

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Biologia Vegetal



**Efeitos do enriquecimento em oxigénio e da fonte de carbono  
em operação em biorreactor na produção de pDNA numa  
estirpe de *Escherichia coli***

**Maria Alexandra Vieira Marcelino**

Dissertação

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2014

Universidade de Lisboa

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Departamento de Biologia Vegetal



**Efeitos do enriquecimento em oxigénio e da fonte de carbono em  
operação em biorreactor na produção de pDNA numa estirpe de  
*Escherichia coli***

**Maria Alexandra Vieira Marcelino**

Dissertação

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Orientadores: Professora Doutora Marília Mateus, IST-UL

Professora Doutora Rita Zilhão, FCUL-UL

2014

## **Agradecimentos**

Quero agradecer a todas as pessoas que foram fundamentais não só na conclusão desta tese como também, ao longo de todo o mestrado.

Primeiramente, quero agradecer à Professora Marília Mateus por ter aceite orientar o meu trabalho de dissertação, por todos os seu ensinamentos, paciência, disponibilidade e palavras de incentivo. Quero agradecer também ao Professor Gabriel Monteiro por ter aceite co-orientar o meu trabalho e pela sua disponibilidade em ensinar e ajudar.

À Professora Rita Zilhão pela sua sempre dedicação aos alunos como professora e orientadora interna neste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório pelos ensinamentos, pelo espírito de entreajuda e momentos de descontração. Quero agradecer especialmente ao Pradipta Rauta pela introdução ao laboratório e disponibilidade em ajudar, ao Luís Raiado pela introdução ao Äkta e toda a ajuda demonstrada, ao João Trabuco e ao Pedro Pereira por toda a ajuda e disponibilidade, à Rita Fernandes e à Diana Marques pelo apoio no trabalho com as estirpes, à Cátia Jorge, à Sara Rosa, à Raquel Santos e à Inês Pinto pela paciência e sempre disponível ajuda no trabalho em Äkta e ao Rodrigo Raposo pelos ensinamentos de HPLC.

Um enorme agradecimento ao Ricardo Pereira pela dedicação e ajuda ao longo deste trabalho, bem como, por ajudar a manter a organização do laboratório. Um obrigada à D. Rosa Gonçalves pela sua simpatia, disponibilidade e manter a limpeza do material de laboratório.

Um agradecimento especial ao João e à Joana por terem sido excelentes estagiários, pelos conhecimentos transmitidos, vontade de aprender e toda a ajuda que foi fundamental na fase final deste trabalho.

Aos meus pais por sempre terem acreditado em mim, pois sem eles, esta etapa não teria sido possível de alcançar.

À Mia e à Mami, por terem sempre acreditado em mim.

Aos meus colegas de mestrado, Rita Santos, Pedro Castro e Inês Costa por me terem sempre ajudado ao longo do período curricular.

À Catarina, Sílvia e Mico por acreditarem em mim, pelo apoio incondicional e todas as palavras de incentivo.

## Abstract

Gene therapy and DNA vaccines present a promise in the treatment of diseases like viral infections, genetic and acquired diseases.

From the point of view of manufacture, it is important to establish a profitable process with a low cost-production relation. So, over the last years the investigation has optimized and improved the production conditions as well as genetically modifying some bacterial strains to turn the production of hypothetical vectors profitable.

This thesis was a follow up on a previous work aiming at genetically modifying *Escherichia coli* strains by knockouts of target genes (*pgi*, *endA* and *recA*) that are directly related with nucleotides and plasmid DNA production along with proving the importance of the carbon source in the fermentative process to maximize the nucleotide synthesis and reduce the acetate production. In this work, two modified *E. coli* strains (GALG20 and DH5 $\alpha$ ) were subjected to different fermentative conditions: shake flask and bioreactor, which was operated under batch and fed-batch modes, with glucose or glycerol as primary carbon sources in addition to fed-batch supplemented with pure oxygen.

**Key-words:** gene therapy, GALG20, plasmid DNA production, vectors, optimization of fermentation conditions

## Resumo

A terapia génica e as vacinas de DNA apresentam uma aposta promissora no tratamento de doenças, nomeadamente infecções virais, doenças genéticas e adquiridas.

No ponto de vista da produção é fundamental que seja um processo rentável com uma boa relação custo-produção. Assim, ao longo das últimas décadas a investigação tem passado por otimizar e melhorar condições de produção bem como, modificar geneticamente determinadas estirpes de bactérias de modo a que produção de possíveis vectores de DNA seja industrialmente rentável.

Nesta dissertação foi dada continuidade a um anterior trabalho que teve como objectivos modificar geneticamente estirpes de *Escherichia coli* fazendo silenciamento de genes alvo (*pgi*, *endA* e *recA*) que estão directamente relacionados com a produção de nucleótidos e produção

de DNA plasmídico e provar a importância da fonte de carbono no processo fermentativo maximizando a síntese de nucleótidos e reduzindo a produção de acetato. Neste trabalho, foram usadas duas estirpes de *E. coli* modificadas (GALG20 e DH5 $\alpha$ ) que foram sujeitas a diferentes condições de fermentação: *shake flask* e biorreactor com glucose e glicerol como fontes primárias de carbono. O biorreactor foi operado em *batch e fed-batch* e ainda enriquecido em oxigénio em operação *fed-batch*.

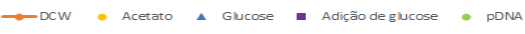

**Palavras-chave:** terapia génica, GALG20, produção de DNA plasmídico, vectores, optimização de condições de fermentação.

# Índice



Agradecimentos.....	i
Abstract.....	ii
Resumo .....	ii
Índice de tabelas .....	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
Lista de variáveis.....	viii
1 Enquadramento e objectivos .....	1
2 Introdução .....	1
2.1 GALG20 .....	3
2.2 pVAX1/GFP .....	4
2.3 Efeito do oxigénio na produção de pDNA .....	5
2.4 Obtenção de pDNA .....	5
2.5 HPLC-HIC (cromatografia de interacção hidrófoba).....	6
3 Materiais e Métodos .....	6
3.1 Estirpes .....	6
3.2 Plasmídeo.....	6
3.3 Meios de cultura.....	6
3.4 Banco celular.....	7
3.5 Meio e condições de cultivo .....	7
3.5.1 Cultura em <i>shake flask</i> .....	7
3.5.2 Cultura em biorreactor <i>fed-batch</i> .....	8
3.6 Quantificação da concentração de biomassa.....	8
3.7 Lise alcalina .....	9
3.8 Electroforese em gel de agarose.....	10
3.9 Quantificação de DNA plasmídico .....	10
3.10 Quantificação de metabolitos.....	11
3.11 $k_{La}$ .....	11
4 Resultados e Discussão.....	12
4.1 Fermentação com glucose como fonte primária de carbono .....	13
4.1.1 Cultura em <i>shake flask</i> .....	13
4.1.2 Cultura em biorreactor.....	15
4.2 Fermentação com glicerol como fonte primária de carbono .....	22
4.2.1 Cultura em <i>shake flask</i> .....	22
4.2.2 Cultura em biorreactor.....	24

5	Conclusão.....	26
5.1	Fermentação em <i>shake flask</i> com glucose e glicerol como fontes primárias de carbono .....	26
5.2	Fermentação em biorreactor operado em <i>fed-batch</i> com glucose como fonte primária de carbono. ....	26
5.3	Fermentação em biorreactor operado em <i>fed-batch</i> com glicerol como fonte primária de carbono .....	28
5.4	Considerações globais .....	28
6	Bibliografia .....	30
	ANEXOS .....	1
1	Rectas de calibração .....	1
1.1	Concentração de biomassa .....	1
1.2	Concentração de pDNA.....	1
1.3	Concentração de metabolitos .....	2
2	Taxa específica de crescimento.....	2
3	$k_{La}$ .....	3
4	Variação dos parâmetros de fermentação .....	4
4.1	<i>Fed-batch</i> com glucose como fonte primária de carbono .....	4
4.2	<i>Fed-batch</i> com glicerol como fonte primária de carbono .....	5
5	<i>Script</i> para programação da bomba de alimentação .....	5

## Índice de figuras

Figura 1 – Estratégias de silenciamento de genes para promover a produção de pDNA em <i>E. coli</i> . Esta figura representa de forma simplificada a central de metabolismo em <i>E. coli</i> . As setas pretas representam o fluxo de carbono na PPP, as setas cinzentas representam a repressão da glicólise e a seta branca representa um fluxo nulo de carbono. G6P glucose-6-fosfato, F6P frutose-6-fosfato, FDP frutose-1,6-difosfato, G3P gliceraldeído-3-fosfato, PEP fosfoenolpiruvato, 6GPC 6-fosfogluconato, RU5P ribulose-5-fosfato, XU5P xilulose-5-fosfato, R5P ribose-5-fosfato, S7P sedoepitulose-7-fosfato, E4P eritrose-4-fosfato, PRS sistema fosfotransferase [3].	4
Figura 2 – mapa do plasmídeo pVAX1/GFP.	4
Figura 3 – Resultados experimentais de fermentação em <i>shake flasks</i> com <i>baffles</i> com GALG20 e DH5 $\alpha$ com glucose como fonte primária de carbono. Nos gráficos A e C estão representados os resultados referentes a ensaios com <i>E. coli</i> GALG20 e nos gráficos B e D estão representados os resultados referentes a ensaios com <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ . 	13
Figura 4 – Electroforese em gel de agarose. Juntamente com os 5 $\mu$ L lisado clarificado foram adicionados 5 $\mu$ L de água e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> . Nas amostras em que foi usado 10 $\mu$ L de lisado clarificado, usou-se também o dobro de água e <i>loading buffer</i> .	15
Figura 5 – Electroforese em gel de agarose. Juntamente com os 5 $\mu$ L lisado clarificado foram adicionados 5 $\mu$ L de água e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> . Nas amostras em que foi usado 10 $\mu$ L de lisado clarificado, usou-se também o dobro de água e <i>loading buffer</i> .	15
Figura 6 – Resultados experimentais em biorreactor operado em <i>fed-batch</i> com GALG20 com glucose como fonte primária de carbono. Os gráficos A, B e D representam ensaios experimentais com as mesma condições de crescimento e cuja temperatura de <i>batch</i> foi de 30°C. No gráfico C o período de crescimento em <i>batch</i> decorreu a 37°C. 	17
Figura 7 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 6A. Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> . Do poço 1 ao 13 foram introduzidos lisados correspondentes aos tempos de fermentação de 23 a 34h e no poço 14 foi introduzido o lisado correspondente às 36h de fermentação.	19
Figura 8 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados nas Figuras 6B (poços 1 a 12) e 6C (poços 13 a 24). Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> .	19
Figura 9 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 6D. Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> .	19
Figura 10 – Resultado experimental em biorreactor operado em <i>fed-batch</i> com GALG20 com glucose como fonte primária de carbono e ar enriquecido em oxigénio puro a partir das 24h de fermentação.	21
Figura 11 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 10. Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de <i>loading buffer</i> . No poço 1 a banda corresponde às 23h de fermentação, no poço 2 corresponde às 25h, no poço 3 às 27h, no poço 4 às 28h, no poço 5 às 30h, no poço 6 às 32h, no poço 7 às 34 e no poço 8 às 35,5h.	22
Figura 12 – Ensaios experimentais em <i>shake flask</i> com 20g/L de glicerol como fonte primária de carbono. Nos gráficos A e C estão representados os resultados dos ensaios feitos com DH5 $\alpha$	

e no gráfico B estão representados os resultados do ensaio feito com GALG20.

	.....23
<p>Figura 13 – Ensaio experimental em biorreactor operado em <i>fed-batch</i> com GALG20 com glicerol como fonte primária de carbono. Na Figura A o início da alimentação foi às 10h e aumento da temperatura de 30°C para 42°C às 24h. Na Figura B o <i>fed-batch</i> foi iniciado às 19h e o aumento da temperatura para 42° ocorreu às 35h.</p>	 .....25
<p>Figura 14 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na figura 13A. Em todos os poços foram introduzidos 10µL de lisado clarificado e 3µL de <i>loading buffer</i>. No poço 1 a banda corresponde às 12h de fermentação, no poço 2 corresponde às 23h, no poço 3 corresponde às 24h, no poço 4 às 26h, no poço 5 às 28h, no poço 6 às 30h, no poço 7 às 32h, no poço 8 às 34,5h e no poço 9 às 35,25h.....</p>	26
<p>Figura 15 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 13B. Em todos os poços foram introduzidos 10µL de lisado clarificado e 3µL de <i>loading buffer</i>. No poço 1 a banda corresponde às 14h de fermentação, no poço 2 corresponde às 18,3h, no poço 3 às 32,15h, no poço 4 às 35,15h, no poço 5 às 37,15h e no poço 6 às 38h.....</p>	26

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Caracterização dos meios de fermentação em frasco com GALG20 e DH5α transformadas com pVAX1/GFP às 24h de cultivo a 37°C e 250 rpm [16]. .....	13
Tabela 2 – Caracterização dos meios de fermentação com glucose como fonte primária de carbono, em biorreactor operado em <i>batch</i> às 24h de cultivo, a 37°C e controlo do arejamento em cascata e <i>fed-batch</i> às 36h de cultivo, a 42°C e controlo do arejamento em cascata com GALG20 e DH5α transformadas com pVAX1/GFP [16]. .....	15
Tabela 3 – Tabela exemplificativa do cálculo do caudal de alimentação desejável de acordo com a equação $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$ para as primeiras três horas de <i>fed-fatch</i> .....	16
Tabela 4 – Tabela exemplificativa do cálculo do caudal de alimentação desejável de acordo com a equação $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$ para as primeiras três horas de <i>fed-fatch</i> . A variável V/x' representa o volume total em função do número de vezes que a bomba debita durante uma hora (quando o intervalo de tempo é de 20min a bomba funciona três vezes). .....	18
Tabela 5 – Resultados globais dos ensaios experimentais descritos. ....	28

## Lista de abreviaturas

*ackA* – gene que codifica para a enzima acetato quinase

AMP – adenosina monofosfato

ATP – adenosina trifosfato

DCW – peso seco celular

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO<sub>600</sub> – densidade óptica, medida ao comprimento de onda de 600nm.

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

gDNA – DNA genómico

GDP – guanosina difosfato

GTP – guanosina trifosfato

HIC-HPLC – cromatografia de interação hidrófoba – cromatografia líquida de alta eficiência

LPS – lipopolissacáridos

OC – *open circular*, circular aberto

pDNA - DNA plasmídico

*pgi* – gene que codifica para fosfoglucose isomerase

*poxB* – gene que codifica para piruvato oxidase

PPP – via das pentoses fosfato

*pta* – gene que codifica para a enzima fosfotransacetilase

*pyk* – gene que codifica para a enzima piruvato quinase

*relA* – gene que codifica para a proteína RelA

RNA – ácido ribonucleico

SC – *supercoiled*, superenrolado

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, dodecilsulfato sódico

Tris – trisaminometano

vvm – volume de gás por volume de meio líquido e por minuto

## Lista de variáveis

$\mu$  – Taxa específica de crescimento ( $t^{-1}$ )

$C_L$  – concentração de oxigénio dissolvido na fase líquida ( $\text{mmol O}_2.L^{-1}$ )

$C_L^*$  – concentração de oxigénio dissolvido em equilíbrio com a pressão parcial de oxigénio na fase gasosa (nas condições de operação do fermentador) ( $\text{mmol O}_2.L^{-1}$ )

H – constante de Henry ( $\text{atm L}^{-1}.\text{M}^{-1}$ )

$k_L a$  – coeficiente volumétrico de transferência de massa para o oxigénio ( $\text{t}^{-1}$ );  $k_L$  – coeficiente de transferência de massa através do filme do lado do líquido ( $\text{L.t}^{-1}$ );  $a$  – área interfacial por unidade de volume de fase líquida ( $\text{L}^2.\text{L}^{-3}$ )

OTR – taxa de transferência de oxigénio ( $\text{mol/L}^{-1}.\text{t}^{-1}$ )

$p\text{O}_2$  – pressão de oxigénio (atm)

$S_f$  – concentração de substrato na solução de alimentação ao biorreactor (fase *fed-batch*),  $\text{M.L}^{-3}$

$t$  – tempo

$V_b$  – volume do biorreactor ( $\text{L}^3$ )

$X_b$  – concentração celular no início da alimentação,  $\text{M}_{\text{DCW}}/\text{L}^3$

$Y_{p/s}$  – coeficiente de rendimento observado de produto/substrato,  $\text{M}_{\text{pDNA}}/\text{M}_{\text{substrato}}$

$Y_{p/x}$  – coeficiente de rendimento observado de produto/biomassa,  $\text{M}_{\text{pDNA}}/\text{M}_{\text{DCW}}$

$Y_{x/s}$  – coeficiente de rendimento observado de biomassa/substrato,  $\text{M}_{\text{DCW}}/\text{M}_{\text{substrato}}$

# 1 Enquadramento e objetivos

Esta dissertação enquadra-se numa linha de investigação da qual foi tida como objectivos modificar geneticamente estirpes de *Escherichia coli* através do silenciamento de genes chave para a produção de nucleótidos para que em conjunto com a optimização das condições de fermentação, poder aumentar a quantidade de DNA plasmídico produzido por célula.

Dando seguimento aos resultados que foram alcançados, foi proposto a continuação dos ensaios experimentais de modo a optimizar as condições de fermentação tendo em conta variações ainda não testadas como a alimentação em *fed-batch* com glicerol e o suplemento de oxigénio puro em operação *fed-batch*.

## 2 Introdução

Actualmente, o desenvolvimento da biotecnologia envolve a produção de biofármacos usados em vacinas, terapêutica e diagnóstico como ácidos nucleicos, proteínas recombinantes entre as quais, anticorpos monoclonais, etc. Nos últimos anos, o salto tem sido dado no sentido de desenvolver vacinas de DNA, seguras e eficazes, bem como, terapias baseadas em DNA [1]. Desta forma, ao longo da última década, os avanços na transferência de genes têm transformado a fantasia futurista da terapia génica numa realidade, prevendo assim, um potencial neste tipo de terapia e um avanço significativo na medicina clínica.

A terapia génica não engloba apenas a entrega de pDNA como também a entrega de oligonucleótidos *antisense* e sistemas baseados em RNA de interferência para células alvo. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos vectores para facilitar a introdução do material genético terapêutico dentro das células, como por exemplo: vectores baseados em DNA, virais e não virais e mais recentemente, vectores codificantes de RNA de interferência [2]. Embora os vectores adenovirais sejam mais comumente usados em ensaios de terapia génica, o seu uso na prática clínica apresenta ainda algumas limitações. Estas limitações podem ser superadas através do uso de vectores não virais cuja análise de risco/ benefício pode ser mais favorável que para os vectores não virais. Os vectores não virais de DNA plasmídico representam 25% dos vectores usados em ensaios clínicos de terapia génica e têm como patologias alvo, cancro, doenças cardiovasculares e oculares, infecções, doenças monogénicas, doenças auto-imunes e distúrbios neurológicos [2, 3].

O DNA plasmídico (pDNA) é actualmente a base e a promessa para as vacinas de DNA e terapias génicas contra algumas infecções, doenças genéticas e adquiridas [4]. É importante lembrar a fraca resposta imunitária que decorre após a injeção de “DNA nu” a menos que seja administrado em elevada dosagem em humanos [5].

Do ponto de vista biotecnológico, a componente chave para o sucesso deste tipo de fármacos é a capacidade de alcançar a produção a larga escala. A bactéria *Escherichia coli* é a espécie mais usada habitualmente como hospedeira para a produção de proteínas heterólogas por tecnologia de DNA recombinante e também tem sido melhorada por engenharia genética de modo a aumentar a produção de pDNA [1]. A quantidade de pDNA em *E. coli* é conhecida por ser influenciada por diversos factores, não só pela estirpe usada mas também pela composição do meio, como fonte de carbono, relação C/N, fontes de carbono adicionais como glutamato e outros aminoácidos e nucleótidos [4].

De grosso modo, as concentrações de pDNA obtidas por fermentação à escala laboratorial estão abaixo de 250mg/L, enquanto que, por fermentação pré-industrial, essas concentrações rondam a ordem de 1000–2100mg/L [3]. No entanto, a quantidade de pDNA por célula pode ser aumentado por indução da replicação do pDNA com a adição de adenosina monofosfato (AMP) em culturas com mutantes *relA*<sup>-</sup> ou por aumento da temperatura no caso de plasmídeos que contenham origem de replicação pUC [4]. No caso dos mutantes *relA*<sup>-</sup> (em estirpes que contenham plasmídeos ColE1) este gene codifica para uma proteína dependente do ribossoma que activa a síntese de (p)ppGpp que faz a transferência de grupos pirofosforil a partir da transferência de grupos fosfato de ATP para GTP ou GDP após privação de aminoácidos e/ou fonte de carbono [6]. Quando esta proteína não é sintetizada, por adição de AMP, este liga-se ao seu receptor formando um complexo que se liga perto de regiões promotoras aumentando a síntese da holoenzima RNA polimerase e facilitando a iniciação da transcrição [7].

Como já referido, a *E. coli* é a bactéria preferencialmente usada neste tipo de estudos e por isso, algumas estirpes têm vindo a ser melhoradas com intuito de aumentar a produção de pDNA. Estas melhorias passaram recentemente por mutações no metabolismo central de carbono e nas propriedades do plasmídeo. Desta forma, estas mutações têm gerado uma panóplia de estirpes produtoras de pDNA como a DH5α*AfruR*, BL21 $\Delta$ *endA*-*ArecA*, JM101 $\Delta$ *pykF* $\Delta$ *pykA*, DH5α*zwf: rpiA*<sup>+</sup> e W3110 $\Delta$ *PTSGalP*<sup>+</sup> $\Delta$ *pykA*. A diminuição de acetato e o aumento da produção de nucleótidos são algumas das estratégias usadas para aumentar o rendimento de produção de pDNA [3]. Para isso, uma das estratégias passa por fazer *knockouts* de genes seleccionados como *pykF* e *pykA* (piruvato quinase), *ackA-pta* (acetato quinase com

fosfotransacetilase) e *poxB* (piruvato oxidase), que visam reduzir a quantidade de acetato produzido pela estirpe, e por sobre-expressar genes da via das pentoses fosfato que aumentam o rendimento da produção de nucleótidos para a síntese de pDNA. Contudo, estas mutações têm revelado uma menor taxa de crescimento em relação à estirpe selvagem, uma característica que sugere organismos menos saudáveis [3].

Ainda que o conhecimento adquirido revele a importância destes genes e os seus possíveis efeitos na obtenção de maior quantidade de plasmídeo por célula, há também que ter em conta as condições de fermentação, a composição do meio e as fontes de carbono utilizadas. Estudos prévios mostram que o glicerol apresenta vantagem como fonte de carbono em relação à glucose por minimizar a produção de acetato no cultivo celular e ainda por ser uma fonte de carbono de baixo custo [3].

Assim sendo, o Departamento de Bioengenharia e o Centro de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa têm vindo a desenvolver projectos com o objectivo de melhorar estirpes de *E. coli* e de otimizar as condições de fermentação de modo a obter os melhores rendimentos e a reduzir a produção de metabolitos indesejáveis.

Nesta dissertação pretendeu dar-se seguimento a um trabalho prévio que originou e caracterizou parcialmente uma estirpe de *E. coli* melhorada (GALG20) no sentido de aumentar a produção de pDNA e melhorar as condições de fermentação alcançadas ao longo desse projecto.

## **2.1 GALG20**

Inicialmente, para diminuir o fluxo de piruvato quinase, foram suprimidos os genes *pykF* e *pykA* em MG1655 $\Delta$ *endA* $\Delta$ *recA* (estirpe MG1655 com deleção na endonuclease A e na recombinase A que têm como objectivo minimizar a digestão e a recombinação não específica de DNA, respectivamente). Numa segunda fase, foi suprimido o gene *pgi* (fosfoglucose isomerase) para direccionar e aumentar o fluxo de carbono na via das pentoses fosfato (PPP), reduzir a formação de acetato e promover a síntese de nucleótidos. A fosfoglucose isomerase redirecciona o fluxo glicolítico aumentando o fluxo na via das pentoses fosfato e promovendo a síntese de nucleótidos e a produção de NADPH. A glicólise fica reprimida mas procede a via de formação de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, conforme ilustrado na Figura 1 [3]. No final, o genótipo que deu origem à estirpe GALG20 foi MG1655 $\Delta$ *endA* $\Delta$ *recA* $\Delta$ *pgi*.

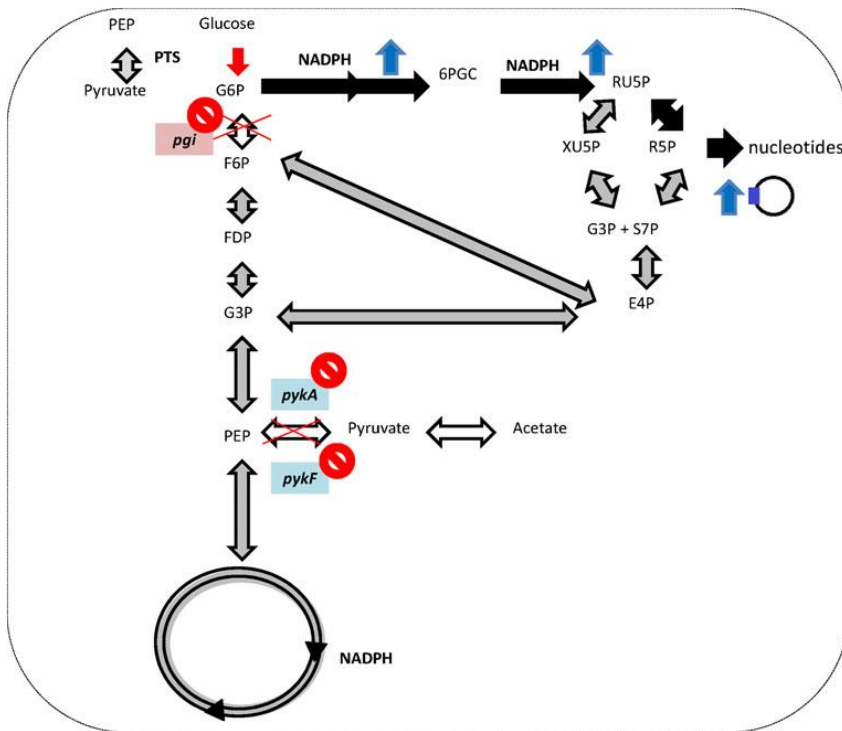


Figura 1 – Estratégias de silenciamento de genes para promover a produção de pDNA em *E. coli*. Esta figura representa de forma simplificada a central de metabolismo em *E. coli*. As setas pretas representam o fluxo de carbono na PPP, as setas cinzentas representam a repressão da glicólise e a seta branca representa um fluxo nulo de carbono. G6P glucose-6-fosfato, F6P frutose-6-fosfato, FDP frutose-1,6-difosfato, G3P gliceraldeído-3-fosfato, PEP fosfoenolpiruvato, 6PGC 6-fosfogluconato, RU5P ribulose-5-fosfato, XU5P xilulose-5-fosfato, R5P ribose-5-fosfato, S7P sedoheptulose-7-fosfato, E4P eritrose-4-fosfato, PRS sistema fosfotransferase [3].

## 2.2 pVAX1/GFP

O pVAX1/GFP (3697pb) é um plasmídeo que foi obtido pela modificação do plasmídeo comercial pVAX1lacZ (6050AREpb, Invitrogen) através da substituição do gene repórter da  $\beta$ -galactosidase pelo gene *GFP* (gene que codifica para a Proteína Verde Fluorescente (GFP)). Este plasmídeo contém o promotor do citomegalovirus humano (CMV) e um gene de resistência à canamicina [8].

Os plasmídeos que possuem uma origem de replicação pUC contêm uma mutação simples, de guanina para adenina, imediatamente antes da sequência do elemento molecular que participa no controlo da replicação do plasmídeo. Este elemento, denominado de RNAI, liga-se ao segundo elemento, o RNAII, para reduzir a taxa de replicação do plasmídeo. Quando a temperatura de cultura aumenta para valores no

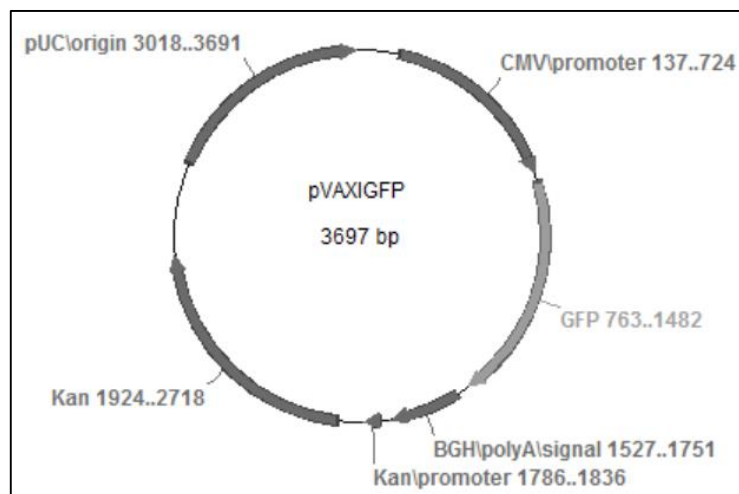


Figura 2 – Mapa do plasmídeo pVAX1/GFP.

intervalo de 40°C a 45°C, a mutação referida impede o enrolamento correcto do RNAI, evitando a correcta ligação entre o RNAI e II que consequentemente leva a um aumento da síntese de pDNA [4].

### **2.3 Efeito do oxigénio na produção de pDNA**

O oxigénio tanto é essencial ao crescimento aeróbio em *E. coli* como ao mesmo tempo, revela ser um problema aquando do seu enriquecimento no meio de cultura devido à sua baixa solubilidade.

O aumento da OTR (taxa de transferência de oxigénio) pode ser feito por aumento da pressão no biorreactor, aumento da agitação ou redução do consumo de oxigénio através diminuição da temperatura ou concentração de substrato, contudo, cada uma destas alternativas gera efeitos na produtividade.

Directamente relacionado com a taxa de crescimento na presença de oxigénio está a biossíntese de precursores e ATP, bem como, a síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos aromáticos. Deste modo, alterações nos níveis de oxigénio dissolvido não afectam apenas a formação e manutenção de biomassa mas também a replicação de plasmídeo e expressão de genes localizados no pDNA.

Como descrito por Xiaoli *et al.* (1991), o aumento do oxigénio no meio de cultura mostra resultados favoráveis no aumento da produção de pDNA [9].

### **2.4 Obtenção de pDNA**

A produção de pDNA inclui fermentação, isolamento primário, purificação intermédia e purificação final. Durante a fermentação, o plasmídeo é produzido por replicação autónoma. O isolamento primário é feito após uma colheita de células seguida de lise alcalina. Parte dos constituintes celulares são eliminados durante a lise e purificação intermédia mas as isoformas de pDNA superenrolado (SC), circular aberto (OC), relaxado, linear e eventuais multímeros, algumas proteínas residuais, endotoxinas, RNA e fragmentos de DNA genómico permanecem na solução de lise.

A qualidade do pDNA é essencialmente dependente da produção e da forma como é armazenado após lise celular. Durante a produção e os processos de recuperação, o pDNA está sujeito a vários stresses que danificam o SC pDNA, resultando em pDNA relaxado ou circular aberto e linear. A maioria das moléculas presentes no lisado apresentam, propriedades físicas, químicas e estruturais análogas com o pDNA: carga negativa (RNA, gDNA e endotoxinas) e

massa molecular (gDNA e endotoxinas), por isso, na purificação final é útil um processo cromatográfico com elevada selectividade que explore as diferenças de hidrofobicidade [10].

## **2.5 HPLC-HIC (cromatografia de interacção hidrófoba)**

As moléculas de pDNA são polímeros lineares ou circulares de desoxirribonucleótidos ligados por ligações/ grupos fosfodiéster que são polianiónicos até pH 4,0. As duas cadeias anti-paralelas estão conectadas por ligações de hidrogénio entre nucleótidos complementares em cada cadeia, ao longo de um eixo comum formando a conhecida estrutura de dupla hélice com depressões altamente hidrófobas acessíveis ao solvente e a ligandos moleculares.

A acessibilidade através dessas depressões a electrões aromáticos, e os locais disponíveis para ligações de hidrogénio são essenciais para a ligação do pDNA e o seu reconhecimento. Os suportes de cromatografia tiram partido das pequenas diferenças entre o pDNA e as suas impurezas (carga, tamanho, hidrofobicidade e acessibilidade das bases azotadas).

A HIC tem sido amplamente usada na pré-purificação de pDNA para fins terapêuticos, no entanto, neste trabalho focar-se-á a sua importância na análise quantitativa. O método explora a interacção entre ligandos hidrófobos imobilizados e regiões não polares na superfície de biomoléculas em ambiente não desnaturado [10].

## **3 Materiais e Métodos**

### **3.1 Estirpes**

Para este trabalho experimental foram usadas duas estirpes de *E. coli*: DH5 $\alpha$  e GALG20.

### **3.2 Plasmídeo**

As estirpes referidas no ponto anterior foram transformadas com o plasmídeo pVAX1/GFP.

### **3.3 Meios de cultura**

No presente trabalho, as fermentações decorreram em meio complexo a pH de 7,1 (10g/L peptona; 10g/L extracto de levedura; 3g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 3,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 3,5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) esterilizado a 120°C durante 20 minutos dentro de frascos rolhados e durante 30 minutos dentro do biorreactor. Após a esterilização e arrefecimento dos meios, estes foram suplementados com 1mL/L de *seed solution* preparada a uma concentração de 10X para uma concentração final de 199mg/L tiamina (cofactor de enzimas do metabolismo de carbono) e 1,99g/L MgSO<sub>4</sub>, 1mL/L de *trace element solution* preparada a uma concentração de 1X (27g/L

FeCl<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O; 2g/L ZnCl<sub>2</sub>; 2g/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 2g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 1g/L CaCl<sub>2</sub>· 2H<sub>2</sub>O; 1,3g/L CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O; 0,3g/L H<sub>3</sub>Bo<sub>3</sub> e 100mL/L HCl) e 30µg/mL de canamicina.

### 3.4 Banco celular

Os bancos celulares de GALG20 e DH5α foram preparados a partir de colónias individuais inoculadas em meio Luria-Bertani suplementado com 30µg/mL de canamicina. As culturas cresceram em *shake flasks* estéreis de rolha permeável ao ar até meio da fase exponencial, em incubador orbital com uma agitação de 250rpm e a 37°C. Em seguida, as alíquotas destas culturas foram armazenadas a -80°C em 20% de glicerol (v/v).

Posteriormente e antes de iniciar a fermentação em *shake flask*, células do referido banco foram mantidas em placas (por cerca de um mês) com meio Luria-Bertani suplementado com 30µg/mL de canamicina para posterior inoculação.

### 3.5 Meio e condições de cultivo

Todos os meios, fontes de carbono e agentes anti-espuma (quando necessários), *shake flasks* e biorreactores foram esterilizados previamente. A adição de soluções suplementares (*seed solution* e *trace element solution*) foi feita após o arrefecimento dos meios.

#### 3.5.1 Cultura em *shake flask*

Usaram-se células mantidas em placa de agar com Luria-Bertani suplementado com 30µg/mL de canamicina para produzir os inóculos de culturas em *shake flask*.

Cada inóculo foi preparado a partir de uma colónia ressuspensa em meio complexo num *shake flask* de 250mL com 50mL de meio complexo. As células foram incubadas *overnight* em frasco de rolha permeável ao ar em incubador orbital a 37°C e a uma agitação de 250 rpm. A inoculação foi feita com um volume de inóculo para uma densidade óptica a 600nm (DO<sub>600</sub>) de 0,1 num *shake flask* de 250mL com 50mL de meio complexo suplementado com *seed solution*, *trace element solution* e 30µg/mL de canamicina e foi ainda adicionada uma fonte primária de carbono esterilizada:

- 20g/L glicerol (adicionada de uma só vez e ao tempo zero de fermentação)
- (5+10)g/L de glucose (adicionada de forma faseada).

Alternativamente, nos estudos em que se usou glucose como fonte primária de carbono, esta foi adicionada a uma concentração de 5g/L ao tempo zero e de 10g/L às 12 horas de fermentação. As células foram incubadas durante 24 horas a 37°C e com uma agitação orbital de 250rpm.

### 3.5.2 Cultura em biorreactor *fed-batch*

O pré-inóculo foi preparado com uma alíquota do banco de células conservado a -80°C para um tubo Falcon de 15mL com 5mL de meio complexo suplementado com *seed solution*, *trace element solution* e 30µg/mL de canamicina. Células do pré-inóculo encubram num balão kitasato com rolha permeável ao ar a 37°C em incubador orbital a 250rpm até à fase exponencial. O inóculo foi preparado com 1% (v/v) de pré-inóculo em 100mL de meio complexo suplementado com *seed solution*, *trace element solution* e 30µg/mL de canamicina. As células incubaram *overnight* a 250rpm e a 37°C.

A inoculação foi feita num biorreactor Fermac 360 (Electrolab) com um volume de trabalho de 1,1L e com uma DO<sub>600</sub> 0,1 em meio complexo suplementado com *seed solution*, *trace element solution* e 30µg/mL de canamicina. Foi ainda adicionada ao tempo zero uma fonte primária de carbono esterilizada (glucose ou glicerol para a concentração de 20g/L). O valor de pH foi mantido a 7,1 usando soluções 1M NaOH e 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. O agente anti-espuma foi adicionado manualmente conforme necessário. O controlo do oxigénio dissolvido foi feito de modo a manter 30% deste por controlo da agitação (250rpm a 800rpm) em cascata com controlo do arejamento. O ar foi fornecido a uma taxa de 1vvm (volume de gás por volume de meio líquido e por minuto).

O período de fermentação em *batch* decorreu a 30°C durante 10 horas. Após a depleção da glucose, às 10h de fermentação, foi iniciado o *fed-batch* com um incremento da temperatura para 42°C às 24h de fermentação, que se prolongou até atingido o volume máximo suportado pelo biorreactor (≈2L). O caudal de alimentação da fonte de carbono pretendido na fase *fed-batch* foi calculado de acordo com a equação  $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$ . O valor de  $\mu$  (taxa específica de crescimento) foi mantido constante em todos os ensaios para uma taxa de 0,12h<sup>-1</sup>. Este valor foi determinado com base no que foi descrito por K. Bohle e A. Ross (2011) [11]. Segundo estes autores, o número máximo de cópias de plasmídeo por célula é obtido a uma taxa específica de crescimento entre 0,1h<sup>-1</sup> e 0,5h<sup>-1</sup> [11]. Esta taxa imposta, em conjunto com um incremento da temperatura como descrito por Silva *et al.* (2008) teria implicações no rendimento  $Y_{p/x}$  e no número de cópias de plasmídeo [12].

As amostras foram recolhidas periodicamente ao longo do período de cultivo a fim de determinar a densidade óptica e quantificar a glucose, o acetato e o pDNA.

## 3.6 **Quantificação da concentração de biomassa**

Determinou-se a correlação linear entre a concentração celular, X (g<sub>DCW</sub>/L) e a OD<sub>600</sub> de *E. coli* DH5α e *E. coli* GALG20 conforme representado em anexo nas Figuras A.1 A, B e C

(ver anexo) cujas equações são respectivamente:  $DO_{600} = 0,433X(g_{DCW}/L)$ ;  $DO_{600} = 0,414X(g_{DCW}/L)$  e  $DO_{600} = 0,498X(g_{DCW}/L)$ .

A concentração  $X$  de biomassa de *E. coli.*, nas amostras recolhidas durante as fermentações foi estimada por uma correlação estabelecida com a  $DO_{600}$  para a gama de valores  $DO_{600} \in [0;1,22]$  para a GALG20 e  $DO_{600} \in [0;1,78]$  para DH5 $\alpha$ , onde se verificou a linearidade da correlação. Para obter essa correlação, a  $DO_{600}$  foi medida num espectrofotómetro Hitachi U-2000 para suspensões preparadas por diluição de uma suspensão concentrada de células de *E. coli* cultivadas em meio complexo num *shake flask*, até ao fim da fase exponencial. Após centrifugação, as células foram lavadas e ressuspensas em 20mM  $KH_2PO_4$ . O peso seco desta suspensão celular concentrada numa estufa a 60°C foi obtido por gravimetria usando como branco 20mM  $KH_2PO_4$ . Para obter o peso seco, ao peso das células secas foi subtraído o peso do tampão e do suporte em papel de alumínio onde foram colocadas as células, A  $OD_{600}$  foi medida com várias diluições da suspensão celular concentrada a partir de uma diluição inicial de 1:10.

### 3.7 Lise alcalina

A lise alcalina foi iniciada com uma solução de glucose (torna o meio isotónico), EDTA (agente quelante dos catiões bivalentes indispensáveis para a actividade de enzimas degradadoras do pDNA e que se desejam inactivar) e Tris-HCl que actua como tampão. A lise depende da disrupção das células a pH 8,0 com NaOH e na presença de SDS (dodecilsulfato de sódio; detergente solubilizador dos lípidos da membrana celular), seguindo-se o desenrolamento e a desnaturação do gDNA e da maioria das proteínas celulares. Embora a isoforma SC-pDNA também se desenrole como consequência da lise alcalina, se o valor de pH se mantiver abaixo de 12,5, a ancoragem dos pares de bases mantém-se e impede a separação completa das duas cadeias. Assim, esta ancoragem funciona como um núcleo para completar a renaturação do pDNA durante o passo de neutralização promovido pelo acetato de potássio. Neste passo o SDS é precipitado juntamente com o gDNA desnaturado e os detritos celulares. Durante o procedimento, há que ter cuidado na manipulação de modo a evitar a formação de fragmentos de gDNA que não são agregados, dificultando a sua eliminação.

No final, o lisado clarificado contém proteínas, RNA, lipopolissacáridos (LPS), fragmentos de gDNA e o desejado pDNA numa proporção inferior a 1% (*m/m*) [13].

O volume de suspensão celular colhido durante a fermentação foi feito com base na igualdade  $C \times V = 10$  ( $C = DO_{600}$ ;  $V =$  volume colhido) de modo a obter sempre o mesmo número de células. As amostras foram centrifugadas durante 15min a 10600 $\times g$  para remover o meio de

cultura. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 500 $\mu$ L de solução P1 (50mM glucose; 25mM Tris-HCl, pH 8,0 e 10mM EDTA, pH 8,0) e foi ainda adicionado 500 $\mu$ L de solução P2 (0,2N NaOH e SDS 1% (*m/v*)). Incubaram-se as suspensões resultantes de forma estática durante 5min à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionaram-se 400 $\mu$ L de solução P3 (3M CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K e ácido acético glacial 11,5% (*v/v*)), misturando-se suavemente, e incubaram-se no gelo por 10min. Por fim, centrifugaram-se as amostras a 20000 $\times g$  durante 60min e guardaram-se os sobrenadantes a -20°C, para posterior quantificação de ácidos nucleicos por HPLC-HIC e análise qualitativa por electroforese em gel de agarose.

### 3.8 Electroforese em gel de agarose

Os géis de agarose foram preparados para uma concentração final de 1% (*m/v*) em tampão TAE (40mM Tris, 20mM ácido acético e 1mM EDTA; pH 8,0) corados no final com 0,4 $\mu$ g/mL de brometo de etídio e visualizado através de luz UV num sistema de aquisição de imagem Eagle Eye II da Stratagene (La Jolla, CA, USA).

Inicialmente em cada poço de gel de agarose foram injectados 5 $\mu$ L de lisado clarificado, 5 $\mu$ L água e 3 $\mu$ L de *loading buffer* para amostras provenientes de tempos de fermentação superiores a 18 horas; para amostras provenientes de tempos de fermentação inferiores, duplicaram-se os volumes. Posteriormente considerou-se adequado utilizar 10 $\mu$ L de lisado clarificado com 3 $\mu$ L de *loading buffer* em todas as soluções colocadas no poço. A electroforese decorreu durante uma hora e 30 minutos e a 120V, usando TAE (1X) como tampão de corrida. O marcador molecular usado foi (NZYDNA ladder III, NZYTech, Portugal), foi carregado também no gel em paralelo com as amostras.

### 3.9 Quantificação de DNA plasmídico

O pDNA foi quantificado nos lisados alcalinos clarificados obtidos a partir de células concentradas provenientes de amostragem de meios de cultivo tal que DO<sub>600nm</sub>=10 usando o método de HPLC de interacção hidrófoba descrito por Diogo *et al.* (2003) [14].

Para a quantificação foi usada a coluna 15 PHE – PE (4,6 mm x 10 cm) (GE Healthcare) conectada ao Äkta™ Purifier 10 FPLC System. O pDNA foi quantificado usando uma recta de calibração a partir de padrões do plasmídeo analisado (pVAX1/GFP) com concentrações de 5 a 150ng/ $\mu$ L representada na Figura 2 em anexo.

A coluna 15 PHE PE HIC (4,6 mm $\times$ 10 cm) da GE Healthcare foi inicialmente equilibrada com 1,5M de sulfato de amónio em 10mM de Tris-HCL, pH 8,0 (1mL/min) e o comprimento de onda  $\lambda$ =260nm. Foram injectados 50 $\mu$ L de lisado e a eluição foi isocrática.

Para o cálculo da concentração de pDNA foi usada a equação de calibração  $[pDNA](ng/\mu L) = 1,1559Área(mAU \times mL)$  válida para concentrações de 0ng/ $\mu$ L a 50ng/ $\mu$ L que reporta à Figura A.2 em anexo.

### 3.10 Quantificação de metabolitos

A concentração de glucose, glicerol e acetato foi determinada por análise de HPLC num sistema Hitachi LaChrom Elite HPLC equipado com uma coluna Rezex ROA Organic Acid H<sup>+</sup> 8% (300 mm x 7,8 mm) especifica para ácidos orgânicos e furaldeídos, um *auto sampler* (Hitachi LaChrom Elite L-2200), uma bomba de HPLC (Hitachi LaChrom Elite L-2130), um detector de índice de refração (RID) Hitachi L-2490 e um detector de UV (Hitachi L-2420). O aquecedor da coluna para colunas grandes (Croco-CIL 100-040-220P, 40 cm x 8 cm x 8 cm, 30–99°C) foi conectado externamente ao sistema de HPLC.

As amostras das culturas foram centrifugadas durante cinco minutos a 15300×g, imediatamente após a sua colheita. O sobrenadante foi diluído de 1:2 em 50mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, centrifugou-se de novo por mais cinco minutos a 15300×g e novamente o sobrenadante se diluiu de 1:10 em 50mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. As amostras foram, então, congeladas a -20°C. Previamente à análise, foram descongeladas e injectadas na coluna a um volume de 20 $\mu$ L. O método de HPLC decorreu a um caudal constante de 0,5mL/min com 5mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fase móvel, a 65°C por 20 min [15].

Os tempos de retenção para este caudal e para os compostos analisados foi o seguinte: glucose≈12,4min; glicerol≈17,6min; acetato≈19,2min.

As concentrações de glucose, glicerol e acetato foram determinadas com recurso a rectas de calibração com as equações cujos gráficos se encontram apresentadas em anexo na Figura 3. Para a glucose e o glicerol as concentrações dos padrões respectivos variaram entre 1g/L e 50g/L e para o acetato variou entre 0,5g/L e 10g/L. Todos os padrões sofreram o mesmo pré-tratamento que as amostras provenientes dos meios de cultura, ou seja, foram diluídas a 1:20 com 50mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. No final, as rectas obtidas foram respectivamente para a glucose, glicerol e acetato:  $Área (mAU \times mL) = 1,27 \times 10^{-5}[glucose](g/L) + 4,04 \times 10^4$ ;  $Área (mAU \times mL) = 1,09 \times 10^5[glicerol](g/L) - 7,40 \times 10^4$ ;  $Área (mAU \times mL) = 1,02 \times 10^5[acetato](g/L)$ .

### 3.11 k<sub>L</sub>a

No fermentador equipado com duas turbinas de Rushton no veio, foram inseridos 1800mL de água destilada e colocados os eléctrodos de oxigénio e pH nos respectivos locais com a válvula de entrada de ar fechada. Adicionou-se sulfito de sódio para uma concentração

de 50mM e sulfato de cobre para uma concentração de 1mM. Após a sua dissolução, foram recolhidas duas amostras de 1mL ao tempo zero. Abriu-se a válvula da botija de oxigénio e da entrada deste no fermentador ajustando o caudal de borbulhamento para a taxa de arejamento de 0,75vvm, programou-se a agitação para 350rpm e, simultaneamente, ligou-se o cronómetro. As amostras foram recolhidas com tempos de intervalo de 5min tendo o cuidado de evitar a entrada de bolhas de ar na pipeta de recolha.

O sulfito residual nas amostras recolhidas foi doseado imediatamente após a colheita por titulação iodométrica. O ensaio decorreu a uma temperatura de 25°C e terminou quando os valores de oxigénio dissolvido se elevaram significativamente acima de zero (indicando o consumo total de sulfito adicionado).

A solução que recebe a amostra foi preparada imediatamente antes da titulação, misturando 1,0mL de solução-padrão de iodo/iodeto (100mM em I<sub>2</sub>), 2mL de uma solução de HCl a 2N e 18,5mL de água destilada. O iodo em excesso, após a adição da amostra de meio reaccional, foi determinado na solução resultante por titulação com uma solução de tiosulfato de 30mM. Esta última foi aferida no início do ensaio, por titulação de uma solução de iodo com HCl, preparada como acima descrito, mas sem adição de amostra de meio reaccional. Para facilitar a detecção do ponto final da titulação, após atingida a coloração amarelo-pálido, adicionaram-se 1-2 gotas de uma solução (cozimento) de amido. Forma-se um complexo azul-escuro amido-iodo, cuja cor se perde no ponto final da titulação (fonte: suporte de apoio às aulas de Laboratório de Engenharia Biológica II do Instituto Superior Técnico).

O cálculo do  $k_La$  foi determinado com recurso a um sistema de equações:

$$\begin{cases} OTR = -\frac{1}{2} \frac{d[SO_3^{2-}](M)}{dt(\text{min})} \\ OTR = k_La(C_L^* - C_L) \end{cases} \quad C_L^* = \frac{pO_2}{H}$$

## 4 Resultados e Discussão

Os resultados apresentados descrevem ensaios feitos com glucose e glicerol como fontes primárias de carbono. Para ambos os casos foram feitos crescimentos em *shake flask* com GALG20 e DH5 $\alpha$  e em biorreactor operado em *fed-batch* apenas com GALG20. Estão também apresentados resultados de um ensaio em biorreactor operado em *fed-batch* com ar enriquecido em oxigénio.

## 4.1 Fermentação com glucose como fonte primária de carbono

### 4.1.1 Cultura em *shake flask*

Como referido anteriormente, os resultados aqui apresentados tiveram como objectivo dar seguimento a um projecto prévio.

Inicialmente pretendeu-se reproduzir os resultados anteriormente obtidos (Tabela 1), como forma de monitorizar a aquisição de competências técnicas.

Tabela 1 – Caracterização dos meios de fermentação em frasco com GALG20 e DH5 $\alpha$  transformadas com pVAX1/GFP às 24h de cultivo a 37°C e 250 rpm [16].

Estirpe	Fonte de carbono	Biomassa (g/L)	Acetato (g/L)	pDNA (mg/L)
GALG20	(5+10)g/L glucose	9,6 $\pm$ 0,2	0,68 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	88,9 $\pm$ 0,7
DH5 $\alpha$		n. d.	n. d.	9,6 $\pm$ 0,5
GALG20	20g/L glicerol	8,5 $\pm$ 0,5	0,61 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	n. d.
DH5 $\alpha$		11,3 $\pm$ 0,9	0,05 $\pm$ 0,01	34,7 $\pm$ 0,6

n. d. – Não disponível

<sup>a</sup> – Valores correspondentes até às 8h de fermentação, após esse período não se detectou a produção de acetato.

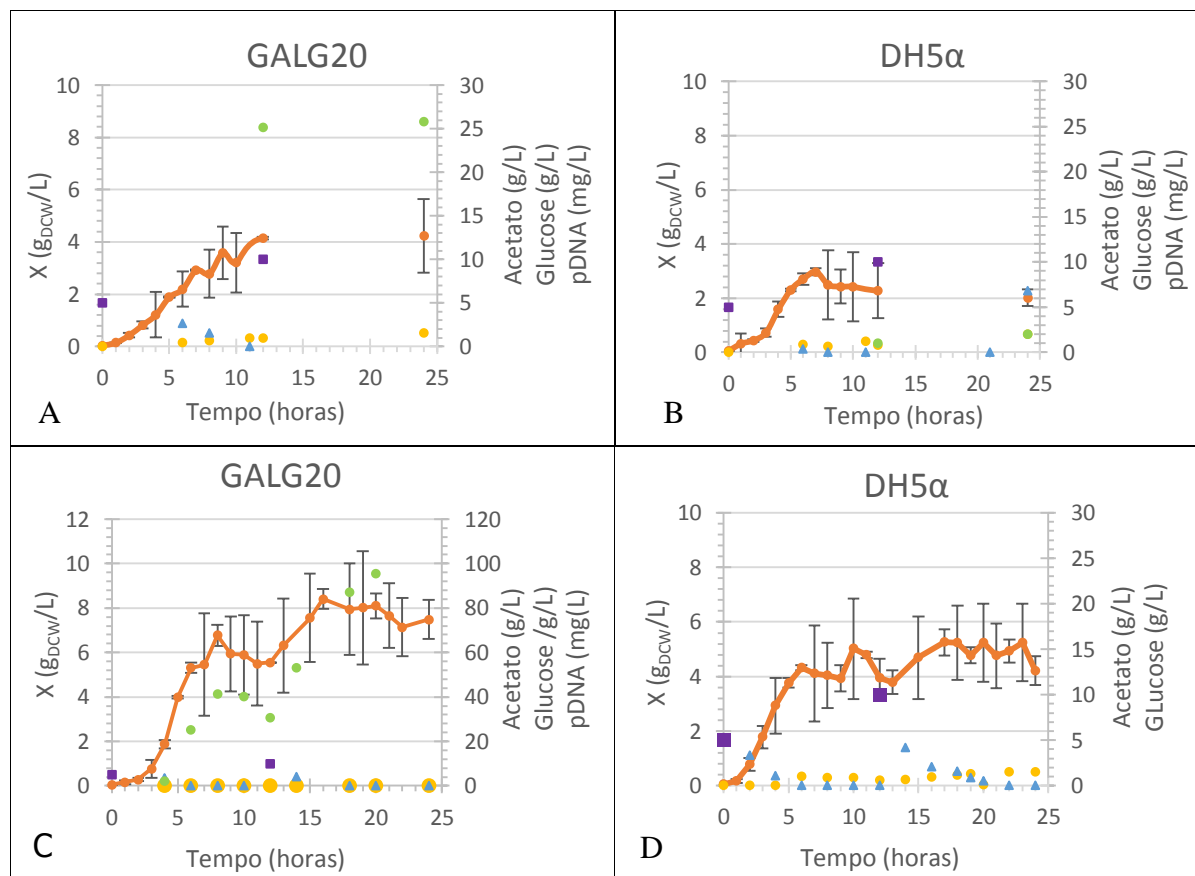


Figura 3 – Resultados experimentais de fermentação em *shake flasks* com *baffles* com GALG20 e DH5 $\alpha$  com glucose como fonte primária de carbono. Nos gráficos A e C estão representados os resultados referentes a ensaios com *E. coli* GALG20 e nos gráficos B e D estão representados os resultados referentes a ensaios com *E. coli* DH5 $\alpha$ .

— DCW    ● Acetato    ▲ Glucose    ■ Adição de glucose    ● pDNA

Para as fermentações representadas nos gráficos A e B da Figura 3 não foram feitas amostragens regulares. De modo a contornar a inexistência de amostragens intermédias entre

as 12 e as 24 horas de fermentação, realizaram-se duas fermentações adicionais, nas mesmas condições, mas a diferente hora de dia, justapondo os resultados da fermentação de repetição (para  $t > 12h$ ) aos dados das primeiras fermentações ( $t < 12h$ ). Os resultados estão representados nas figuras 3C e D.

Em relação à produção de acetato em GALG20 no ensaio representado na Figura 3A, a concentração média obtida foi de  $[(0,83 \pm 0,5)g/L]$  um pouco acima do que foi anteriormente obtido  $[(0,68 \pm 0,05)g/L]$  enquanto que na Figura 3C se pode verificar que não houve produção de acetato. A produção de biomassa na Figura 3A atingiu concentrações inferiores ( $\approx 4,24g_{DCW}/L$ ) ao obtido em estudos anteriores  $[(9,6 \pm 0,2)g/L]$  enquanto que no ensaio representado na Figura 3C a concentração de biomassa foi próxima do esperado ( $\approx 7,48g/L$ ). Nos ensaios feitos com a estirpe DH5 $\alpha$ , as concentrações médias de acetato produzido foram de  $[(0,70 \pm 0,9)g/L]$  no ensaio representado na figura 3B e  $[(0,80 \pm 0,5)g/L]$  no ensaio representado na Figura 3D.

A produção de acetato nos ensaios com GALG20 apresenta concentrações semelhantes ao que se obteve nos ensaios com DH5 $\alpha$ . Este resultado vai contra ao que seria esperado uma vez que a estirpe GALG20 foi construída com *knockout* de um gene que leva à produção de acetato. Assim, seria de esperar que a produção de acetato em DH5 $\alpha$  superasse a de GALG20.

Analisando os resultados prévios e os actuais, a concentração de pDNA produzido, em GALG20 foi inferior ao esperado no ensaio representado na Figura 3A (25,85mg/L) e próximo do esperado,  $[(88,9 \pm 0,7)mg/L]$  (Tabela 1), no ensaio representado na Figura 3C (95,35g/L). Em DH5 $\alpha$  a concentração máxima obtida foi de 1,99mg/L (Figura 3B) enquanto que os resultados prévios apontam para  $[(9,6 \pm 0,5)mg/L]$ . Os resultados da Figura 3D foram desprezados.

Analisando o consumo de glucose, é possível verificar que em todos os ensaios toda a glucose adicionada foi metabolizada, sendo relevante salientar os coeficientes de rendimento observados no ensaio representado na Figura 3C, assim foram produzidos  $6,33mg_{pDNA}/g_{glucose}$ ,  $0,53g_{DCW}/g_{glucose}$  e  $11,9mg_{pDNA}/g_{DCW}$ .

As taxas específicas de crescimento foram de  $\mu=0,85h^{-1}$  (Figura 3A) e  $\mu=0,93h^{-1}$  (Figura 3C) em GALG20 e  $\mu=0,84h^{-1}$  (Figura 3B) e  $\mu=1,01h^{-1}$  (Figura 3D) em DH5 $\alpha$  não mostrando relação com a produção de pDNA. Em anexo na Figura A.4 estão representados os respectivos gráficos. No caso da *E. coli* GALG20 a taxa específica de crescimento obtida em estudos anteriores foi inferior  $[(\mu=0,67 \pm 0,05)h^{-1}]$ . Os resultados obtidos anteriormente para a estirpe DH5 $\alpha$  não estão disponíveis.

Analisando os resultados electroforéticos, é notável a diferença verificada entre as bandas representativas de tempos de fermentação de 6h a 24h em GALG20 (poços 3, 6, 9, 13

(Figura 4) e poço 1 da Figura 5) e as bandas representativas de tempos de fermentação de 6h a 24h em DH5 $\alpha$  (poços 2, 4 e 6 da Figura 5 e poço 2 da Figura 4). Estes resultados, ainda que qualitativos, estão de acordo com o que seria esperado uma vez que as mutações que caracterizam a estirpe GALG20 fazem com que a produção de pDNA seja maior que a estirpe controlo DH5 $\alpha$ . A produção de pDNA em GALG20 foi notória.

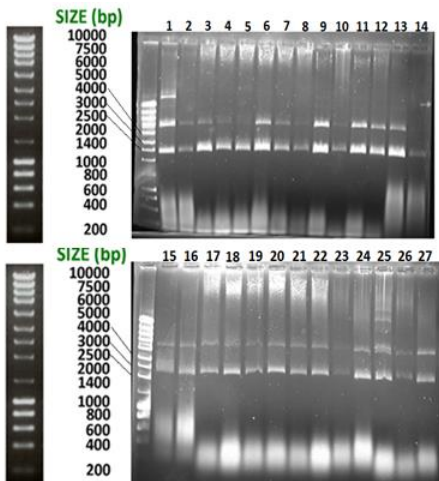


Figura 4 – Electroforese em gel de agarose. Juntamente com os 5 $\mu$ L lisado clarificado foram adicionados 5 $\mu$ L de água e 3 $\mu$ L de *loading buffer*. Nas amostras em que foi usado 10 $\mu$ L de lisado clarificado, usou-se também o dobro de água e *loading buffer*.

DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	Estirpe
2	3	4	5	6	7	8	9	11	Poço
5	10	10	10	10	10	5	5		Volume de lisado ( $\mu$ L)
24	6	6	6	12	12	12	18	18	t(h)
3D	3C	12B	12C	3C	12B	12C	3C	12B	Figura

DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	DH5 $\alpha$	GALG20	GALG20	Estirpe
12	13	15	16	18	21	24	27		Poço
5	5	5	5	10	10	5	5		Volume de lisado ( $\mu$ L)
18	24	24	24	6	12	18	24		t(h)
12C	3C	12B	12C	12A	12A	12A	12A		Figura

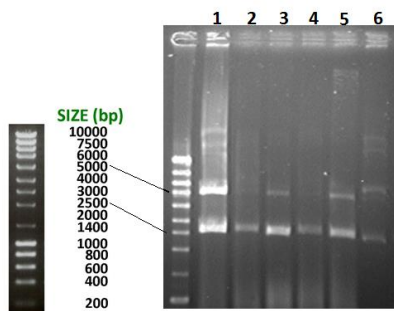


Figura 5 – Electroforese em gel de agarose. Juntamente com os 5 $\mu$ L lisado clarificado foram adicionados 5 $\mu$ L de água e 3 $\mu$ L de *loading buffer*. Nas amostras em que foi usado 10 $\mu$ L de lisado clarificado, usou-se também o dobro de água e *loading buffer*.

GALG20	DH5 $\alpha$	DH5 $\alpha$	DH5 $\alpha$	Estirpe
1	2	4	6	Poço
5	10	10	5	Volume de lisado ( $\mu$ L)
24	6	12	18	t(h)
3A	3D	3D	3D	Figura

#### 4.1.2 Cultura em biorreactor

Como já referido, o objectivo deste trabalho está em melhorar e otimizar condições de fermentação anteriormente descritas e cujos resultados se encontram na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização dos meios de fermentação com glucose como fonte primária de carbono, em biorreactor operado em *batch* às 24h de cultivo, a 37°C e controlo do arejamento em cascata e *fed-batch* às 36h de cultivo, a 42°C e controlo do arejamento em cascata com GALG20 e DH5 $\alpha$  transformadas com pVAX1/GFP [16].

Estirpe	Estratégia de fermentação	Acetato (g/L)	pDNA (mg/L)
GALG20	<i>Batch</i>	0	87,3 $\pm$ 10,7
	<i>Fed-batch</i>	7,1 $\pm$ 1,7	140,6 $\pm$ 21,1
DH5 $\alpha$	<i>Batch</i>	3,9 $\pm$ 0,7	72,2 $\pm$ 3,8
	<i>Fed-batch</i>	16,1 $\pm$ 4,2	40,1 $\pm$ 2,5

#### 4.1.2.1 *Cultura em fed-batch*

Segundo os resultados obtidos anteriormente a este estudo (Tabela 2), a fermentação em *fed-batch* com um salto na temperatura de 30°C para 42°C às 24 horas permitiria obter quantidades de pDNA na ordem dos 140mg/L. Com o objectivo de conseguir um ponto de partida para melhorar os resultados prévios, tentou reproduzir-se os mesmos (Figuras 6A, B e D). O caudal desejável de alimentação foi calculado de acordo com a equação  $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$  e todos os parâmetros foram mantidos constantes ( $\mu=0,12h^{-1}$ ,  $X_b=9,50g_{DCW}/L$ ,  $V_b=1,1L$ ,  $Y_{x/s}=0,47g_{DCW}/g_{glucose}$  e  $S_f=175g_{glucose}/L$ ). A alimentação foi iniciada às 10h de fermentação após a glucose introduzida inicialmente ter sido consumida.

Inicialmente a bomba foi programada manualmente no *software* do fermentador Electrolab com tempos *on* e *off* para todos os minutos de cada hora com variações entre cada hora para acompanhar o aumento esperado de biomassa (face ao  $\mu$  imposto) e tendo em conta o coeficiente de rendimento biomassa/substrato que tinha sido observado  $Y_{x/s}=0,47g_{DCW}/g_{glucose}$  como está exemplificado na Tabela 3 para as primeiras três horas de alimentação.

Tabela 3 – Tabela exemplificativa do cálculo do caudal de alimentação desejável de acordo com a equação  $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$  para as primeiras três horas de *fed-batch*.

$\mu=0,12h^{-1}$	$X_b=9,5 g_{DCW}/L$	$V_b=1,1L$	$S_f=175g/L$	$Y_{x/s}=0,47g_{DCW}/g_{substrato}$	
Tempo (h)	F(t) L/h	F(t) mL/min	$V_T$ (mL)	Seg. <i>on</i> /min	Seg. <i>off</i> /min
10	0,02	0,29	17,2	0,34	59,66
11	0,02	0,32	19,4	0,39	59,61
12	0,02	0,36	21,8	0,44	59,56

No primeiro ensaio (figura 6A) a taxa de alimentação foi calculada com base em valores anteriores de concentração de biomassa às 10h de fermentação  $X \approx 9,5g_{DCW}/L$  ( $DO_{600} \approx 22$ ), no entanto às 10h a  $DO_{600}$  foi de  $DO_{600} \approx 18$  ( $7,8g_{DCW}/L$ ). No final da fermentação verificou-se existir um atraso no funcionamento da bomba na medida em que apenas foram debitados 100mL. Durante todo o período de *fed-batch*, o débito de glucose deveria de ter sido de aproximadamente 3L se o *fed-batch* decorresse normalmente até às 36h, contudo, o volume máximo suportado pelo fermentador é de 2L, pelo que só seria possível introduzir 1L de solução de glucose a 175g/L. Deste modo e em condições normais, o *fed-batch* apenas poderia decorrer até às 26h (901mL). Tendo em conta estas condições, não se podem considerar os resultados apresentados na Figura 6A como um verdadeiro *fed-batch* estando as condições descritas mais próximas de uma operação em *batch*.

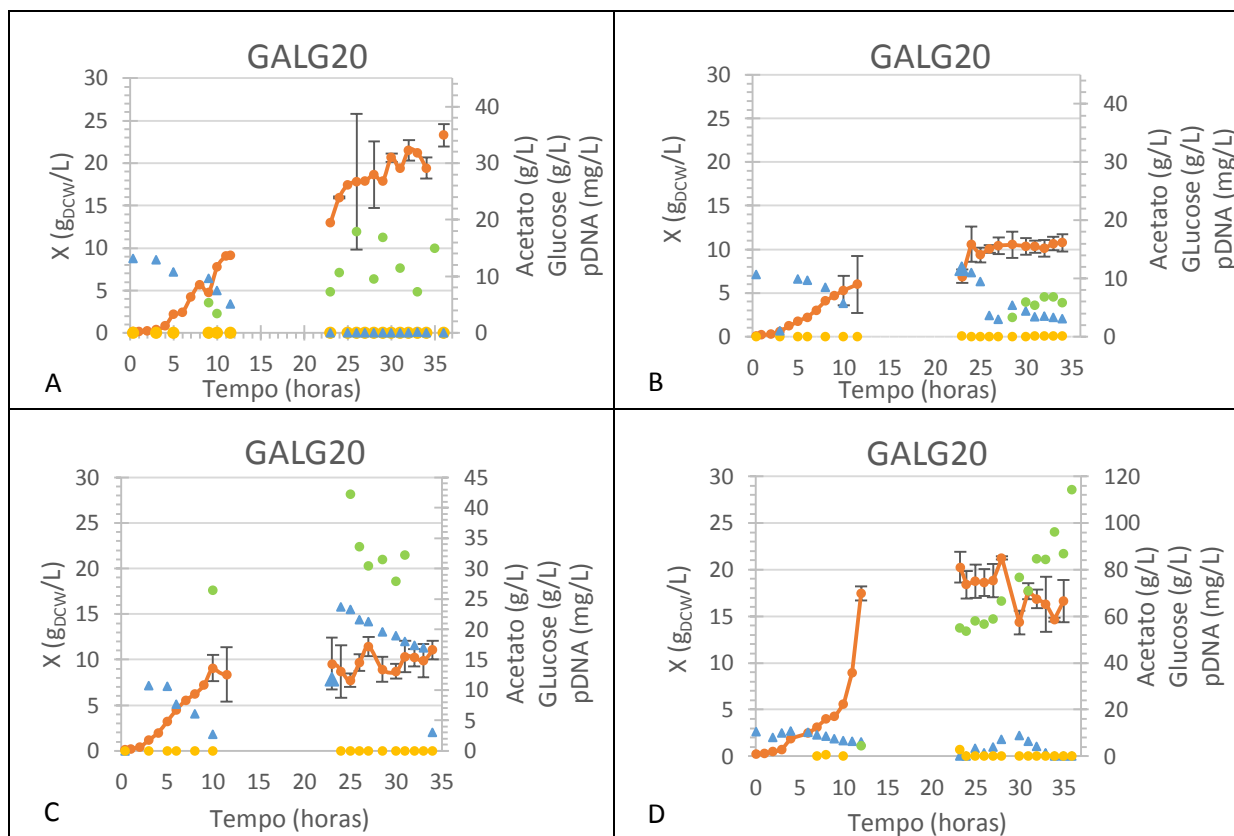


Figura 6 – Resultados experimentais em biorreactor operado em *fed-batch* com GALG20 com glucose como fonte primária de carbono. Os gráficos A, B e D representam ensaios experimentais com as mesmas condições de crescimento e cuja temperatura de *batch* foi de 30°C. No gráfico C o período de crescimento em *batch* decorreu a 37°C. —●— DCW —▲— Glucose —●— Acetato —●— pDNA

Em anexo, Figura A.7A estão representadas as variações dos parâmetros fermentativos (agitação, temperatura, pressão de oxigénio e pH) onde é possível verificar o salto da temperatura de 30°C para 42°C e que a agitação foi proporcional à percentagem de oxigénio, contudo, esta manteve-se acima dos 30%.

A produção de pDNA foi desprezável devido à falta de substrato e às oscilações apresentadas nas concentrações de pDNA obtidas (16,5mg/L às 32h e 14,1mg/L às 35h). Na Figura 7 estão representados os resultados electroforéticos que também remetem para uma baixa concentração de pDNA. No final os coeficientes observados foram de  $Y_{x/s}=0.70g_{DCW}/g_{glucose}$ ,  $Y_{p/s}=0,46mg_{pDNA}/g_{glucose}$  e  $Y_{p/x}=0,66mg_{pDNA}/g_{DCW}$ .

Como referido, a bomba de alimentação não funcionou como programado. Uma alternativa para a solução deste problema passou pela observação da bomba em funcionamento e com alteração nos períodos de débito de forma a que, estivesse ligada durante períodos superiores a 30 segundos. A correcção da programação da bomba só foi possível com recurso a *scripts* informáticos devido aos inúmeros períodos de *on* e *off* que foram acrescentados (passaram a ser usados intervalos de tempo de 20min (10h-12h), 15 min (13-17h), 10min (18h-

21h) e 5min (22-26h) como está exemplificado na Tabela 4 para as primeiras três horas de alimentação.

Tabela 4 – Tabela exemplificativa do cálculo do caudal de alimentação desejável de acordo com a equação  $F(t) = (\mu X_b V_b / S_f Y_{x/s}) e^{\mu t}$  para as primeiras três horas de *fed-batch*. A variável  $V/x'$  representa o volume total em função do número de vezes que a bomba debita durante uma hora (quando o intervalo de tempo é de 20min a bomba funciona três vezes).

$\mu=0,12h^{-1}$ $X_b=9,5 \text{ g}_{DCW}/L$ $V_b=1,1L$ $S_f=175g/L$ $Y_{x/s}=0,47g_{DCW}/g_{substrato}$							
Tempo (h)	F(t) L/h	F(t) mL/min	$V_T$ (mL)	$V/x'$	Seg. on/min	Seg. off/min	$\Delta t$
10	0,02	0,29	17,2	5,7	114,50	1085,50	20'
11	0,02	0,32	19,4	6,5	129,09	1070,91	
12	0,02	0,36	21,8	7,3	145,55	1054,45	

Em anexo, na Figura A.9 está representado o *script* que foi utilizado. Durante os ensaios (Figuras 6B e C) verificou-se que estes períodos de funcionamento não foram suficientes para que a bomba funcionasse como pretendido, assim, posteriormente, para o ensaio representado nas Figuras 6D, a bomba foi programada de forma a corrigir o *deficit* de glucose.

Em todos os *scripts* foi tido em conta o volume suportado pelo fermentador pelo que, foi tido em conta no número de horas de *fed-batch*.

No ensaio representado na Figura 6B, entre as 10h e as 22h, a taxa específica de crescimento correspondeu à que foi implementada ( $\mu=0,12h^{-1}$ ) e das 22h às 36h foi apenas de  $0,04h^{-1}$ , tendo sido este o período mais crítico. É de salientar que estes valores não são reais dado que o volume debitado não corresponde ao que foi consumido. A DO atingida às 10h de ensaio foi de 12 ( $X=5,3g_{DCW}/L$ ). A concentração de pDNA produzido foi na ordem de 6mg/L.

No ensaio representado na Figura 6D, a DO no início do *fed-batch* era apenas de aproximadamente 10 ( $X\approx 4,2g_{DCW}/L$ ). Mesmo após a tentativa de correcção do funcionamento da bomba de alimentação foi necessário adicionar 100mL de glucose a 175g/L com recurso a uma bomba externa ao reactor às 24, 26 e 27 horas. Analisando os parâmetros de fermentação que estão representados em anexo na Figura A.7D, verifica-se uma alteração não programada da temperatura e o controlo do arejamento em cascata esteve desligado até às 10h. Ainda assim, os resultados obtidos foram bastante favoráveis, tendo-se alcançado 114mg/L de pDNA. Na Figura 9 estão representados os resultados electroforéticos que evidenciam os resultados obtidos para a concentração de pDNA. O facto da banda referente ao poço 1 surgir menos destacada pode dever-se à baixa concentração de pDNA às 12h e as bandas menos destacadas nos poços 13 e 14 podem dever-se a erros na introdução das amostras nos respectivos poços.

Analisando os resultados electroforéticos (Figura 8), por comparação com os resultados dos ensaios da Figura 6D (Figuras 9) as diferenças na concentração de pDNA são notórias pelo que a intensidade das bandas dos poços 1 a 12 (Figura 8) é inferior ao que é verificado nos restantes poços em ambas as figuras.

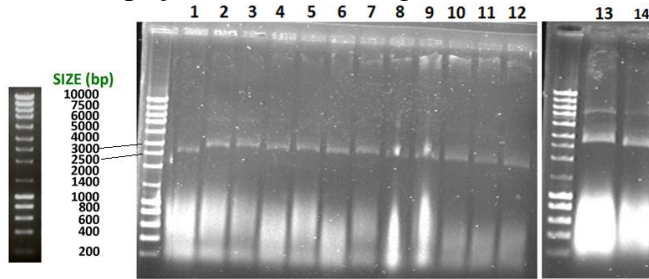


Figura 7 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 6A. Em todos os poços foram introduzidos 10µL de lisado clarificado e 3µL de *loading buffer*. Do poço 1 a 13 foram introduzidos lisados correspondentes aos tempos de fermentação de 23 a 34h e no poço 14 foi introduzido o lisado correspondente às 36h de fermentação.

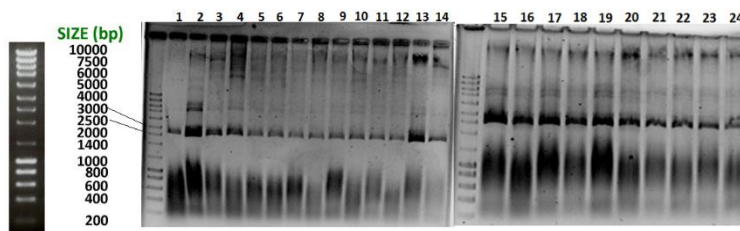


Figura 8 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados nas Figuras 6B (poços 1 a 12) e 6C (poços 13 a 24). Em todos os poços foram introduzidos 10µL de lisado clarificado e 3µL de *loading buffer*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10h	23h	24h	25h	26h	27h	28h	30h	31h	31h	33h	34h
Figura 6B											
13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
10h	23h	24h	25h	26h	27h	28h	30h	31h	31h	33h	34h
Figura 6C											

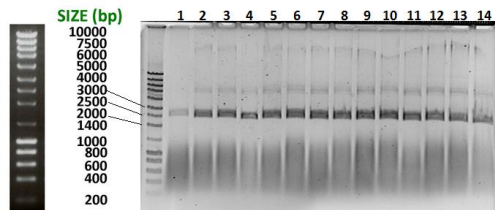


Figura 9 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 6D. Em todos os poços foram introduzidos 10µL de lisado clarificado e 3µL de *loading buffer*.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
12h	23,25h	24h	25h	26h	27h	28h	30h	31h	32h	33h	34h	35h	36h

No final, os coeficientes de rendimento observados para os ensaios das Figuras 6B, e D foram respectivamente:  $Y_{x/s}=0,17g_{DCW}/g_{glucose}$ ;  $Y_{p/s}=0,10mg_{pDNA}/g_{glucose}$ ;  $Y_{p/x}=0,59mg_{pDNA}/g_{DCW}$  e  $Y_{x/s}=0,17g_{DCW}/g_{glucose}$ ;  $Y_{p/s}=1,20mg_{pDNA}/g_{glucose}$ ;  $Y_{p/x}=7,06mg_{pDNA}/g_{DCW}$ . É de salientar a os coeficientes de produto/substrato e produto/biomassa observados no ensaio do gráfico 6D.

Em anexo, nas Figuras A.7B e D é possível verificar que os parâmetros de fermentação foram mantidos conforme programado.

De forma a verificar a importância da temperatura no período *batch*, realizou-se uma fermentação a 37°C cujos resultados estão representados na Figura 6C. A partir do volume de glucose que foi debitado pela bomba, determinou-se que a taxa específica de crescimento até às 22h foi de  $0,11\text{h}^{-1}$  e das 22h às 36h foi de  $0,03\text{h}^{-1}$ . Particularmente neste caso, a metabolização da glucose foi inferior ao verificado nos restantes ensaios apresentados na Figura 6. Apenas neste ensaio foi possível alcançar a  $\text{DO}_{600}$  próxima da esperada às 10h de fermentação ( $\text{DO}_{600}\approx 22$ ;  $X\approx 9,5\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ). A  $\text{DO}_{600}$  obtida às 10h neste ensaio foi de  $\text{DO}_{600}\approx 21$  ( $X\approx 9,1\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ) e isto é explicado pelo facto de que quando foram iniciados os ensaios em *fed-batch* apenas era tido como referência os valores dos anteriores ensaios que decorreram a 37°C e que permitiram alcançar uma  $\text{DO}_{600}\approx 22$  no período homólogo. Em anexo, na Figura A.7C está representado o gráfico com as variações dos parâmetros de fermentação onde é possível verificar que não ocorreram variações não programadas dos parâmetros de fermentação. A produção de pDNA rondou valores na ordem de  $30\text{mg}/\text{L}$  e este resultado pode ser também destacado através da análise dos resultados da electroforese representada na Figura 8. No final do ensaio, os coeficientes de rendimento observados foram de  $Y_{x/s}=0,18\text{g}_{\text{DCW}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ ;  $Y_{p/s}=0,50\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ ;  $Y_{p/x}=2,75\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{DCW}}$ . Apesar do coeficiente de biomassa/substrato ter superado o que foi conseguido no ensaio do gráfico 6D, não foi suficiente para superar o coeficiente de produto/biomassa, reforçando assim o impacto da temperatura de *batch* no aumento da concentração de biomassa.

Em todos estes ensaios, a produção de acetato manteve concentrações iguais ou próximas de zero.

Uma vez atingida uma concentração de pDNA próxima do que foi conseguido ( $\approx 114\text{mg}/\text{L}$ ) em resultados previamente descritos ( $\approx 140\text{mg}/\text{L}$ ), o ensaio experimental seguinte teve como objectivo testar o efeito do ar enriquecido em oxigénio.

#### 4.1.2.2 Cultura em *fed-batch* com ar enriquecido em oxigénio

Começou-se por calcular o  $k_{La}$  (coeficiente volumétrico de transferência de massa para o oxigénio ( $\text{h}^{-1}$ );  $k$  – coeficiente de transferência através do filme do lado do líquido ( $\text{cm}\cdot\text{h}^{-1}$ );  $a$  – área interfacial por unidade de volume de fase líquida ( $\text{cm}^2\cdot\text{cm}^{-3}$ ).

Para este fim, usou-se o método de oxidação de sulfito. Este método tira partido da oxidação de iões sulfito em meio aquoso, pelo oxigénio, em presença de iões  $\text{Cu}^{2+}$  ou  $\text{Co}^{2+}$  como catalisadores. No final, a recta obtida foi  $[\text{SO}_3^{-2}](M) = -3,88 \times 10^{-5}t(s) + 4,67 \times 10^{-2}$  (Figura A. 6A em anexo) e o  $k_{La}$  calculado foi de  $52\text{h}^{-1}$ . Por comparação com resultados obtidos com oxidação do sulfito por ar (Figura A. 6B em anexo), o valor de OTR foi superior

(valor proporcional ao declive das rectas) devido ao aumento da força motriz com que foi adicionado o oxigénio puro. O valor de  $k_{LA}$  foi inferior ao valor obtido por oxidação do sulfito por ar ( $38h^{-1}$ ). É de salientar que este cálculo não foi feito em condições reais de crescimento e que o  $k_{LA}$  depende do meio de cultura, da temperatura e do valor de OTR.

O ensaio cujo procedimento experimental incluiu ar enriquecido em oxigénio puro está representado na Figura 10. Analisando os valores de DO obtidos às 10h de fermentação nos ensaios anteriores ( $DO_{600} \approx 12$ ), optou-se por recalcular o caudal desejável, mantendo a taxa

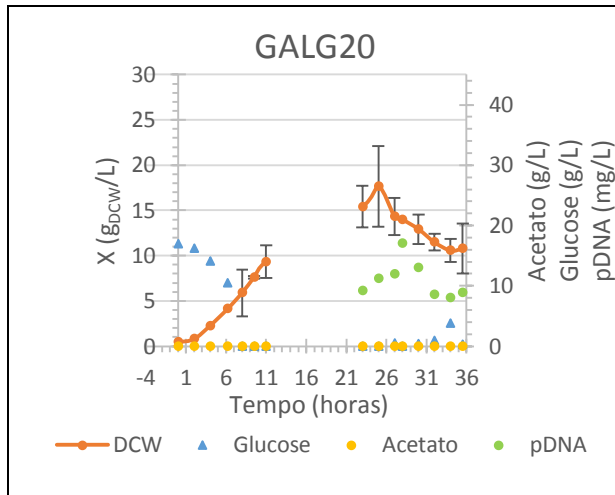


Figura 10 – Resultado experimental em biorreactor operado em *fed-batch* com GALG20 com glucose como fonte primária de carbono e ar enriquecido em oxigénio puro a partir das 24h de fermentação.

específica de crescimento de  $\mu=0,12h^{-1}$ . O suplemento em oxigénio foi introduzido no momento em que foi iniciado o *fed-batch*. A taxa de alimentação sofreu ajustes com base na concentração de biomassa obtida uma hora antes do início do *fed-batch* ( $DO_{600} \approx 18$ ;  $X \approx 7,8g_{DCW}/L$ ). Entre as 10h e as 30h de fermentação apenas foi debitado aproximadamente 500mL de glucose a 175g/L quando na realidade deveriam de ter sido debitados 1,264L. Com base nestes valores, estimou-se que a taxa específica de

crescimento seria de  $0,07h^{-1}$ , contudo, até ao início do *fed-batch* estimou-se que a taxa específica de crescimento foi de  $0,3h^{-1}$ .

Em anexo, na Figura A.7E está representado o gráfico com as variações dos parâmetros fermentativos. Estes resultados remetem para a dificuldade em controlar a agitação aquando do enriquecimento do ar em oxigénio. As bolhas de oxigénio ao se acumularem junto do sensor fizeram com que a leitura da percentagem de oxigénio dissolvido no meio fosse superior à percentagem real, levando à diminuição da agitação.

Analisados os dados acima referidos, seria esperado que a produção de pDNA não superasse o que foi possível obter em ensaios homólogos sem enriquecimento de ar, pelo que, neste ensaio, a concentração de pDNA apresenta um valor máximo de concentração às 28h (17mg/L). A oscilação das concentrações pode dever-se a erros da recolha de amostragem ou à fase de crescimento em que as células se encontravam aliado às deficientes condições de arejamento e alimentação de glucose. Na Figura 11, é possível verificar pela intensidade das bandas que às 28h (poço 4) a concentração de pDNA é superior àquela que se verifica no final da fermentação.

No final, os coeficientes de rendimento observados foram de  $Y_{x/s}=0,17\text{g}_{\text{DCW}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ ;  $Y_{p/s}=0,13\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{glucose}}$ ;  $Y_{p/x}=0,76\text{mg}_{\text{pDNA}}/\text{g}_{\text{DCW}}$ .

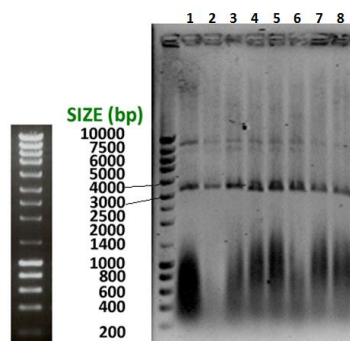


Figura 11 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 10. Em todos os poços foram introduzidos  $10\mu\text{L}$  de lisado clarificado e  $3\mu\text{L}$  de *loading buffer*. No poço 1 a banda corresponde às 23h de fermentação, no poço 2 corresponde às 25h, no poço 3 às 27h, no poço 4 às 28h, no poço 5 às 30h, no poço 6 às 32h, no poço 7 às 34 e no poço 8 às 35,5h.

## 4.2 Fermentação com glicerol como fonte primária de carbono

### 4.2.1 Cultura em *shake flask*

No sentido de reproduzir resultados obtidos anteriormente a este estudo (Tabela 1), foram feitas alguns ensaios em *shake flask* com glicerol como principal fonte de carbono. Nos resultados prévios foi possível concluir que o glicerol tem efeitos mais positivos em relação à glucose em GALG20 na medida em esta estirpe não produz acetato, o que aliado ao baixo custo desta substância, é uma boa alternativa para aplicações em escala industrial face a outras fontes de carbono mais dispendiosas como a glucose. No entanto, a taxa específica de crescimento com  $20\text{g/L}$  de glicerol é inferior  $[(0,60\pm 0,05)\text{h}^{-1}]$  ao que se verifica com adição de  $(5+10)\text{g/L}$  de glucose  $[(0,67\pm 0,05)\text{g/L}]$  e o mesmo se verifica com a concentração de biomassa uma vez que com glicerol ( $X=8,5\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ) também é inferior que com a mesma adição de glucose ( $X=9,6\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ). A concentração de pDNA em culturas com  $20\text{g/L}$  de glicerol em estudos anteriores não está disponível, contudo foram feitos ensaios com adição de  $(5+10)\text{g/L}$  de glicerol  $[(79,4\pm 7,0)\text{g/L}]$  que face à suplementação de  $20\text{g/L}$  de glucose  $[(140,8\pm 0,8)\text{g/L}]$  a concentração obtida foi inferior. Assim, nestes ensaios pretendeu-se saber qual a concentração de pDNA possível de se obter em crescimentos com meios de cultura suplementados com  $20\text{g/L}$  de glicerol.

Nestes ensaios foi também tido em conta dois tipos de frascos, com *baffles* (chicanas) e sem *baffles*, reflectindo-se a sua importância no crescimento bacteriano devido ao aumento da oxigenação do meio.

Na Figura 12A é notável a diferença no crescimento comparando os tipos de frasco onde decorreu o crescimento, verificando-se que, apenas o crescimento que decorreu em frasco com *baffles* apresenta a concentração de biomassa ( $X\approx 11,5\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ) prevista para DH5 $\alpha$  por comparação com Gonçalves *et al.* (2013) [3] e apresentados na Tabela 1 ( $11,3 \pm 0,9\text{g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ) para a estirpe DH5 $\alpha$ .

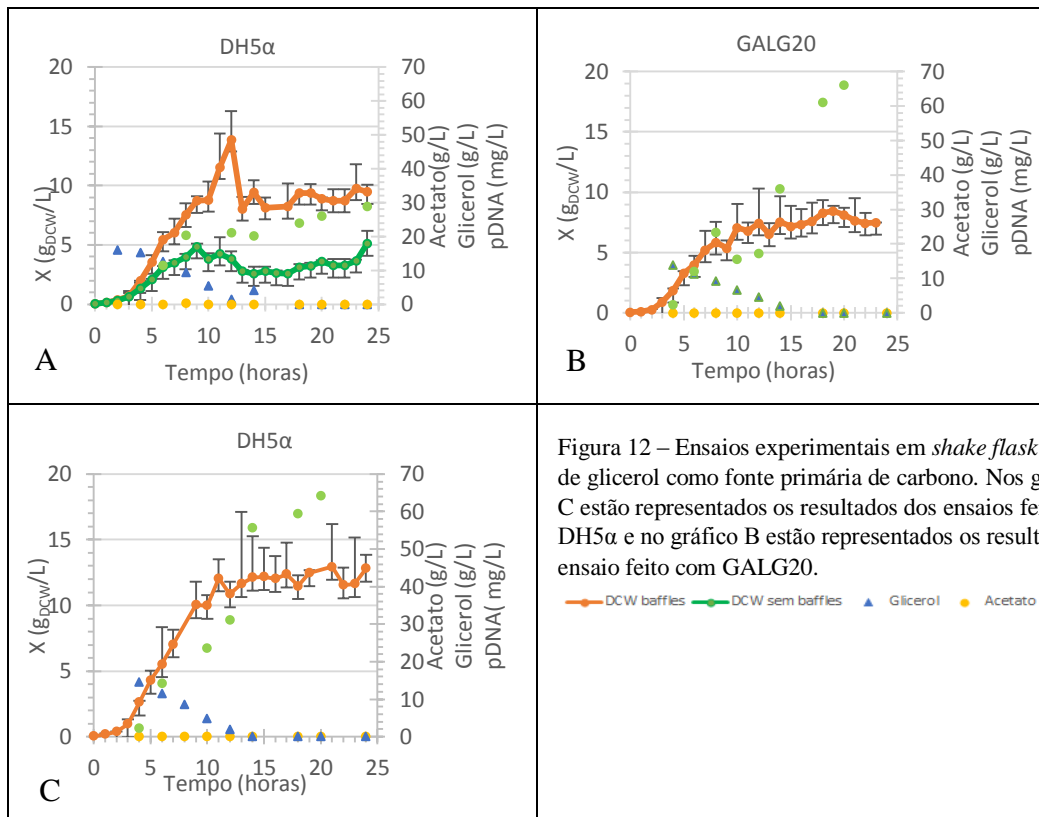


Figura 12 – Ensaio experimentais em *shake flask* com 20g/L de glicerol como fonte primária de carbono. Nos gráficos A e C estão representados os resultados dos ensaios feitos com DH5α e no gráfico B estão representados os resultados do ensaio feito com GALG20.

—●— DCW baffles —●— DCW sem baffles ▲ Glicerol ● Acetato ● pDNA

A taxa específica de crescimento nos ensaios apresentados foi de  $0,8h^{-1}$  em DH5α e  $0,9h^{-1}$  em GALG20. Em ambos os casos os valores obtidos foram superiores ao obtido em ensaios anteriores ( $[(0,6\pm 0,05)h^{-1}]$  em GALG20 e  $[(0,55\pm 0,01)h^{-1}]$  em DH5α).

A concentração de biomassa obtida em GALG20 ( $X\approx 6,9g_{DCW}/L$ ) foi inferior ao que foi obtido em resultados anteriores  $[(8,5\pm 0,5)g_{DCW}/L]$ . Em anexo, na Figura A.5 estão representados os gráficos com as respectivas taxas específicas de crescimento.

A concentração de acetato verificada foi zero ou próximo de zero, como esperado.

Para a quantificação de pDNA do ensaio representado na Figura 12A, as amostras recolhidas e analisadas correspondem ao crescimento que decorreu em frasco com *baffles*. As concentrações de pDNA obtidas no ensaio representado na Figura 12A foram bastante inferiores ao que foi possível obter no ensaio homólogo representado na Figura 12C pelo que se pode considerar que poderão ter ocorrido erros experimentais na recolha das amostras e/ou preparação e análise dos lisados clarificados (quando foram realizados estes ensaios a metodologia de extracção de pDNA ainda não estava consolidada). Nas Figuras 12B e 12C foram desprezados os valores referentes à concentração de pDNA às 24h mas ainda assim, verifica-se que a concentração máxima de pDNA obtido atingiu valores próximos ao que foi anteriormente obtido com adição de (5+10)g/L de glicerol. Desta forma, o uso de 20g/L não parece vantajoso se aplicado a níveis industriais.

Analisando os resultados electroforéticos apresentados na Figura 4, por comparação da intensidade das bandas dos poços 4, 7, 11 e 15 e 5, 8, 12 e 16 (Figuras 12B e 12C, respectivamente) com os poços 18, 21, 24 e 27 (Figura 12A) é possível clarificar que houve uma produção inferior de pDNA no ensaio representado na Figura 13A pelo que a intensidade das bandas do referido ensaio é inferior ao que se verifica nos ensaios das Figuras 13B e 13C.

Apesar da concentração de pDNA obtido em GALG20 com glicerol como fonte primária de carbono não ter superado o que foi possível obter com glucose, tentou-se explorar mais uma vez as potencialidades do glicerol por alteração das condições de crescimento. Assim, foram feitos dois ensaios com GALG20 em biorreactor operado em *fed-batch*.

#### 4.2.2 Cultura em biorreactor

A alimentação em *fed-batch* foi calculada para 175g/L de glicerol e com um débito de bomba efectuado em intervalos de tempo de 20min (10h a 12h), 15min (13h a 19h), 10min (20 a 21h) e 5min (22h até ao final do *fed-batch*). Tal como nos ensaios efectuados com glucose, foi tido em conta o volume máximo suportado pelo biorreactor.

A taxa de alimentação foi calculada obedecendo à equação descrita anteriormente e usando os valores já descritos para as variáveis, apenas foi alterado o valor de  $X_b$  previsto para o início do *fed-batch* (tendo em conta os estudos de cultura em frasco a 37°C, corresponde a  $DO_{600} \approx 16$ ;  $X_b \approx 7,0 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ) e  $Y_{x/s} = 0,3 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{g}_{\text{glicerol}}$ .

No primeiro ensaio (Figura 13A) a taxa específica de crescimento (estimada) alcançada correspondeu ao que foi imposto pela equação ( $\mu = 0,12 \text{ h}^{-1}$ ) podendo este valor não corresponder ao real como referido anteriormente. Neste caso, estima-se que a taxa específica de crescimento tenha sido inferior pela concentração de glicerol verificada no final da fermentação e o mesmo se verifica na Figura 13B. A densidade óptica obtida às 10h foi apenas  $DO_{600} \approx 17$ . No ensaio representado na Figura 13B a densidade óptica foi apenas  $DO_{600} \approx 3$  ( $X \approx 1,3 \text{ g}_{\text{DCW}}/\text{L}$ ). Este valor pode dever-se a um erro experimental no cálculo da densidade óptica para a inoculação no fermentador. Os valores obtidos na Figura 13A para a produção de pDNA apresentam incoerência talvez devido a erros na recolha da amostragem que posteriormente se terão reflectido no cálculo da concentração. Na Figura 14B é possível ver o reflexo da concentração de biomassa na produção de pDNA. Estes resultados são ainda confirmados nas análises electroforéticas representadas nas Figuras 14 e 15 onde é possível verificar a fraca intensidade das bandas na Figura 15 (remete à Figura 13B) em comparação com a Figura 14 que representa os resultados da Figura 13B. Dada a baixa concentração de biomassa do ensaio da Figura B,

seria de esperar que a concentração de pDNA não superasse o que foi obtido no ensaio da Figura 13A.

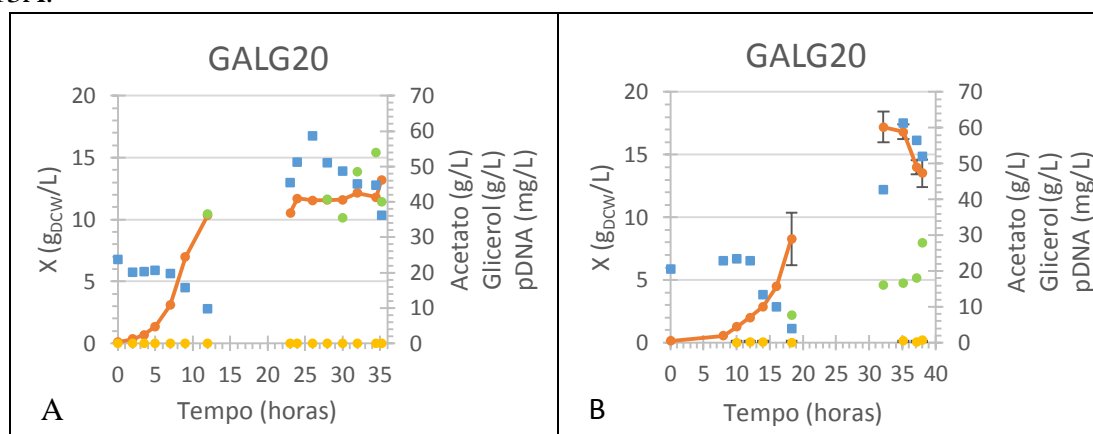


Figura 13 – Ensaio experimental em biorreactor operado em *fed-batch* com GALG20 com glicerol como fonte primária de carbono. Na Figura A o início da alimentação foi às 10h e aumento da temperatura de 30°C para 42°C às 24h. Na Figura B o *fed-batch* foi iniciado às 19h e o aumento da temperatura para 42° ocorreu às 35h.

— DCW    ■ Glicerol    ● Acetato    ● pDNA

Em anexo, nas Figuras A.8A e 8B estão representados os gráficos com as variações dos parâmetros de fermentação onde é possível verificar alterações não programadas da temperatura. Verificou-se existir um problema no arrefecimento do pelo que o equipamento não conseguiu responder ao aumento de temperatura dentro do biorreactor juntamente com a elevada temperatura ambiente. Do ponto de vista da produção de pDNA, a indução da replicação do plasmídeo no ensaio da Figura 13A aconteceu de forma precoce podendo até ter afectado o aumento da biomassa pelo que a concentração desta se manteve até fim do ensaio com uma variação de  $[(11,6 \pm 0,8)g_{DCW}/L]$ . No ensaio representado da Figura 13B, o *fed-batch* foi iniciado às 19h devido ao crescimento lento das células. No gráfico da Figura A.8B em anexo, é possível verificar a subida da temperatura no final da fermentação (35h). Esta subida da temperatura coincidiu com a produção de pDNA o que prova que a replicação do pVAX1/GFP é induzida pela temperatura de 42°C. Ainda no ensaio da Figura 13B as variações de temperatura ao longo do ensaio foram notáveis, contudo, não foi determinante para afectar a concentração de biomassa obtida. Outro ponto crítico apresentado em anexo na Figura A.8 é a percentagem de oxigénio dissolvido. Na Figura A.8A (remete Figura 13A) apresenta valores próximos de zero, nomeadamente no período entre as 10h e as 15h e dificilmente atingiu o valor programado de 30%. Apesar de no ensaio representado na Figura 13B não terem surgido problemas relacionados com a percentagem de oxigénio dissolvido, a produção de pDNA não foi superior ao ensaio da Figura 13A.

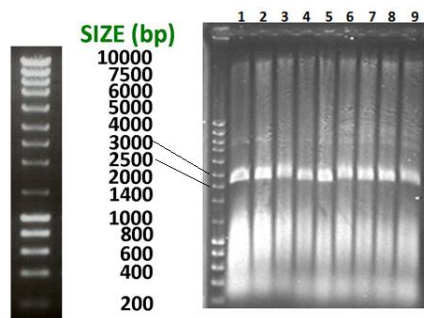


Figura 14 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na figura 13A. Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de *loading buffer*. No poço 1 a banda corresponde às 12h de fermentação, no poço 2 corresponde às 23h, no poço 3 corresponde às 24h, no poço 4 às 26h, no poço 5 às 28h, no poço 6 às 30h, no poço 7 às 32h, no poço 8 às 34,5h e no poço 9 às 35,25h

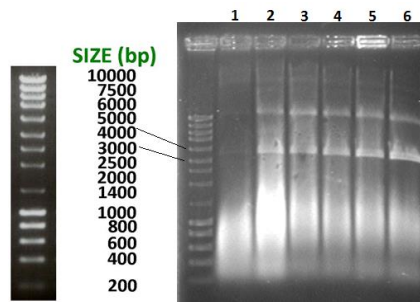


Figura 15 – Electroforese em gel de agarose correspondente aos resultados apresentados na Figura 13B. Em todos os poços foram introduzidos 10 $\mu$ L de lisado clarificado e 3 $\mu$ L de *loading buffer*. No poço 1 a banda corresponde às 14h de fermentação, no poço 2 corresponde às 18,3h, no poço 3 às 32,15h, no poço 4 às 35,15h, no poço 5 às 37,15h e no poço 6 às 38h.

## 5 Conclusão

### 5.1 Fermentação em *shake flask* com glucose e glicerol como fontes primárias de carbono

De um modo geral, os resultados previstos ( $[9,6\pm 0,2]$ g<sub>DCW</sub>/L e  $[88,9\pm 0,7]$ mg<sub>pDNA</sub>/L) nas fermentações em que a glucose foi usada como fonte primária de carbono foram alcançados ( $\approx 7,5$ g<sub>DCW</sub>/L e  $\approx 95$ mg<sub>pDNA</sub>/L). Nas fermentações que decorreram na presença de glicerol como fonte primária de carbono foi possível obter concentrações de pDNA na ordem das 66mg/L em GALG20 (não disponíveis resultados prévios para comparação) e uma concentração de biomassa na ordem de 7,5g/L que foi ligeiramente inferior ao obtido em ensaios prévios ( $[8,5\pm 0,5]$ g/L).

### 5.2 Fermentação em biorreactor operado em *fed-batch* com glucose como fonte primária de carbono.

Na primeira fase da fermentação, decorre a formação de biomassa durante a operação a 30°C e a 37°C verificando-se vantajoso para o aumento da biomassa que esta fase decorra a 37°C. No entanto, após o processo fermentativo entrar em *fed-batch*, a biomassa continua ainda a ser formada. Depois da temperatura atingir os 42°C, é alcançada a fase estacionária com previsão de um aumento substancial na produção de pDNA [17].

O salto na temperatura permite que determinados genes fiquem sobre-expressos enquanto outros tenham os seus níveis de expressão diminuídos bem como aumentar consideravelmente o número de cópias do plasmídeo como descrito por Lin-Chao *et al.*

(1992)[18]. Dentro dos genes que estão sobre-expressos encontram-se o *mlc* e *crp*. O *lpdA* é activado e o *ptsG* é *down-regulated* [7]. O gene *mlc* codifica para a proteína Mlc que é responsável pela diminuição da produção de acetato quando o crescimento celular está comprometido e é um severo repressor de operações catabólicas cujos produtos estão ligados ao metabolismo de açúcar [19]. O gene *crp* codifica para uma proteína de sinal que forma um complexo com cAMP capaz de activar ou reprimir a transcrição por ligação a locais específicos dentro ou próximo de promotores de diferentes genes [20]. O gene *lpdA* codifica para a proteína lipoamida desidrogenase (LPD) e é um componente do complexo piruvato desidrogenase que faz a ligação entre a glicólise o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos [21]. Assim, a activação deste gene vai aumentar a energia da célula necessária ao metabolismo. O gene *ptsG* é responsável pelo transporte específico de glucose no sistema de fosfotransferase [22]. Este gene ao ficar *down-regulated* vai permitir um maior fluxo de carbono na via glicolítica, estimulando a produção de nucleótidos.

Os ensaios efectuados com borbulhamento de oxigénio teriam como objectivo aumentar a concentração de pDNA produzido face ao processo homólogo na ausência de enriquecimento do meio em oxigénio. Durante a operação verificou-se um deficiente controlo da percentagem de oxigénio dissolvido pelo biorreactor na medida em que, devido ao acumular de bolhas de oxigénio junto do sensor, a leitura dos valores não foi real tendo-se comprovado o mesmo através da recolha de uma amostra de meio do fermentador e respectiva quantificação com outro sensor externo. Verificou-se também a impossibilidade em operar o biorreactor a 30% de oxigénio pelo que foram feitas várias tentativas por meio de alteração dos parâmetros de agitação de forma a tentar manter a percentagem de oxigénio dissolvido constante. Futuramente, este problema poderá ser solucionado com recurso a válvulas capazes de permitir fazer o devido controlo da concentração de oxigénio no meio líquido. Aliando este facto ao anormal funcionamento da bomba de alimentação, considera-se estes resultados inconclusivos. Na medida em que ficou por conhecer a verdadeira razão da diminuição da produção de pDNA, futuramente ter-se-á que melhorar a forma de operar o biorreactor de modo a permitir atingir os objectivos pretendidos. Mediante estudo e análise da base teórica subjacente a esta dissertação (melhoramento genético e condições de crescimento) e tendo em conta os resultados positivos obtidos é possível fundamentar a continuidade deste estudo.

### 5.3 Fermentação em biorreactor operado em *fed-batch* com glicerol como fonte primária de carbono

Apesar de todas as tentativas efectuadas, não foi possível atingir o objectivo proposto. As alterações inesperadas da temperatura só posteriormente foram detectadas pelo que a indução da replicação do plasmídeo ocorreu antes de atingida a biomassa suficiente para que todo o processo fosse industrialmente rentável. Num dos ensaios apresentados o crescimento celular foi lento com oscilações da temperatura no decorrer do ensaio e com consequente prolongamento do tempo de fermentação.

Semelhante ao que ocorreu no caso em que a alimentação decorreu com glucose, o anormal funcionamento da bomba de alimentação faz com que os resultados obtidos não possam ser validados na totalidade nem comparados com o que foi obtido no estudo anterior (Gonçalves, 2013).

Ainda que os valores da taxa específica de crescimento tenham sido os valores previstos no cálculo da taxa de alimentação, não se pode concluir que esse valor seja exacto pois o volume debitado não corresponde ao que foi verdadeiramente metabolizado.

### 5.4 Considerações globais

Analisando os resultados globais apresentados na Tabela 5, o crescimento em biorreactor potenciou o aumento da biomassa produzida mas não o aumento da concentração de pDNA. A concentração de pDNA máxima obtida, ainda que tenha sido em crescimento em biorreactor não mostra ser industrialmente rentável em comparação com a concentração máxima obtida em crescimento em *shake flask*. O efeito do glicerol como fonte primária de carbono em conjunto com os restantes parâmetros de fermentação em biorreactor mostrou ser pouco rentável industrialmente uma vez que a concentração de pDNA máxima obtida foi de 27,98mg/L.

Tabela 5 – Resultados globais dos ensaios experimentais descritos.

Estirpe	Fonte de carbono	Modo de operação	Duração da fermentação	X <sub>final</sub> (gDCW/L)	[pDNA] <sub>final</sub> (mg/L)	Y <sub>x/s</sub> (gDCW/gsubstrato)	Y <sub>p/s</sub> (mgpDNA/gsubstrato)	Y <sub>p/x</sub> (mgpDNA/gDCW)
DH5α	Glucose	<b>Fed-batch</b>	24h	4,22	1,99	0,46	0,13	0,28
GALG20	5+10g/L		24h	4,24	95,35	0,53	6,33	11,9
DH5α	Glicerol 20g/L	<b>Batch</b>	24h	12,8	64,22	0,87	4,27	4,91
GALG20			24h	7,5	66,23	0,50	4,40	8,80
GALG20	Glucose	<b>Fed-batch*</b>	36h	23,3	114,18	0,70	0,46	0,66
GALG20	Glicerol		36h	13,5	27,98	0,28	0,64	2,29
GALG20	Glucose	<b>Fed-batch com O<sub>2</sub></b>	36h	10,8	13,0	0,17	0,13	0,76

\* – *fed-batch* com borbulhamento de ar.

Tendo em conta os problemas ocorridos durante os crescimentos em biorreactor, acredita-se ainda ser possível modular e aumentar a produção de pDNA na presença de glicerol e com enriquecimento do ar em oxigénio.

Em suma, se os resultados obtidos com ar enriquecido em oxigénio e com glicerol como fonte primária de carbono em *fed-batch* fossem positivos, uma alternativa seria juntar os dois métodos de modo a potenciar um processo rentável e aceite a nível industrial.

## 6 Bibliografia

- [1] Salem-Bekhit, M.M., et al., *Yield production of recombinant plasmid DNA with Escherichia coli in fed-batch culture by pseudo-exponential feeding*. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2013. **27**(2): p. 3709-3715.
- [2] Silva, F., J.A. Queiroz, and F.C. Domingues, *Plasmid DNA fermentation strategies: influence on plasmid stability and cell physiology*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012. **93**(6): p. 2571-2580.
- [3] Goncalves, G.A.L., et al., *De novo creation of MG1655-derived E-coli strains specifically designed for plasmid DNA production*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. **97**(2): p. 611-620.
- [4] Wunderlich, M., et al., *Effect of growth rate on plasmid DNA production and metabolic performance of engineered Escherichia coli strains*. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2014. **117**(3): p. 336-342.
- [5] Listner, K., et al., *Development of a highly productive and scalable plasmid DNA production platform*. Biotechnology Progress, 2006. **22**(5): p. 1335-1345.
- [6] Gropp, M., et al., *Regulation of Escherichia coli RelA requires oligomerization of the C-terminal domain*. Journal of Bacteriology, 2001. **183**(2): p. 570-579.
- [7] Hasan, C.M.M. and K. Shimizu, *Effect of temperature up-shift on fermentation and metabolic characteristics in view of gene expressions in Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 2008. **7**.
- [8] Madeira, C., et al., *Nonviral Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells Using Cationic Liposomes for Gene and Cell Therapy*. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010.
- [9] Li, X.L., J.W. Robbins, and K.B. Taylor, *Effect of the levels of dissolved oxygen on the expression of recombinant proteins in four recombinant Escherichia coli strains*. Journal of Industrial Microbiology, 1992. **9**(1): p. 1-9.
- [10] Raiado-Pereira, L., D.M.F. Prazeres, and M. Mateus, *Impact of plasmid size on the purification of model plasmid DNA vaccines by phenyl membrane adsorbers*. Journal of Chromatography A, 2013. **1315**: p. 145-151.
- [11] Bohle, K. and A. Ross, *Plasmid DNA Production for Pharmaceutical Use: Role of Specific Growth Rate and Impact on Process Design*. Biotechnology and Bioengineering, 2011. **108**(9): p. 2099-2106.
- [12] Silva, F., et al., *Influence of Growth Conditions on Plasmid DNA Production*. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. **19**(11): p. 1408-1414.
- [13] Diogo, M.M., J.A. Queiroz, and D.M.F. Prazeres, *Chromatography of plasmid DNA*. Journal of Chromatography A, 2005. **1069**(1): p. 3-22.
- [14] Diogo, M.M., J.A. Queiroz, and D.M.F. Prazeres, *Assessment of purity and quantification of plasmid DNA in process solutions using high-performance hydrophobic interaction chromatography*. Journal of Chromatography A, 2003. **998**(1-2): p. 109-117.
- [15] Teresa Cesario, M., et al., *Enhanced bioproduction of poly-3-hydroxybutyrate from wheat straw lignocellulosic hydrolysates*. New Biotechnology, 2014. **31**(1): p. 104-113.
- [16] Gonçalves, G.A.L., *Dissertação de Doutoramento em Bioengenharia: Rational engineering of Escherichia coli strains for plasmid biopharmaceutical manufacturing*. 2013, Instituto Superior Técnico.
- [17] Williams, J.A., et al., *Generic Plasmid DNA Production Platform Incorporating Low Metabolic Burden Seed-Stock and Fed-Batch Fermentation Processes*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **103**(6): p. 1129-1143.

- [18] Lin-Chao, S., W.T. Chen, and T.T. Wong, *High copy number of the pUC plasmid results from a rom rop-suppressible point mutation in RNA-II*. *Molecular Microbiology*, 1992. **6**(22): p. 3385-3393.
- [19] Nam, T.W., et al., *The Escherichia coli glucose transporter enzyme IICBGlc recruits the global repressor Mlc*. *Embo Journal*, 2001. **20**(3): p. 491-498.
- [20] Balsalobre, C., J. Johansson, and B.E. Uhlin, *Cyclic AMP-dependent osmoregulation of crp gene expression in Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2006. **188**(16): p. 5935-5944.
- [21] Li, M., et al., *Effect of lpdA gene knockout on the metabolism in Escherichia coli based on enzyme activities, intracellular metabolite concentrations and metabolic flux analysis by C-13-labeling experiments*. *Journal of Biotechnology*, 2006. **122**(2): p. 254-266.
- [22] Plumbridge, J., *Expression of ptsG, the gene for the major glucose PTS transporter in Escherichia coli, is repressed by Mlc and induced by growth on glucose*. *Molecular Microbiology*, 1998. **29**(4): p. 1053-1063.

# **ANEXOS**

# 1 Rectas de calibração

## 1.1 Concentração de biomassa

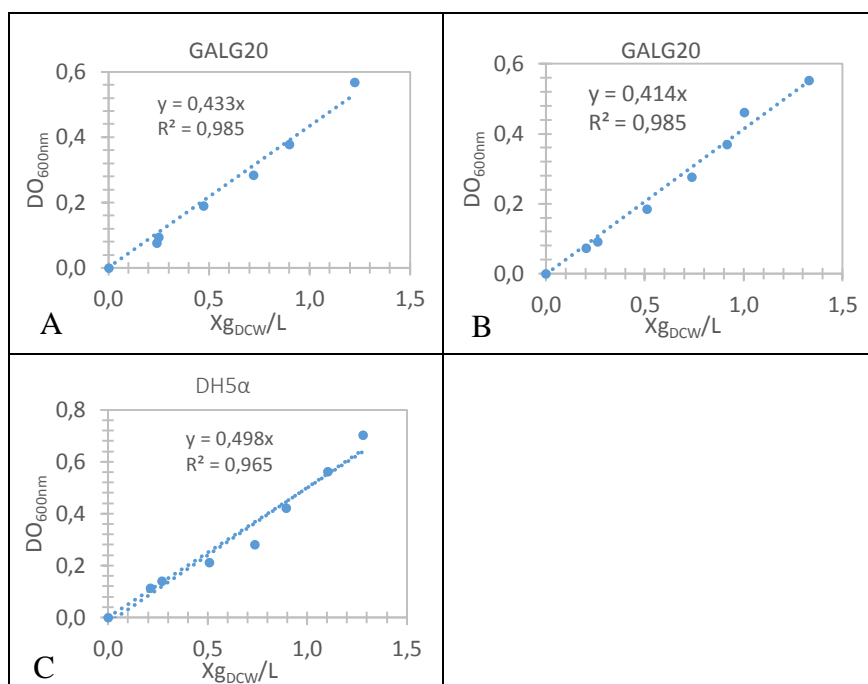


Figura A. 1 – Rectas de calibração determinadas para o cálculo da concentração de biomassa ( $X_{gDCW}/L$ ) válido para valores de  $DO_{600}$  de 0 a 0,6 em GALG20 e 0 a 0,7 em DH5 $\alpha$ . No gráfico A, a recta foi calculada a partir de um crescimento com glucose como fonte primária de carbono, no gráfico B a recta foi calculada a partir de um crescimento com glicerol como fonte primária de carbono e o gráfico C foi obtido a partir de um crescimento com glicerol como fonte primária de carbono.

## 1.2 Concentração de pDNA

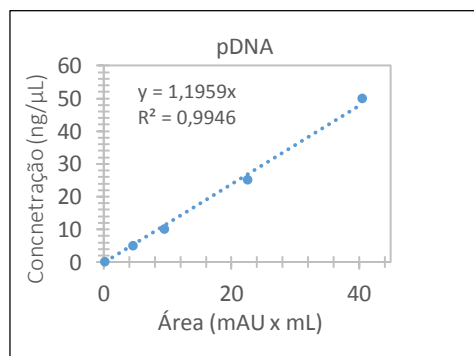


Figura A. 2 – Recta de calibração determinada para quantificar a concentração de pDNA. Válida para valores entre 0ng/ $\mu L$  e 50ng/ $\mu L$ .

### 1.3 Concentração de metabolitos

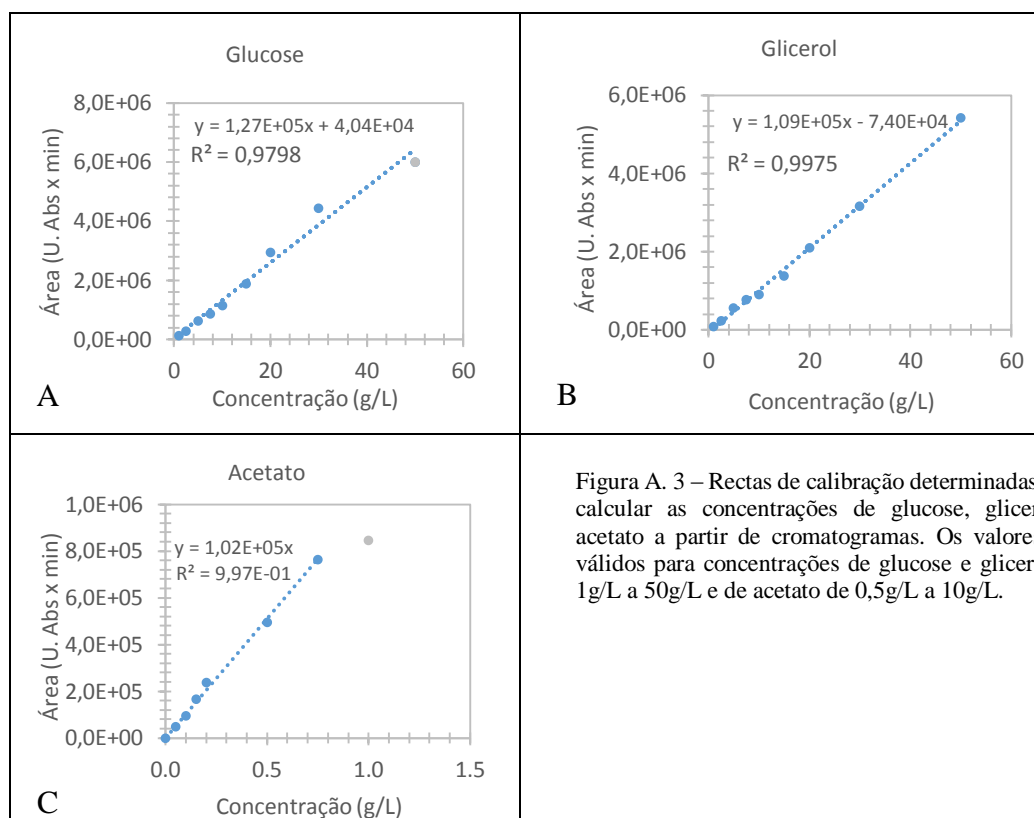


Figura A. 3 – Rectas de calibração determinadas para calcular as concentrações de glucose, glicerol e acetato a partir de cromatogramas. Os valores são válidos para concentrações de glucose e glicerol de 1g/L a 50g/L e de acetato de 0,5g/L a 10g/L.

### 2 Taxa específica de crescimento

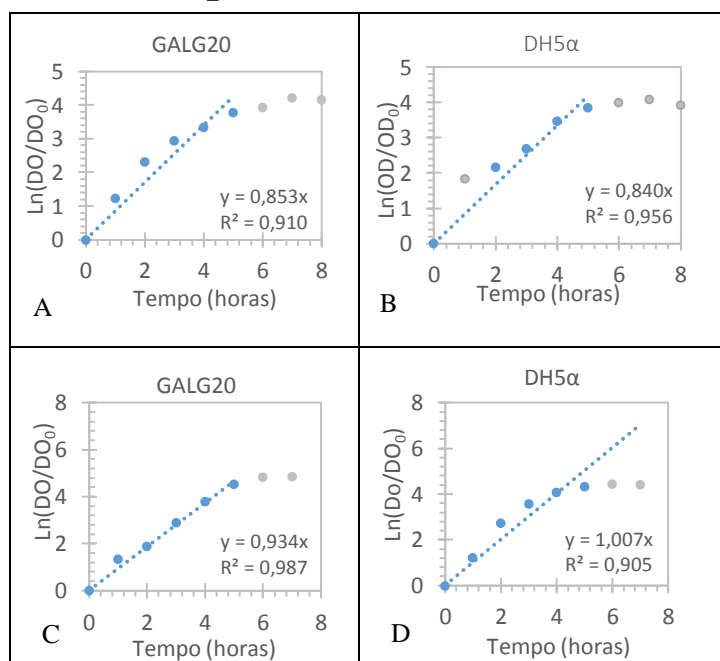


Figura A. 4 – Taxas específicas de crescimento dos ensaios representados nas Figuras 3A, 3B, 3C e 3D, respectivamente A, B, C e D.

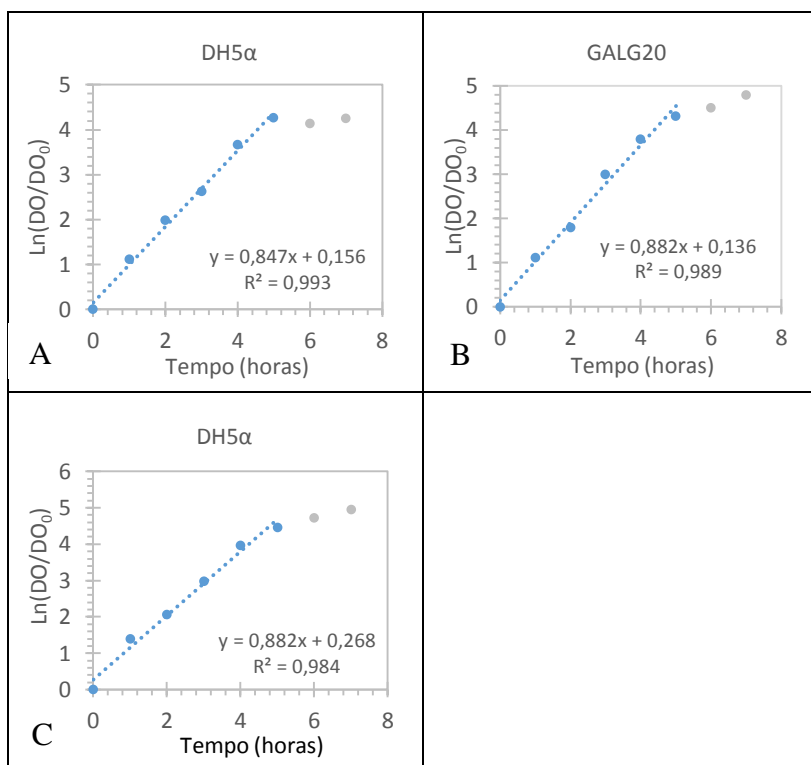


Figura A. 5 – Taxas específicas de crescimento referentes às figuras 13A, 13B e 13C respectivamente, A, B e C.

### 3 $k_{LA}$

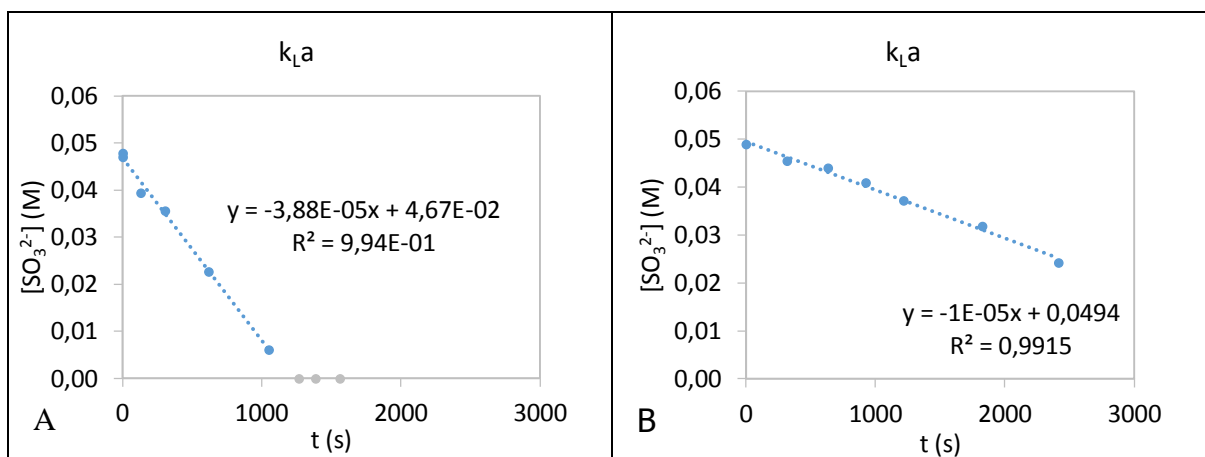


Figura A. 6 – Gráficos representativos do cálculo do  $k_{LA}$ . O gráfico A corresponde ao cálculo do  $k_{LA}$  com oxigénio puro e o gráfico B corresponde ao cálculo do  $k_{LA}$  com borbulhamento de ar obtido pelos alunos de Laboratórios de Engenharia Biológica II do Instituto Superior Técnico.

## 4 Variação dos parâmetros de fermentação

### 4.1 Fed-batch com glucose como fonte primária de carbono

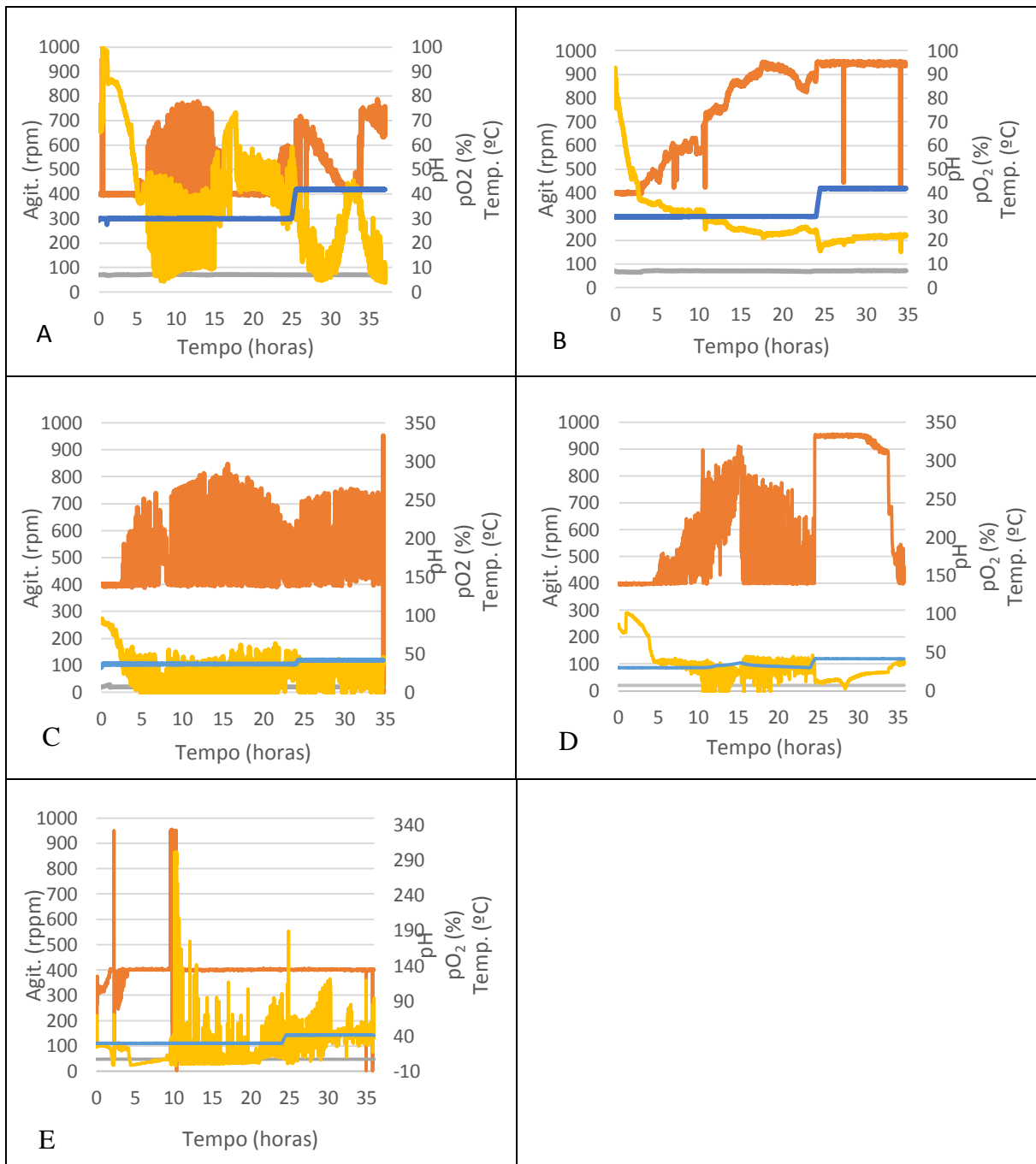


Figura A. 7 – Variação dos parâmetros de fermentação referentes aos gráficos 6A, 6B, 6C, 6D e 10, respectivamente A, B, C, D e E. — Agit. — pH — pO<sub>2</sub> — Temp.

## 4.2 Fed-batch com glicerol como fonte primária de carbono

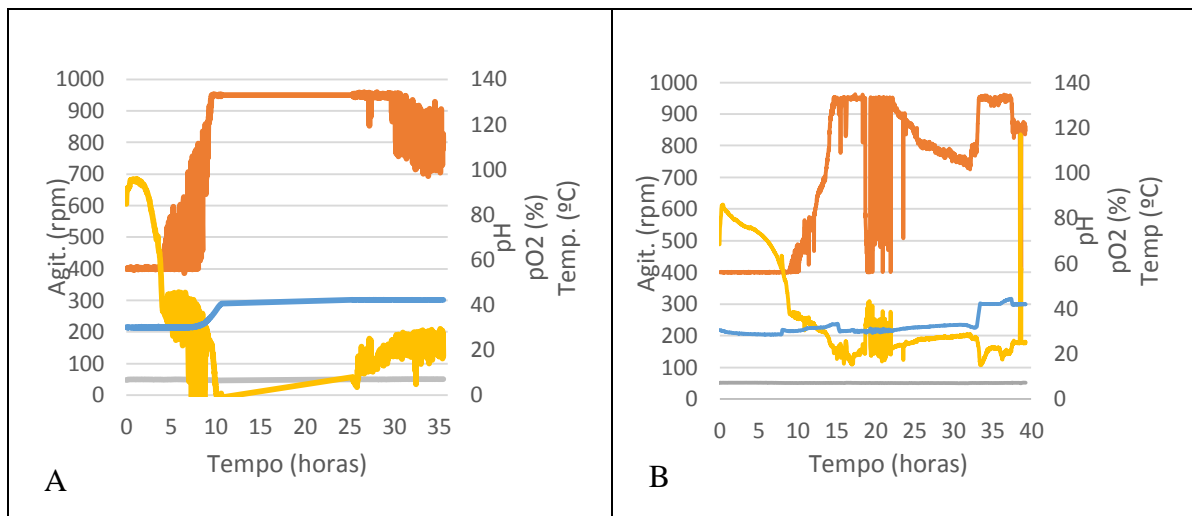


Figura A. 8–Variação dos parâmetros de fermentação referentes às figuras 13A e 13B, respectivamente, A e B.

— Agit. — pH — pO2 — Temp.

## 5 Script para programação da bomba de alimentação

```
<code>
<?php
function gera_setpoint($intervalo_in,$hora_start_in,$hora_end_in,$sec_on_in,$sec_off_in)
{
$a=0;
for ($i = $hora_start_in; $i <= $hora_end_in; $i++, $a++) {
$max_j=(60/$intervalo_in)-1;
for ($j = 0; $j <= $max_j; $j++) {
$intervalo=$intervalo_in;
$aux1=$j*$intervalo_in;
$aux2=($j*$intervalo_in)+1;
$sec_off=$sec_off_in;
$sec_on=$sec_on_in; // $sec_off=60-$sec_on; // arredondamentos..
$sec_until_next="60.00";
$sec_until_next_zero="0.00";
echo "0\t".$i."\t".$aux1."\tPump 1 time off\t".$sec_off[$a]."\r\n <br>";
echo "0\t".$i."\t".$aux1."\tPump 1 time on\t".$sec_on[$a]."\r\n <br>";
}
}
} // end gera_setpoint()
function gera_setpoint_horario($hora_start_in,$hora_end_in,$sec_on_in,$sec_off_in)
{
$a=0;
for ($i = $hora_start_in; $i <= $hora_end_in; $i++, $a++) {
$sec_off=$sec_off_in;
$sec_on=$sec_on_in;
echo "0\t".$i."\t0\tPump 1 time off\t".$sec_off[$a]."\r\n <br>";
echo "0\t".$i."\t0\tPump 1 time on\t".$sec_on[$a]."\r\n <br>";
}
} // end gera_setpoint_horario()

gera_setpoint(20,10,12,[114.50,129.09,145.55],[1085.50, 1070.91, 1054.45]);
gera_setpoint(15,13,17,[123.08,138.78,156.47,176.42,198.91],[776.92,761.22,743.53,723.58,701.09]);
gera_setpoint(10,18,21,[149.51,168.58,190.07,214.30],[450.49, 431.42, 409.93, 385.70]);
gera_setpoint(5,22,26,[120.81,136.22, 153.58, 173.17, 195.24],[179.19, 163.78, 146.42, 126.83,
104.76]);

?>
```

Figura A. 9 – Script informático usado para programar a bomba de alimentação do fermentador Electrolab no ensaio representado na Figura 6B e 6C.