

Universidade da Beira Interior



Tese de Mestrado em Química Industrial

**Influência do pH e Temperatura em sistemas de
produção da proteína recombinante, catecol-O-
metiltransferase humana**

Rodrigo Roque Silva

Covilhã 2010

Universidade da Beira Interior



**Influência do pH e Temperatura em sistemas de
produção da proteína recombinante, catecol-*O*-
metiltransferase humana**

**Dissertação apresentada à Universidade da Beira Interior, para
obtenção do grau de Mestre em Química Industrial.**

Orientadores:

Magnífico Reitor Prof. Dr. João António de Sampaio Rodrigues Queiroz (UBI)

Prof. Dr. Luís António Paulino Passarinha (UBI)

Prof. Dr. João Dias (Universidade Nova de Lisboa)

Rodrigo Roque Silva

Covilhã 2010

Índice

Índice de figuras	iii
Índice de tabelas	vi
Resumo	ix
<i>Abstract</i>	x
Lista de Abreviaturas	xi
Agradecimentos	xiii
1. Introdução	1
1.1 Caracterização bioquímica da catecol- <i>O</i> -metiltransferase (COMT)	1
1.2 Caracterização estrutural da COMT	3
1.3 Polimorfismos genéticos	4
2. Actividade da COMT	5
2.1 Cinética e mecanismos de reacção	6
2.2 Métodos de determinação da actividade da hSCOMT	8
3. Produção de proteínas recombinantes	10
3.1 Factores que afectam a produção de proteínas recombinantes	11
3.1.1 Temperatura	15
3.1.2 pH	15
3.1.3 Agitação	16
3.2 Modelos semi-híbridos de consumo de substrato em função do pH e da Temperatura	17
3.3 Sistemas de produção da proteína hSCOMT	21
3.3.1 <i>Scale-Down / Scale-Up</i>	22
3.3.1.1 <i>Batch</i>	23
3.3.1.2 <i>Fed-Batch</i>	25
3.4 Fluxos associados à síntese de biomassa	29
4. Objectivos	34

5. Materiais e Métodos	35
5.1 Materiais	35
5.2 Expressão e Recuperação da proteína hSCOMT recombinante	35
5.3 Método de <i>Bradford</i> para determinação da concentração da proteína – COMT	36
5.4 Actividade Enzimática	36
6. Resultados e Discussão	40
6.1 Meio Complexo	41
6.1.1 Agitação	44
6.1.2 Temperatura	46
6.1.3 pH	48
6.2 Meio Semi-definido	50
6.2.1 Agitação	52
6.2.2 Temperatura	54
6.2.3 pH	56
6.3 Comparação da Performance - Meio Complexo vs Meio semi-definido	58
7. Conclusão	71
8. Referências	73

Índice de Figuras

Figura 1- *O* – metilação da dopamina catalisada pela COMT (Adaptado de Pihlavisto e Reenilä, 2002).

Figura 2- Representação esquemática da estrutura tridimensional da COMT. Destacam – se o co – substrato S – adenosil – metionina (SAM) o inibidor 3,5 dinitrocatecol (3,5 DNC), o íão magnésio e a molécula de água (Adaptado de Bonifácio *et al.*, 2009).

Figura 3- Vista esquemática do sítio catalítico da COMT, representando os aminoácidos necessários (caixas rectangulares), o íão Mg^{2+} e a molécula de água, com AdoMet e o substrato catecólico (Adaptado de Mannisto e Kaakkola, 1999).

Figura 4- *O*-metilação típica de um substrato catecólico, catalisada pela enzima COMT (Adaptado de Lundstrom *et al.*, 1995).

Figura 5- Etapas do desenvolvimento de um modelo matemático genérico em bioprocessos (Adaptado de Vanrolleghem e Dochain, 1998) .

Figura 6- Curva de crescimento típica da *E. coli* em modo de operação *batch* (Adaptado de Carnes A., 2005).

Figura 7- Curva de crescimento típica da *E. coli* em modo de operação *Fed- batch* (Adaptado de Carnes A., 2005).

Figura 8- Metabolismo da glucose e do acetato na *E. coli* (Adaptado de Carlson e Srienc, 2004 e de Phue *et al.*, 2005).

Figura 9- Representação esquemática da capacidade oxidativa limitada da *E. coli* (Adaptado de Cannizzaro *et al.*, 2004).

Figura 10– Curva de calibração BSA com Tampão BIAL.

Figura 11 – Curva de calibração da metanefrina.

Figura12– Curva de calibração do Glicerol.

Figura 13– Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio SOB, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 14– Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio SOB, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 15– Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 16- Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 17- Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 18- Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 19- Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 20- Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 21- Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 22- Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio semi-definido, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 23- Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 24- Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 25- Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 26- Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 27- Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 28- Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína).

Figura 29- Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB, testadas a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 225 rpm.

Figura 30- Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, testadas a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 225 rpm.

Figura 31- Cromatograma típico, obtido para a quantificação de glicerol na fermentação, realizada a 30°C, a pH 6,5 e 225rpm.

Figura 32 – A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB; **B:** Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido. Ambos testados a 40°C, a pH inicial de 5 e 8 e com agitação de 150 e 300 rpm.

Figura 33- A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. **B:** Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, ambos testados a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 9 e 351rpm.

Figura 34 – A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. **B:** Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, ambos testadas a 13,2°C e 46,8°C, pH inicial de 6,5 e com agitação de 225rpm.

Figura 35- A e B: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. **C:** Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, testadas a 30°C, a pH inicial de 3,97 e 9,0 e 225rpm.

Figura 36- Cromatograma típico, obtido para a quantificação de glicerol, na fermentação realizada a 30°C, a pH 3,97 e 225rpm.

Índice de tabelas

Tabela 1– Afinidades da proteína SCOMT e MBCOMT, para vários substratos, em diferentes matrizes (Adaptado de Bonifácio *et al.*, 2007).

Tabela 2– Métodos analíticos aplicados na análise da actividade da proteína COMT (Adaptado de Pihlavisto e Reenila, 2002).

Tabela 3– Vantagens, Desvantagens e aplicações de sistemas de expressão actualmente utilizados em meios de cultura (Adaptado de Yin *et al.*, 2007).

Tabela 4– Classes de modelos matemáticos (Adaptado de Bailey, 1998).

Tabela 5– Resumo das vantagens e desvantagens dos modos de operação que um bioreactor pode funcionar (Adaptado de Versyck, 2000).

Tabela 6– Composição do meio para *batch* e *fed – batch* e solução de nutrientes de alimentação (Adaptado de Passarinha *et al.*, 2009).

Tabela 7– Condições de fermentações testadas.

Tabela 8- Valores médios de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final obtidos, em meio de cultura SOB e semi-definido, para os seis ensaios realizados a 30°C, pH inicial de 6,5 e com agitação de 225rpm.

Tabela 9- Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 40°C, pH inicial de 5 e 8 e com agitação de 150 e 300 rpm.

Tabela 10- Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 30°C, pH inicial de 6,5 e 99 e 351rpm.

Tabela 11- Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 13,2°C e 46,8°C, pH inicial de 6,5 e 225rpm.

Tabela 12- Valores de actividade específica (nmol/h/mg proteína), de concentração de Biomassa [X] (g/L), produtividade volumétrica (nmol/h/mL), produtividade mássica (nmol/h/mgX), concentração de glicerol [Gl] e pH final para a hSCOMT, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 30°C, pH inicial de 3,97 e 9,0 e 225rpm.

Resumo

Nas últimas décadas, a catecol-*O*-metiltransferase tem sido produzida em diversos sistemas biológicos usando vectores de expressão, otimizados sobre várias formulações moleculares. Apesar de todos os organismos descritos na literatura, terem produzido formas funcionais da enzima, a produtividade máxima encontrada, até ao momento, foi de 1g de proteína alvo. Actualmente, a investigação reduzida, realizada na fase *upstream* do processo produção de SCOMT humana, destaca as produtividades específicas e volumétricas para vários domínios biofarmacêuticos e neurológicos. Deste modo, o principal objectivo deste trabalho foi desenvolver um modelo sustentável que descreva a produtividade e a actividade da hSCOMT baseada nas condições típicas de fermentação. Baseado num sistema de cultura de *Escherichia coli*, o presente estudo destinou-se a determinar a densidade celular máxima e a quantidade activa/ótima de proteína em erlenmeyers, proporcionando um desempenho importante para o *scale-up* do bioreactor.

Inicialmente, estudámos os meios complexo e semi-definido, devido à elevada produtividade, anteriormente encontrada, tornando o processo mais facilmente controlado devido ao uso do glicerol, como fonte de carbono principal. Foram realizados, ensaios em *batch*, variando parâmetros chave como (temperatura, pH e agitação) de acordo com o *design* factorial estabelecido para o desenvolvimento das experiências. Com base nos resultados obtidos nos ensaios *batch*, podemos concluir que, em termos de actividade específica e produtividade da proteína hSCOMT, o meio complexo reuniu melhores resultados que o meio semi-definido. No entanto, conseguimos melhorar os valores, em termos de produtividade mássica e volumétrica, no meio semi-definido, para temperaturas superiores a 30°C e pH básico. Um modelo quimiométrico será proposto para simular os dados experimentais baseados nas condições de operação *batch*, nomeadamente, pH, temperatura e velocidade de agitação.

Palavras-chave: Fermentação, hSCOMT, Temperatura, velocidade de agitação, pH.

Abstract

In the past decades, recombinant soluble catechol-*O*-methyltransferase (SCOMT) has been produced in several biological systems using expression vectors, optimized under several molecular formulations. In spite of all organisms described in the literature, produced functional forms of the enzyme, the maximum productivity achieved so far was 1g of target protein. Indeed until now, insignificant research has been conducted in the upstream stage for human SCOMT production, in order to improve specific and volumetric productivities for several biopharmaceutical and neurological domains. Therefore, the main scope of this work was to develop a suitable model that describes the hSCOMT productivity and activity performance on typical fermentation conditions. Based on an *Escherichia coli* cultivation system, the present study aims for the assay of maximal cell density and optimal active protein amounts in flasks, providing a major milestone for the bioreactor scale-up.

Initially, we focus the studies on complex and semi-defined media, due to the higher protein yields previously achieved and more easily process control using glycerol as the main carbon source. Batch tests were carried out, varying the target parameters (temperature, pH and agitation) according to a well established factorial design of experiments. Based on the results obtained we can concluded that, in batch experiments in terms of specific activity and hSCOMT yield, the complex media achieved better results than a semi-defined formulation. Nevertheless, in a semi-defined media at temperatures above 30 °C and basic pH we can improve activity results and massic or volumetric productivities. A chemometric model will be proposed to simulate the experimental data based on the batch operating conditions, namely temperature, pH and stirring rate.

Keywords: Fermentation, hSCOMT, Temperature, Stirring rate, pH.

Lista de abreviaturas

A – Adenina

Ado-Met – S-adenosil-L-metionina

Ala – Alanina

COMT – catecol-*O*-metiltransferase

cDNA – DNA complementar

CS – Citrato de sódio

DTT – ditioneitol

DP – Doença de Parkinson

E. coli – *Escherichia coli*

G – Guanina

GST – Glutathione-S-transferase

HIC – Cromatografia de Interação Hidrofóbica

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

MBCOMT – forma associada à membrana da COMT

Met – Metionina

RPC – Cromatografia de fase reversa

RNA – ácido ribonucleico

RPM – rotações por minuto

mRNA – RNA mensageiro

SA – Sulfato de Amónio

SAH – S-adenosilhomocisteína

Val - Valina

Agradecimentos

E porque tudo na vida é um processo de aprendizagem, quero manifestar uma nota de agradecimento, em primeiro lugar, aos meus orientadores, o Magnífico Reitor Prof. Doutor João Queiroz, o Prof. Doutor Luís Passarinha e o Prof. Doutor João Dias, pela orientação, motivação, disponibilidade e sobretudo encorajamento.

Um agradecimento a todos os colegas que fizeram parte da minha vida académica, e com quem partilhei tantos momentos de alegria e angústia, sentimentos característicos desta vida de estudante.

Sem os meus amigos e família, tudo isto seria completamente impossível de realizar. Sem o vosso apoio, amizade, confiança e humildade não tinha percorrido este caminho – Obrigado!

1. Introdução

A biotecnologia define-se pela manipulação de organismos vivos ou parte deles, com o objectivo de produzir bens ou serviços de utilidade, controlando parâmetros essenciais ao processo de produção e de purificação da molécula – alvo. Contudo, a obtenção de produtos biologicamente activos, manipulando diferentes condições no processo de produção, é um passo desafiante e motivador.

1.1 Caracterização Bioquímica da catecol-*O*-metiltransferase (COMT)

A enzima catecol-*O*-metiltransferase (COMT) foi descrita, caracterizada e purificada parcialmente por Axelrod e seus colaboradores no final dos anos 50, dando início a duas décadas de produção dos primeiros inibidores da COMT.

Especificamente, a proteína COMT caracteriza-se por ser uma enzima monomérica, dependente do catião magnésio, sendo responsável pela transformação de substratos catecólicos biologicamente activos ou tóxicos, através de uma *O*-metilação específica usando S-adenosil-*L*-metionina (SAM) como dador do grupo metilo (Bonifácio *et al.*, 2007). A COMT desempenha um papel importante no metabolismo de catecóis endógenos e exógenos, onde se incluem estrogénios catecólicos, catecolaminas (Figura 1) e os seus metabolitos hidroxilados, ácido ascórbico, alguns intermediários do metabolismo da melanina e ainda xenobióticos catecólicos, como os flavonóides (Lundström *et al.*, 1995). De facto, a COMT actua como uma barreira enzimática contra os efeitos tóxicos de xenobióticos no cérebro e na mucosa intestinal, permitindo de igual modo a protecção da placenta e do embrião contra compostos hidroxilados, activados no início da gravidez (Mannistö e Kaakkola, 1999). Actualmente, tem sido também sugerido um papel relevante da COMT na modulação da neurotransmissão dopaminérgica pré – frontal (Matsumoto *et al.*, 2003).

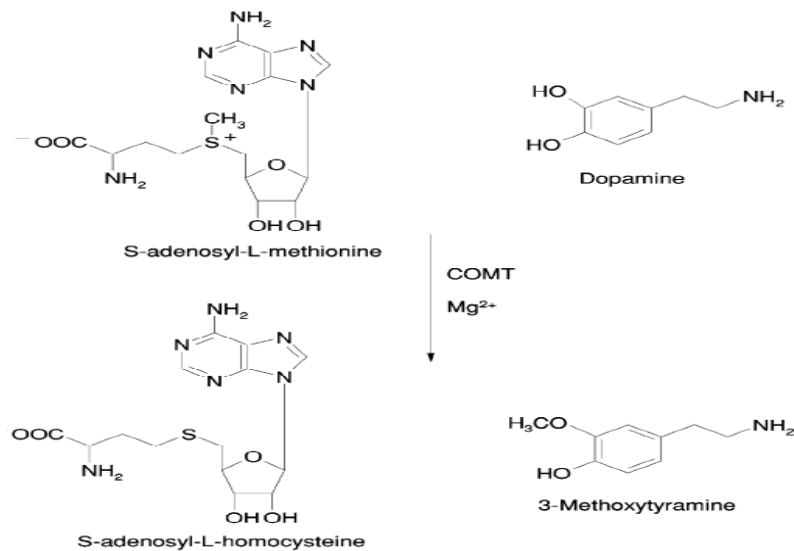


Figura 1- O – metilação da dopamina catalisada pela COMT (Adaptado de Pihlavisto e Reenilä, 2002).

Basicamente, nos mamíferos, um único gene codifica as duas formas da COMT, uma forma solúvel (SCOMT) e uma forma ancorada à membrana (MBCOMT) sendo também, encontrado e caracterizado numa grande diversidade de organismos procariontas e eucariotas, nomeadamente bactérias, leveduras, plantas, animais vertebrados e invertebrados (Bonifácio *et al.*, 2007).

Em termos de localização subcelular, a COMT solúvel humana (hSCOMT) localiza-se ao nível citosólico e nuclear, ao passo que a forma membranar se encontra associada ao retículo endoplasmático e à membrana nuclear (Lundström *et al.*, 1995). Tipicamente, a SCOMT humana (hSCOMT) e a sua homóloga em rato são constituídas por 221 resíduos a que correspondem, respectivamente, as massas moleculares de 24,4 kDa e 24,8 kDa (Tenhunen *et al.*, 1993). Curiosamente, existe uma homologia de 81% entre as duas proteínas solúveis, pertencendo ambas à família de metiltransferases dependentes do cofactor SAM (Cheng *et al.*, 2001). Adicionalmente a isoforma membranar da COMT (MBCOMT) em rato contém 43 resíduos adicionais no N – terminal, enquanto que a MBCOMT humana contém 50 resíduos adicionais, conferindo-lhes respectivamente as massas moleculares de 29,6 kDa e 30 kDa (Mannistö e Kaakkola, 1999).

Tipicamente, os níveis de expressão são elevados nas duas isoformas presentes na maioria dos tecidos, onde predomina a forma solúvel da COMT. Contudo, os níveis mais elevados foram identificados no fígado, rim e tracto intestinal, com excepção do

cérebro humano cuja isoforma maioritária é a membranar (MBCOMT) (Mannistö e Kaakkola, 1999).

1.2 Caracterização estrutural da COMT

Em 1994, a estrutura tridimensional da SCOMT de rato foi decifrada por Vidigren e seus colaboradores, utilizando um complexo formado pela enzima, o cofactor S-adenosil-L-metionina (SAM), um íão de magnésio e o inibidor competitivo 3,5 – dinitrocatecol (Vidgren *et. al* 1994). A descoberta da conformação atómica do centro activo incitou a uma vaga de novos estudos estruturais e teóricos sobre os mecanismos inibitórios da enzima. Recentemente, mais estruturas de SCOMT de rato foram descritas recorrendo à utilização de inibidores mais específicos (Bonifácio *et al.*, 2002; Lerner *et al.*, 2001) e inibidores sem a estrutura nitrocatecólica tradicional (Rutherford *et al.*, 2008 e Tsuji *et al.*, 2009).

Basicamente, a proteína da COMT é constituída por um domínio único α/β , em que as oito hélices α se dispõem em redor das folhas β na zona central (Figura 2) (Bonifácio *et al.*, 2007). O centro activo consiste num domínio de ligação do co-factor SAM (Ado-Met), e num centro catalítico, com uma estrutura côncava na superfície externa da proteína (Menisto e Kaakkola, 1999).

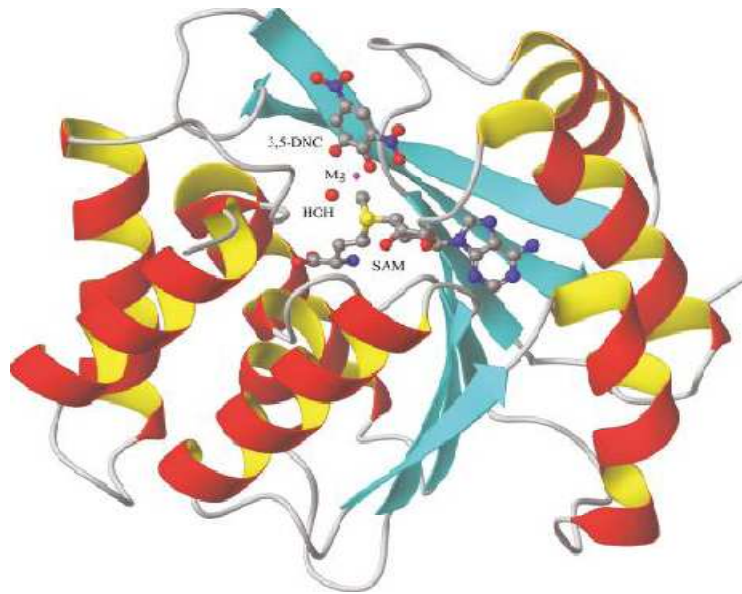


Figura 2- Representação esquemática da estrutura tridimensional da COMT. Destacam – se o co – substrato S – adenosil –L– metionina (SAM) o inibidor 3,5 dinitrocatecol (3,5 DNC), o ião magnésio e a molécula de água (Adaptado de Bonifácio *et al.*, 2009).

1.3 Polimorfismos Genéticos

Um polimorfismo da COMT, muito comum em humanos, envolve a modificação de um único nucleótido (G→A), originando a substituição do aminoácido Valina (Val) por um aminoácido Metionina (Met), na posição 108 da SCOMT e na posição 158 da MBCOMT (Lotta *et al.*, 1995). Esta substituição confere à proteína um decréscimo na estabilidade termal da variante Met, originando uma variação substancial na sua actividade enzimática, quando comparada com a variante nativa (Lachman *et al.*, 1996).

Tipicamente, identificam-se três formas da enzima com distintos níveis de actividade: uma forma termolábil de baixa actividade associada a indivíduos homozigóticos para o alelo Met, outra forma termostável de elevada actividade em indivíduos homozigóticos para o alelo Val e uma forma intermédia típica de indivíduos heterozigóticos (Manistö e Kaakkola, 1999). Curiosamente, são sugeridas associações da forma termolábil de baixa actividade, ao aumento de incidência do cancro de mama

associado a estrogénios, em mulheres homocigóticas para o alelo metionina (Goodman *et al.*, 2001; Lavigne *et al.*, 1997) e várias desordens do foro mental (p.e doença de Parkinson) (Karayiorgou *et al.*, 1997; Kirov *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2009). No entanto, nem todas as variações genotípicas de COMT podem ser atribuídas ao polimorfismo Val108Met, indicando a possibilidade de outras variantes genéticas.

A doença de Parkinson é uma desordem crónica neurodegenerativa caracterizada pela perda de neurónios dopaminérgicos associando-se níveis diminuídos de dopamina e sintomas motores característicos (tremores, bradicinésia, rigidez e instabilidade postural) (Hornykiewicz e Kish, 1987). Um dos tratamentos sintomáticos mais efectivos para a doença de Parkinson é a administração combinada de L – DOPA (levodopa) com um inibidor da descarboxilase periférica dos aminoácidos aromáticos (AADC) (Bonifati e Meco, 1999). No entanto, após administração oral, apenas 1% da dose de levodopa administrada atinge o cérebro. Esta quantidade aumenta de 5% a 10% quando combinada com o inibidor da AADC (Mannisto e Kaakkola, 1990), mas o metabolismo subsequente pela COMT limita a sua biodisponibilidade para posterior conversão em dopamina. Deste modo, a administração de inibidores da COMT como adjuvantes na terapia levodopa/inibidor da AADC inverte parcialmente esta situação e melhora os benefícios clínicos desta terapia (Baas *et al.*, 1997; Bonifácio *et al.*, 2007).

2. Actividade da Catecol-O-metiltransferase

A COMT desempenha um papel importante no metabolismo de compostos catecólicos, sendo, por isso, alvo de interesse científico e clínico. Com o objectivo de quantificar a actividade enzimática da COMT, são necessários métodos analíticos sensíveis, adequados e rápidos, que garantam a qualidade da produção de proteínas recombinantes. Destacam-se como métodos analíticos, o teste *in vitro* da eficácia de novos inibidores da COMT, a determinação de relações estrutura – actividade e a quantificação da actividade da COMT em condições fisiológicas e patofisiológicas (Pihlavisto e Reenila, 2002).

2.1 Cinética e Mecanismos de reacção

Além das semelhanças na estrutura primária das isoformas SCOMT e MBCOMT, ambas as formas da enzima apresentam afinidades semelhantes para o SAM, idêntica dependência ao catião Mg^{2+} , inibição pelo cálcio e um pH óptimo nos ensaios de actividade enzimática (Bonifácio *et al.*, 2007). No entanto, a forma associada à membrana possui uma maior afinidade para o substrato (Tabela 1) mas apresenta uma actividade catalítica menor que a forma solúvel. Por exemplo, o K_m para o substrato dopamina apresentado pela MBCOMT de cérebro humano e de rato é, respectivamente, de 3,3 μM e de 3,6 μM . Enquanto que, a SCOMT exibe um K_m de 1000 μM e 280 μM nos humanos e no rato, respectivamente. Adicionalmente, a afinidade da forma MBCOMT para catecolaminas é 10 a 100 vezes maior que a da SCOMT, facto que poderá ser explicado pela interacção entre o péptido adicional da MBCOMT e o substrato ou complementarmente por alterações conformacionais no centro activo da enzima, promovidas por interacções membranares (Bonifácio *et al.*, 2007).

Especificamente, o sítio catalítico contém vários aminoácidos relevantes no desempenho da função biológica da enzima (Figura 3). Após a ligação do substrato, um resíduo de lisina (Lys 144) posiciona-se na vizinhança de um dos grupos hidroxilo do substrato, actuando como base catalítica da reacção nucleofílica, ao aceitar o protão desse grupo. Seguidamente, ocorre a transferência do grupo metilo proveniente do cofactor AdoMet para o grupo hidroxilo ionizado. Neste processo, o ião Mg^{2+} controla a orientação do anel catecólico do substrato, ao apresentar uma coordenação octaédrica que lhe permite estabelecer ligações com dois resíduos de ácido aspártico (Asp 141 e Asp 169), um resíduo de aspargina (Asn 170), ambos os grupos hidroxilo do substrato e uma molécula de água. Adicionalmente, dois resíduos de triptofano (Trp 38 e Trp 143) e um resíduo de prolina (Pro 174) apresentam-se como os “guardiões” hidrofóbicos do sítio catalítico, mantendo o anel catecólico planar na posição correcta, definindo assim a selectividade da COMT face ao substrato (Mannisto e Kaakkola, 1999).

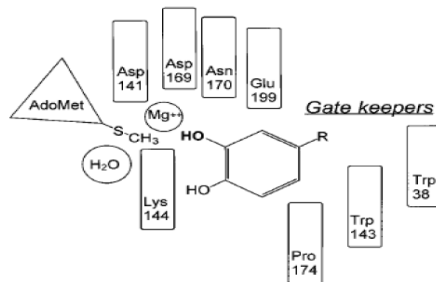


Figura 3- Vista esquemática do sítio catalítico da COMT, representando os aminoácidos necessários (caixas retangulares), o íon Mg^{2+} e a molécula de água, com AdoMet e o substrato catecólico (Adaptado de Mannisto e Kaakkola, 1999).

Tabela 1– Afinidades da proteína SCOMT e hSCOMT, para vários substratos, em diferentes matrizes (Adaptado de Bonifácio *et al.*, 2007).

Fonte	Substrato	SCOMT	hSCOMT	Ref.	
		K_m (μM)			
Humano	Cérebro	Dopamina	280	3,3	Jeffery and Roth, 1987
	(E. coli) Recombin.	Catecol	108	10	Malherbe <i>et al.</i> , 1992
		Epinefrina		215 – 337	Passarinha <i>et al.</i> , 2008
	(Células Sf9) Recombin.	Dopamina	207*	15*	Lotta <i>et al.</i> , 1995
		Norepinefrina	369*	24*	Lotta <i>et al.</i> , 1995
		DBA	39*	30*	Lotta <i>et al.</i> , 1995
		Levodopa	613*	266*	Lotta <i>et al.</i> , 1995
Rato	Fígado e cérebro	Epinefrina	168 - 345	0,9 – 3	Bonifácio <i>et al.</i> , 2000
	Fígado, Cérebro e rim	Norepinefrina	304 - 464	5,5 – 11,4	Masuda <i>et al.</i> , 2003
Porco	Cérebro	R - Salsolinol	156	43	Hotzl and Thomas 1997
Coelho	Aorta	2 – Hidroxiestradiol	0,27	0,15	Reid <i>et al.</i> , 1986
		Isoproterenol	121	0,91	

* Valores obtidos para metilação específica na posição meta.

Genericamente, a transferência do grupo metilo para um dos grupos hidroxilo do substrato catecólico, catalisada pela COMT, ocorre através de um ataque nucleofílico directo (tipo SN_2) do grupo hidroxilo do catecol ao carbono do grupo metilo do cofactor AdoMet (Manisto e Kaakkola, 1999). Esta reacção de *O*-metilação catecólica (Figura 4) apresenta uma regioselectividade específica, sendo que, na reacção *in vitro* a razão entre os produtos 3 e 4 -*O*-metilados vai depender do pH da reacção e da natureza do substrato (Bonifati and Meco, 1999).

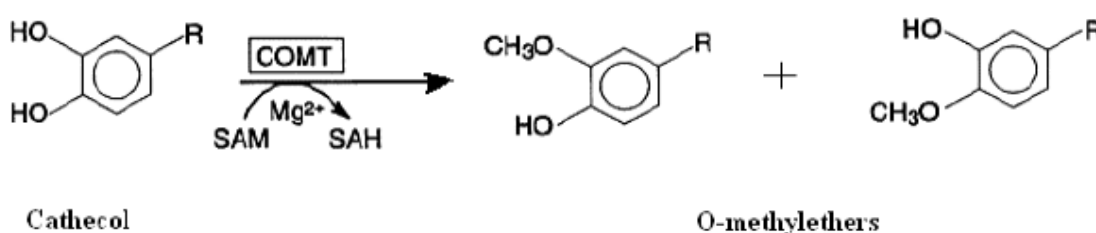


Figura 4- *O*-metilação típica de um substrato catecólico, catalisada pela enzima COMT (Adaptado de Lundstrom *et al.*, 1995).

Inicialmente foram propostos três modelos para o mecanismo cinético da COMT: equilíbrio rápido, ordem aleatória e o mecanismo de ping – pong (Bonifati e Meco, 1999). No entanto, a resolução da estrutura da COMT por difracção de raio – X e posteriores estudos cinéticos permitiram estabelecer um mecanismo sequencial e ordenado para a reacção de *O* – metilação. De forma sucinta, inicialmente ocorre a ligação de SAM, seguida pelo catião Mg^{2+} e, por último, o substrato catecólico (Bonifácio *et al.*, 2007). O cofactor é o primeiro a ligar-se, uma vez que o local de ligação encontra-se num local mais profundo na proteína do que o local de ligação do Mg^{2+} e do substrato (Mannisto and Kaakkola, 1999).

2.2 Métodos de determinação da actividade da COMT

A análise da actividade enzimática da COMT deve efectuar-se de modo fíável, rápido e sensível, especialmente tendo em conta a sua descoberta como alvo

terapêutico e a revelação das formas polimórficas da proteína. Esta análise envolve geralmente a incubação da enzima, em condições específicas, seguida de separação e quantificação dos produtos *O*-metilados (Pihlavisto e Reenilä, 2002).

Tipicamente, a enzima COMT encontra-se numa forma activa em praticamente todos os tecidos, exibindo os valores mais elevados de actividade nas células do fígado, rim e placenta (Tilgmann e Kalkkinen, 1990). Deste modo, é extremamente relevante a selecção cuidadosa da fonte da enzima, a escolha do substrato mais adequado e as condições de incubação ideais. Geralmente são usados eritrócitos ou células mononucleares na determinação da actividade da proteína (Axelrod *et al.*, 1971; Sladek-Chelgren *et al.*, 1981). No entanto, estas fontes exibem um nível reduzido de actividade, sendo portanto necessário recorrer a métodos analíticos que promovam sensibilidades elevadas (Pihlavisto e Reenila 2002). Experimentalmente, a actividade da COMT *in vitro* pode ser determinada por métodos directos (Abdel – Latif, 1969; Herblin, 1973) e extracção líquido – líquido (Zaitso *et al.*, 1981; Koh *et al.*, 1991), como indicado na Tabela 2. A cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) de fase reversa (HPLC – RP) com diferentes sistemas de detecção, seleccionados de acordo com as propriedades dos substratos, são usados para analisar produtos da *O*-metilação, requerendo uma boa sensibilidade.

Tabela 2-Métodos analíticos aplicados na análise da actividade da proteína COMT (Adaptado de Pihlavisto e Reenila, 2002).

Reacção da COMT				
	Extracção Líquido - líquido	TLC e cromatografia em papel	Cromatografia Gasosa	Cromatografia Líquida
Quantificação directa de substrato e produto	Detector de Fluorescência Contagem por cintilação líquida	Detector de Fluorescência ou UV Contagem por cintilação líquida	Detector de ionização de chama Espectroscopia de Massa	Detector radioquímico Detector electroquímico Espectroscopia de Massa

Inicialmente foram implementados métodos directos que dependiam da visualização de cor na mistura reaccional (Herblin,1973) ou da determinação espectrofotométrica (Borchardt, 1974). A grande desvantagem destes métodos reside na ausência de separação entre substrato e produtos *O*-metilados. Posteriormente, foram desenvolvidos métodos que consistiam na incorporação de um passo de separação através de extracção líquido - líquido ou de cromatografia, seguido de diferentes técnicas de detecção, entre as quais se destacam a detecção por UV, fluorescência, radioquímica e electroquímica.

Tipicamente, sistemas de HPLC com colunas de fase reversa, são as técnicas de separação comum em ensaios de actividade da COMT (Tuomainen *et al.*, 1996; Zürcher *et al.*, 1996). Geralmente os detectores radioquímicos melhoram os ensaios de actividade da COMT, contudo devido ao uso de materiais radioactivos torna-se um método restrito, pois afecta a reacção de *O*-metilação (Pihlavisto e Reenila, 2002). Deste modo, a detecção electroquímica foi introduzida nos ensaios de actividade da COMT uma vez que os catecóis e grupos hidroxilo fenólicos de produtos *O*-metilados são facilmente oxidáveis (Allen *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1981). Os detectores electroquímicos (ECD) apresentam excelentes limites de detecção e aplicam-se a uma vasta gama de analitos, devido à sua grande sensibilidade e selectividade (Saxer *et al.*, 2004). Tipicamente, os ECD fornecem medições mais sensíveis e detectam valores até três ordens de magnitude menores, quando comparado com os detectores espectrofotométricos UV – visível (Toth *et al.*, 2004). Adicionalmente, os limites de detecção obtidos em sistemas HPLC – ECD, com um eléctrodo de trabalho pode diminuir com um factor 4 (Reenila *et al.*, 1995) ou 10 (Pihlavisto e Reenila, 2002), através da aplicação de um sistema coulométrico de três eléctrodos em série. Caracterizado por uma elevada eficiência (99%), as actividades da COMT podem ser detectadas, permitindo o uso de baixas concentrações de substrato em diversos tecidos (Reenila *et al.*, 1995).

3. Produção de proteínas recombinantes

O aparecimento da biologia molecular nos anos 70 tornou possível a produção de proteínas heterólogas em diferentes células hospedeiras. A tecnologia do DNA

recombinante é a base das abordagens da engenharia genética, de proteínas e metabólica, permitindo a produção de uma gama variada de péptidos e proteínas em células que naturalmente não as produziriam. Os primeiros produtos a surgirem no mercado, obtidos a partir desta tecnologia foram os farmacêuticos (por exemplo, insulina, interferões e vacina da hepatite B). Sendo a produção de proteínas recombinantes um processo chave em biotecnologia, representa uma alternativa à extracção de quantidades limitadas da proteína original que se encontra geralmente em concentrações tão baixas, que a sua extracção se torna muito dispendiosa e, muitas vezes, impossível de implementar. Além disso, a pureza da proteína obtida pode não ser suficiente para eliminar contaminações tóxicas, pirógenas ou infecciosas (Domingues *et al.*, 2003).

Geralmente, a expressão de genes em bactérias é a forma mais simples e mais económica na obtenção de elevadas quantidades de proteína para fins de investigação, clínicos ou industriais. Actualmente, a bactéria *Escherichia coli* é o microrganismo hospedeiro mais bem caracterizado da literatura. Além disso, esta bactéria pode dividir-se exponencialmente de forma a atingir elevadas densidades celulares, o que permitiu o desenvolvimento de processos fermentativos económicos, com elevado rendimento na produção de proteínas recombinantes em grande escala (Fonseca *et al.*, 2007).

3.1 Factores que afectam a produção de proteínas recombinantes

A optimização da produção de proteínas heterólogas inicia-se com a construção de uma estirpe recombinante, cujo o processo de fermentação desenvolvido tem em conta o *feedback* a partir do desenvolvimento do processo de *downstream*, à escala final de produção (Thiry *et al.*, 2002).

A produção de proteínas recombinantes é afectada por numerosos factores do processo, como o modo de operação, tempo de indução (no que diz respeito à concentração de massa celular), duração da fase de produção e a composição do meio de cultura. Contudo, parâmetros como, número de gerações, probabilidade de mutações, esterilização do meio, temperatura, pH, agitação, oxigenação e pressão são afectados pela escala do processo (Thiry *et al.*, 2002). Muitos dados na literatura relatam o

crescimento da *E. coli* em meios quimicamente definidos com fontes de carbono orgânicas, bem como em meios orgânicos de natureza complexa. No entanto, elevadas complexidades na formulação do meio podem conduzir ao decréscimo da reprodutibilidade em termos da resposta metabólica celular, reduzindo a possibilidade de controlo (Passarinha *et al.*, 2009).

Os sistemas celulares hospedeiros para a expressão de genes exógenos são geralmente procariotas ou eucariotas, cada um apresentando vantagens e desvantagens, com aplicações diversas (Tabela 3). Tipicamente, a selecção do sistema de expressão deve ser efectuada tendo em conta a produtividade e bioactividade do produto resultante, aplicação final e propriedades físico-químicas da proteína alvo. Dos vários sistemas de expressão heteróloga disponíveis, a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* tem sido o mais atractivo e utilizado. A sua capacidade de crescimento rápido e a elevada densidade em substratos de custo reduzido, são algumas das vantagens que levam à utilização generalizada deste microrganismo (Baneyx, 1999).

Tabela 3– Vantagens, desvantagens e aplicações de sistemas de expressão actualmente utilizados na biotecnologia recombinante (Adaptado de Yin *et al.*, 2007).

Hospedeiro	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
<i>E. Coli</i>	Scale – up, baixo custo, tempo reduzido, operação simples.	Solubilidade da proteína, pode requerer optimização específica da proteína.	Análise estrutural, produção de anticorpos, ensaios funcionais e interacções proteicas.
Leveduras	Processamento de proteínas eucarióticas, aplicável à fermentação, meios simples.	Obtenção de elevados rendimentos, cujas condições de crescimento podem requerer optimização	
Células de Insecto	Elevado nível de processamento, rendimentos elevados quando comparados com sistemas de mamíferos.	Condições de cultura mais exigentes.	Análise estrutural Produção de anticorpos, ensaios funcionais
Células de Mamífero	Maior nível de processamento proteico	Rendimento relativamente baixo, condições de cultura mais exigentes.	Interacções proteicas

Tipicamente, diversos produtos metabólicos secundários são formados durante o crescimento de *E. coli*, alguns deles apresentando efeitos tóxicos acentuados quando atingem determinadas concentrações no meio de cultura. O acetato é o metabolito que apresenta um dos maiores efeitos tóxicos e é produzido quando a *E. coli* é crescida em condições anaeróbias (Lee, 1996), em condições limitantes de oxigénio (Yin *et al.*, 2007), e em condições aeróbias desde que na presença de excesso de glucose (Fieschko e Ritsch, 1996). Especificamente, o acetato é produzido, quando o fluxo de carbono para a via metabólica central excede a carência biossintética e a capacidade de geração de energia da célula, saturando o ciclo tricarboxílico e/ou a cadeia de transporte de electrões (Lee, 1996). As concentrações elevadas de acetato conduzem a uma redução do crescimento celular, afectando o rendimento em termos de biomassa. Além disso, foi demonstrado que o acetato apresenta maior efeito inibitório em culturas de *E. coli*

recombinantes do que em culturas não recombinantes, e sendo a produção de produtos recombinantes significativamente afectada pela acumulação de acetato (Lee, 1996).

O efeito prejudicial de acetato deve-se ao facto, da acumulação de sais resultantes da adição de ácidos e bases utilizados para o controlo do pH. Geralmente, a formação de acetato depende, do meio de cultura utilizado e da taxa específica de crescimento (μ). Verifica-se que, em meios complexos e semi-definidos, o acetato é formado quando a taxa de crescimento específica excede os $0,20 \text{ h}^{-1}$ (Klemann e Strohl, 1994). No entanto, em meio definido, o acetato é tipicamente formado quando a taxa específica de crescimento excede os $0,14 \text{ h}^{-1}$ (Fieschko e Ritsch, 1996).

De modo geral, as alterações na composição do meio de cultura, principalmente na fonte de carbono, podem influenciar na minimização da formação de acetato. Alguns investigadores substituíram a glucose por glicerol, como fonte principal de carbono, obtendo-se concentrações celulares elevadas e reduções significativas na taxa de formação de acetato. Este comportamento pode ser explicado pela menor taxa de transporte do glicerol para o interior da célula, quando comparada à da glucose, reduzindo o fluxo de carbono para a glicólise, o que resulta numa menor taxa de formação de acetato (Korz *et al.*, 1995). Adicionalmente, a adição de determinados aminoácidos como a glicina e metionina, podem reduzir os efeitos colaterais do acetato e melhorar a expressão de proteínas recombinantes (Han *et al.*, 1993). De facto, processos para a produção de proteínas recombinantes podem ser controlados, por adaptação adequada ao ambiente celular, como o tipo e concentração de macro e micro nutrientes. No entanto, a limitação de nutrientes gera stress nas bactérias, levando ao aumento de células desprovidas de plasmídeos.

Tipicamente, a limitação de carbono, azoto, fósforo e elementos vestigiais podem ser prejudiciais à estabilidade do plasmídeo (Lima, 1993). A instabilidade plasmídica em condições nutricionais limitantes pode ocasionar uma redução do número de cópias do plasmídeo, já que é particularmente afectado pela limitação do fósforo e magnésio no meio de fermentação, no entanto limitações de glucose e amónia originam um aumento do número de cópias do plasmídeo (Lima, 1993). Geralmente, observa-se que a utilização de meio de cultura complexos, favorece a estabilização do número de cópias do plasmídeo e deste modo influencia drasticamente o rendimento da proteína alvo (Lima, 1993). Actualmente, o sistema de plasmídeos pET baseado na T7

RNA polimerase, constituído por promotores híbridos, múltiplos locais de clonagem para incorporação de diferentes organismos de fusão e locais de clivagem de proteases, é o mais usado na produção de proteínas recombinantes (Sørensen e Mortensen, 2005). Tipicamente, a estirpe BL21 da bactéria *E. coli* é bastante robusta, capaz de crescer rapidamente em meio mínimo, sem no entanto ser patogénica (Chart *et al.*, 2000 e Sørensen e Mortensen, 2005).

3.1.1 Temperatura

Uma variável importante que pode ser utilizada para o controlo do metabolismo celular é a temperatura do meio de cultura. Geralmente, a temperatura óptima para o crescimento da *E. coli* é 37°C. No entanto, com a diminuição deste valor para 30°C, reduz-se a capacidade de consumo de nutrientes, bem como a taxa específica de crescimento máxima, minimizando-se os efeitos tóxicos dos produtos metabólicos secundários, a geração de calor e a carência de oxigénio (Carnes A., 2005). Diversos processos de obtenção de proteínas recombinantes utilizam promotores activados pela temperatura. Especificamente, operando a baixas temperaturas, promove-se o aumento da produtividade específica de biomassa, evitando a formação de corpos de inclusão da proteína alvo (Wurm, 2004). Com base nestas vantagens, muitos autores foram persuadidos a realizarem as suas fermentações *fed-batch* a temperaturas mais baixas que a temperatura óptima de crescimento da *E. coli* (MacDonald e Neway, 1990; Riesenberg *et al.*, 1991; Lee e Chang, 1999; Korz *et al.*, 1995).

3.1.2 pH

A escolha do pH depende da estabilidade da expressão da proteína recombinante do microrganismo (Thiry *et al.*, 2002). A optimização do pH do meio é crucial, especialmente para proteínas segregadas a partir de leveduras, pois podem crescer numa ampla gama de pHs. Tipicamente, meios ácidos a pH entre 6,2 – 6,8, e crescimentos a 30 – 37°C têm sido associados ao aumento da produção de proteínas recombinantes (Carnes A., 2005). O pH de uma cultura sofre mudanças no momento em que a principal fonte de carbono se esgota. Nesta fase, o pH tende a aumentar devido,

principalmente, à libertação de iões amónia pelas células, como resultado do metabolismo de compostos complexos, existentes no meio. Deste modo torna-se vital, este tipo de controlo em fermentações onde o meio de cultura é semi-definido ou complexo (Lee *et al.*, 1996).

Contudo, no caso de ocorrer uma sobrealimentação em culturas onde o meio é complexo, a quantidade de base adicionada para controlar o pH deve ser reduzida. Este facto deve-se, como já foi referido, à libertação de iões amónia, quando a fonte de azoto é utilizada para o metabolismo celular. É provável que parte do meio complexo seja usado, para fins energéticos, bem como a adição de algum ácido durante a parte final da fermentação para controlar o pH (Fieschko e Ritsch, 1996 e Maré L. *et al.*, 2007).

É comum o uso de sais basais em meios de cultura, onde a amónia é utilizada como fonte de azoto, no controlo do pH durante a fermentação, sendo este facto considerado uma desvantagem. Acontece que, em culturas com elevadas densidades celulares, devido à escassez de azoto, pode levar a uma elevada actividade de protease, sendo determinante para a expressão extracelular. Vulgarmente, de forma a evitar a carência de azoto, o meio optimizado pode incluir sulfato de amónio, usado como fonte de azoto (Ghosalkar A. *et al.*, 2008).

Tipicamente, durante a fermentação, a fase de pós-indução reflecte, embora indirectamente, uma mudança na fisiologia celular. Assim, torna-se vantajoso, manter o pH em estado estacionário, através da alimentação da fonte de carbono e azoto, evitando a acumulação de ácidos orgânicos, como por exemplo, ácido acético, procurando encontrar elevados níveis de expressão da proteína alvo (Luo Q. *et al.*, 2006).

3.1.3 Agitação

A oxigenação no meio de cultura torna-se limitante em culturas com elevadas densidades celulares devido principalmente, à baixa solubilidade do oxigénio em água e à elevada concentração celular que exige níveis de oxigénio suplementares. A solubilidade do oxigénio em água a 25°C e a pressão de 1 atm é aproximadamente 8,0 mg/L, contudo o oxigénio pode ser incrementado com o aumento do fluxo de ar ou com o aumento da velocidade de agitação. Em culturas com elevadas densidades celulares é comum a utilização do enriquecimento de ar com oxigénio puro para prevenir

limitações pelo oxigénio dissolvido no meio (Matsui *et al.*, 1999 e Strandberg e Enfors, 1991). Adicionalmente, alguns investigadores realizam fermentações sob condições pressurizadas, com o objectivo de aumentar a solubilidade do oxigénio no meio de cultura (Matsui *et al.*, 1999 e Strandberg e Enfors, 1991). No entanto para, pressões parciais acima de 0,4 atm, o dióxido de carbono libertado pela fermentação pode ser solubilizado, aumentando a concentração de ácido acético no meio.

O nível de oxigénio no meio de cultura tem uma importante relevância no metabolismo dos microrganismos. De um modo geral, a perda do plasmídeo aumenta com a diminuição da taxa de oxigenação e consequentemente, um aumento na taxa de perda do plasmídeo pode ser a principal causa para a instabilidade (Kumar *et al.*, 1991).

Contudo, a geração de calor metabólico em fermentações *fed-batch* ou culturas com densidades celulares elevadas pode ser desvantajoso, especialmente para culturas em *scale-up*, onde se observa uma redução da relação entre a superfície da camisa de arrefecimento e o volume do fermentador. Neste tipo de processos, as maiores fontes de calor são originadas pela agitação mecânica e o calor metabólico proveniente das células (Kumar *et al.*, 1991).

3.2 Modelos semi-híbridos de consumo de substrato em função do pH e da Temperatura

Os modelos matemáticos têm adquirido cada vez mais importância em biotecnologia, sendo já uma ferramenta indispensável no estudo de bioprocessos (Bastin e Dochain, 1990). Geralmente, o objectivo da modelação matemática consiste em decifrar um modelo que, apesar da sua simplicidade, seja capaz de atingir a finalidade para a qual está a ser formulado, sem no entanto, perder aplicabilidade e assim evitar que o processo de identificação e validação seja mais complexo do que o necessário (Bastin e Dochain, 1990).

A simulação de bioprocessos tem suscitado um grande interesse, quer no meio académico quer industrial, apresentando – se como um instrumento efectivo no projecto e desenvolvimento de algoritmos robustos, na optimização, monitorização, controlo e caracterização de bioprocessos (Bastin e Dochain, 1990). A formulação do modelo matemático, permite modelar o sistema e simular as suas condições de operação,

reduzindo o trabalho experimental associado. Contudo, como grande parte dos sistemas biológicos têm dinâmicas complexas e estão sujeitas a várias perturbações, é necessário recorrer também a dados experimentais para além do conhecimento baseado em leis físicas (Bastin e Dochain, 1990). Os dados experimentais são por isso, pré-requisitos para o projecto e aplicação de modelos biológicos. De facto, esses dados são necessários em quase todas as etapas de modelação de bioprocessos, as quais se centram na selecção da estrutura do modelo calibração e identificação dos seus parâmetros (Bastin e Dochain, 1990).

Os modelos matemáticos podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, podendo um dado processo ser descrito e classificado por modelos matemáticos pertencentes a mais de uma das categorias indicadas na tabela 4.

Tabela 4- Classes de modelos matemáticos (Adaptado de Bailey, 1998).

Classes de modelos matemáticos	
Não verbal	Verbal
Descritivo	Predictivo
Determinístico	Estocástico
Contínuo no tempo	Discreto no tempo
Não estruturado	Estruturado
Distribuído	Segregado
Parâmetros concentrados	Parâmetros distribuídos

Nos modelos não estruturados a população de microrganismos é considerada numa única variável, não havendo a preocupação de descrever a composição e a qualidade da biomassa. Estes modelos permitem, normalmente, uma descrição satisfatória dos processos numa gama variada de condições. Contudo, estas condições devem estar bem definidas pois estes modelos consideram que as reacções em todas as células ocorrem à mesma velocidade (Bastin e Dochain, 1990). Tem sido demonstrado que os modelos não estruturados podem ser integrados com sucesso, em algoritmos de monitorização avançada e de controlo de bioprocessos, sem a necessidade de equipamento muito sofisticado (Bastin e Dochain, 1990). Além disso, estes modelos

estão na base do procedimento do controlo óptimo adaptativo para a optimização de processos (Van Impe, 1993).

Adicionalmente, existem os modelos estruturados nos quais um componente, como a biomassa, é subdividido em compartimentos. O comportamento dinâmico do sistema pode assim ser simulado de um modo mais efectivo, visto que é abrangido por um maior número de fenómenos. No entanto, em geral, estes modelos são muito difíceis de identificar, devido ao grande número de parâmetros e uma vez que todas as variáveis de estado necessárias são, em geral, de difícil quantificação (Van Impe, 1993).

O desenvolvimento de um modelo matemático capaz de simular o comportamento de um dado processo é uma tarefa iterativa, que decorre em várias etapas fortemente dependentes umas das outras, destacando-se: (1) formulação do modelo; (2) identificação do modelo e (3) validação do modelo. Na Figura 5 representam-se, as etapas do desenvolvimento do modelo matemático (Van Impe, 1993).

Inicialmente, a etapa de formulação do modelo consiste na definição e caracterização da sua estrutura. Nesta fase são definidos os limites do sistema, as variáveis de entrada e saída assim como o tipo e o nível de complexidade do modelo a utilizar (Vanrolleghem e Dochain, 1998). São também definidas as várias relações entre as variáveis. Durante a etapa de identificação pretende-se estimar o valor numérico dos parâmetros envolvidos nas funções que relacionam as variáveis do modelo (Vanrolleghem e Dochain, 1998). Esta é normalmente a etapa crítica do desenvolvimento do modelo matemático, devido essencialmente às dificuldades experimentais e ao tempo dispendido. A etapa final do desenvolvimento do modelo matemático consiste na sua validação, efectuando-se o teste à sua capacidade de previsão (Vanrolleghem e Dochain, 1998). Posteriormente, as previsões do modelo são comparadas com os resultados experimentais que não foram utilizados na identificação dos seus parâmetros. Teoricamente, se o modelo descrever satisfatoriamente os resultados experimentais conclui-se que o modelo está validado, caso contrário, se as previsões discordarem significativamente desses resultados, não conseguindo também descrever as suas tendências, a estrutura do modelo deverá ser alterada, considerando novamente as etapas anteriores (Vanrolleghem e Dochain, 1998).

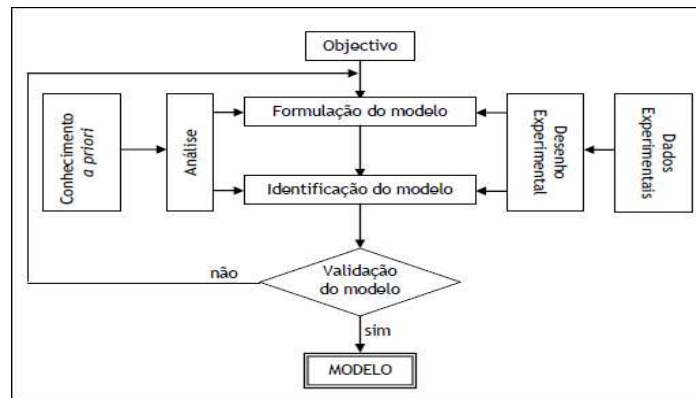


Figura 5- Etapas do desenvolvimento de um modelo matemático genérico em bioprocessos (Adaptado de Vanrolleghem e Dochain, 1998) .

A modelação de processos biotecnológicos envolve normalmente um maior número de iterações do que a dos processos químicos. A validação experimental permite a identificação dos seus parâmetros, bem como, ultrapassar algumas incertezas que ainda possam existir na estrutura do modelo, recorrendo eventualmente a algumas iterações do procedimento de modelação (Vanrolleghem e Dochain, 1998 e Bernaerts *et al.*, 2000).

Contrariamente, as características inerentes dos bioprocessos, como a sua não linearidade, conjugadas com técnicas analíticas pouco adequadas e robustas, fazem com que o procedimento de modelação matemática não possa ser aplicado sem alteração, implicando muitas vezes um número de iterações relativamente elevado (Vanrolleghem e Dochain, 1998 e Bernaerts *et al.*, 2000).

O desenho óptimo de experiências, tem como objectivo otimizar o conteúdo de informação dos dados experimentais, de modo a permitir a identificação do modelo matemático do processo em estudo (Merkel *et al.*, 1996 e Keesman e Stigter, 2002). A planificação das experiências poderá permitir não só realizar fermentações em condições em que o sistema seja preparado adequadamente, como escolher períodos dessas fermentações onde a sensibilidade a cada um dos parâmetros do modelo seja maior, e assim conseguir a sua identificação com a maior precisão possível (Bernaerts *et al.*, 2000; Keesman e Stigter, 2002).

Genericamente, o processo de identificação dos parâmetros do modelo matemático em biotecnologia é limitado, não só pela qualidade da informação disponível, proveniente dos resultados experimentais, mas também devido ao facto

desses modelos serem não lineares, traduzindo-se muitas vezes numa considerável correlação entre os parâmetros a identificar (Versyck *et al.*, 1998). Sendo assim, por vezes, apenas um subconjunto desses parâmetros poderá ser identificado mesmo que seja verificada a identificabilidade teórica do modelo (Walter e Pronzato, 1990).

3.3 Sistemas de produção da proteína hSCOMT

Actualmente, muitas proteínas são produzidas por microrganismos geneticamente modificados, de forma a incrementar a concentração e produtividade celular (Maré *et al.*, 2007). A expressão de proteínas recombinantes é geralmente induzida através da incorporação de plasmídeos compostos por componentes genéticos compatíveis, entre os quais destacam-se: origem de replicação (*ori*), um marcador de resistência a antibiótico, promotores transcricionais, regiões de iniciação de tradução (TIRs), assim como terminadores transcricionais e traducionais (Maré *et al.*, 2007).

Especificamente, a tecnologia de proliferação consiste em controlar o ciclo celular do hospedeiro produtor de maneira a reconduzir a sua energia metabólica na criação de biomassa para a produção de proteínas alvo com aplicações farmacêuticas (Fussenegger *et al.*, 1998). Geralmente, o processo de produção desenvolve-se em duas fases sequenciais: uma fase de expansão, onde as células proliferam até atingirem uma densidade celular específica, seguida de uma fase produtora, onde as células suspendem o ciclo celular na fase G1 e iniciam a produção da proteína alvo, após indução (Weber e Fussenegger *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, a COMT solúvel na forma recombinante tem sido produzida em *E. coli*, células de insectos, e em células de mamíferos, utilizando vectores de expressão baseados em vírus Epstein – barr (vírus do Herpes) e vírus Simian 40 (Polyomavírus) (Passarinha *et al.*, 2009). Apesar de todos os sistemas acima mencionados produzirem formas funcionais de enzima, os métodos permitem produzir até 1g de proteína alvo (Passarinha *et al.*, 2009). De facto, até ao momento pouca investigação tem sido conduzida na fase *upstream*, de forma a melhorar a produtividade volumétrica e mássica para vários domínios de aplicação biofarmacêutica e neurológica (Passarinha *et al.*, 2009). Em termos comparativos, a ausência de actividade de COMT

endógena, aliada às vantagens já apresentadas, fazem da *E. coli* um sistema de expressão ideal da proteína hSCOMT (Lundström *et al.*, 1995).

Curiosamente e tendo em vista a simplificação do processo de purificação, a enzima alvo poderá ser expressa em *E. coli* recorrendo a um sistema de proteína de fusão com a enzima glutathione – S – transferase (GST). Este sistema permite alcançar níveis de expressão elevados numa forma biologicamente activa (Tilgmann e Ulmanen, 1996). Mais recentemente, a hSCOMT foi produzida também sob a forma de proteína de fusão, mas desta vez associada a um péptido de ligação à calmodulina, originando níveis de expressão elevados e uma purificação eficiente com a utilização de um processo de isolamento mais simplificado do que em estudos referidos anteriormente (Bonifácio *et al.*, 2001).

3.3.1 *Scale-Down / Scale-Up*

Alguns sistemas de produção *scale-down*, para proteínas recombinantes, utilizam a indução da proteína recombinante após uma fase de crescimento celular durante a qual a formação do produto é nula ou extremamente reduzida (Lin,2000). Após a adição do indutor e da taxa específica de produção ter alcançado o seu valor máximo, a síntese do produto continua por algumas horas (Shimizu *et al.*, 1998; Seeger *et al.*, 1995).

Tipicamente, o glicerol é usado como fonte de carbono nas fermentações à escala laboratorial, uma vez que, é relativamente barato, autoclavável, e a formação de sub-produtos, como o acetato durante o crescimento, é significativamente menor do que a observada com glucose (Paalme *et al.*, 1990). Curiosamente, utiliza-se uma concentração inicial baixa em glicerol, no meio de fermentação, calculada com base na taxa de crescimento específica, rendimento, quantidade de glicerol e biomassa. Durante a fermentação, o momento da diminuição de glicerol é automaticamente identificado pelo decréscimo de O₂ no meio de cultura (Paalme *et al.*, 1990).

Adicionalmente, nas produções em *scale-up* de produtos terapêuticos recombinantes necessitam de culturas com densidades celulares elevadas, por forma a incrementar a biomassa microbiana e a formação do produto alvo. O principal objectivo

das fermentações, seja a nível industrial ou em fase de pesquisa e desenvolvimento, é maximizar a produtividade volumétrica (g/Lh) para obter a maior quantidade possível de produto num dado volume, durante o menor período de tempo possível. Sendo assim, altas densidades celulares tornam-se um pré-requisito para elevadas produtividades (Thiry *et al.*, 2002). A produção em larga escala de proteínas recombinantes em sistema de expressão com *E. coli* é usualmente conseguida usando um bioprocessos com duas etapas (Passarinha *et al.*, 2009). Na primeira fase as células dividem-se até se obterem densidades celulares elevadas, sob condições de crescimento favoráveis, onde a síntese de proteínas é mantida no mínimo. Posteriormente a segunda etapa, caracteriza-se pela expressão da proteína recombinante alvo, após indução (Passarinha *et al.*, 2009).

Experimentalmente, a melhor maneira para efectuar o *scale-up* do processo é iniciá-lo com o *scale-down* até a escala piloto, onde as condições de cultura serão reproduzidas na escala final de produção. Tipicamente, quando a escala é aumentada o meio torna-se cada vez mais heterogéneo (Thiry *et al.*, 2002).

Adicionalmente, a instabilidade genética dos microrganismos recombinantes é um dos principais problemas para o *scale-up* de processos fermentativos, já que usualmente as estirpes recombinantes são mais instáveis em condições de expressão, que em condições de repressão (Lin, 2000). Deste modo constata-se que, a separação entre as fases de crescimento do hospedeiro e a expressão génica da proteína recombinante é essencial no incremento da estabilidade e da produtividade do processo (Lin, 2000).

Seguidamente abordamos alguns modos de operação em bioprocessos, nomeadamente os modos de operação *bacth* e *fed-batch*, esclarecendo algumas considerações sobre ambos, bem como as suas principais diferenças de funcionamento e limitações associadas.

3.3.1.1 *Batch*

O regime de cultura *batch* (descontínuo) (Figura 6) tornou-se no *setup* padrão para processos de cultura de usando como microrganismo a *E. coli*. Depois da fase *lag*, as células crescem com taxas elevadas até à fase de morte celular, onde se observa uma

redução do número de células viáveis. Contudo, alguns estudos sugerem que controlando a proliferação de células do hospedeiro podemos incrementar a produtividade, e melhorar rendimento do produto, melhorando de um modo geral o desempenho do processo *batch* (Kaufmann H. *et al.*, 2001).

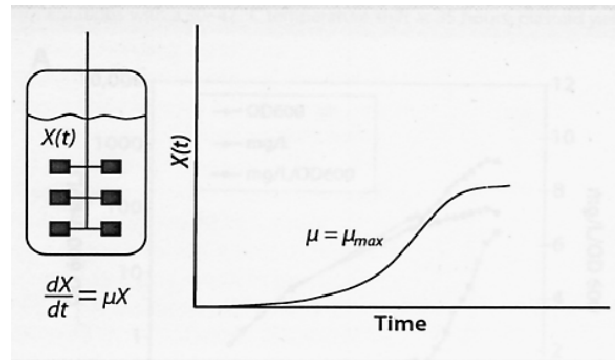


Figura 6- Curva de crescimento típica da *E. coli* em modo de operação *batch* (Adaptado de Carnes A., 2005).

A principal vantagem da fermentação *batch* é a simplicidade. Todos os nutrientes necessários ao crescimento celular estão presentes durante a inoculação, sendo tipicamente recomendado 1 a 5% do volume de cultura, por forma a minimizar a fase *lag*. Posteriormente, durante a fase exponencial de crescimento, todos os nutrientes encontram-se em excesso; originando taxas de crescimento específica máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) descritas e previstas pela cinética de Monod (Ryan e Parulekar, 1990; Li e Taylor, 1994; Patnaik, 2002).

Do ponto de vista experimental, a operação *batch* é a mais atractiva tendo em conta a sua fácil implementação, a redução de custos em consumíveis e o tempo de experimentação. Ao nível industrial, este tipo de operação é também uma configuração comum na produção de proteínas recombinantes. No entanto, as fermentações em *batch* originam rendimentos baixos devido essencialmente à concentração limitante de substrato e/ou à concentração de produtos formados que, tipicamente inibem o crescimento (Ryan e Parulekar, 1990; Li e Taylor, 1994; Patnaik, 2002).

Há semelhança de outros tipos de operação, em modo *batch*, os meios de cultura podem ser semi-definidos ou complexos. Geralmente, os meios semi-definidos fornecem um crescimento reprodutível no sobrenadante para a proteína segregada (Thiry *et al.*, 2002). Os meios complexos incluem peptona e/ou extracto de levedura,

contudo, a composição pode variar em quantidade e qualidade dificultando a reprodutibilidade das fermentações. Em geral, são fáceis de preparar, económicos e de rápido crescimento, sendo difícil analisar a variação entre os “*batches*” realizados. Assim, em algumas culturas é necessário a utilização de meios complexos para estimular a formação do produto e/ou o crescimento celular, principalmente se as estirpes forem auxotróficas. Em ambos os casos, a escolha da fonte de carbono é crucial. Tipicamente, uma concentração elevada de glucose pode originar a acumulação de acetato, reduzindo o rendimento em biomassa e os níveis de expressão da proteína alvo em *E.coli* (Thiry *et al.*, 2002).

3.3.1.2 *Fed-Batch*

A fermentação *fed-batch* (Figura 7) tem sido usada na indústria desde o início do século XX, na produção de cerveja e de levedura para a panificação (fermento de padeiro) e, mais tarde, desde 1950, na produção de antibióticos, entre muitos outros casos (Shiloach e Fass, 2005).

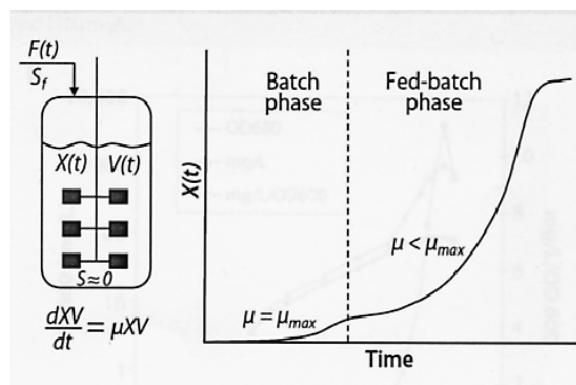


Figura 7- Curva de crescimento típica da *E. coli* em modo de operação *Fed-batch* (Adaptado de Carnes A., 2005).

Geralmente, a fermentação *fed-batch* começa com uma fase de *batch*. As células são inoculadas com um volume inicial de meio que contém os nutrientes não limitantes e os substratos limitantes. Curiosamente, os meios de cultura definidos são amplamente descritos em fermentações *fed-batch*, uma vez que os nutrientes são conhecidos podendo ser controlados durante a fermentação, facilitando e simplificando o processo *downstream* de recuperação (Shiloach e Fass, 2005). De forma a que o crescimento

celular atinja elevadas densidades, torna-se necessário desenvolver um meio de cultura que contenha todos os nutrientes necessários, evitando-se inibições por concentrações elevadas de nutrientes essenciais, ou o inverso, a ausência de algum elemento essencial ao metabolismo celular. Também é desejável que a solução de alimentação adicionada ao meio de cultura tenha uma formulação simples e seja sustentável. Para desenvolver este tipo de alimentação a abordagem geralmente utilizada têm em consideração, a composição mássica das células e dos coeficientes de rendimento de cada componente presente no meio (Riesenber e tal., 1999). Actualmente, a operação *fed-batch*, quando devidamente otimizada a cada sistema de expressão, torna possível alcançar densidades celulares acima de 190 g/L (em peso seco), em fermentações com *E. coli*, para produção de proteínas recombinantes (Shiloach e Fass, 2005).

A alimentação controlada dos nutrientes limitantes inicia-se após esgotamento total do nutriente alvo. Especificamente, várias estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas, com controlos *feedback* (p.e., D.O – Stat, pH- Stat, actividade metabólica, concentração de biomassa, e concentração de substrato) ou pré – determinados (p.e., constante, linear, passo a passo, ou alimentação exponencial) (Carnes A., 2005). Esta ultima é uma das estratégias de alimentação mais simples e eficazes, permitindo que a cultura cresça a uma taxa pré – determinada inferior à $\mu_{\text{máx}}$ sem necessitar de um controlo *feedback*. Como a fermentação começa em modo *batch* contendo uma concentração de substrato abaixo dos limites de inibição, as células crescem até que o substrato se esgote, no momento exacto em que a alimentação de nutrientes começa (Carnes A., 2005).

Como foi referido anteriormente, o crescimento da *E. coli* em culturas de alta densidade celular, em meios compostos por glucose, é a formação e acumulação de acetato. A sua acumulação torna-se particularmente relevante quando há síntese de proteínas heterólogas, uma vez que constata-se que concentrações de acetato superiores a 2,4 g/L afectam negativamente o crescimento de células e a produção de proteínas (Noronha et al., 2000). Sendo assim, a estratégia de alimentação usada desempenha um papel crítico para o sucesso da fermentação, visto dela depender, em grande parte, o controlo da produção de acetato, a concentração máxima celular e a produtividade pretendida (Noronha et al., 2000). Para minimizar a formação de acetato em culturas *fed-batch*, foram desenvolvidas diversas estratégias, como o controlo da taxa específica de crescimento. A maneira mais eficiente de controlar a taxa específica de crescimento é

limitar os nutrientes necessários ao crescimento celular, tipicamente a fonte de carbono ou azoto (Riesenberg *et al.*, 1991; Paalme *et al.*, 1990; Yoon *et al.*, 1994; Klemann e Strohl, 1994).

Estudos adicionais mostram que têm sido aplicadas com sucesso estratégias baseadas, em caudais de alimentação constantes ou exponenciais, ou métodos mais sofisticados, que envolvem esquemas de controlo indirecto com retroacção de parâmetros físicos como o teor de oxigénio dissolvido e o pH (Korz *et al.*, 1995; Narciandi, 1996; Wangsa-Wirawan *et al.*, 1997; Suárez e Kilikian, 2000; Johnston *et al.*, 2002; Kleist *et al.*, 2003). Resumidamente, na Tabela 5, representam-se algumas vantagens definidas para os diferentes tipos de reactores em modo de operação *batch*, *fed-Batch* e contínuo.

Tabela 5– Resumo das vantagens e desvantagens associadas aos modos de operação de um bioreactor (Adaptado de Versyck, 2000).

Modo de operação	Vantagens	Desvantagens
<i>Batch</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Equipamento simples; ▪ Adequado para baixa produção; ▪ Redução do esforço experimental, tempo e consumo de reagentes; ▪ Fácil implementação; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Tempo de espera longo para enchimento e lavagem; ▪ Variação das condições de reacção com o tempo; ▪ Inadequado para estudos de identificação de parâmetros de modelos; ▪ Não permite a transferência de conhecimento de parâmetros para outras condições de operação; ▪ Inadequado para estudos de desenho óptimo de experiências;
<i>Contínuo</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Permite elevada produção; ▪ Boa qualidade dos produtos devido às condições constantes de operação; ▪ Adequado para estudos cinéticos; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Requer controlo de fluxo; ▪ Instável durante longos períodos de fermentação; ▪ Esforço experimental, tempo e consumo de consumíveis acentuados; ▪ Pouco adequado para estudos de identificação de parâmetros de modelos; ▪ Permite a transferência de conhecimento de parâmetros para outras condições de operação; ▪ Pouco adequado para estudos de desenho óptimo de experiências;
<i>Fed-batch</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Controlo de condições ambientais; ▪ Adequação para estudos de identificação de parâmetros de modelos; ▪ Permite a transferência de conhecimento de parâmetros para outras condições de operação; ▪ Adequado para estudos de desenho óptimo de experiências; 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Necessita de estratégias de alimentação de forma a se obter a concentração desejada de substrato e produtos; ▪ Necessita de equipamentos e software sofisticados; ▪ Implica algum esforço experimental, tempo e gastos de consumíveis;

3.4 Fluxos associados à síntese de biomassa

O crescimento celular é garantido pela oxidação de nutrientes através de uma rede complexa de reacções bioquímicas. Durante esse processo é produzido novo material biológico acompanhado pela produção de energia utilizada para manter a organização celular. Assim, observa-se a combinação de fluxos associados à síntese de biomassa e outros fluxos metabólicos, que produzem energia essencialmente utilizada na manutenção do gradiente iónico, reparação de proteínas e polinucleótidos existentes, assim como para manter as infra-estruturas bioquímicas que permitem à célula uma rápida adaptação a alterações ambientais (Varma et al., 1993; Holms, 1996; Lima e Mota, 2003).

A análise dos fluxos metabólicos tem emergido como uma importante ferramenta no campo da engenharia, uma vez que podem ser quantificados pelo desenvolvimento de balanços metabólicos. Tipicamente as, mudanças no fluxo metabólico podem reflectir a utilização e limitações potenciais das vias metabólicas e fornecem a informação para o desenvolvimento e controlo optimizado do bioprocessos. A rede de fluxo metabólico elucidada e orientada não apenas o controlo do processo de cultura *fed-batch*, mas também melhora as estirpes recombinantes (Yan L. et al., 2008).

O princípio de conversão de substratos em biomassa e energia é relativamente simples, consistindo no transporte de cada fonte de carbono para a célula e posteriormente na sua degradação em moléculas mais simples com incorporação nas vias metabólicas centrais. Tipicamente estas vias, contêm cerca de trinta compostos: entre os quais destacam-se ácidos fosforilados e/ou carboxílicos e tiol-ésteres da coenzima A (Varma et al., 1993; Holms, 1996; Lima e Mota, 2003). A conversão de compostos intermediários é catalizada por enzimas organizadas em vias metabólicas como a glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas, das pentoses fosfato, e o ciclo dos ácidos tri-carboxílicos (ATC), e variações deste ciclo como a via Entner - Doudorof e da fosfocelulase. Estas vias conduzem não só à produção de energia, sob a forma de Adenosina Trifosfato (ATP), coenzimas reduzidas, como o Hidrogeno-nicotinamida Adenina Dinucleótido (NADH), e o Hidrogeno-flavina Adenina Dinucleótido (FADH₂), mas igualmente de moléculas de baixo peso molecular que são utilizadas na síntese de blocos precursores (aminoácidos, bases púricas e pirimídicas, açúcares

fosfatados e outros derivados de açúcares, ácidos orgânicos e diferentes metabolitos) de diferentes macromoléculas que constituem as células (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e polissacáridos) (Varma et al., 1993; Holms, 1996; Lima e Mota, 2003).

O metabolismo da *E. coli* serviu, durante mais de uma década, como base para novos métodos de análise das vias metabólicas. Actualmente, aceita-se que esta bactéria possua essencialmente quatro vias metabólicas, (Zhao e Shimizu, 2003; Carlson e Sreenc, 2004) extremamente eficientes, na conversão da fonte de carbono e oxigénio em novas gerações de células e energia de manutenção sob qualquer nível de limitação de oxigénio (Zhao e Shimizu, 2003; Carlson e Sreenc, 2004). Geralmente nestes casos, a glucose é o substrato mais utilizado experimentalmente, uma vez que pode ser simultaneamente fonte de carbono e energia, sendo facilmente metabolizado e com custos relativamente reduzidos.

Na ausência de oxigénio, fermentações na presença de glucose conduzem à produção essencialmente de etanol, acetato, formato, succinato e lactato. Em sistemas de produção de proteínas recombinantes, a via anaeróbia mais eficiente produz três moléculas de ATP, uma de acetato, uma de etanol e duas de formato por cada molécula de glucose formada, traduzindo-se num rendimento energético de aproximadamente 0,5 moles de ATP por mole de carbono de glucose consumida (Carlson e Sreenc, 2004). Em condições aeróbias e quando a glucose está em excesso, segue-se uma via fermentativa originando a produção de compostos de baixo peso molecular. O acetato é o composto mais frequente em fermentações de *E. coli* (Phue e Shiloach, 2004). Esta via apresenta um rendimento energético de 2 moles de ATP por mole de carbono de glucose oxidada, com a seguinte estequiometria:



O acetato formado pela via anterior pode ser oxidado e usado como fonte de carbono secundária se a sua concentração não for inibitória e se a capacidade do ciclo dos ATC não estiver toda ocupada pelo metabolismo da glucose (Alba e Calvo, 2000). Quando o acetato é a única fonte de carbono os compostos intermediários do ciclo dos ATC são produzidos pelo ciclo do glioxilato que é inibido na presença da glucose (Carlson e Sreenc, 2004). A reacção de oxidação do acetato está representada na equação 2.



Deve ser realçado que nas equações anteriores não é considerada a formação de biomassa, não se incluindo, por isso, os coeficientes de rendimento. Na Figura 8 representa-se um esquema simplificado do metabolismo da glucose e do acetato na *E. coli*.

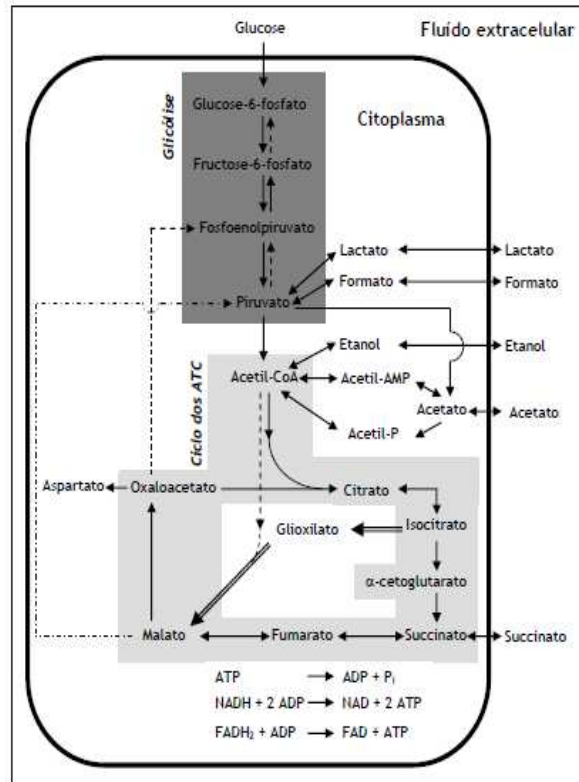


Figura 8- Metabolismo da glucose e do acetato na *E. coli* (Adaptado de Carlson e Srien, 2004 e de Phue et al., 2005).

Em resumo, quando a *E. coli* cresce na presença de glucose em condições de aerobiose, esta é metabolizada em várias etapas, pelas seguintes vias: glicólise, ciclo dos ATC e cadeia respiratória. Especialmente, na glicólise, a glucose 6-fosfato é convertida em piruvato e no ciclo dos ATC, a acetil-CoA é oxidada a dióxido de carbono e água com produção associada de coenzimas reduzidas. Uma reacção intermediária faz a união entre as duas vias anteriores, onde por acção da piruvato desidrogenase é produzida a acetil-CoA através do piruvato. Como referido anteriormente, quando a glucose se encontra em excesso há produção de acetato. A explicação mais comum para a sua formação e acumulação é o fluxo elevado de carbono através da glicólise, que

excede a capacidade do ciclo dos ATC. Assim, o acetato é produzido através da acetil-CoA pela acção das enzimas fosfotransacetilase e acetato quinase e através do piruvato pela piruvato oxidase. Por outro lado, o acetato formado poderá ser novamente convertido em acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase, sendo o reabastecimento do ciclo dos ATC feito via ciclo do glioxilato.

Na Figura 9, está representada a capacidade oxidativa em *E. coli* em condições de aerobiose, reproduzindo as principais vias metabólicas que podem ocorrer durante um processo fermentativo. Especificamente, para valores inferiores à taxa específica crítica de crescimento ($\mu_{\text{crítico}}$) a glucose é completamente oxidada, originando elevados rendimentos em biomassa por glucose consumida, denominando-se por rendimento oxidativo em glucose (Y_{SX}^{OX}). A Equação 1 traduz este metabolismo oxidativo, o qual é representado na Figura 9 pelas setas 1 e 2. Para valores superiores a μ crítico e inferiores à taxa específica máxima de crescimento o excesso de glucose é convertido essencialmente, através do metabolismo oxido-redutivo em acetato, obtendo-se um rendimento inferior de biomassa por glucose consumida. Este rendimento é designado por redutivo em glucose (Y_{SX}^{red}). A Equação 2 traduz o metabolismo oxido-redutivo (Figura 9 – seta 3). As setas 4 e 5 da Figura 9 descrevem uma situação, designada por metabolismo oxidativo em glucose e acetato ou oxidativo em acetato, respectivamente (Equação 2).

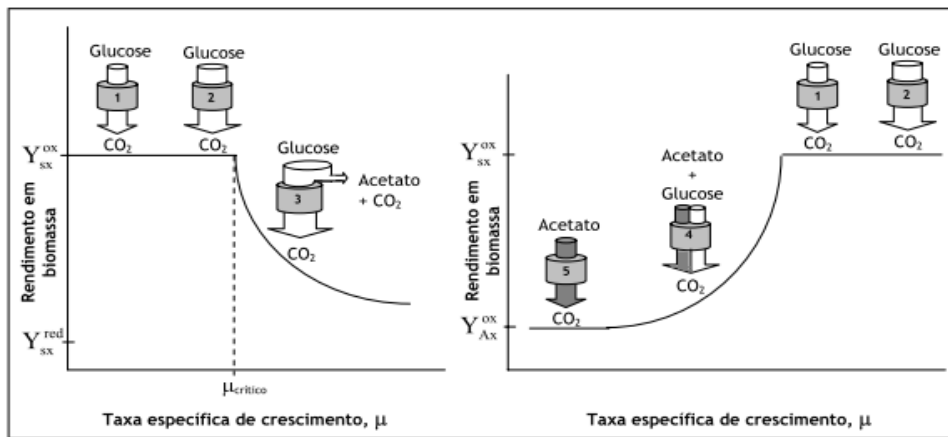


Figura 9 - Representação esquemática da capacidade oxidativa da *E. coli* (Adaptado de Cannizzaro et al., 2004).

Globalmente, uma vez que a acumulação de acetato afecta o crescimento e a produção de proteínas, têm sido aplicadas várias estratégias para limitar a sua acumulação durante bioprocessos de alta densidade celular, das quais se destacam a adição gradual de glucose usando técnicas de alimentação *fed-batch* (Cannizzaro et al., 2004) e o desenvolvimento de estirpes mutantes com vias metabólicas modificadas. Embora, o metabolismo da glucose e do acetato para a *E. coli* tenha sido intensamente estudado durante os últimos 50 anos, ainda não foi proposta uma justificação unânime para os fenómenos mais importantes que caracterizam o crescimento desta bactéria (Varma e Palsson, 1993a e 1993b; Ko et al., 1994; Van de Walle e Shiloach, 1998; Xu et al., 1999; Edwards e Palsson, 2000; Dittrich et al., 2005).

4. Objectivos

Este trabalho teve como objectivo:

- Determinar a influência de variáveis como a temperatura, o pH e a agitação na produtividade da hSCOMT.
- A implementação de modelos de pH e temperatura, no controlo de sistemas de produção da proteína recombinante.

5. Materiais e Métodos

5.1 Materiais

A água ultra-pura foi obtida num sistema Milli – Q (Millipore/Waters) como base na formulação do meio de crescimento da bactéria. O sal dissódico de carbenicilina, isopropil – β – D – tiogalactopiranosido (IPTG), triptona, extracto de levedura, lisozima, dithiothreitol (DTT) e glicerol, metanefrina, epinefrina, SAM, ácido cítrico monohidratado, octil sulfato de sódio, dibutilamina e ácido perclórico concentrado 70% (v/v), foram obtidos na Sigma Chemical Co (St Louis, MO, U.S.A). Todos os outros químicos utilizados no desenvolvimento do trabalho eram de grau analítico, comercialmente disponíveis e usados sem purificação posterior.

5.2 Expressão e Recuperação da proteína hSCOMT recombinante

As células de *Escherichia coli* BL21(DE3), que continham o plasmídeo de expressão (pET101/ D – hSCOMT), foram crescidas durante a noite a 37°C em placas de agar, com meio LB padrão contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de carbenicilina. Posteriormente, inoculada uma colónia em 62,5 mL de meio SOB com 62,5 μL de carbenicilina em erlenmeyers de 250 mL. As células foram crescidas a 37°C e 250 rpm até ser atingida uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) de 2,6; correspondente ao meio da fase exponencial de crescimento bacteriano. A pré-cultura foi então diluída (1:8) em meio SOB fresco (250 mL) num *erlenmeyer* de 1L, sendo o volume de inóculo calculado de modo a alcançar uma DO_{600} inicial de 0,2 – 0,3. Quando a DO_{600} atingiu 0,7; a produção de hSCOMT é induzida pela adição de IPTG (concentração final de 1 mM). Após 4 horas de crescimento, as células foram recolhidas por centrifugação (4600 rpm, 20 min, 4°C) e armazenadas a -20°C para posterior utilização. Com o objectivo de estabelecer uma comparação, o mesmo processo foi repetido, utilizando um meio semi-definido, como meio de fermentação e de produção da proteína hSCOMT.

Posteriormente, o precipitado de células foi suspenso num tampão padrão (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 10 mM DTT, 1 mM MgCl_2) contendo inibidores de proteases (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Leupeptina e 0,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e Pesptatina), foi lisado por tratamento

com Lisozima (0,5 mg/mL) seguido de ciclos consecutivos de congelamento (azoto líquido a -120°C) e descongelamento (42°C). Finalmente, adiciona-se DNase (1mg/mL), com o objectivo de reduzir a viscosidade da amostra (Passarinha *et al.*, 2008). Após a lise bacteriana, foi obtido um volume de sobrenadante de 10 mL e injectado directamente num HPLC acoplado a detecção electroquímica amperométrica para estudos de actividade enzimática.

5.3 Método de *Bradford* para determinação da concentração da proteína – COMT

O conteúdo em proteína nos lisados obtidos foi medido pelo método de *Bradford* (macro-ensaio). Deste modo, procedeu-se à elaboração de uma recta de calibração com soluções padrão de BSA no intervalo de 100 – 1000 $\mu\text{g/mL}$, de modo a relacionar a absorvência medida na amostra com a concentração de proteína presente nos extractos obtidos.

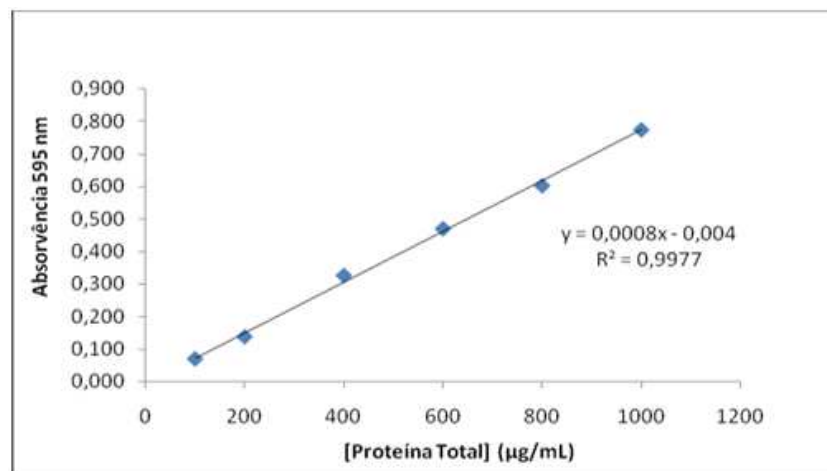


Figura 10 – Curva de calibração BSA com Tampão BIAL.

5.4 Actividade Enzimática

A eficiência da metilação da proteína hSCOMT recombinante obtida, foi avaliada pela quantificação de metanefrina formada a partir de epinefrina como substrato, num sistema de HPLC com detecção electroquímica. Inicialmente foi traçada

uma recta de calibração com concentrações crescentes de metanefrina (1 – 20 nmol/mL) de modo a relacionar a altura do pico de metanefrina com a concentração de metanefrina presente na amostra.

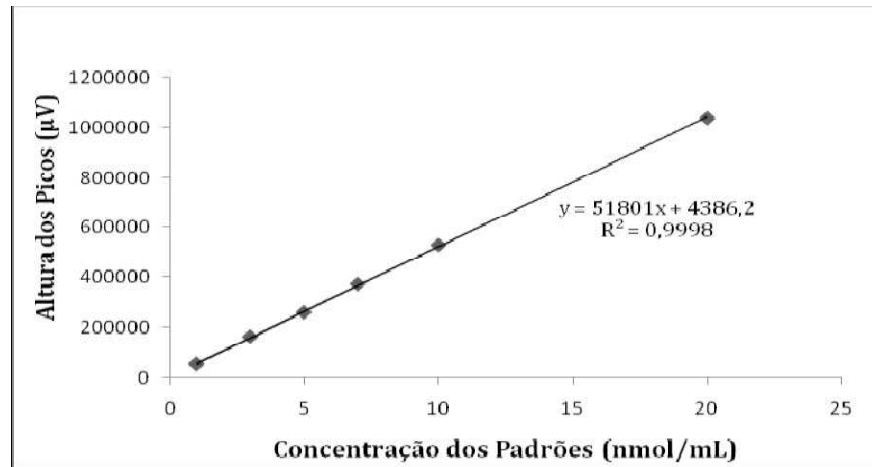


Figura 11 – Curva de calibração da metanefrina.

Nos ensaios de actividade da enzima, uma alíquota de 150 µg/mL de extracto solúvel foi incubada com 5 mM de tampão fosfato de sódio (pH 7,8) contendo 0,2 mM de MgCl₂, 2 mM de EGTA, 250 µM de SAME e 1 mM de epinefrina num volume total de amostra de 1 mL. As reacções foram realizadas a 37°C durante 10 min num banho, sob agitação, e foram interrompidas pela adição de 200 µL de ácido perclórico (2M). Os sobrenadantes foram centrifugados a 6000 rpm durante 10 min a 4°C, filtrados com membranas que possuem um tamanho de poro de 0,22 µm, de modo a remover o material precipitado, para posterior análise num sistema de HPLC com detecção electroquímica. As actividades da proteína hSCOMT foram calculadas em termos de nmol de MN produzida/h/ mg de proteína.

Especificamente, o sistema de HPLC inclui uma bomba quaternária com controlador (600), um injector manual (Rheodyne 7725), um desgaseificador (AF) instalado entre o reservatório do eluente e a válvula de injeção, uma bomba e um detector amperométrico electroquímico (ECD – 2465). O sistema de HPLC é controlado automaticamente pelo software Empower, fornecido pela *Waters Corporation* (Milford, MA, USA).

Em termos experimentais, a fase móvel (0,145 mM de EDTA, 0,1 mM de acetato de sódio, 0,1 mM de ácido cítrico, 0,5 mM de octil sulfato de sódio, 1 mM de

dibutilamina e 5% de metanol (v/v), ajustando o pH a 3,5 com ácido perclórico 70% (v/v), foi filtrada através de uma membrana com um tamanho de poro de 0,20 μm , (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany), desgaseificada ultrasonicamente e bombeada em modo isocrático no sistema cromatográfico a 1 mL/min. A separação cromatográfica é obtida utilizando uma coluna de fase – reversa com um tamanho de partícula de 5 μm , XTerra MS C₁₈ ODS (250 \times 4,6 mm, i.d) ligada a uma pré-coluna da mesma natureza (5 μm , 10 \times 4,6 mm, i.d), ambas fornecidas pela *Waters*. Todas as injeções foram efectuadas utilizando uma válvula *Rheodyne*, equipada com um loop de 20 μL .

A oxidação electroquímica de metanefrina das respectivas O – quinonas foram realizadas num célula, equipada com um eléctrodo de trabalho de carbono vítreo com 3 mm de diâmetro, acoplada a um eléctrodo de referência a um potencial de oxidação de +750 mV. O eluente, a coluna analítica foram mantidos a uma temperatura constante usando um módulo instalado no detector electroquímico. A sensibilidade do método foi fixada em 100 nA.

Com o objectivo de determinar a concentração de glicerol, e de sub-produtos nos ensaios realizados em meio semi-definido (Tabela 6), utilizou-se um sistema de HPLC com detecção electroquímica, através de eluição isocrática (0,6 mL/min), com uma coluna Bio-rad Aminex HPX-87H, catalog 1250140, com 0,01 N de H₂SO₄. Uma curva de calibração foi realizada, com concentrações crescentes de glicerol de 0,2 – 1 g/L, de forma a relacionar a altura do pico com a concentração de glicerol presente na amostra.

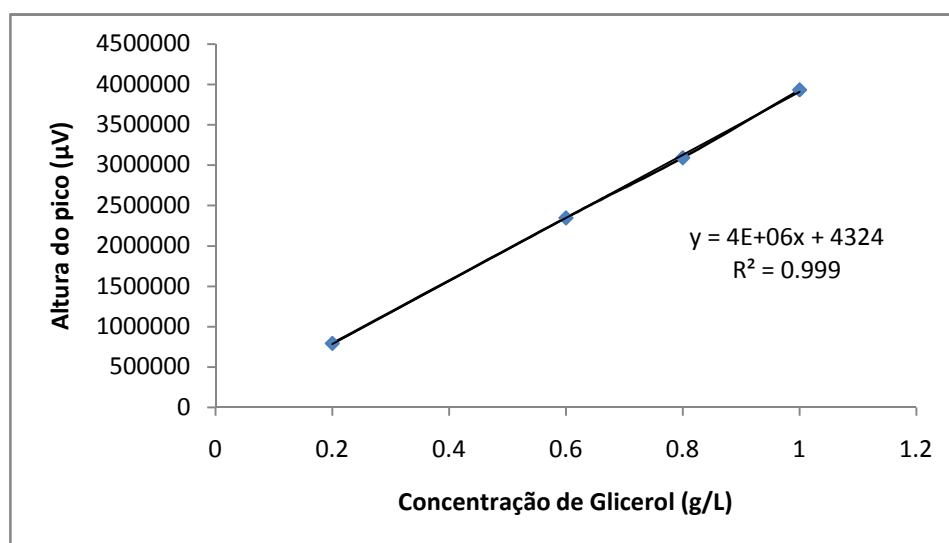


Figura 12– Curva de calibração do Glicerol.

Tabela 6 – Composição do meio para *batch* e *fed – batch* e solução de nutrientes de alimentação (Adaptado de Passarinha *et al.*, 2009).

Componentes	Concentração
Na_2HPO_4	5,50 g/L
NaCl	0,50 g/L
Ácido Cítrico monohidratado	1,64 g/L
Citrato de Potássio	2,00 g/L
Citrato de Sódio	0,67 g/L
Triptona	20 g/L
Glicerol	30 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,21 g/L
Carbencilina	50 $\mu\text{g/mL}$
Elementos vestigiais	1,5 mL
Composição da solução de elementos vestigiais	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	27 g/L
ZnCl_2	2g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1g/L
CuSO_4	1,2 g/L
H_3BO_3	0,5 g/L
Composição da alimentação do <i>Fed</i>	
Glicerol	300 g/L
Triptona	40g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15g/L
Carbencilina	250mg/L
Solução de elementos vestigiais	10 g/L

6. Resultados e Discussão

A otimização de meios de cultura, envolve a manipulação de variáveis independentes como (pH, temperatura, nutrientes, velocidade de agitação, etc), fixando outros parâmetros. Tipicamente, trata-se de um processo demorado e dispendioso, para um grande número de variáveis. Para superar esta dificuldade, o *design* factorial pode ser empregue com sucesso, há semelhança do que acontece em outros domínios, na otimização de bioprocessos (Adinarayana K. *et al.*, 2003). O *design* factorial, consiste num conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas, usadas vulgarmente para determinar os efeitos de inúmeras variáveis em diferentes processos biotecnológicos (Heck J. *et al.*, 2008).

Neste trabalho, com base na tabela 7, podemos observar as condições de fermentação, testadas tendo por base o *design* factorial, previamente estabelecido.

Tabela 7 – Condições de fermentações testadas.

Nº de ensaios	Temperatura(°C)	pH_{inicial}	Agitação (rpm)
1	46,8	6,5	225
1	40	5	150
1	40	5	300
1	40	8	150
1	40	8	300
6	30	6,5	225
1	30	6,5	99
1	30	6,5	351
1	30	9	225
1	30	3,97	225
1	20	5	150
1	20	5	300
1	20	8	150
1	20	8	300
1	13,2	6,5	225

Tipicamente, as condições óptimas para o crescimento da *E. coli*, na produção da proteína hSCOMT, são estabelecidas a 37°C, 250 rpm e a pH aproximadamente neutro. No entanto a manipulação destas variáveis, poderá ter bastante influência no crescimento da *E. coli* quer em meios complexos (SOB), quer em meios semi-definidos. Especificamente, a temperatura pode ser utilizada para o controlo do metabolismo celular, uma vez que o seu aumento, influencia a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo (Carnes A., 2005). A agitação é outro parâmetro a ter em conta, uma vez que culturas com elevadas densidades celulares requerem boas taxas de oxigenação e de homogeneização entre os vários nutrientes presentes na mistura. Adicionalmente o controlo do pH sofre alterações, no momento em que a principal fonte de carbono se esgota, aumentando o seu valor, assim sendo é necessário o controlo deste parâmetro, recorrendo à adição de pequenas quantidade de ácido e base. Contudo é necessário ter em atenção à formação de acetato, resultante da acumulação de sais que se formam através da adição de ácidos e bases, de forma a evitar o *overflow* deste metabolito, sendo prejudicial ao crescimento microbiano no processo de fermentação (Lee *et al.*, 1996 e Fieschko e Ritsch, 1996).

Seguidamente apresentamos, os resultados em termos de actividade específica e produtividade mássica da enzima hSCOMT, obtidos como resultado de fermentações efectuadas em meio complexo e semi-definido.

6.1 Meio Complexo (SOB)

Os meios complexos são largamente utilizados para estimular a formação de biomassa e/ou crescimento celular. Incluem na sua composição peptona e/ou extracto de levedura, proporcionando um rápido crescimento celular (Riesenber *et al.*, 1999 e Thiry *et al.*, 2002).

Seguidamente apresentamos, os resultados em termos de actividade específica (Figura 13) e produtividade mássica (Figura 14) da proteína alvo, de acordo com as condições de fermentação testadas.

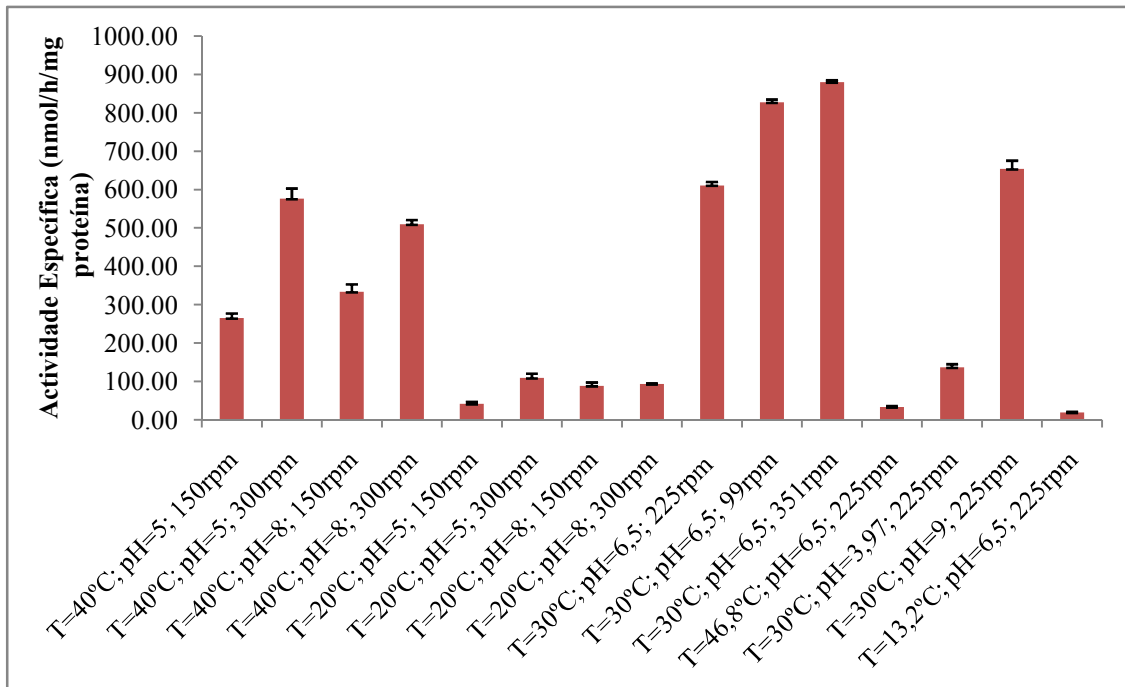


Figura 13– Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio SOB, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a T=37°C e 250 rpm.

De acordo com a figura 13, podemos referir que, em termos de actividade específica (nmol/h/mg proteína) da enzima hSCOMT, as condições de fermentação, que apresentam melhores resultados são a 30°C e 40°C de temperatura, em pH inicial de 6,5 e 9 e rotações de 225 e 300 rpm. Contudo, destaca-se a fermentação realizada a 30°C, pH inicial de 6,5 e 351 rpm, que regista um maior valor de actividade de proteína hSCOMT. Adicionalmente, condições extremas de operação apresentam valores de actividade menores, especificamente à temperatura de 13,2 e 46,8°C, com pH inicial de 6,5 e a 225 rpm. Isto significa que no meio complexo, parâmetros como a temperatura e as rotações, têm um papel fundamental nos resultados obtidos em termos de actividade específica desta proteína.

Tipicamente, a temperatura óptima de crescimento da *E. coli* é 37°C, logo é natural que condições de fermentação realizadas a 30 e 40°C apresentem uma concentração de biomassa final apreciável, bem como valores elevados de actividade específica e produtividade volumétrica da proteína alvo. A velocidade de agitação é outro parâmetro a considerar, pois como já foi referido, culturas com elevadas densidades ópticas requerem boas taxas de oxigenação, permitindo maior transferência

de O₂ para as células, obtendo-se assim um maior crescimento microbiano, bem como um bom rendimento do produto alvo.

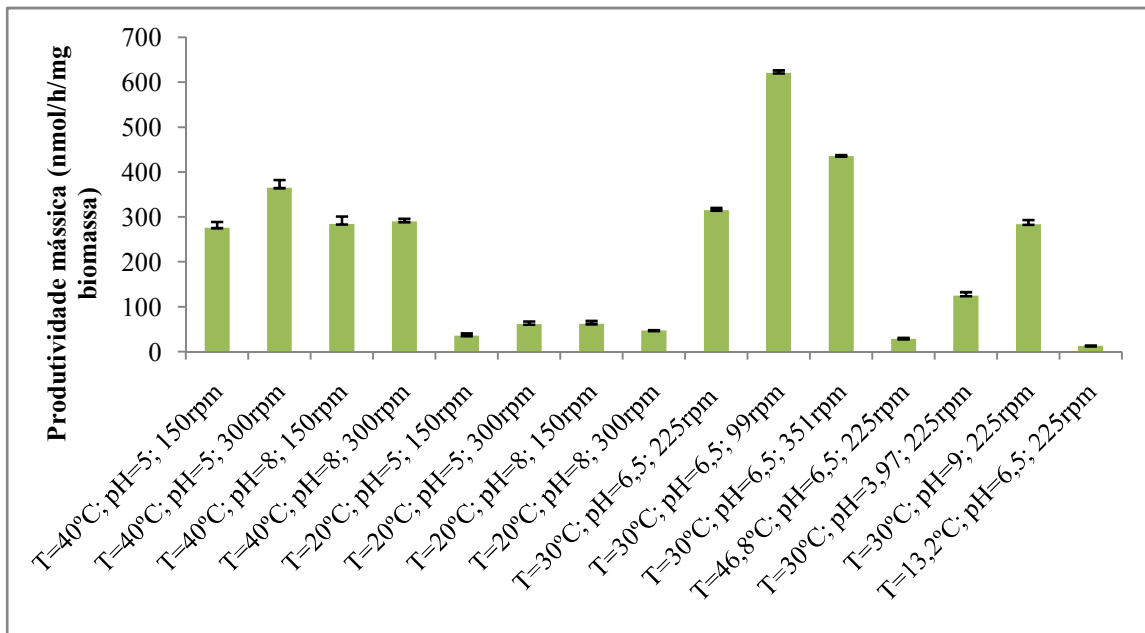


Figura 14– Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio SOB, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

Tipicamente, a produtividade mássica (nmol/h/mg de biomassa) é calculada em termos da razão entre a actividade total de proteína (nmol/h) e a massa de biomassa produzida, em 250 mL de meio de fermentação. A biomassa formada, tem em consideração o peso seco da massa microbiana (0,3862 g/L) (Passarinha *et al.*, 2009) e da densidade óptica encontrada.

Em termos de produtividade mássica (Figura 14) há condições que apresentam incrementos e decréscimos significativos. Nas fermentações realizadas a 20 e 40°C a discrepância não é tão acentuada, do que a 30°C, registando-se melhores valores de produtividade mássica. Este facto deve-se, há maior quantidade de biomassa produzida, no final das fermentações testadas.

6.1.1 Agitação

A velocidade de agitação, condiciona a quantidade de O₂ dissolvido no meio de fermentação e conseqüentemente no transporte deste gás para o interior das células. Tratando-se de fermentações efectuadas em meio cuja composição é complexa, torna-se difícil a solubilidade do O₂, que influencia directamente o crescimento microbiano e o rendimento da proteína alvo. Seguidamente apresentamos os resultados em termos de actividade específica (Figura 15) e produtividade mássica (Figura 16) da enzima hSCOMT, resultantes da manipulação da velocidade de agitação, nas fermentações realizadas.

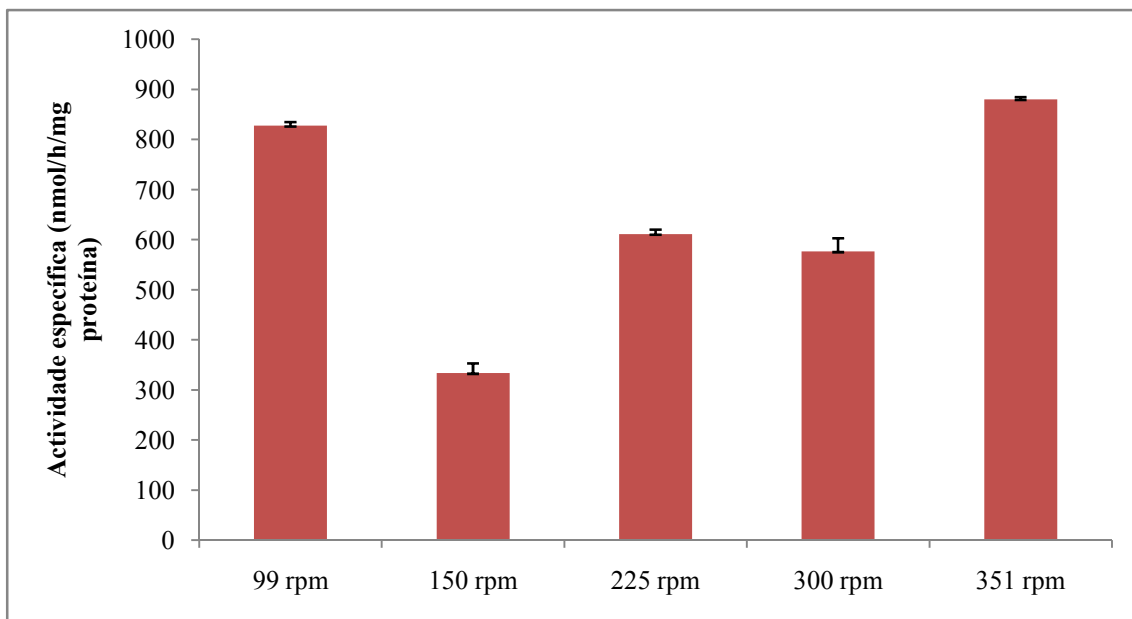


Figura 15 – Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

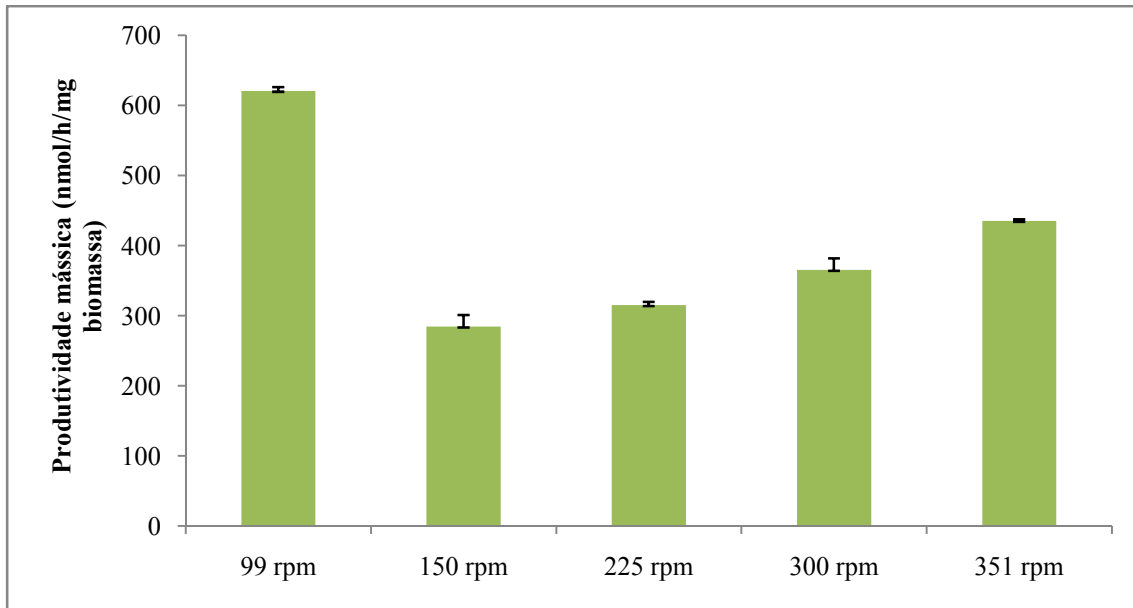


Figura 16 - Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

Observando as figuras 15 e 16, podemos afirmar que a agitação é um parâmetro, que afecta de modo acentuado, a actividade específica e a produtividade mássica dos sistemas de produção da proteína hSCOMT. Deste modo, a fermentação realizada a 351 rpm, apresenta o maior valor de actividade específica, quando comparado com os ensaios realizados a 99, 150, 225 e 300 rpm. Uma vez que, a agitação é descrita como uma variável limitante em fermentações com elevadas densidades celulares, e sendo o oxigénio tipicamente pouco solúvel em meios líquidos, constata-se que culturas de *E. coli* com elevadas concentrações celulares exigem elevados níveis de oxigénio e consequentemente níveis de agitação superiores. Tipicamente, quanto maiores forem as rotações num meio de cultura, mais elevados serão os níveis de oxigénio transferidos para o interior das células, afectando directamente as vias metabólicas de produção da proteína alvo. Experimentalmente, o maior valor encontrado em termos de produtividade mássica, obteve-se em condições de fermentação efectuadas a 99 rpm, de acordo com a maior quantidade de biomassa formada no final da fermentação, em comparação com as condições restantes.

6.1.2 Temperatura

As fermentações realizadas com meio complexo são relativamente céleres no que diz respeito, ao crescimento de biomassa, devendo-se ao facto, da composição deste meio, incluir extracto de levedura e peptona. Uma vez que a temperatura óptima de crescimento da *E. coli* verifica-se a 37°C, a alteração deste valor apresenta consequências directas em parâmetros como, a taxa específica de crescimento, e carência de O₂, minimizando os efeitos tóxicos, causados pela produção de metabolitos, resultantes do metabolismo celular e logicamente na produtividade da hSCOMT (Riesenberg *et al.*, 1991 e Lee e Chang, 1999 e Carnes A., 2005).

Com base nos resultados em termos de actividade específica (Figura 17) e produtividade mássica (Figura 18) da proteína alvo, observamos os efeitos da manipulação da temperatura nas fermentações realizadas.

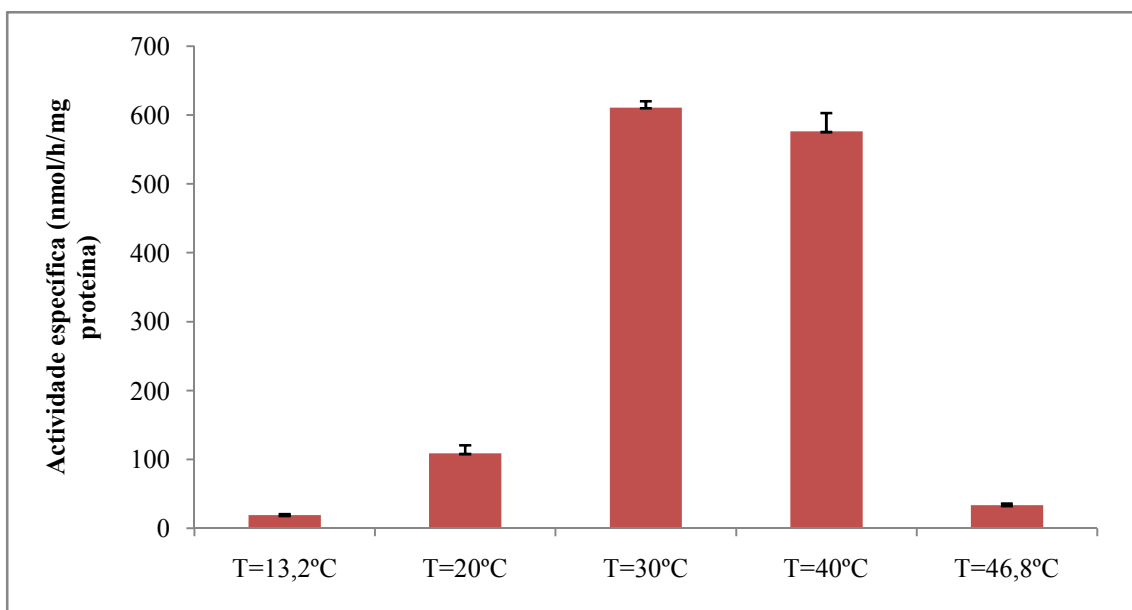


Figura 17 - Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

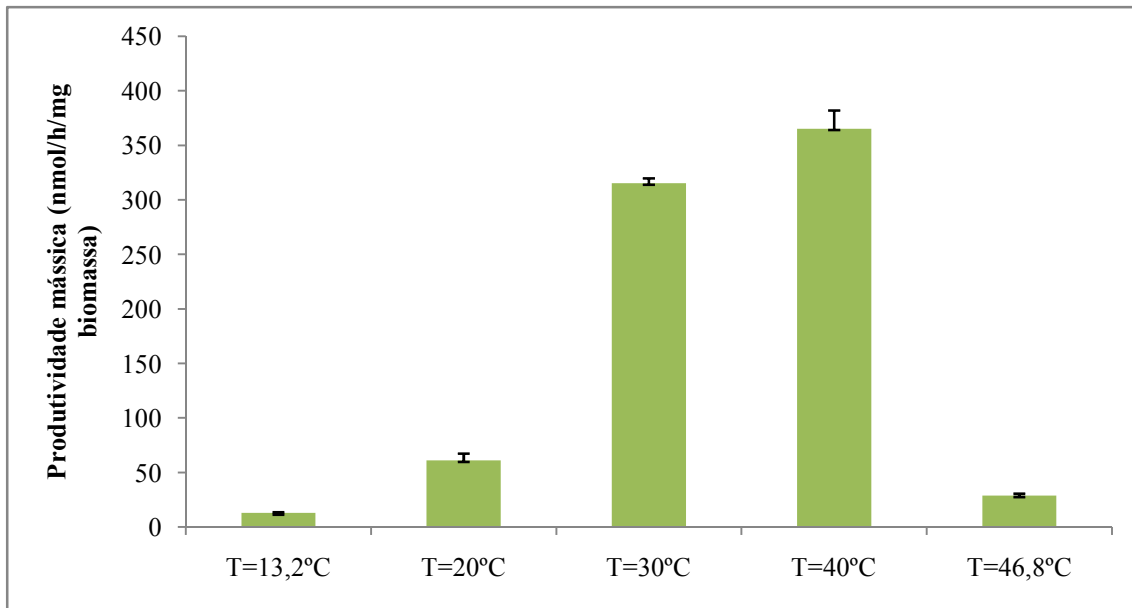


Figura 18 - Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

Os resultados obtidos em termos de manipulação da temperatura, mostram que as condições de fermentação realizadas a 30 e 40°C apresentam incrementos significativos quando comparados com as temperaturas de 20 e 46,8°C. Pelo contrário, as condições que registam menores valores de actividade específica e produtividade mássica, são a 13,2 e 46,8°C. Sendo estas, condições de temperatura, bastante agressivas para o processo de crescimento da *E. coli*, verificando-se por isso, uma menor quantidade de biomassa produzida no final das fermentações efectuadas, e consequentemente menor concentração celular.

6.1.3 pH

O controlo do pH, em qualquer meio de cultura, é fundamental para o crescimento de microrganismos como a *E. coli*. O pH favorável no crescimento da biomassa é aproximadamente neutro, contudo é necessário um controlo do seu valor ao longo do processo de fermentação, uma vez que este parâmetro tende a aumentar, à medida que a fonte de carbono se esgota. A formação de compostos resultantes do metabolismo celular, como o acetato, é um indicador de alteração do pH no meio (Lee *et al.*, 1996 e Maré L. *et al.*, 2007). De acordo com a influência do pH na actividade específica (Figura 19) e na produtividade mássica (Figura 20) da proteína hSCOMT, apresentamos os seguintes valores, relativamente às fermentações efectuadas.

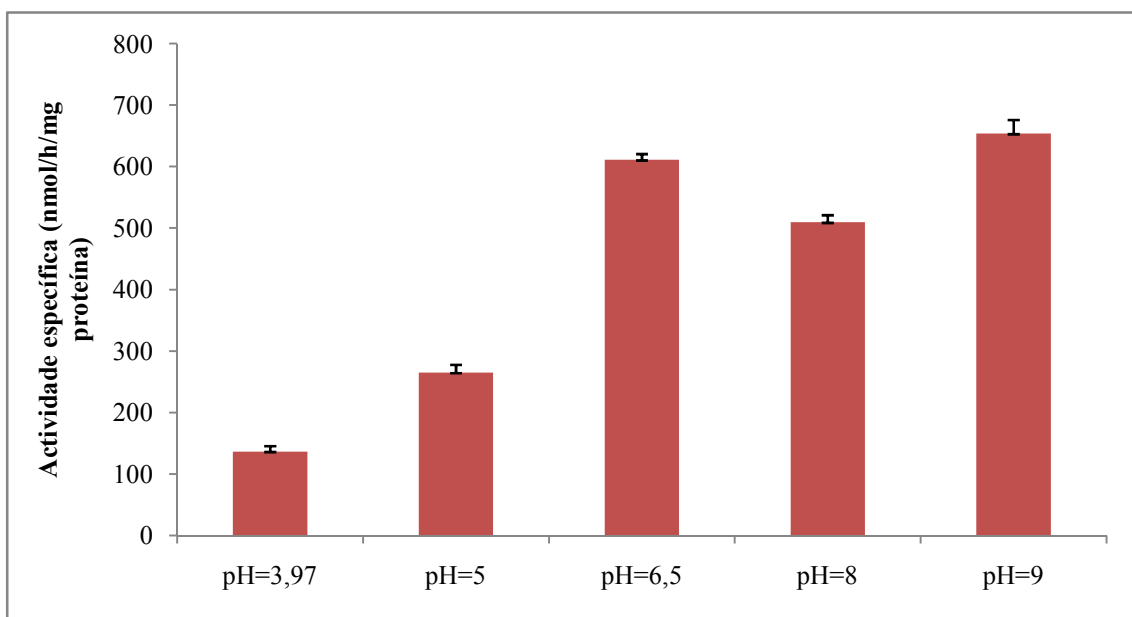


Figura 19 - Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

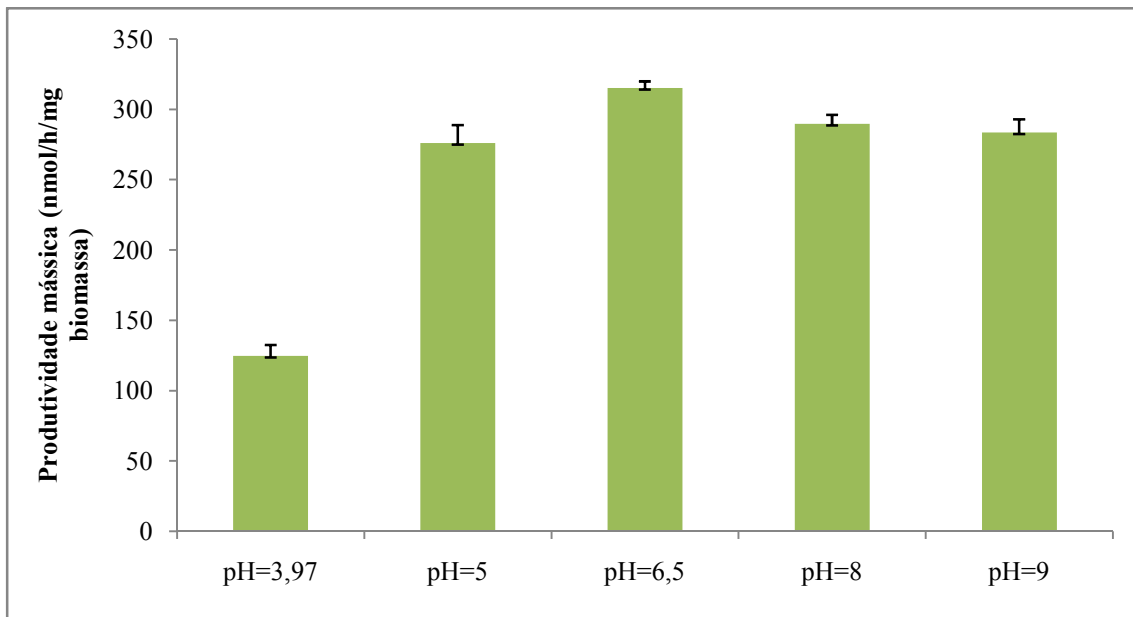


Figura 20 - Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio SOB, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

Das análises das figuras 19 e 20, observamos que a actividade específica e produtividade mássica da hSCOMT, são afectadas pelo pH inicial do meio de cultura. Assim condições de fermentação realizadas a pH 6,5; 8 e 9, apresentam maiores resultados em termos de actividade específica da hSCOMT. Especificamente, esta gama de pH, encontra-se estritamente associada ao aumento de produção de proteínas recombinantes (Fieschko e Ritsch, 1996 e Carnes A., 2005). Como pHs ácidos, 3,97 e 5, são mais agressivos, inibem o crescimento da *E. coli*, consequentemente traduzindo-se em menores valores de actividade da enzima hSCOMT. No entanto, em termos de produtividade mássica da proteína, para pH de 3,97 e 5 registam-se valores apreciáveis para condições testadas, verificando-se um incremento de resultados obtidos quando comparados com a actividade específica, uma vez que, os valores de concentração celular são relativamente elevados.

6.2 Meio Semi-definido

Geralmente os meios semi-definidos fornecem condições de crescimento reprodutíveis na produção de proteínas heterólogas (Thiry e tal., 2002). De seguida apresentamos, os resultados com base na actividade específica (Figura 21) e produtividade mássica (Figura 22) da hSCOMT.

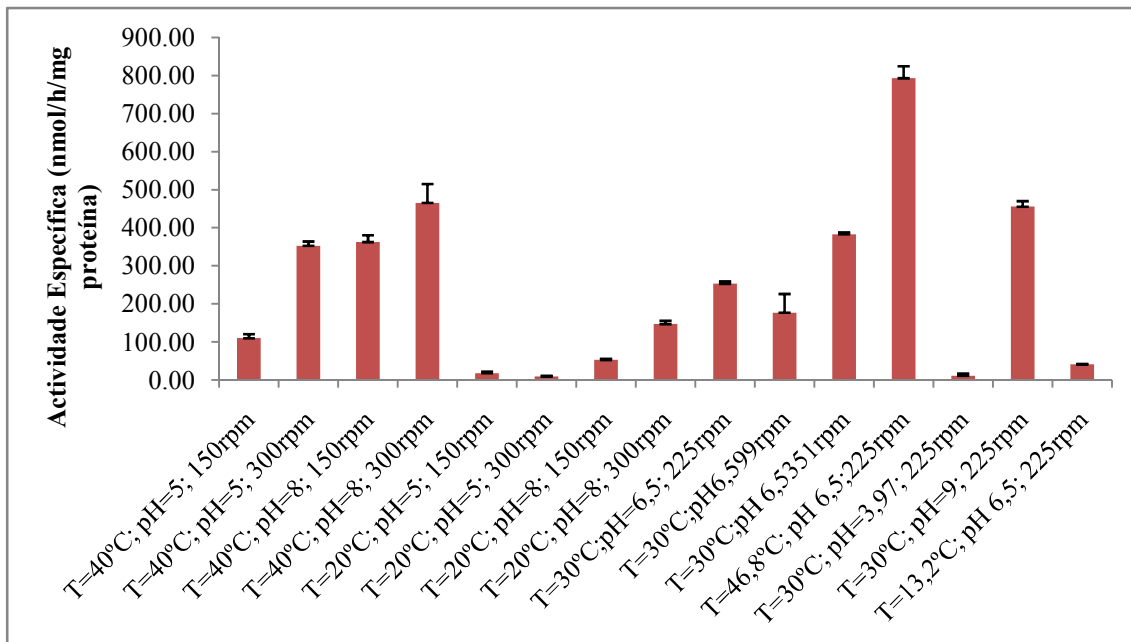


Figura 21 - Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio semi-definido, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

De forma geral, quando estudos similares são realizados em meio semi-definido observa-se que, em termos de actividade específica da proteína alvo, apresentam melhores resultados a 46,8°C de temperatura, a pH inicial de 6,5 e 9 e rotações de 225 e 300 rpm. Das condições testadas, as que apresentam um valor menor de actividade, foram realizadas a uma temperatura de 13,2 e 20°C, pH inicial de 3,97 e 5 com uma agitação de 150 rpm.

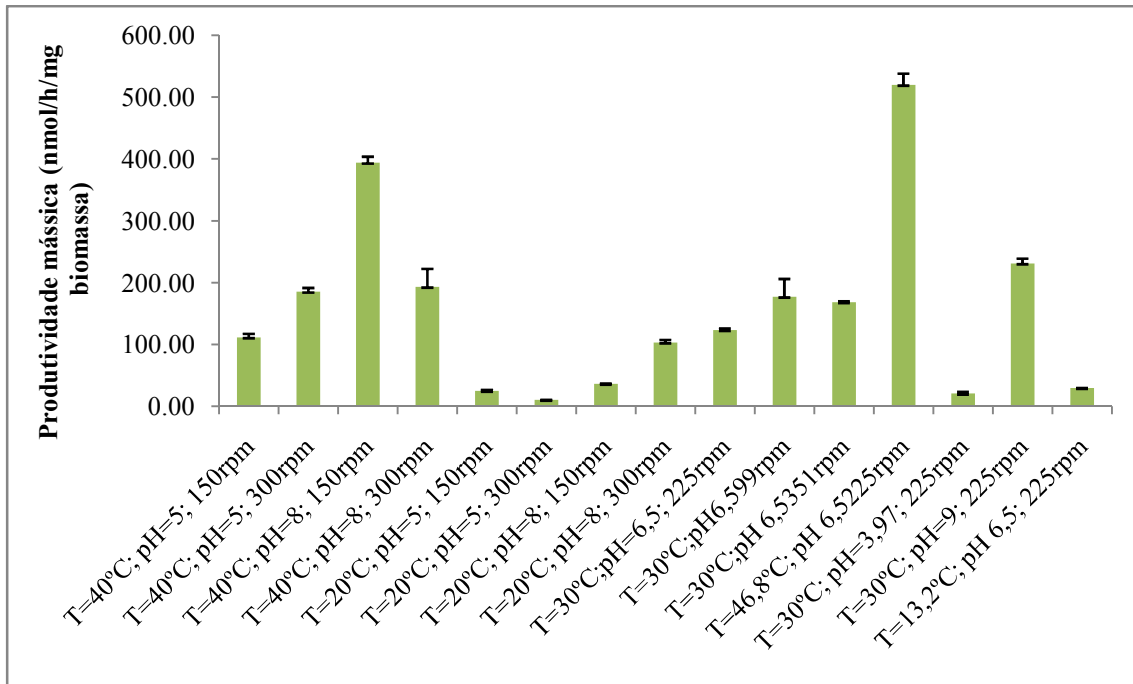


Figura 22 - Estudos comparativos das diferentes condições de fermentação, testadas com o meio semi-definido, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo efectuado a 37°C e 250 rpm.

A apresentação dos resultados em termos de produtividade mássica (figura 22), indica que temperaturas de 46,8°C e 40°C incrementam o parâmetro em análise. Destacam-se condições de fermentação realizadas a 40°C, pH 8, com rotações de 150 rpm, bem como a 46,8°C, pH 6,5 e 225 rpm, que obteve maior crescimento microbiano no final de cada fermentação.

Contrariamente, os ensaios que demonstram um menor valor de produtividade mássica, foram efectuados a 13,2 e 20°C, a pH inicial de 3,97 e 5 e a 150 rpm, verificando-se menores valores em termos de concentração final de biomassa nas fermentações realizadas nestas condições.

6.2.1 Agitação

O crescimento de *E. coli* em meios de fermentação semi-definidos, requerem boas taxas de oxigenação, pois tendencialmente obtêm-se elevadas concentrações de biomassa. Assim o nível de O₂, é um parâmetro fundamental que influencia o metabolismo celular e naturalmente o crescimento microbiano, bem como o rendimento de proteína alvo. Outro factor determinante, no crescimento celular e logicamente, na produção de proteínas heterólogas, é a geração de calor metabólico proveniente das células, e da agitação mecânica, frequente em fermentações com elevadas densidades celulares (Kumar *et al.*, 1991 e Matsui *et al.*, 1999). De acordo com a influência da velocidade de agitação na actividade específica (Figura 23) e na produtividade mássica (Figura 24) da proteína hSCOMT, registamos os seguintes valores, relativamente às fermentações realizadas.

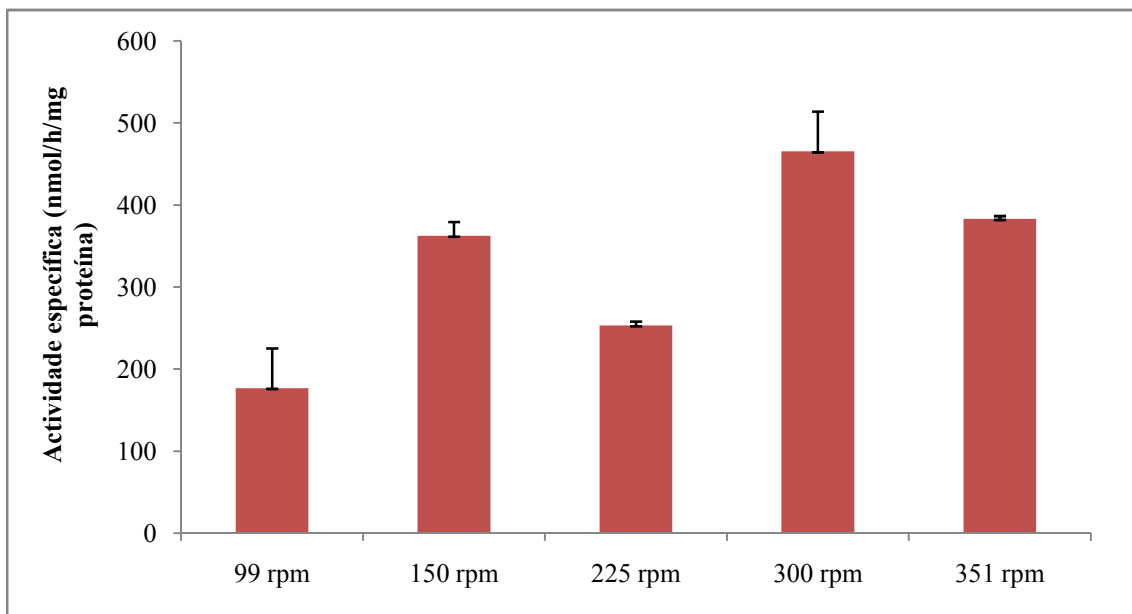


Figura 23 - Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de Actividade Específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

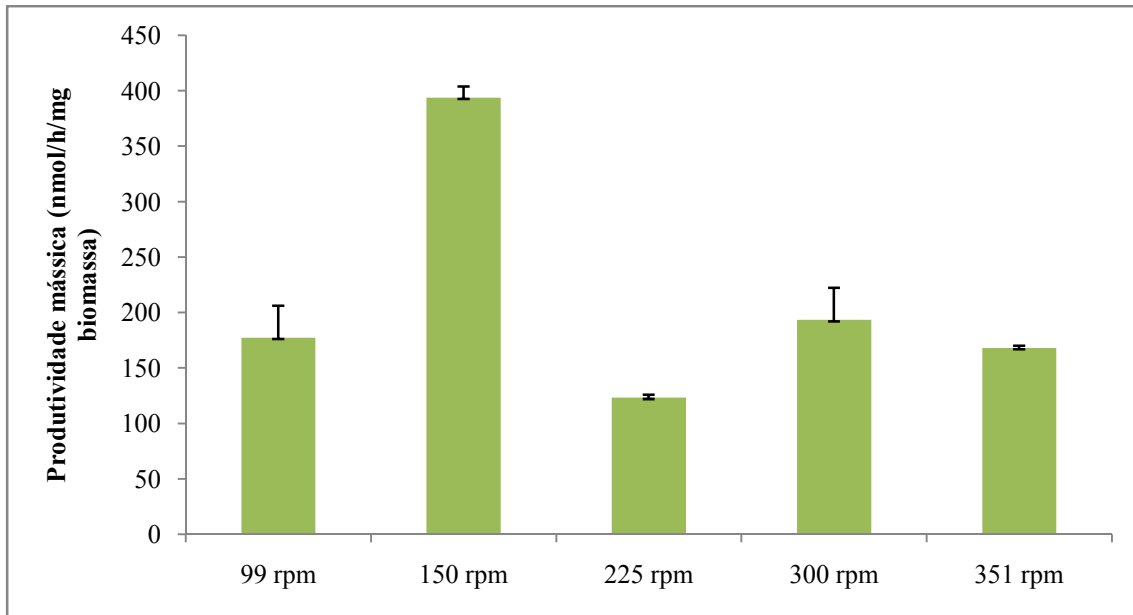


Figura 24 - Estudos comparativos das diferentes condições de agitação (rpm) em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

As fermentações realizadas a 300 e 351 rpm, apresentam um maior valor de actividade específica (figura 23), comparado com os outros ensaios realizados. Os resultados obtidos, vão de encontro com o que se encontra descrito na literatura uma vez que, quando as condições de fermentação são realizadas a rotações elevadas, obtêm-se maiores valores de actividade da proteína hSCOMT, pois tratam-se de culturas com elevadas densidades celulares que requerem grandes taxas de oxigenação. Curiosamente, o maior valor encontrado, em termos de produtividade mássica (figura 24), obteve-se em condições de fermentação efectuadas a 150 rpm, devido à elevada concentração celular registada no final da fermentação.

6.2.2 Temperatura

A temperatura do meio de cultura é uma variável importante utilizada para o controlo do metabolismo celular. Operando em meio semi-definido, a uma temperatura superior a 37°C (temperatura óptima de crescimento da *E. coli*) obtêm-se elevadas concentrações celulares, de uma forma mais célere, devido essencialmente à constituição deste meio (MacDonald e Neway, 1990 e Carnes A., 2005). Com base nos resultados em termos de actividade específica (Figura 25) e produtividade mássica (Figura 26) da proteína alvo, observamos os efeitos da manipulação da temperatura nas fermentações realizadas.

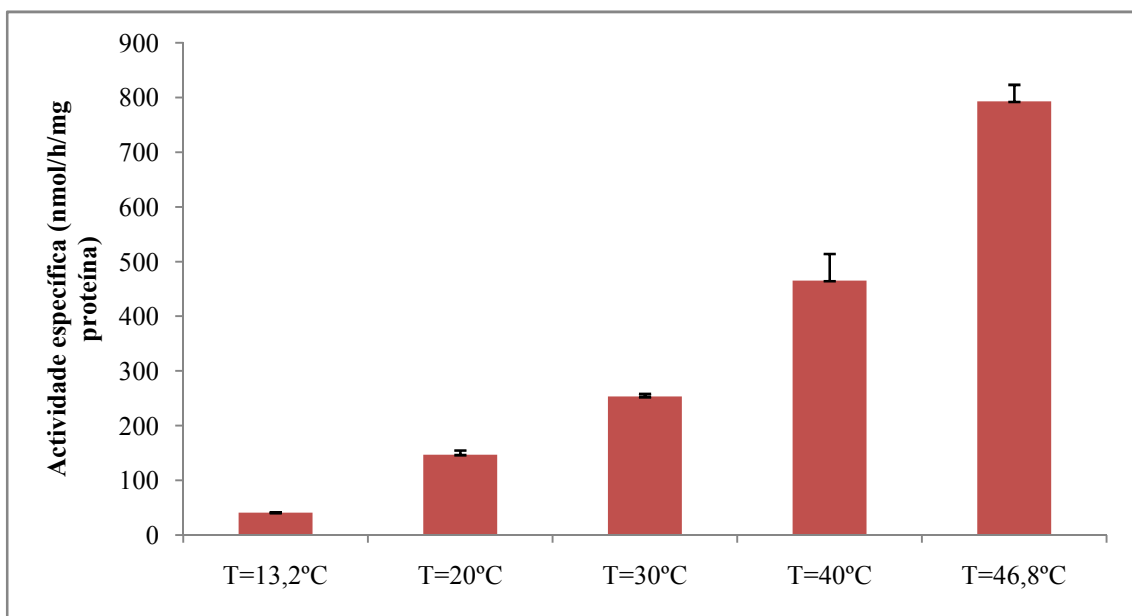


Figura 25 - Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuada a 37°C e 250 rpm.

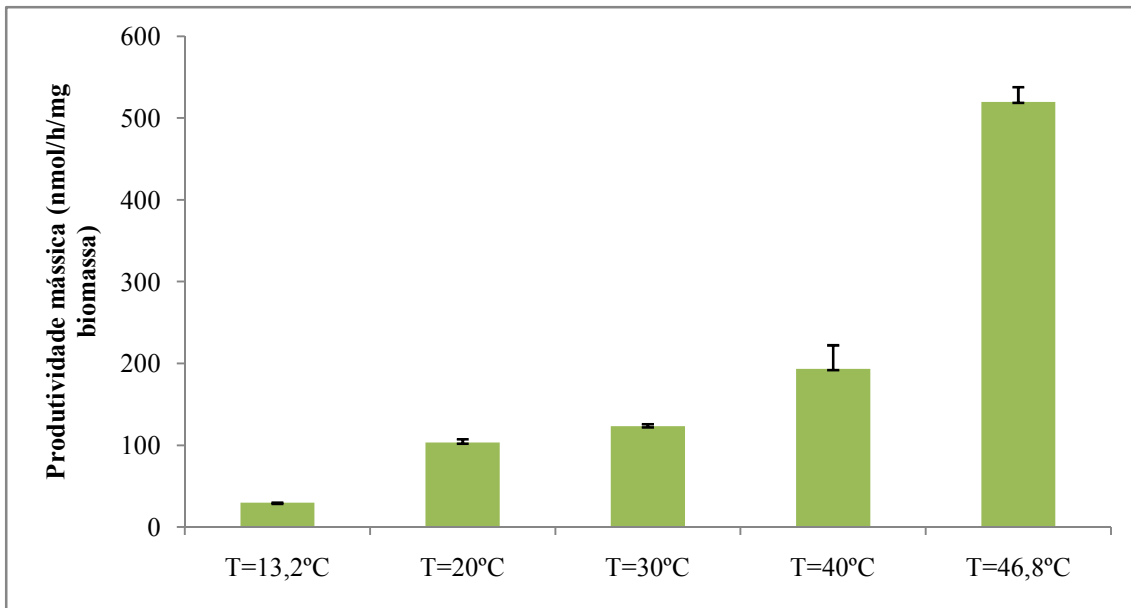


Figura 26 - Estudos comparativos das diferentes condições de temperatura em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de Produtividade Mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuada a 37°C e 250 rpm.

De acordo com a literatura, em experiências *batch*, o crescimento de *E. coli* e consequentemente a produção da proteína alvo, reúne melhores valores numa gama de temperaturas de 17 a 37°C (Levisauskas *et al.*, 2003). Assim, da análise das figuras 25 e 26 respectivamente, em termos de actividade específica e produtividade mássica da hSCOMT, mostram que a fermentação realizada a 46,8°C apresenta melhores resultados em relação às restantes condições efectuadas, facto este que não se verifica em meio complexo. Assim, fermentações realizadas em meio semi-definido, a uma temperatura de 46,8°C são favoráveis ao crescimento de *E. coli* e consequentemente à produção de proteína alvo.

Pelo contrário, as condições que registam menores valores de actividade específica e produtividade mássica, são a 13,2 e 20°C. Sendo estas, condições de temperatura, bastante limitantes para o processo de crescimento da *E. coli*, traduzindo-se numa reduzida concentração celular no final de cada fermentação.

6.2.3 pH

O crescimento da biomassa, está associado a pHs aproximadamente neutros, contudo é necessário um controlo do seu valor, pois este tende a aumentar, à medida que se consome a fonte de carbono. A formação de compostos resultantes do metabolismo celular, como o acetato, é um indicador de alteração do pH no meio (Lee *et al.*, 1996 e Maré L. *et al.*, 2007). Apresentamos, seguidamente os resultados em termos de actividade específica (Figura 15) e produtividade mássica (Figura 16) da proteína alvo, resultantes da manipulação do pH, efectuado nas fermentações realizadas.

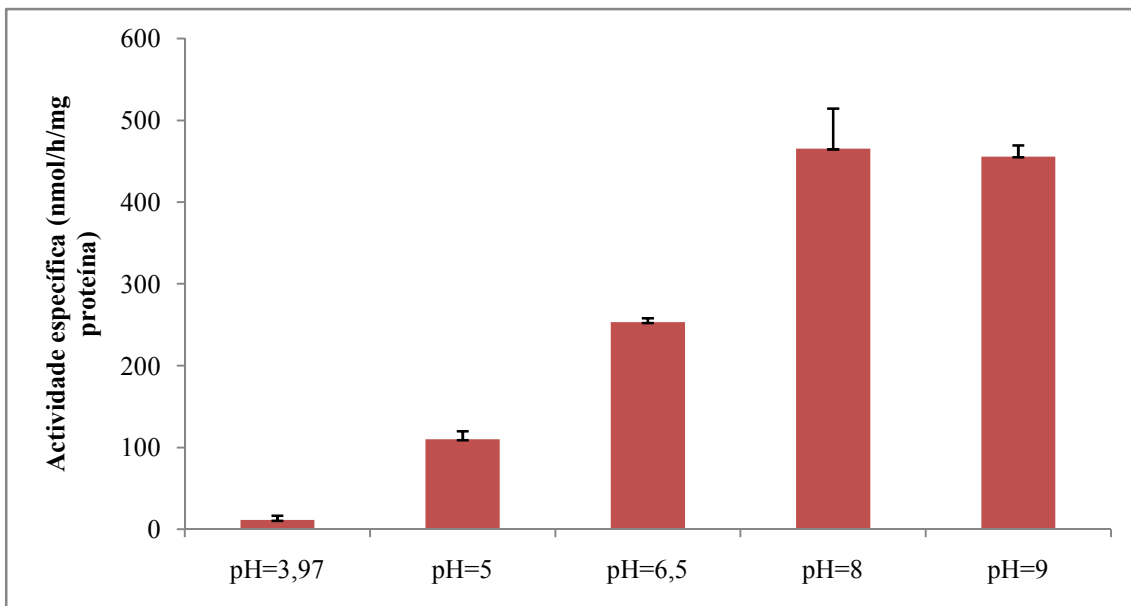


Figura 27 - Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de actividade específica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

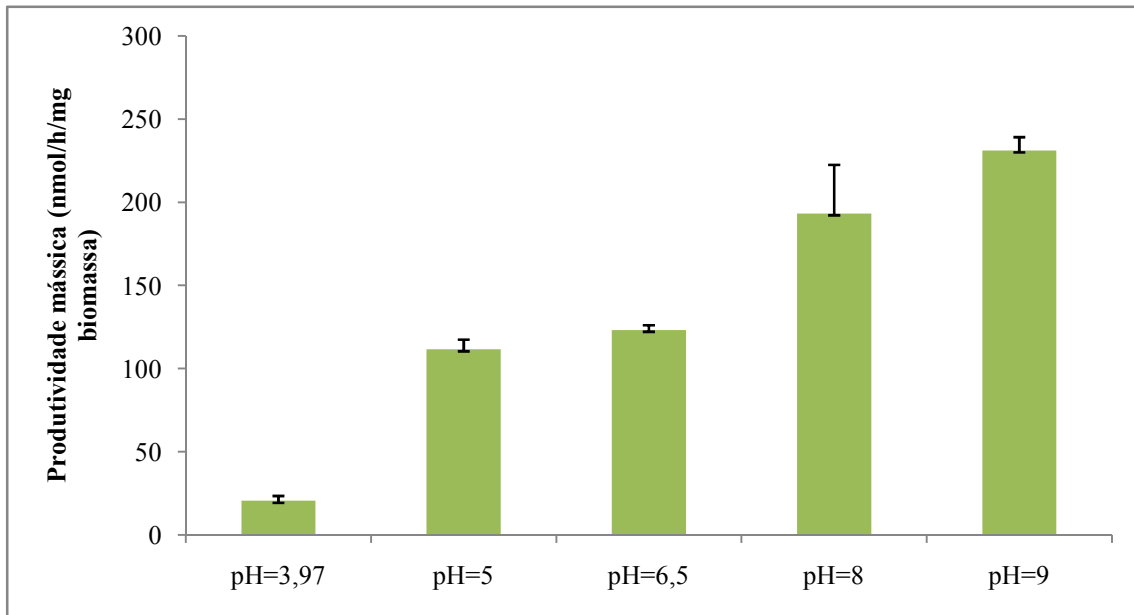


Figura 28 - Estudos comparativos das diferentes condições de pH em fermentações testadas com o meio semi-definido, em termos de produtividade mássica da hSCOMT (nmol/h/mg proteína). Controlo de fermentações efectuado a 37°C e 250 rpm.

Pelas figuras 27 e 28, observamos que a actividade específica e produtividade mássica da hSCOMT, respectivamente, são afectadas pelo pH inicial do meio de cultura. Assim condições de fermentação realizadas a pH 6,5; 8 e 9, apresentam incrementos na actividade específica da hSCOMT, como já tínhamos verificado em meio complexo. Em termos de produtividade mássica da proteína, registam-se valores apreciáveis para condições testadas a pH 8 e 9, relacionados com a elevada concentração celular obtida no final destes ensaios.

6.3 Comparação da Performance - Meio complexo vs Meio semi-definido

Tendo em consideração os resultados experimentais obtidos, a partir das fermentações realizadas em meio complexo e semi-definido, seguidamente efectuamos uma comparação, tendo em conta o desempenho destes dois meios.

Tabela 8 – Valores médios de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final obtidos, em meio de cultura SOB e semi-definido, para os seis ensaios realizados a 30°C, pH inicial de 6,5 e com agitação de 225rpm.

Fermentações/ Condições			Meio de cultura	Actividade específica (nmol/h/mg proteína)	[X] (g/L)	[Gl] (g/L)	Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL)	Produtividade Mássica (nmol/h/mgX)	pH final
T=30°C	pH 6,5	225 rpm	SOB	578,19 ± 21,19	1,1	-	346,92 ± 12,7	318,6 ± 11,76	7,13
			S.D	244,18 ± 15,82	1,28	0,98	143,63 ± 7,50	115,7 ± 10,13	6,43

De acordo com a Tabela 8, podemos referir que as condições de fermentação testadas a 30°C, pH inicial de 6,5 e 225 rpm, registaram valores superiores no meio complexo (SOB), quando comparado com o meio semi-definido, em parâmetros como a actividade específica, produtividade volumétrica e mássica da proteína hSCOMT. Este facto deve-se provavelmente, à diferente composição existente entre os dois meios de fermentação, como a existência de extracto de levedura no meio complexo, e glicerol, como principal fonte de carbono no meio semi-definido. Relativamente aos pHs finais das fermentações, não se registam discrepâncias significativas em relação aos pHs dos meios de fermentação.

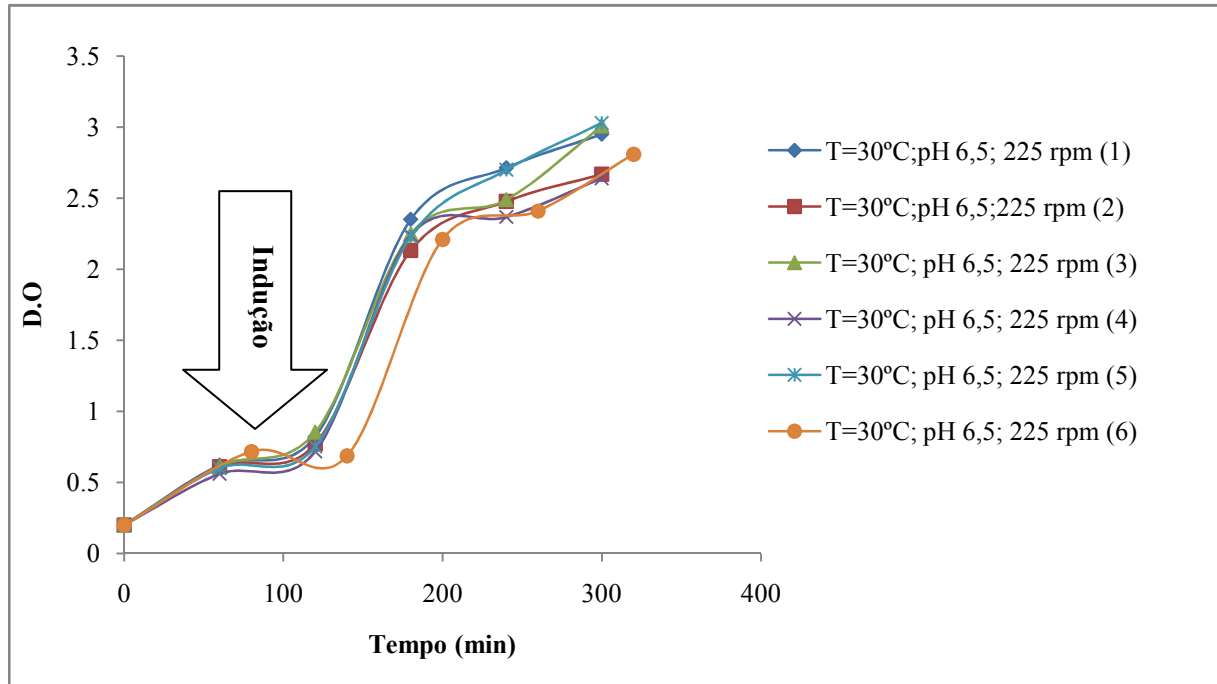


Figura 29 – Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB, testadas a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 225 rpm.

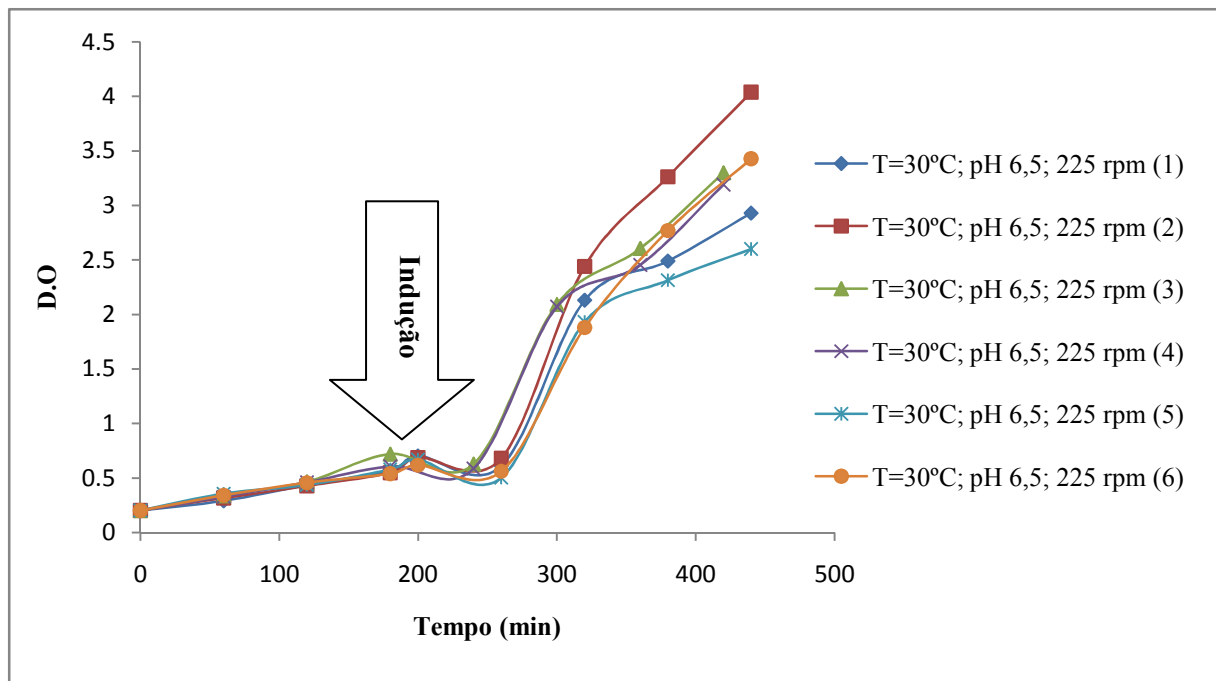


Figura 30 - Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, testadas a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 225 rpm.

Analisando as Figuras 29 e 30, observamos que o crescimento da *Escherichia coli* em meio complexo é mais célere que em meio semi-definido, bem como o tempo que a fermentação demora a atingir uma densidade óptica de 0,7 de forma que a produção de hSCOMT seja induzida com a adição de IPTG. Contudo a densidade óptica final, registada no meio semi-definido é ligeiramente superior à encontrada para o meio complexo, verificando-se consequentemente maiores valores em termos de concentração de biomassa, para este meio.

Relativamente ao meio semi-definido, que inclui na sua composição, o glicerol, como principal fonte de carbono, podemos observar pela análise do cromatograma obtido (Figura 30), o consumo deste composto ao fim de 7 horas de fermentação e compara-lo com a concentração de glicerol inicial presente no meio de cultura. Verifica-se que houve uma redução considerável deste composto ao longo do tempo de fermentação. Tipicamente, o glicerol é identificado a um tempo de retenção característico de aproximadamente 20 minutos; contudo cerca dos 13 minutos aparece um pico que não conseguimos identificar.

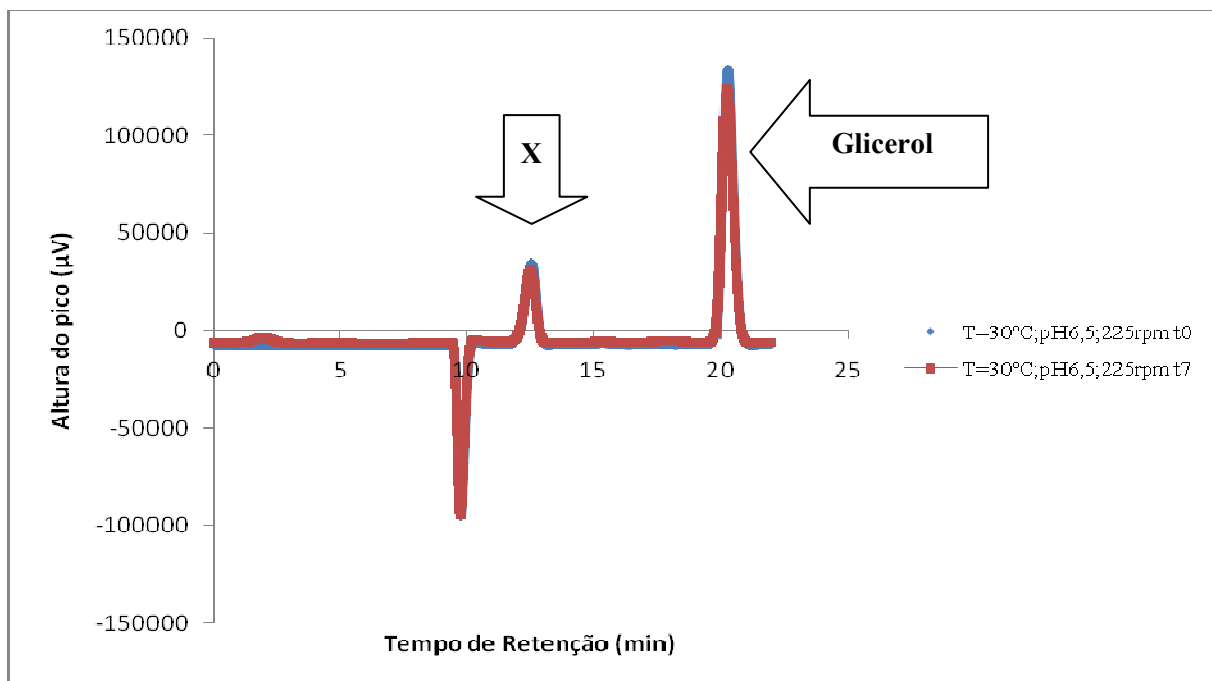


Figura 31 – Cromatograma típico, obtido para a quantificação de glicerol, na fermentação realizada a 30°C, a pH 6,5 e 225rpm.

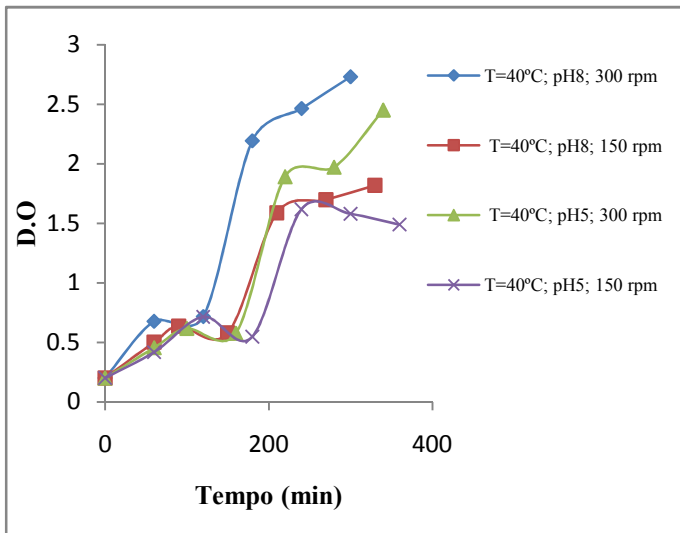
Tabela 9 - Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 40°C, pH inicial de 5 e 8 e com agitação de 150 e 300 rpm.

Fermentações/ Condições			Meio de cultura	Actividade específica (nmol/h/mg proteína)	[X] (g/L)	[Gl] (g/L)	Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL)	Produtividade Mássica (nmol/h/mgX)	pH final
T=40°C	pH 5	150 rpm	SOB	264,90 ± 12,36	0,58	-	158,94 ± 7,41	276,13 ± 12,88	6,08
			S.D	109,9 ± 10,06	0,59	0,33	65,93 ± 10,22	111,54 ± 6,04	5,12
		300 rpm	SOB	576,23 ± 26,68	0,95	-	345,74 ± 16,01	365,31 ± 16,92	6,85
			S.D	352,65 ± 10,60	1,14	0,21	211,59 ± 5,57	185,36 ± 6,36	5,19
	pH 8	150 rpm	SOB	333,25 ± 19,77	0,70	-	199,95 ± 11,86	284,40 ± 16,87	7,41
			S.D	371,97 ± 17,07	0,55	0,98	223,18 ± 18,55	404,02 ± 10,24	7,59
		300 rpm	SOB	509,31 ± 11,39	1,05	-	305,59 ± 6,83	284,40 ± 6,48	7,71
			S.D	109,9 ± 48,78	0,59	0,98	65,93 ± 20,26	111,54 ± 29,27	5,12

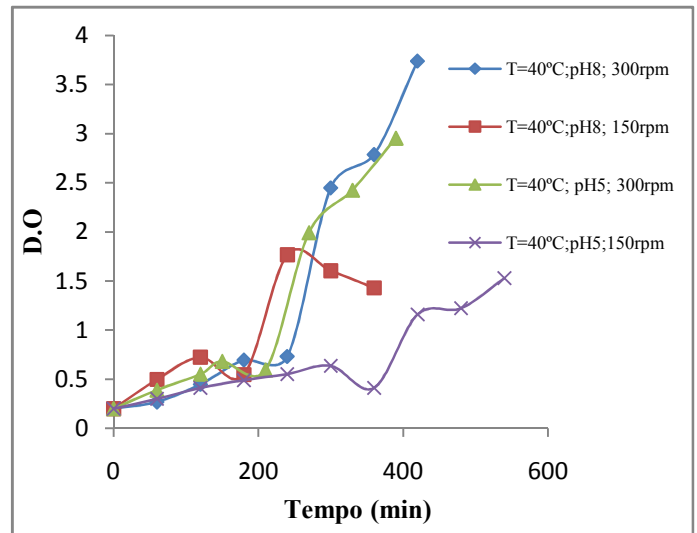
Com base na Tabela 9, podemos observar que, o meio complexo (SOB) reúne uma formulação adequada para a obtenção de actividades específicas, produtividades volumétricas e mássicas elevadas em condições de fermentação de 40°C, pH inicial de 5 a 150 e 300 rpm, bem como a pH inicial 8 e agitação de 300 rpm.

Adicionalmente ao que foi referido anteriormente, a cultura de *E. coli* apresenta um crescimento maior em meio complexo (SOB) (Figura 32-A) do que em meio semi-definido (Figura 32-B), necessitando de um menor tempo para atingir a D.O necessária à indução com IPTG.

Relativamente à D.O final atingida em cada meio de fermentação, podemos observar que para condições realizadas a 300 rpm quer para meio semi-definido quer para meio complexo, a D.O apresenta o máximo valor atingido neste tipo de ensaios.



A



B

Figura 32 – A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB; B: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido. Ambos testados a 40°C, a pH inicial de 5 e 8 e com agitação de 150 e 300 rpm.

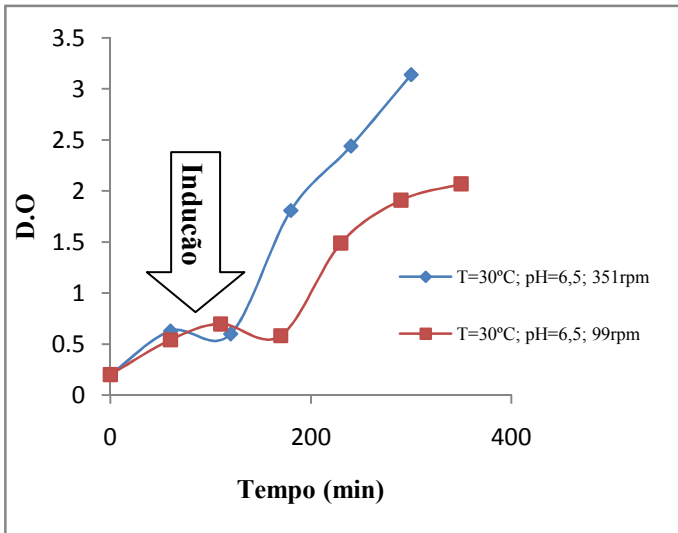
Foram realizados ensaios de modo análogo aos restantes efectuados, variando a temperatura. Assim realizaram-se fermentações a 20°C, pH inicial de 5 e 8 e rotações de 150 e 300 rpm. Não se registando valores significativos de actividade específica, produtividade volumétrica e mássica de proteína alvo, bem como de concentração final de biomassa.

Contudo os valores mais elevados em termos de actividade específica, produtividade mássica e volumétrica, registaram-se em meio complexo. Destacam-se condições testadas a 20°C, pH inicial de 5 e 300 rpm, que obtiveram um valor de actividade específica para a enzima hSCOMT de, $109,0 \pm 11,63$, produtividade mássica e volumétrica de $61,10 \pm 6,52$ e $65,38 \pm 6,98$, respectivamente. Para a mesma temperatura, embora a um pH inicial de 8 e 300 rpm, encontraram-se valores de actividade específica para a proteína hSCOMT de, $143,18 \pm 7,69$, produtividade mássica de $100,40 \pm 4,61$ e volumétrica de, $85,91 \pm 5,39$.

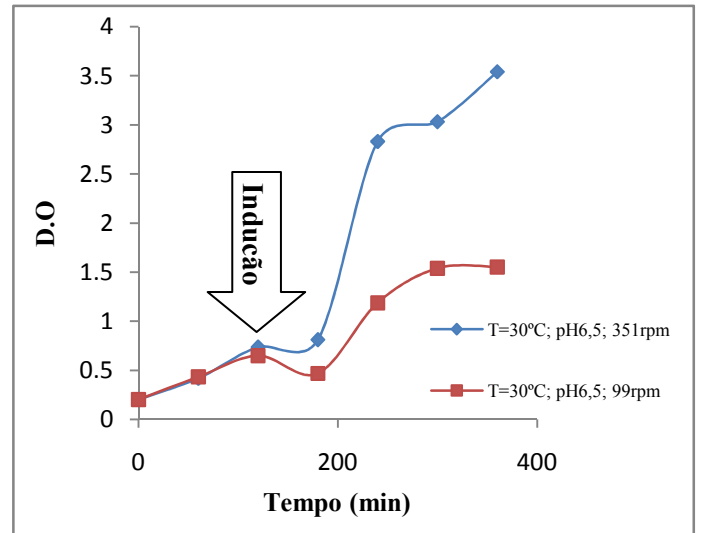
Tabela 10- Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 30°C, pH inicial de 6,5 e 99 e 351rpm.

Fermentações/ Condições			Meio de cultura	Actividade específica (nmol/h/mg proteína)	[X] (g/L)	[Gl] (g/L)	Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL)	Produtividade Mássica (nmol/h/mgX)	pH final
T=30°C	pH 6,5	99 rpm	SOB	827,17 ± 7,71	0,80	-	496,30 ± 4,62	620,66 ± 5,78	6,49
			S.D	176,91 ± 48,34	0,60	0,98	106,15 ± 48,44	177,28 ± 29,01	6,37
		351 rpm	SOB	880,06 ± 4,79	1,21	-	528,04 ± 2,88	435,32 ± 2,37	7,21
			S.D	383,03 ± 3,65	1,37	0,99	229,82 ± 1,60	168,06 ± 2,19	6,47

Tendo em conta a Tabela 10, podemos deduzir que as condições de fermentação testadas a uma temperatura de 30°C, a pH inicial de 6,5 e a 99 rpm registaram melhores valores de actividade específica, produtividade mássica e volumétrica da enzima hSCOMT em meio complexo do que em meio semi-definido. O mesmo acontece para condições realizadas a uma temperatura de 30°C, a um pH inicial de 6,5 e a 351 rpm, que recolhem valores mais elevados, em relação aos parâmetros referidos, para o meio complexo (SOB) em relação ao meio semi-definido. Isto deve-se ao facto das fermentações realizadas em meio complexo, atingirem geralmente uma concentração de biomassa final, superior há registada em meio semi-definido. Tendo em consideração o pH final das fermentações realizadas, não se verificam discrepâncias significativas, em relação ao pH inicial do meio.



A



B

Figura 33- A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. B: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, ambos testados a 30°C, a pH inicial de 6,5 e 99 e 351rpm.

Pela análise das Figuras 33 – A e B, é possível observar que as condições de fermentação realizadas a 99 rpm não registam um crescimento de *E. coli* elevado. Este facto deve-se essencialmente, há reduzida concentração de biomassa produzida, quer em meio complexo, quer em meio semi-definido, afectados pela reduzida velocidade de agitação e consequentemente pela menor transferência de O₂ para as células durante o processo de fermentação.

Por outro lado, as condições de fermentação efectuadas a 351 rpm verificam que o crescimento de *E. coli* em ambos os meios de cultura apresentam densidades ópticas muito próximas (aproximadamente 3,5), devido há elevada velocidade de agitação e consequentemente há maior transferência de O₂ para as células. Nestas condições realizadas, o tempo de fermentação é relativamente semelhante entre os dois meios testados.

Tabela 11 - Valores de Actividade Específica (nmol/h/mg proteína), Concentração de Biomassa [X] (g/L), Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL), Produtividade Mássica (nmol/h/mgX), Concentração de Glicerol [Gl] e pH final, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 13,2°C e 46,8°C, pH inicial de 6,5 e 225rpm.

Fermentações/ Condições			Meio de cultura	Actividade específica (nmol/h/mg proteína)	[X] (g/L)	[Gl] (g/L)	Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL)	Produtividade Mássica (nmol/h/mgX)	pH final
T=13,3°C	pH 6,5	225 rpm	SOB	19,08 ± 1,77	0,90	-	11,45 ± 1,06	12,77 ± 1,19	7,43
			S.D	41,25 ± 0,41	0,83	0,99	24,75 ± 0,29	29,73 ± 0,24	6,45
SOB			33,47 ± 2,40	0,70	-	20,08 ± 1,44	28,72 ± 2,06	6,5	
S.D			793,13 ± 30,48	0,92	0,95	475,88 ± 19,97	519,78 ± 18,29	6,46	
T=46,8°C									

Tendo em consideração as condições de fermentação testadas é de considerar que estas são pouco utilizadas nestes estudos, mas para efeitos de modelação é importante ter pontos extremos, relativamente às variáveis em estudo. Deste modo, analisando a Tabela 11, tendo em conta as fermentações realizadas a uma temperatura de 13,2°C, a pH de 6,5 e a 225 rpm, registam valores pouco significativos de actividade específica, produtividade mássica e volumétrica da proteína hSCOMT, contudo são ligeiramente superiores em meio semi-definido do que em meio complexo. De modo mais significativo, para fermentações realizadas a 46,8°C de temperatura, a pH de 6,5 e 225 rpm, o meio semi-definido reúne melhores valores, comparativamente com os resultados obtidos para o meio complexo.

Adicionalmente, observando as curvas de crescimento (Figura 34 – A e B), verifica-se que em meio semi-definido, obtém-se um maior crescimento microbiano, consequentemente maior concentração de biomassa final para a fermentação realizada a 46,8°C, necessitando de um menor tempo para atingir a D.O necessária à indução com IPTG, do que a fermentação realizada a uma temperatura de 13,2°C.

Em meio complexo, ao contrário do que acontece no meio semi-definido, a fermentação realizada a 46,8°C, regista um menor crescimento de biomassa no final da fermentação, quando comparada com a realizada à temperatura de 13,2°C, que regista

uma maior densidade óptica, e naturalmente maior concentração de biomassa final, necessitando de várias horas para que a indução da proteína alvo seja processada.

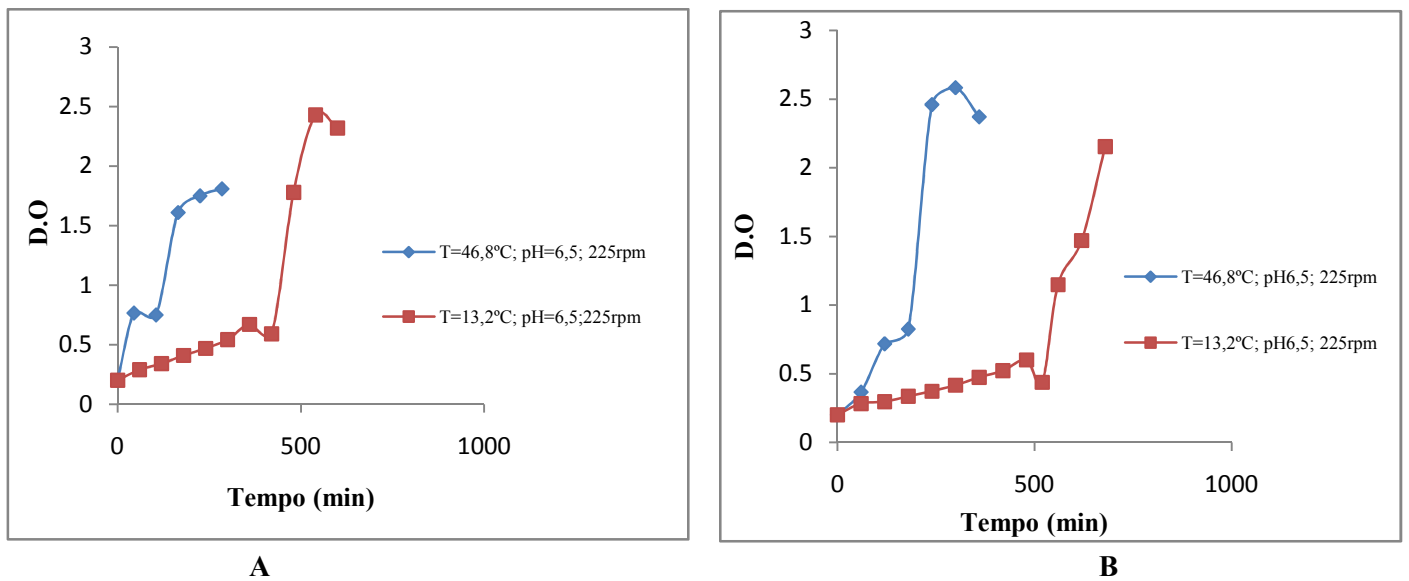


Figura 34 – A: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. B: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, ambos testadas a 13,2°C e 46,8°C, pH inicial de 6,5 e com agitação de 225rpm.

Tabela 12- Valores de actividade específica (nmol/h/mg proteína), de concentração de Biomassa [X] (g/L), produtividade volumétrica (nmol/h/mL), produtividade mássica (nmol/h/mgX), concentração de glicerol [G] e pH final para a hSCOMT, em meio de cultura SOB e semi-definido, testadas a 30°C, pH inicial de 3,97 e 9,0 e 225rpm.

Fermentações/ Condições			Meio de cultura	Actividade específica (nmol/h/mg proteína)	[X] (g/L)	[G] (g/L)	Produtividade Volumétrica (nmol/h/mL)	Produtividade Mássica (nmol/h/mgX)	pH final
T=30°C	pH 3,97	225 rpm	SOB	136,51 ± 8,56	0,66	-	81,91 ± 5,14	124,73 ± 7,82	4,97
			S.D	11,35 ± 5,17	0,33	0,407	6,81 ± 6,86	20,51 ± 3,10	4,16
	SOB		653,58 ± 22,03	1,38	-	392,15 ± 13,22	283,56 ± 9,56	8	
	S.D		463,18 ± 13,53	1,18	1,13	277,91 ± 6,86	234,91 ± 8,12	7,82	

Considerando a Tabela 12, identificamos que as fermentações efectuadas a uma temperatura de 30°C, pH inicial de 3,97 e 9, com rotações de 225 rpm, obtêm melhores valores de actividade específica, produtividade mássica e volumétrica da enzima hSCOMT, em meio complexo, comparativamente ao meio semi-definido. Contudo, não se registam discrepâncias significativas do pH final em relação ao inicial, nas fermentações realizadas a pH inicial de 3,97 em ambos os meios; o que não acontece para fermentações efectuadas a pH inicial de 9, registando-se um decréscimo relativamente ao pH inicial para ambos os meios de cultura.

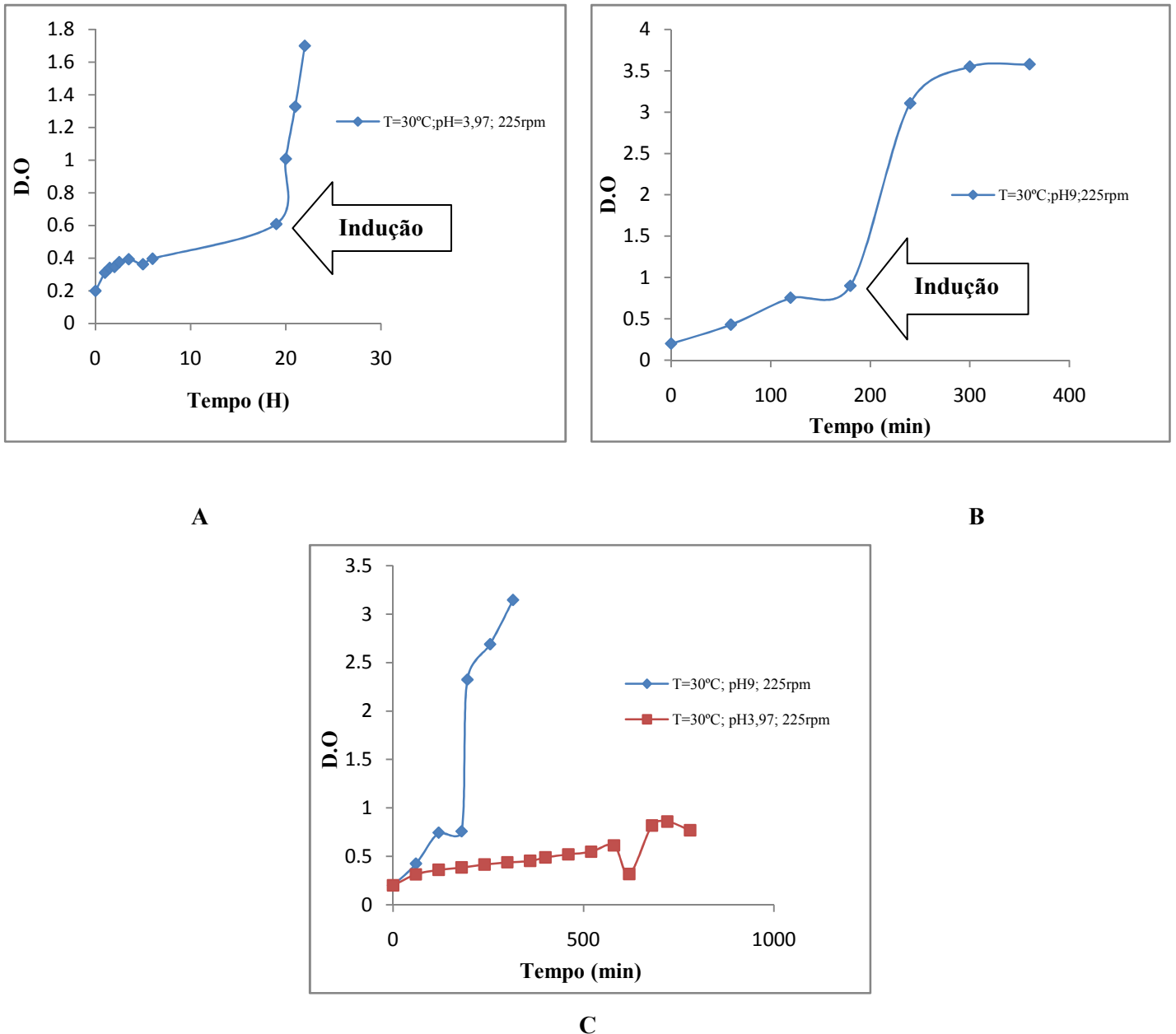


Figura 35- A e B: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura SOB. C: Curvas de crescimento de *Escherichia coli*, em meio de cultura semi-definido, testadas a 30°C, a pH inicial de 3,97 e 9,0 e 225rpm.

De acordo com a Figura 35 – A e B, reparamos que em meio complexo (SOB), a fermentação realizada a pH inicial de 3,97, necessita de cerca de 20 horas para atingir uma D.O compatível com a indução por IPTG, registrando-se um reduzido crescimento em termos de produção de biomassa. Em relação à fermentação testada a pH inicial alcalino (9), é notório um maior crescimento de *E. coli* em menor tempo de

fermentação, uma vez que o valor do pH inicial não inibe o crescimento dos microrganismos, como pHs muito ácidos (3,97).

De igual modo observa-se a partir da Figura 35 - C, que a fermentação realizada a pH inicial de 9, obteve maior crescimento celular, necessitando de um menor tempo de fermentação, comparativamente com o ensaio realizado a pH inicial 3,97 (10 horas de processo para que ocorra indução) registando um crescimento bacteriano muito reduzido.

Comparativamente aos dois meios de fermentação testados, é possível afirmar que se obtém maior crescimento celular em meio complexo, do que em meio semi-definido, o facto do meio complexo incluir na sua composição extracto de levedura e peptona como fonte de carbono é determinante para a eficácia deste meio, nestas condições realizadas.

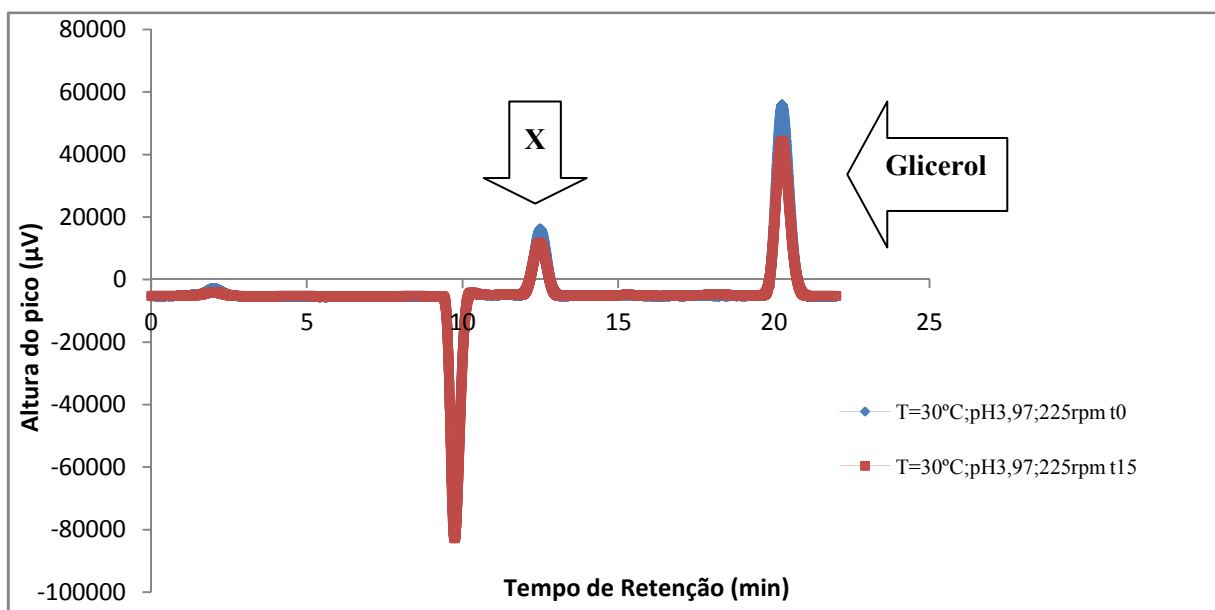


Figura 36 - Cromatograma típico, obtido para a quantificação de glicerol, na fermentação realizada a 30°C, a pH 3,97 e 225rpm.

Analisando a Figura 36, observamos um cromatograma típico, obtido para a quantificação de glicerol, presente em meio semi-definido, como principal fonte de carbono, nas condições de fermentação efectuadas.

É visível pelo pico do gráfico, que o glicerol aparece a um tempo de retenção de aproximadamente 20 minutos, registrando-se um consumo considerável pela *E. coli*, ao longo do tempo de fermentação. Inicialmente o pico de glicerol possui uma área de 6000 μV , enquanto que passadas 15 horas de fermentação o pico de glicerol regista cerca de 4000 μV , verificando-se um decréscimo de glicerol ao longo do tempo de fermentação.

7. Conclusão

O controlo de parâmetros do processo de produção da hSCOMT torna necessária a optimização de meios de cultura, manipulando variáveis essenciais ao desenvolvimento destes bioprocessos. Este trabalho tem como objectivo principal a implementação de modelos de pH e temperatura em sistemas de produção da proteína hSCOMT, determinando a influência das variáveis alvo na produtividade da hSCOMT. Com base em estudos, à escala de *erlenmeyers*, e manipulando as variáveis já referidas, testámos dois meios de fermentação, o meio complexo e semi-definido de maneira a compreender a influência desses parâmetros nos níveis de produção da proteína alvo.

Tipicamente, são formados produtos durante o crescimento da *E. coli*, como o acetato, que pode apresentar efeitos tóxicos acentuados, quando presente em determinadas concentrações no meio de cultura. Especificamente, elevadas concentrações de acetato, conduzem a uma redução do crescimento celular, afectando directamente, a biomassa formada e a produtividade do produto alvo. A substituição da fonte de carbono, pode ser a solução para reduzir os efeitos prejudiciais do acetato no meio, ao utilizar-se glicerol em vez de glucose.

Geralmente, velocidade de agitação, tem um papel fundamental no crescimento da *E. coli*, e naturalmente na produção de proteína alvo, traduzindo-se na quantidade de O₂ necessária ao meio de cultura, e consequentemente ao metabolismo dos microrganismos. Destacamos que, fermentações realizadas a velocidades de agitação elevadas, como por exemplo a 300 e 351 rpm, obtiveram melhores resultados em termos de crescimento da *E. coli*, bem como na produtividade da enzima hSCOMT.

De acordo, como *design* factorial pré-estabelecido, podemos concluir que de um modo geral, as fermentações realizadas em meio complexo, têm um crescimento celere, registando melhores valores em termos de actividade específica, produtividade volumétrica e mássica relativamente à produção da enzima hSCOMT. No que diz respeito ao meio semi-definido, as fermentações realizadas a temperaturas de 46,8, 40 e 13,2°C, pH inicial de 8 e 150 rpm, apresentam valores superiores de actividade específica, produtividade volumétrica e mássica da proteína hSCOMT, quando comparadas com as obtidas no meio complexo. É de salientar que, fermentações

realizadas com este meio têm um crescimento relativamente mais lento que o meio complexo, obtendo-se concentrações finais de biomassa ligeiramente superiores. Como se trata de um meio que possui como principal fonte de carbono, o glicerol, observamos que este composto vai ser amplamente consumido ao longo da fermentação, pois partimos de uma concentração inicial de 30 g/L, e no final obtemos em média cerca de 1g/L de glicerol.

Não é prudente considerarmos, relativamente aos meios de fermentação utilizados, que um seja mais eficiente em termos de crescimento da *E. coli* e conseqüentemente na produção de hSCOMT que outro, pois vai sempre depender das condições utilizadas em cada fermentação.

8. Referências

- Adinarayana K., Ellaiah P., Srinivasulu B., Devi R., Adinarayana G.. **Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation.** *Process Biochemistry*, 38 (2003), 1565-1572.
- Alba, M.J.G. e Calvo, E.G. **Characterization of bioreaction processes: aerobic *Escherichia coli* cultures.** *Journal of Biotechnology*, 84 (2) (2000), 107 – 118.
- Andersen DC, Krummen L. **Recombinant protein expression for therapeutic applications.** *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002), 117–123.
- Baas H, Beiske AG, Ghika J, Jackson M, Oertel WH, Poewe W, Ransmayr G. **Catechol-*O*-methyltransferase inhibition with tolcapone reduces the “wearing off” phenomenon and levodopa requirements in fluctuating parkinsonian patients.** *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 63 (1997), 421–428.
- Baneyx F. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Current opinion in Biotechnology*, 10 (1999), 411-421.
- Bastin, G. e Dochain, D.. **On-line estimation and adaptive control of bioreactors,** *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*, (1990).
- Bernaerts, K., Versyck, K.J. e Van Impe, J.F.. **On the design of optimal dynamic experiments for parameter estimation of a Ratkowsky-type growth kinetics at suboptimal temperatures.** *International Journal of Food Microbiology*, 54 (1-2), (2000), 27-38.
- Bonifácio MJ, Archer M, Rodrigues ML, Matias PM, Learmonth DA, Carrondo MA and Soares – da – Silva P. **Kinetics and crystal structure of catechol-*O*-methyltransferase complex with co substrate and a novel inhibitor with potential therapeutic application.** *Molecular Pharmacology*, 62(4) (2002), 795-805.

- Bonifácio MJ, Palma PN, Almeida L, Soares-da-Silva P. **Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's Disease.** *CNS Drug Reviews*, 13(3) (2007), 352-379.
- Bonifácio MJ, Vieira-Coelho MA and Soares-da-Silva P. **Expression and characterization of rat soluble catechol-O-methyltransferase fusion protein.** *Protein Expression and Purification*, 23(1) (2001), 106-112.
- Bonifati V and Mecocci G. **New, Selective Catechol-O-Methyltransferase Inhibitors as Therapeutic Agents in Parkinson's Disease.** *Pharmacological Therapy*, 81(1) (1999), 1–36.
- Borchardt RT. **A rapid spectrophotometric assay for catechol-O-methyltransferase.** *Analytical Biochemistry*, 58(2) (1974), 382-389.
- Carlson, R. e Srienc, F. **Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production; Identification of reactions.** *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (1) (2004), 1 – 19.
- Cargill M, Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N *et al.* **Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes.** *Nature Genetics*, 22(3) (1999), 231-238.
- Carnes A. **Fermentation Design for the Manufacture of Therapeutic Plasmid DNA.** *BioProcess International*, (2005), 2 – 7.
- Chart H, Smith HR, La Ragione RM, Woodward MJ. **An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5alpha and EQ1.** *Journal of Applied Microbiology*, 89(6) (2000), 1048-1058.
- Cheng X, Roberts RJ. **AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping.** *Nucleic Acids Research*, 29(18) (2001), 3784-3795.
- Dittrich, C.R., Bennett, G.N. e San, K.Y. **Characterization of the acetate – producing pathways in *Escherichia coli*.** *Biotechnology Progress*, 21 (4) (2005), 1062 – 1067.
- Domingues, L., Gama, F.M., Videira, A. (2003) **“Engenharia de proteínas”**, in: Engenharia Enzimática (F. M. Gama, M. R. Aires – Barros, J. Cabral, eds.), LIDEL – Edições Técnicas Lda, Cap.4, 97 – 120.

- Edwards, J.S. e Palsson, B.O. **Robustness analysis of the *Escherichia coli* metabolic network.** *Biotechnology Progress*, 16 (6) (2000), 927 – 939.
- Fieschko, J., Risch, T.. **Production of alpha consensus interferon in recombinant *Escherichia coli*.** *Chem. Eng. Commun*, 45 (1996), 229 – 240.
- Fonseca M, Teixeira J., (2007) “**Reactores Biológicos: Fundamentos e aplicações**”, LIDEL – Edições Técnicas Lda.
- Ghosalkar A., Sahai V., Srivastava A. ”**Optimization of chemically defined medium for recombinant *Pichia pastoris* for biomass production.**” *Bioresource technology*, 99 (2008), 7906-7910.
- Goodman JE, Lavigne JA, Wu K, Helzlsouer KJ, Strickland PT, Selhub J, Yager JD. **COMT genotype, micronutrients in the folate metabolic pathway and breast cancer risk.** *Carcinogenesis*, 22(10) (2001), 1661-1665.
- Hamajima N., Matsuo K., Tajima K., Mizutani M., Iwata H., Iwase T., Mitsuhiro M., Iwata H., Iwase T., Miura S., Oya H., Obata T.. **Limited association between a catechol-*O*-methyltransferase (COMT) polymorphism and breast cancer risk in Japan.** *Int J Clin Oncol*, (2001), 6:13–18
- Han, K., Lin, H.C., Hong, J.. **Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentation.** *Biotechnol. Bioeng.*, 41 (1993), 316-324.
- Heck J., Flôres S., Hertz F., Ayub M. **Statistical optimization of thermo-tolerant xylanase activity from Amazon isolated *Bacillus circulans* on solid-state cultivation.** *Bioresource Technology*, 97 (2006), 1902-1906.
- Herblin WF. **A simple colorimetric assay for catechol-*O*-methyltransferase.** *Analytical Biochemistry*, 51(1) (1973), 19-22.
- Hirano Y, Tsunoda M, Funatsu T, Imai K. **Rapid assay for catechol-*O*-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography fluorescence detection.** *Journal of Chromatography, B* 819(1) (2005), 41-46.
- Holms, H. **Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*.** *Ferms Microbiology Reviews*, 19 (2) (1996), 85 – 116.

Hornykiewicz O, Kish SJ. **Biochemical pathophysiology of Parkinson's disease.** *Advances in Neurology*, 45 (1987), 19–34.

Johnston, W., Cord – Ruwisch, R. e Cooney, M.J. **Industrial control of recombinant *E.coli* fed-batch culture: new perspectives on traditional controlled variables.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25 (2) (2002), 111 – 120.

Kaufmann H., Mazur X., Marone R., Bailey J., Fussenegger M. **Comparative Analysis of Two Controlled Proliferation Strategies Regarding Product Quality, Influence on Tetracycline-Regulated Gene Expression, and Productivity.** *Biotechnology and Bioengineering*, 72 (2001), 592 – 602.

Karayiorgou M, Altemus M, Galke BL, Goldman D, Murphy DL, Ott J, Gogos JA. **Genotype determining low catechol-*O*-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive - compulsive disorder.** *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 94 (1997), 4572–4575.

Keesman, K.J. e Stigter, J.D. **Optimal parametric sensitivity control for the estimation of kinetic parameters in bioreactors.** *Mathematical Biosciences*, 179, (2002), 95-111.

Kirov G, Murphy KC, Arranz MJ, Jones I, McCandles F, Kunugi H.. **Low activity allele of catechol-*O*-methyltransferase gene associated with rapid cycling bipolar disorder.** *Molecular Psychiatry*, 3(4) (1998), 342–345.

Kleist, S., Miksch, G., Hitzmann, B., Arndt, M., Friehs, K e Flaschel, E. **Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61 (2003), 456 – 462.

Klemann, G.L., Strohl, W.R.. **Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation.** *Cur. Opin. Biotechnol*, 5 (1994), 180 – 186.

Ko, Y. – F., Bentley, W.E. e Weigand, W.A. **A metabolic model of cellular energetic and carbon flux during aerobic *Escherichia coli* fermentation.** *Biotechnology and Bioengineering*, 43 (1994), 847 – 855.

- Koh S, Arai M, Kawai S, Okamoto M. **Assay of catechol-O-methyltransferase activity by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection.** *Journal of Chromatography*, 226(2) (1981), 461-465.
- Korz, D.J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E.A. e Deckwer, W.-D. **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology*, 39 (1) (1995), 59 – 65.
- Kumar, P.K.P, Maschke, H.E., Friehs, K., Schugerl, K.. **Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors.** *Tibtech*, 9 (1991), 279-284.
- Lachman HM, Papolos DF, Saito T, Yu YM, Szumlanski CL, Weinshilboum RM. **Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders.** *Pharmacogenetics*, 6 (1996), 243–250.
- Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang HY, Strickland PT, Bell DA, Selmin O et al. **An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer.** *Cancer Research*, 57 (1997), 5493–5497.
- Lerner C, Ruf A, Gramlich V, Masjost B, Zurcher G, Jakob-Roetne R, Borroni E and Diederich F. **X-ray crystal structure of a bisubstrate inhibitor bound to the enzyme catechol-O- methyltransferase: a dramatic effect of inhibitor preorganization on binding affinity.** *Angewandte Chemie International Edition*, 40 (2001), 4040-4042.
- Lima, B.D. **Produção de insulina através de precursores recombinantes em *Escherichia coli*.** Tese de doutoramento, Universidade de Brasília, 1993.
- Lima, N. e Mota, M. **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**, Lidel (2003).
- Lee, S.Y. **High cell-culture of *Escherichia coli*.** *Trends Biotechnol.*, 14 (1996), 98-105.
- Lee, C.W., Chang, H. N.. **Continuous production of Penicillin Acylase from recombinant *Escherichia coli* in a membrane cell recycle fermentors.** *Annals New York Academy of Science*, 613 (1999), 839-845.

- Li, X.L e Taylor, K.B. **Effect of Glucose on the Expression Parameters of Recombinant Protein in *Escherichia coli* During Batch Growth in Complex Medium.** *Biotechnology Progress*, 10 (2) (1994), 160 – 164.
- Li Y, Yang X, van Breemen RB, Bolton JL. **Characterization of two new variants of human catechol-*O*-methyltransferase in vitro.** *Cancer Letters*, 230 (2005), 81–89.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K. **Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol-*O*-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme.** *Biochemistry*, 34 (1995), 4202 - 4210.
- Luo Q., Shen Y., Wei D., Wei C. **”Optimization of culture on the overproduction of TRAIL in high-cell-density culture by recombinant *Escherichia coli*.”** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (2006), 71: 184 – 191.
- Lundström K, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Ulmanen I. **Cloning, expression and structure of catechol-*O*-methyltransferase.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1251(1) (1995), 1-10.
- MacDonald, H.L., Neway, J.O.. **Effects of medium quality on the expression of human interleukin-2 at high cell density in fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990), 640-650.
- Männistö PT, Kaakkola S. **Rationale for selective COMT inhibitors as adjuncts in the drug treatment of Parkinson’s disease.** *Pharmacological Toxicology*, 66 (1990), 317–323.
- Mänistö PT, Kaakkola S. **Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors.** *Pharmacological Reviews*, 51(4) (1999), 593-628.
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hide TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR. **Catechol-*O*-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function.** *Neuroscience*, 116 (2003), 127–137.

- Maré, L., Cimander, C., Elfwing, A., Hagander, P.. **Feeding strategies for *E.coli* fermentations demanding an enriched environment.** *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 30 (2007), 13-25.
- Matsui, T., Yokota, H., Sato, S., Mukataka, S., TakaHashi, J.. **Pressurized culture of *E.coli* for a High concentration.** *Agric. Biol. Chem.*, 5 (1999), 2115-2120.
- Merkel, W., Schwarz, A., Fritz, S., Reuss, M. e Krauth, K.. **New strategies for estimating kinetic parameters in anaerobic wastewater treatment plants.** *Water Science and Technology*, 34 (5-6), (1996), 393-401.
- Narciandi, R.E. **High – level production of p36 from HIV-2 in fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*.** *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81 (4) (1996), 360 – 362.
- Noronha, S.B., Yeh, H.J.C., Spande, T.F e Shiloach, J. **Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using C-13-NMR/MS.** *Biotechnology and Bioengineering*, 68 (3) (2000), 316 – 327.
- Paalme, T., Tilsma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., Vilu, R., **Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate.** *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990), 312-319.
- Palma PN, Rodrigues ML, Archer M, Bonifácio MJ, Loureiro AI, Learmonth DA, Carrondo MA and Soares-da-Silva P. **Comparative study of ortho- and meta-nitrated inhibitors of Catechol-*O*-methyltransferase: Interactions with the active site and regioselectivity of *O*-methylation.** *Molecular Pharmacology*, 70 (1) (2006), 143-153.
- Passarinha L.A, Bonifácio MJ, Queiroz JA. **Comparative study on the interaction of recombinant human soluble catechol-*O*-methyltransferase on some hydrophobic adsorbents.** *Biomedical Chromatography*, 21 (2007), 430 – 438.
- Passarinha L.A, Bonifácio MJ, Queiroz JA. **A new approach on the purification of recombinant human soluble catechol-*O*-methyltransferase from an *Escherichia coli* extract using hydrophobic interaction chromatography.** *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008), 287–296.

Patnaik, P. R. **Comparative evaluation of batch and fed-batch bioreactors for GAPDH production by recombinant *Escherichia coli* with distributed plasmid copy number.** *Chemical Engineering Journal*, 87 (3) (2002), 357 – 366.

Pihlavisto P and Reenilä I. **Separation methods for catechol-*O*-methyltransferase activity assay: physiological and pathophysiological relevance.** *Journal of Chromatography B*, 781 (2002), 359-372.

Pekka T. Männistö and Seppo Kaakkola. **Catechol-*O*-methyltransferase (COMT): Biochemistry, Molecular Biology, Pharmacology, and Clinical Efficacy of the New Selective COMT Inhibitors.** *Pharmacological Reviews*, 51 (1999), 593 – 628.

Phue, J. – N., Noronha, S.B., Hattacharyya, R., Wolfe, A.J. e Shiloach, J. **Glucose metabolism at high density growth of *E.coli* B and *E.coli* K: Differences in metabolism pathways are responsible for efficient glucose utilization in *E.coli* B as determined by microarrays and northern blot analyses.** *Biotechnology and Bioengineering*, 90 (7) (2005), 805 – 820.

Phue, J. – N e Shiloach, J. **Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E.coli* B (BL21) and *E.coli* (JM109).** *Journal of Biotechnology*, 109 (1 – 2) (2004), 21 – 30.

Riesenberg, D..**High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*.** *Cur. Opin. Biotechnol.*, 2 (1991), 380-384.

Riesenberg, D., Guttke, R.. **High-cell density cultivation of microorganism.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51 (1999), 422-430.

Rodríguez – Nogales J., Ortega n., Perez – Mateos M., Busto M. **Experimental design and responde surface modeling applied for the optimisation of pectin hydrolysis by enzymes from *A. niger* CECT 2088.** *Food Chemistry*, 101 (2007), 634 – 642.

Ryan, W e Parulekar, S.J,. **Effects of culture conditions on plasmid stability and production of a plasmid-encoded protein in batch and continuous cultures of *Escherichia coli* JM103[pUC8].** *Annals of New York Academy of Sciences*, 589 (1990), 91 – 110.

- Rutherford K, Le Trong I, Stenkamp, RE and Parson WW. **Crystal Structures of Human 108V and 108M Catechol-O-Methyltransferase.** *Journal of Molecular Biology*, 380 (2008), 120–130.
- Seeger, A., Schneppe, B., McCarthy, J.E.G., Deckwer, W.D., Rinas, U.. **Comparison of temperature and isopropyl- β -D-Thiogalacto-pyramidose-induced synthesis of fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant Escherichia coli.** *Enzyme Microb. Technol.*, 10 (1995), 947-953.
- Shiloach, J e Fass, R. **Growing E.coli to high cell density – A historical perspective on method development.** *Biotechnology Advances*, 23 (5) (2005), 345 – 357.
- Shimizu, N., Fukuzono, S., Fujimori, K., Nishimura, N., Odawara, Y.. **Fed-batch cultures of recombinant Escherichia coli with inhibitory substance concentration monitoring.** *Journal Ferm. Technol.*, 66 (1998), 187-191.
- Sørensen HP and Mortensen KK. **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli.** *Journal of Biotechnology*, 115 (2005), 113–128.
- Shield AJ, Thomae BA, Eckloff BW, Wieben ED, Weinshilboum RM. **Human catechol-O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes.** *Molecular Psychiatry*, 9 (2004), 151–160.
- Strandberg, L., Enfors, S.O.. **Batch and Fed-batch cultivations for the temperature induced of a recombinant protein in E.coli.** *Biotechnol. Lett*, 13 (1991), 609-614.
- Suárez, D.C, Liria C.W. e Kilikian B.V.. **Effect of yeast extract on Escherichia coli growth and acetic acid production.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14 (1998), 331 – 335.
- Suárez, D.C e Kilikian, B.V. **Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant Escherichia coli.** *Process Biochemistry*, 35 (9) (2000), 1051 – 1055.
- Tilgmann C and Ulmanen I. **Purification methods of mammalian catechol-O-methyltransferase.** *Journal of Chromatography B*, 684 (1996), 147-161.
- Thiry M and Cingolani D. **Optimizing scale-up fermentation processes.** *Trends in Biotechnology*, 20 (2002), 103 – 105.

- Tsuji E, Okazaki K, Isaji M, Takeda K. **Crystal structures of the Apo and Holo form of rat catechol-O-methyltransferase.** *Journal of Structural Biology*, 165 (2009), 133–139.
- Tuomainen P, Reenilä I, Männistö PT. **Validation of assay of catechol-O-methyltransferase activity in human erythrocytes.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14(5) (1996), 515-23.
- Ulmanen I and Lundström K. **Cell-free synthesis of rat and human catechol-O-methyltransferase. Insertion of the membrane-bound form into microsomal membranes in vitro.** *European Journal of Biochemistry*, 202 (3) (1991), 1013-1020.
- Van de Walle, M. e Shiloach, J. **Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation.** *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (1) (1998), 71 – 78.
- Van Impe, J.F.. **Modeling and optimal adaptive control of biotechnological processes.** *Tese de Doutorado, Universidade Católica de Leuven, Bélgica*, (1993).
- Vanrolleghem, P.A. e Dochain, D. **Bioprocess model identification.** Em: Van Impe, J.F.M., Vanrolleghem, P.A. e Iserentant, D.M. (eds), *Advanced Instrumentation Data Interpretation, and Control of Biotechnological Processes*. pp., (1998), 251-318, Kluwer Academic Publishers, Holanda.
- Varma, A., Boesh, B. e Palsson, B.O. **Biochemical production capabilities of *Escherichia coli*.** *Biotechnology and Bioengineering*, 42 (1993), 59 – 73.
- Varma, A., e Palsson, B.O. **Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: I. Synthesis of biosynthetic precursors and cofactors.** *Journal of Theoretical Biology*, 165 (1993b), 477 – 502.
- Varma, A., e Palsson, B.O. **Metabolic capabilities of *Escherichia coli*: II. Optimal growth patterns.** *Journal of Theoretical Biology*, 165 (1993a), 503 – 522.
- Versyck, K. J. **Dynamic Input Design for Optimal Estimation of Kinetic Parameters in Bioprocess Models.** *Tese de doutoramento, Universidade católica de Leuven, Bélgica*.

- Versyck, K.J., Claes, J.E. e Van Impe, J.F. **Optimal experimental design for practical identification of unstructured growth models.** *Mathematics and Computers in Simulation*, 46 (5-6), (1998), 621-629.
- Vidgren J, Svensson LA, Liljas A..**Crystal structure of catechol-*O*-methyltransferase.** *Nature*, 368 (1994), 354 – 359.
- Walter, E. e Pronzato, L..**Qualitative and quantitative experiment design of phenomenological models - a survey.** *Automatica*, 26 (2), (1990), 195-213.
- Wang Y, Hu Y, Fang Y, Zhang K, Yang H, Ma J, Xu Q, Shen Y. **Evidence of Epistasis Between the Catechol-*O*-Methyltransferase and Aldehyde Dehydrogenase 3B1 Genes in Paranoid Schizophrenia.** *Biological Psychiatry*, 65 (2009), 1048–1054.
- Wangsa – Wirawan, N., Lee, Y., Falconer, R., Mansell, C., O’Neill, B. e Middelberg, A. **Novel fed-batch strategy for the production of insulin-like growth factor 1 (IGF – 1).** *Biotechnology Letters*, 19 (11) (1997), 1079 – 1082.
- Weber W and Fussenegger M. **Inducible product gene expression technology tailored to bioprocess engineering.** *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (2007), 399–410.
- Wurm F. **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.** *Nature Biotechnology*, 22 (2004), 1393 – 1398.
- Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G. e Enfors, S.O. **Glucose overflow metabolism and mixed–acid fermentation in aerobic large–scale fed-batch processes with *Escherichia coli*.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51 (5) (1999), 564 – 571.
- Yan L., Dai F., Long S., Hui S., Xiao M., Yu M. e Gui Z. **Analysis of metabolic flux in *Escherichia coli* expressing human-like collagen in fed-batch culture.** *Biotechnol Lett*, (2008) 30, 637–643.
- Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. **Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes.** *Journal of Biotechnology*, 127 (2007), 335–347.

Yoon, S.K., Kang, W.K., Park, T.H.. **Fed-batch operation of recombinant *E.coli* containing trp promoter with controlled specific growth rate.** *Biotechnol. Bioeng.*, 43 (1994), 995-999.

Zhao, J. e Shimitzu, K. **Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on C¹³ – labeled acetate and glucose using GG-MS and powerful calculation method.** *Journal of Biotechnology*, 101 (2) (2003), 101 – 117.

Zürcher G, Da Prada M, Dingemanse J. **Assessment of catechol-*O*-methyltransferase activity and its inhibition in erythrocytes of animals and humans.** *Biomedical Chromatography*, 10(1) (1996), 32 - 36.