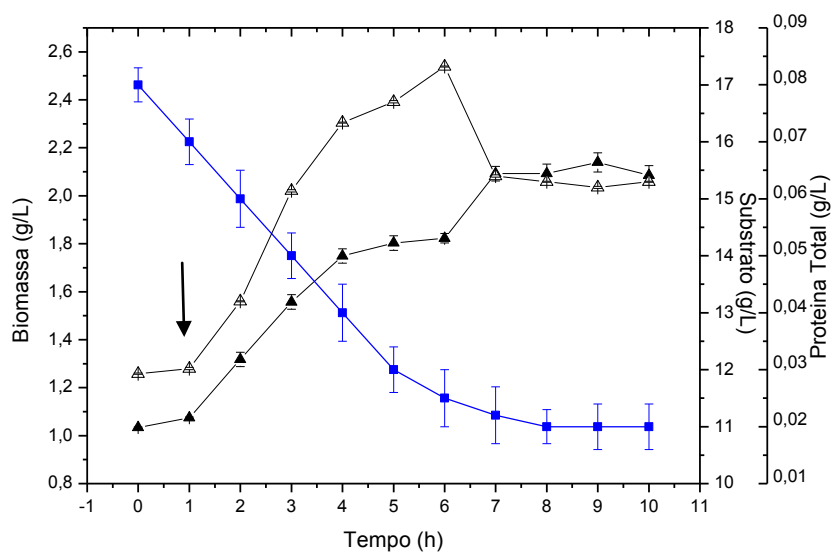


Figura 18 – Perfil do crescimento celular (▲) consumo de substrato (■) proteína total (△) para o clone 503 cultivado no meio 2xTY em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.

A Figura 18 apresenta o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e proteína total (intra e extracelular) para o ensaio F13 (Meio 2xTY clone 503). A concentração máxima de proteína total (intra e extracelular) atingida no cultivo do clone 503 no meio 2xTY foi de 0,083 g/L. A expressão da proteína total também apresentou comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) no valor de (0,031 g.g<sup>-1</sup>) um pouco antes de 6 horas de cultivo. Mais uma vez observou-se o possível efeito da limitação da fonte de carbono e nutrientes no meio. Observa-se também um comportamento diaúxico que consiste na redução da proteína total com o aumento da biomassa.

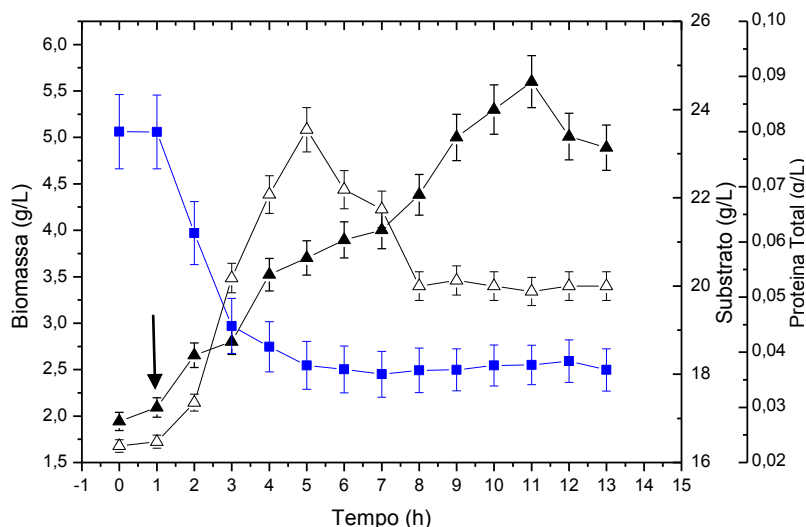


Figura 19 - Comportamento do crescimento celular ( $\blacktriangle$ ) consumo de substrato ( $\blacksquare$ ) e proteína total ( $\triangle$ ) para o clone 503 cultivado no meio TB em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG.

A Figura 19 apresenta o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e proteína total (intra e extracelular) para o ensaio F14 (Meio TB clone 503). A concentração máxima de proteína total (intra e extracelular) atingida no cultivo do clone 503 no meio TB foi de 0,080 g/L.

Outra vez expressão da proteína total apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{PX}$ ) no valor de (0,0151 g.g<sup>-1</sup>) no instante de 5 horas de cultivo. Esta diminuição da concentração de proteína 503 poderia ser explicada pela ação das proteases, hidrolisando as proteínas internas para satisfazer suas necessidades energéticas e nutricionais.

A partir dos resultados obtidos dos clones 648 e 503 cultivados nos dois meios (2xTY e TB), ensaios F01/F02-648 2xTY/TB e F13/F14-503 2xTY/TB, foram estimados os parâmetros cinéticos, cujo valores são mostrados na Tabela 5.

Tabela 3- Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por IPTG em incubador rotativo.

Ensaio	X <sub>máx</sub> (g/L)	Ac.Acético (g/L)	T <sub>f</sub> (h)	μ <sub>xmáx</sub> (h <sup>-1</sup> )	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )	[Proteína intra] Max (g/L)	t[Prot] Max (h)	P <sub>p/x</sub> (g/g)	μ <sub>p</sub> (g/g.h)
F01 648/2xTY	3,13	3,90	5	0,29	0,30	0,18	6	0,066	0,031
F02 648/TB	5,45	4,13	8	0,17	0,18	0,01	5	0,005	0,002
F13 503/2xTY	2,10	0,46	9	0,14	0,18	0,05	6	0,031	0,011
F14 503/TB	5,60	1,28	11	0,09	0,12	0,05	5	0,015	0,005

\* Ac. Acético-máxima concentração de ácido acético

\* μ<sub>x</sub>-Velocidade específica de crescimento no instante de indução

\* μ<sub>xmáx</sub> - Velocidade máxima específica de crescimento

\* P<sub>p/x</sub>. Produção específica de proteína

Na cinética de crescimento do micro-organismo, quando comparados os ensaios F01 (clone 648 em meio 2xTY) e F02 (clone 648 em meio TB) induzidos por IPTG, nota-se que a mudança de composição do meio acarretou um incremento de 74% na máxima concentração celular de 3,13 g/L para 5,45 g/L.

Para o clone 503, os ensaios F13 (clone 503 em meio 2xTY) e F14 (clone 503 em meio TB) induzidos por IPTG, observa-se que mais uma vez a presença do glicerol na composição do meio TB, provocou um incremento de aproximadamente 167% na concentração celular final (de 2,10 g/L para 5,6 g/L). Entretanto, com relação à expressão da proteína nota-se melhores resultados no meio 2xTY.

Para o clone 648 cultivado no meio 2xTY, a alta taxa de crescimento específico (μ<sub>x</sub>) no momento de indução (0,30 h<sup>-1</sup>), resultou no aumento acentuado no rendimento específico da proteína atingida (0,066 g/g), quando comparado com o cultivo no meio TB que atingiu o valor de 0,005 g/g. Elevada velocidade de síntese μ<sub>p</sub> (0,031 g/L.h), foi também observado no meio 2xTY, conforme mostra a Tabela 5. Pode-se observar que o meio 2xTY parece ser o mais favorável para síntese de proteína. A concentração de ácido acético foi verificada no meio TB (4,13 g/L), levemente superior quando comparado ao meio 2xTY (3,9 g/L), o que pode estar promovendo a inibição da síntese da proteína 648 cultivada no meio TB (Krause *et al.*, 2010).

Vale salientar que no ensaio F14 (clone 503 em meio TB) a velocidade específica de crescimento no instante da indução μ<sub>x</sub> (0,12 h<sup>-1</sup>) é inferior à velocidade específica de crescimento μ<sub>x</sub> atingida (0,18 h<sup>-1</sup>) do ensaio F13 (clone 503 meio 2xTY), o que pode ter

provocado (no meio TB) uma velocidade de síntese protéica mais lenta  $\mu_p$  (0,002 g/g.h) resultando em baixa produção específica  $P_{P/X}$  (0,005 g.g<sup>-1</sup>) enquanto que para o meio 2xTY a produção específica foi 0,03 g.g<sup>-1</sup>. Portanto, analisando-se os parâmetros cinéticos supracitados, pode-se ressaltar que as condições fisiológicas e metabólicas da *E. coli* no momento de indução são de extrema importância para viabilizar a síntese protéica (Hellmut *et al.*, 1994; Tian *et al.*, 2011).

A maioria das proteínas sintetizadas naturalmente em *Escherichia coli* é intracelular, acumulando-se no citoplasma e resultando muitas vezes na formação de corpos de inclusão, que são agregados insolúveis e inativos (Donovan *et al.*, 1996; Rossi, 2001; Tran *et al.*, 2010).

Neste sentido, a fim de investigar o tipo de expressão (intra ou extracelular) dos antígenos 648 e 503 de *Leishmania i. chagasi* com indução por IPTG utilizando os dois diferentes meios (2xTY e TB), as Figuras 20A a 20D, apresentam a produção da proteína intra e extracelular, dos clones 648 e 503 nos meios (2xTY e TB), F01/F02-(648/2xTY/TB), F13/F14-(503/2xTY/TB) ensaios induzidos por IPTG em incubador rotativo.

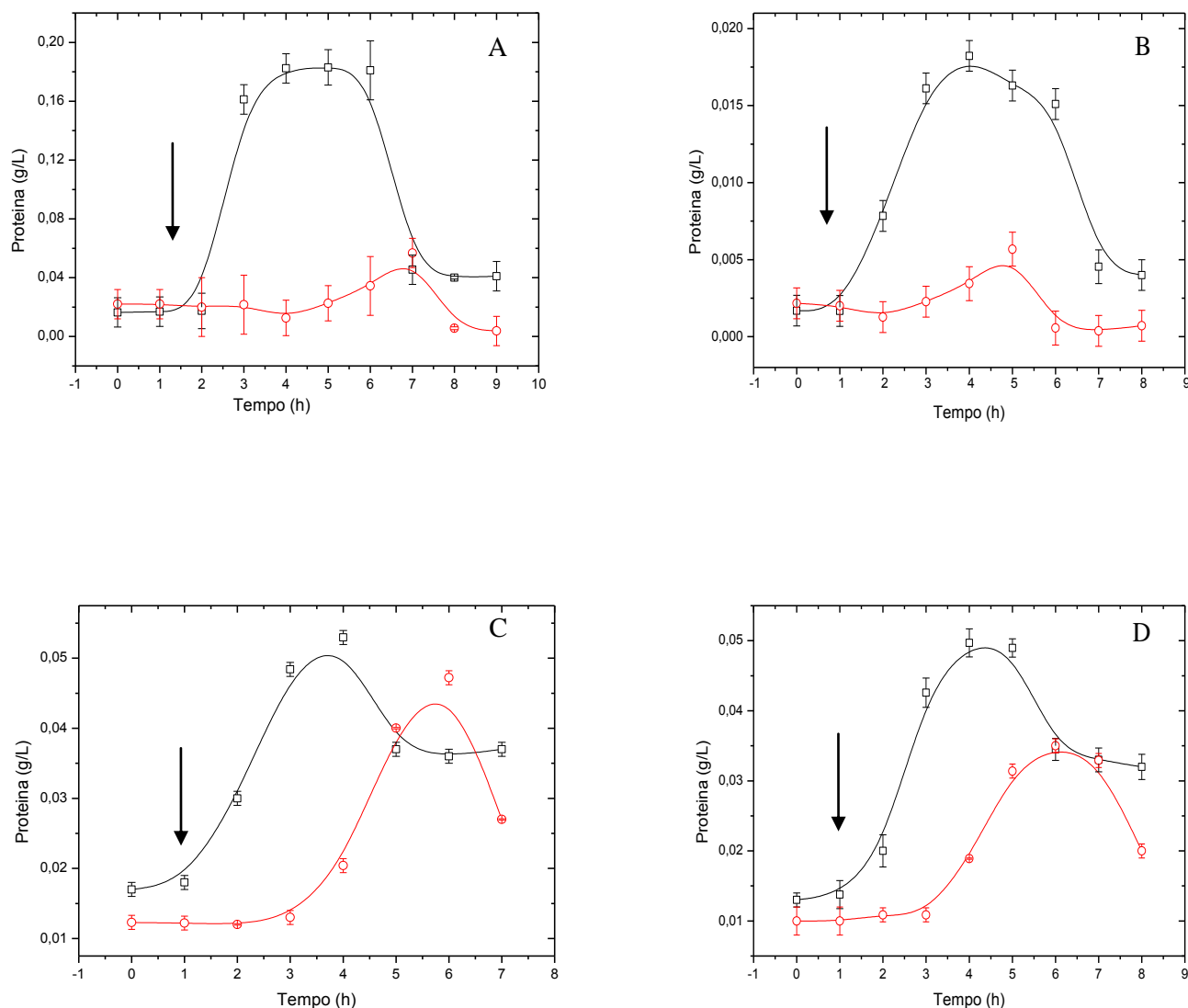


Figura 20 - Produção da proteína intra (□) e extracelular (○) induzido por IPTG em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm : (A) ensaio F01 (648/2xTY), (B) ensaio F02 (648/TB), (C) ensaio F13 (503/2xTY), (D) ensaio F14 (503/TB).

Em termos de localização verificou-se que as proteínas 648 e 503 são armazenadas intracelularmente. Em se tratando do clone 648 (Figura 20A, 20B) pode-se observar que concentração máxima da proteína 648 intracelular no meio TB (0,018 g/L) foi 10 vezes menor quando comparada à concentração máxima da proteína intracelular atingida no meio 2xTY (0,18 g/L). E que logo após indução houve incremento na concentração de proteína atingindo a concentração máxima da proteína intracelular às 4 horas de cultivo, portanto, neste momento, a célula retém a maior parte da proteína sintetizada. Após este instante, ocorreu um decréscimo da proteína intracelular e uma elevação da proteína extracelular, podendo ser

decorrente da *lise* celular proveniente de uma saturação da proteína no interior da célula. Este comportamento foi similar para o clone 503, pode-se observar, Figuras 20 (C e D), a máxima concentração da proteína intracelular cultivada nos meios 2xTY e TB foi 0,05 g/L às 4 horas de cultivo. Outra vez pode-se observar que para o clone 503, que em termos de expressão, o meio 2xTY foi o mais adequado, talvez por possuir uma quantidade elevada de triptona suprindo a bactéria com aminoácidos e vitaminas suficientes que pode ter favorecido a síntese protéica. Estes resultados mostraram que o extrato de levedura pode aumentar a produção de ácido acético, particularmente, no meio TB. Além disso, a baixa concentração de extrato de levedura em relação ao meio TB talvez tenha promovido um menor acúmulo do inibidor ácido acético (Kilikian *et al.*, 2000; Rossi, 2001).

#### **4.1.3 – Ensaios com indução por IPTG em biorreator de bancada**

Esse conjunto de ensaios foi submetido a um procedimento de indução por IPTG a fim de verificar a influência da indução na expressão de antígenos (648, 503) de *Leishmania i. chagasi* em biorreator de bancada.

As Figuras 21A e 21B mostram o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e produção da proteína 648 intracelular com indução por IPTG em biorreator de bancada.

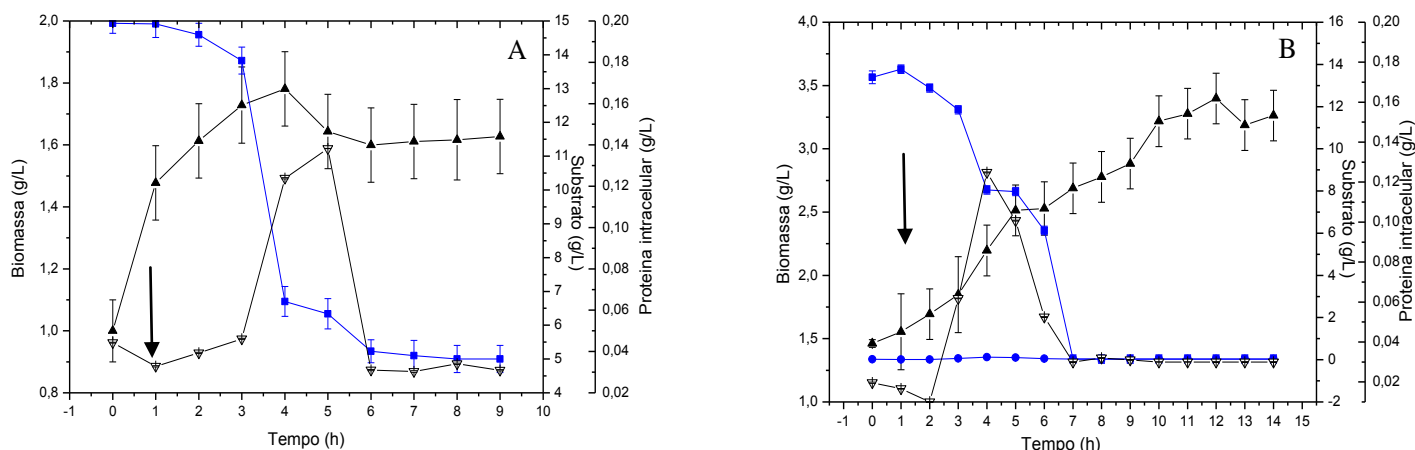


Figura 21 - Comportamento do crescimento celular ( $\blacktriangle$ ), consumo do substrato ( $\blacksquare$ ) e concentração da proteína 648 intracelular ( $\nabla$ ) em biorreator a 37°C e 200 rpm, induzido por IPTG : (A) ensaio F05 (648/2xTY), (B) ensaio F06 (648/TB).

Na cinética de crescimento celular, no meio 2xTY, pode-se observar que o tempo necessário para atingir a máxima concentração celular de 1,78 g/L foi de 4 horas de cultivo (Figura 21A). Com relação ao consumo de substrato, observa-se que o clone 648 apresentou um consumo do substrato acentuado nas primeiras 4 horas de cultivo, o que coincide com duração da fase exponencial de crescimento.

O comportamento cinético, no meio TB, pode-se observar que o tempo necessário para atingir a máxima concentração celular de 3,4 g/L foi de 12 horas de cultivo (Figura 21B). Com relação ao consumo de substrato, pode-se observar que o clone 648 apresentou um consumo do substrato acentuado nas primeiras 7 horas de cultivo e houve pouco substrato residual (não consumido). O meio TB apresentou melhores resultados em termos de crescimento. A maior densidade celular para este meio de cultivo pode ser explicada, pelo fato do meio ser rico em extrato de levedura e sais de fosfato, além de uma fonte extra de carbono (glicerol) (Krause *et al.*, 2010).

Nota-se na Figura 21A, que a expressão da proteína 648 intracelular em biorreator também apresentou um comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima de proteína ( $P_{P/X}$ ) no valor de 0,08 g.g<sup>-1</sup> no instante de 5 h, correspondendo à máxima fração de proteína 648 que a célula pode acumular antes de iniciar a *lise* e ação das proteases.

Com relação à expressão da proteína 648 cultivada no meio TB em biorreator, o mesmo comportamento tem sido observado em incubador rotativo, para o clone 648, cultivado no meio TB induzido por IPTG (Ensaio F02) que atingiu a máxima concentração da proteína

648 intracelular de 0,018 g/L. Nota-se que a proteína 648 apresentou uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) de 0,05 g.g<sup>-1</sup> no instante de 5 h, correspondendo à máxima fração de proteína 648 que a célula pode acumular antes de iniciar a *lise*.

A partir dos resultados obtidos dos ensaios F05/F06-648 2xTY/TB induzidos por IPTG, foram estimados os parâmetros cinéticos, cujos valores são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por IPTG em biorreator.

Ensaio	X <sub>f</sub> (g/L)	Ac. Acético (g/L)	T <sub>f</sub> (h)	μ <sub>xma*</sub> (h <sup>-1</sup> )	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )	[PI] (g/L)	t[Prot] <sub>Máx</sub> (h)	P <sub>x</sub> (g/L.h)	P <sub>p/x</sub> (g/g)	P <sub>p</sub> (g/L.h)
F05 648/2xTY	1,78	0,65	4	0,173	0,196	0,1382	5	1,4774	0,08	0,032
F06 648/TB	3,4	2,79	12	0,076	0,086	0,1148	4	1,5538	0,05	0,031

PI- proteína intracelular

Ac. Acético- ácido acético

De modo geral, o comportamento cinético do crescimento celular do clone recombinante 648, sofreu mudanças significativas nos ensaios com indução quando comparados com os ensaios sem indução. Percebe-se que nos ensaios com indução ocorre um crescimento celular inferior em relação aos ensaios sem indução o que sugere a mudança do metabolismo de crescimento para produção da proteína de interesse, e diferente do ocorrido com o clone 648, pois um incremento no crescimento celular foi verificado nos ensaios com indução. A toxicidade do IPTG promove um estresse metabólico e uma redução no crescimento do micro-organismo, assim, a adição do indutor promove uma mudança na maquinaria de expressão gênica principalmente para a produção da proteína recombinante (Pei *et al.*, 2011).

Em relação aos ensaios F05 (clone 648 no meio 2xTY ) e F06 (clone 648 no meio TB) induzidos por IPTG, observa-se que a composição do meio TB, provocou um incremento significativo de aproximadamente 91% na concentração celular final (de 1,78 g/L para 3,4 g/L). Entretanto, com relação à expressão da proteína nota-se melhores resultados no meio 2xTY. Vale salientar que no ensaio F06 (clone 648 meio TB) a velocidade específica de crescimento no instante da indução foi de 0,086 h<sup>-1</sup>, valor este inferior à velocidade específica de crescimento do ensaio F05 (clone 648 meio 2xTY) que foi de 0,19 h<sup>-1</sup>, o que pode ter provocado (no meio TB) uma baixa produção específica  $P_{P/X}$  (0,05 g.g<sup>-1</sup>) quando comparado a o meio 2xTY (0,08 g.g<sup>-1</sup>).

Para os ensaios realizados em biorreator, mais uma vez percebe-se que em termos de expressão, o meio 2xTY foi o mais adequado para síntese protéica, talvez por possuir uma quantidade elevada de triptona que supre a bactéria com aminoácidos e vitaminas suficiente para favorecer a síntese proteica, além disso, a baixa concentração de extrato de levedura em relação ao meio TB talvez ocasione um menor acúmulo do inibidor ácido acético. A concentração de ácido acético para o clone 648 no meio TB atingiu o valor de 2,79 g/L, valor considerado elevado quando comparado ao valor crítico (0,9 g/L) que o ácido acético começa a exercer efeito inibitório sobre o crescimento e expressão (Xue *et al.*, 2010).

#### **4.1.4 – Ensaios com indução por Lactose visando analisar a expressão da proteína em incubador rotativo**

O IPTG representa hoje um dos indutores mais utilizados nos mais diversos sistemas de alta expressão. Apesar de sua eficácia como indutor nos vários sistemas de expressão, uma das grandes desvantagens do uso do IPTG consiste no fato de ser tóxico à maioria das células. Assim, devido a sua toxicidade e elevado custo, a utilização do IPTG como indutor limita a produção em maior escala de uma proteína de interesse. Um indutor alternativo ao IPTG é a lactose, porém um pequeno número de trabalhos pode ser encontrado na literatura descrevendo esse último indutor para expressão de proteínas heterólogas (Tian *et al.*, 2011).

Desta forma, nesse conjunto de ensaios procedeu-se a indução por lactose a fim de verificar o comportamento deste indutor na expressão dos antígenos (648 e 503) de *Leishmania i. chagasi* comparando-o com IPTG.

A adição da lactose foi feita no mesmo tempo quando se utilizou o IPTG. Início da fase exponencial de crescimento quando atingia-se a densidade ótica ( $DO_{590nm}$  entre 0,4 -0,5) (Ma *et al.*, 2006; Xue *et al.*, 2010).

As Figuras 22 (A e B) apresentam o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e proteína total (intra e extracelular) para o ensaio F15 (Meio 2xTY clone 503 induzido por lactose) e F16 (Meio TB clone 503 induzido por lactose).

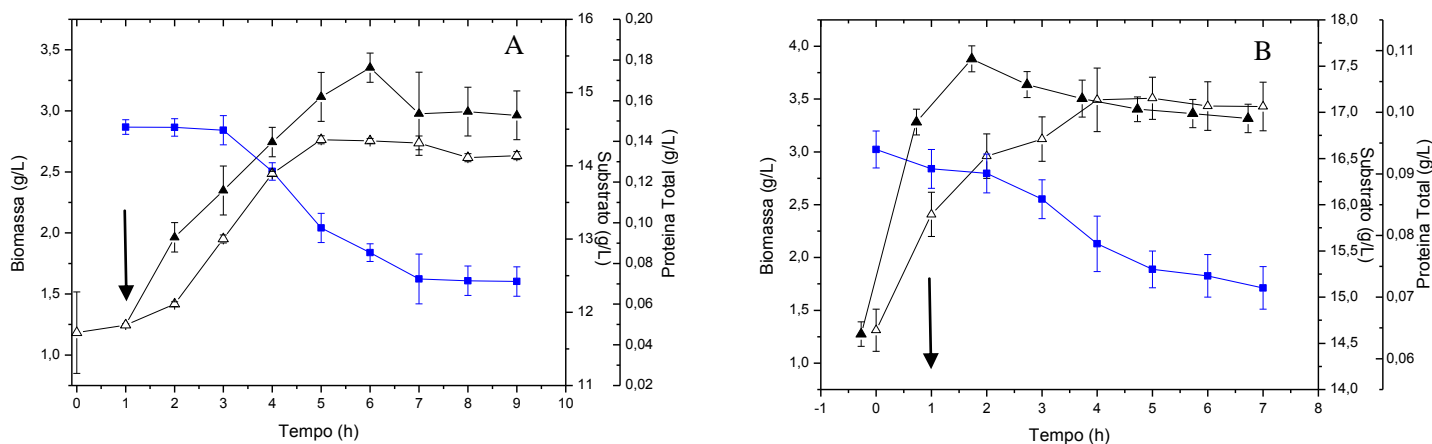


Figura 22 - Comportamento do crescimento celular (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína total 503 (Δ) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm, induzido por Lactose : (A) ensaio F15 (503/2xTY), (B) ensaio F16 (503/TB).

Para o clone 503 (Figura 22A), pode-se observar que o tempo necessário para atingir a máxima concentração celular  $X_{m\acute{a}x}$  (3,35 g/L) foi de 6 horas de cultivo. Com relação ao consumo de substrato, observa-se que o clone 503 apresentou um discreto consumo do substrato nas primeiras 7 horas de cultivo.

O ensaio F15 (Meio 2xTY clone 503), induzido por lactose quando comparado ao ensaio F13 (Meio 2xTY clone 503) induzido por IPTG conforme mostrado nas Tabelas 3 e 4, apresentou um acréscimo de 60% na máxima concentração celular de 2,10 para 3,35 g/L, além disso, a máxima concentração do ácido acético atingida (0,57 g/L) foi apenas 23% inferior quando comparado ao ensaio F13 (0,46 g/L).

Em termos de expressão, a concentração máxima atingida pela proteína foi de 0,14 g/L de proteína total (intra e extracelular). A expressão da proteína 503 induzida por lactose apresenta comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) no valor de (0,026  $g \cdot g^{-1}$ ) no instante de 5 horas de cultivo. O mesmo comportamento tem sido observado para o clone 503 cultivado no meio 2xTY induzido por IPTG. Para o ensaio F15, que atingiu a máxima concentração da proteína 503 intracelular de 0,079 g/L foi 65% superior quando comparado ao ensaio F13 induzido por IPTG que foi 0,052 g/L.

Em termos de estabilidade foi observado comportamento diferente na expressão da proteína 503 quando se compara os ensaios induzidos por IPTG com a lactose, uma vez que a indução por IPTG foi mais rápida, entretanto, com a indução por lactose parece não haver perceptivelmente a *lise* celular, uma vez que a proteína permanece estável ao longo do cultivo.

Para o clone 503 (Figura 22B), pode-se observar que o tempo necessário para atingir o  $X_{m\acute{a}x}$  (3,5 g/L) foi de 5 horas de cultivo. Com relação ao consumo de substrato, observa-se que o clone 503 apresentou um discreto consumo do substrato nas primeiras 8 horas de cultivo.

O ensaio F16 (Meio TB clone 503) induzido por lactose quando comparado ao ensaio F14 (Meio TB clone 503) induzido por IPTG, conforme mostrado nas Tabelas 4 e 8, apresentou um crescimento de 60% na máxima concentração celular (de 5,6 para 3,5 g/L), lm disso, a máxima concentração do ácido acético atingida (1,78 g/L) foi apenas 39 % superior quando comparado ao ensaio F14 (1,28 g/L).

Em termos de expressão, a concentração máxima atingida pela proteína 503 induzida por lactose foi de 0,11 g/L de proteína total (intra e extracelular) nos dois meios. A expressão da proteína 503 apresenta um comportamento similar quando cultivada no meio TB induzido por IPTG. O ensaio F16 induzido por lactose atingiu a máxima concentração da proteína 503 intracelular (0,058 g/L) 18% superior quando comparado ao ensaio F14 induzido por IPTG (0,049 g/L).

Em termos de estabilidade foi observado comportamento similar a expressão da proteína 503 cultivada no meio TB induzido por IPTG em incubador rotativo (Ensaio F14).

A partir dos resultados obtidos com o clone 503 nos meios de cultivo (2xTY e TB), ensaios F15/F16-503 2xTY/TB, foram estimados os parâmetros cinéticos, cujo valores são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por lactose em incubador rotativo.

Ensaio	$X_{m\acute{a}x}$ (g/L)	Acético (g/L)	$T_f$ (h)	$\mu_{xmax}$ * (h <sup>-1</sup> )	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	[PI] (g/L)	$t[Prot]_{Max}$ (h)	$P_{p/x}$ (g/g)	$\mu_P$ (g/g.h)
F15 503/2xTY	3,35	0,57	6	0,13	0,45	0,079	5	0,026	0,008
F16 503/TB	3,50	1,78	6	0,38	0,41	0,058	3	0,025	0,004

\* Resultados obtidos durante a fase exponencial

PI- proteína intracelular

Em relação aos ensaios F15 (clone 503 no meio 2xTY ) e F16 (clone 503 no meio TB), observa-se que a composição do meio TB, parece resultar em um incremento não muito significativo na máxima concentração celular (de 3,35 g/L para 3,5 g/L), por outro lado,

incremento significativo, de aproximadamente 192%, foi observado no valor da velocidade específica máxima de crescimento (de  $0,13 \text{ h}^{-1}$  para  $0,38 \text{ h}^{-1}$ ). Com relação à expressão da proteína nota-se melhores resultados no meio 2xTY. Vale notar que no ensaio F16 (clone 503 meio TB) a velocidade específica de crescimento no instante da indução  $0,41 \text{ h}^{-1}$  é levemente inferior à velocidade específica de crescimento ( $0,45 \text{ h}^{-1}$ ) do ensaio F15 (clone 503 meio 2xTY), o que pode ter provocado (no meio TB) uma velocidade de síntese protéica mais lenta  $\mu_p$  ( $0,004 \text{ g/g.h}$ ) resultando em baixa produção específica  $P_{p/X}$  ( $0,025 \text{ g.g}^{-1}$ ) enquanto que para o meio 2xTY produção específica ( $0,026 \text{ g.g}^{-1}$ ).

Comparando-se os dois ensaios (F15 e F16), foi observado que em termos de crescimento o meio TB apresentou melhores resultados por apresentar uma maior concentração da fonte de carbono (extrato de levedura e uma fonte extra de carbono (glicerol), além do fosfato o que pode ter favorecido o metabolismo primário do clone 503.

Adotando-se a lactose como indutor, investigou-se o tipo de expressão (intra ou extracelular) do antígeno 503 de *Leishmania i. chagasi* em incubador rotativo utilizando dois diferentes meios (2xTY e TB). As Figuras 24A e 24B descrevem a produção da proteína intra e extracelular do clone 503 nos meios de cultivo (2xTY e TB) induzido por lactose em incubador rotativo.

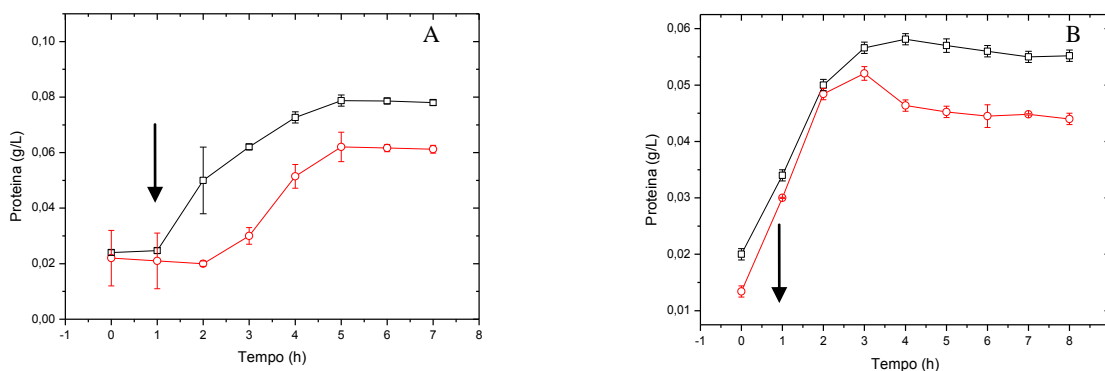


Figura 23 - Produção da proteína intracelular (□) e extracelular (○) induzido por lactose em incubador rotativo a  $37^{\circ}\text{C}$  e 200 rpm (A) ensaio F15 (503/2xTY), (B) ensaio F16 (503/TB).

Pode-se notar em termos de expressão, Figura 23 (A), que logo após indução houve um incremento na concentração de proteína atingindo a máxima concentração da proteína intracelular ( $0,079 \text{ g/L}$ ) e extracelular ( $0,06 \text{ g/L}$ ) no instante de 5 horas de cultivo. Para o clone 503 cultivado no meio TB, Figura 23 (B), o momento de maior expressão ocorreu às 3 horas de cultivo atingindo a máxima concentração tanto intracelular ( $0,058 \text{ g/L}$ ) quanto para extracelular ( $0,052 \text{ g/L}$ ). Percebe-se que nos ensaios submetidos à indução por lactose ocorre

uma estabilidade protéica após o acúmulo, diferentemente dos ensaios induzidos por IPTG, onde a toxicidade do mesmo pode promover um estresse metabólico secreção da proteína intracelular para o meio poderá ser afetada (Pei *et al.*, 2011).

Desta forma, levando-se em consideração o conteúdo protéico e a estabilidade, a lactose parece ser um indutor promissor para síntese nestes casos. Para os ensaios do clone 648, submetidos à indução por IPTG, apesar de nestes casos se obter a máxima concentração da proteína no meio 2xTY (0,18 g/L), percebe-se que as células após indução por IPTG, sofrem a *lise* celular, após algumas horas de indução, fato que não foi observado nos ensaios induzidos com a lactose. A causa deste comportamento pode estar relacionada ao acúmulo maior e mais rápido da proteína nos ensaios submetidos à indução por IPTG o que significa uma diminuição de outras atividades celulares que não a síntese protéica (Wang *et al.*, 2010).

Neste contexto, com o objetivo de comparar o parâmetro produtividade dos clones 648 e 503 e verificar a influência da indução por IPTG e lactose a Figura 24 ilustra o comportamento da produtividade em células dos clones 648 e 503 submetidos à indução por IPTG e lactose em incubador rotativo. Ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648 (induzido com IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503 (induzido com IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido com lactose).

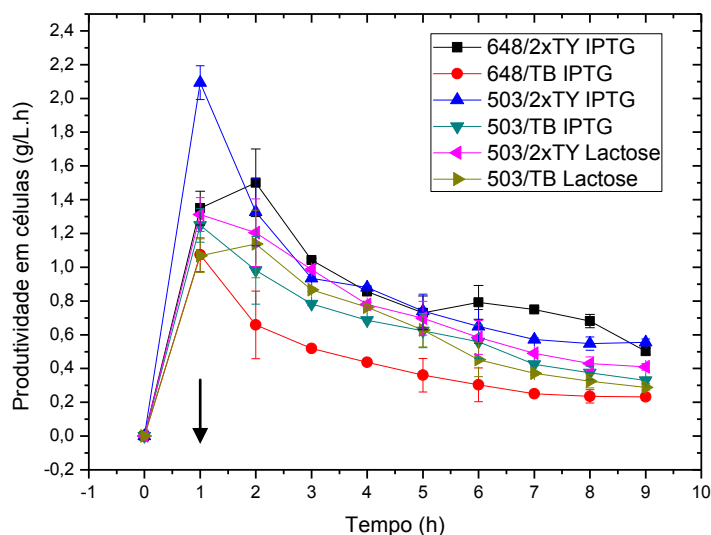


Figura 24 - Produtividades em células dos ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648( induzido por IPTG), F13/F14 - 2xTY-TB/503( induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Ao se considerar o parâmetro produtividade, pode-se observar que a maioria dos ensaios, exceto os ensaios F02 (Meio TB clone 648) e F14 (Meio 2xTY clone 648), atingiram maior produtividade durante 1 hora de cultivo, no instante em que foi realizada a indução. Entretanto, o ensaio F14 (Meio TB clone 503) apresentou melhor valor de produtividade (2,09 g/L.h) em relação a todos os demais que atingiram valores de aproximadamente 1,3 g/L.h. É interessante ressaltar que o ensaio F14 (Meio TB clone 503) foi o que apresentou também maior concentração celular no instante de indução no valor de 2,09 g/L, o que significa que o conhecimento das condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução parece favorecer a produtividade em células. Liria (1995) trabalhando com o cultivo de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS em processos descontínuo e descontínuo alimentado para a obtenção de elevada produção da proteína Troponina C (TnC), obteve valores de produtividade 0,7 g/L.h, utilizando o IPTG como indutor e realizando o procedimento de indução no instante em que a concentração celular foi de 6,5 g/L no início da fase exponencial. Gombert (1996) e Panda *et al* (1999), trabalhando com o mesmo processo de Liria, realizou uma indução no instante em que a concentração celular X foi de 4,2 g/L e 3,2 g/L, respectivamente. A produtividade da proteína P<sub>p</sub> foi de 1 g/L.h e 0,2 g/L.h, respectivamente. Valores estes são inferiores aos obtidos no presente trabalho exceto para o ensaio F14 (Meio TB clone 503) que apresentou melhor valor de produtividade (2,09 g/L.h). Desta forma, mais uma vez reforçando a importância do conhecimento das condições fisiológicas do micro-organismo no instante de indução a fim de otimizar a produção da proteína recombinante.

Em se tratando do parâmetro produtividade em células, Figura 24, observou-se que no instante de 1 hora de cultivo as produtividades são bem diferentes entre os clones e os meios testados, apresentando valores crescentes no instante de 1 hora (fase exponencial). Observou-se que : Meio 2xTY clone 503 Lactose > Meio 2xTY clone 648 IPTG > Meio TB 503 Lactose > Meio TB 648 IPTG > Meio TB clone 503 induzido por IPTG. Verificando-se a maior produtividade em células para o clone 503 meio TB no ensaio induzido por IPTG (2,09 g/L h).

A Figura 25 abaixo ilustra um comportamento semelhante para a produtividade das proteínas 648 e 503 em relação a todos os ensaios realizados em incubador rotativo, com indução por IPTG e lactose.

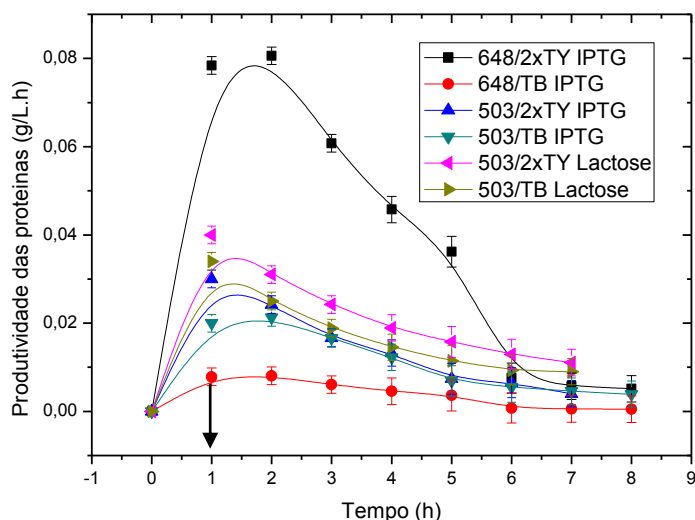


Figura 25- Produtividade das proteínas 648 e 503 dos ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648 (induzido por IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503( induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503( induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Nota-se que a maioria dos ensaios atingiram a máxima produtividade das proteínas 648 e 503, durante 1 hora de cultivo, no instante em que foi realizada a indução. O ensaio F01 (Meio 2xTY clone 648) induzido por IPTG apresentou melhor valor desta produtividade (0,08 g/L.h) quando comparado com os demais ensaios que atingiram valores de aproximadamente 0,04 g/L.h. É interessante ressaltar que o ensaio F15 (Meio 2xTY clone 503) induzido por lactose foi o que apresentou melhor taxa de crescimento específico no instante de indução  $\mu_x$  (0,45 h<sup>-1</sup>), resultando em uma síntese mais rápida de proteína  $\mu_p$  (0,008 g/g.h), e maior rendimento específico da proteína (0,026 g/g) em relação ao demais ensaios. Assim, levando-se em consideração o fator custo, toxicidade, estabilidade e a elevada produção do inibidor ácido acético, observa-se a maior produtividade da proteína 503 cultivada no meio 2xTY induzido por lactose (0,04 g/L h).

A literatura relata muitos estudos com o objetivo de aumentar a produtividade de proteínas recombinantes utilizando bactérias como hospedeiros, tais como: manutenção de alta dosagem de gene, redução da toxicidade, aumento da estabilidade proteolítica da proteína, composição do meio de cultivo, entre outros (Hortsch & Weuster-Botz., 2011). Verifica-se que o acúmulo de proteína nos ensaios induzidos por IPTG e lactose são diferente e parece não ser possível obter o mesmo acúmulo intracelular quando são utilizadas estas duas moléculas indutoras. A explicação para este fato está ligada a forma de ação de cada uma das moléculas indutoras (Pei *et al.*, 2011).

Desta forma, algumas considerações sobre a utilização da lactose como molécula indutora devem ser feitas. De acordo com trabalhos realizados por Tian *et al.* (2011), a lactose apresenta grande vantagem como molécula indutora em relação ao IPTG, devido ao elevado custo deste último composto. Além desta vantagem, Wang *et al.* (2010), ainda levantam a questão da toxicidade do IPTG em relação a humanos, nesse caso, para o presente trabalho em que um dos interesses consiste na produção de proteínas recombinantes a serem testadas como *kits* para diagnóstico da leishmaniose, torna-se ainda maior a necessidade de obter um bioproduto purificado e isento de endotoxinas. Portanto, o estudo das condições de cultivo que proporcionam um alto acúmulo de proteína na indução por IPTG ou lactose deve ser conduzido levando-se em conta a diferença principal na utilização destes dois compostos pelas células. O IPTG é um indutor que age apenas bloqueando o repressor produzido gene *lac I*, não dependendo do sistema de transporte da lactose permease para entrar na célula microbiana. Apresenta livre penetração na célula mesmo em presença de glicose e tem sua utilização muito difundida na literatura, apesar de ser um indutor de custo elevadíssimo (Tran *et al.*, 2011). Apesar da diferença não ser tão significativa na produção específica da proteína dos ensaios induzidos por IPTG em relação à lactose, acredita-se que os resultados obtidos no presente estudo demonstram a importância de seguir estudos utilizando a lactose como molécula indutora da síntese da proteína de interesse, principalmente, se for levado em conta o fator custo para a ampliação de escala. E mais, na indução por lactose as células parecem não entrar num processo que as leve a *lise* celular. Nos ensaios realizados por Liria (1995) e Tran *et al* (2010) com IPTG, pode-se observar a ocorrência da *lise* celular após algumas horas de indução, fato que não foi notado neste trabalho nos ensaios induzidos por lactose.

Com o objetivo de analisar a forma de atuação do IPTG e lactose, para os dois clones (648 e 503), a Figura 26, mostra a velocidade de síntese de proteína dos ensaios submetidos à indução por IPTG e lactose.

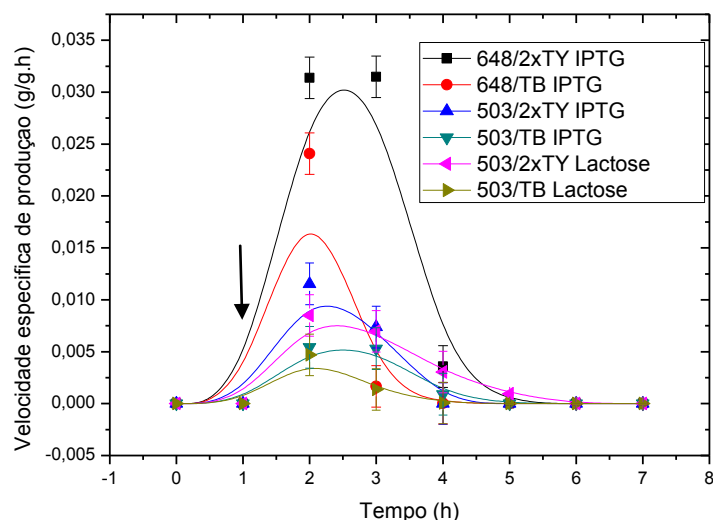


Figura 26 - Velocidade específica de produção das proteínas 648 e 503 ensaios F01/F02- 2xTY-TB/648 (induzido por IPTG), F13/F14 -2xTY-TB/503 (induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Na Figura 26, verifica-se que nos ensaios submetidos à indução por IPTG houve uma alta velocidade de síntese de proteína em relação aos demais ensaios induzidos por Lactose. Para o ensaio F01-clone 648 no meio 2xTY induzido por IPTG, a velocidade de síntese atingiu o patamar de 0,03 g/g.h. Assim, nos ensaios induzidos por IPTG, pode-se observar uma alta velocidade de síntese proteica ( $\mu_p$ ) sugerindo está relacionada ao fato de o IPTG, unir-se a molécula repressora por uma difusão simples ou transporte ativo, resultando numa rápida indução (Kotik *et al.*, 2004). Entretanto, nos ensaios induzidos por lactose, para unir-se a molécula repressora são necessárias algumas etapas extras. Primeiramente a célula deve sintetizar uma enzima lactose permease que irá permitir o transporte da lactose para o interior da célula e depois a lactose deve ser convertida pela beta-galactosidase (enzima que decompõe a lactose em galactose e glicose), portanto, pode-se observar altos valores de velocidades específicas de produção (Figura 32), tal comportamento pode ser decorrente da alta carga metabólica que foi observada quando utiliza o IPTG como molécula indutora (Kilikian *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2011).

Se considerar que na análise desempenho do processo a produtividade é um parâmetro importante, o ensaio F01-meio 2xTY-clone 648 induzido por IPTG apresentou melhor desempenho, pois sua produtividade foi 2 vezes maior quando comparado ao ensaio F15-meio 2xTY-clone 503 induzido por lactose. Entretanto, em processos utilizando à tecnologia do DNA recombinante a produtividade pode não ser um critério determinante para definir o desempenho de um cultivo, pois se consideram processos que resultem em alto valor

agregado. Então, um critério que pode ser considerado é a concentração final do produto recombinante. Desta forma, o ensaio F15-meio 2xTY-clone 503 induzido por lactose apresentou melhor desempenho, pois o mesmo não apresentou *lise* celular durante a indução, o acúmulo de proteína foi mais estável, apesar da sua concentração não ser significativamente superior ao ensaio F01. Além disso, pode-se verificar que o ensaio com o clone 648 acarretou numa maior formação do metabólito inibidor (ácido acético).

A Figura 27, mostra o comportamento da indução do clone 503 em incubador rotativo pela ação das duas moléculas indutoras (IPTG e lactose) nos dois meios de cultivo (2xTY e TB) e o seu efeito na velocidade específica de crescimento.

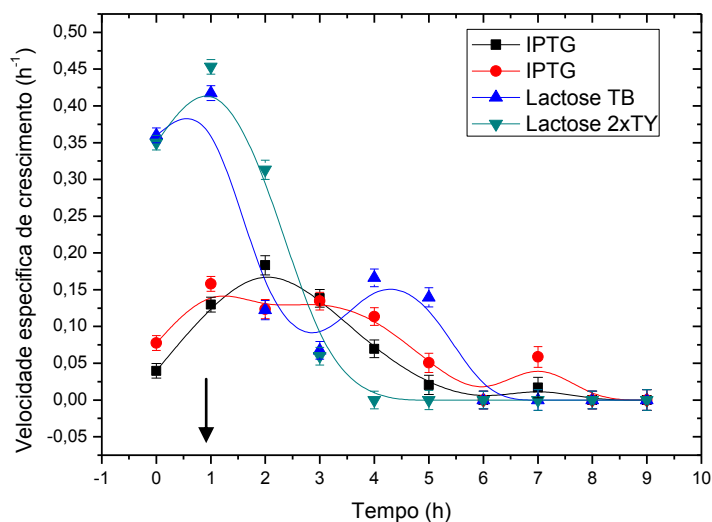


Figura 27- Velocidades específicas de crescimento dos ensaios F13/F14 -2xTY-TB/503 (induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503 (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Observa-se na Figura 27 que os ensaios com o clone 503 cultivado no meio 2xTY induzido por lactose apresentou uma maior da velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) de  $0,45 \text{ h}^{-1}$ . Como é esperada, a velocidade específica de crescimento diminuiu consideravelmente logo após de iniciada a etapa de indução, 1 hora de cultivo, queda essa sendo visível para os ensaios F15 e F16 nos quais a lactose foi utilizada como molécula indutora. Possivelmente, a redução da velocidade específica de crescimento foi originada pela síntese rápida da proteína de interesse acarretando uma mudança do metabolismo de crescimento para o da expressão da proteína. Além disso, percebe-se que os ensaios F13/F14 induzidos por IPTG, pode causar uma resposta de estresse metabólico que pode ter afetado o metabolismo desse clone e resultar na queda da velocidade específica de crescimento. Neste

caso, a concentração de ácido acético atingiu valor inferior a 0,9 g/L, o que pode não ter exercido efeito inibitório no crescimento e na síntese da proteína (Xue *et al.*, 2010).

Finalmente, pode-se supor que o processo de indução para esta *Escherichia coli* com este sistema de expressão faz com que a atividade celular mude da fase de crescimento para a produção da proteína recombinante de forma gradual. Esta mudança é bastante acentuada para o ensaio F15 (Meio 2xTY clone 503), Figura 33, no qual observou-se uma queda mais acentuada no valor da velocidade máxima específica de crescimento após indução, resultando uma síntese de proteína mais rápida no valor de  $\mu_p = 0,008 \text{ g/gh}$  e maior produção específica de  $P_{P/X} = 0,026 \text{ g.g}^{-1}$ , em relação a todos os ensaios com indução. Conferindo, em termos de expressão, maior estabilidade para o clone 503 cultivado no meio 2xTY induzido por lactose. Por outro lado, comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os de Panda *et al.* (1999); Heyland *et al.* (2011) observou-se que os mesmos corroboram com os obtidos no presente estudo, onde também indicaram um aumento da concentração da proteína com a diminuição da velocidade máxima específica de crescimento.

Com o objetivo de avaliar a influência dos indutores (IPTG ou lactose) na velocidade específica de formação de ácido acético, a Figura 28, mostra o comportamento velocidade específica de formação de ácido acético no decorrer o tempo.

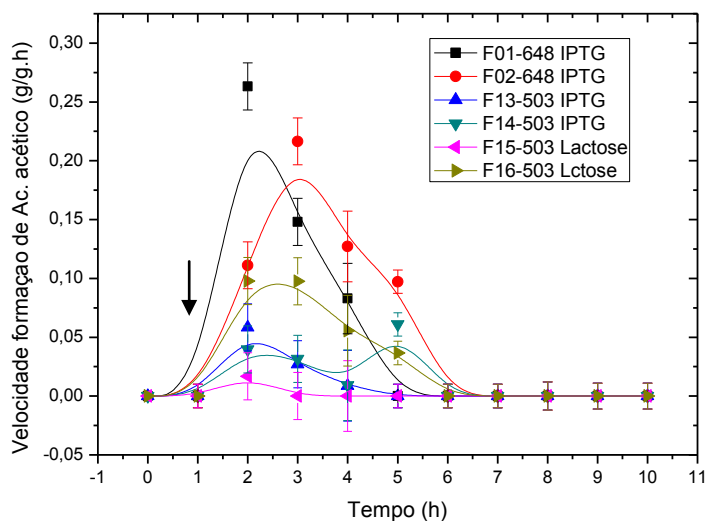


Figura 28- Velocidades específicas de formação de ácido acético dos ensaios F01/F02-648, F13/F14-503, F15/F16-503 (induzido por IPTG), F15/F16-2xTY-TB/503(induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Para o ensaio F01- clone 648-meio 2xTY induzido por IPTG, Figura 28, observou-se que a máxima velocidade específica de formação de ácido acético ( $\mu_{Ac \text{ máx}}$ ) foi de 0,26 g/g.h,

19% superior quando comparado com o ensaio F02-clone 648-Meio TB induzido por IPTG, que atingiu a máxima velocidade específica de formação de ácido acético ( $\mu_{Ac\ máx}$ ) de 0,21 g/g.h. Entretanto, para o ensaio F02 (Figura 29) observou-se que o mesmo apresentou a máxima concentração de ácido acético de 4,1 g/L que foi 5% superior quando comparado máxima concentração de ácido acético de 3,9 g/L para o ensaio F01. Pode-se observar a máxima velocidade específica de formação de ácido acético nos ensaios induzidos por IPTG, uma vez que este indutor parece ser propício a resultar em estresse metabólico e uma queda na estabilidade protéica.

A formação de ácido acético, em cultivos em *E.coli*, tem sido freqüentemente discutida na literatura e há um consenso na necessidade de se evitar a formação desse metabólito (Valgepea *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010), uma vez que um dos maiores problemas da expressão em *E.coli* é o acúmulo de acetato ao longo de cultivo o que contribui para redução do crescimento e expressão da proteína alvo (Jana & Deby, 2005, Eiteman & Alteman, 2006, Tian *et al.*, 2011). Em meio de cultivo complexo, a quantidade de nutrientes (disponível sob a forma de aminoácidos e vitaminas presentes no extrato de levedura ou bacto-triptona) faz com que o microrganismo consuma estes compostos para biossíntese, e a fonte de carbono (lactose) para obtenção de energia, utilizando as vias fermentativas como forma de regulação do fluxo de nutrientes presentes. A elevada concentração de extrato de levedura no meio TB pode acarretar uma maior concentração de subprodutos no meio de cultivo, como por exemplo, o ácido acético (Xue *et al.*, 2010). Assim, a Figura 29, ilustra o comportamento da concentração de ácido acético produzido pelo metabolismo dos clones 648 e 503 cultivados nos dois meios (2xTY e TB) induzidos por IPTG ou lactose.

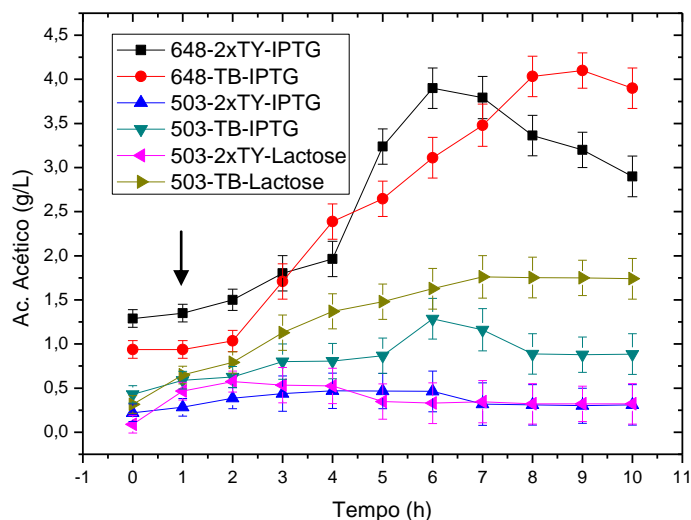


Figura 29- Concentração de ácido acético dos ensaios F01/F02 (648-2xTY/TB)-(induzido por IPTG) , F13/F14-(503/2xTY/TB)( induzido por IPTG), F15/F16-(503/2xTY/TB)- (induzido por lactose) em incubador rotativo a 37°C e 200 rpm.

Na Figura 29, observa-se que o cultivo do clone 648 atingiu a máxima concentração de ácido acético no meio TB (4,1 g/L) no final da fase exponencial. E enquanto para o clone 503, a máxima concentração de ácido acético foi também atingida no meio TB (1,76 g/L). Assim, a concentração de ácido acético para clone 503, por atingir valor um pouco acima do valor crítico a 0,9 g/L, deve exercer efeito inibitório parcial no crescimento e expressão (Xue *et al.*, 2010). No cultivo do clone 648, observa-se uma produção de ácido acético acima do valor crítico o que representa um problema para o processo. Com em relação ao clone 503-meio TB induzido por Lactose e IPTG, a concentração de ácido acético atingiu o valores de 1,76 g/L e 1,26 g/L, respectivamente. Neste caso, a concentração de ácido acético está um pouco acima do valor crítico 0,9 g/L, podendo assim, comprometer o processo (Xue *et al.*, 2010).

#### 4.1.5 - Ensaios com indução por Lactose em biorreator de bancada

A lactose pode ser uma alternativa ao IPTG na indução de diferentes proteínas recombinantes devido ao baixo custo agregado, por não apresentar toxicidade às células e ainda funcionar como fonte de carbono e energia, diferentemente dos casos onde o IPTG é utilizado (Gombert & Kilikian, 1998; Pei *et al.*, 2011).

O IPTG é um forte indutor químico utilizado largamente na indução de promotores (Makrides, 1996). Entretanto, estudos demonstram que somente o IPTG (independente da

produção de proteína recombinante) pode causar uma resposta de estresse em *E.coli* (Tomazetto *et al.*, 2007). E ainda, o uso desse indutor é indesejável na produção de proteínas recombinantes com finalidade terapêutica ou na produção em larga-escala devido ao alto custo desse indutor (Donovan *et al.*, 1996, Gombert & Kilikian, 1998 e Pei *et al.*, 2011).

Para avaliar a influência do tipo de indutor na expressão das proteínas, um terceiro conjunto de ensaios foi submetido a um procedimento de indução por Lactose para verificar a influência desse indutor na expressão de antígenos recombinantes (648 e 503) *L. i. chagasi* em biorreator de bancada.

Com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em maior escala, os melhores resultados obtidos em incubador rotativo foram reproduzidos em biorreator de bancada Biostat B (B. Braun Biotech International) de 1,5 L de volume nas mesmas condições de pH, temperatura, velocidade de agitação e vazão de aeração do terceiro conjunto de ensaios do presente estudo.

A Figura 30, apresenta comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e concentração de proteína 648 intracelular para o ensaio F07 (Meio 2xTY clone 648) induzido por lactose.

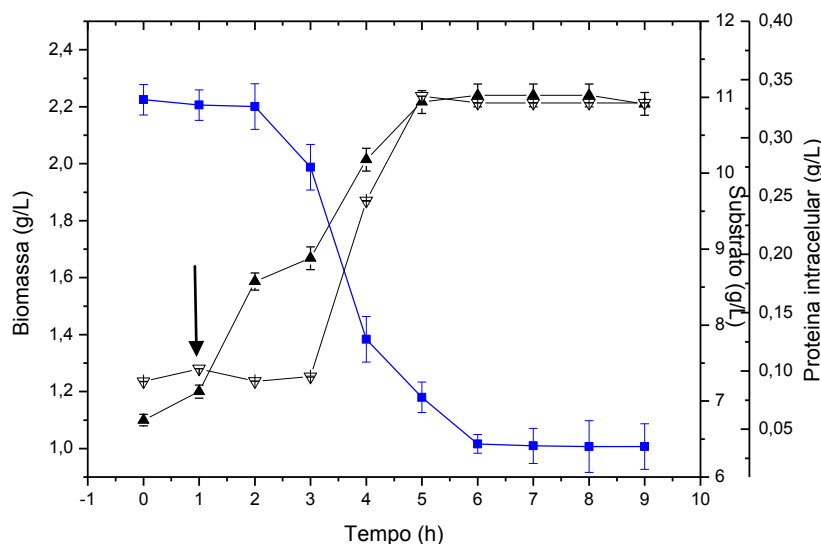


Figura 30- Comportamento do crescimento celular (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína 648 intracelular (▼) no Meio 2xTY (induzido por Lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm.

Com relação ao consumo de substrato, observou-se que o clone 648 no meio 2xTY teve um consumo do substrato acentuado nas primeiras 6 horas de cultivo, o que coincide com duração da fase exponencial de crescimento.

O ensaio F07 (Meio 2xTY clone 648) induzido por lactose atingiu a máxima concentração celular (2,24 g/L) que foi 25% superior quando comparado ao ensaio F05 (Meio 2xTY clone 648 induzido por IPTG (1,78 g/L), conforme mostrado na Tabela 6. Além disso, verifica-se para o clone 648 cultivado no meio 2xTY induzido por lactose atingiu a máxima concentração de ácido acético de 1,36 g/L sendo 100% superior quando comparado ao ensaio F05 induzido por IPTG que foi 0,65g/L.

A Figura 30 mostra que concentração da proteína aumentou até o discreto consumo da fonte de carbono, instante no qual se observa uma queda rápida da concentração de proteína. Esta diminuição da concentração de proteína poderia ser explicada pelo fato de que a célula, ao ser limitado pela fonte de carbono ativa suas proteases. Nota-se que a expressão da proteína 648 apresenta um comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/X}$ ) no valor de (0,15 g.g<sup>-1</sup>) no instante de 5 h, correspondendo à máxima fração de proteína 648 que a célula pode acumular antes de iniciar a secreção da proteína para o meio de cultivo. Comportamento similar têm sido observado para o clone 648 quando cultivado no meio 2xTY induzido por IPTG; ensaio F07, que atingiu a máxima concentração da proteína 648 intracelular de 0,33 g/L que foi 39% superior quando comparado a máxima concentração da proteína 648 intracelular induzido por IPTG que foi de 0,13 g/L.

A Figura 31 apresenta o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e concentração de proteína 648, intracelular, para o ensaio F08 (Meio TB clone 648) induzido por lactose.

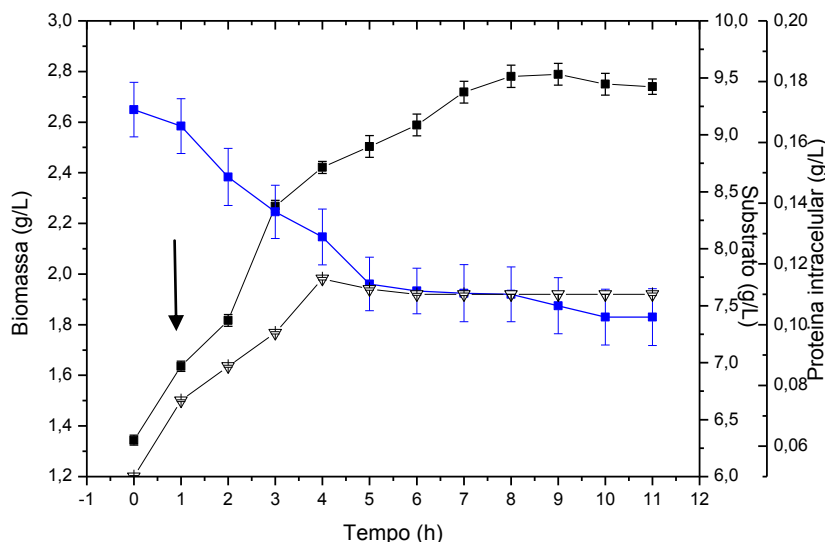


Figura 31- Curvas de crescimento (▲), consumo do substrato (■) e concentração da proteína 648 intracelular (▽) no Meio TB ( induzido por Lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm.

Este ensaio apresentou um acréscimo de 21% na máxima concentração celular (de 2,79 g/L para 3,4g/L) quando comparado ao ensaio F06 (Meio TB clone 648) induzido por IPTG, conforme mostrado nas Tabelas 6 e 10, além disso, alcançou-se uma máxima concentração do ácido acético de 0,52 g/L que foi 81% inferior quando comparado ao ensaio F06 (Meio TB clone 648) induzido por IPTG (2,79 g/L).

Além disso, nota-se na Figura 31, que a concentração da proteína aumentou até o esgotamento da fonte de carbono e que a redução da concentração de proteína no meio TB poderia ser explicada pela ação das proteases, além disso, observa-se também que a expressão da proteína 648 apresenta um comportamento associado ao crescimento, com uma expressão específica máxima ( $P_{P/x}$ ) no valor de  $(0,04 \text{ g.g}^{-1})$  no instante de 6 h, correspondendo à máxima fração de proteína 648 que a célula pode acumular antes de iniciar a secreção da proteína para o meio extracelular. Comportamentos similares têm sido observado para o clone 648 quando cultivado no meio TB induzido por IPTG, ensaio F06, em que se atingiu a máxima concentração da proteína 648 intracelular (0,11 g/L), a mesma concentração também foi atingida para o ensaio F08 induzido por lactose.

A partir dos resultados obtidos dos ensaios F07/F08-648 2xTY/TB, induzido por lactose, foram obtidos os parâmetros cinéticos, cujo valores são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos obtidos dos ensaios com indução por lactose em biorreator.

Ensaio	$X_{máx}$ (g/L)	Ac.Acético (g/L)	$T_f$ (h)	$\mu_{xmax}$ * (h <sup>-1</sup> )	$\mu_x$ (h <sup>-1</sup> )	[Proteína intra] $M_{max}$ (g/L)	$t[Prot]_{Max}$ (h)	$P_x$ (g/Lh)	$P_{p/x}$ (g/g)	$P_p$ (g/l.h)	$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )
F07 648/2xTY	2,24	1,36	6	0,1459	0,1418	0,3357	5	1,200	0,15	0,1018	2,05
F08 648/TB	2,79	0,52	9	0,1288	0,0033	0,1151	4	1,636	0,05	0,0750	2,08

Nos ensaios induzidos por lactose, para o F08 (clone 648 meio TB) a velocidade específica de crescimento no instante de indução 0,003 h<sup>-1</sup> é inferior à velocidade específica de crescimento (0,14 h<sup>-1</sup>) à do ensaio F07 (clone 648 meio 2xTY), o que pode ter provocado (no meio TB) uma velocidade de síntese protéica mais lenta  $\mu_p$  (0,001 g/g.h) resultando em baixa produção específica  $P_{p/X}$  (0,04 g.g<sup>-1</sup>) enquanto que para o meio 2xTY produção específica (0,14 g.g<sup>-1</sup>). Mais uma vez reforçando a importância do conhecimento das condições fisiológicas do microrganismo no instante de indução a fim de otimizar a produção da proteína recombinante. Entretanto, em relação à produção do inibidor ácido acético dos ensaios submetidos à indução por lactose, pode-se observar que o ensaio F07-2xTY apresentou a máxima concentração no valor de 1,36 g/L, valor este não considerado muito acima do valor crítico o que não resultou na queda da concentração da proteína de interesse.

A Figura 32 apresenta o comportamento semelhante para a produtividade em células do clone 648 induzido por IPTG e lactose em biorreator.

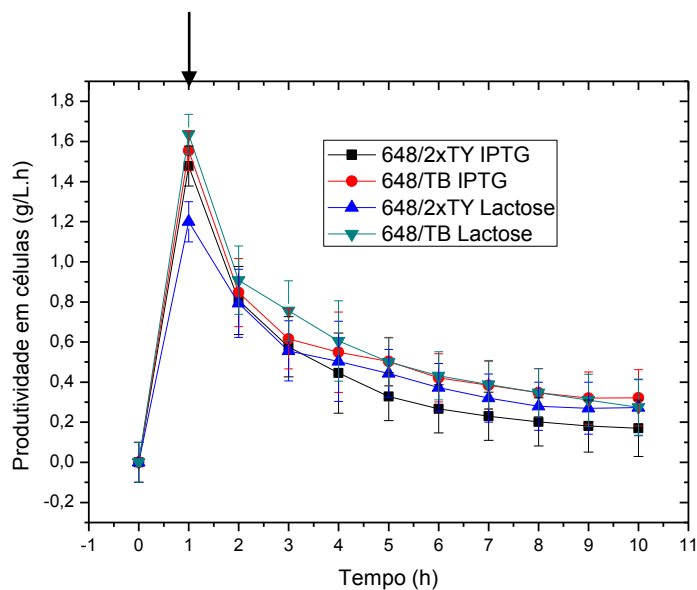


Figura 32- Produtividades em células ensaios F05/F06-2xTY/TB-648( induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648 ( induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm.

Ao se considerar o parâmetro produtividade, Figura 32, pode-se observar que todos os ensaios atingiram a maior produtividade durante 1 hora de cultivo, no instante em que foi realizada a indução. O ensaio F08 (Meio TB clone 648) apresentou valor ligeiramente maior de produtividade (1,6 g/L.h) quando comparado a todos os demais que atingiram valores de aproximadamente 1,5 g/L.h. É interessante notar que o ensaio F08 (Meio TB clone 648) foi o que apresentou melhor concentração celular no instante de indução no valor de 1,81 g/L.

A Figura 33 ilustra o comportamento para a produtividade da proteína 648 induzido por IPTG e lactose em biorreator.

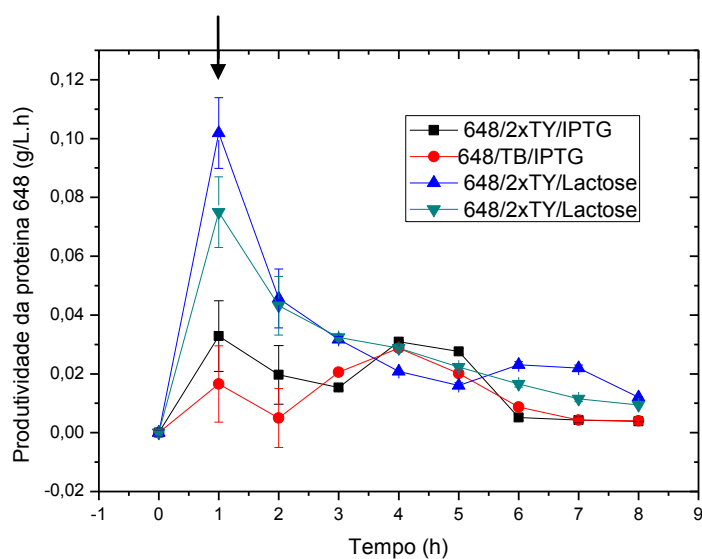


Figura 33 - Produtividade da proteína 648 ensaios F05/F06-2xTY/TB-648( induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648 (induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm.

Ao se considerar o parâmetro produtividade da proteína 648, Figura 33, percebe-se que todos os ensaios atingiram a máxima produtividade do produto durante 1 hora de cultivo, no instante em que foi realizada a indução e o ensaio F07 (Meio 2xTY clone 648) induzido por lactose apresentou melhor valor de produtividade da proteína (0,1 g/L.h). É interessante ressaltar que o ensaio F07 (Meio 2xTY clone 648) induzido por lactose foi o que apresentou melhor taxa de crescimento específico no instante de indução  $\mu_x$  (0,14 h<sup>-1</sup>) também resultou em uma síntese mais rápida de proteína (0,06 g/g.h) e rendimento específico protéico maior (0,14 g/g ) quando comparado aos ensaios para o clone 648 cultivado no meio 2xTY induzido por IPTG ou lactose.

Com o objetivo de avaliar a presença ácido acético (metabólito inibidor) produzido pelo clone 648 cultivado nos dois meios (2xTY e TB) e a influência dos indutores (IPTG e lactose) a Figura 34 apresenta o comportamento da concentração de ácido acético para o clone 648 cultivado nos dois meios (2xTY e TB) (induzido por IPTG e lactose).

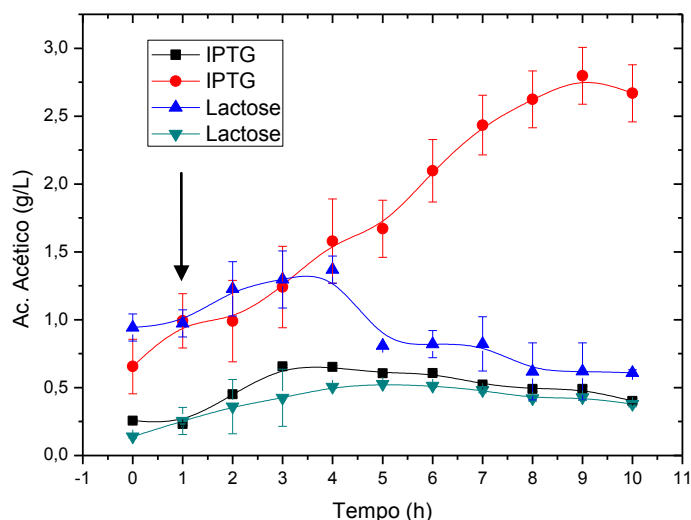


Figura 34- Concentração de ácido acético ensaios F05/F06-2xTY/TB-648 (induzido por IPTG), F07/F08-2xTY/TB-648( induzido por lactose) em biorreator a 37°C e 200 rpm.

Em termos de concentração de ácido acético, Figura 34, o ensaio F06-Meio TB-IPTG apresentou a máxima concentração de ácido acético que foi de 2,79 g/L, acima do considerado crítico, 0,9 g/L. Tal comportamento, de elevada produção de ácido acético acima do valor crítico, pode ser observado no ensaio para o clone 648 cultivado no meio TB induzido por IPTG, a alta complexidade do meio TB associada à elevada concentração de extrato de levedura (24 g/L) quando comparado com o meio 2xTY (10 g/L) pode ser o fator favorável a produção acentuada de ácido acético. Em se tratando dos indutores, a produção acentuada de ácido acético que ocorreu utilizando-se o IPTG como indutor indica que talvez a alta carga metabólica imposta pelo mesmo desviou o metabolismo para produção do metabólito inibidor (ácido acético).

#### 4.1.6 - Ensaios para a avaliação da cinética de crescimento do clone 503 em biorreator de bancada sob diferentes velocidades de agitação

Mais uma vez percebe-se que em termos de expressão o meio 2xTY foi o mais adequado para síntese protéica, além disso, a baixa concentração de extrato de levedura em relação ao meio TB. Talvez ocasione um menor acúmulo do inibidor ácido acético. Observou-se que o cultivo com o clone 503 acumulou menor concentração do ácido acético no meio 2xTY. Diante deste resultado, resolveu-se utilizar o clone 503 para os ensaios subsequentes. Uma vez que a elevada concentração de ácido acético promove a inibição no crescimento e redução da síntese de proteína heteróloga.

Com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em maior escala e em condições de não limitação de oxigênio, os melhores resultados obtidos em incubador rotativo foram reproduzidos em biorreator de bancada. As condições de operação do processo, nesse grupo de ensaios, foram similares ao conjunto de ensaios realizados em incubador rotativo. Assim, as três frequências de agitação foram estudadas (200 rpm, 400 rpm e 600 rpm) a fim de avaliar a sua influência no crescimento do clone 503.

Neste contexto, realizou-se um quarto conjunto de ensaios como objetivo de verificar a influência da agitação no crescimento do clone 503, desta forma, ensaios sem indução, foram conduzidos em biorreator de bancada sob agitações diferentes (200, 400 e 600 rpm) e com uma vazão de aeração constante no valor de 1vvm. A Figura 35 apresenta a influência da agitação no crescimento celular do clone 503 cultivado no meio 2xTY (não induzido) em biorreator.

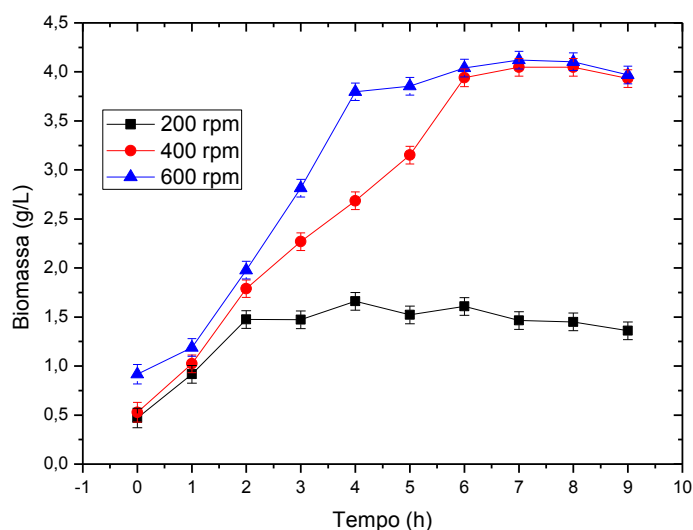


Figura 35- Influência da agitação no crescimento celular do clone 503 (não induzido) em biorreator.

Na Figura 35 mostra-se a influência da agitação no crescimento celular do clone 503 (não induzido) em biorreator. Nota-se a ausência de fase lag, sugerindo uma boa adaptação do metabolismo do clone 503 cultivado no meio 2xTY para todas as frequências de agitação estudadas. Observa-se que o aumento da agitação de 200 rpm para 600 rpm resultou em um incremento significativo na biomassa atingindo a máxima concentração de 3,94 g/L. Sob elevada agitação, o crescimento celular aumentou de uma velocidade específica de crescimento no valor de  $0,15 \text{ h}^{-1}$  a 200 rpm para  $0,37 \text{ h}^{-1}$  a 600 rpm, indicando que a concentração de oxigênio no meio é um forte influenciador na cinética de crescimento, como a alta concentração celular é resultante de uma elevada transferência de oxigênio verificada

nos ensaios com alta velocidade de agitação (Bajaj & Singhal, 2010). A Figura 36 mostra o comportamento das curvas de consumo de substrato dos ensaios sob diferentes velocidades de agitação.

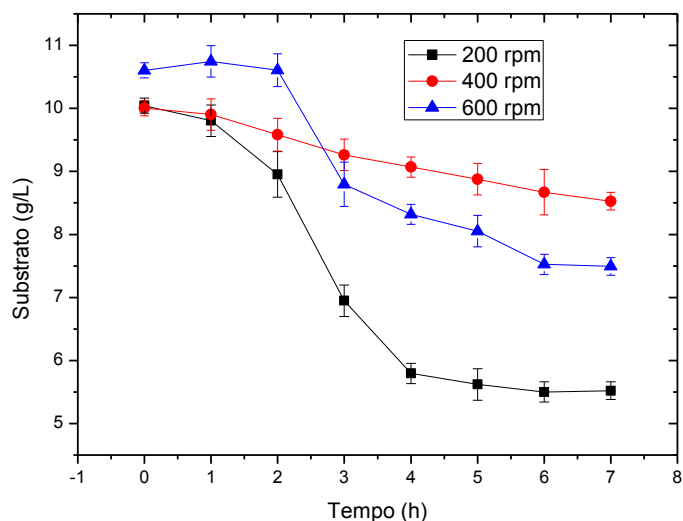


Figura 36- Influência da agitação no consumo do substrato do clone 503 (não induzido) em biorreator.

Observou-se que o ensaio F17 200 rpm com o clone 503 houve um consumo acentuado de substrato, enquanto para o ensaio F18 400 rpm há um discreto decréscimo na curva de substrato com fator de conversão de substrato em biomassa no valor de  $3,91 \text{ g.g}^{-1}$ .

A Figura 37 ilustra a produtividade em células do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

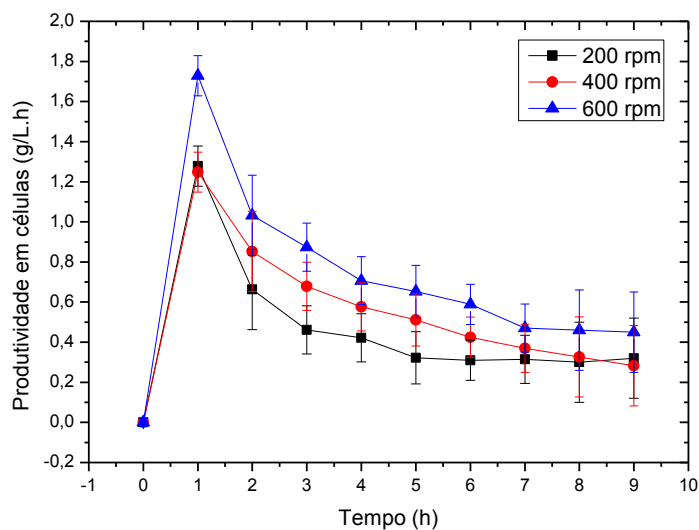


Figura 37 - Produtividade em células do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação (200, 400 e 600 rpm).

Com a relação à produtividade ( $P_x$ ), houve um acréscimo em 35% na produtividade em células do ensaio F17 a 200 rpm (clone 503 meio 2xTY):  $P_x$  (1,27 g/L.h) em relação ao ensaio F19 a 600 rpm (clone 503 meio 2xTY):  $P_x$  (1,72 g/L.h). A produtividade em células do ensaio F18 a 400 rpm atingiu valor aproximadamente semelhante quando comparado ao ensaio F17 a 200 rpm (clone 503 e meio 2xTY):  $P_x$  (1,24 g/L). Visivelmente, pode-se observar que a elevada agitação utilizada no ensaio F19 a 600 rpm pode ter aumentado a troca metabólica da célula com o meio de cultivo minimizando a formação do ácido acético, consequentemente, pode ter favorecido o metabolismo primário do clone 503.

A Figura 38 mostra o comportamento da velocidade específica de crescimento nos ensaios em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

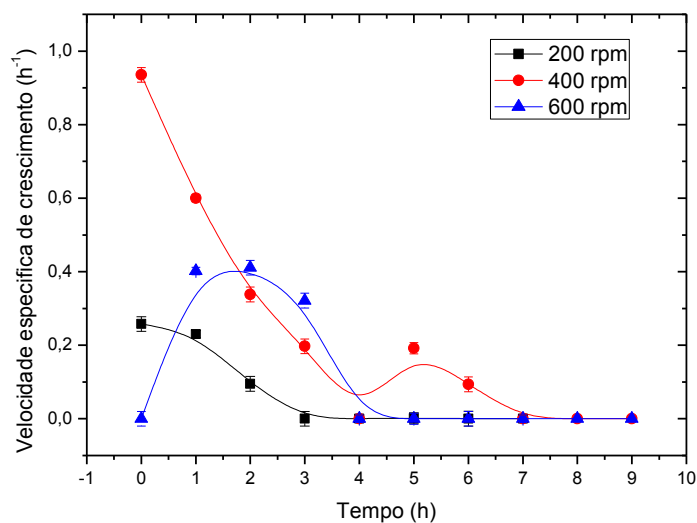


Figura 38 - Velocidade específica de crescimento (não induzido) em biorreator sob diferentes frequências de agitação.

Para o ensaio F18 a 400 rpm (Meio 2xTY clone 503), observa-se uma queda acentuada na velocidade específica de crescimento nas 3 primeiras horas de cultivo. Entretanto, para o ensaio F19 a 600 rpm, houve um acréscimo no valor da velocidade específica de crescimento nas 2 horas de cultivo, o que pode ser explicado pela maior agitação, aumentando a transferência de massa e portanto, melhorando a utilização dos nutrientes. Talvez no ensaio F19 a agitação a 600 rpm não tenha ocorrido limitação da transferência de oxigênio o que pode ter contribuído para o acréscimo na velocidade específica de crescimento e menor produção de ácido acético (Pansuriya & Singhal, 2011).

A Figura 39 ilustra a concentração do ácido acético do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

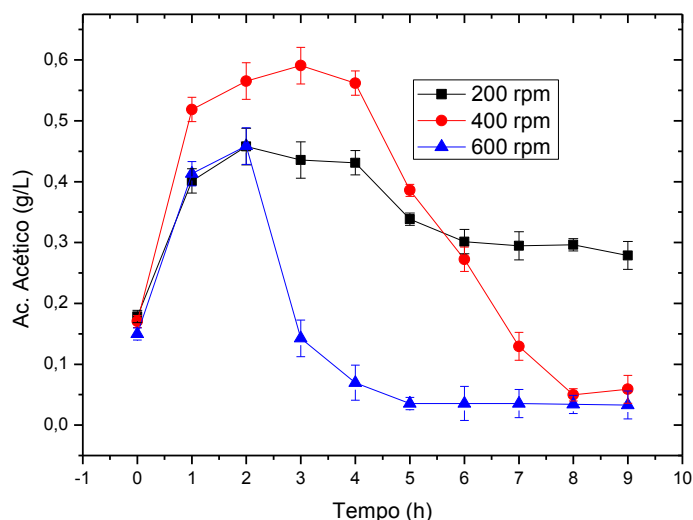


Figura 39 – Concentração do ácido acético do clone 503 (não induzido) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

Em se tratando da concentração de ácido acético (Figura 39) mostra a concentração de ácido acético do clone 503 cultivado sob diferentes velocidades de agitação, observou-se que apesar de ter atingido a máxima concentração de ácido acético de 0,59 g/L, para o ensaio F18 a 400 rpm, o mesmo não exerceu efeito inibitório. Neste caso, a concentração de ácido acético atingiu valor inferior a 0,9 g/L, o que pode não ter exercido efeito inibitório no crescimento e na síntese da proteína (Xue *et al.*, 2010). Pode-se observar para o ensaio F19 a 600 rpm houve uma menor produção de ácido acético quando comparado aos demais ensaios, uma vez que a elevada agitação pode ter aumentado a troca metabólica da célula com o meio de cultivo obtendo energia suficiente para a bactéria exercer suas atividades metabólicas não desviando o seu metabolismo para a formação do ácido acético. A limitação de oxigênio no meio causa o desvio do metabolismo da bactéria de aeróbio para anaeróbio. Em condições de anaerobiose a *E.coli* realiza ciclo de Krebs sendo que em menor intensidade para produção de algumas enzimas constitutivas. A velocidade específica de consumo de  $O_2$  é uma variável importante, pois ajuda no entendimento da cinética de crescimento do micro-organismo já que exprime sua regulação metabólica, sendo importante como dado para aumento de escala e controle de processo (Xue *et al.*, 2010).

Assim, o ensaio F19 a agitação 600 rpm e maior oxigenação desviou seu metabolismo para obtenção de energia pelo ciclo de Krebs no qual verifica-se uma menor produção de ácido acético, o que favoreceu ao incremento da concentração celular.

Analisando os resultados obtidos dos ensaios com o clone 503 no meio 2xTY sob diferentes velocidades de agitação, foram obtidos os parâmetros cinéticos, cujo valores são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios não induzidos em biorreator a 37°C sob diferentes velocidades de agitação.

Ensaio	$X_{máx}$ (g/L)	$t_{xmáx}$ (h)	$S_o$ (g/L)	$S_f$ (g/L)	$(S_o - S_f)$ (g/L)	$\mu_{xmax}$ (h <sup>-1</sup> )	$P_x$ (g/L.h)	$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	Acético (g/L)
F17 503/200 rpm	1,65	4	10,04	5,53	4,50	0,158	0,91	1,57	0,45
F18 503/400 rpm	4,04	8	9,90	8,52	1,37	0,241	1,02	3,91	0,59
F19 503/600 rpm	4,12	7	10,60	7,49	3,10	0,370	1,18	3,82	0,45

Comparando os parâmetros que caracterizam o crescimento celular dos ensaios F17, F18 e F19, em biorreator sob diferentes velocidades de agitações (Tabela 12), verifica-se que para o ensaio F19 (Clone 503 no meio 2xTY) sob agitação de 600 rpm e vazão de aeração constante 1 vvm, obteve-se a máxima concentração celular de 4,12 g/L.

Portanto, para o clone 503 os ensaios F17 e F19 (Meio 2xTY), nota-se que a mudança da agitação de 200 rpm para 600 rpm acarretou um incremento de 149 % na máxima concentração celular de (1,65 g/L) para (4,12 g/L), com fator de conversão de substrato a células (3,82 g.g<sup>-1</sup>) e produtividade em células (1,18 g/L.h) superior em relação ao ensaio F17 com agitação de 200 rpm que apresentou fator de conversão no valor de (1,57 g.g<sup>-1</sup>) e produtividade em células (0,91 g/L.h). A elevada agitação a 600 rpm obtida no ensaio F19 (clone 503 no meio 2xTY) melhora a disponibilidade de oxigênio o que pode ter favorecido o metabolismo primário do clone 503.

#### **4.1.7 - Ensaios induzidos por Lactose para a expressão do antígeno 503 em biorreator de bancada sob diferentes velocidades de agitação.**

A partir dos resultados obtidos no conjunto de ensaios anterior, realizou-se um novo conjunto de ensaios com o objetivo de avaliar a influência da agitação na expressão da proteína 503 em biorreator de bancada.

Existe uma relação inversa entre a concentração de oxigênio no meio de cultivo e a formação de acetato. Esse acúmulo de acetato reduz o gradiente eletroquímico em torno da membrana celular, necessário para síntese de ATP. Conseqüentemente, contribuindo para inibição do crescimento celular e produção da proteína recombinante (Gombert & Kilikian., 1998; Zhang *et al.*, 2010).

Frente aos resultados obtidos inicialmente em incubador rotativo utilizando o IPTG como indutor e com a finalidade de reduzir o custo da expressão e a toxicidade, foram realizados ensaios de indução com a lactose. Com o objetivo de observar o desempenho dos cultivos em maior escala, e em condições de não limitação de oxigênio, os melhores resultados obtidos em incubador rotativo foram reproduzidos em biorreator de bancada.

A expressão da proteína recombinante, neste grupo de ensaios nos quais as frequências de agitação foram estudadas, foi induzida pela adição da lactose, sendo o instante de indução e as condições de operação do processo igualmente as condições dos ensaios anteriores.

Com base nos estudos realizados por Bajaj & Singhal (2010) a agitação e aeração são parâmetros importantes em todo processo aeróbio, apresentam um efeito significativo, principalmente, na síntese do produto de interesse. Por esta razão, neste conjunto de ensaios estudou-se a influência da velocidade de agitação na expressão do antígeno.

Sob a condição de melhor clone, meio de cultivo e indutor, os ensaios com indução foram conduzidos em biorreator de bancada com o clone 503 cultivado no meio de cultivo 2xTY induzido por lactose. Variando-se a agitação de 200 rpm para 400 rpm e posteriormente 600 rpm, respectivamente, com o objetivo estudar a influência da agitação na expressão da proteína 503 de *Leishmania i. chagasi*.

A Figura 40 ilustra o comportamento das três frequências de agitação estudadas no crescimento celular do clone 503 cultivado no meio 2xTY (induzido por lactose).

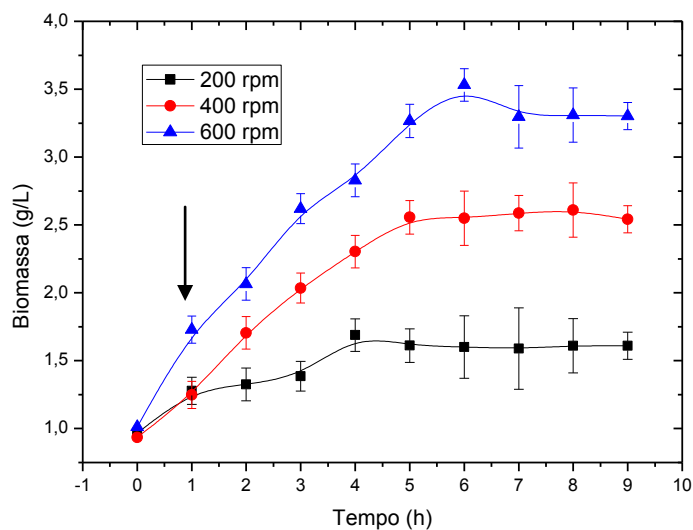


Figura 40 - Influência da agitação no crescimento celular do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator.

Na Figura 40 nota-se mais uma vez a ausência da fase lag confirmando a boa adaptação do clone 503 no meio cultivo 2xTY. Comparando os parâmetros cinéticos dos ensaios F20, F21 e F22 em biorreator sob diferentes velocidades de agitações (Tabela 12), verifica-se que no ensaio F22, sob agitação de 600 rpm e vazão de aeração 1 vvm, obteve-se máxima concentração celular  $X_{\text{máx}}$  de 3,53 g/L. Pode-se observar na Figura 41, que o aumento da agitação de 200 rpm para 600 rpm resultou em um incremento significativo na biomassa. Sob elevada agitação, o crescimento celular aumentou com uma velocidade específica de crescimento no valor de  $0,11 \text{ h}^{-1}$  a 200 rpm para  $0,24 \text{ h}^{-1}$  a 600 rpm. Este incremento na biomassa do ensaio F22 a 600 rpm submetido a maior agitação pode ser explicada pela maior transferência de oxigênio e de nutrientes o que pode ter favorecido o metabolismo primário do clone 503.

A Figura 41 mostra o consumo do substrato do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

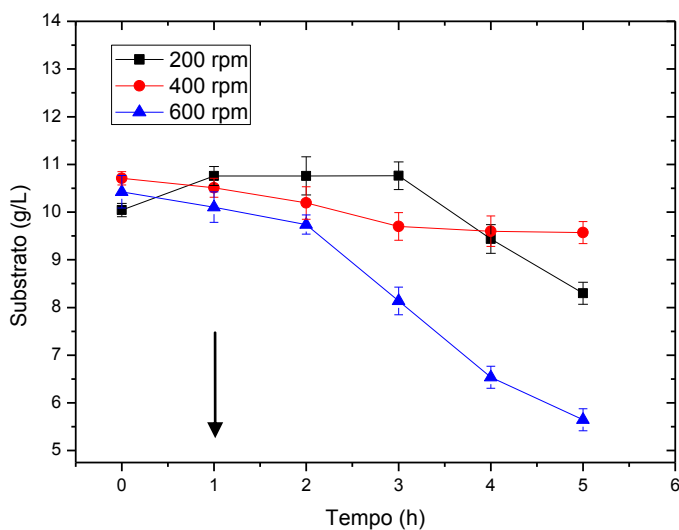


Figura 41 - Consumo do substrato do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator sob diferentes velocidades de agitação.

Com relação ao comportamento do consumo de substrato dos ensaios com três frequências de agitação estudadas, induzidos por lactose, conforme Figura 41, pode-se observar que para o ensaio F22 a 600 rpm, houve um consumo mais acentuado de substrato o que coincide com a máxima concentração celular de 3,53 g/L. Para o ensaio F21 a 400 rpm, há um leve decréscimo na curva de substrato com fator de conversão de substrato em biomassa no valor de 2,3 g.g<sup>-1</sup>.

A Figura 42 ilustra o comportamento da velocidade específica de crescimento do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator em diferentes agitações.

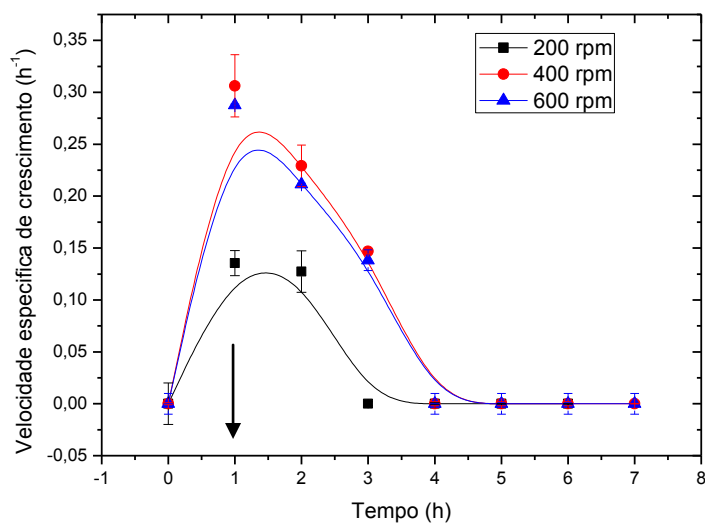


Figura 42 - Velocidade específica de crescimento do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator.

Na Figura 42 observa-se uma queda na velocidade específica de crescimento após indução, essa redução pode ser atribuída à mudança do metabolismo de crescimento para produção da proteína 503. Esta mudança é bastante acentuada para o ensaio F21 (meio 2xTY clone 503) a agitação de 400 rpm, no qual apresentou uma queda mais acentuada no valor da velocidade específica de crescimento resultando na síntese mais rápida e um maior produção específica  $P_{P/X} = 0,08 \text{ g.g}^{-1}$  quando comparados aos demais ensaios com diferentes frequências de agitação estudadas. Por outro lado, comparando-se os resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por Riesenberg *et al.* (1990), Panda *et al.* (1999) e Puertas *et al.* (2010) verifica-se que não existem grandes diferenças, pois ambos apontaram um aumento da concentração da proteína com a diminuição da velocidade máxima específica de crescimento.

A Figura 43 ilustra a influência da agitação na produção do antígeno 503 (induzido por lactose) em biorreator.

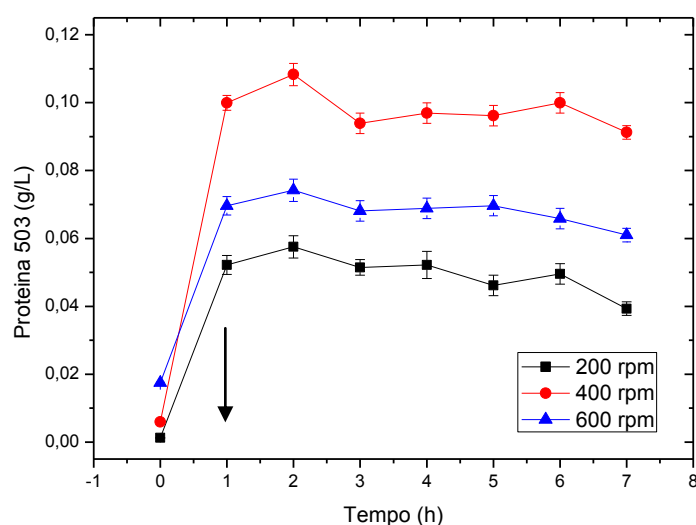


Figura 43 - Influência da agitação na produção do antígeno 503 (induzido por lactose) em biorreator.

Com relação à influência da agitação na produção do antígeno 503 (Figura 43) pode-se observar que a síntese de proteína 503 ocorreu nas duas primeiras horas e a mesma permanece estável ao longo do cultivo, diferentemente ocorre com os ensaios do clone 648, induzidos com IPTG. A alta carga metabólica imposta por esse indutor (Glick, 1995; Kilikian *et al.*, 2000 e Tomazetto *et al.*, 2007) resultou em estresse metabólico e uma queda na estabilidade protéica. Portanto, parece ser interessante a utilização da lactose como indutor principalmente devido ao baixo custo e a ausência de toxicidade (Wang *et al.*, 2010).

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por Tomazetto *et al.* (2007) e Pansuriya & Singhal (2011), verificou-se que a maior concentração de proteína foi obtida com agitação de 400 rpm. Portanto, percebe-se que a agitação moderada aumentou a concentração da proteína 503, assim, o processo parece demandar uma agitação em níveis que permitam o crescimento celular satisfatório e evite a formação de ácido acético. A Figura 44 apresenta a influência da agitação na produtividade da proteína 503 em biorreator.

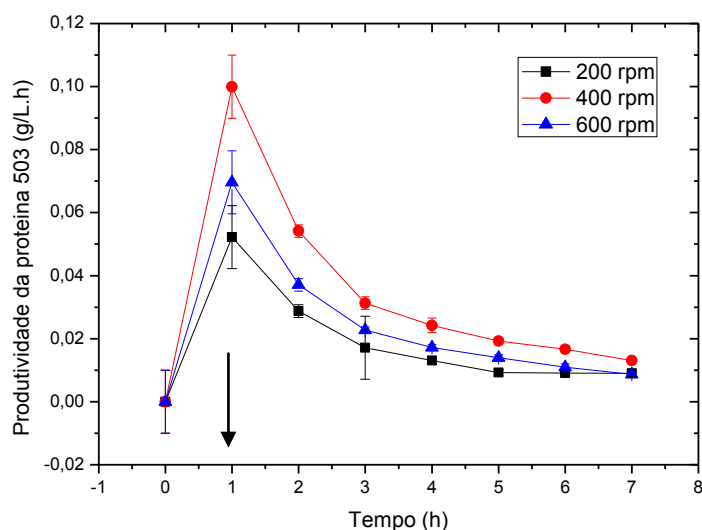


Figura 44 - Produtividade da proteína 503 (induzido por lactose) em biorreator.

Percebe-se que a maioria dos ensaios atingiu a máxima produtividade da proteína 503 durante 1 hora de cultivo, no instante em que foi realizada a indução. O ensaio F22 a 400 rpm apresentou melhor valor de produtividade da proteína 503 (0,1 g/L.h) quando comparado a todos os demais que atingiram valores de aproximadamente 0,07 g/L.h. É interessante ressaltar mais uma vez a importância da velocidade específica de crescimento no instante de indução que foi de  $0,3 \text{ h}^{-1}$ , podendo-se concluir que se a célula chega à fase de indução com alta velocidade específica de crescimento, no instante de indução, conforme o ensaio F22 (clone 503 meio 2xTY) a agitação de 400 rpm, resultou no maior rendimento específico Ppx ( $0,08 \text{ g.g}^{-1}$ ).

A influência da agitação na concentração de ácido acético do clone 503 cultivado no meio 2xTY (induzido por lactose) em biorreator pode ser avaliada na Figura 45.

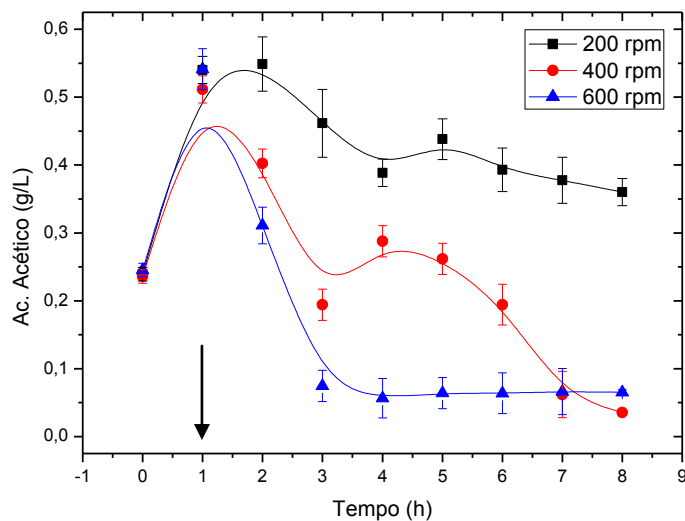


Figura 45 – Concentração de ácido acético do clone 503 (induzido por lactose) em biorreator.

A Figura 45 mostra a máxima concentração do ácido acético para as três frequências de agitação estudadas ocorreu no instante de indução (1h) e atingiu a máxima concentração no valor de 0,54 g/L, entretanto, quando comparado com as Figuras 45 e 48, não percebe-se o efeito inibitório no crescimento celular e na expressão da proteína 503, quando acumulado a concentração inferior a crítica 0,9 g/L. Portanto, pode-se concluir que as frequências de agitação estudadas (200, 400 e 600 rpm), por atingir a máxima concentração de ácido acético inferior ao valor crítico a 0,9 g/L, deve não exercer efeito inibitório no crescimento e expressão da proteína. A lactose, além de ser uma molécula indutora mais barata e menos tóxica, pode atuar com fonte de carbono, uma vez que a concentração ideal da lactose é de fundamental importância para viabilizar a síntese da proteína. Neste contexto, a Figura 46, mostra o comportamento da concentração de lactose logo após a etapa de indução para as três frequências de agitação estudadas.

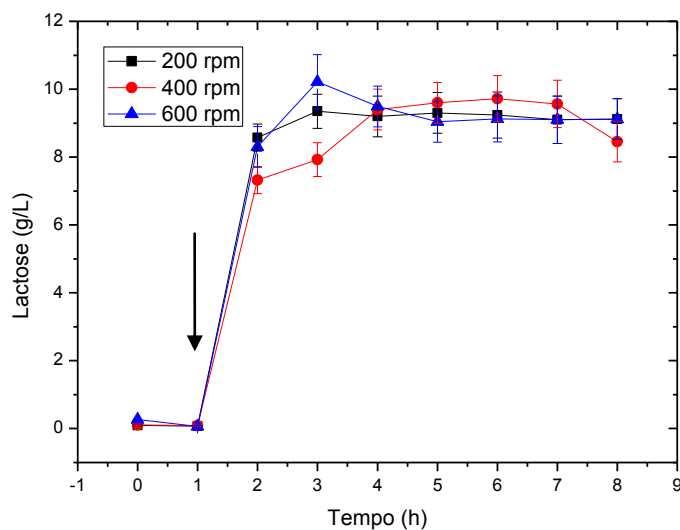


Figura 46 - Concentração de lactose ao longo da etapa de indução em biorreator.

Percebe-se que apesar da lactose não ser metabolizada pela *Escherichia coli*, a indução por lactose mostrou-se uma estratégia promissora para promover a síntese da proteína, pois a concentração de ácido acético pode ser mantida abaixo de 0,9 g/L.

A lactose é um dissacarídeo que na presença da enzima lactose permease será hidrolisada e metabolizada pela célula bacteriana. Pode atuar como molécula indutora e como substrato, assim células podem continuar crescendo e produzir a proteína, sendo menos provável ocorrer à *lise* celular. No entanto, a alta carga metabólica imposta pelo IPTG, quando comparada com a indução de lactose, além do alto teor de proteína e estabilidade da mesma, indica que a lactose é provavelmente o indutor mais propício para a síntese desta proteína heteróloga. Enquanto que o IPTG atua apenas como indutor, ao ser adicionado na célula não será metabolizado acarretando apenas a produção da proteína, e depois de de 3-4 horas as bactérias podem ter *lise* celular (Tian *et al.*, 2011). A Tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos obtidos com o clone 503 cultivado no meio 2xTY(induzido por lactose) com três diferentes frequência de agitação estudadas.

Tabela 8 - Parâmetros cinéticos referentes aos ensaios com indução por Lactose em biorreator.

Ensaio	X <sub>máx</sub> (g/L)	Acético (g/L)	T <sub>f</sub> (h)	μ <sub>xmáx</sub> * (h <sup>-1</sup> )	μ <sub>x</sub> (h <sup>-1</sup> )	[Proteína intra] Max (g/L)	t[Prot] <sub>Max</sub> (h)	P <sub>x</sub> (g/L.h)	P <sub>p/x</sub> (g/g)	P <sub>p</sub> (g/L.h)
F 20 200 rpm	1,68	0,5480	4	0,1195	0,1354	0,0575	2	1,27	0,0433	0,0522
F21 400 rpm	2,61	0,5110	8	0,2295	0,3062	0,1083	2	1,24	0,0801	0,0999
F22 600 rpm	3,53	0,5410	6	0,2471	0,2877	0,0741	2	1,72	0,0558	0,0696

De modo geral, comparando-se os resultados obtidos dos ensaios sem indução (F17, F18, F19) com os ensaios com indução (F20, F21, F22) sob diferentes velocidades de agitação, percebe-se que a concentração celular dos ensaios com indução foi significativamente inferior em relação aos ensaios sem indução, o que é esperada essa mudança do metabolismo de crescimento para produção da proteína de interesse. Com exceção do ensaio F20, o qual obteve valores aproximadamente semelhantes quando comparado com a concentração celular do ensaio F17.

Comparando os parâmetros que caracterizam o crescimento celular entre os ensaios F20, F21 e F22 em biorreator sob diferentes velocidades de agitação (Tabela 8), verifica-se que o ensaio F22 (Clone 503 no meio 2xTY) sob agitação de 600 rpm e vazão de aeração de 1 vvm, atingiu-se máxima concentração celular de 3,53 g/L.

Para o clone 503, os ensaios F20 e F22 (Meio 2xTY) induzidos por lactose, nota-se que a variação na agitação de 200 rpm para 600 rpm acarretou um incremento de aproximadamente 100% na concentração celular de (1,68 g/L) para (3,53 g/L), produtividade em células de 1,72 g/L.h superior ao ensaio F20, com agitação de 200 rpm, que apresentou produtividade em células de 1,27 g/L.h. A elevada agitação a 600 rpm obtida no ensaio F22 (clone 503 no meio 2xTY) induzido por lactose aumentou a disponibilidade de oxigênio favorecendo o metabolismo primário do clone.

No ensaio F21 (clone 503 no meio 2xTY) sob agitação de 400 rpm obteve-se uma concentração de proteína de 0,1083 g/L que foi 68% superior quando comparado com a concentração de proteína obtida no ensaio sob agitação 600 rpm que foi de 0,0741 g/L e 53% superior ao ensaio sob agitação 200 rpm que foi de 0,0575 g/L. Parece que o aumento da agitação para 600 rpm apresentou efeito negativo sobre a produção de proteína, diminuindo a produção da mesma. No ensaio F22 a 600 rpm percebe-se que a elevada agitação pode aumentar o crescimento celular do clone, entretanto, não corresponde a altas concentrações da proteína de interesse corroborando com os resultados obtidos por Tomazetto *et al.* (2007) e

Bajaj & Singhal (2010). Em termos de expressão de proteína, a máxima concentração de proteína 503 foi para ensaio F21, agitação de 400 rpm.

#### 4.2- Verificação da expressão da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese foi realizada para possibilitar a visualização das bandas protéicas das proteínas de interesse expressa pelos dois clones (648 e 503) utilizando a *Escherichia coli* como hospedeiro. A expressão da proteína recombinante foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel do tipo SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

A proteína de interesse foi determinada quantitativamente, através do método de Lowry. Os pontos experimentais para a realização da eletroforese correspondem aos que apresentaram maior concentração protéica (início da fase exponencial em cada cultivo). Para todas as eletroforeses do presente estudo padronizou-se uma concentração de 50 µg/µL. A Figura 47, ilustra as bandas protéicas expressa pelo antígeno 648 cultivado no meio 2xTY induzido por IPTG.

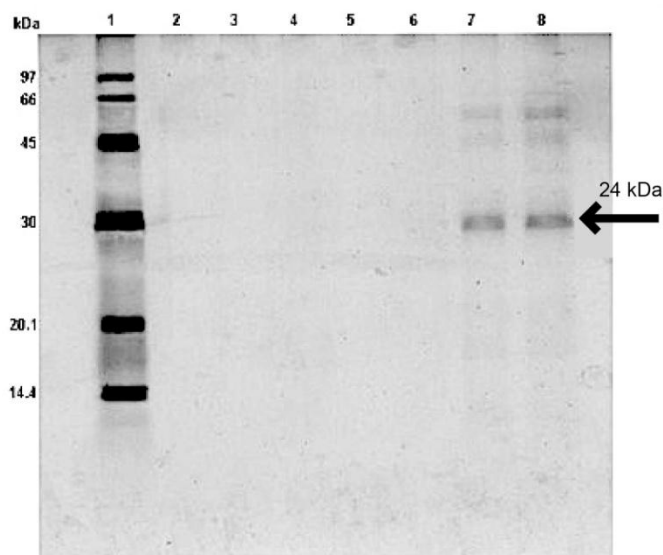


Figura 47- SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 648 de *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por IPTG no meio 2xTY. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas não ligadas à resina, Linhas (3-6): amostras não induzidas, Linhas (7 e 8): proteína eluída. Gel revelado por nitrato de prata.

Com base nos resultados dos ensaios submetidos à estratégia de indução por IPTG, pode-se observar na Figura 47, que a proteína 648 aparece como uma banda nítida na primeira eluição (Linhas 7-8), com massa molecular de aproximadamente 24 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína intracelular foi quantificada pelo método de Lowry com

concentração de 0,18 g/L, confirmando a expressão da proteína 648 no meio 2xTY. A Figura 48, ilustra as bandas protéicas expressa pelo antígeno 648 cultivado no meio TB induzido por IPTG.

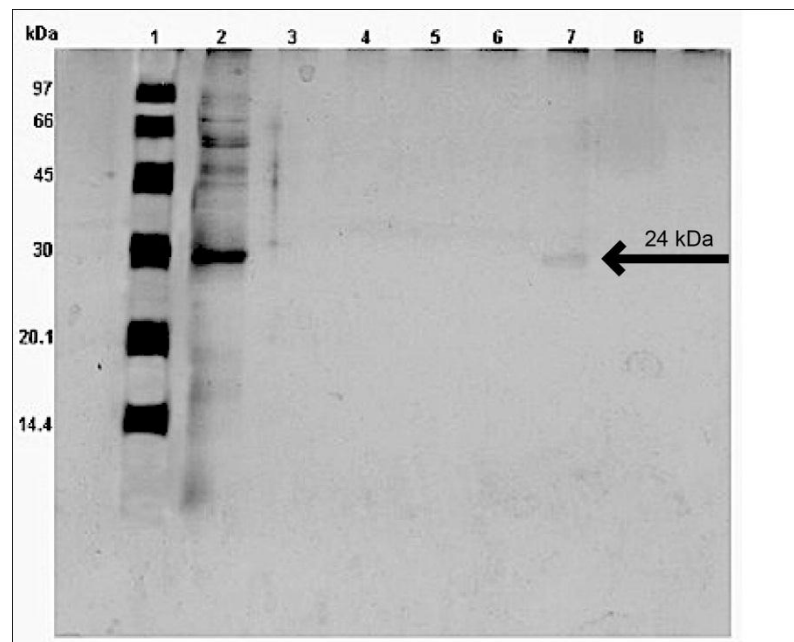


Figura 48 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 648 da *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por IPTG no meio TB. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas não ligadas à resina, Linhas (3-6): amostras não induzidas, Linha (7): proteína eluída. Gel revelado por nitrato de prata. A eficácia da indução por IPTG, confirmando a expressão da proteína 648 no meio TB com massa molecular de 24 kDa.

Como todas as amostras foram submetidas à mesma rotina de tratamento e análise até aplicação no gel para realização da eletroforese, pode-se relacionar a intensidade das bandas obtidas com a concentração de proteína no meio. Nos ensaios para expressão da proteína 648, observa-se nas Figuras 47 e 48, análise da expressão do antígeno 648 da *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por IPTG, nos meios de cultivo 2xTY e TB, respectivamente. Percebe-se que o nível de expressão do meio 2xTY apresenta uma banda mais nítida (Figura 48) quando comparado ao meio TB (Figura 48) . Desta forma, o meio 2xTY por ser rico em triptona pode favorecer a síntese de proteína enquanto que o TB, apesar de maior disponibilidade de substrato favorece apenas ao crescimento. A Figura 49, ilustra as bandas protéicas expressa pelo antígeno 503 cultivado no meio 2xTY induzido por IPTG e lactose.

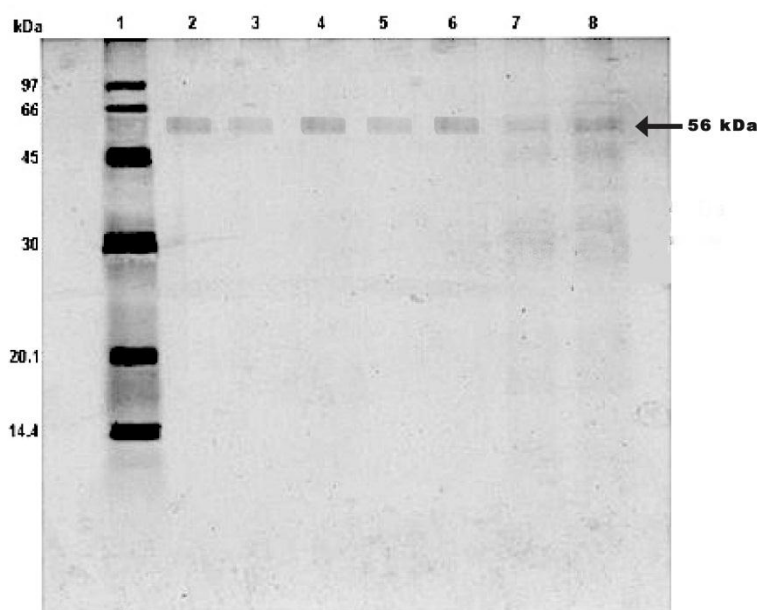


Figura 49 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido no meio 2xTY. Linha (1): Marcador; Linhas (2, 4, 6, 8): Proteínas eluídas induzidas por Lactose, Linhas (3, 5, 7): Proteínas eluídas induzida por IPTG.

Pode-se observar, conforme Figura 49, que a proteína eluída utilizando-se a Lactose como indutor (Linhas 2, 4, 6, 8) apresentam uma banda mais nítida em relação à proteína eluída por IPTG (Linhas 3, 5, 7). Confirmando a massa molecular da proteína 503 induzido por lactose ou IPTG, aproximadamente 56 kDa. A concentração da proteína intracelular, induzido por Lactose e IPTG, quantificada pelo método de Lowry, foi de 0,079 g/L e 0,052 g/L, respectivamente. Confirmando a eficácia de indução da proteína 503 quando induzida por IPTG ou Lactose, havendo indicativo de que o último indutor seja promissor para síntese da proteína de interesse, corroborando assim com os resultados obtidos por Tomazetto *et al.*, (2007); Li *et al.*, (2011).

Com relação à velocidade de agitação, Figura 50, proteína eluída sob diferentes agitações (200 rpm, 400 rpm e 600 rpm) e induzida por Lactose.

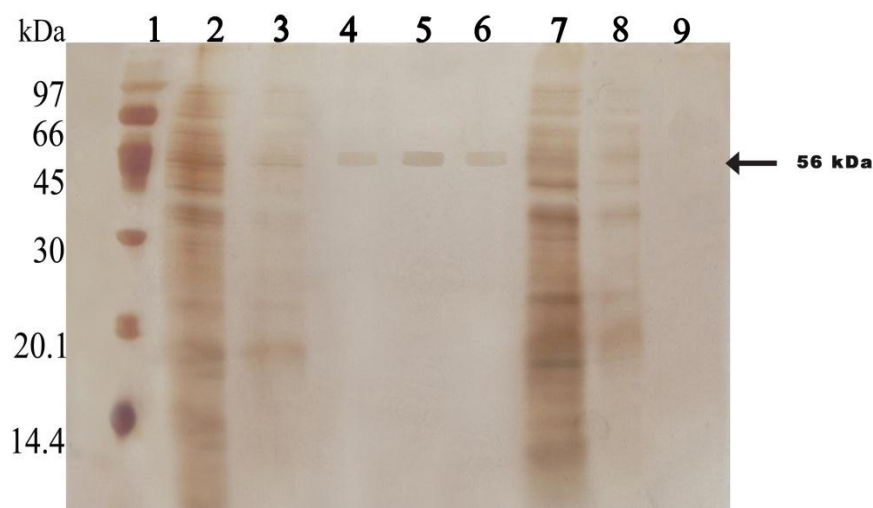


Figura 50- SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da *Leishmania i. chagasi* em *E. coli* induzido por Lactose no meio 2xTY sob diferentes velocidades de agitação. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas totais, Linha (3): proteínas não ligadas à resina, Linha (4): proteína eluída a 200 rpm, Linha (5): proteína eluída a 400 rpm, Linha (6): proteína eluída a 600 rpm, Linha (7): proteína total, Linha (8): proteínas não ligadas a resina, Linha (9): amostra extracelular.

Para os ensaios realizados as três frequências de agitação, observa-se que a proteína eluída a 400 rpm resultou uma maior concentração de proteína intracelular no valor de 0,1083 g/L. Na (Linha 9), aplicou-se amostra extracelular, verificou-se que as bandas não foram visualizadas o que vem a evidência que a expressão é intracelular.

A Figura 51, ilustra as bandas protéicas expressa pelo antígeno 503 cultivado no meio 2xTY e TB, induzido por lactose e IPTG, respectivamente.

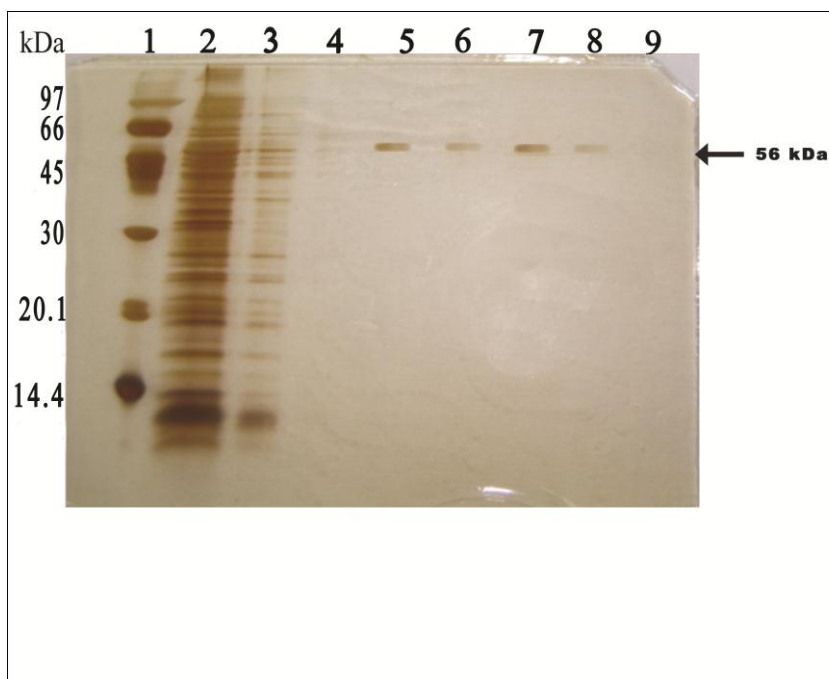


Figura 51 - SDS-PAGE análise da expressão do antígeno 503 da *Leishmania i. chagasi* em *E. coli*. Linha (1): Marcador; Linha (2): proteínas totais, Linha (3): proteínas não ligadas à resina, Linhas (4 e 9): amostras não induzidas, Linhas (5 e 7) proteína eluída no meio 2xTY induzida por Lactose, Linhas (6 e 8) proteína eluída no meio TB induzida por IPTG.

Na Figura 51, observa-se que a proteína 503 de *Leishmania i. chagasi* no meio 2xTY induzida por lactose (Linhas 5 e 7) apresentou uma banda mais nítida quando comparada com a proteína eluída no meio TB (Linhas 6 e 8), (Linha 9): amostra não induzida. Observou-se qualitativamente que o meio 2xTY foi o mais adequado para síntese protéica.

Pode-se verificar que a proteína 503 aparece com uma banda nítida após primeira eluição (Linhas 5-8), com massa molecular de aproximadamente 56 kDa. Nesse instante, a concentração da proteína intracelular foi de 0,15 mg/mL. Não percebe-se a presença da banda nítida (Linhas 4 e 9), pois nestes ensaios não foi adicionado indutor, confirmando a eficácia de indução nos demais ensaios.

A partir dos géis referentes às proteínas 648 e 503 (Figuras 47-51), foi realizado procedimento para cálculo de seus pesos moleculares, através do qual constatou-se que seria, respectivamente, 24 kDa e 56 kDa, corroborando com os resultados obtidos por Martins *et al.* (2006).

---

## **Capítulo 5**

### **Conclusão**

---

## 5. Conclusões

- Avaliando o comportamento dos clones (648 e 503) nos meios de cultivos (2xTY e TB), o meio TB apresentou-se mais favorável ao crescimento dos dois clones. O clone 503 foi o escolhido para os ensaios subseqüentes devido ao menor acúmulo de ácido acético (metabólito inibidor) produzido pelo metabolismo desse clone;
- A expressão das proteínas 648 e 503 apresenta o comportamento associado ao crescimento, e a expressão no meio 2xTY foi o mais adequado para síntese da proteína para os cultivos realizados em incubador rotativo e biorreator de bancada;
- As proteínas 648 e 503 são armazenadas intracelularmente observando-se tanto nos cultivos realizados em incubador rotativo quanto em biorreator de bancada;
- O conhecimento das condições fisiológicas e metabólicas do microrganismo no instante de indução é um parâmetro importante para síntese de proteína;
- Levando-se em consideração o conteúdo proteico e sua estabilidade, a lactose parece ser um indutor promissor para esta síntese protéica;
- Com relação à influência da agitação na produção do antígeno 503, verificou-se que a agitação de 600 rpm favoreceu apenas o crescimento do clone. Em termos de expressão, o ensaio com a agitação de 400 rpm resultou em um melhor acúmulo da proteína;
- A expressão das proteínas 648 e 503 foram confirmadas por eletroforese, com a identificação da massa molecular. As massas moleculares da proteína 648 nos meios 2xTY e TB foram, respectivamente, 24 kDa. A massa molecular da proteína 503 no meio 2xTY foi de 56 kDa;
- De posse dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se estudar a possibilidade de realização de ensaios em batelada alimentada, a fim de minimizar a produção

de metabólitos secundários, principalmente, o ácido acético, maximizando a produção do bioproduto de interesse.

- Pode-se propor um modelo matemático fenomenológico não-estruturado do processo em batelada, assim com o modelo bem ajustado é possível fazer simulações em batelada, batelada alimentada e contínuo a fim de otimizar o processo de produção de antígenos recombinantes de *Leishmania i. chagasi*.

---

**Capítulo 6**  
**Referências bibliográficas**

---

## Referência bibliográficas

- ALBERTS, B. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochem Eng J*, v. 49, p. 379-387, 2010.
- ALFASI, S., SEVASTSYANOVICH, Y., ZAFFARONI, L.; et al. Use of GFP fusions for the isolation of *Escherichia coli* strains for improved production of different target recombinant proteins. *Biotechnol J*, v.156, p.11-21, 2011.
- APHA, AWWA, WEF. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: American public health association, 1988.
- AQUINO, L. C. L.; SOUSA, H. R. T.; MIRANDA, E. A.; et al. A. Evaluation of IDA-PEVA hollow fiber membrane metal ion affinity chromatography for purification of a histidine-tagged human proinsulin. *J Chromatogr*, v. 834, p. 68-76, 2006.
- ATKINS, P.; JONES, L. *Princípios de Química- Questionando a vida moderna e o meio ambiente*. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- BAJAJ, B.; SINGHAL, R. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly ( $\gamma$ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnol Bioproc E*, v.15, n.4, p. 635-640, 2010.
- BALDERAS - HERNANDEZ, V. E.; PAZ MALDONADO, L. M. T. ; RIVERO, E. M.; et al. Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biotechnol Bioproc E*, v.13, n.1, p. 7-13, 2008.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. **Revelação por prata**. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, v.8, p.93-99, 1987.
- BORZANI, W.; et al. *Biotecnologia industrial-fundamentos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.v.1.
- BRAZ, R. F.; NASCIMENTO, E. T.; MARTINS, D. R.; et al. The sensitivity and specificity of *Leishmania chagasi* recombinant K39 antigen in the diagnosis of American visceral leishmaniasis and in differentiating active from subclinical infection. *Am J Trop Med Hyg*, v.67, n.4, p. 344-348, 2002.
- BRESOLIN, I. T. L.; MIRANDA, E. A.; BUENO, S. M. A. Cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (imac) de biomoléculas: aspectos fundamentais. *química nova (impresso)*, v. 32, p. 1288-1296, 2009.
- BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA – uma introdução**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; NANCY, W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, v.10, p.385–393, 2010.

CASTILLO, I. D. S. **Cultivo de *Escherichia coli* recombinante**: desenvolvimento de estratégia para o crescimento e indução a síntese de troponina C. 1997. 171 f. *Dissertação* (Mestrado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica), – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Farmácia, São Paulo/SP.

COSTA, J. P.C.L. **Estudo cinético do cultivo de *Escherichia coli* alterada geneticamente contendo plasmídeo para a síntese de Troponina C**. 1993. 162 f. *Dissertação* (Mestrado) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

COSTA, M. M.; ANDRADE, H. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; et al. Analysis of *Leishmania i. chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. *J. Proteome Res*, v.10, n.5, p. 2172–2184, 2011.

DAVIES, C. R.; KAYE, P. M.; CROFT, S. L.; et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ*, v. 326, p.377–382, 2003.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *J Ind Microbiol*, v.16, n.3, p.145-154, 1996.

DRUMOND, K. O.; COSTA, F. A. Forty years of visceral leishmaniasis in the State of Piauí: a review. *Rev Inst Med Trop*, v. 53, n.(1), p:3-11, 2011.

EITEMAN, M. A.; ALTEMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends Biotechnol*, v.24, p. 140-164, 2006.

ETTINGER, N. A.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania i. chagasi*. *Ann. Hum.Genet*, v. 73, p.304-313, 2009.

FRANK, D. T.; CHARLES, L.; JAFFE, A. N.; WARBURG, R. K.; SVOBODOVA, M.; PELEG, O.; BANETH, G. *Leishmania* tropical in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.82, p. 814–818, 2010.

GOMBERT, A. K. **Produção de troponina C em *Escherichia coli***: estudo da indução por lactose e obtenção de alta concentração celular. 1996. 134f. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. A simple way of achieving high cell concentration in recombinant *Escherichia coli* cultivation. *Braz J. Chem Eng*, v.14, n. 2, p.1-8, 1997.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **J Biotechnol**, v.60, n.1-2, p.47-54, 1998.

GONÇALVES, V. M.; FERREIRA, D. S.; SARI, R. S.; et al. Cultivo de *Escherichia coli* recombinante para produção da proteína rfPspA1 de *Streptococcus pneumoniae* em batelada alimentada: estudo de diferentes estratégias de alimentação, v.12, p.1-8, 2008.

GUPTA, P.; GHOSALKAR, A.; MISHRA, S.; et al. Enhancement of over expression and chaperone assisted yield of folded recombinant aconitase in *Escherichia coli* in bioreactor cultures. **J Biosci Bioeng**, v.107, n.2, p.102-107, 2009.

HARRISON, J. S.; KESHAVARZ-MOORE, E.; DUNNILL, P.; et al. Factors affecting the fermentative production of a lysozyme-binding antibody fragment in *Escherichia coli*. **Biotechnol Bioeng**, v.53, n.6, p.611-622, 1997.

HELLMUTH, K.; KORZ, D. J.; SANDERS, E. A.; et al. Effect of growth rate on stability and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell density cultivation of *Escherichia coli* TG1. **J.Biotechnol**, v.32, p.289-298, 1994.

HISS, H. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.v.1.541p.

HOFFMANN, B. J.; BROADWATER, J. A.; JOHNSON, P.; et al. Lactose Fed-batch overexpression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21(DE3): Process control yielding high levels of metal-incorporated, soluble protein. **Protein expr purif**, v.6, p.646-654, 1995.

HOFFMANN, F.; VAN DEN HEUVEL, J.; ZIDEK, N.; RINAS, U. Minimizing inclusion body formation during recombinant protein production in *Escherichia coli* at bench and pilot plant scale. **Enzyme Microb Technol**, v.34, p.235-241, 2004.

HORTSCH, R.; BOTZ, W. Growth and recombinant protein expression with *Escherichia coli* in different batch cultivation media. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.90, p.69-76, 2011.

JANA, S.; DEBY, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Appl microbial biotechnol**, v.67, p.289-298, 2005.

JERÔNIMO, S. M.; DUGGAL, P.; BRAZ, R. F.; et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania i. chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand J Infect Dis**, v.36, n.6-7, p.443-9, 2004.

JERÔNIMO, S. M.; HIGGS, E.; VEDVICK, T.; et al. Identification of *Leishmania chagasi* antigens recognized by human lymphocytes. **J Infect Dis**, v.172, n. 4, p.1055-60, 1995.

KILIKIAN, B. V.; SUAREZ, I.D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochem**, v. 35, n.9, p.1019-25, 2000.

KOTIK, M.; KOCANOVÁ, M.; MARESOVÁ, H.; et al. High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer. *Protein Expr. Purif*, v.36, p.61-69, 2004.

KRAUSE, M.; UKKONEN, K.; HAATAJA, T.; et al. A novel fed-batch cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in *shaker* cultures. *Microb cell fact*, v.9, p.9-11, 2010.

KWEON, D. H.; HAN, N. S.; PARK, K. M.; et al. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, v.36, p.537-542, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LARENTIS, A. L.; SAMPAIO, H. C. C.; MARTINS, O. B.; et al. Influence of induction conditions on the expression of carbazole dioxygenase components (CarAa, CarAc, and CarAd) from *Pseudomonas stutzeri* in recombinant *Escherichia coli* using experimental design. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, v. 38, p. 1045-1054, 2011.

LARSON, R. E.; et al. IV Curso de verão em Biologia Celular e Molecular. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo - USP, 2007.

LIM, H. K.; JUNG, K. H. Improvement of heterologous productivity by controlling postinductive specific growth rate in recombinant *Escherichia coli* under control of the PL promoter. *Biotechnol Prog*, v. 14, p.548-553. 1998.

LIMA, W. J. N. **Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**. 2004. 628 f. Tese Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, SP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

LINDEN, R. Terapia gênica: o que é, o que não é e o que será. *Estud. av*, v.24, n.70, p. 31-69, 2010.

LIRIA, C. W. Processo descontínuo alimentado no cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS para produção de proteína recombinante troponina C. 1995. 128 f. Tese (mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/ SP.

LOSEN, M.; FROLICH, B.; POHL, M.; BUCHS, J. Effect of limitation and medium composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flast cultures. *Biotechnol Prog*, v.2, p.1062-1068, 2004.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUG, N. J.; FARR, A. L.; et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v.193, n.1, p. 265-75, 1951.

LU, Y. R.; WARNER, M.; SEDLAK, H. O. N.; et al. Comparison of glucose/xylose cofermentation of poplar hydrolysates processed by different pretreatment technologies. *Biotechnol Progr*, v.25, p.349–356, 2009.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl. Environ. Microbiol*, v.56, p.1004–1011, 1990.

MA. X.; ZHENG, W.; WANG, T.; et al. Optimization and high-level expression of a functional GST-tagged rHLT-B in *Escherichia coli* and binding ability of purified rHLT-B. *J Microbiol*, v.44, n.3, p.293-300, 2006.

MACDONALD, H. L.; NEWAY, J. O. Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* k-12. *Appl. Environ. Microbiol*, v.56, p.640-650, 1990.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev*, v.60, p. 512–538, 1996.

MANDERSON, D.; DEMPSTER, R.; CHISTI, Y. A recombinant vaccine against hydatidosis: production of the antigen in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, v. 33, p.173–182, 2006.

MARTINS, D. R.; JERÔMINO, S. M.; WILSON, M. E.; et al. *Leishmania chagasi* T Cell antigens. *ASM*, 2006.

MULINARI, F. Jaburetox-2Ec: um peptídeo recombinante derivado de uréase de *Canavalia ensiformis* com potencial bioinseticida. Dissertação de Mestrado, UFRGS, Brasil, 2004.

PANDA, A. K.; KHAN, R. H.; APPA RAO, K. B. C.; et al. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. *J Biotechnol*, v.75, p.161-172, 1999.

PANSURIYA, R. C.; SINGHAL, R. S. Effects of dissolved oxygen and agitation on production of serratiopeptidase by *Serratia marcescens* NRRL B-23112 in stirred tank bioreactor and its kinetic modeling. *J Microbiol Biotechnol*, v.21, p.430-437, 2011.

PEI, X. L.; WANG, Q. Y. ; LI, C. L.; QIU, X. F.; et al. Efficient Production of a Thermophilic 2-Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase in Glucose-Limited Fed-Batch Cultivations of *Escherichia coli* by Continuous Lactose Induction Strategy. *Appl Biochem Biotechnol*, v.165, p.416-25, 2011.

PILAREK, M.; GLAZIRINA, J.; NEUBAUER, P. Enhanced growth and recombinant protein production of *Escheria coli* by a perfluorinated oxygen carrier in miniaturized fed-bacth cultures. *Microb Cell Facts*, v.10, p.1-9, 2011.

PINSACH, J.; MAS, C.; LÓPEZ-SANTIN, J. Induction strategies in fed-bactch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. *Biochemical Engineering Journal*, v.41, p.181-187, 2008.

REY, L. C. *Parasitologia – Parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África*. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

RIESENBERG, D.; MENZEL, K.; SCHULZ, V.; et al. High cell density fermentation of recombinant *Escherichia coli* expressing human interferon alpha 1. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.34, n.1, p.77-82, 1990.

RODRIGUES, G. S.; CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P. J.; et al. *Avaliação de impacto ambiental de atividades em estabelecimentos familiares do Novo Rural*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. 44 p.

ROSSI, M. *Desenvolvimento do processo de cultivo de Escherichia coli RRI*. 2001. 100f. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, USP, Departamento de Engenharia Química, São Paulo/SP.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. 1.ed. São Paulo: EditoramEdgard Blücher Ltda, 2001. v. 1. 541p.

SELVAPANDIYAN, A.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; et al. Immunity to Visceral Leishmaniasis Using Genetically Defined Live-Attenuated Parasites. *J Trop Med Med*, v.1, p.1-12, 2012.

SEREIKATE, I.; STATKUTE, A.; MORKUNAS, M.; et al. Production of recombinant mink growth hormone in *E. coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, v.74, p.316-23, 2007.

SHARMA, S. S.; BLATTNER, F. R.; HARCUM, S. W. Recombinant protein production in *Escherichia coli* reduced genome strain. *Metabolic Engineering*, v. 9, p.133-141, 2007.

SILVA JUNIOR, J. G. *Eletroforese de proteínas: guia teórico-prático*. Rio de Janeiro: Interciência, 2001.

SUÁREZ D. C.; KILIKIAN, B.V. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, v.35, p.1051-1055, 2000.

TIAN, H.; TANG, L.; WANG, Y.; WANG, X.; et al. Lactose Induction Increases Production of Recombinant Keratinocyte Growth Factor-2 in *Escherichia coli*. *Int J Pept Res Ther*, v.17, p.123–129, 2011.

TOMAZETTO, G.; MULINARI, F.; STANISCUASKI, F.; et al. Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p.821–827, 2007.

TRAN, T. T.; MAMO, G.; MATTIASSON, B.; KAUL, R. H. A thermostable phytase from *Bacillus* sp. MD2: cloning, expression and high-level production in *Escherichia coli*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v.37, p.279-287, 2010.

VALDEZ-CRUZ, N. A.; CASPETA, L.; PEREZ, N. O.; RAMIREZ, N. O.; TRUJILLO-ROLDAN, M. A. Production of recombinant proteins in *E.coli* by the heat inducible

expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microbial Cell Factories*, v. 9, p.1-16, 2010.

VALGEPEA, K.; ADAMBERG, K.; VILU, R. Decrease of energy spilling in *Escherichia coli* continuous cultures with rising specific growth rate and carbon wasting. *BMC Systems Biology*, v.106, p.1-11, 2011.

VIDAL, L.; FERRER, P.; ALVARO, G.; et al. Influence of induction and operation mode on recombinant rhamnulose 1-phosphate aldose production by *Escherichia coli* using the T5 promoter. *Journal of Biotechnology*, v.118, p.75-87, 2005.

VOULGARIS, S.; ARNOLD, A.; SPEIGHT, R.; et al. Effects of dissolved oxygen availability and culture biomass at induction upon the intracellular expression of monoamine oxidase by recombinant *E. coli* in fed batch bioprocesses. *Process Biochemistry*, v.46, n. 3, p. 721-729, 2011.

WANG, D.; LI, Q.; MAO, Y.; et al. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *ptsG* mutant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v.87, p.2025-2035, 2010.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog*, v. 38, n.4, p.147-160, 2005.

WONG, M. S.; THOMAS, W. U, S.; CAUSEY, B.; et al. Reduction of acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures for increased recombinant protein production. *Metabolic Engineering*, v.10, n.2, p. 97-108, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2009. Leishmaniasis. <http://who.int/emc/diseases/leish/index.html>. Acesso em 19 de dezembro 2011.

XIE, R.; TU, M.; WU, Y.; et al. Improvement in HPLC separation of acetic acid and levulinic acid in the profiling of biomass hydrolysate. *Bioresour Technol*. v.102, n.7, p.4938-4942, 2011.

XUE, W.; FAN, D.; SHANG, L.; et al. Effects of acetic acid and its assimilation in fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA. *J. Biosci. Bioeng*, v. 109, p.257-261, 2010.

YEE, L.; BLANCH, H. W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Bio. Technol*, v.10, p.1550-1556, 1992.

ZHANG, Y.; LI, Z.; YE, Q. Enhanced production of human epidermal growth factor under control of the *phoA* promoter by acetate-tolerant *Escherichia coli* DB15 in a Chemically defined medium. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.15, p.626-634, 2010.

---

## **ANEXOS**

---

## ANEXO I

Tabela 1. Lista dos tampões dos tampões utilizados na purificação da proteína de interesse e no procedimento de lise dos corpos de inclusão.

Tampão	Composição	Etapa
Tampão de Ligação	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=6,3.	Purificação
Tampão de Eluição C	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=5,9.	Purificação
Tampão de Eluição E	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=4,5.	Purificação
Tampão de Lise	Fosfato de sódio 100 mM, 8 M uréia , 10 mM Tris-Cl, pH=8,0.	Lise dos corpos de inclusão

Referência : (Qiagen, Valência, U.S.A)

## **ANEXO II**

### **Curva Padrão**

O princípio desse método consiste em duas reações colorimétricas: A reação de Biureto, na qual os íons Cu interagem com as ligações peptídicas originando uma coloração azul intensa e a reação, que envolve a adição do reagente de Folin-Ciocalteu em uma mistura complexa de sais inorgânicos cuja reação com a tirosina e o triptofano resulta em uma coloração azul esverdeada intensa. A combinação dessas duas reações fornece um teste muito mais sensível do que as duas reações isoladamente

O procedimento de determinação da proteína consistiu em centrifugar uma massa conhecida da suspensão bacteriana. Após contato com a resina, o sobrenadante era diluído adequadamente com NaOH 1N, para posterior, determinação da quantidade de proteína presente no caldo. Em seguida, adicionava-se 0,5ml desta solução num tubo contendo 5ml da solução D. Agitava-se novamente por 30 segundos. Após 20 minutos adicionava-se 0,5ml do Reagente de Folin. Agitava-se novamente por 30 segundos e deixava-se repousar por 90 minutos. Este tempo foi suficiente para que a amostra desenvolvesse uma coloração roxa.

Após a leitura da absorbância a 660 nm em espectrofotômetro UV-Visível da Thermo Spectronic modelo Genesys 10uV, o valor da concentração das proteínas nas amostras foram obtidas pela interpolação numa curva padrão, utilizando-se para isto soluções de Albumina bovina (Biosystems) como padrão. No anexo II, apresenta-se a curva padrão.

Solução D

Solução A: a 2% (p/v) de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

Solução B: 4% (p/v) de Tartarato de sódio e potássio.

Solução C: 2% (p/v) de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Solução D: Juntava-se 2ml da solução A e 2ml da solução B num balão de 100ml, completando-se o volume com a solução C.

Reagente 2: reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma) diluído para 1N.

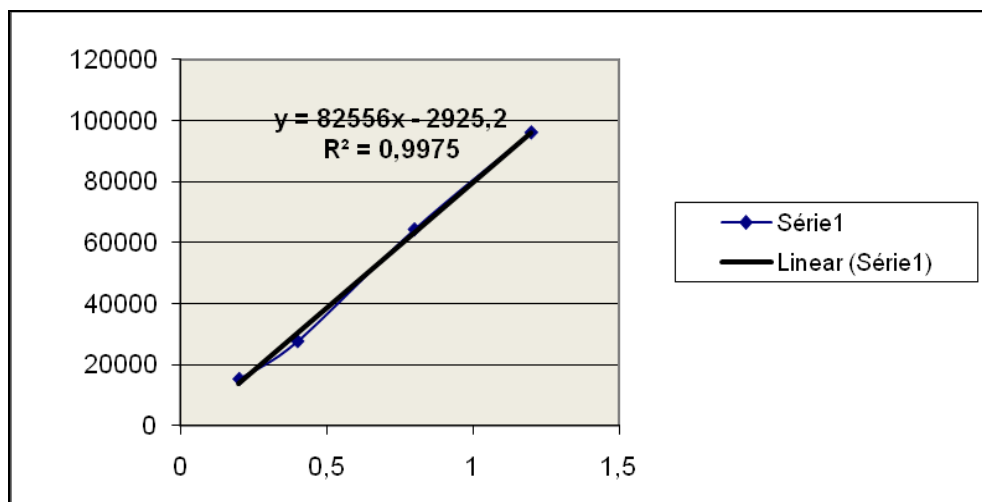
A partir do reagente de Folin (Merck) 2N, obteve-se uma solução 1N através da diluição com água.

Para obtenção de uma curva padrão foram utilizados padrões a partir de Albumina bovina (Biosystems) com concentrações de 20, 70, 210, 280, 350 e 420 mg/mL, as quais foram relacionadas com suas respectivas absorvâncias.

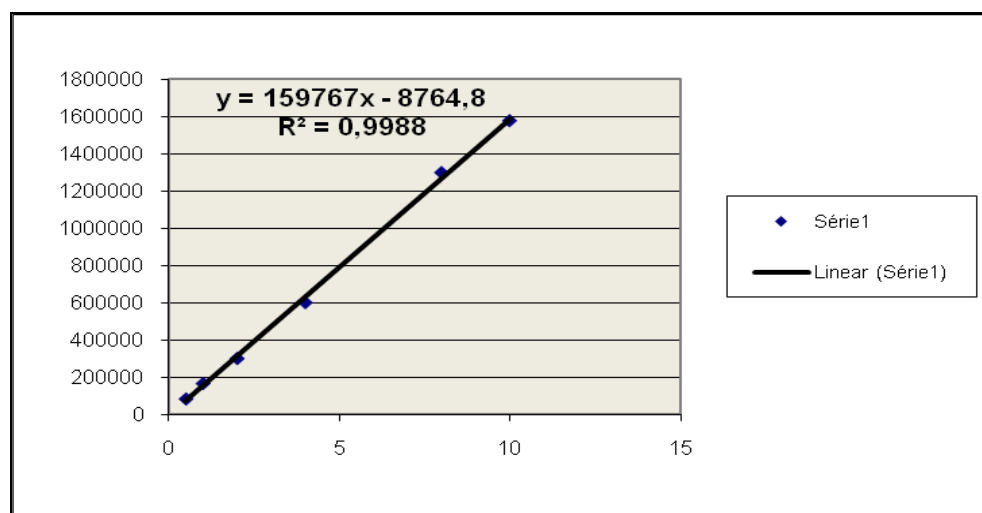
A curva padrão resultante foi  $y = 758,16 \cdot X - 31,952$  com coeficiente de correlação de  $R = 0,9919$ .

## ANEXO III

### Curva Padrão correspondente a concentração do ácido acético

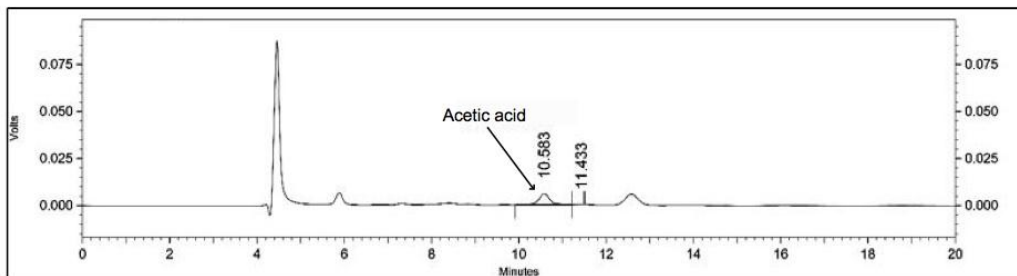


### Curva Padrão correspondente a concentração de lactose

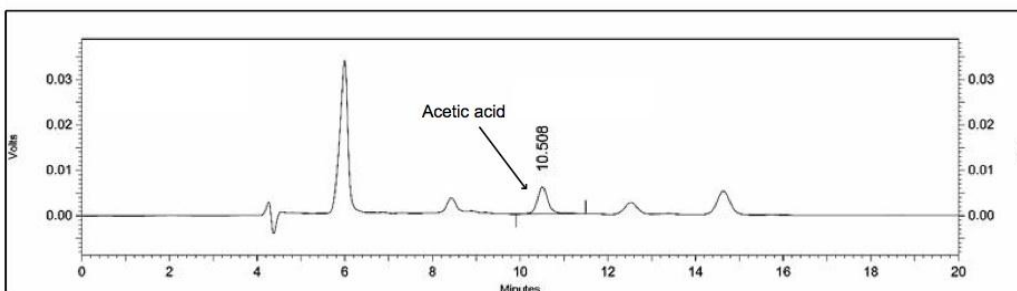


Cromatograma típico indicando o pico correspondente ao ácido acético ( $T_R = 10,5$  minutos).

**A**



**B**



**Cromatogramas de produção do ácido acético em meio 2xTY (A) e Meio TB (B) com tempo de retenção ( $T_R= 10,5$  minutos).**