

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALESSANDRA DA SILVA RAUPP

**ESTUDO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
ACETATO UTILIZANDO DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE OPERAÇÃO EM
BIORREATORES**

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ALESSANDRA DA SILVA RAUPP

**ESTUDO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
ACETATO UTILIZANDO DIFERENTES ESTRATÉGIAS DE OPERAÇÃO EM
BIORREATORES**

Trabalho de conclusão apresentado junto à
atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do
curso de Química Industrial, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Químico
Industrial

Prof. Dra. Daniele Misturini Rossi
Orientadora

Prof. Dra. Giandra Volpato
Co-orientadora

Porto Alegre

2016

Dedico este trabalho aos amores da minha vida:
meus pais, minha irmã e meu noivo.

Obrigada por tudo!

Agradeço à minha orientadora e co-orientadora por toda a ajuda e boa vontade em partilhar seus ensinamentos. À toda equipe da empresa Quatro G P&D pelo auxílio durante os experimentos. À minha família e ao meu noivo por todo o apoio e paciência.

RESUMO

A quantificação de acetato, metabólito produzido por micro-organismos, é muito importante para a otimização de cultivos em biorreator. Uma quantidade de biomassa mais elevada está relacionada a um aumento do número de células que podem expressar a proteína de interesse durante o cultivo. O produto final, visado para a comercialização, é a enzima Lactase, tendo como foco principal empresas do setor alimentício, em especial lácteos. Altas concentrações de acetato podem interferir no andamento do cultivo, tornando-se tóxicas para as células e inibindo o seu crescimento. O acetato é produzido pelas células quando estas encontram-se em meios com limitação de oxigênio e excessos de glicose, de modo que o controle destes parâmetros é fundamental para se atingir altas densidades celulares. Uma maneira de controlar estes nutrientes é utilizando estratégias de alimentação adequadas em biorreatores, de modo que glicose e oxigênio estejam em concentrações necessárias aos micro-organismos. Várias são as estratégias utilizadas na indústria para manter as concentrações de acetato abaixo da inibitória. As estratégias utilizadas neste trabalho foram baseadas nos métodos de vazão de alimentação com o manejo baseado no método do controle do oxigênio dissolvido, conhecido como DO-stat e estratégia não retro-alimentada, baseada na alimentação linear. A concentração de acetato foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência. O método proposto para a quantificação sofreu alterações em relação a metodologias já descritas, devido a limitações do equipamento disponível na empresa. Deste modo, foi realizada a validação parcial do novo método proposto para esta análise. Outra variável que necessita atenção é a indução da expressão da proteína de interesse. Micro-organismos recombinantes necessitam de um indutor para que, a partir da adição deste indutor, a proteína de interesse possa ser expressa pelas células. Porém, o indutor também pode ser tóxico para o cultivo, de modo que o tempo de indução também foi estudado. Com a avaliação de todos os parâmetros descritos, foi determinada a melhor condição de cultivo para o crescimento da bactéria recombinante, responsável pela produção da enzima Lactase, bem como a análise de custos dos recursos utilizados.

Palavras-chave: Acetato. Biorreator. Lactase.

ABSTRACT

Acetate, a metabolite produced by microorganisms, it is very important to optimize bioreactor cultivations. A higher amount of biomass is related to an increase number of cells that can express the protein of interest during the cultivation. The final product, targeted for commercialization is the Lactase enzyme, focusing mainly on companies in the food sector, especially dairy. High acetate concentrations can interfere the cultivation progress, making it toxic to the cells and inhibiting their growth. Acetate is produced by cells when they are in means with oxygen and glucose excess so the control of these parameters is essential for attaining high cell densities. One way to control these nutrients is using adequate feeding strategies, so that glucose and oxygen concentrations are required in the microorganisms, without excess. There are several strategies used in the industry to maintain concentrations of acetate below the inhibitory. The strategies used in this study were based on flow rate methods with the handling based on oxygen dissolved control method, known as DO-stat and without feedback control, based on a linear rate. The acetate was quantified by high-performance liquid chromatography. The proposed method for the quantification had changes to the methods already described, due to limitations of equipment available in the company. Thus, the partial validation was carried out of the proposed new method for this analysis. Another variable that needs attention is the induction. Recombinant microorganisms require an inductor for starting the addition of the inducer, the protein of interest can be expressed by the cells. However, the inducer can be toxic to the crop, so that the induction time was also studied. With the evaluation of all the parameters described, it was determined the best growing conditions for growth of recombinant bacteria, responsible for producing the Lactase enzyme as well as the analysis of cost of resources used.

Key words: Acetate. Bioreactor. Lactase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reação de hidrólise da lactose catalisada pela enzima lactase	13
Figura 2: Principais partes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência	17
Figura 3: Matriz estrutural de um trocador iônico	18
Figura 4: Condições experimentais da coluna Aminex HPX-87H.....	19
Figura 5: Relação entre OD _{600nm} e Biomassa	26
Figura 6: Cromatograma referente ao ponto de 20,0 g/L de acetato da curva de calibração ...	27
Figura 7: Curva padrão de quantificação de acetato.....	27
Figura 8: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 30 h de cultivo	30
Figura 9: Cromatograma referente ao ponto de 1,25 g/L de acetato da curva de calibração ...	37
Figura 10: Cromatograma referente ao ponto de 2,50 g/L de acetato da curva de calibração .	37
Figura 11: Cromatograma referente ao ponto de 5,00 g/L de acetato da curva de calibração .	38
Figura 12: Cromatograma referente ao ponto de 10,0 g/L de acetato da curva de calibração .	38
Figura 13: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 4 h de cultivo	39
Figura 14: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 8 h de cultivo	39
Figura 15: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 16 h de cultivo	39
Figura 16: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 20 h de cultivo	40
Figura 17: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 24 h de cultivo	40
Figura 18: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 1	41
Figura 19: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 2.....	41
Figura 20: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 3.....	42
Figura 21: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 4.....	42
Figura 22: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 5.....	43
Figura 23: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 6.....	43
Figura 24: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 7.....	44
Figura 25: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 8.....	44
Figura 26: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 9.....	45
Figura 27: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 10.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estratégias de tempos de indução e alimentação testadas	25
Tabela 2: Precisão intra-ensaio e Exatidão da metodologia proposta	28
Tabela 3: Limites de Detecção e Quantificação	28
Tabela 4: Quantificação de acetato das fermentações	29
Tabela 5: Cotação de reagentes e materiais descartáveis	33
Tabela 6: Relação de custos por etapa.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CMD – Concentração média determinada

CO₂ – Dióxido de carbono

DO – Taxa de oxigênio dissolvido

DP – Desvio padrão

DPR – Desvio padrão relativo

F1 – Fermentação 1

F2 – Fermentação 2

F3 – Fermentação 3

F4 – Fermentação 4

F5 – Fermentação 5

F6 – Fermentação 6

F7 – Fermentação 7

F8 – Fermentação 8

F9 – Fermentação 9

F10 – Fermentação 10

IPTG - Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

LB – *Lysogeny Broth*

LD – Limite de determinação

LQ – Limite de quantificação

MCB – *Master cell bank*

NaCl – Cloreto de sódio

OD_{600nm} – Densidade óptica medida à 600 nm

pH – Medida do potencial hidrogeniônico da solução

R² – Coeficiente de correlação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. LACTASE	13
3.2. CULTIVO COM ALTAS DENSIDADES CELULARES	14
3.3. INTERFERÊNCIAS DO CULTIVO	15
3.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO.....	19
4.2. PREPARO DO BIORREATOR E MEIO DE CULTIVO.....	19
4.3. ESTRATÉGIAS DOS CULTIVOS	21
4.4. QUANTIFICAÇÃO DE ACETATO	22
4.4.1. <i>Preparo das Amostras</i>	22
4.4.2. <i>Instrumentação</i>	22
4.4.3. <i>Curva de Calibração</i>	22
4.4.4. <i>Validação Parcial do Método</i>	23
4.4.5. <i>Linearidade</i>	23
4.4.6. <i>Precisão Intra-ensaio</i>	23
4.4.7. <i>Exatidão</i>	23
4.4.8. <i>Limite de Detecção (LD)</i>	24
4.4.9. <i>Limite de Quantificação (LQ)</i>	24
4.5. ANÁLISE DE BIOMASSA	24
5. RESULTADOS	25
5.1. ENSAIOS FERMENTATIVOS	25
5.2. QUANTIFICAÇÃO DE ACETATO	26
5.2.1. <i>Curva de Calibração e Validação do Método</i>	26
5.2.2. <i>Quantificação de Acetato dos Cultivos em Biorreator</i>	28
6. DISCUSSÃO	30
7. ANÁLISES DE CUSTOS.....	32
8. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE - A	37
APÊNDICE - B.....	39
APÊNDICE - C	41

1. INTRODUÇÃO

A empresa Quatro G Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, situada no parque tecnológico da PUC-RS, trabalha com a produção de biofármacos produzidos biotecnologicamente. Com isso, o interesse de produzir a enzima lactase, para adicionar este produto ao seu portfólio, atraindo novos clientes do setor alimentício, principalmente indústrias de laticínios. Para se obter grandes quantidades da proteína de interesse comercial, primeiramente é necessário estabelecer as melhores condições de cultivo para a célula que produz a proteína desejada. Com o avanço das técnicas dos cultivos em biorreator, juntamente com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, é possível um aumento significativo do produto final obtido e a consequente redução dos custos da produção. Isto se deve ao fato de que micro-organismos recombinantes superexpressam a proteína desejada e quanto maior for a densidade celular obtida com o cultivo, maior a possibilidade das células produzirem a proteína de interesse.

Os cultivos em biorreator são caracterizados pelo alto controle de diversos parâmetros importantes para o crescimento microbiano, como pH, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura, agitação e a possibilidade de adição de alimentação. Porém, alguns cuidados devem ser tomados para se estabelecer a melhor condição de cultivo. Excessos de nutrientes e condições limitantes de oxigenação acarretam a produção de acetato pela célula (LEE, 1996). O acetato é um metabólito produzido pelos micro-organismos, sendo que a produção de proteína recombinante é significativamente reduzida por acúmulo de acetato. Deste modo, torna-se necessário monitorar a produção de acetato para se estabelecer a melhor condição de cultivo.

Para controlar a quantidade de acetato que as células produzem, diversas são as estratégias de alimentação que podem ser avaliadas em biorreatores. Todas as estratégias possuem o mesmo objetivo, que é a introdução dos nutrientes de maneira controlada, fornecendo para as células somente o necessário para o seu crescimento e evitando excessos.

A concentração de acetato pode ser determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Porém, neste processo é exigido altas temperaturas para a análise, sendo que o cromatógrafo disponível na empresa não possui forno e, portanto, a metodologia deve ser realizada à temperatura ambiente.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho é propor uma metodologia analítica para avaliar a interferência de acetato no andamento do cultivo e, com base na quantidade de biomassa obtida, determinar qual a estratégia de alimentação e indução apresentaram os melhores resultados. Os objetivos específicos propostos são:

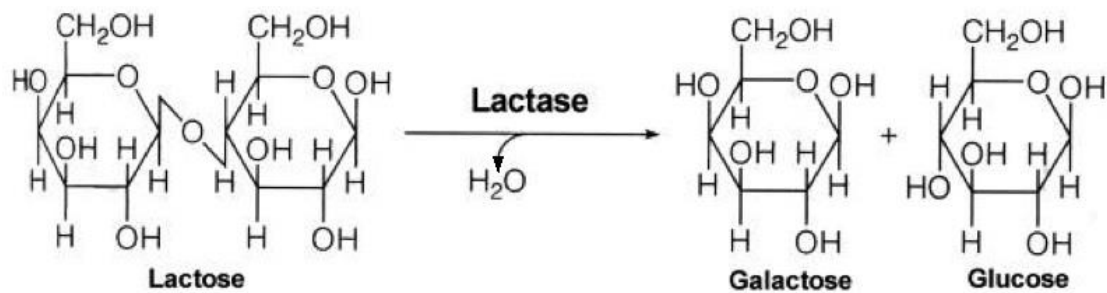
- Determinar a melhor estratégia de alimentação;
- Determinar o melhor tempo de indução;
- Determinar a biomassa obtida em cada cultivo;
- Avaliar os custos do desenvolvimento da metodologia para a empresa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Lactase

Também denominada como β -galactosidase, a lactase é responsável por catalisar a reação de hidrólise da lactose, liberando como produtos os seus monossacarídeos constituintes: glicose e galactose. A Figura 1 apresenta a reação catalisada pela lactase.

Figura 1: Reação de hidrólise da lactose catalisada pela enzima lactase



Fonte: Adaptado de TREVISAN, 2008.

A lactose é o componente mais abundante no leite de mamíferos e está presente na fabricação de diversos produtos lácteos e não lácteos. É classificada como um dissacarídeo, formado por uma molécula de glicose e uma de galactose, unidas através da ligação glicosídica. Apresenta-se sob duas formas anoméricas: α -Lactose e β -Lactose (PEREIRA et al., 2012). A diminuição do teor de lactose dos produtos derivados do leite tem sido muito estudada devido a interesses tecnológicos de melhorar (dentre outros fatores) a solubilidade e o poder adoçante dos alimentos. Além disso, há também os problemas nutricionais que envolvem este açúcar, como a intolerância à lactose (SANTIAGO et. al., 2004).

Visando a diminuição das quantidades de lactose nos alimentos, a lactase é amplamente utilizada na indústria, para melhorar a solubilidade de produtos concentrados de leite, tornando-os mais facilmente fermentáveis. Outro exemplo de utilização da lactase na indústria de laticínios é no melhoramento das propriedades de derivados lácteos, no qual a baixa solubilidade da lactose pode conferir uma textura arenosa para os produtos. Essa característica é indesejável, pois causa a depreciação do produto, bem como pode acarretar em problemas tecnológicos durante o processamento industrial (SANTIAGO et. al., 2004).

Além disso, a enzima é utilizada na fabricação de leite e derivados lácteos com baixo teor de lactose e em suplementos alimentares, produtos estes consumidos por pessoas com intolerância à lactose (SANTIAGO et. al., 2004). Acredita-se que esta condição afete mais de 75% da população mundial, dos quais aproximadamente 5% ocorrem no norte da Europa e

mais de 90% em países da Ásia e da África. No Brasil, os índices de intolerantes à lactose são de 57% em brancos e mulatos, 80% em negros, mais de 89% em povos indígenas e chegando a 100% em povos descendentes de japoneses (MATTAR; MAZO, 2010).

A produção de leite no Brasil desempenha um importante papel na economia do país. Segundo dados do IBGE, a produção brasileira de leite, em 2014, foi de 35,17 bilhões de litros, colocando o Brasil na quarta posição no ranking mundial, atrás dos Estados Unidos, Índia e China. A região sul foi a que obteve maior resultado, com 34,7% da produção nacional, seguida da região sudeste, com 34,6% do total (CARVALHO; CARNEIRO, 2015).

Com o aumento de diagnósticos de indivíduos intolerantes à lactose, a enzima lactase vem se destacando neste mercado, com a finalidade de se produzir alimentos com baixos teores de lactose. O interesse na utilização de enzimas como biocatalisadores industriais é crescente nos mais distintos processos. As razões deste crescimento podem ser resumidas em: alta eficiência catalítica, alta especificidade pelo substrato, biodegradabilidade e alta atividade em condições suaves de reação, tais como temperatura e pressão. Porém, o uso industrial de enzimas ainda representa um aumento de custo bastante significativo no processo, que se reflete no valor do produto final. Algumas alternativas de diminuir o custo de aplicação industrial de enzimas envolvem o aumento da atividade enzimática, que pode ser obtido através da produção de enzima recombinante. As técnicas de engenharia genética representam um avanço nas possibilidades de se obter células mais produtivas, permitem produzir processos em alta densidade celular, dentre outras vantagens (ANSARI; SATAR, 2012).

3.2. Cultivo com altas densidades celulares

A produção de enzimas microbianas em escala industrial se faz majoritariamente por cultivos submersos. Com os avanços tecnológicos na instrumentação e controle de processo, as técnicas de cultivo submerso têm se beneficiado, pois conseguem adequar-se muito bem aos cultivos de micro-organismos recombinantes, que vêm sendo crescentemente empregados para a produção de enzimas (SANT'ANNA JR, 2007). Os cultivos em altas densidades celulares foram desenvolvidos com a finalidade de aumentar a produtividade em biomassa e também para proporcionar vantagens, tais como volume reduzido da cultura, menores custos de produção e redução de investimentos em equipamentos (SARGO, 2011).

A bactéria *Escherichia coli* é o hospedeiro mais comumente utilizado nestes cultivos. Porém, como grande parte das proteínas é acumulada na porção intracelular da *E. coli* recombinante, a produtividade do cultivo está diretamente relacionada com a concentração

final de células (RIESENBERG, 1991). Existem diferentes maneiras de se conduzir um processo fermentativo em escala industrial. Um biorreator pode ser operado de forma contínua, batelada ou batelada-alimentada. O processo em batelada-alimentada, também chamado “fed batch”, é o mais frequentemente utilizado para obtenção de altas densidades celulares (LEE, 1996).

Basicamente, a batelada alimentada para cultivos de micro-organismos pode ser dividida em 3 etapas: cultivo descontínuo, alimentação da fonte de carbono e indução da síntese da proteína recombinante. A primeira etapa deste processo ocorre até que a primeira fonte de carbono, adicionada ao meio de cultura inicial, seja consumida. Após, inicia-se a segunda etapa, de modo que a alimentação deve ser adicionada aos poucos, pois não havendo acúmulos evita-se a formação de subprodutos inibidores. Por fim, ocorre a indução da síntese proteica, com a adição de uma substância denominada indutor, capaz de ativar a síntese das proteínas recombinantes induzidas (CARVALHO; SATO, 2007).

A otimização da produção da proteína-alvo é estudada principalmente através da manipulação do meio de cultivo, tempo de indução, concentração do indutor e temperatura, juntamente com o controle da velocidade específica de crescimento antes e depois da indução. Para se obter uma elevada produção da proteína recombinante é necessário, primeiramente, atingir elevadas concentrações celulares. Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) é amplamente utilizado para expressar a proteína de interesse em *E. coli*. O IPTG não é consumido durante o processo e não necessita de transportadores para entrar na célula. Porém, este indutor é tóxico, de modo que sua concentração e o tempo de indução devem ser estudados para se determinar a melhor condição, ou seja, aquela em que o IPTG não interfira significativamente no crescimento celular (SARGO, 2011).

3.3. Interferências do cultivo

Um grande problema que precisa ser contornado em um cultivo de alta densidade celular é a produção de acetato. A produção de acetato é resultado do crescimento de *E. coli* sob condições anaeróbicas ou limitantes de oxigênio. Ela pode ocorrer quando o fluxo de carbono do metabolismo excede a demanda da biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula. Pode ocorrer a produção de acetato, também, em situação aeróbica, quando há excesso de glicose no meio (WOLFE, 2005).

A alta concentração de acetato pode reduzir a taxa de crescimento, a produção de biomassa e a densidade máxima de células viáveis. Assim, a produção de proteínas recombinantes é significativamente reduzida pelo excesso de acetato produzido no cultivo.

A formação de acetato varia entre as diferentes cepas e meios de cultura utilizados, sendo que é maior em culturas “fed batch” do que em batelada. Isto se deve ao fato de que em batelada-alimentada o tempo da cultura é maior. Estratégias para reduzir a formação de acetato em culturas “fed batch” vem sendo desenvolvidas, controlando a taxa de crescimento do micro-organismo pela limitação dos nutrientes essenciais, como fontes de carbono e nitrogênio (LEE, 1996).

As metodologias de alimentação utilizadas nos cultivos celulares de altas densidades podem ser ou não controladas por um mecanismo de retroalimentação. No modo de operação sem controle por retroalimentação, o fornecimento de nutrientes é feito de forma ininterrupta até o final da fase de enchimento da dorna. Além disso, a alimentação pode ocorrer com vazões constantes ou variáveis. A alimentação linear é um exemplo desta metodologia. Nela, ocorre um aumento gradual da vazão da alimentação, que acompanha a taxa de crescimento celular (LEE, 1996).

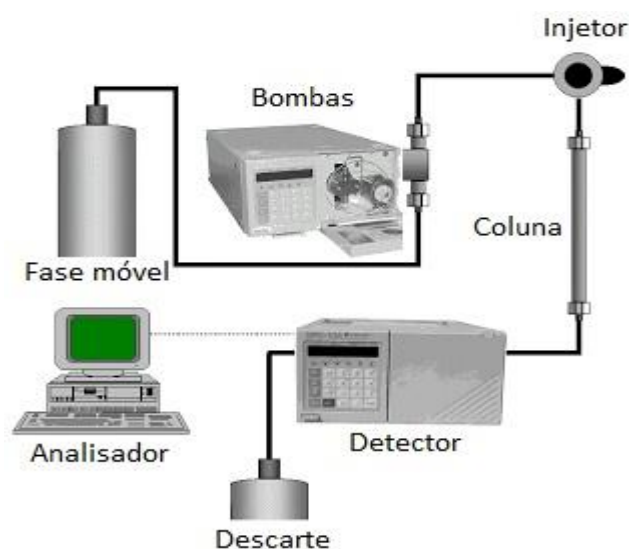
O modo de operação com controle por retroalimentação é mais sofisticado. A adição dos nutrientes pode ser controlada em função da concentração desta no meio de fermentação (controle direto) ou em função de parâmetros físicos do cultivo (controle indireto), tais como densidade óptica, pH, quociente respiratório, entre outros. O método DO-stat é baseado na constatação de que a concentração de oxigênio dissolvido (DO) no meio de cultivo aumenta quando ocorre o esgotamento dos nutrientes da cultura. Deste modo, a concentração de substrato pode ser mantida dentro da faixa desejada adicionando-se uma quantidade pré-determinada de nutrientes, quando o DO sobe acima de determinado valor (LEE, 1996).

Porém, para se estabelecer qual a melhor estratégia de alimentação de um cultivo em biorreator, é preciso monitorar a produção de acetato pelo micro-organismo e assim ajustar os parâmetros necessários para que se obtenha altas densidades celulares em um meio com poucas concentrações de metabólitos tóxicos. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é uma importante ferramenta que pode auxiliar neste processo de monitoramento de produção de acetato.

3.4. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida consiste numa metodologia analítica que tem por objetivo a separação de distintas espécies químicas presentes numa amostra. A separação processa-se por meio de um mecanismo de interação seletiva entre as moléculas da amostra e duas fases: fase estacionária e fase móvel. A fase estacionária refere-se à coluna cromatográfica, ou seja, um cilindro rígido (normalmente de aço ou vidro) no interior do qual se encontra um material de enchimento formado por pequenas partículas. A fase móvel refere-se à solução ou solvente, que flui continuamente através do sistema, arrastando a amostra injetada pela coluna e pelo detector. A Figura 2 apresenta as principais partes que compõe um cromatógrafo líquido (CHUST, 1990).

Figura 2: Principais partes de um cromatógrafo líquido de alta eficiência



Fonte: Adaptado de CHUST (1990).

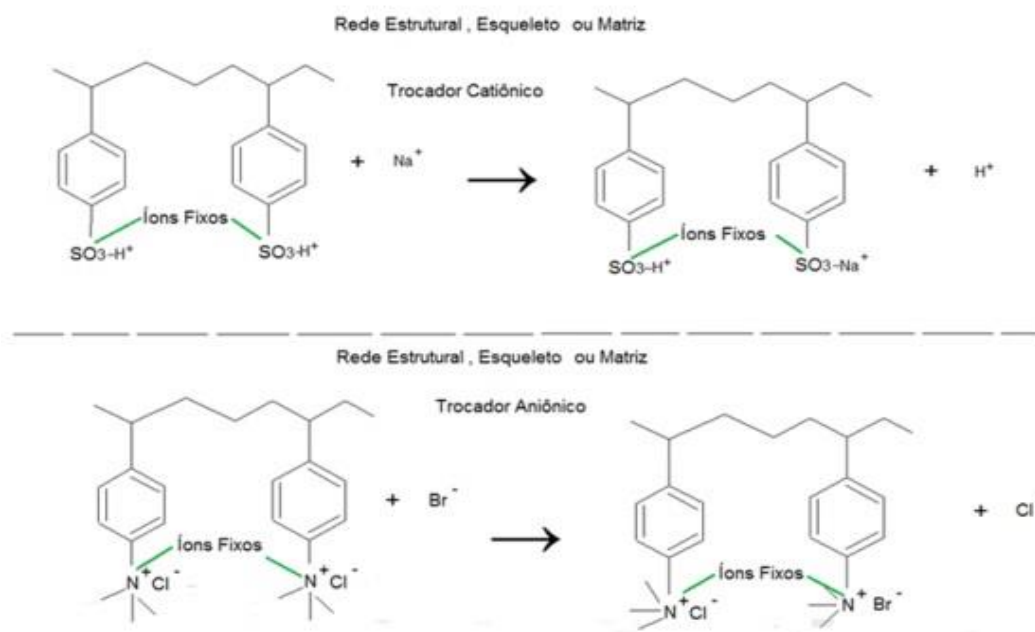
A fase móvel é bombeada para todo o sistema de maneira contínua e vazão constante. Após a estabilização do sistema, medida através da linha de base constante, ocorre a injeção da amostra. Uma pequena quantidade da amostra é introduzida ao sistema. A fase móvel direciona a amostra para a coluna cromatográfica (fase estacionária). As substâncias presentes na amostra, devido às suas distintas estruturas moleculares e grupos funcionais, possuem diferentes afinidades com as fases móvel e estacionária e, portanto, as suas velocidades de migração serão igualmente distintas, permitindo o desenvolvimento da separação cromatográfica. Após, o fluxo de amostra e fase móvel eluídas passam por um detector, que

gera um sinal conforme a concentração do componente. Este sinal é registrado e assim é construído o cromatograma (CHUST, 1990).

Deste modo, a CLAE separa as espécies químicas e é um método que pode ser utilizado para separar, identificar e quantificar substâncias presentes em diferentes tipos de produtos. Em função das diferentes características dessas duas fases, existem diferentes metodologias empregadas para a separação de componentes de uma amostra, tais como: cromatografia por adsorção, partição, troca iônica, exclusão, permeação em gel, dentre outros (CHUST, 1990).

A cromatografia de troca iônica baseia-se na interação entre os íons presentes na amostra e na fase estacionária. Um trocador iônico pode ser definido como um material que contém um “esqueleto” ou “matriz”, na qual são fortemente fixados íons de cargas positiva ou negativa. A Figura 3 apresenta a matriz estrutural de um trocador iônico. Para preservar a neutralidade elétrica, este sólido deve conter íons móveis ou deslocáveis de carga oposta. Quando os íons fixos da matriz são negativos, os íons deslocáveis devem ser positivos, neste caso o trocador é catiônico. No caso contrário, isto é, quando os íons fixados são positivos, os íons trocáveis são negativos e, portanto, tem-se um trocador aniônico (ABRÃO, 2014).

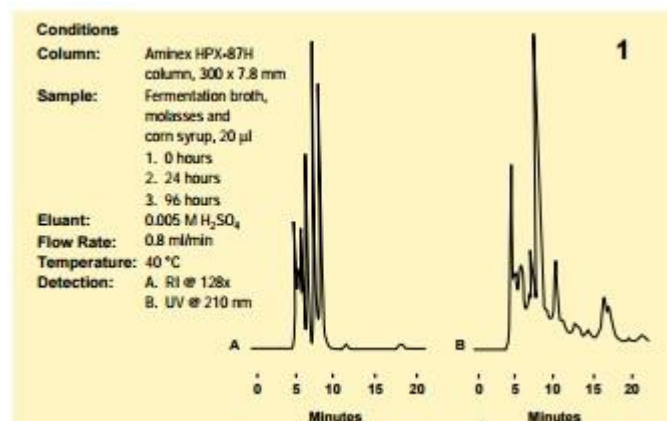
Figura 3: Matriz estrutural de um trocador iônico



Fonte: Modificado de ABRÃO, 2014.

Um exemplo de coluna de troca aniônica é a Aminex HPX-87H, da empresa Bio-rad. De acordo com o manual desta coluna, ela pode ser utilizada para a quantificação de subprodutos de fermentações, incluindo o metabólito acetato. As condições utilizadas são apresentadas na Figura 4 a seguir. O monitoramento do meio de cultivo foi realizado com 20 μL de amostra, fluxo de 0,8 mL/min, à temperatura de 40 °C e a fase móvel utilizada foi de 0,005 M de ácido sulfúrico.

Figura 4: Condições experimentais da coluna Aminex HPX-87H



Fonte: Manual guia Aminex.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo e Manutenção

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Escherichia coli*, modificada geneticamente para produzir a enzima β -galactosidase a partir do DNA genômico de *Kluyveromyces marxianus*. A bactéria produzida foi cultivada em meio líquido *Lysogeny Broth* (LB) e um estoque foi feito em glicerol 30 % e mantido a -20 °C. Esse estoque foi identificado como Master Cell Bank (MCB) e utilizado como inóculo de todos os cultivos.

4.2. Preparo do Biorreator e Meio de Cultivo

O meio de cultivo utilizado tanto para o pré-inóculo (solução para o crescimento celular inicial, em agitador orbital) e inóculo (crescimento em biorreator) foi o LB. Trata-se de uma solução contendo NaCl (5 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e triptona (10 g/L). Após a pesagem das devidas quantidades dos componentes e a diluição em água bidestilada, foi

feito o ajuste do pH para 7,0. O processo de esterilização de todo o sistema foi feito através de autoclave, ficando por 20 minutos à 121 °C e 1 atm. Após a retirada e o resfriamento do sistema, o pré-inóculo foi preparado.

O pré-inóculo foi preparado em fracos erlenmeyer de 250 mL, adicionando-se 100 µL do MBC em 100 mL de meio LB. Este pré-inóculo foi posto em agitador orbital por aproximadamente 12 h, com temperatura de 37 °C. Transcorrido este tempo, a Densidade Óptica a 600nm (OD_{600nm}) foi verificada em espectrofotômetro (Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 pro), para proceder o inóculo no biorreator. A partir do resultado obtido desta medição, o volume a ser inserido na dorna era calculado, de forma que a OD_{600nm} inicial do cultivo em biorreator fosse 0,1.

Todos os cultivos foram desenvolvidos em biorreator de bancada com duas dornas de 2 L cada (BIOSTAT® B plus, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). Este equipamento possui controle automático de temperatura, agitação, aeração, pH e oxigênio dissolvido no meio, através de um eletrodo polarográfico. Além disso, o biorreator é equipado com três bombas peristálticas acopladas à unidade de controle para adição de ácido e base, mantendo o pH sempre constante. A temperatura da dorna foi mantida em 30 °C por meio de camisa de resfriamento.

Com as condições iniciais estabelecidas, foi realizado o inóculo do cultivo no biorreator. O inóculo foi feito a partir do pré-inóculo, quando este atingiu OD_{600nm} de aproximadamente 1,0. Como o volume de meio de cultura na dorna foi de 900 mL e o volume inicial de cultivo é de 1 L, é necessário adicionar 100 mL de pré-inóculo para se atingir o volume inicial do experimento. Outra condição é a OD_{600nm} inicial do cultivo, que deve ser de 0,1. Para manter estes parâmetros, um simples cálculo de diluição foi realizado, onde o volume de pré-inóculo adicionado foi expresso em mL:

$$Volume_{(pré-inóculo)} = \frac{0,1}{OD_{600nm} (pré-inóculo)} \times 1000$$

Calculado o volume de pré-inóculo, completava-se para 100 mL com a adição de LB estéril, se necessário. Por fim, o inóculo era adicionado por meio de seringa e ao fim da adição, a OD_{600nm} era medida em espectrofotômetro e este tempo era considerado o tempo inicial de crescimento no biorreator.

Transcorridas 5 h de cultivo, foi adicionada a solução de alimentação. A alimentação foi igual para todos os experimentos. Trata-se de uma solução rica em nutrientes, utilizada com o objetivo de prolongar a fase de crescimento microbiano e o consequente aumento da

densidade celular. A solução era preparada em duas etapas. Na etapa inicial, foram preparadas 3 soluções. A solução 1 continha 300 mL de glicose, com concentração de 600 g/L. A solução 2 foi de 100 mL de LB 10 vezes concentrado a partir das concentrações originais, ou seja, NaCl (50 g/L), extrato de levedura (100 g/L) e triptona (100 g/L). A solução 3 foi 100 mL de sulfato de magnésio 125 g/L. Em todas as soluções foi utilizada água bidestilada. As soluções foram esterilizadas por autoclave, por 20 minutos à 121 °C e 1 atm. A segunda etapa de preparação foi feita após a esterilização e resfriamento, onde as 3 soluções foram misturadas, formando a solução de alimentação. A concentração final dos nutrientes, portanto, foi de 400 g/L de glicose, LB 2 vezes a concentração original e 25 g/L de sulfato de magnésio. Também foi adicionado a esta solução o antibiótico canamicina, com concentração final de 30 µg/mL.

4.3. Estratégias dos Cultivos

A alimentação teve seu início em 5 h de cultivo. Os mecanismos de alimentação avaliados foram a vazão de alimentação com controle baseado no método DO-stat e estratégia não retro-alimentada, baseada na alimentação linear. Para as estratégias de alimentação linear, a agitação da dorna foi mantida em cascata, conforme a condição inicial. Foram testadas diferentes vazões de alimentação, sendo que a vazão total da bomba de alimentação teve variações de 1 a 9%. Porém, para as estratégias DO-stat, a agitação foi fixada para 800 rpm, sem cascata, de modo que a velocidade de agitação no meio não interferisse a medição do oxigênio dissolvido no sistema. Assim, conforme os níveis de aeração fossem reduzidos, a alimentação era adicionada ao cultivo. A agitação em cascata ocorre quando existe atrito suficiente entre a parede e as partículas e, em altas velocidades de rotação, forma-se um arco com um pequeno espaço de ar no interior, obtendo-se o movimento de partículas em cascata. Este aumento na velocidade de agitação favorece a oxigenação do meio.

Além das estratégias de alimentação, foram testados tempos diferentes de indução com IPTG. Os tempos de indução analisados foram: 12 h, 18 h e 24 h. Todos os cultivos utilizaram a mesma concentração de IPTG (1 mM), variando apenas o estágio inicial da indução de expressão da proteína recombinante.

4.4. Quantificação de Acetato

4.4.1. Preparo das Amostras

As amostras analisadas foram coletadas nos tempos de cultivo de 4 h, 8 h, 16 h, 20 h, 24 h e 30 h. Uma alíquota de 1 mL do cultivo coletado foi centrifugada por 3 minutos, a 3000 rpm e o sobrenadante extraído e armazenado a -20 °C. Antes da análise por cromatografia, o sobrenadante foi descongelado e filtrado com membrana 0,22 µm de malha.

4.4.2. Instrumentação

O acetato foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no equipamento Äkta Purifier, GE Healthcare, Reino Unido equipado com a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, EUA). Todos os experimentos foram realizados com fluxo de 0,6 mL/min, à temperatura ambiente (25°C) e com o detector de UV a 210 nm. A fase móvel utilizada foi uma solução de ácido sulfúrico 0,005 M. O ácido foi diluído em água ultrapura e a solução final foi filtrada com membrana de 0,22 µm de malha. O equipamento Äkta, disponível pela empresa é utilizado principalmente para purificação, de modo que seu software de análise não apresenta elementos para proceder a correta identificação dos picos e ajustes da linha de base. Com isto, foi necessário a utilização de outro software que a empresa possui: o ACD/Spec Manager, desenvolvido pela empresa ACD Labs, Canadá. Trata-se de um software para processamento, interpretação, armazenamento, recuperação e comunicação de dados e espectros de múltiplas técnicas analíticas.

4.4.3. Curva de Calibração

Primeiramente, foi determinada a curva de calibração de acetato. Para isto, preparou-se soluções contendo diferentes concentrações de acetato de sódio (acetato de sódio anidro, 99,9% de pureza, Sigma Aldrich), diluídas no mesmo meio de cultura utilizado nos cultivos em biorreator (LB, pH 7,0). A curva foi feita em triplicata, portanto, foram preparadas 3 soluções de acetato de sódio 20,0 g/L em meio LB, utilizando balões volumétricos. Após, realizou-se diluições seriadas para obter os demais pontos da curva: 10,0 g/L, 5,00 g/L, 2,50 g/L e 1,25 g/L. Todas as diluições utilizaram a mesma matriz, ou seja, LB, pH 7,0. As pipetas utilizadas nas diluições foram devidamente calibradas. As amostras foram analisadas em equipamento Äkta, sendo o volume de injeção dos padrões analisados de 100 µL.

4.4.4. Validação Parcial do Método

Para avaliação das mudanças realizadas no método de análise, foram realizados alguns testes de validação, para garantir que o método modificado atenda as premissas de qualidade analítica. Conforme RESOLUÇÃO N° 899 da Anvisa, os ensaios de validação parcial podem ser desde uma pequena determinação, como a determinação da exatidão e precisão intra-ensaio, até próximo de uma validação total. Portanto, foram determinadas a linearidade da curva analítica, precisão intra-ensaio, exatidão do método, limites de detecção e quantificação.

4.4.5. Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes e que o coeficiente de correlação (R^2) mínimo aceitável seja 0,99.

4.4.6. Precisão Intra-ensaio

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão intra-corrída mostra a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada. Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação:

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100$$

onde, DP é o desvio padrão e CMD, a concentração média determinada. O valor máximo aceitável não deve ser superior ao desvio de 15%.

4.4.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Desta forma, a exatidão foi verificada a partir de 9 determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3

concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \right) \times 100$$

O desvio não deve exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios menores ou iguais a 20%.

4.4.8. Limite de Detecção (LD)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. A estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base.

4.4.9. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Assim como o LD, o LQ também pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1.

4.5. Análise de Biomassa

Para determinar o crescimento do micro-organismo, mediu-se a OD_{600nm} em espectrofotômetro. Para determinar o branco da leitura, uma alíquota das amostras foi centrifugada, durante 3 minutos a 3000 rpm, garantindo assim a completa decantação das células de *E. coli*. O sobrenadante foi extraído para a leitura do branco e depois as leituras da fração de amostra não centrifugada foram realizadas. Todas as medidas foram realizadas em duplicata.

Os dados obtidos pela medição da densidade óptica foram correlacionados com a biomassa pela determinação do peso-seco. A medição do peso-seco foi feita em duplicata, onde duas alíquotas foram coletadas do biorreator em tubos com massa conhecida. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. O pellet formado foi lavado com tampão, garantindo a total remoção do meio de cultura. Novamente as alíquotas foram

centrifugadas e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi levado à estufa, à 85°C onde permaneceu até atingir um peso constante. A diferença encontrada foi relacionada à medida de densidade óptica mediante a construção de uma reta de correlação e, portanto, a biomassa, em gramas de célula por litro, foi determinada.

5. RESULTADOS

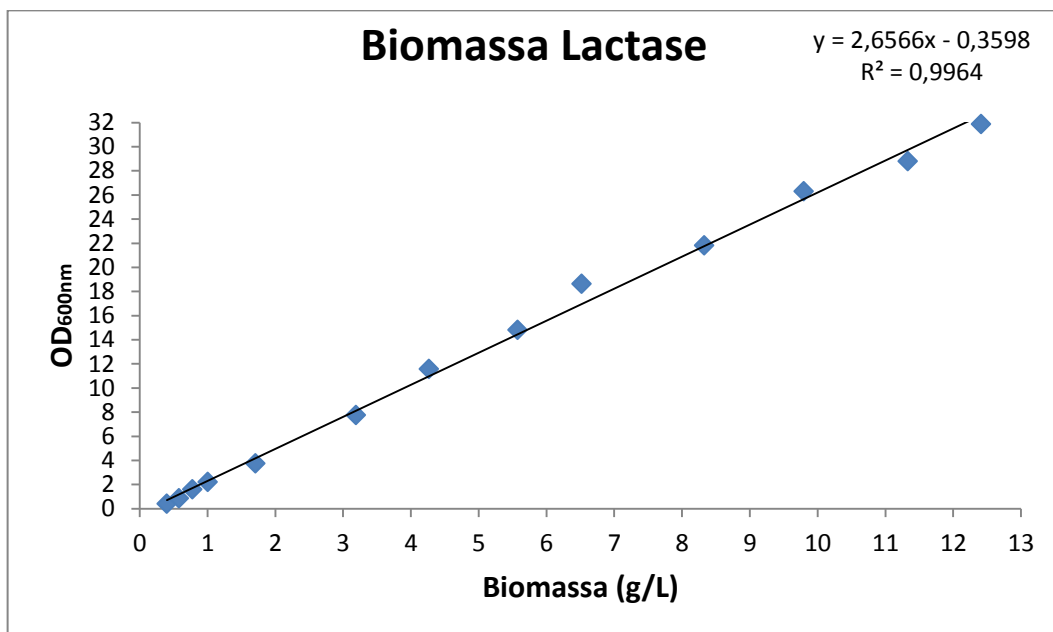
5.1. Ensaio fermentativos

Foram realizadas dez fermentações, que apresentaram parâmetros iguais de pH, agitação, temperatura, concentração de micro-organismo e meio de cultivo. As diferenças entre os cultivos foram exclusivamente as estratégias de alimentação e o tempo de indução. Para melhor visualização das diferenças entre as condições das dez fermentações mencionadas, é apresentado a Tabela 1.

Tabela 1: Estratégias de tempos de indução e alimentação testadas

Fermentação	Tempo de Indução	Estratégia de Alimentação
1	12 h	- DO-stat
2	24 h	- DO-stat
3	24 h	- Linear 1 - 9 %
4	24 h	- Linear 1 - 5 %
5	12 h	- Linear 1 - 5 %
6	18 h	- Linear 1 - 5 %
7	18 h	- DO-stat
8	18 h	- Linear 1 - 4 %
9	12 h	- Linear 1 - 3 %
10	18 h	- Linear 1 - 3 %

Com os dados das medições de OD_{600nm} e peso seco, foi possível estabelecer uma correlação entre a OD_{600nm} e a biomassa. A Figura 5, a seguir apresenta esta relação.

Figura 5: Relação entre OD_{600nm} e Biomassa

Conforme consta na Figura 5, a equação obtida foi:

$$y = 2,6566x - 0,3598$$

onde y é a densidade óptica obtida e x a biomassa (g/L). Esta relação foi utilizada em todos os experimentos.

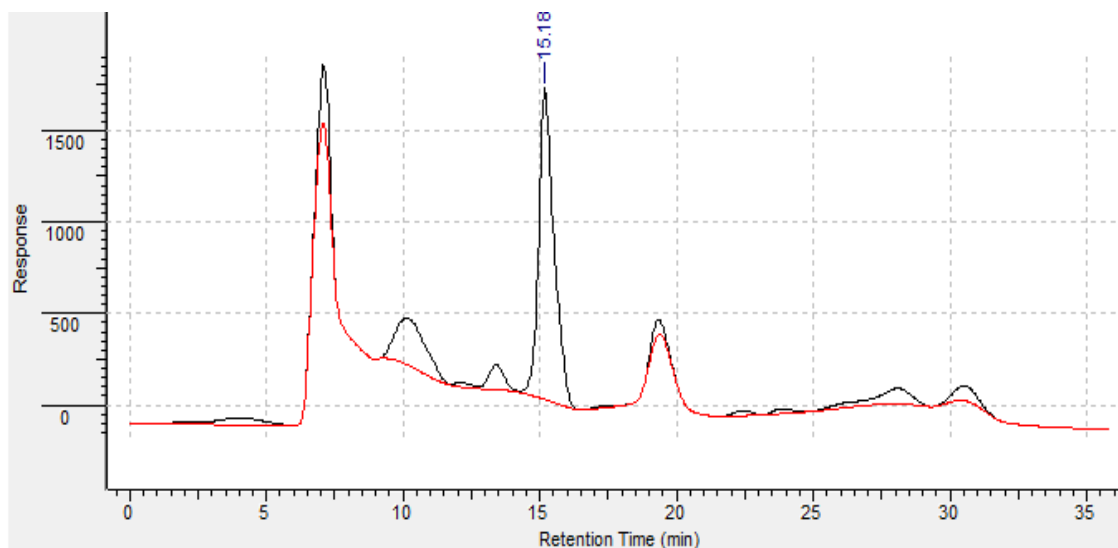
5.2. Quantificação de Acetato

O acetato foi quantificado de acordo com a curva de calibração e as análises de validação do método, apresentados a seguir.

5.2.1. Curva de Calibração e Validação do Método

Para exemplificação, é apresentado a Figura 6, que demonstra o cromatograma obtido do ponto padrão 20,0 g/L de acetato. As Figuras 9, 10, 11 e 12 apresentam os cromatogramas dos demais pontos da curva de calibração e encontram-se no APÊNDICE - A.

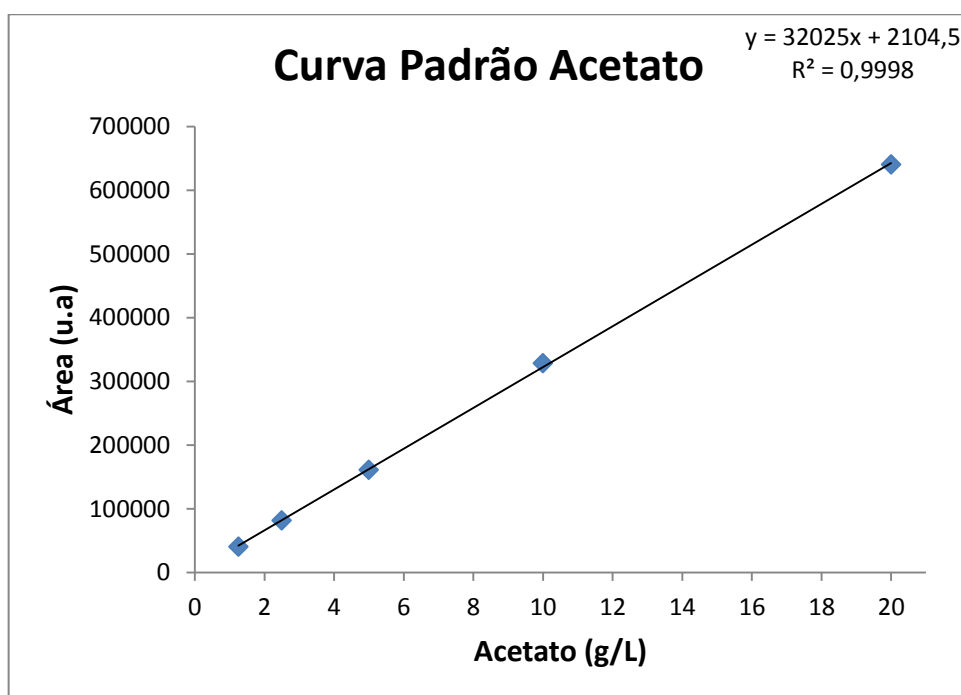
Figura 6: Cromatograma referente ao ponto de 20,0 g/L de acetato da curva de calibração



Nota-se que o acetato coelui com outros constituintes da matriz (LB). Deste modo, foi preciso empregar eventos de integração, para selecionar somente a porção do pico referente ao acetato. O método empregado pelo software utilizado permite que seja identificado o pico de interesse, que no caso é o pico que elui em 15,18 min. Com isto, o ajuste da linha de base é feito de forma automática, sem interferência do operador.

Foi construída a curva padrão para a quantificação, como mostra a Figura 7.

Figura 7: Curva padrão de quantificação de acetato



A equação da reta obtida, como apresenta a Figura 7 foi:

$$y = 32025x - 2104,5$$

A curva apresentou uma linearidade (R^2) de 0,9998.

Para os cálculos da precisão intra-ensaio e exatidão da metodologia, foram selecionados os pontos de concentrações 1,25 g/L, 5,00 g/L e 20,0 g/L. Cada ponto foi analisado 5 vezes. A Tabela 2 a seguir apresenta o resultado das análises.

Tabela 2: Precisão intra-ensaio e Exatidão da metodologia proposta

Ponto 1,25 g/L		Ponto 5,00 g/L		Ponto 20,0 g/L	
Áreas	Acetato g/L	Áreas	Acetato g/L	Áreas	Acetato g/L
40545,08	1,20	162586,23	5,01	642730,40	20,0
45054,12	1,34	162541,04	5,01	645636,96	20,1
43065,08	1,28	158130,07	4,87	647336,32	20,1
38786,69	1,15	159294,66	4,91	633076,28	19,7
38391,62	1,13	155673,58	4,80	654909,00	20,4
Média	1,22		4,92		20,1
Desvio Padrão	0,0890		0,0927		0,247
Precisão (%)	7,29		1,88		1,23
Exatidão (%)	97,6		98,4		100

Os Limites de Detecção e Quantificação foram determinados medindo-se os ruídos da linha de base de 5 curvas da solução de acetato 5,00 g/L. O LD foi determinado como sendo 3 vezes o sinal do ruído da linha de base, bem como o Limite de Quantificação foi determinado como sendo 10 vezes este ruído. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 3, a seguir:

Tabela 3: Limites de Detecção e Quantificação

Sinal do Pico de Acetato (mV)	385
Sinal do Ruído (mV)	0,121
Limite de Detecção (g/L)	0,00473
Limite de Quantificação (g/L)	0,0158

5.2.2. Quantificação de Acetato dos Cultivos em Biorreator

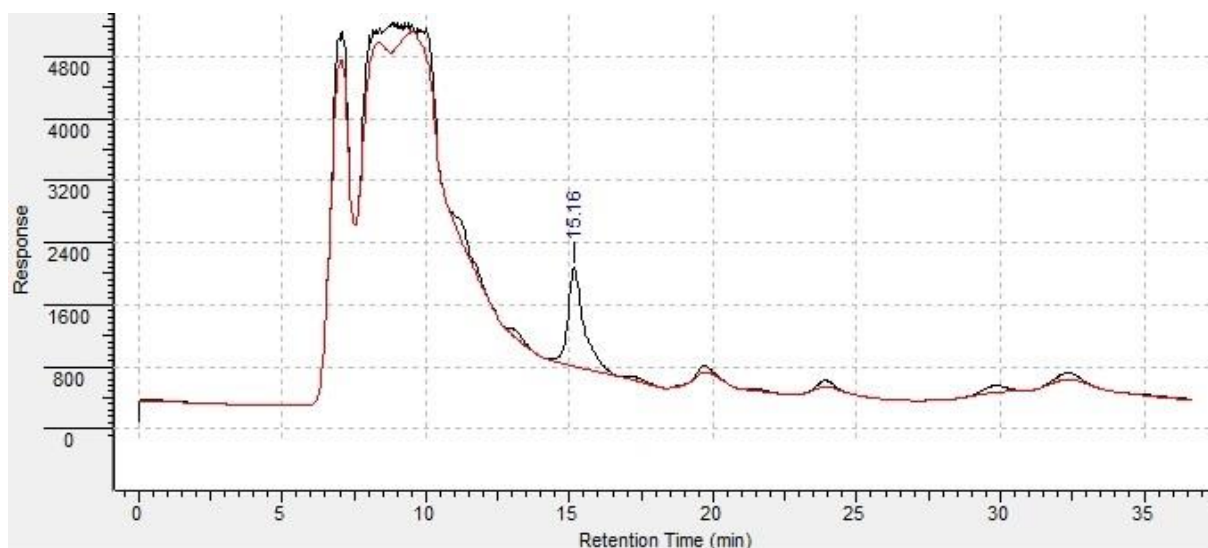
Tendo todas as exigências analíticas atendidas, procederam-se as quantificações de acetato dos cultivos. As amostras analisadas foram coletadas nos tempos de 4 h, 8 h, 16 h, 20 h, 24 h e 30 h da fermentação, como mostra a Tabela 4, a seguir.

Tabela 4: Quantificação de acetato das fermentações

	4 h	8 h	16 h	20 h	24 h	30 h
Acetato F1 (g/L)	1,78	< 1,25	< 1,25	< 1,25	< 1,25	< 1,25
Acetato F2 (g/L)	1,31	< 1,25	< 1,25	< 1,25	< 1,25	1,53
Acetato F3 (g/L)	1,70	< 1,25	3,26	10,57	14,22	14,69
Acetato F4 (g/L)	1,99	< 1,25	< 1,25	6,82	9,81	< 1,25
Acetato F5 (g/L)	< 1,25	2,93	3,18	6,79	3,10	19,5
Acetato F6 (g/L)	1,46	< 1,25	< 1,25	3,50	5,17	7,04
Acetato F7 (g/L)	< 1,25	< 1,25	1,76	2,74	2,84	2,31
Acetato F8 (g/L)	< 1,25	< 1,25	4,56	4,24	4,93	2,43
Acetato F9 (g/L)	< 1,25	2,00	4,86	7,38	1,57	17,13
Acetato F10 (g/L)	< 1,25	< 1,25	2,17	< 1,25	5,24	2,29

Para ilustrar os resultados acima descritos, a Figura 8 apresenta a quantificação de acetato da F3, com 30 h de cultivo. As Figuras 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam os cromatogramas dos demais pontos analisados do mesmo cultivo e encontram-se no APÊNDICE - B.

Figura 8: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 30 h de cultivo



É importante destacar que os mesmos eventos de integração utilizados para a curva padrão foram empregados nas quantificações dos cultivos e que a matriz utilizada para a curva padrão, LB, é a mesma matriz apresentada nos cromatogramas analisados das fermentações. Deste modo, a coeluição do pico de acetato com os outros constituintes da matriz manteve o mesmo perfil.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para todas as exigências analíticas foram satisfatórios, apesar da dificuldade de separação do acetato com os outros constituintes da matriz. Tendo em vista essa dificuldade, foram testados diferentes fluxos e concentrações da fase móvel. O fluxo original da metodologia, à temperatura ambiente, apresentou um pior resultado quando testado frente a fluxos menores. Diminuindo o fluxo para 0,6 mL/min, melhorou a resposta em comparação ao fluxo 0,8 mL/min. Foi testado, ainda, a redução para 0,2 mL/min. Porém este fluxo apresentou o mesmo resultado do anterior, de modo que o fluxo 0,6 mL/min foi escolhido em função do tempo de análise ser menor em comparação a utilização do fluxo 0,2 mL/min. As mesmas dificuldades foram encontradas alterando as concentrações da fase móvel, de modo que manteve-se, portanto, a mesma concentração prevista no guia da coluna.

O volume de amostra injetado precisou ser alterado em função da indisponibilidade de injeção de 20 μL , como consta nas condições padrões de operação. A empresa possui volumes de injeção de 10 μL e de 100 μL . Ambos volumes foram testados, de modo que a injeção de 10 μL de amostra mostrou-se insuficiente, sendo necessário a utilização de 100 μL de amostra injetada. É importante ressaltar que não foi possível a troca da coluna nem do detector, devido

ao sistema Äkta possuir somente detector UV e as demais colunas disponíveis serem para purificação de proteínas, não servindo para quantificação de metabólitos.

Mesmo com as dificuldades impostas, foi possível desenvolver uma metodologia capaz de satisfazer a necessidade da empresa de quantificar o acetato e, assim, potencializar seus estudos visando uma melhor produção da enzima. A linearidade da curva de calibração apresentou-se dentro dos parâmetros impostos pela normativa seguida, tendo como resultado um R^2 de 0,9998. A precisão não deveria ser superior a 15%, para mais ou para menos. O ponto da curva que teve o maior desvio foi o de 1,25 g/L, com desvio de 7,29%. Os experimentos foram realizados com mais replicatas do que a normativa exigia. Era exigido 3 concentrações diferentes e as análises de cada ponto feitas em triplicata. Para garantir a eficácia do método, foram realizadas 5 réplicas de cada ponto e o valor ficou dentro do aceitável. O mesmo ocorreu para a exatidão, que também teve seu limite de desvio estabelecido em 15%. O menor ponto da curva também apresentou o maior desvio, com exatidão de 97,6 %, ou seja, um desvio de 2,4 %.

As concentrações utilizadas ficaram dentro dos limites de detecção e quantificação calculados. Analisando estes limites, seria possível, inclusive, determinar menores concentrações de acetato. Porém, o maior interesse da empresa é a quantificação precisa e exata de concentrações acima de 5 g/L, que é quando o acetato atinge concentrações inibitórias. Observando as análises realizadas nos pontos de 5,00 g/L e 20,0 g/L, a precisão e exatidão mostraram-se satisfatórias. Os dados obtidos nos testes de validação da metodologia demonstram que, mesmo com as condições limitantes de equipamento e software de análise, é possível obter dados confiáveis de quantificação de acetato e analisar qual a melhor estratégia de alimentação dos cultivos.

Com a validação realizada, as quantificações de acetato das fermentações foram essenciais para estabelecer a melhor condição de operação no biorreator, otimizando a produção de *E. coli*. Para se estabelecer a melhor condição de cultivo, é necessário analisar aquela em que as concentrações de acetato se mantenham abaixo da concentração mínima inibitória (5 g/L) e que a biomassa obtida seja satisfatória. Para facilitar o estudo da melhor condição, foram construídas as Figuras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 e 27 que correlacionam a biomassa obtida e o acetato quantificado em função do tempo de cultivo das fermentações 1 a 10, respectivamente. As Figuras podem ser observadas no APÊNDICE - C.

Comparando os resultados obtidos e analisando os gráficos anteriormente descritos, nota-se que a F1 obteve baixas concentrações de acetato, de forma que este componente não interferiu no andamento do cultivo. Porém, a F1 apresentou a menor quantidade de biomassa,

se comparada às outras fermentações. A F2 foi planejada com a estratégia de alimentação igual a F1, tendo como única diferença o tempo da indução com IPTG. Nota-se que esta simples mudança acarretou em aumento de biomassa, sendo que o acetato manteve-se nos limites aceitáveis. Na F3, foi estabelecida uma nova estratégia de alimentação, mantendo o tempo de indução em 24 h. É observado um aumento considerável de biomassa do cultivo, porém as concentrações de acetato também cresceram de maneira expressiva, tornando-se tóxico para as células e impedindo uma biomassa ainda maior.

Visando um aperfeiçoamento da estratégia anterior, na F4 manteve-se a condição de alimentação linear, porém com uma menor inclinação da reta. Esta fermentação apresentou um resultado satisfatório de biomassa e manteve o acetato em concentrações mais baixas que a anterior. Em alguns pontos, o acetato atingiu concentrações superiores a 5 g/L, porém seu valor foi reduzido nas medições posteriores, indicando um consumo de acetato pela célula.

Nas fermentações F5 e F6 foram testados tempos de indução diferentes, sendo que a indução com 18 h apresentou uma boa quantidade de biomassa e manteve o acetato em baixas concentrações, de forma que só atingiu concentrações inibitórias na etapa final do cultivo. As fermentações F7 e F8 testaram as duas estratégias de alimentação: DO-stat e linear com variação de 1 a 4% da vazão total da bomba do equipamento, respectivamente. Comparando os resultados, conclui-se que a estratégia linear foi a que apresentou os melhores indicadores, pois obteve biomassa maior e menores concentrações de acetato. No cultivo F9, o tempo de indução foi reduzido para 12 h e a alimentação linear teve sua vazão da bomba de alimentação reduzida para 3%. Enquanto isso a F10 mudou apenas o tempo de indução para 18 h, se comparada com a F9. Analisando os dados destes dois cultivos, a F10 apresentou um melhor resultado.

7. ANÁLISES DE CUSTOS

Como a empresa já possui todos os equipamentos necessários tanto para a produção da enzima como para quantificação de acetato, foi necessária somente a aquisição dos reagentes e materiais descartáveis, portanto. A Tabela 5 a seguir apresenta um demonstrativo das cotações dos produtos necessários para a produção.

Tabela 5: Cotação de reagentes e materiais descartáveis

Item	Cotação
Acetato de Sódio	R\$ 318,00/kg
Ácido Fosfórico	R\$ 200,00/L
Ácido Sulfúrico	R\$ 109,00/L
Cloreto de Sódio	R\$ 20,00/kg
Cubeta de plástico	R\$ 14,90/un.
Extrato de Levedura	R\$ 300,00/500 g
Falcon	R\$ 1,00/un.
Filtro de 0,22 mm	R\$ 4,20/uni
Glicose	R\$ 150,00/kg
Hidróxido de Amônio	R\$ 400,00/L
IPTG	R\$ 428,00/g
Microtubo	R\$ 0,10/un.
Ponteiras de micropipeta	R\$ 0,15/un.
Seringa 1 mL	R\$ 0,30/un.
Seringa 60 mL	R\$ 4,50/un.
Sulfato de Canamicina	R\$ 438,00/g
Sulfato de Magnésio	R\$ 480,00/kg
Triptona	R\$ 400,00/500g

A Tabela 6 apresenta uma relação de custos por etapa do desenvolvimento da proposta apresentada.

Tabela 6: Relação de custos por etapa

Descrição	Custo
Desenvolvimento da <i>E. coli</i> recombinante	R\$ 5.000,00
Preparação do MCB	R\$ 140,00
Pré-inóculo (para 10 cultivos)	R\$ 50,00
Cultivo em biorreator (10 cultivos)	R\$ 4.000,00
Quantificação de Acetato (para 90 replicatas)	R\$ 360,00
Determinação da Biomassa	R\$ 10,00
Manutenção e Reparo de Equipamentos	R\$ 2.000,00
TOTAL	R\$ 11.560,00

Observando os custos da produção e desenvolvimento de bioprodutos, no caso a enzima lactase, nota-se a importância de se estabelecer uma metodologia capaz de produzir grandes quantidades de enzima com volume reduzido. Portanto, a importância de estabelecer uma metodologia capaz de monitorar o metabólito que mais interfere na obtenção deste resultado, que é o acetato.

8. CONCLUSÃO

A mudança de temperatura na quantificação de acetato por CLAE manteve a qualidade analítica do método, atendendo as exigências da resolução n° 899 da Anvisa. Com isso, foi possível a quantificação de acetato das fermentações pelo equipamento e coluna próprios da empresa, não sendo necessária a aquisição de um forno de coluna especificamente para esta análise, bem como um software adequado para processamento dos dados. O emprego desta metodologia com recursos próprios gerou economia para a empresa, que já opera com produtos que necessitam de um alto investimento, no caso, os cultivos em biorreator e a construção e operação com bactérias recombinantes.

A implementação desta técnica é extremamente importante para os estudos de otimização de produção de bioprodutos produzidos pela empresa. Como é possível observar nas análises de custos, produtos provenientes da biotecnologia possuem um alto valor agregado, de modo que saber o quanto de acetato o cultivo produz é uma importante diretriz para programar os novos escalonamentos da produção.

De uma maneira geral, as fermentações que expressaram os melhores valores de biomassa foram a F6, a F8 e a F10. Nota-se que nos melhores resultados de biomassa, concomitantemente as concentrações de acetato estão controladas. Os dados obtidos demonstram a importância de se determinar a quantidade de acetato produzido e o quanto este metabólito prejudica o crescimento celular.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES – CNEN, 2014. 187 p.
- ANSARI, S. A.; SATAR, R. Recombinant β -galactosidases – past, present and future: a mini review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdã, v 81, p 1-6, 2012.
- CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua Alimentada. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 2ª ed. São Paulo. Ed Edgard Blücher, 2007. Cap 10, p 205-218.
- CARVALHO, R. G.; CARNEIRO, A. V. Indicadores: Leite e Derivados. Embrapa Gado de Leite. Informações técnicas. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1355117/1528925/Indicadores++Leite+e+Derivados++Outubro+2015/5b950cc9-be92-49f7-8331-441692a422bf>>. Acesso em 30 setembro 2016.
- CHUST, R. B. Introdução à Cromatografia de Líquidos. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. Disponível em: <<http://www.spq.pt/magazines/BSPQ/563/article/3000458/pdf>>. Acesso em 01 novembro 2016.
- GUIDE TO AMINEX FOR HPLC COLUMNS. Biorad.
- LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Tib. Technology**, v. 14, p. 98-104, 1996.
- MATTAR, R.; MAZO, D. F. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v 56, n 2, p 230-236, 2010.
- PEREIRA, M. C. S. et al. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v 67, n. 389, p. 57-65, 2012.
- RESOLUÇÃO RE N° 899 DE 20 DE MAIO DE 2003: Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Brasil: Anvisa. 2003 -
- RIESENBERG, D. High-Cell-Density Cultivation of *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**. Alemanha, n. 2, p. 380-384, 1991.
- ROCHA, A. A. Imagem do leite segue positiva, mas produto sem lactose avança. **Valor Econômico**. São Paulo, 18 jun. 2015. Caderno Agronegócios.
- SANT'ANNA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A. et al. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. 2ª ed. São Paulo. Ed Edgard Blücher, 2007. Cap 14, p 351-390.
- SANTANA, L. N. S. **Imobilização e estabilização de β -galactosidase por ligações multipontuais em duolite A568**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de b-galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 24, n 4, p 567-572, 2004.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de Cultivos de Alta Densidade Celular de rE. coli Utilizando Glicerol como Fonte de Carbono**. 2011. 114 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

TREVISAN, A. P. **Influência de diferentes concentrações de enzimas lactase e temperaturas sobre a hidrólise da lactose em leite pasteurizado**. 2008. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2008.

WOLFE, A. J. The Acetate Switch. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. Illinois, v. 69, n. 1, p. 12-50, 2005.

APÊNDICE - A

Figura 9: Cromatograma referente ao ponto de 1,25 g/L de acetato da curva de calibração

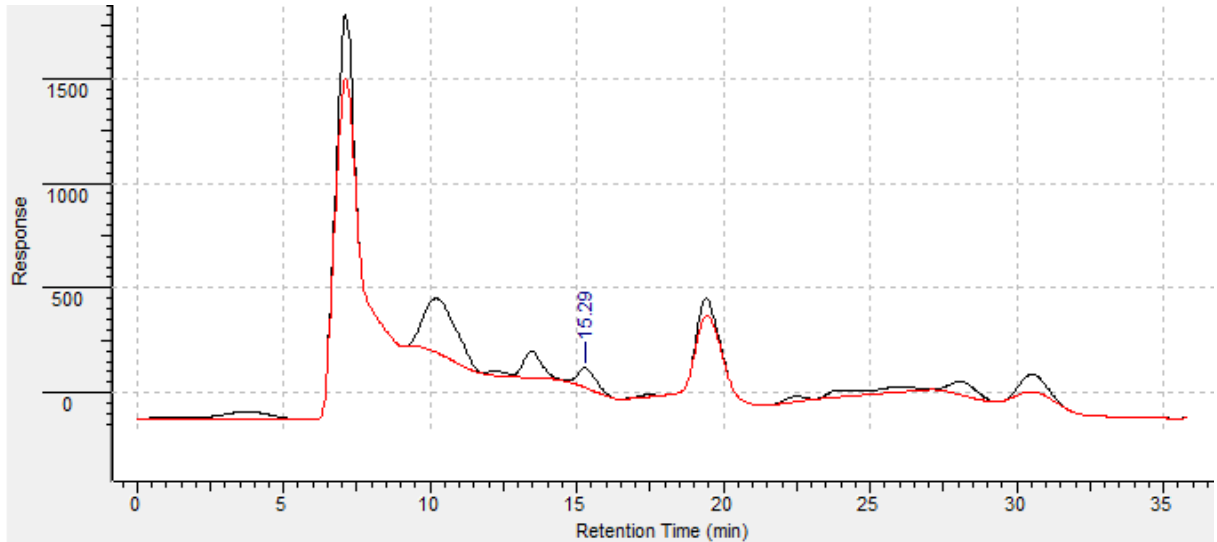


Figura 10: Cromatograma referente ao ponto de 2,50 g/L de acetato da curva de calibração

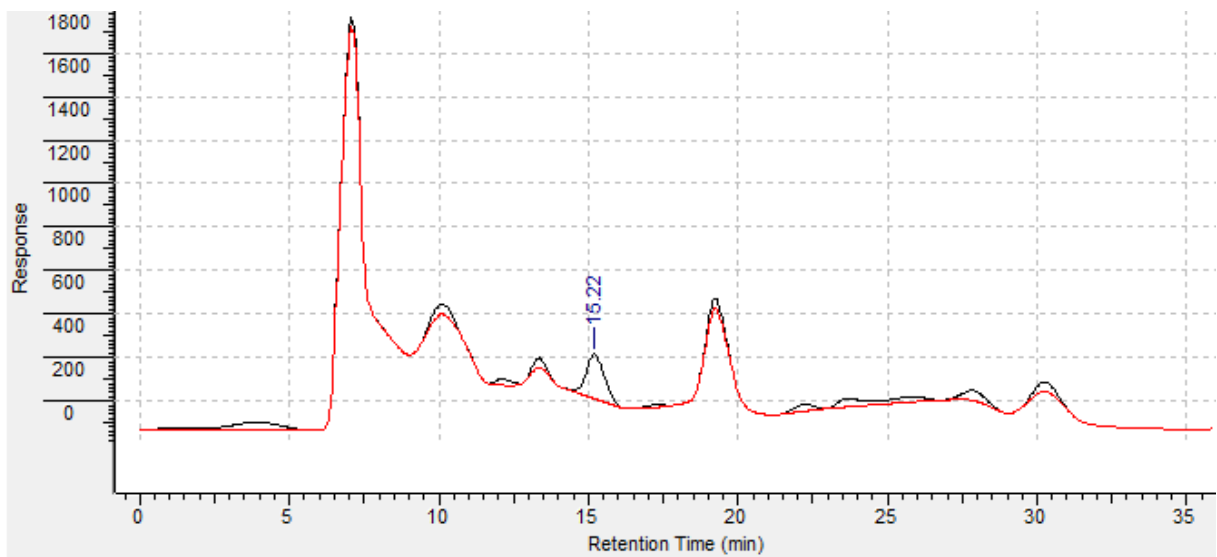


Figura 11: Cromatograma referente ao ponto de 5,00 g/L de acetato da curva de calibração

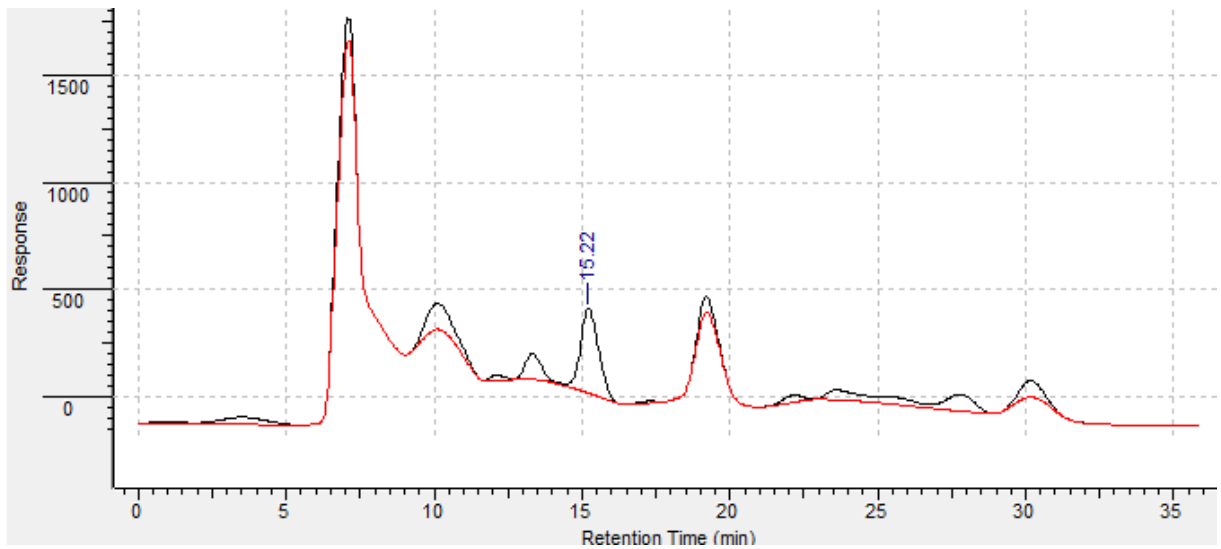
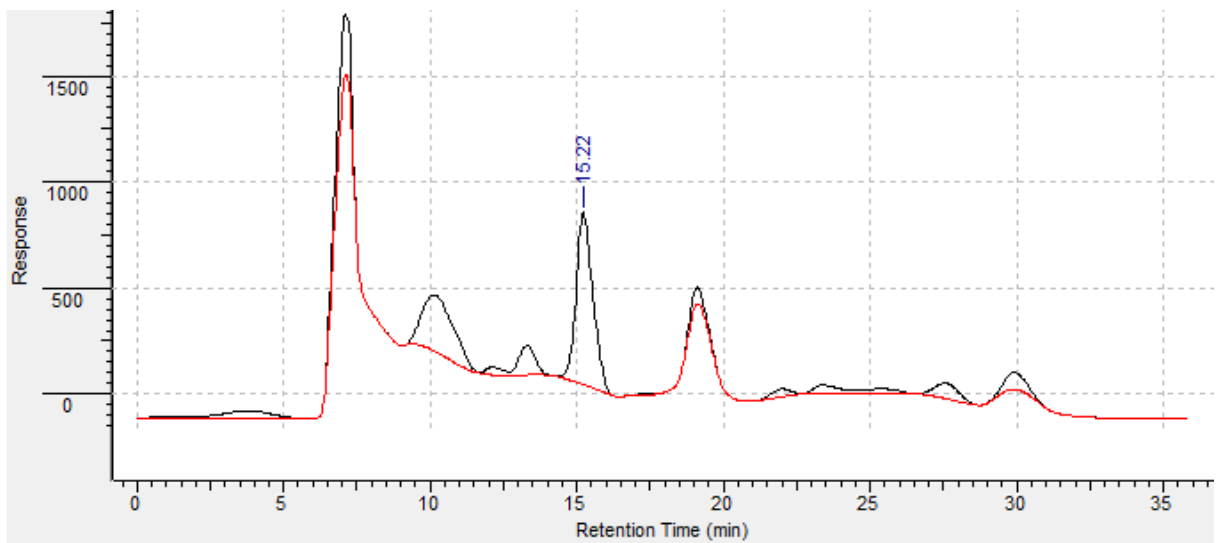


Figura 12: Cromatograma referente ao ponto de 10,0 g/L de acetato da curva de calibração



APÊNDICE – B

Figura 13: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 4 h de cultivo

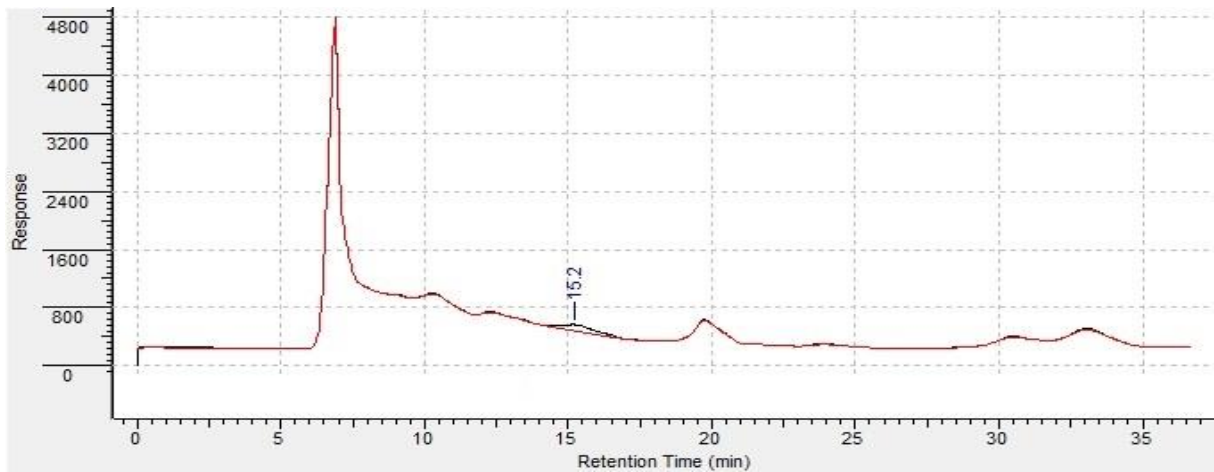


Figura 14: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 8 h de cultivo

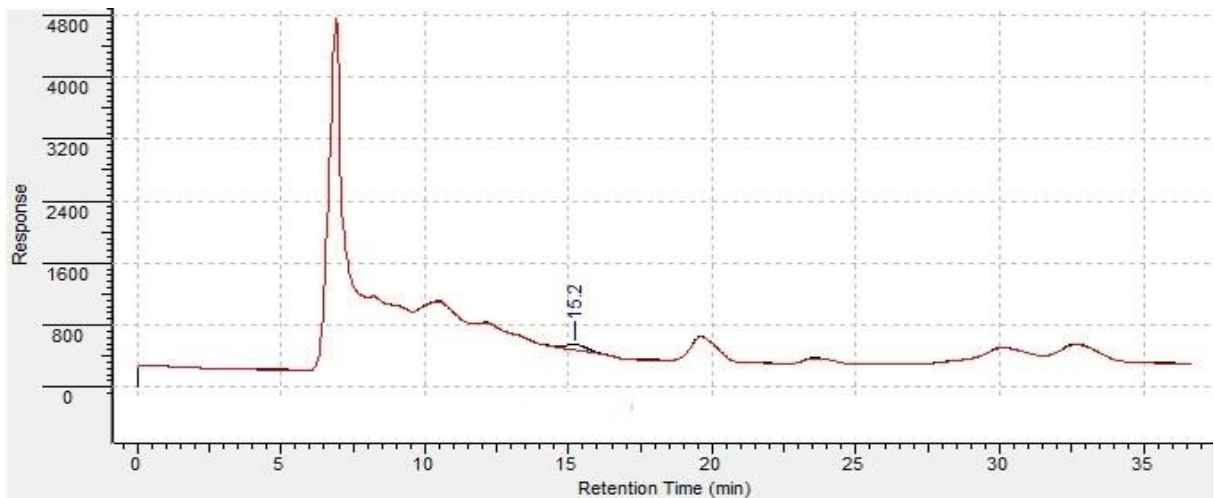


Figura 15: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 16 h de cultivo

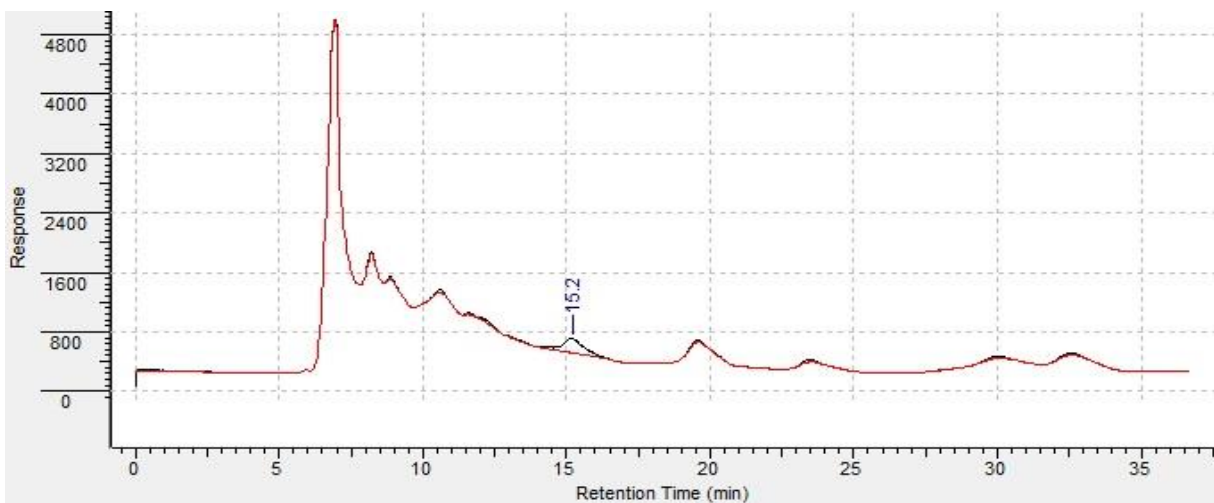


Figura 16: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 20 h de cultivo

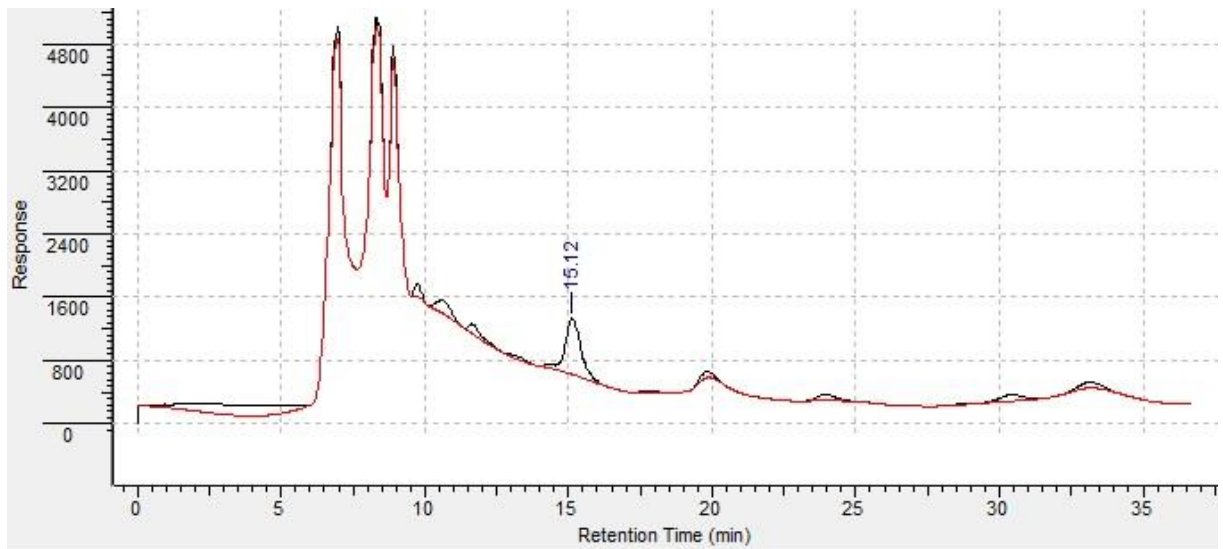
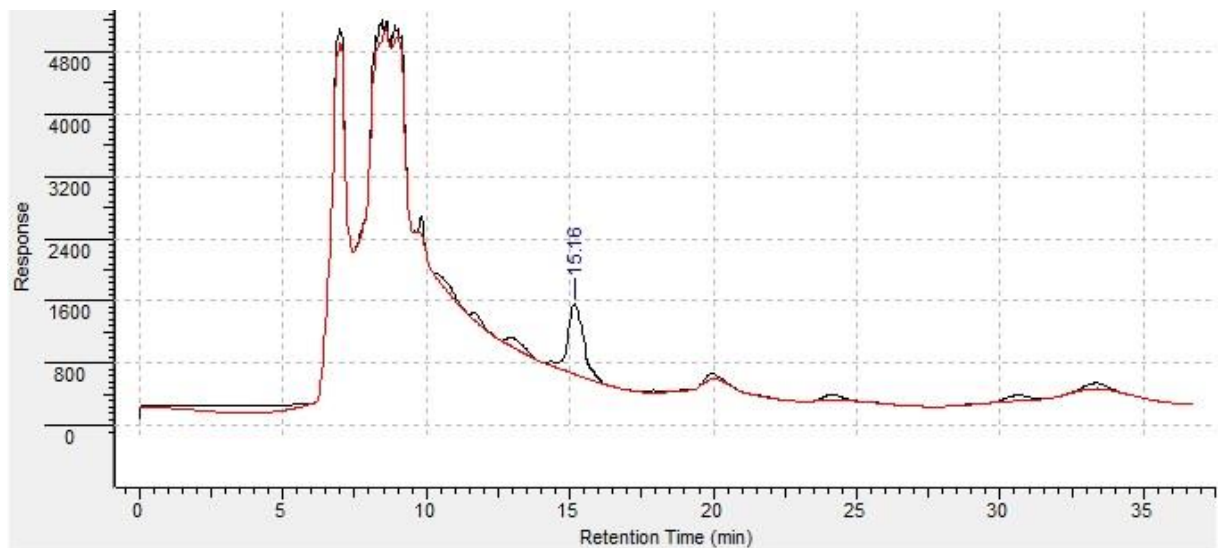


Figura 17: Cromatograma da quantificação de acetato da F3, com 24 h de cultivo



APÊNDICE – C

Figura 18: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 1

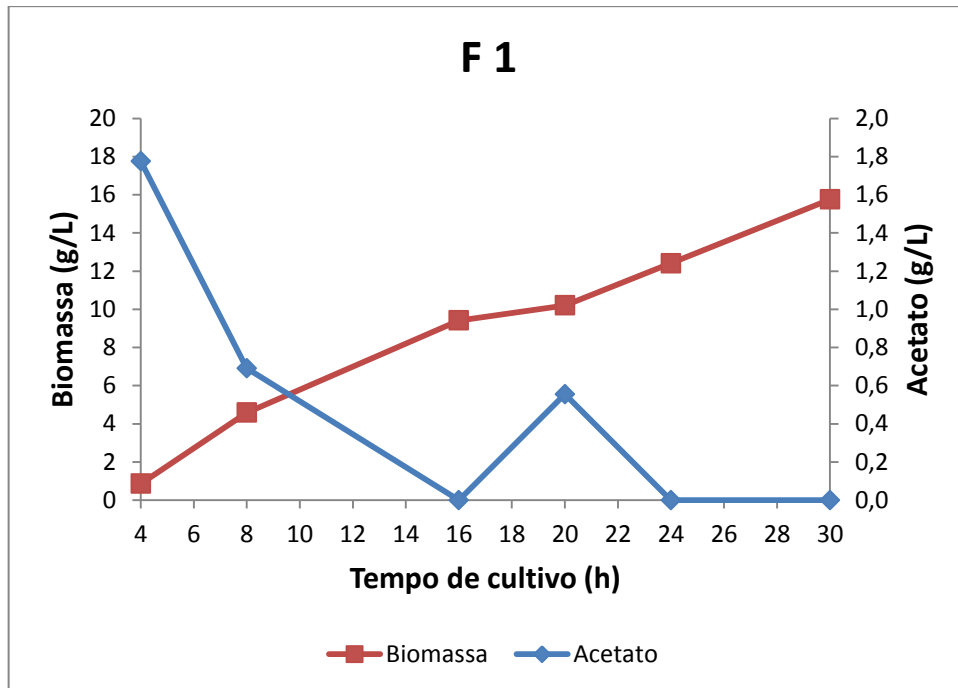


Figura 19: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 2

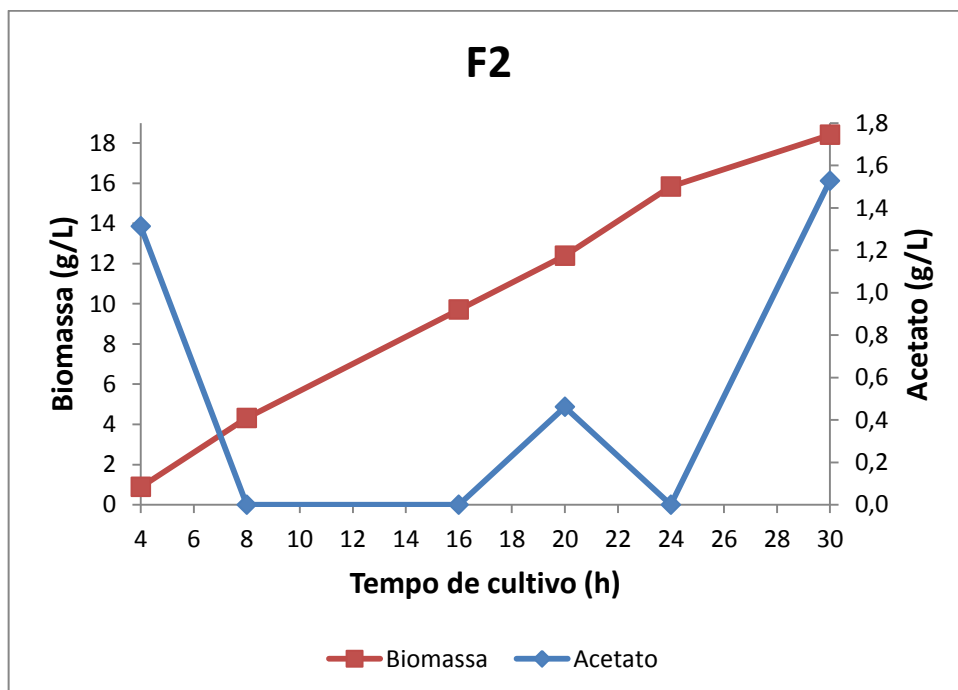


Figura 20: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 3

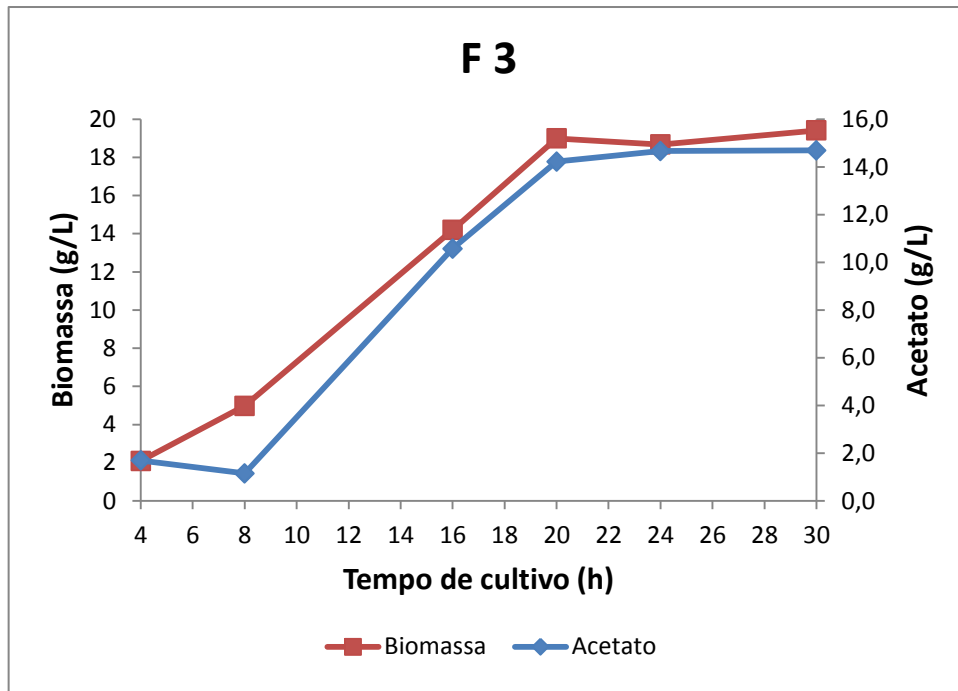


Figura 21: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 4

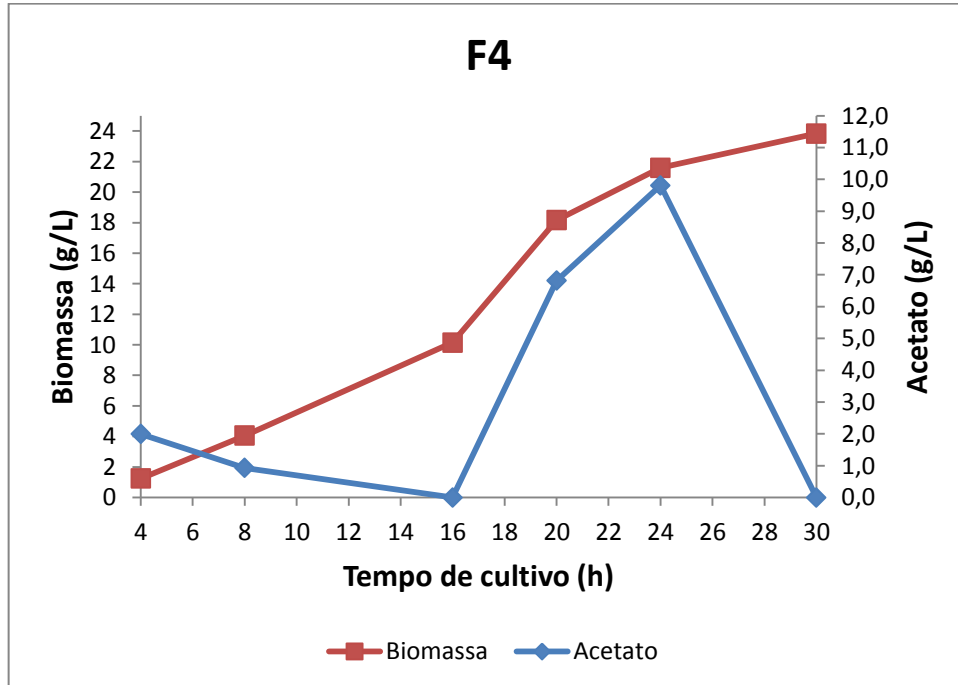


Figura 22: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 5

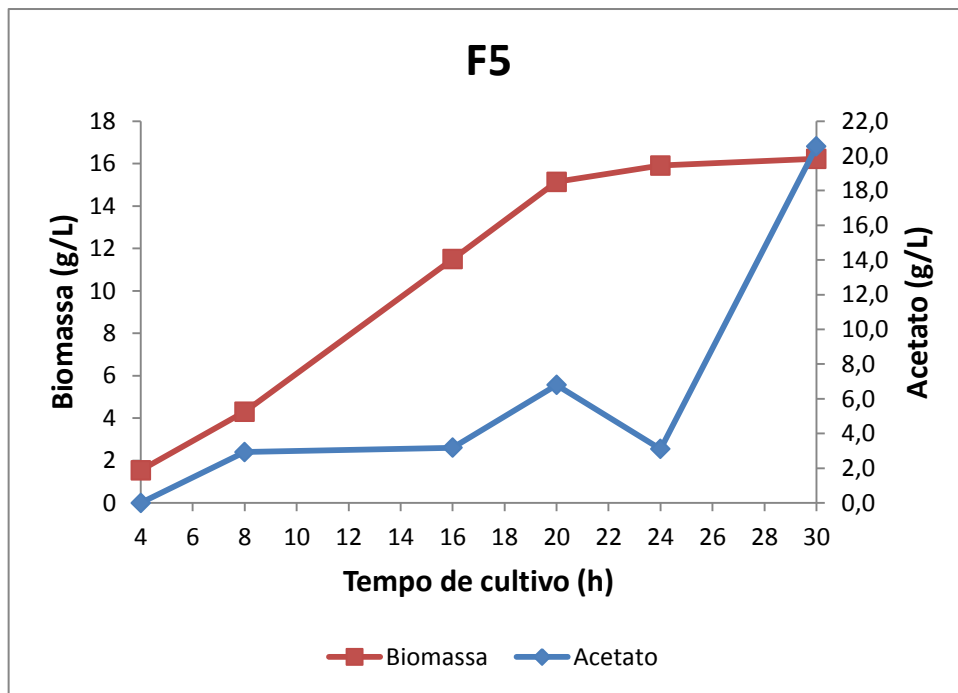


Figura 23: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 6

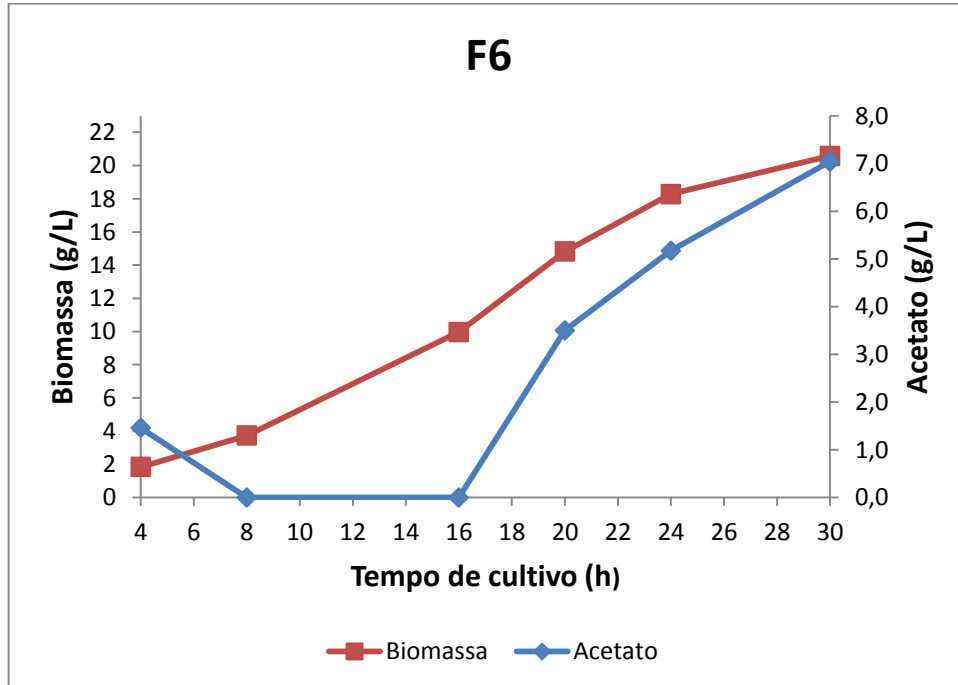


Figura 24: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 7

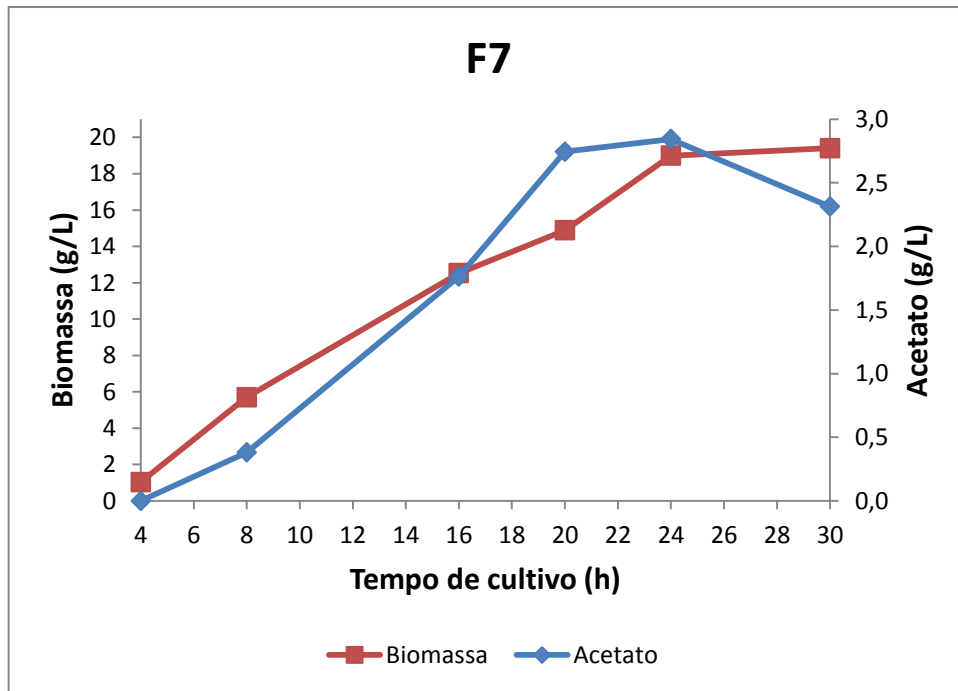


Figura 25: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 8

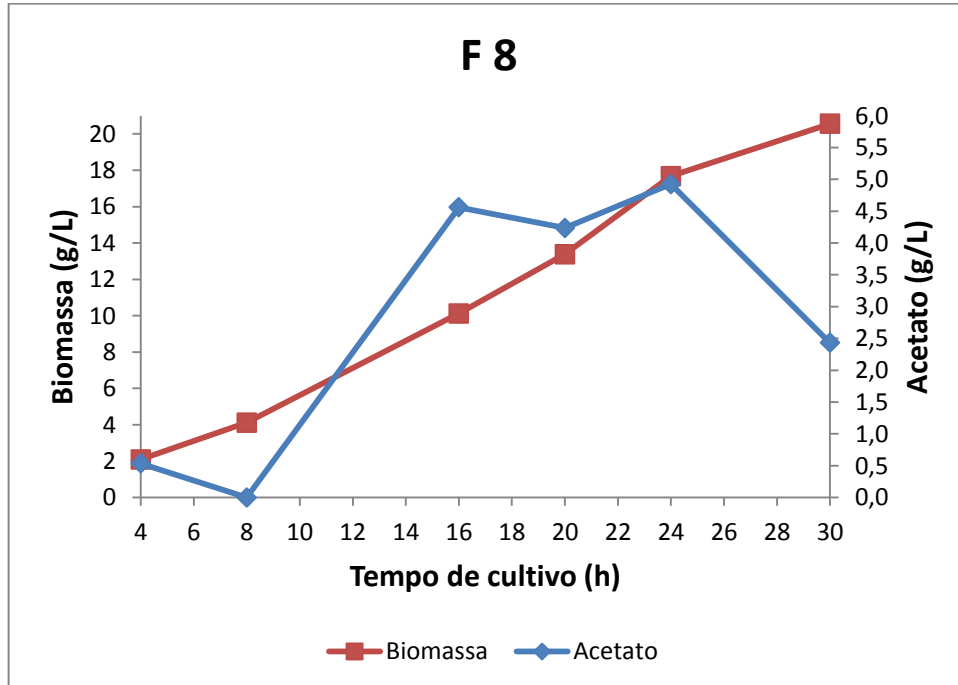


Figura 26: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 9

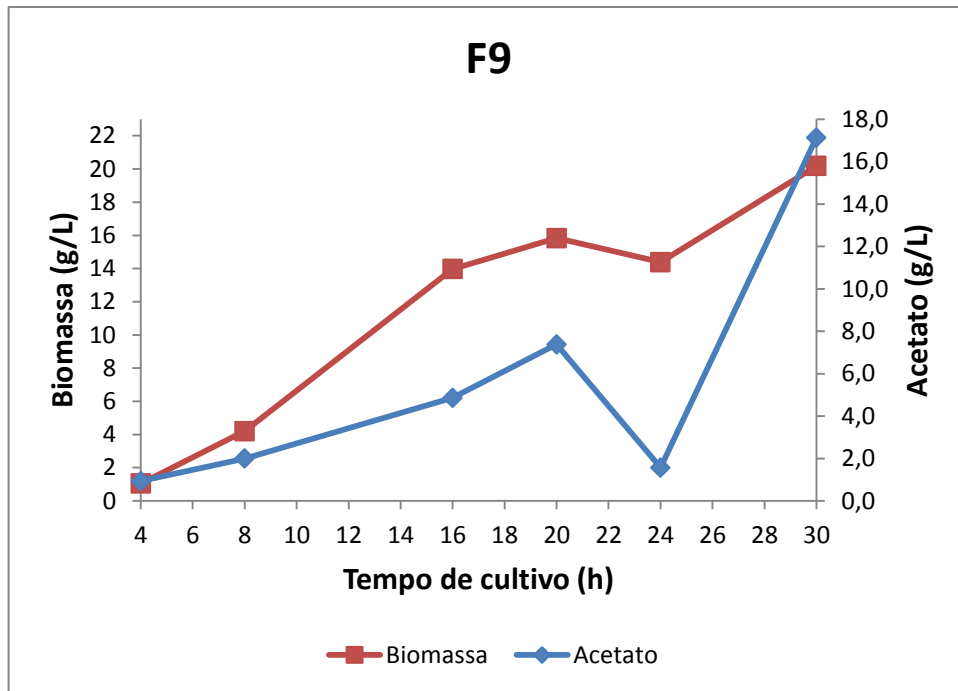


Figura 27: Biomassa e acetato em função do tempo de cultivo da fermentação 10

