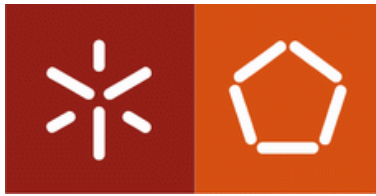


Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sandra Maria Gomes Carvalho

**Monitorização e Modelação da Fermentação
de *E. coli* Recombinante**



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

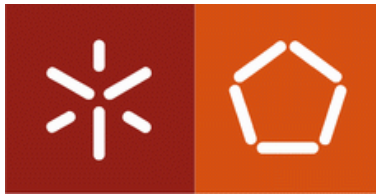
Sandra Maria Gomes Carvalho

Monitorização e Modelação da Fermentação de *E. coli* Recombinante

Mestrado em Biotecnologia - Engenharia de Bioprocessos

Trabalho efectuado sob a orientação do
Professor Doutor Eugénio Manuel de Faria Campos Ferreira
Professora Doutora Isabel Cristina de Almeida Pereira da Rocha

Abril de 2009



Universidade do Minho
Escola de Engenharia

Sandra Maria Gomes Carvalho

**Monitorização e Modelação da Fermentação
de *E. coli* Recombinante**

À minha filha Beatriz e ao
Rodrigo. Juntos vocês são o meu
coração. Amo-vos.

AGRADECIMENTOS

Muitos foram os que contribuíram para que este trabalho fosse possível, fazendo justiça a cada instante à velha máxima de que o Homem não é uma ilha...

A todos agradeço com sincero sentimento, mas quero deixar uma palavra especial de apreço:

Ao Professor Eugénio Ferreira, orientador desta dissertação, gostaria de manifestar o meu reconhecimento e o meu muito obrigada por toda a ajuda que me prestou tornando possível a realização deste trabalho. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que depositou em mim, o seu empenho e apoio durante a realização do trabalho. O meu sincero e sentido: obrigada.

Ao Professor José Teixeira, que apesar de não ser orientador desta tese, me tem sempre incentivado e apoiado em cada projecto que empreendo, contribuindo para que esta dissertação pudesse ser concluída. O meu sincero e sentido: obrigada.

À Professora e amiga Isabel Rocha, a quem só o meu coração pode falar “.....”

O meu sincero e sentido: obrigada pela amizade, pela ajuda, pelo incentivo em todos os meus momentos de desânimo e especialmente pela sua permanente disponibilidade e paciência para resolver cada etapa desta tese.

À Ana Cristina Veloso, por todo o apoio e disponibilidade que sempre me dedicou. Pelas sugestões e entusiasmo. Não poderia deixar de expressar um agradecimento especial pela sua amizade. O meu sincero e sentido: obrigada.

Ao Laboratório de Fermentações do Departamento de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, na pessoa do Professor José Teixeira e da Professora Isabel Belo, gostaria de agradecer as condições disponibilizadas.

Gostaria ainda de manifestar o meu agradecimento às minhas colegas de trabalho e Laboratório, em especial à Sónia Carneiro, pelo apoio e ajuda sempre manifestados.

Por último, mas não menos importantes, não poderia esquecer de forma alguma todas as pessoas que me ajudaram a chegar até aqui em especial à professora Inês Conceição Roberto e Carla Joana Silva, o meu muito obrigado.

A todos agradeço.

Sandra Carvalho

RESUMO

O presente trabalho visou otimizar as condições ambientais de fermentação de forma a maximizar a produção de proteína fluorescente (EYFP – Enhanced Yellow Fluorescent Protein) pela bactéria *Escherichia coli* M15.

Para atingir os objectivos deste projecto, foi utilizada a metodologia de planeamento factorial, sendo a análise dos dados experimentais efectuada com o auxílio de um programa estatístico (Design Expert, Versão 5.0).

Uma vez que um dos objectivos era avaliar qual a fase de crescimento, no momento da indução da produção de EYFP, que proporcionava maior produção de intensidade de fluorescência por *E. coli* recombinante, foram efectuados dois planeamentos factoriais 2^2 , com repetição no ponto central. No primeiro planeamento, a indução da produção de EYFP foi efectuada no início da fase exponencial de crescimento e no segundo planeamento factorial a indução da produção de EYFP foi efectuada no meio da fase exponencial de crescimento. Os factores ambientais estudados foram a temperatura de fermentação e a concentração de oxigénio dissolvido, sendo as respectivas regiões de estudo de 27°C até 40°C e 15% até 40% de saturação.

De forma a caracterizar todo o processo fermentativo foram analisadas as seguintes respostas: taxa específica máxima de crescimento, rendimento em biomassa, e produção máxima de fluorescência arbitrária e normalizada.

Foi verificado que a fase de crescimento na qual é efectuada a indução da produção da proteína afecta a quantidade de fluorescência final obtida, obtendo-se, para as melhores condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido (33,5°C e 27,5%), a fluorescência máxima média de 70 577 AFU quando a indução é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, o que representa um aumento de 5 263 AFU comparativamente com o máximo obtido quando a indução se efectua no início da fase exponencial de crescimento.

Foi também verificado que a fase de crescimento na qual é efectuada a indução influencia o efeito dos factores temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido nas respostas estudadas.

Após a realização dos ensaios experimentais nas condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido definidos para cada ponto do planeamento factorial, foi avaliada a significância estatística e efeito de cada variável independente, bem como o efeito de interacção nas várias respostas estudadas. Posteriormente, cada resposta foi aproximada por um modelo linear e avaliado o seu desempenho.

Foi concluído que para todas as respostas, um polinómio de segundo grau era mais adequado para descrever a dependência da respectiva resposta da temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido.

Quando a indução da produção de EYFP foi efectuada no início da fase exponencial de crescimento, os valores máximos para as respostas taxa específica máxima de crescimento, rendimento em biomassa e produção de fluorescência arbitrária, foram obtidos para as condições do ponto central (33,5°C e 27,5%) sendo os seus valores médios de 0,424 h⁻¹, 0,522 g/g e 65 313,5 AFU, respectivamente. O valor máximo para a produção de fluorescência em unidades normalizadas foi obtido para as condições (+1;+1), isto é, (40°C, 40%) do planeamento factorial sendo o seu valor de 42 225,8 NFU.

Quando a indução da produção de EYFP foi efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, os valores máximos para a taxa específica máxima de crescimento e produção de fluorescência arbitrária foram obtidos para as condições do ponto central (33,5°C e 27,5%), sendo os seus valores de 0,4095h⁻¹ e 70.576,9 AFU. O melhor rendimento em biomassa foi obtido para as condições (27,5°C, 40%) sendo o seu valor de 0,410 g/g. A produção de fluorescência normalizada foi máxima no ponto (40°C;40%) sendo o seu valor de 35 689,04 NFU.

ABSTRACT

This work is focused on the optimization of environmental conditions of recombinant *E.coli* fermentation for the maximization of recombinant protein production.

To achieve those objectives, a factorial design methodology was employed, and experimental data were analysed using a statistical program (Design-Expert, version 5.0).

Since the determination of the appropriate growth phase for induction of recombinant protein production was also studied, two 2^2 factorial design with two replicates in the central point, were made.

In the first 2^2 factorial design, the induction of recombinant YEFP protein production was made in the beginning of the exponential growth phase, while in the second 2^2 factorial design the induction of recombinant YEFP protein was made in the middle of the exponential growth phase. The environmental factors studied were the temperature of fermentation and dissolved oxygen concentration. The ranges of study were 27°C to 40°C for the temperature of fermentation and 15% to 40% for dissolved oxygen, respectively.

For the characterization of the fermentative process the following responses were analyzed: maximum specific growth rate, yield of biomass, arbitrary and normalized intensity of fluorescence produced.

After analysing the experimental data, it was observed that the growth phase in which the induction was performed affected the amount of final fluorescence obtained (correlated with the amount of recombinant protein produced). It was possible to conclude that the induction in the middle of the exponential growth phase led the best results. The best conditions regarding temperature and dissolved oxygen concentration were 33.5°C and 27.5%, resulting in a maximum average fluorescence of 70.577 AFU, which represents an increase of 5.263 AFU when compared with the same conditions, but with the induction performed in the beginning of the exponential growth phase.

From the same experimental data it could also be verified that the moment when the induction of protein production is performed affects the effect of the factors temperature and dissolved oxygen in the responses of the system studied.

The statistical significance and the effects of the independent variables were evaluated, as well as the interaction of the effects between the variables. Afterwards, each response of the system was approximated by a linear model and the model performance was evaluated.

ÍNDICE

1 Introdução

1.1 Microrganismo: aspectos fisiológicos e bioquímicos.

1.1.1 *Escherichia coli*: aspectos fisiológicos.

1.1.2 *Escherichia coli*: aspectos bioquímicos.

1.2 Proteína de fluorescência verde (gfp)

1.3 Influência dos factores ambientais na produção de proteínas recombinadas em *E. coli*

1.3.1 Influência da temperatura

1.3.2 Influência do oxigénio

1.3.3 Influência da fase de indução

1.4 Planeamento de experiências

2 Objectivos

3 Materiais e métodos

3.1 Meios de cultura

3.1.1 Preparação do inóculo

3.1.2 Preparação do meio de cultura para os ensaios

3.2 Microrganismo

3.3 Fermentador e unidade de medida e controlo digital

3.4 Operação experimental dos ensaios

3.5 Condições experimentais estudadas

3.6 Planeamento experimental

3.7 Métodos analíticos

3.7.1 Determinação da concentração de biomassa

3.7.2 Determinação da intensidade de fluorescência

3.8 Métodos de determinação das respostas analisadas

3.8.1 Taxa específica de crescimento (h^{-1})

3.8.2 Rendimento em biomassa $\gamma_{x/s}$ (g biomassa / g glucose)

3.8.3 Produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias f (AFU)

3.8.4 Produção de fluorescência em unidades normalizadas f (NFU) ou (AFU/(g/kg))

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação dos efeitos temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido

A) Quando a indução da produção de yefp é efectuada no início da fase exponencial de crescimento

4.1.1 Análise da resposta taxa específica máxima de crescimento

- 4.1.2 Análise da resposta rendimento em biomassa
- 4.1.3 Análise da resposta produção máxima de fluorescência arbitrária
- 4.1.4 Análise da resposta produção máxima de fluorescência normalizada

B) Quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento

- 4.1.5 Análise da resposta taxa específica máxima de crescimento
- 4.1.6 Análise da resposta rendimento em biomassa
- 4.1.7 Análise da resposta produção máxima de fluorescência arbitrária
- 4.1.8 Análise da resposta de produção máxima de fluorescência normalizada

4.2 Análise das respostas

A) Quando a indução da produção de YEFP é efectuada no início da fase exponencial de crescimento

- 4.2.1 Análise da resposta taxa específica máxima de crescimento
- 4.2.2 Análise da resposta rendimento em biomassa
- 4.2.3 Análise da resposta produção máxima de fluorescência arbitrária
- 4.2.4 Análise da resposta produção máxima de fluorescência normalizada

B) Quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento

- 4.2.5 Análise da resposta taxa específica máxima de crescimento
- 4.2.6 Análise da resposta rendimento em biomassa
- 4.2.7 Análise da resposta produção máxima de fluorescência arbitrária
- 4.2.8 Análise da resposta produção máxima de fluorescência normalizada

4.3 Avaliação da influência do momento de indução de produção de YEFP no aumento da intensidade de fluorescência

5 Conclusões

6 Recomendações

7 Referências bibliográficas

Anexos

Anexo A: curvas de calibração

A.1 Curva de calibração de biomassa

A.2 Estudo da linearidade do espectrofluorímetro

Anexo B: Exemplo da determinação das respostas analisadas na construção dos planeamentos factoriais

B.1 Determinação da taxa específica máxima de crescimento $\mu_{\max}(\text{h}^{-1})$

B.2 Rendimento em biomassa - $\gamma_{x/s}$ (g biomassa / g glucose)

B.3 Produção máxima de fluorescência

Anexo C: Resultados experimentais de todas as fermentações.

Anexo D: Gráficos de probabilidade normal de todas as fermentações.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Propriedades das proteínas fluorescentes (adaptado de Patterson et al., 2001).

Tabela 1.2: Matriz de planeamento 2^2 com ponto central. X_1 e X_2 representam os valores das variáveis codificadas pelas equações $X_1 = (x_1 - 50)/5$ e $X_2 = (x_2 - 100)/10$.

Tabela 1.3: Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Tabela 3.1: Composição do meio de cultura sintético M9 modificado

Tabela 3.2: Composição da solução de traços de minerais.

Tabela 3.3: Composição da solução de vitaminas.

Tabela 3.4: Descrição dos componentes principais do bioreactor.

Tabela 3.5: Matriz do planeamento experimental segundo dois factoriais 2^2 , com repetição no ponto central.

Tabela 3.8: Valores de t_{tab} , nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância, no planeamento efectuado.

Tabela 4.1: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ (h^{-1}), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ ($g_{biomassa}/g_{glucose}$), produção máxima de fluorescência F (AFU) e produção máxima de fluorescência normalizada $f(NFU)$, no planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, para indução da produção de YEFP no início da fase exponencial.

Tabela 4.2: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ (h^{-1}), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ ($g_{biomassa}/g_{glucose}$), produção máxima de fluorescência F (AFU) e produção máxima de fluorescência normalizada $f(NFU)$, no planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, para indução da produção de YEFP no meio da fase exponencial.

Tabela 4.3: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta taxa específica máxima de crescimento**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.4: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta rendimento em biomassa**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.5: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência arbitrária**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.6: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência normalizada**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.7: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta taxa específica máxima de crescimento**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.8: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta rendimento em biomassa**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.9: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência arbitrária**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.10: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste **t** de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência normalizada**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.11 – critérios para validação de diferentes modelos, Moldavsky e Cohen, 1996.

Tabela 4.12: Análise de variância para o modelo representativo da taxa específica máxima de crescimento de *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.13: Análise de variância para o modelo representativo do rendimento em biomassa para *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.14: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência arbitrária em *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.15: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência normalizada em *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.16: Análise de variância para o modelo representativo da taxa específica máxima de crescimento em *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.17: Análise de variância para o modelo representativo do rendimento em biomassa de *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.18: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência arbitrária em *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.19: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência normalizada em *E.coli*, na região em estudo.

Tabela 4.20: Valores da intensidade de fluorescência (AFU) 6 horas e 21 horas após a indução da produção de proteína; densidade óptica a 600nm no momento da Indução para cada ensaio.

Tabela 4.21: Temperatura de fermentação (°C), concentração de oxigénio dissolvido (%), tempo de indução (h) e fluorescência obtida em cada ensaio do planeamento factorial 2^2 com indução de produção no meio da fase exponencial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Fotografia¹, obtida por microscopia electrónica, e esquema² típico da célula de *E. coli*.

Figura 1.2: Metabolismo oxidativo da glucose em *E.coli*.

Figura 1.3: Vias metabólicas mais importantes durante a fermentação da glucose por *E.coli*.

Figura 1.4: Representação esquemática das várias vias oxidativas e oxido-reductiva em *E.coli*. Em A,B e C existe apenas glucose no meio de fermentação. No caso A, o ciclo TCA está completamente ocupado com glucose, enquanto que em B existe alguma capacidade respiratória livre e em C a glucose excede a capacidade oxidativa, direccionando a glucose para a produção de acetato. No caso D, a capacidade oxidativa esta totalmente preenchida com glucose e consequentemente o acetato do meio de cultura não é oxidado, enquanto que o oposto acontece em E. No caso F, apenas o acetato está presente no meio e é totalmente oxidado.

Figura 1.5: (A) Estrutura terciária da GFP⁴. (B) Tripéptido que constitui o Cromóforo da GFP⁵.

Figura 1.6: Planeamento factorial de dois níveis com ponto central. (adaptado de Neto *et al.*, 1995).

Figura 1.7: Decomposição do desvio em relação à média global, $(Y_i - \bar{Y})$, na soma das parcelas $(Y_i - \hat{Y}_i)$ e $(\hat{Y}_i - \bar{Y})$.

Figura 3.1: Fotografia da instalação experimental utilizada nos ensaios.

Figura 4.1: Gráfico de probabilidade normal para a resposta taxa específica máxima de crescimento de *E.coli* M15.

Figura 4.2: Interacção dos efeitos A e B na resposta taxa específica máxima de crescimento.

Figura 4.3: Interacção dos efeitos A e B na resposta rendimento em biomassa.

Figura 4.4: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência arbitrária por YEFP em *E.coli*.

Figura 4.5: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência arbitrária por YEFP em *E.coli*.

Figura 4.6: Interacção dos efeitos A e B na resposta produção máxima de fluorescência normalizada por YEFP em *E.coli*.

Figura 4.7: Interação dos efeitos A e B na resposta taxa específica máxima de crescimento.

Figura 4.8: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta rendimento em biomassa.

Figura 4.9: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta rendimento em biomassa.

Figura 4.10: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias.

Figura 4.11: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias.

Figura 4.12: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas pela concentração de biomassa.

Figura 4.13: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas pela concentração de biomassa.

Figura 4.14: Curvas de nível descritas pelo modelo \hat{Y} que representa a taxa específica máxima de crescimento de *E.coli* M15, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.15: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa a taxa específica máxima de crescimento em *E.coli* M15, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.16: Curvas de nível descritas pelo modelo \hat{Y} que representa a produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.17: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa a produção máxima de fluorescência arbitrária em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.18: Curvas de nível descritas pelo modelo \hat{Y} que representa a produção de fluorescência em unidades normalizadas, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.19: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa a produção máxima de fluorescência normalizada em *E.coli* M15, quando a

indução de produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.20: Curvas de nível descritas pelo modelo \hat{Y} que representa o rendimento em biomassa, quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.21: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa o rendimento em biomassa em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.22: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa a produção máxima de fluorescência arbitraria em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.23: Superfície de resposta descrita pelo modelo \hat{Y} que representa a produção máxima de fluorescência normalizada em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Figura 4.24: Gel obtido por western blot para cada ensaio; 1.6 ensaio 1 e 6h após indução; 1.21 ensaio 1 e 21h após indução; 2.6 ensaio 2 e 6h após indução; 2.21 ensaio 2 e 21h após indução; 3.6 ensaio 3 e 6h após indução; 3.21 ensaio 3 e 21h após indução (Veloso. A.C.A., 2006).

Figura 4.25: Gel western blot obtido para cada condição do ensaio do planeamento factorial 2^2 com indução da produção no meio da fase exponencial.

Figura 4.26: Variação da intensidade de fluorescência (AFU) ao longo do tempo de fermentação (h) para as condições do planeamento 2^2 , com indução da produção no meio da fase exponencial.

Figura 6.1: Planeamento em estrela (Barros Neto *et al.*, 1995).

NOMENCLATURA

- X_0 – Concentração de biomassa inicial (g/kg)
- X - Concentração de biomassa (g/kg)
- X_i concentração de biomassa inicial (g/kg)
- X_f concentração de biomassa no final da fermentação (g/kg)
- μ - Taxa específica de crescimento (h^{-1})
- $\gamma_{X/S}$ – Rendimento em biomassa (g/g)
- F – Produção máxima de fluorescência arbitrária (AFU)
- f – Produção máxima de fluorescência normalizada (NFU)
- dX/dt – Velocidade instantânea de crescimento, isto é, variação da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação (g/kg h)
- t – Tempo de fermentação (h)

1. INTRODUÇÃO

1.1 MICRORGANISMO: ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Após as descobertas nos anos 1960 das potencialidades e aplicabilidade das ferramentas de manipulação e sequenciação de DNA, *in vitro*, a expressão de genes em células microbianas tem sido utilizada como técnica chave para produzir, por via fermentativa, proteínas bioactivas.

A combinação da tecnologia de DNA recombinado com a optimização dos processos de produção, tem permitido a síntese de proteínas em larga escala, que de outra forma seriam difíceis ou mesmo impossíveis de obter.

Do ponto de vista económico, a produção e comercialização de proteínas produzidas a partir de DNA recombinado requer uma cultura recombinante geneticamente estável, elevadas produtividades na produção aliadas a processos de recuperação e purificação eficientes e de baixo custo.

Uma lacuna frequentemente encontrada na optimização e controlo dos processos fermentativos destinados à produção de proteínas recombinadas, é a inexistência de métodos analíticos expeditos que permitam a sua quantificação de forma rápida e fidedigna.

A utilização combinada da expressão da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP), como sonda da expressão da proteína de interesse criou uma ferramenta de monitorização poderosa na expressão de proteínas recombinadas, nomeadamente em *E. coli*.

Das várias proteínas sintetizadas por esses processos, as proteínas humanas recombinadas têm-se destacado pela sua importância como produtos biológicos farmacêuticos, sendo a *E. coli* o hospedeiro mais utilizado na sua produção (Lee, 1996; Jeong e Lee, 1999; Huang *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2004; Yuan *et al.*, 2004; Shiloach e Fass, 2005).

Os principais motivos pelos quais a bactéria *E. coli* tem sido escolhida como hospedeiro para a expressão de genes heterólogos prendem-se com a facilidade com que este organismo pode ser manipulado geneticamente, as elevadas taxas de crescimento verificadas, a obtenção de elevadas densidades celulares, os baixos requisitos nutricionais (Blight e Holland, 1994; Rocha, 2003), e o facto de se conhecer a sequência genómica completa e as principais vias metabólicas.

Como a maioria das proteínas produzidas em estirpes de *E. coli* recombinantes é intracelular, a produtividade é normalmente proporcional à densidade celular final. Deste modo, têm-se desenvolvido técnicas de cultura de altas densidades celulares para otimizar a produtividade, assim como para reduzir os custos de produção e de equipamento (Korz *et al.*, 1995; Prytz *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004).

Neste capítulo será feita uma revisão das principais características fisiológicas e metabólicas da *E. coli*.

Descreve-se ainda a metodologia estatística utilizada no processo em estudo: optimização dos parâmetros ambientais (temperatura e concentração de oxigénio dissolvido) para a produção da proteína EYFP (*Enhanced Yellow-green Fluorescent Protein* - proteína de fluorescência amarela esverdeada melhorada) em *E. coli* M15.

1.1.1 *ESCHERICHIA COLI*: ASPECTOS FISIOLÓGICOS

A bactéria *Escherichia coli* foi originalmente descrita, em 1885 por Theodor Escherich, um bacteriologista Alemão, e chamada de bacterium coli commune.

O nome "*Escherichia coli*", refere-se a um grupo de bactérias constituído por diferentes estirpes que têm em comum várias características.

A *E. coli* como microrganismo procariota, é relativamente pequena e simples. A sua dimensão típica é de 0,5 µm de diâmetro e 1,5 µm de comprimento, apresentando uma forma de bastonete.

Na Figura 1.1 é apresentado um esquema típico da célula de *E. coli* e também uma fotografia obtida por microscopia electrónica.

As células da *E. coli* são constituídas essencialmente por compostos orgânicos, sendo a sua composição média, obtida por análise elementar em peso seco, de 50% de carbono, 20% de oxigénio, 14% de azoto, 8% de hidrogénio, 3% de fósforo, 2% de potássio, 1% de enxofre, 0,05% de cálcio, magnésio e cloro, 0,2% de ferro e um total de 0,3% de outros minerais como manganésio, cobalto, cobre, zinco e molibdénio (Neidhardt *et al.*, 1990).

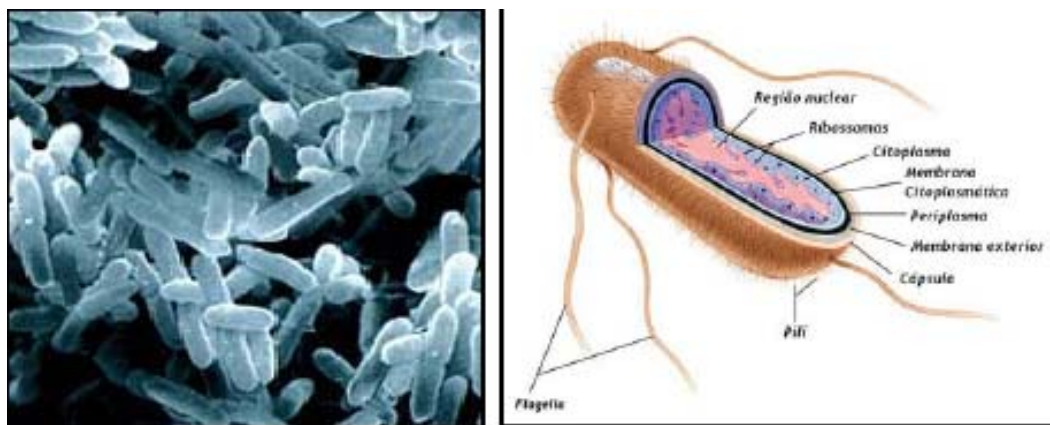


Figura 1.1 Fotografia¹, obtida por microscopia electrónica, e esquema² típico da célula de *E. coli*.

A *E. coli* é uma bactéria tipicamente gram negativa, possuindo uma membrana citoplasmática (mais interna) circundada por uma parede de mureína e por uma membrana externa. O espaço entre as duas membranas é chamado periplasma e difere significativamente, em termos de composição química, do citosol.

Em determinadas condições, pode ainda observar-se uma camada viscosa de polímeros, essencialmente polissacáridos, designada por cápsula. Esta parede de peptidoglicano ou mureína confere à célula equilíbrio estrutural, permitindo-lhe preservar a sua integridade numa grande diversidade de condições externas (Bailey e Ollis, 1986; Neidhardt *et al.*, 1990), facilitando-lhe também a adesão a superfícies.

A membrana citoplasmática, com uma espessura típica de 70 Å, tem uma estrutura semelhante à das células eucariontes. Esta membrana é de grande importância pois determina quais as espécies químicas que podem ser transferidas entre a célula e o meio ambiente, assim como a velocidade dessa transferência.

¹ Retirado de <http://www.sartorius.de>

² Adaptado de <http://cwx.prenhall.com>

Tipicamente, a *E. coli* possui dois tipos de apêndices superficiais, os *flagella* e os *pili*. Ambos surgem da membrana citoplasmática e são essencialmente agregados de proteínas. Apesar da sua composição semelhante, têm funções distintas. Os *flagella* são organelos de locomoção enquanto que os *pili* são organelos de adesão. Existem ainda *pili*, designados como *pili* sexuais, que permitem a transferência do ADN durante a conjugação bacteriana (Neidhardt *et al.*, 1990).

O material genético da bactéria localiza-se na região central ou pré-núcleo, sendo constituído por uma molécula de ADN circular. No entanto, podem também existir outras pequenas moléculas de ADN circulares, designadas por plasmídeos.

A *E. coli* é um organismo anaeróbio facultativo. Como mesofílico, pode crescer a temperaturas entre os 8 e os 48°C, sendo a taxa máxima de crescimento obtida a 39°C, designada por temperatura óptima de crescimento.

É uma bactéria ácido tolerante e pode crescer a valores de pH desde 4,4 até 10. Existem na literatura e na *internet* várias obras de referência bem como bases de dados onde se pode encontrar informação detalhada sobre a fisiologia, o metabolismo e genoma da *E. coli* (Neidhardt *et al.*, 1990; Holms, 1996; Karp *et al.*, 2002; Martinez-Antonio *et al.*, 2003; Carlson e Srienc, 2004).

1.1.2 *ESCHERICHIA COLI*: ASPECTOS BIOQUÍMICOS

A *E. coli* é capaz de crescer em diferentes substratos na presença e ausência de oxigénio. A glucose é o substrato mais utilizado devido à sua facilidade em ser metabolizada, funcionar simultaneamente como fonte de carbono e energia, e também devido ao seu baixo preço.

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 depois na sua degradação a moléculas mais simples e incorporação nas vias metabólicas centrais.

Aceita-se que a *E.coli* possua essencialmente quatro vias metabólicas principais, consideradas mais eficientes, para converter a fonte de carbono e oxigénio em novas células e energia de manutenção sob qualquer nível de limitação de oxigénio (Zhao e Shimizu, 2003; Carlson e Srienc, 2004). Sendo assim, podem ocorrer:

Fermentação da glucose

Na ausência de oxigénio ocorre a fermentação da glucose ou crescimento fermentativo com produção essencialmente de etanol, acetato, formato, succinato e lactato. A via anaeróbia mais eficiente produz três moléculas de ATP, uma de acetato, uma de etanol e duas de formato por molécula de glucose fermentada, traduzindo-se num rendimento energético de aproximadamente 0,5 moles de ATP por mole de carbono de glucose consumida.

Oxidação da glucose

Na presença do oxigénio, quando este não é limitativo, ocorre a oxidação completa da glucose em dióxido de carbono, consumindo-se seis moléculas de oxigénio e produzindo-se vinte e seis ATPs. O rendimento energético é de 4,33 moles de ATP por mole de carbono de glucose consumida.

Na Equação 1.1 representa-se a reacção mais eficiente para a produção de energia em termos de rendimento de ATP em glucose.

Glucose + Oxigénio > Dióxido de Carbono + Água + Energia



Equação 1.1

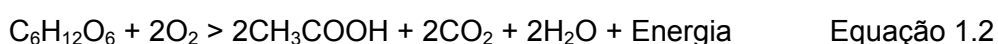
As reacções mais importantes para a oxidação da glucose são ilustradas na figura 1.2 e este processo pode ser dividido numa serie de blocos funcionais:

- Transporte da glucose para o interior da célula através do sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase. A membrana citoplasmática da *E.coli* não é permeável à glucose. Por isso, ela possui um sistema de transporte que efectua a passagem da glucose para o citoplasma. Este processo de transporte está acoplado à fosforilação da glucose a glucose-6-fosfato.
- Degradação da glucose-6-fosfato a piruvato via glicólise ou via Embden-Meyerhof-Parnas. No processo, precursores metabólicos são também produzidos: 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e piruvato que são usados para as reacções de biossíntese. É também gerada energia metabólica por estas reacções.
- Descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-coenzima A (acetil-CoA) pela piruvato desidrogenase.
- Oxidação do acetil-CoA a dióxido de carbono via ciclo dos ácidos tricarbóxicos (*tricarboxylic acid cycle* - TCA), sendo gerada energia e poder redutor. Intermediários do ciclo dos TCA tais como oxaloacetato e α -cetoglutarato são utilizados na produção de macromoléculas. Durante o crescimento em glucose, existem várias vias acopladas à geração dos intermediários do ciclo TCA.
- Oxidação das coenzimas reduzidas formadas nos passos anteriores na cadeia respiratória. A respiração é o processo de geração de ATP no qual compostos actuam como dadores de electrões através de uma cadeia de transferência para aceitadores de electrões. A respiração aeróbia usa o oxigénio como aceitador final. Durante a cadeia de transferência de electrões, protões (H^+) são transportados para fora da membrana citoplasmática, gerando uma força protomotora. Com a passagem dos protões outra vez para o citoplasma, a energia da força protomotora é capturada como ATP, catalisada pela ATPase.

Oxidação e fermentação da glucose

Em condições aeróbias e quando a glucose está em excesso, esta pode seguir uma via fermentativa, originando a produção de compostos de baixo peso molecular. O acetato é o composto mais frequente em fermentações aeróbias de *E. coli* (Phue e Shiloach, 2004). A glucose é metabolizada oxidativamente seguindo a estequiometria descrita na equação 1.1 até ser atingido o limite da sua capacidade respiratória. A partir daí, e em simultâneo, a glucose é metabolizada por via fermentativa.

Glucose + Oxigénio > Acetato + Dióxido de Carbono + Água + Energia



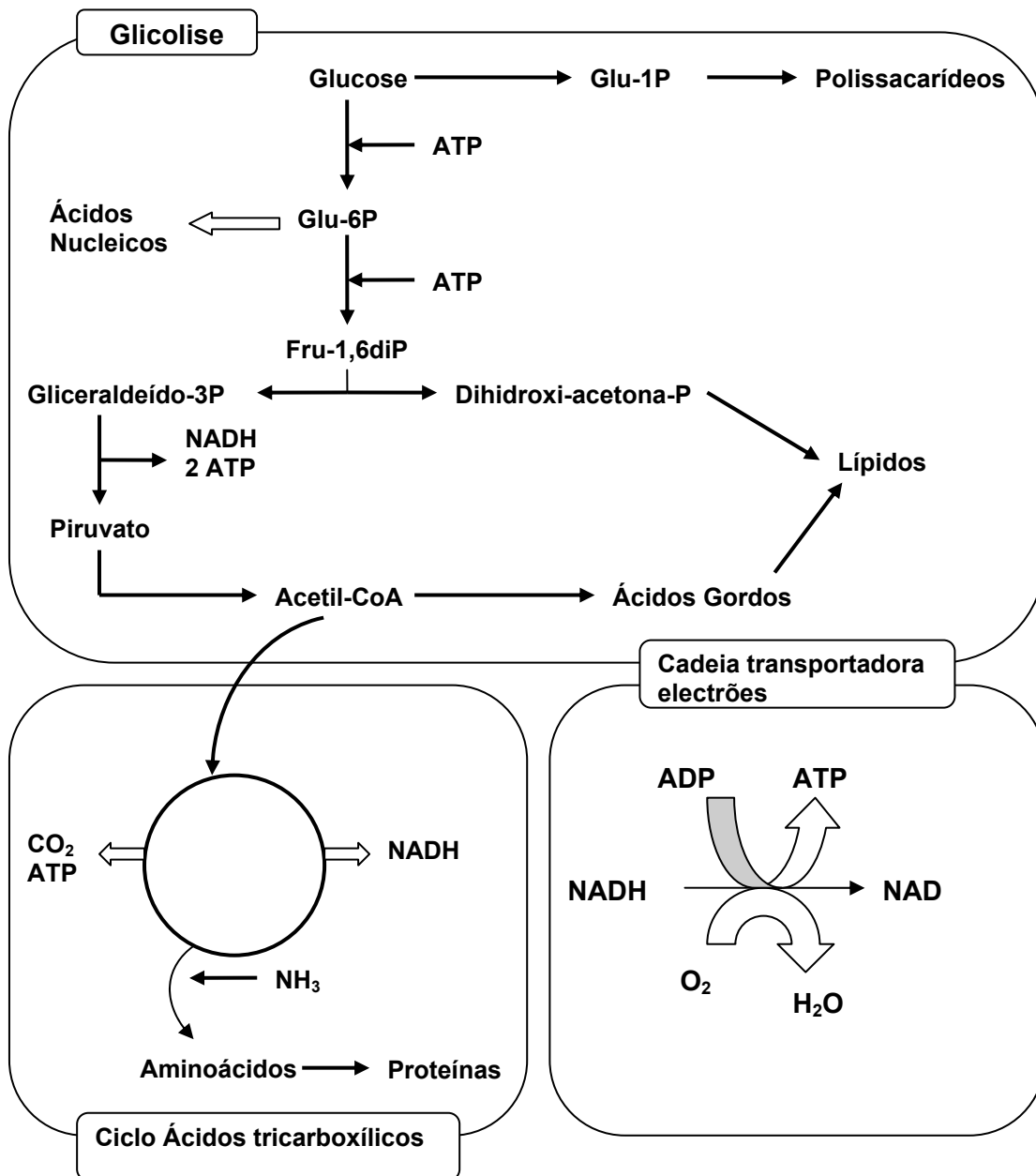


Figura 1.2 Metabolismo oxidativo da glucose em *E. coli*.

Durante a produção de ácido acético, o fluxo do acetil-CoA é parcialmente direccionado para acetato, via acetilfosfato, em vez de entrar totalmente no ciclo TCA. Através de duas reacções enzimáticas, catalisadas pela acetil-CoA ortofosfatase acetiltransferase e acetato cinase, uma molécula de ácido acético é produzida a partir da acetil-CoA. Concomitante com esta conversão, é formado um ATP. Do ponto de vista energético, a produção aeróbia de ácido acético tem um rendimento de 4 moléculas de ATP por cada molécula de glucose consumida, quando comparado com as 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucose para a produção de etanol, se o uso anabólico da glucose não for considerado. Também, a maior diferença entre a síntese de ácido acético e a síntese de outros metabolitos parcialmente oxidados da glucose como o etanol ou ácido láctico, é a ausência do passo de oxidação do NADH na via sintética do ácido acético. O NADH é oxidado durante a conversão do piruvato a

etanol ou ácido láctico, enquanto NADH é gerado durante a conversão do piruvato a ácido acético. Consequentemente, a formação de ácido acético requer o passo de re-oxidação do NADH e logo do consumo de oxigénio.

As reacções mais importantes envolvidas na fermentação da glucose por *E. coli* são ilustradas na figura 1.3.

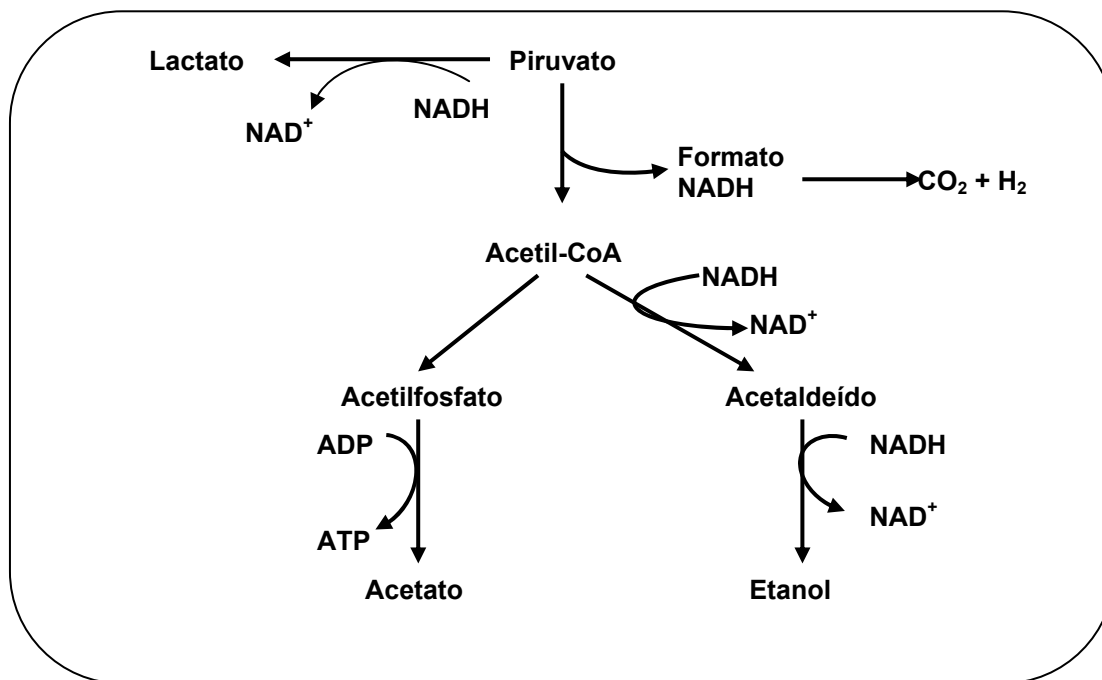
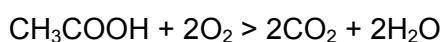


Figura 1.3 Vias metabólicas mais importantes durante a fermentação da glucose por *E. coli*.

Oxidação do acetato

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 TCA 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 TCA são produzidos pelo ciclo do glioxilato que é inibido pela presença da glucose (Carlson e Srienc, 2004). A reacção de oxidação do acetato está representada na Equação 1.3.

Acetato + Oxigénio > Dióxido de Carbono + Água



Equação 1.3

Deve ser realçado que nas equações anteriores não é considerada a formação de biomassa, não se incluindo por isso, os coeficientes de rendimento que tomam em linha de conta a síntese celular.

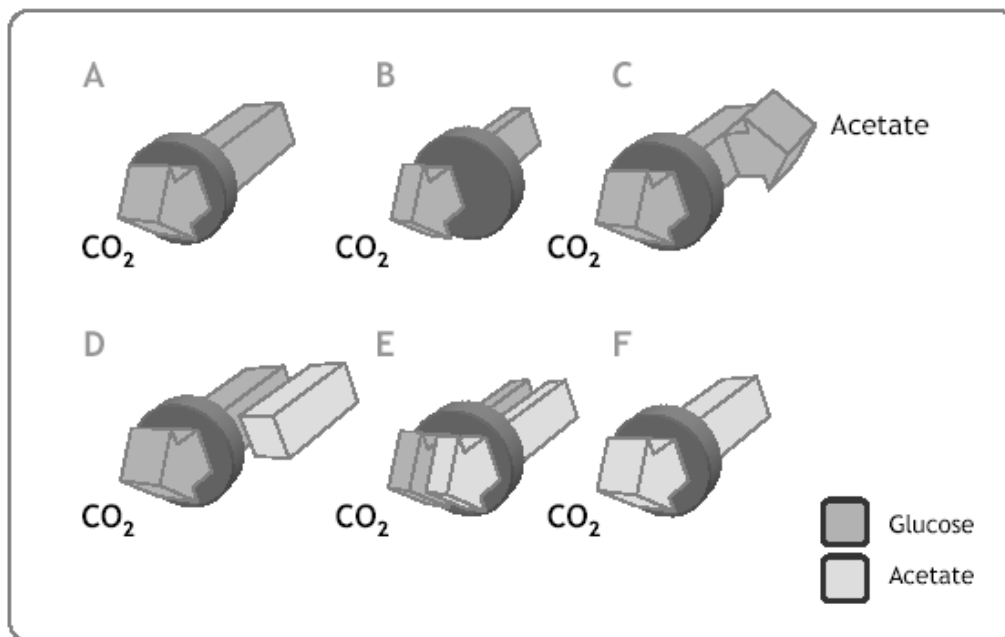


Figura 1.4 Representação esquemática das várias vias oxidativas e oxido-redutivas em *E. coli*. Em A, B e C existe apenas glucose no meio de fermentação. No caso A, o ciclo TCA está completamente ocupado com glucose, enquanto que em B existe alguma capacidade respiratória livre e em C a glucose excede a capacidade oxidativa, direccionando a glucose para a produção de acetato. No caso D, a capacidade oxidativa está totalmente preenchida com glucose e consequentemente o acetato do meio de cultura não é oxidado, enquanto que o oposto acontece em E. No caso F, apenas o acetato está presente no meio e é totalmente oxidado.

Na Figura 1.4 está representada a capacidade oxidativa limitada da *E. coli* em condições de aerobiose. Tenta-se representar de uma forma esquemática as principais vias metabólicas que podem ser utilizadas durante um processo fermentativo com esta bactéria. Para valores inferiores à taxa específica crítica de crescimento ($\mu_{\text{crítico}}$) a glucose é completamente oxidada com um elevado rendimento em biomassa por glucose consumida, denominando-se rendimento oxidativo em glucose.

A equação 1.1 traduz este metabolismo oxidativo, o qual é representado na figura 1.4 pelos casos A, B e D.

Para valores superiores a $\mu_{\text{crítico}}$ e inferiores à taxa específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máxima}}$), o excesso de glucose é convertido, através do metabolismo oxido-redutivo, em acetato, obtendo-se um rendimento inferior de biomassa por glucose consumida. A Equação 1.1 e a Equação 1.2 traduzem o metabolismo oxido-redutivo representado pela caso C da Figura 1.4. Quando o consumo de glucose não utiliza a totalidade da capacidade oxidativa da *E. coli*, ou na ausência desta, a *E. coli* consome simultaneamente o acetato ou apenas este último, respectivamente. Os casos E e F da Figura 1.4 descrevem esta situação, designada por metabolismo oxidativo em glucose e acetato ou oxidativo em acetato, respectivamente (Equação 1.1 e Equação 1.3).

1.2 PROTEÍNA DE FLUORESCÊNCIA VERDE (GFP)

A proteína de fluorescência verde (GFP – *green fluorescent protein*) proveniente de medusa (*Aequorea victoria*) tem sido extensivamente aplicada em várias áreas das ciências biológicas. A sua característica única de auto-sintetizar o cromóforo necessitando apenas da presença de oxigénio molecular, isto é, sem necessidade de adicionar qualquer composto (substrato ou cofactor) externo ao organismo que a expressa para que a sua fluorescência seja detectada, faz dessa proteína um excelente marcador *in vivo* de expressão genética (Timmons *et al.*, 1997; Gill *et al.*, 2000) e de localização de proteínas (Gerdes e Kaether, 1996; Margolin, 2000) em vários sistemas biológicos como mamíferos, peixes, insectos, plantas, leveduras e numa grande variedade de bactérias (March *et al.*, 2003; Su, 2005).

A GFP é uma proteína composta por 238 aminoácidos com um peso molecular entre 27 e 30 kDa (Gerdes e Kaether, 1996). A sua estrutura terciária é representada na Figura 1.5 (A). Apresenta uma forma cilíndrica bastante compacta, sendo formada por onze cadeias exteriores não paralelas (a verde) que constituem a sua parede e possui um diâmetro e um comprimento aproximado de 30 e 40 Å, respectivamente. Existem ainda pequenas secções em α -hélice que formam o limite do cilindro (a cinzento) e um segmento α -hélice irregular (a azul) que assegura a estrutura do cromóforo que se localiza no centro geométrico do cilindro (a vermelho), e que é constituído pelo tripéptido Ser65-Tyr66-Gly67, representado na Figura 1.5 (B) (Yang *et al.*, 1996).

A GFP é uma proteína excepcionalmente estável, devido essencialmente à sua estrutura terciária compacta. É bastante resistente à acção de proteases, agentes químicos desnaturantes como a ureia e o dodecilsulfato de sódio (SDS). Para além disso, mantém a sua fluorescência numa grande gama de valores de pH (5,5 a 12,0) e a temperaturas elevadas (até 70 °C).

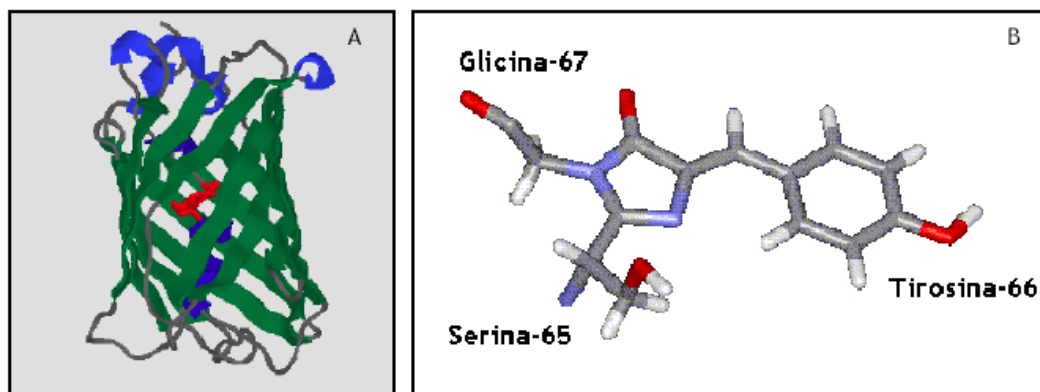


Figura 1.5 (A) Estrutura terciária da GFP³. (B) Tripéptido que constitui o Cromóforo da GFP⁴.

Algumas variações na GFP deram origem a proteínas que têm fluorescência azul (EBFP – Enhanced Blue Fluorescent Protein), cinzenta (ECFP - Enhanced Blue Fluorescent Protein) e amarela esverdeada (EYFP - Enhanced Yellow Fluorescent Protein). Por outro lado, manipulações genéticas possibilitaram a criação de variantes

³ Retirado de <http://public-1.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/jonda/structur.htm>

⁴ Retirado de <http://dwb.unl.edu/Teacher/NSF/C08/C08Links/pps99.cryst.bbk.ac.uk>

da GFP, como a proteína com fluorescência verde melhorada (Enhanced Green Fluorescent Protein - EGFP) que fluoresce trinta e cinco vezes mais que a GFP selvagem. Na Tabela 1.1 encontram-se descritas algumas propriedades destas proteínas, tais como: o coeficiente de extinção (E_m), o rendimento quântico (Y_Q), o comprimento de onda de excitação (λ_{Ex}), o comprimento de onda de emissão (λ_{Em}), o valor médio de pH ao qual a proteína perde 50% de fluorescência, o tempo relativo de branqueamento (*photobleaching* - tbranqueamento).

A monitorização e controlo de bioprocessos têm sido realizados, normalmente, recorrendo à análise de parâmetros como o oxigénio dissolvido, pH, densidade óptica (DO), a concentração de substrato e a concentração dos gases de saída da fermentação. Contudo, nem sempre é possível medir em linha esses parâmetros e nenhum deles reflecte, em tempo real, todas as alterações dos fenómenos que ocorrem no interior das células. Por outro lado, a monitorização da concentração das proteínas recombinadas, as quais são o produto de interesse em grande parte dos bioprocessos, raramente é feita em linha, devido à sua análise ser, quase sempre, um processo demorado e complexo.

A GFP tem demonstrado um enorme potencial como método de monitorização não destrutivo *in situ* de bioprocessos, não só pelas características já referidas anteriormente mas também porque não apresenta, normalmente, riscos de toxicidade para o hospedeiro (Reischer *et al.*, 2004). Esta proteína tem sido usada para monitorizar em linha a concentração de biomassa usando um sensor de fibra óptica em fermentações de *E. coli* de baixa (Randers-Eichhorn *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002) e alta densidade celular (Delisa *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2000; Delisa *et al.*, 2001).

A GFP tem sido também utilizada, com sucesso, como proteína de fusão, uma vez que tem demonstrado não interferir com inúmeras proteínas às quais se liga quer por N – ou C-terminal (Poppenborg *et al.*, 1997; Cha *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004). Seo *et al.* (2003) conseguiram detectar níveis de *stress* celular fundindo a GFP com elementos do promotor do gene da proteína induzida por *stress* por choque térmico, em várias estirpes de *E. coli*. Albano *et al.* (1998) e DeLisa *et al.* (1999) construíram um plasmídeo que contém a fusão de dois genes repórter, a GFP e a cloranfenicol-acetyl transferase (CAT). Os seus resultados sugerem uma correlação quantitativa directa entre a intensidade da fluorescência da GFP e a actividade da enzima CAT.

No trabalho desenvolvido por Liu *et al.* (2001) o crescimento celular e a expressão da GFP em culturas de células de tabaco transgénico foram monitorizados, tendo utilizado a fluorescência da GFP para determinar o caudal de alimentação em reactor semi-contínuo.

Estes e muitos outros trabalhos desenvolvidos enfatizam o interesse da GFP como repórter genético *in vivo* e como modelo de proteína, para monitorizar e otimizar a produção de proteínas recombinadas em processos fermentativos (Li *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Zupan *et al.*, 2004).

Tabela 1.1 Propriedades das proteínas fluorescentes (adaptado de Patterson et al., 2001).

Proteína	Aminoácidos Substituidos ⁽¹⁾	Em (cm ⁻¹ M ⁻¹)	γ _Q (%)	λ _{EX} (nm)	λ _{Em} (nm)	pH	t _{braqueamento}
GFP	--	9500	~80	395(470)	509(540)	--	--
EGFP	Phe ₆₄ Leu Ser ₆₅ Thr	55000	~60	488	507	5,9	100
EBFP	Phe ₆₄ Leu Tyr ₆₆ His Tyr ₁₄₅ Phe	31000	~25	383	445	5,8	3
ECFP	Phe ₆₄ Leu Ser ₆₅ Thr Tyr ₆₆ Trp Asn ₁₄₆ Ile Met ₁₅₃ Thr Val ₁₆₃ Ala	26000	~40	433(453)	475(501)	4,7	85
EYFP	Ser ₆₅ Gly Val ₆₈ Leu Ser ₇₂ Ala Thr ₂₀₃ Tyr	84000	~61	513	527	6,5	35

(1) Ala - alanina; Asn – asparagina; Gly – glicina; His – histidina; Ile – isoleucina; Leu – leucina; Met – metionina; Phe – fenilalanina; Ser – serina; Thr – treonina; Trp – triptofano; Val – valina; Em – coeficiente de extinção; γ_Q – rendimento quântico; λ_{EX} – comprimento de onda de excitação; λ_{Em} – comprimento de onda de emissão; t_{braqueamento} – tempo relativo de branqueamento (photobleaching).

1.3 INFLUÊNCIA DE FACTORES AMBIENTAIS NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINADAS EM *E. COLI*.

1.3.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A produção de proteínas recombinantes como a interleucina-18 e o interferão tem constituído marcos importantes para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. No entanto, a sua produção em *E.coli* apresenta alguns problemas, nomeadamente a formação de agregados proteicos insolúveis conhecidos como corpos de inclusão. Vários polipeptídeos, especialmente quando produzidos a taxas elevadas tendem a acumular-se em corpos de inclusão ou outro tipo de agregados proteicos devido a uma propensão para a agregação, à existência de regiões expostas a solventes, entre outros factores.

Têm sido exploradas várias estratégias para otimizar o rendimento da proteína solúvel pela minimização do enrolamento não correcto da proteína, através de estratégias direccionadas para a própria proteína ou por engenharia do processo (Andrea *et al*, 2007; Baneyx e Mujacic, 2004; Sorensen e Mortensen, 2005a)

A solubilidade proteica pode também ser favorecida pela co-produção, com a proteína desejada, de “chaperones” individuais ou conjuntos de “chaperones” (Andrea *et al*, 2007; Baneyx e Palumbo, 2003; Nishihara *et al.*, 1998), que são proteínas que têm por função auxiliar no enrolamento correcto das proteínas produzidas. Uma outra alternativa passa pela redução da produção da proteína desejada através da limitação da dosagem do gene ou diminuindo a expressão do gene recombinante.

Por outro lado, a manipulação de parâmetros do processo como a diminuição da temperatura de crescimento pode resultar em maiores rendimentos e melhoramento da actividade biológica da proteína solúvel.

Em suma, existem duas vias para melhorar a produção de proteínas recombinantes biologicamente activas, entre as quais a produção de GFP objecto de estudo deste trabalho. A primeira é através da manipulação e engenharia genética e a segunda através da optimização dos parâmetros do processo produtivo, nomeadamente a temperatura de crescimento.

Têm sido publicados vários estudos mostrando a influência da temperatura de crescimento na qualidade conformacional, rendimento e solubilidade de proteínas recombinantes.

Andrea *et al* (2007) estudaram a influência da temperatura de crescimento no melhoramento da qualidade conformacional da proteína recombinante (GFP recombinante) insolúvel. Neste estudo foi utilizada a estirpe de *E. coli* BL21 transformada com o vector de expressão pETGFP. Foram testadas três temperaturas diferentes (37, 30 e 16°C). Foi verificado que a 37°C, 58,8% da GFP recombinante produzida encontrava-se na fracção celular insolúvel. A 30°C, 54,4% da GFP produzida era insolúvel e a 16°C a percentagem de GFP insolúvel era de 16,9%. Estes dados indicam que temperaturas de crescimento sub-óptimas têm um efeito positivo na solubilidade da GFP.

Os mesmos autores analisaram ainda no mesmo trabalho a emissão de fluorescência da GFP da fracção solúvel a diferentes temperaturas encontrando um aumento progressivo da fluorescência específica (indicativa do correcto enrolamento da GFP e correcta formação do cromóforo) a qual quadruplica quando se passa de 37°C para 16°C. Curiosamente, a fluorescência específica da GFP da fracção celular insolúvel aumenta ainda mais dramaticamente sob as mesmas condições (dez vezes mais quando se passa de 37°C para 16°C). Em resumo, estes autores concluíram que a fracção de proteína agregada decresce acentuadamente a baixas temperaturas, enquanto que a qualidade conformacional da GFP solúvel e agregada, reflectida pela emissão de fluorescência específica, melhora progressivamente.

Mónica *et al* (2008) estudaram o impacto da temperatura e da taxa de expressão do gene na solubilidade da proteína (GFP) e na sua qualidade conformacional. Estes autores estudaram a emissão de fluorescência de células de *E. coli* produtoras de GFP a diferentes temperaturas, desde 16°C até 42°C. Foi observado experimentalmente que tanto a fluorescência total por unidade de biomassa como a fluorescência da fracção particular associada com os corpos de inclusão aumentaram com o aumento da temperatura. Contudo, a fluorescência associada à proteína solúvel teve um ligeiro decréscimo para as mesmas gamas de temperatura.

No que diz respeito à produção de proteína em cada condição de crescimento, os autores observaram que, enquanto a quantidade de GFP solúvel mostrou um pequeno pico a 27°C, as quantidades de GFP total e insolúvel aumentaram com a temperatura. Estes dados põem em evidência a forte dependência da solubilidade da GFP com a temperatura.

A emissão específica da GFP insolúvel não foi muito afectada pela temperatura, observando-se o mínimo a 27°C. Contudo, a qualidade conformacional da GFP total aumenta com a diminuição da temperatura de forma exponencial a qual é essencialmente contabilizada pela fracção solúvel.

Estes autores concluíram que a temperatura, nas gamas fisiológicas entre 16°C e 42°C tem um impacto positivo no rendimento total de GFP. Isto é exclusivamente

contabilizado pelo aumento da quantidade de proteína agregada, uma vez que o rendimento da fracção solúvel é pouco afectado. A fluorescência total por célula tem um máximo a 32°C, também contabilizada exclusivamente pela fracção celular insolúvel. Finalmente, a qualidade conformacional da GFP solúvel é dramática e progressivamente diminuída pela temperatura enquanto que a fluorescência específica da GFP em corpos de inclusão permanece aproximadamente constante.

Kentaro *et al.* (2004) efectuaram a optimização sistemática da expressão de proteína activa usando a GFP como repórter do enrolamento. Neste estudo os autores utilizaram a estirpe de *E. coli* BL21 transformada com o plasmídeo GST-hIL-18wild-GFP responsável pela produção das proteínas interleucina-18 e GFP. Para determinar a temperatura de indução optimizada, os autores avaliaram a fluorescência na gama 15-37°C. Estes autores verificaram que quando a expressão era efectuada a 37°C, a proteína de fusão precipitava em corpos de inclusão. De todas as temperaturas estudadas, a temperatura de indução de 25°C mostrou o melhor rendimento.

1.3.2 INFLUÊNCIA DO OXIGÉNIO

Na bioluminescência da medusa *Aequorea*, a GFP é a chave para a emissão de luz. A energia necessária para a emissão de luz é produzida na reacção despoletada pelo ião Ca^{2+} da foto-proteína aequorina, a qual coexiste com a GFP no órgão fotogénico da medusa.

A energia é depois transferida para as moléculas de GFP cujo estado excitado assim formado dissipa a energia na forma de luz verde ($\lambda_{\text{máx.}}$ 509 nm). Na ausência de GFP, a aequorina emite luz azul ($\lambda_{\text{máx.}}$ 470 nm) (O. Shimomura, 1979).

Aspectos estruturais da GFP foram descritos no ponto 1.3.A), nomeadamente a estrutura cilíndrica e as suas propriedades físicas e espectrais.

Análises efectuadas permitiram elucidar que o fluoróforo é originado a partir de uma sequência interna Ser-Try-Gly a qual é pós-translacionalmente modificada para a estrutura 4-(p-hidroxibenzil)-imidazol-5-ona. Vários estudos efectuados com GFP recombinante em *E. coli* permitiram propor um mecanismo sequencial iniciado pela rápida ciclização entre a Ser65 e a Gly67 para formar o intermediário imidazol-5-ona, seguido por um passo muito lento (de horas) de oxidação (passo limitante) da Tyr66 da cadeia lateral por acção de oxigénio molecular.

A necessidade de oxigénio durante a fase final de formação do cromóforo da GFP contrasta com os efeitos negativos de elevadas concentrações de oxigénio na fluorescência apresentada pela GFP. Associado a este último efeito encontra-se o facto de o oxigénio molecular reduzir o rendimento quântico dos fotões verdes que são produzidos no estado excitado (Phillips Jr, 1997).

Abeer *et al.* (2008) descreveram a perda de fluorescência e alterações na molécula de GFP induzidos por oxiradicaís, tendo estudado em que extensão os oxiradicaís poderiam danificar e desnaturar a GFP e se este dano/desnaturação poderia ser seguido pela perda de fluorescência. No mesmo trabalho, examinaram também a influência do pH nos danos na GFP induzidos por oxiradicaís e consequentemente a perda de fluorescência.

Após os ensaios experimentais, os autores, verificaram que a GFP realmente perde a sua fluorescência quando exposta a oxiradicaís, sendo essa perda pH-dependente.

Belpair *et al.*, 2005, estudaram um método para monitorizar o destino da proteína de fluorescência verde adicionada a lamas residuais aeróbias e anaeróbias. Estes autores utilizaram um procedimento baseado na análise fluorométrica da GFP nas fracções líquidas e sólidas das lamas. Foi verificado que, sob condições aeróbias e a 20°C, a maior parte da GFP se associava imediatamente com a fracção sólida das lamas. Cerca de 20% da fluorescência devida à fracção sólida associada à GFP

continuou presente após 72h. Sob condições anaeróbias e a 35°C, o sinal de fluorescência devido à GFP foi reduzido em 90% apenas em 6 h. Estes dados mostram a necessidade da presença de oxigénio para a expressão de fluorescência pela GFP.

1.3.3 INFLUÊNCIA DA FASE DE INDUÇÃO

A produção de proteínas recombinantes usando genes heterólogos apresenta vários problemas, sendo necessária a optimização das condições de expressão, com o objectivo de obter proteínas activas com elevados rendimentos de produção.

A utilização de um sistema repórter, como a GFP, permite a optimização dos parâmetros operacionais de indução para várias proteínas recombinantes que utilizem o mesmo sistema de expressão.

Na literatura estão referenciados vários parâmetros a estudar como a concentração de indutor, a estirpe hospedeira, a temperatura de indução, e a fase de crescimento na qual deve ser efectuada a indução, entre outros.

Tabandeh *et al.* (2008) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para optimizar as condições de indução da produção do interferão beta recombinante em culturas de alta densidade celular. Estes autores estudaram a influência da concentração de indutor e o peso seco no momento da indução na produtividade global de interferão beta. Para tal, utilizaram três pesos secos diferentes no momento de indução (50, 60 e 70 g/L) e três concentrações de indutor (1,2 e 3 mM de IPTG - isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo) como variáveis num planeamento factorial completo de três níveis. Estes autores obtiveram duas condições operacionais óptimas. No primeiro caso, 50 g/L de peso seco e 2,54 mM de IPTG conduziram a uma produtividade global de 0,151 g/L.h de interferão beta. No segundo caso obteve-se a mesma produtividade global de interferão beta para 70 g/L de peso seco e 1,29 mM de IPTG. A aplicação destas condições optimizadas permitiu obter uma produtividade global de interferão beta três vezes superior ao obtido nas condições do ponto central (condições não óptimas).

Kentaro *et al.* (2004) também optimizaram as condições de expressão da GFP, sendo esta utilizada como repórter do enrolamento e actividade da interleucina-18. Estes autores estudaram o efeito da concentração de IPTG (indutor) e o ponto máximo de produção de fluorescência. Os autores estudaram quatro concentrações de IPTG (0,1; 0,5; 1 e 2 mM) verificando que a fluorescência aumentava directamente com o aumento da concentração de IPTG, apresentando uma estabilização a 1 mM de IPTG. A intensidade máxima de fluorescência com 0,1 mM foi obtida após 9 horas, enquanto que a intensidade de fluorescência máxima com 0,5; 1 e 2 mM foi obtida cerca das 15 horas após a indução. Para todas as concentrações, uma vez atingida a fluorescência máxima, esta diminuía gradualmente.

Susanne *et al.* (2006) estudaram os factores que afectavam a expressão de proteína solúvel usando a metodologia de superfície de resposta. Estes autores optimizaram a temperatura de indução, tempo de indução e concentração de indutor na expressão da proteína não estrutural NS3 do genótipo do vírus C em *E. coli*. Através deste trabalho, os autores demonstraram que todos os factores em estudo afectaram de forma significativa a expressão da proteína solúvel.

1.4 PLANEAMENTO DE EXPERIÊNCIAS

Quando se realiza um ensaio, é essencial fazer a recolha correcta de dados, de modo a permitir retirar conclusões objectivas, e assim, dar resposta ao problema que suscitou a realização do ensaio. Uma forma muito eficiente de melhorar o valor e a qualidade da pesquisa, encurtando o tempo de desenvolvimento do processo e consequentemente os custos, é através de ensaios estatisticamente planeados (Sen e Swaminathan, 1997).

Geralmente, a fermentação é a etapa crítica no estabelecimento da viabilidade técnica e económica de um processo biotecnológico, sendo difícil implementar ao nível industrial os estudos efectuados em laboratório, mesmo quando as características bioquímicas, microbiológicas e físico-químicas estão já bem definidas. Assim, a obtenção de modelos matemáticos que descrevem o processo fermentativo em estudo, é de extrema importância, pois possibilita um melhor controlo dos mesmos e a obtenção de maiores concentrações do produto desejado com menor custo. A utilização de planeamentos factoriais para a optimização de processos fermentativos possibilita o estudo de diversas variáveis com um número reduzido de ensaios e permite também verificar os efeitos individuais dos factores e suas interacções. Sendo assim, o presente trabalho tem como principal objectivo a optimização das condições que proporcionam a melhor taxa de produção de YEFP em *E. coli* M15, utilizando planeamento factorial de experiências.

O planeamento factorial de experiências tem sido amplamente utilizado na avaliação dos efeitos das variáveis e na optimização de diversos processos microbiológicos. Segundo Horitsu et al. (1992), há duas formas de optimizar as condições de cultura para a produção microbiológica de um produto desejado: a primeira é uma abordagem cinética, que utiliza o modelo cinético da produção do produto de interesse, e a segunda é a aplicação de métodos estatísticos.

Segundo estes autores, a metodologia estatística provou ser muito útil na optimização das condições de reacção para microrganismos.

A essência de um bom planeamento consiste em projectar um ensaio de forma que ele seja capaz de fornecer exactamente o tipo de informação que se procura.

Partindo do total desconhecimento do sistema a estudar, o primeiro passo consiste em definir claramente os objectivos pretendidos. Nesta situação de pouca informação, não sendo sequer conhecidas as variáveis mais importantes para o sistema em estudo, é necessário realizar a triagem das variáveis e eliminar as não significativas. O uso de *planeamentos factoriais fraccionários* permite essa selecção de uma forma rápida e económica podendo ser usados para estudar vinte ou mais factores experimentais ao mesmo tempo. Na literatura pode ser obtida informação mais detalhada sobre planeamentos factoriais fraccionários, nomeadamente em (Neto et al. 1995; Silva, 1999).

Após a selecção das variáveis importantes, o próximo passo será avaliar quantitativamente a influência destas, sobre a resposta de interesse, bem como as possíveis interacções. Esta etapa pode ser efectuada, com o mínimo de ensaios, através de *planeamentos factoriais completos*. Ultrapassando esta etapa, e para obter uma descrição mais detalhada do processo, efectua-se a construção de modelos empíricos.

Quando o objectivo principal da investigação é a optimização do sistema, isto é, maximizar ou minimizar algum tipo de resposta, utiliza-se a *metodologia de superfície de resposta* (RSM – Response Surface Methodology), que se baseia na modelação por mínimos quadrados ou alternativamente a optimização *simplex sequencial*, em que o objectivo é simplesmente chegar ao óptimo, dispensando-se a construção de um modelo. Por último, terá que ser avaliada a qualidade do ajuste do modelo aos dados experimentais obtidos.

A metodologia de superfície de resposta é constituída por duas etapas: a modelação e o deslocamento. Estas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem

necessárias, com o objectivo de atingir uma região óptima (máxima ou mínima) da superfície em estudo. A modelação é feita, normalmente, ajustando-se modelos lineares ou quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planeamentos factoriais. O deslocamento dá-se sempre ao longo do caminho de máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajectória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada.

Considerando o caso concreto do estudo do efeito de duas variáveis (X_1 e X_2) na variação de uma determinada resposta (y), é efectuado um planeamento factorial 2^2 completo, com repetição no ponto central (figura 1.6). De notar que este planeamento contém um ponto central, e por isso varre três níveis de cada variável, e não dois.

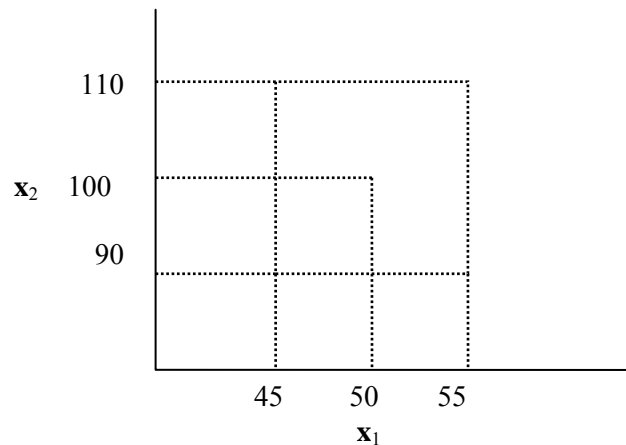


Figura 1.6 Planeamento factorial de dois níveis com ponto central. (adaptado de Neto et al., 1995)

Tabela 1.2 Matriz de planeamento 2^2 com ponto central. X_1 e X_2 representam os valores das variáveis codificadas pelas equações $X_1 = (x_1 - 50)/5$ e $X_2 = (x_2 - 100)/10$.

Ensaio	x_1	x_2	X_1	X_2	Y
1	45	90	-1	-1	Y1
2	55	90	1	-1	Y2
3	45	110	-1	1	Y3
4	55	110	1	1	Y4
5	50	100	0	0	Y5
6	50	100	0	0	Y6
7	50	100	0	0	Y7

O facto de existirem três níveis permite verificar se há ou não falta de ajuste para um modelo linear. A tabela 1.2 mostra a matriz do planeamento factorial que seria necessário executar experimentalmente. Após a realização dos ensaios definidos na tabela 1.2 e determinação dos valores numéricos da resposta para cada ensaio (valores de y), se for admitido que a superfície de resposta na região em estudo é uma função linear dos factores, a resposta pode ser estimada pela equação 1.4:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 \quad \text{Equação 1.4}$$

onde b_0 , b_1 e b_2 são estimativas dos parâmetros do modelo e X_1 e X_2 representam as variáveis em estudo, na forma codificada. Os valores de b_0 , b_1 e b_2 podem ser obtidos pelo método dos mínimos quadrados. A partir dos três ensaios repetidos no ponto central é calculada uma estimativa da variância associada aos parâmetros do modelo

que é utilizada na determinação dos erros padrão inerentes a cada parâmetro do modelo.

Pode-se então definir a equação do modelo ajustado representado na equação 1.5.

$$\hat{Y} = (b_0 \pm t_{n-2}\sigma_{b0}) + (b_1 \pm t_{n-2}\sigma_{b1})X_1 + (b_2 \pm t_{n-2}\sigma_{b2})X_2 \quad \text{Equação 1.5}$$

onde:

t_{n-2} representa o valor de t numa distribuição de Student com n-2 graus de liberdade sendo n o número de ensaios.

$(\sigma_{b0}, \sigma_{b1}, \sigma_{b2})$ representa o erro padrão associado a cada parâmetro do modelo.

Os valores do erro padrão e t são utilizados na avaliação da significância estatística do respectivo parâmetro. Para o nível de probabilidade escolhido, normalmente 95%, o valor do parâmetro calculado tem que ser significativamente diferente de zero nesse nível de confiança para ser estatisticamente significativo e portanto incorporado no modelo proposto.

Os mesmos parâmetros também são utilizados para avaliar a significância dos efeitos e do efeito de interação.

A qualidade do ajuste de um modelo linear nos parâmetros aos dados experimentais obtidos é efectuada através da análise de variância (ANOVA), como descritos na tabela 1.3

Tabela 1.3 Tabela de análise de variância para o ajuste de um modelo linear nos parâmetros pelo método dos mínimos quadrados. n_i = número de repetições no nível i ; m = número de níveis distintos; $n = \sum n_i$ = número total de observações; p = número de parâmetros do modelo.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Nº de graus de liberdade	Média Quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2$	$p - 1$	$MQ_R = SQ_R/(p-1)$
Resíduos	$SQ_r = \sum \sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r/(n-p)$
Falta ajuste	$SQ_{faj} = \sum \sum (\hat{Y}_i - \bar{Y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m-p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n-m)$

Total $SQ_T = \sum \sum (Y_{ij} - \bar{Y})^2$ $n - 1$

% de variação explicada: SQ_R/SQ_T

% de variação explicável: $(SQ_T - SQ_{ep})/SQ_T$

Significância estatística da regressão

Admitindo que os erros seguem uma distribuição normal, podem-se utilizar as médias quadráticas para testar se a equação de regressão é estatisticamente significativa. Quando por exemplo $b_1 = 0$, isto é, quando não há relação entre X_1 e Y , pode-se demonstrar que a razão entre as médias quadráticas MQ_R e MQ_r segue uma distribuição F:

$$MQ_R/MQ_r \approx F_{1,n-2} \quad \text{equação 1.6}$$

onde 1 e $n-2$ são o número de graus de liberdade da média quadrática devida à regressão e da média quadrática residual, respectivamente. Como a equação 1.6 só é válida para $b_1 = 0$ podemos testar essa hipótese nula usando o valor efectivamente calculado para MQ_R/MQ_r . Para isso basta compará-lo com o valor tabelado de $F_{1,n-2}$ no nível de confiança desejado. Se for verificado que MQ_R/MQ_r é maior que $F_{1,n-2}$, a possibilidade de $b_1 = 0$ deve ser rejeitada. Por outras palavras, nesse caso teríamos evidências estatísticas suficientes para acreditar na existência de uma relação linear entre as variáveis. Quanto maior o valor de MQ_R/MQ_r , melhor.

Pode acontecer, porém, que uma regressão, embora significativa do ponto de vista do teste F, não seja útil para realizar previsões, por cobrir uma faixa pequena dos factores estudados. Sugeriu-se (Box e Wetz, 1973) que para que isso não ocorra, isto é, para que uma regressão seja não apenas estatisticamente significativa mas também útil para fins predictivos, o valor da razão MQ_R/MQ_r deve ser no mínimo quatro a cinco vezes $F_{1,n-2}$.

Tal como no caso anterior, também a soma quadrática residual pode ser decomposta nas parcelas soma quadrática do erro puro e soma quadrática devido à falta de ajuste:

$$SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj} \quad \text{equação 1.7}$$

a primeira parcela não tem a ver com o modelo, reflectindo apenas a dispersão das respostas repetidas em torno das suas médias em cada nível. Este termo dá uma medida do erro aleatório que afecta as respostas. A segunda parcela depende do modelo fornecendo uma medida da falta de ajuste do modelo às respostas observadas.

Um teste F da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} serve para avaliar se o modelo está ou não bem ajustado às observações. Valores altos de MQ_{faj}/MQ_{ep} significarão muita falta de ajuste. Sendo $F_{n,m}$ retirado da tabela para n graus de liberdade da falta de ajuste e m graus de liberdade do erro puro.

2 OBJECTIVOS

Geral

Optimizar as condições ambientais de fermentação de forma a maximizar a produção de proteína fluorescente – YEFP - em *E. coli* M15.

Específicos

- Avaliar o efeito da concentração de oxigénio dissolvido nos parâmetros específicos que caracterizam o processo (taxa específica máxima de crescimento, rendimento em biomassa, produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias e normalizadas) bem como a influência da variação da temperatura de fermentação.
- Pretendeu-se, também, verificar qual a fase de crescimento na qual, deveria ser efectuada a indução da produção de proteína fluorescente –YEFP.
- Estabelecer um modelo matemático, para cada resposta estudada, que represente a variação da resposta em função dos factores estudados e determinar o ponto óptimo da equação validada.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo descrevem-se todos os materiais e métodos utilizados para estudar experimentalmente a influência dos parâmetros ambientais, temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, na produção de YEFP em *E.coli* M15.

O planeamento factorial utilizado, o processo fermentativo, o microrganismo bem como informações relativas ao equipamento, instalação experimental e reagentes químicos usados, são a seguir abordados.

3.1 MEIOS DE CULTURA

O meio de cultura utilizado, tanto na preparação do inoculo como no estudo dos ensaios em modo descontínuo, foi um meio M9 modificado descrito a seguir.

3.1.1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

O meio de cultura utilizado na preparação do inoculo vem descrito na tabela 3.1. Em todos os ensaios foram preparados 0,3 Kg do meio M9 modificado (Rocha, 2003; Veloso, 2006), da seguinte forma: pesou-se 1,5 g de glucose comercial (1) e adicionou-se num matraz água destilada até perfazer um peso total de 250 g.

Noutro matraz, foram pesados os sais pertencentes ao conjunto 2 da tabela 3.1 e adicionou-se água destilada até perfazer um peso total de 30 g.

Ambos os matrizes acima descritos foram esterilizados em autoclave, durante 20 minutos à temperatura de 121°C.

Posteriormente, foi preparada uma solução com os compostos do grupo 3 da tabela 3.1 adicionando-se água destilada até um peso total de 20 g.

Após arrefecimento, foi adicionada à chama a solução de compostos 2 à solução de compostos 1. A solução de compostos 3 foi adicionada à junção dos dois meios, sendo esterilizada por filtração com acrodiscos estéreis de 0,2 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro (Gelman Sciences, EUA) directamente para o recipiente que continha os meios 1 e 2.

Após a preparação do meio de cultura, este foi inoculado a partir de crioviais Stock contendo 1 mL de *E.coli* M15 com os plasmídeos [pEYFP] e [pREP4] que tinham sido progressivamente descongelados desde -80°C, -20°C até à temperatura ambiente.

O inoculo assim preparado foi colocado a 37°C e a uma velocidade de agitação de 150 rpm, numa incubadora orbital, até ser atingida uma densidade óptica de aproximadamente 1,3, que de um modo geral demorava cerca de 17 horas.

3.1.2 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA PARA OS ENSAIOS

Os ensaios experimentais relativos aos dois planeamentos factoriais de dois níveis 2², com duas repetições no ponto central (cuja variação dos factores temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido está descrita na tabela 3.5) foram efectuados em modo descontínuo com meio M9 modificado, com um peso total de 3 kg. A preparação do meio de fermentação foi semelhante para todos os ensaios e processou-se da seguinte forma: os compostos marcados com (1) na tabela 3.1 foram dissolvidos em água destilada e a solução resultante esterilizada em autoclave, dentro do reactor, durante 30 minutos à temperatura de 121°C. O peso total

desta solução foi de 2,6 kg. Os compostos (2) foram dissolvidos em água destilada num matraz e esterilizados em autoclave, durante 20 minutos à mesma temperatura da solução anterior, tendo um peso total de 0,37 kg. A solução dos compostos (3), com peso total de 0,03 kg, foi esterilizada com acrodiscos estéreis de 0,2 µm de porosidade e 25 mm de diâmetro (Gelman Sciences, EUA).

Tabela 3.1 Composição do meio de cultura M9 modificado

Nome	Compostos		Concentração (g/kg)		Solução
	Grau de pureza (≥)	Marca	Inóculo	Descontínuo	
Glucose monohidratada	comercial	COPAM	5,0	5,0	1
Na ₂ HPO ₄	98,5%	Riedel-de-Haën	6,0	6,0	2
KH ₂ PO ₄	98%	Riedel-de-Haën	3,0	3,0	2
NH ₄ Cl	99,5%	Panreac	1,0	1,0	2
NaCl	99,8%	Riedel-de-Haën	0,50	0,50	2
MgSO ₄ .7H ₂ O	99%	Riedel-de-Haën	0,12	0,12	3
Tiamina	99%	Fluka	0,34	0,34	3
CaCl ₂ .2H ₂ O	99%	Riedel-de-Haën	0,015	0,015	3
Kanamicina	92%	Sigma	0,025	0,025	3
Ampicilina	91%	Sigma	0,1	0,1	3
Solução de traços de minerais	-----	----	----	2,0 (i)	3
Solução de vitaminas	-----	----	----	2,0 (i)	3

(i) As unidades destas soluções são mL/kg.

Nas Tabelas 3.2 e 3.3 indicam-se as composições das soluções de traços minerais e de vitaminas utilizadas. Estas soluções foram preparadas no laboratório a partir dos compostos químicos mencionados nessas tabelas.

Tabela 3.2 Composição da solução de traços de minerais.

Composto	Grau de pureza (≥)	Marca	Concentração (g/L)
FeCl ₃	99%	Riedel-de-Haën	27
ZnCl ₂	98%	Riedel-de-Haën	2,0
CoCl ₂	98%	Riedel-de-Haën	2,0
NaMoO ₄	99,5%	Merck	2,0
CaCl ₂	99%	Riedel-de-Haën	1,0
CuCl ₂	99%	Riedel-de-Haën	1,0
H ₃ BO ₃	99,8%	Merck	0,50
HCl	95%	Merck	100 ⁽ⁱ⁾

(i) unidade: mL/L.

Tabela 3.3 Composição da solução de vitaminas.

Compostos	Grau de pureza (≥)	Marca	Concentração (g/L)
Riboflavina	98%	Riedel-de-Haën	0,42
Ácido Pantoténico	99%	Fluka	5,4
Ácido Nicotínico	99%	Riedel-de-Haën	6,1
Piridoxina	99,5%	Merck	1,4
Biotina	98,5%	Merck	0,060
Ácido Fólico	95%	Merck	0,042

3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado foi a estirpe de *E. coli* M15 (Nals, Strs, Rifs, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+), (QUIAGEN Inc., EUA), derivada da *E. coli* K12, contendo os plasmídeos [pREP4] (QUIAGEN Inc., USA) e [pEYFP] (Clontech, USA). O plasmídeo pREP4, de baixo número de cópias, confere resistência à kanamicina e expressa a proteína repressora *lac*, codificada pelo gene *lacI*, derivando do plasmídeo pACYC. Nas células hospedeiras estão presentes várias cópias deste plasmídeo que asseguram a produção de elevados níveis da proteína repressora *lac* que se liga às sequências do promotor no plasmídeo pEYFP e regula rigorosamente a expressão das proteínas recombinadas. A estirpe *E. coli* M15[pREP4] é assim capaz de uma produção de proteínas controlada, pois exhibe baixos níveis de expressões na fase pré-indução. Este facto é significativo, uma vez que permite a obtenção de culturas mais estáveis.

A expressão da proteína de fluorescência amarela esverdeada melhorada (EYFP), codificada pelo vector pEYFP (obtido a partir do plasmídeo pUC19, este por sua vez derivado do plasmídeo pPD16.43) é rapidamente induzida pela adição de 1 mM de IPTG, que se liga às proteínas repressor *lac* inactivando-as. A EYFP, como referido no item 1.2, é uma variação da GFP com a substituição de quatro aminoácidos que alteram o espectro de emissão de verde para amarelo esverdeado. O seu nível de fluorescência é aproximadamente igual ao da EGFP. O plasmídeo pEYFP, de elevado número de cópias, confere resistência à ampicilina.

3.3 FERMENTADOR E UNIDADE DE MEDIDA E CONTROLO DIGITAL

Todas as fermentações foram efectuadas em modo descontínuo num bioreactor agitado de 5-L (Biostat M.D, B.Braun, Alemanha).

O reactor está equipado com uma camisa para controlo da temperatura, um rotor de agitação e um controlador de caudal mássico para o arejamento. Inclui ainda

sensores para a concentração de oxigénio dissolvido, pH, temperatura, potencial redox, controlo de nível de volume e detecção de espuma.

O fermentador encontra-se ligado a uma unidade de controlo digital (DCU – *Digital Control Unit*) onde algumas destas variáveis podem ser monitorizadas e controladas. Cada variável tem o seu próprio ciclo de controlo, com parâmetros próprios, os quais podem ser alterados directamente pelo utilizador ou através de comunicação remota.

A DCU também permite outras funções como a amplificação dos sinais dos sensores, e a sua calibração.

A actuação final nos elementos de controlo também é efectuada por esta unidade, basicamente pela actuação nas bombas usadas para a adição de ácido ou base no controlo do pH, no aquecimento da camisa para controlo da temperatura e na velocidade de agitação e/ou taxa de arejamento para controlo da concentração de oxigénio dissolvido.

O sistema de fermentação Biostat incorpora outras unidades, responsáveis pelo poder de agitação, aquecimento e bombagem da água da camisa, bombas peristálticas para adição de ácido e base e adição de anti-espuma.

A descrição dos componentes do bioreactor pode ser encontrada na tabela 3.4.

Tabela 3.4 Descrição dos componentes principais do bioreactor.

Componente	Descrição
Vaso de fermentação (BIOSTAT MD, B.Braun, Germany).	-Vaso de cultura em vidro de boro-silicato com camisa externa para controlo da temperatura e várias portas para sondas, colheitas e entradas.
Agitador	-Movido por um motor de 55 WDC directamente montado no topo do vaso de fermentação -Agitador com 6 pás.
Sonda de temperatura	-Termómetro de platina (Pt-100)
Sonda de pH (Mettler Toledo, Suíça).	-Eléctrodo de vidro esterilizável -Medição de potenciometria
Sonda de oxigénio dissolvido (Mettler Toledo, Suíça)	-Medição polarográfica
Sistema de alimentação de gás	-Ar comprimido -Filtro 1- μ m (Swagelok, EUA) -Controlador de caudal mássico Hi-Tec F201C-FB (Bronkhorst, Holanda). -Filtro de membrana ACRO 50 (Pall, EUA)
Controlo de pH	-2 bombas peristálticas para adição de ácido e base.

O bioreactor é alimentado com ar desumidificado obtido a partir do sistema de ar comprimido do laboratório e controlado através de um controlador de caudal mássico (modelo Hi-Tec F201C-FB da Bronkhorst, Holanda)

A linha de ar que alimenta o reactor passa através de dois processos de filtração: a primeira é efectuada com um filtro de 1 μ m da Swagelok (EUA) antes do controlador de caudal mássico para remoção de partículas grosseiras, a segunda filtração utiliza um filtro de membrana hidrofóbica autoclavável de 0,2 μ m (Acro 50 da Pall, USA) que é colocado antes do reactor para esterilização do ar.

A figura 3.1 mostra uma fotografia da instalação experimental utilizada para a realização dos ensaios.



Figura 3.1: Fotografia da instalação experimental utilizada nos ensaios.

3.4 OPERAÇÃO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS

Para efectuar cada ensaio, com os factores definidos para os planeamentos factoriais 2^2 com ponto central (tabela 3.5), e após a esterilização do meio de cultura, seguiu-se a sequência de passos seguinte:

- 1- Adicionar de forma estéril dos meios 2 e 3 (da tabela 3.1) ao meio 1 que se encontra dentro do reactor.
- 2- Introduzir a referência para a temperatura de fermentação correspondente ao ensaio do planeamento factorial a executar, na DCU.
- 3- Activar a agitação com um valor de referência de 150 rpm na DCU.
- 4- Iniciar o controlo da temperatura e esperar que esta atinja o valor pretendido de forma estável.
- 5- Calibrar a sonda de oxigénio dissolvido para 0% de oxigénio dissolvido através da introdução, asséptica, de azoto gasoso no meio de cultura de acordo com as instruções da DCU.
- 6- Calibrar a sonda de oxigénio dissolvido para 100% de oxigénio dissolvido através da introdução, asséptica, de 10 L/min de ar e aumentando a agitação para 500 rpm.

- 7- Introduzir a referência para o oxigénio dissolvido na DCU, em função do nível definido para cada ensaio do planeamento factorial.
- 8- Calibrar o eléctrodo de pH fora do reactor utilizando padrões de pH 4 e pH 7.
- 9- Introduzir o eléctrodo de pH dentro do reactor após esterilização com etanol (70% comercial).
- 10- Iniciar o controlo de pH.
- 11- Iniciar o controlo em cascata da concentração de oxigénio dissolvido.
- 12- Inocular o reactor iniciando-se assim, o ensaio.
- 13- Retirar uma amostra ao meio de fermentação, de hora em hora. Em cada amostra efectuar as seguintes leituras:
 - a. Ler a densidade óptica ($D.O_{600nm}$) da amostra a 600 nm num espectrofotómetro UV/VIS V-560 (Jasco, inc., EUA).
 - b. Ler a fluorescência da amostra num espectrofluorímetro FP-6200 (Jasco, inc., EUA) com $\lambda_{excitação}$ de 513 nm e $\lambda_{emissão}$ de 527 nm.
 - c. Centrifugar a amostra a 3000 rpm durante 20 minutos numa centrífuga CENCOM (J.P. Selecta, Espanha).
 - d. Ler novamente a fluorescência do sobrenadante com $\lambda_{excitação}$ de 513 nm e $\lambda_{emissão}$ de 527 nm
 - e. Filtrar 1 mL de amostra, com filtros descartáveis Gyrodisc Syr. CA-PC (Orange Scientific, Bélgica) de porosidade 0,2 μm e 30 mm de diâmetro. Determinar a concentração de acetato e glucose por HPLC, num cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC) Jasco (Japão), com detector UV/Vis Jasco e detector de Índice de refração Jasco, com acido sulfúrico 0,01 N como eluente a caudal constante de 0,5 mL/min à temperatura de 35°C, sendo a separação efectuada numa coluna cromatográfica de ácidos orgânicos Chrompack.
 - f. Na restante amostra filtrada, determinar a concentração de glucose pelos métodos DNS e enzimático.
 - g. Efectuar a indução da produção da proteína YEFP pela adição, asséptica, de uma solução de 1,5 mM de IPTG. Para o planeamento factorial 2^2 com ponto central, com indução da produção de YEFP no início da fase exponencial de crescimento, adicionar a solução 1,5 mM de IPTG quando a densidade óptica do meio de fermentação for de aproximadamente 0,4, à qual correspondem cerca de 2 horas de fermentação. Para o planeamento factorial 2^2 com ponto central com indução da produção de YEFP no meio da fase exponencial de crescimento, adicionar a solução 1,5 mM de IPTG quando a densidade óptica do meio de fermentação for de aproximadamente 3,0, à qual correspondem cerca de 7 horas de fermentação. A solução de 1,5 mM de IPTG é esterilizada com acrodiscos estéreis de 0,2 μm de porosidade e 25 mm de diâmetro (Gelman Sciences, EUA), directamente para o interior do reactor,

3.5 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS ESTUDADAS

As fermentações foram efectuadas com os valores de referência para o controlo das variáveis ambientais indicados na Tabela 3.5.

Foram utilizadas soluções aquosas (diluição 1:4) de hidróxido de amónio a 25% e de ácido fosfórico a 85%, para controlar o pH do meio a 7,0 ($\pm 0,1$). Para controlar o nível de espuma foi adicionado, quando necessário, um agente anti-espuma (Merck).

Para estudar o efeito dos factores temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido na produção da proteína YEFP em *E.coli* M15 foi efectuado um planeamento factorial 2^2 completo, com repetição no ponto central. Este planeamento foi efectuado em duplicado, sendo a indução da produção efectuada no início da fase exponencial de crescimento, para um dos planeamentos 2^2 e a indução da produção de YEFP efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, para o outro planeamento factorial 2^2 . Na tabela 3.5 vêm descritos os planeamentos experimentais.

Tabela 3.5 Matriz do planeamento experimental segundo dois factoriais 2^2 , com repetição no ponto central.

Ensaio	Nível da variável		Factor		Momento de Indução
	T (°C)	O2 dissolv. (%)	T (°C)	O2 dissolv. (%)	
1	-1	-1	27	15	Início
2	+1	-1	40	15	Início
3	-1	+1	27	40	Início
4	+1	+1	40	40	Início
5	0	0	33,5	27,5	Início
6	0	0	33,5	27,5	Início
1	-1	-1	27	15	Meio
2	+1	-1	40	15	Meio
3	-1	+1	27	40	Meio
4	+1	+1	40	40	Meio
5	0	0	33,5	27,5	Meio
6	0	0	33,5	27,5	Meio

Início – indução da produção de GFP no início da fase exponencial de crescimento (D.O._{600nm} = 0,4)

Meio – indução da produção de GFP no meio da fase exponencial de crescimento (D.O._{600nm} = 3,0)

3.6 PLANEAMENTO EXPERIMENTAL

As variáveis a estudar foram codificadas de acordo com a equação 3.1:

$$V_C = (V_R - V_0) / \Delta V_R \quad \text{equação 3.1}$$

Onde V_C – valor codificado da variável independente

V_R – valor real da variável independente

V_0 – valor real da variável independente no ponto central

ΔV_R – valor do passo, isto é, $(V_{R\text{máx.}} - V_{R\text{min.}})/2$

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o programa DESIGN-EXPERT (versão 5).

A significância dos factores experimentais foi testada pelo teste *t* de student. Este teste, baseado na hipótese de que o verdadeiro parâmetro é zero, foi utilizado para verificar se o factor em causa é ou não significativo na resposta em estudo. Se o valor de *t* calculado (t_{calc}) for superior ao *t* tabelado ($t_{\text{tab}, 1-\alpha, \lambda}$) para um nível de significância α e λ graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta.

Os níveis de significância, a notação utilizada para denotar cada nível, bem como os valores de t_{tab} para os graus de liberdade do estudo (neste caso, 3 graus de liberdade), encontram-se na tabela 3.8.

Tabela 3.8 Valores de t_{tab} , nível de probabilidade e notação utilizada para cada nível de significância, no planeamento efectuado.

Nível de significância	Valor de t_{tab}	p	Notação
90%	2,353	$p < 0,10$	*
95%	3,182	$p < 0,05$	**
99%	5,841	$p < 0,01$	***

Posteriormente, foi postulado que as respostas eram ajustadas a um modelo polinomial de primeira ordem, expresso pela equação 3.2:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_{12} X_1 X_2 \quad \text{equação 3.2}$$

Onde:

\hat{Y} Representa a variável de resposta,

b_0 – valor da média global das respostas (coeficiente de intercepção)

b_1 e b_2 – valores dos efeitos principais (coeficientes lineares)

b_{12} – valor do efeito de interacção

X_1 e X_2 – representam as variáveis estudadas.

A avaliação desta superfície indica onde existem as condições óptimas dentro da área experimental estudada, ou em que direcção é necessário realizar ensaios adicionais para alcançarem melhores resultados.

A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação R^2 e a sua significância estatística foi determinada pelo teste F de Fisher.

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

A determinação da concentração de biomassa das amostras foi efectuada, em duplicado, através da leitura da densidade óptica das amostras a 600 nm (DO_{600}) num espectrofotómetro UV/Vis V-560 (Jasco, EUA). O valor de absorvância obtido, em cada amostra, foi correlacionado com o peso seco, calculando-se a concentração de biomassa (g/Kg) através de uma curva da calibração de densidade óptica versus peso seco (anexo A.1). Como branco foi usada água destilada. Em geral, as amostras tiveram que ser diluídas com água destilada para adequar a medição à gama linear de absorvância da curva de calibração (0 a 0,8 unidades de absorvância).

3.7.2 DETERMINAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA

Para determinar a intensidade de fluorescência de cada amostra foram efectuadas diluições com água destilada sendo a fluorescência obtida por leitura directa no espectrofluorímetro (Jasco FP-6200) com um comprimento de onda de excitação de 513 nm e comprimento de onda de emissão de 527 nm. As diluições foram efectuadas de forma que o valor de fluorescência obtido (em Unidades arbitrárias de fluorescência - AFU – *Arbitrary Fluorescence Units*) estivesse dentro da zona de leitura (valores de fluorescência entre 20 e 600 AFU).

Cada amostra foi centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos numa centrífuga CENCOM (J.P. Selecta, Espanha) e determinada a fluorescência do sobrenadante, para avaliar se a fluorescência obtida nas amostras era unicamente devida à biomassa ou se existia fluorescência devida a metabolitos ou componentes do meio de cultura. Foi verificado que a fluorescência do sobrenadante era constante ao longo de toda a fermentação e ligeiramente superior à fluorescência do meio de cultura.

Para garantir que a intensidade de fluorescência obtida em cada amostra diluída era proporcional à fluorescência efectiva de cada amostra foi inicialmente estudada a relação existente entre a fluorescência e a densidade óptica. Para esse efeito, efectuaram-se várias diluições de uma amostra do meio de cultura determinando-se a respectiva fluorescência e densidade óptica a 600 nm.

Foi verificado que o limite de detecção do espectrofluorímetro é de 1000 AFU. No entanto, a sua zona de leitura encontra-se entre 20 e 600 AFU, aproximadamente (Anexo A.4), podendo ser garantido que dentro desta zona de leitura a diluição efectuada na amostra não dilui o valor de fluorescência efectivo.

3.8 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DAS RESPOSTAS ANALISADAS

Cada ensaio do planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, foi efectuado nas condições experimentais descritas na tabela 3.5.

As respostas para as quais se pretendia otimizar as condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, foram as seguintes:

3.8.1 Taxa específica de crescimento – μ (h^{-1})

Para o cálculo desta resposta, utilizou-se a cinética associada a reactores descontínuos (equação 3.3), nos quais se sabe que na fase de latência, a taxa específica de crescimento é próxima de zero, enquanto que na fase exponencial de crescimento, a taxa específica de crescimento é constante e máxima.

Foi então definido, em primeiro lugar, onde se inicia e acaba a fase exponencial de crescimento, para cada ensaio do planeamento factorial. Após a determinação dos pontos experimentais correspondentes à fase exponencial, foi utilizada a expressão da taxa específica de crescimento (equação 3.4).

$$\mu = 1/X * dX/dt \quad \text{equação 3.3}$$

onde:

μ - Taxa específica de crescimento (h^{-1})

X - Concentração de biomassa (g/Kg)

dX/dt – Taxa de variação da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação (g/Kg h)

que por integração vem:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu * t \quad \text{equação 3.4}$$

Onde:

X_0 – Concentração de biomassa inicial (g/Kg)

t – Tempo de fermentação (h)

A partir do declive da recta $\ln(x)$ vs t determinou-se o valor para a taxa específica de crescimento, para cada ensaio em estudo.

3.8.2 Rendimento em biomassa – $\gamma_{X/S}$ (g biomassa / g glucose)

O rendimento em biomassa foi obtido dividindo a quantidade de biomassa produzida (g) pela quantidade de substrato consumido (g), a partir da expressão (equação 3.5):

$$\gamma_{X/S} = \Delta X / (-\Delta S) = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad \text{equação 3.5}$$

Sendo:

$\gamma_{X/S}$ – rendimento em biomassa (g/g)

ΔX – Diferença da concentração de biomassa inicial (X_i) e concentração de biomassa no final da fermentação (X_f)

$(-\Delta S)$ – Diferença da concentração de glucose inicial (S_i) e concentração de glucose no final da fermentação (S_f)

O mesmo parâmetro, foi também calculado a partir do coeficiente angular da recta: ΔX vs $(-\Delta S)$.

3.8.3 Produção máxima de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias - F (AFU)

A produção de fluorescência foi obtida a partir da diferença entre o valor máximo de fluorescência obtido durante a produção e o valor de fluorescência antes da indução da produção em unidades arbitrárias.

3.8.4 Produção de fluorescência em unidades de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa - f (NFU) ou (AFU/(g/Kg))

Para cada ponto experimental, em cada fermentação, foi efectuada a normalização da intensidade de fluorescência obtida (AFU) pela correspondente concentração de biomassa responsável por produzir essa intensidade de fluorescência. A produção de fluorescência normalizada foi obtida por diferença entre o valor máximo de fluorescência normalizada durante a produção e o valor de fluorescência normalizada antes da indução.

Um exemplo da análise dos dados experimentais, efectuada em cada ensaio dos planeamentos factoriais, bem como o cálculo de todas as respostas, acima mencionadas, vem descrito no anexo B.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TEMPERATURA DE FERMENTAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE OXIGÉNIO DISSOLVIDO

A avaliação do efeito da temperatura de fermentação, bem como do da concentração de oxigénio dissolvido no meio nas respostas estudadas, foi efectuada segundo um planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central.

Com o objectivo de estudar o comportamento das respostas em função do momento de indução da produção de YEFP, foi efectuada um novo planeamento factorial, alterando-se o momento de indução.

Sendo assim, foram efectuados os seguintes planeamentos:

- planeamento factorial 2^2 completo, com repetição no ponto central.
Em todos os ensaios, a indução da produção de proteína GFP foi efectuada no início da fase exponencial de crescimento, correspondendo a uma D.O. (600nm) de 0,4, aproximadamente.
- planeamento factorial 2^2 completo, com repetição no ponto central.
Em todos os ensaios a indução da produção de proteína GFP foi efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, correspondendo a uma D.O.(600nm) de 3,0, aproximadamente

As repetições no ponto central foram efectuadas com o objectivo de estimar o erro experimental.

Nas tabelas 4.1 e 4.2 encontram-se os principais resultados obtidos para os ensaios realizados com base nos planeamentos factoriais 2^2 . As respostas analisadas foram a taxa específica máxima de crescimento, o rendimento em biomassa, a produção máxima de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias e a produção de fluorescência em unidades de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa.

A análise das respostas é efectuada segundo duas perspectivas:

1. Inicialmente é efectuada a análise de cada efeito na resposta, bem como o efeito de interacção (ao longo deste capítulo, 4.1)
2. Posteriormente é postulado um modelo para descrever o comportamento da resposta em função dos factores em estudo (descrito no capítulo seguinte, 4.2).

Relativamente à produção de fluorescência e analisando as tabelas 4.1 e 4.2, pode-se verificar um comportamento semelhante quando a indução da produção de YEFP é efectuada nas duas fases de crescimento da bactéria, verificando-se, para os dois casos, uma produção máxima nas condições do ponto central.

Pela observação das mesmas tabelas, não é possível analisar o efeito dos factores nas outras respostas estudadas, pelo que se recorreu à análise estatística dos dados experimentais. Esta análise foi realizada utilizando-se o programa Design-Expert (versão 5.0).

As estimativas dos efeitos (isto é, as estimativas dos valores numéricos de b_0 , b_1 , b_2 e b_{12} , sendo b_0 o valor da média global das respostas, representado por: MÉDIA; b_1 e b_2 são os efeitos principais, temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, representados por A e B; e b_{12} é o efeito da interacção dos efeitos principais, representado por AB), os erros-padrão (isto é, erro experimental associado à determinação da estimativa do efeito) e os resultados relativos à aplicação do teste t de Student (o critério utilizado para avaliar a significância estatística do efeito utilizando o teste t de Student vem descrito no ponto 3.6. Neste ponto vem também

explicado o significado da notação utilizada nas tabelas abaixo. O valor de t_{tab} é dado pelo programa e o seu cálculo algébrico pode ser consultado nas secções 2.6 e 3.1 da referência bibliográfica (Neto et al., 1995)), para as quatro respostas analisadas e os valores de t_{tab} são apresentados nas tabelas 4.3 a 4.10. Todos estes valores foram fornecidos pelo programa DESIGN-EXPERT (Versão 5.0)

Tabela 4.1: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ (h^{-1}), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ (g biomassa / g glucose), produção máxima de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias F(AFU), produção de fluorescência em unidades de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa f(NFU), no planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, para indução da produção de YEFP no início da fase exponencial.

Ensaio	Variáveis		Respostas			
	T	O ₂	μ	$Y_{x/s}$	F	f
	(nível do factor)	dissolvido (nível do factor)				
1	-1	-1	0,290	0,329	10219	4494
2	+1	-1	0,254	0,259	32917	25204
3	-1	+1	0,322	0,457	11673	4432
4	+1	+1	0,205	0,193	43189	42226
5	0	0	0,428	0,411	63710	29019
6	0	0	0,422	0,633	66917	29183

Tabela 4.2: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ (h^{-1}), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ (g biomassa / g glucose), produção máxima de fluorescência em unidades de fluorescência arbitrárias F(AFU), produção de fluorescência em unidades de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa f(NFU), no planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, para indução da produção de YEFP no meio da fase exponencial.

Ensaio	Variáveis		Respostas			
	T	O ₂	μ	$Y_{x/s}$	F	f
	(nível do factor)	dissolvido (nível do factor)				
1	-1	-1	0,263	0,304	6515	3284
2	+1	-1	0,345	0,231	52052	33130
3	-1	+1	0,308	0,410	6927	2897
4	+1	+1	0,333	0,323	59154	35689
5	0	0	0,442	0,379	64324	30496
6	0	0	0,377	0,398	76830	36120

A) INDUÇÃO EFECTUADA NO INÍCIO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO

4.1.1 ANÁLISE DA RESPOSTA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO

A tabela 4.3 descreve as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de Student para a resposta taxa específica máxima de crescimento, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela 4.3: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta taxa específica máxima de crescimento**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	0,27	2,121E-3	
A: Temperatura	-0,038	2,121E-3	-18,03 ***
B: Oxigénio dissolvido	-4,250E-3	2,121E-3	-2,00
AB	-0,020	2,121E-3	-9,55***

Pela análise da tabela 4.3, verifica-se que tanto o efeito da temperatura de fermentação como o efeito de interacção dos dois factores, são estatisticamente significativos ao nível de 99% de confiança, uma vez que os respectivos valores de t_{cal} são, em valor absoluto, superiores ao valor de t_{tab} que para o nível de 99% de confiança é 5,841.

O efeito da concentração de oxigénio dissolvido no meio de fermentação não é estatisticamente significativo, quando avaliado pelo teste t de Student dado que o valor de t_{cal} é inferior a t_{tab} que para 90% de confiança tem o valor de 2,353.

Estes resultados são representados pelo gráfico de probabilidade normal na figura 4.1, onde os pontos A e AB, correspondentes aos factores “Temperatura de fermentação” e “efeito de interacção”, estão bastante afastados da recta de probabilidade normal, sendo por isso significativos. O mesmo não acontece com o ponto B (factor concentração de oxigénio dissolvido), sendo por isso estatisticamente não significativo. Quanto mais afastado estiver o ponto representante do efeito da recta de probabilidade normal, mais estatisticamente significativo é o seu efeito na resposta em estudo.

É de notar que os efeitos significativos, temperatura de fermentação e efeito de interacção, têm um efeito negativo na resposta taxa específica de crescimento (tabela 4.3; expresso no sinal negativo dos respectivos efeitos).

Para interpretar o efeito dos factores temperatura de fermentação, concentração de oxigénio dissolvido no meio e efeito de interacção na resposta em estudo utilizam-se os gráficos de interacção dos efeitos, como o representado na figura 4.2. A existência de um efeito de interacção significativo indica que os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente.

Pela análise da figura 4.2 verifica-se que no nível inferior do factor B, um aumento do factor A do seu nível inferior para o seu nível superior (de A- para A+) produz uma diminuição da resposta taxa específica de crescimento que passa de $0,290 \text{ h}^{-1}$ para $0,254 \text{ h}^{-1}$.

Na mesma figura pode ser observado que no nível superior do factor B (B+), um aumento do factor A do seu nível inferior para o seu nível superior (de A- para A+) produz uma diminuição da resposta que passa de $0,322 \text{ h}^{-1}$ para $0,205 \text{ h}^{-1}$. Este facto

era esperado pois verificou-se que a temperatura tinha um efeito negativo sobre a resposta em causa.

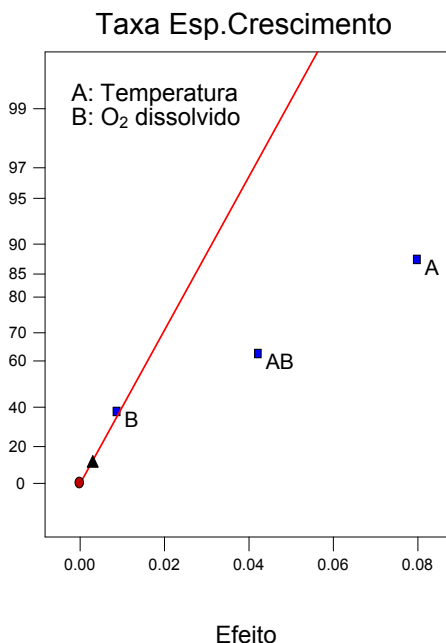


Figura 4.1. – Gráfico de probabilidade normal para a resposta taxa específica máxima de crescimento de *E.coli* M15.

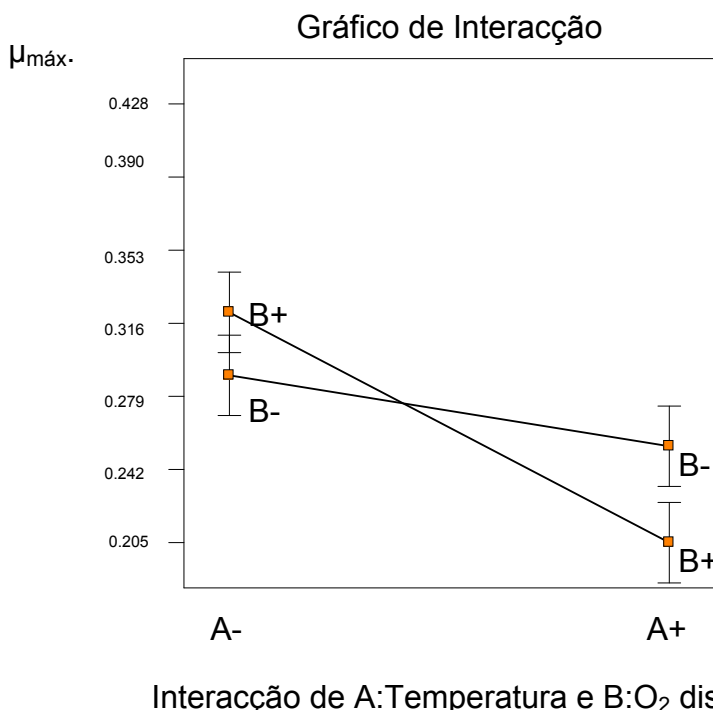


Figura 4.2: Interação dos efeitos A e B na resposta taxa específica máxima de crescimento.

Da mesma forma, quando o factor A, temperatura de fermentação, se encontra no seu nível inferior (A-), um aumento do factor B, concentração de oxigénio

dissolvido, de B- para B+ produz um ligeiro aumento da taxa específica de crescimento, passando de 0,290 h⁻¹ para 0,322 h⁻¹. Quando o factor A se encontra no nível superior, A+, um aumento do factor B do nível inferior para o nível superior, de B- para B+, produz uma ligeira diminuição da resposta, passando de 0,254 h⁻¹ para 0,205 h⁻¹. Como foi verificado na tabela 4.3 o efeito B, concentração de oxigénio dissolvido, quando avaliado pelo teste *t* de student não era estatisticamente significativo. Assim, as diferenças observadas para este caso servem apenas para aferir a tendência da resposta. Olhando para o valor de *t*_{cal} do factor B (2,00), este é próximo do valor de *t*_{tab} de 2,353, para 90% de confiança, o que quer dizer que este factor apesar de não ser estatisticamente significativo influencia a resposta. No entanto a influência deste factor na resposta taxa específica máxima de crescimento, na região de estudo, é de tal forma pouco acentuada que não é quantificada pelo modelo empregue que é um modelo empírico. Daqui podemos concluir que as variações produzidas na taxa específica de crescimento quando se altera a temperatura são bastante superiores às variações produzidas na resposta quando se altera a concentração de oxigénio dissolvido no meio de fermentação, mostrando que o efeito da temperatura de fermentação sobre a resposta é bastante mais acentuado.

Vários modelos têm sido propostos para descrever a dependência da taxa específica máxima de crescimento com a temperatura. Foi mostrado que, dentro da gama de temperaturas que permitem o crescimento, a taxa específica máxima segue uma curva em forma de “sino”, a qual apresenta um máximo (temperatura óptima de crescimento). No modelo proposto por Esener (1981) (equação 4.1), μ_{max} aproxima-se assintoticamente das abcissas nos pontos das duas temperaturas cardinais, máxima e mínima:

$$\mu_{max} = [A \exp (-\Delta H1/RT)]/[1+K \exp (-\Delta H2/RT)] \quad \text{Equação 4.1}$$

Também o modelo proposto por Matkowsky et al. (1982) (equação 4.2) é definido para $T_{min} < T < T_{max}$ Fora desta gama μ_{max} é zero:

$$(\mu_{max})^{(1/2)} = b (T-T_{min.})\{1-\exp [c (T-T_{max.})]\} \quad \text{Equação 4.2}$$

Kovarová et al. (1996) estudaram a aplicação destes dois modelos em reactor fechado para o crescimento de *E. coli* ML30. Foi demonstrado que ambos os modelos ajustaram bem os dados experimentais, obtendo-se experimentalmente uma temperatura óptima de 38,7°C e $\mu_{max} = 0,95 \pm 0,05$ para o modelo 4.1 e $\mu_{max} = 0,92 \pm 0,05$ para o modelo 4.2. É de notar que para temperaturas abaixo da temperatura óptima, a diminuição da taxa específica máxima de crescimento é mais lenta comparando com a diminuição súbita que ocorre para valores de temperatura superiores à temperatura óptima de crescimento. No presente estudo pode-se concluir que a temperatura óptima se encontrará na vizinhança do ponto central, correspondente a 33.5°C.

Os valores para a taxa específica máxima de crescimento apresentados por estes autores são bastante superiores aos determinados no presente trabalho. No entanto, na literatura vêm referenciados outros valores para o mesmo parâmetro mais próximos dos aqui apresentados. Kayser et al. (2005) apresentam um valor de 0,415 h⁻¹ para este parâmetro para a *E. coli* K-12. Siguenza et al. (1999) determinaram experimentalmente a taxa específica máxima de crescimento em reactor fechado, para

a estirpe selvagem JM101 e duas estirpes suas derivadas PB12 e PB25, afectadas no metabolismo PEP (fosfoenolpiruvato) obtendo $0,78 \text{ h}^{-1}$, $0,47 \text{ h}^{-1}$ e $0,62 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. É de salientar que os ensaios experimentais efectuados para o planeamento factorial, não correspondem, à partida, às condições óptimas de crescimento, pelo que as taxas específicas máximas de crescimento determinadas podem apresentar valores ligeiramente inferiores aos esperados nas condições óptimas. Além disso, as taxas específicas máximas são função das estirpes usadas e da composição do meio de cultura, por exemplo, pelo que os valores obtidos não são directamente comparáveis com os encontrados na literatura.

Relativamente ao oxigénio, a sua presença ou ausência no meio de cultura determina as vias metabólicas pelas quais a *E. coli* efectua a assimilação da glucose, pelo que uma comparação entre a sua ausência / presença no que se refere à taxa específica de crescimento tem permitido obter resultados significativamente diferentes (Berney et al., 2006). No entanto, na região de estudo (concentração de oxigénio dissolvido entre 15 e 40%) o oxigénio não é um parâmetro limitante do crescimento. Assim, as eventuais diferenças encontradas poderão estar relacionadas com o maior ou menor efeito de um eventual stress oxidativo (Hondorp et al., 2004; Farr et al., 1991).

O stress oxidativo pode ser funcionalmente definido como um excesso de prooxidantes na célula. Tem sido mostrado em vários trabalhos publicados (Brunori et al., 1984; Hill et al., 1978; Floyd et al., 1990) que moléculas de oxigénio activo causam “danos” no DNA, RNA, proteínas e lípidos. As espécies de oxigénio activo são produzidas como um sub-producto do metabolismo aeróbio e a sua produção é aumentada quando a *E.coli* ou outras células são expostas a certos ambientes, por via alimentar ou doença. A toxicidade do oxigénio verifica-se quando o grau de stress oxidativo excede a capacidade do sistema de defesa das células.

A título de exemplo refere-se o trabalho de Honder et al., 2004, que estudaram a inactivação pelo stress oxidativo da cobalamina-independente metionina sintetase (MetE) em *Escherichia coli*. Para células de *E.coli* sob stress oxidativo parece existir uma ligação entre este fenómeno, a disponibilidade de metionina, e a enzima que catalisa o passo final de biossíntese de metionina, cobalamina-independente metionina sintetase (MetE). Os autores verificaram que as células de *E.coli* sujeitas a um stress oxidativo transiente durante o crescimento em meio mínimo desenvolviam auxotrofia para a metionina, parando o seu crescimento concluindo que a metionina se torna limitante do crescimento em células sujeitas a stress oxidativo.

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que para baixas temperaturas um aumento da disponibilidade de oxigénio conduz a um aumento da taxa específica máxima de crescimento. Quando a temperatura é de 40°C , superior à optima, verifica-se que um aumento da concentração de oxigénio dissolvido conduz a uma diminuição da taxa específica de crescimento. Uma possível explicação para esta alteração de comportamento pode ser a existência de um factor de stress provocado pela temperatura elevada, sendo o aumento da concentração de oxigénio dissolvido um factor de stress adicional.

4.1.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RENDIMENTO EM BIOMASSA

Na tabela 4.4 estão descritas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de Student para a resposta rendimento em biomassa, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Pela análise da referida tabela, verifica-se que nenhum dos efeitos principais é significativo, quando avaliados pelo teste t de Student pois os correspondentes valores de t_{cal} são inferiores ao valor de t_{tab} (2,353), para 90% de confiança.

Os mesmos resultados são verificados no gráfico de probabilidade normal que se encontra no anexo D.

Este facto permite concluir que a resposta rendimento em biomassa é independente da temperatura de fermentação e da concentração de oxigénio dissolvido no meio para o presente estudo. No entanto, vários dados bibliográficos contrariam estes factos (Goldberg et al., 1994; Farr et al., 1991; Bortolussi et al., 1983; Siguenza et al., 1999; Rocha, 2003).

Tabela 4.4: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta rendimento em biomassa**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	T _{cal}
Média	0,31	0,078	
A: Temperatura	-0,084	0,078	-1,06
B: Oxigénio dissolvido	0,015	0,078	0,20
AB	-0,048	0,078	-0,62

Não obstante os efeitos não serem significativos, foi efectuada uma análise da sua interacção. Observando a figura 4.3 (gráfico de interacção dos efeitos), verifica-se que quando o efeito B se encontra no seu nível inferior (B-), um aumento do factor A do seu nível inferior para o seu nível superior, não produz uma variação acentuada da resposta em causa, havendo uma ligeira diminuição do rendimento em biomassa de 0,329 g/g para 0,259 g/g quando se passa de A- para A+. Quando o factor B (percentagem de oxigénio dissolvido) se encontra no seu nível superior (B+), um aumento do factor A (temperatura de fermentação) do seu nível inferior para o seu nível superior, de A- para A+, produz uma diminuição mais acentuada da resposta (rendimento em biomassa), sendo os respectivos valores de 0,457 g/g (A-) e 0,193 g/g (A+). Daqui podemos verificar que um aumento da temperatura tem um efeito negativo na resposta rendimento em biomassa, sendo esse efeito mais acentuado para elevadas concentrações de oxigénio dissolvido no meio de fermentação.

Da mesma forma, quando o factor temperatura de fermentação se encontra no seu nível inferior (A-), um aumento do factor B do seu nível inferior (B-) para o seu nível superior (B+) conduz a um aumento do rendimento em biomassa que passa de 0,329 g/g para 0,457 g/g. Quando o factor A está no seu nível superior (A+), um aumento da concentração de oxigénio dissolvido conduz a uma diminuição do rendimento em biomassa de 0,259 g/g para 0,193 g/g quando B passa de B- para B+. Daqui podemos observar que o efeito da concentração de oxigénio no meio de fermentação é o inverso para os dois níveis de temperatura. Conclui-se também que o efeito da temperatura de fermentação sobre a resposta rendimento em biomassa é mais acentuado que o efeito da concentração do oxigénio dissolvido, para esta região de estudo. Este facto é evidenciado na tabela 4.4, uma vez que o efeito da temperatura é superior em termos absolutos, apesar de não ser significativo.

A explicação mais provável para que os factores temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido se tenham apresentado estatisticamente não significativos, contrariamente aos dados descritos na literatura, pode dever-se ao facto de o modelo que está a ser construído ser uma modelo empírico. Os modelos empíricos são modelos que procuram apenas descrever, com base nas evidências experimentais, o comportamento do processo estudado, ao contrário dos modelos cinéticos que descrevem com rigor e pormenorizadamente todas as reacções do processo. Sendo assim, pode ser que na região de estudo, um modelo empírico não

possua sensibilidade suficiente para traduzir o efeito significativo dos factores na resposta, não podendo por isso ser incorporados no presente modelo.

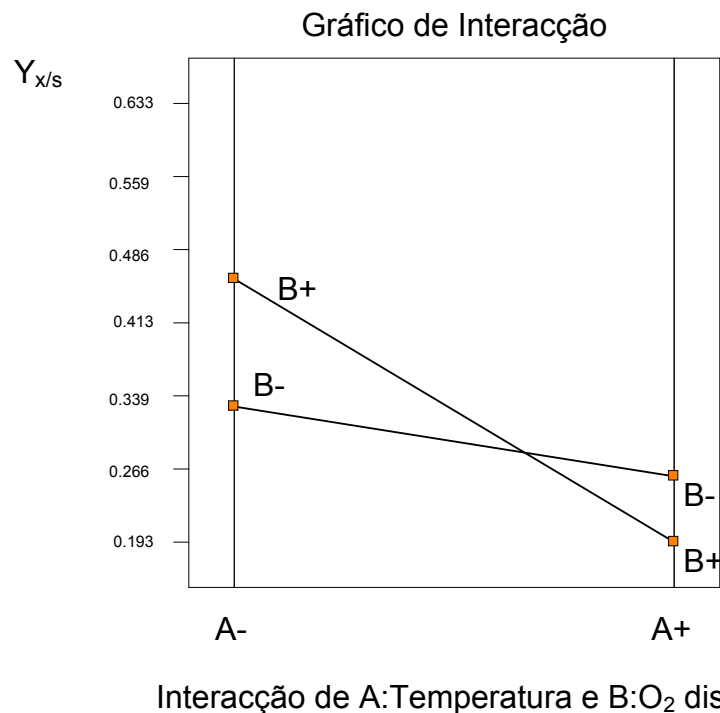


Figura 4.3: Interação dos efeitos A e B na resposta rendimento em biomassa.

Como foi verificado, a concentração de oxigénio dissolvido apresentou um efeito contraditório sobre o rendimento em biomassa. Para baixas temperaturas o efeito da concentração de oxigénio dissolvido foi positivo havendo um aumento desta resposta, mas para temperaturas elevadas o efeito foi negativo. Estes dados podem ser suportados no facto de o oxigénio ser um factor limitante do crescimento e perto do seu valor crítico afectar a taxa de crescimento, podendo ao mesmo tempo ter um efeito inibitorio quando presente em excesso. Sendo assim, é natural que para temperaturas elevadas um aumento da concentração de oxigénio seja um factor de stress adicional provocando uma diminuição do rendimento em biomassa.

4.1.3 ANÁLISE DA RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA EM UNIDADES ARBITRÁRIAS

A intensidade de fluorescência de cada amostra foi quantificada através da leitura directa, de cada amostra, num fluorímetro. Esta intensidade de fluorescência vem expressa em AFU (unidades arbitrárias de fluorescência).

Para cada condição do planeamento factorial, o aumento da intensidade de fluorescência foi monitorizado ao longo do tempo de fermentação.

Com o objectivo de determinar qual a influência da temperatura de fermentação e da concentração de oxigénio dissolvido na produção dessa fluorescência, foi efectuada a análise estatística dos efeitos sobre a resposta.

Na tabela 4.5 vêm descritas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de Student para a resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias.

Como pode ser visualizado na tabela 4.5, o efeito de interacção não é estatisticamente significativo. Os efeitos principais, temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, são estatisticamente significativos sendo a temperatura de fermentação estatisticamente significativa num nível de 99% de confiança (pois o valor de t_{cal} é superior a t_{tab} que para este nível de confiança é 5,841) e a concentração de oxigénio dissolvido num nível de 90% de confiança (pois o valor de t_{cal} é superior a t_{tab} que para este nível de confiança é 2,353). Verifica-se um efeito positivo dos efeitos principais sobre a produção de fluorescência.

Tabela 4.5: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	24499,53	1133,85	
A: Temperatura	13553,73	1133,85	11,95***
B: Oxigénio dissolvido	2931,41	1133,85	2,59*
AB	2204,53	1133,85	1,94

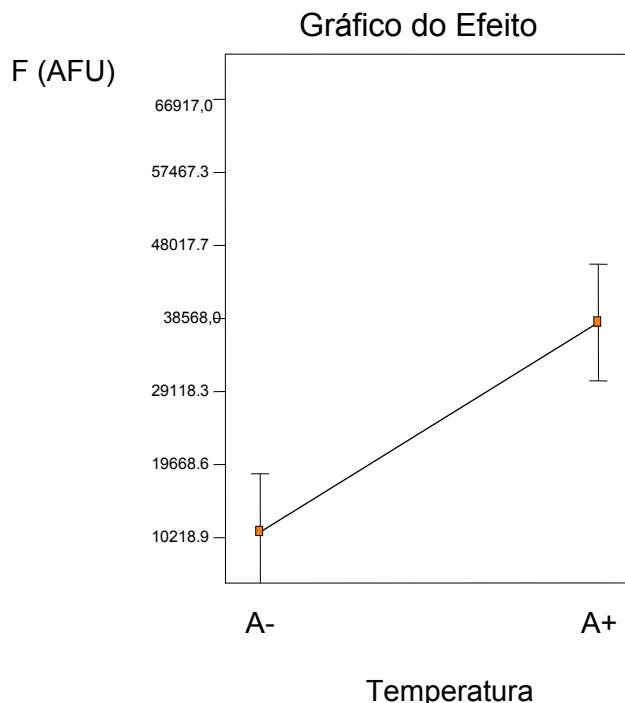


Figura 4.4.: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência arbitrária por YEFP em *E.coli*.

Como o efeito da interacção da temperatura de fermentação com a concentração de oxigénio dissolvido, não é estatisticamente significativo, a análise dos efeitos principais sobre a resposta pode ser efectuada isoladamente.

Observando a figura 4.4 verifica-se que quando o factor A (Temperatura de fermentação) passa do seu nível inferior, A-, para o seu nível superior, A+, existe um aumento acentuado da resposta. Pela análise da figura 4.5 verifica-se também, que um aumento da concentração de oxigénio dissolvido produz um aumento da resposta, no entanto o seu efeito não é tão pronunciado como o efeito do factor A sobre a resposta.

Com base nestes dados, pode ser concluído que a produção de fluorescência arbitrária é influenciada positivamente por elevadas temperaturas de fermentação e elevadas concentrações de oxigénio dissolvido.

A influência da temperatura de operação na produção de fluorescência pela GFP tem sido extensivamente estudada nos últimos anos (Mónica et al., 2008; Andrea et al., 2006; Belpaire et al. 2007; Kentaro et al., 2004).

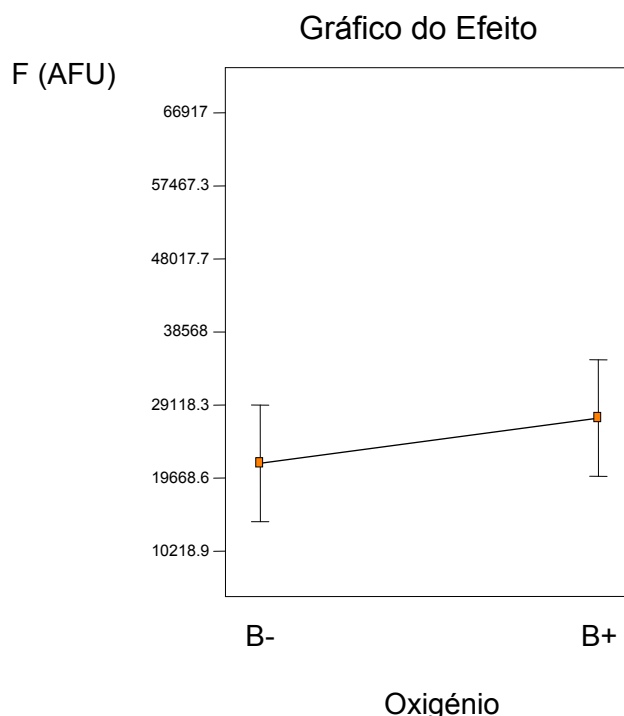


Figura 4.5: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência arbitrária por YEFP em *E.coli*.

Vários autores têm referenciado unanimemente (ver por exemplo a referência Andrea et al., 2006) que baixas temperaturas de fermentação favorecem a qualidade conformacional da proteína GFP, seja através da diminuição da percentagem de proteína insolúvel (em corpos de inclusão) relativamente à fracção solúvel, isto é, pelo aumento da sua solubilidade, como do melhoramento da fluorescência específica da fracção proteica solúvel e insolúvel.

No entanto, em termos globais, tem sido descrito que um aumento da temperatura de fermentação conduz a um aumento da fluorescência total por unidade de biomassa. Mónica et al. (2008) faz referência no seu trabalho ao aumento da fluorescência global por unidade de biomassa com o aumento da temperatura de fermentação, mas este aumento é unicamente devido ao aumento da fracção insolúvel.

Relativamente à influência de oxigénio dissolvido na produção de fluorescência pela GFP, vários estudos publicados evidenciam a necessidade da presença de oxigénio para que a GFP produza fluorescência (Chong et al. 2008; Belpaire et al., 2005; Inouye et al., 1994, Jiménez-Banzo et al., 2008). No entanto, muitos autores evidenciam o efeito negativo de elevadas concentrações de oxigénio na fluorescência apresentada pela GFP, nomeadamente pela presença de oxiradicaís (Abeer et al. 2008; Jiménez-Banzo et al., 2008; Belpaire et al., 2005; Phillips Jr., 1997).

Neste trabalho e de acordo com a literatura, um aumento da temperatura de fermentação conduz a um aumento acentuado da produção de fluorescência total pela YEFP. A concentração de oxigénio dissolvido, na gama em estudo, revelou ter um efeito positivo na produção de fluorescência, mas esse efeito não é muito pronunciado.

4.1.4 ANÁLISE DA RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA EM UNIDADES NORMALIZADAS PELA CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA

Analisando os efeitos da temperatura de fermentação e percentagem de oxigénio dissolvido, sobre a produção máxima de fluorescência normalizada pela biomassa (tabela 4.6), os resultados são concordantes com a análise efectuada para as unidades arbitrárias de fluorescência.

Aqui, todos os efeitos são estatisticamente significativos num nível de confiança de 99% e tanto os efeitos principais como o efeito de interacção têm um efeito positivo sobre a resposta.

Tabela 4.6: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	19088,87	57,86	
A: Temperatura	14626,00	57,86	252,79***
B: Oxigénio dissolvido	4239,77	57,86	73,28***
AB	4271,14	57,86	73,82***

É de notar que o nível de significância estatística dos efeitos e do efeito de interacção aumentou relativamente à resposta de produção de fluorescência antes de ser normalizada. Este facto é coerente, uma vez que os efeitos da temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido para além de afectarem a resposta produção de fluorescência vão afectar o estado fisiológico celular, logo a significância destes factores aumenta, quando a intensidade de fluorescência é normalizada pela concentração de biomassa.

Na figura 4.6 vem descrito o efeito de interacção da temperatura de fermentação e percentagem de oxigénio dissolvido para a resposta produção de fluorescência normalizada.

Como pode ser verificado, o comportamento é semelhante ao comportamento obtido para a produção de fluorescência arbitrária. Isto é, tanto no nível inferior como superior do factor B, um aumento da temperatura do seu nível inferior A- (27°C) para o seu nível superior A+ (40°C) conduz a um aumento acentuado da resposta. Estes resultados eram esperados pelo apontado no ponto anterior (ponto 4.1.3).

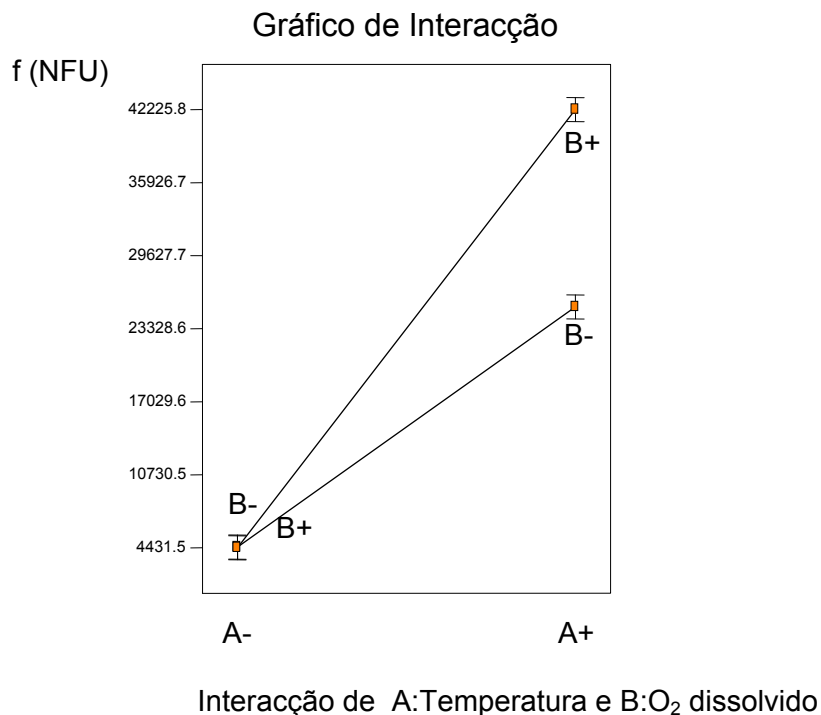


Figura 4.6: Interação dos efeitos A e B na resposta produção máxima de fluorescência normalizada por YEFP em *E. coli*.

B) – QUANDO A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE YEFP É EFECTUADA NO MEIO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO

4.1.5 ANÁLISE DA RESPOSTA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO

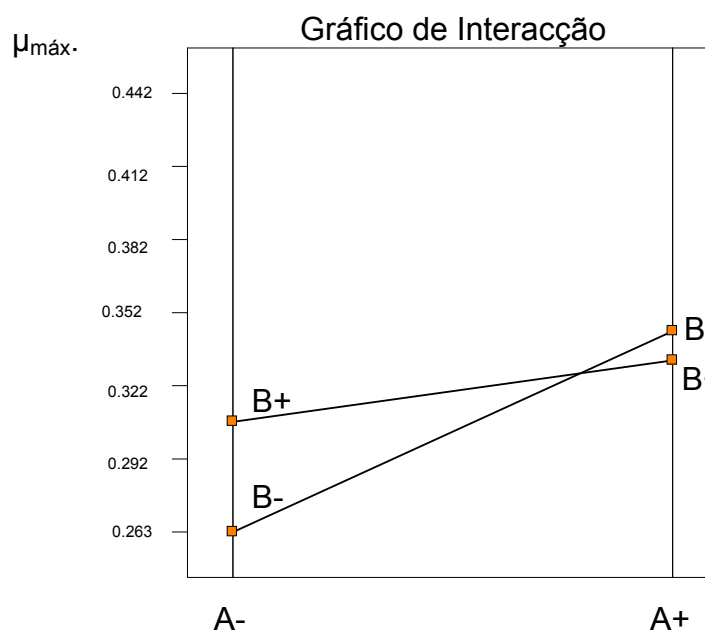
Quando a indução da produção de proteína YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento de *E. coli*, as respostas produzidas pelo sistema são diferentes.

Na tabela 4.7 vêm descritas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e os resultados da aplicação do teste t de Student para a resposta taxa específica máxima de crescimento, quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento. No anexo D pode ser observado o gráfico de probabilidade normal para esta resposta.

Pela análise da tabela 4.7, verifica-se que nenhum dos efeitos estudados é estatisticamente significativo, pois os respectivos valores de t_{cal} são inferiores a t_{tab} , para qualquer nível de confiança. Pode ser concluído que, tanto a temperatura de fermentação como a percentagem de oxigénio dissolvido não influenciam a taxa específica de crescimento no presente estudo. No entanto, e como foi referido anteriormente, os dados apresentados na literatura contrariam este facto. Não obstante, foi efectuada uma análise do gráfico de interação dos efeitos (figura 4.7) para avaliar de que forma os factores estudados afectam a taxa específica máxima de crescimento.

Tabela 4.7: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta taxa específica máxima de crescimento**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	0,031	0,023	
A: Temperatura	0,027	0,023	1,16
B: Oxigénio dissolvido	8,250E-3	0,023	0,36
AB	-0,014	0,023	-0,62



Interação de A:Temperatura e B:O₂ dissolvido

Figura 4.7: Interação dos efeitos A e B na resposta taxa específica máxima de crescimento.

Pode ser observado que, quando o factor B (oxigénio dissolvido) está no seu nível inferior (B-), um aumento do factor A do seu nível inferior para o seu nível superior produz um aumento acentuado da resposta que passa de 0,263 h⁻¹ para 0,345 h⁻¹, respectivamente. Da mesma forma, quando o factor B está no seu nível superior (B+), também um aumento do factor A do seu nível inferior para o seu nível superior produz um aumento na resposta que passa de 0,308 h⁻¹ para 0,333 h⁻¹. Daqui pode ser concluído que a temperatura de fermentação possui um efeito positivo sobre a resposta taxa específica máxima de crescimento, na região em estudo, e que esse efeito é mais acentuado para baixas concentrações de oxigénio dissolvido. Da mesma forma, quando a temperatura de fermentação se encontra no seu nível inferior (A-), um aumento do factor B (concentração de oxigénio dissolvido) do seu nível inferior para o seu nível superior conduz a um ligeiro aumento da taxa específica de crescimento de 0,263 h⁻¹ para 0,308 h⁻¹. Porém, quando o factor A se encontra no seu nível superior

(A+), um aumento do factor B conduz a uma ligeira diminuição da resposta, sendo os seus valores de $0,345 \text{ h}^{-1}$ e $0,333 \text{ h}^{-1}$.

Comparando estes resultados com os obtidos para a taxa específica máxima de crescimento, quando a indução da proteína é efectuada no início da fase exponencial, verifica-se um efeito contrário da temperatura. Isto é, quando a indução da produção é efectuada no início da fase exponencial a temperatura é estatisticamente significativa e tem efeito negativo sobre a resposta. Quando a indução da produção é efectuada no meio da fase exponencial a temperatura, apesar de não ser estatisticamente significativa, tem um efeito positivo sobre a resposta. Este facto pode ser explicado pela gama de temperaturas da região de estudo que vai desde 27°C a 40°C . Nesta região está incluída a temperatura óptima de crescimento, na qual a taxa específica de crescimento é máxima. Para ambos os casos, o valor máximo para a taxa específica máxima de crescimento foi obtida para o ponto central ($33,5^\circ\text{C}$) que é a temperatura mais próxima da temperatura óptima de crescimento. Para os outros pontos do planeamento factorial, e como as temperaturas se afastam bastante da temperatura óptima, o seu efeito pode ser contrário.

Relativamente à concentração de oxigénio dissolvido, e na região de estudo, este factor não se mostrou estatisticamente significativo para ambos os planeamentos. Como já foi referido, isto pode dever-se ao facto de o oxigénio na região de estudo não ser limitante do crescimento e como tal ter uma influência de menor impacto em grande medida apenas associada à ocorrência de stress oxidativo para concentrações elevadas de oxigénio dissolvido.

4.1.6 ANÁLISE DA RESPOSTA RENDIMENTO EM BIOMASSA

Com o objectivo de avaliar o efeito da temperatura de fermentação e da percentagem de oxigénio dissolvido na resposta rendimento em biomassa, quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial, foram determinadas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de Student, descritas na tabela 4.8. Por análise da tabela, verifica-se que os dois efeitos estudados são altamente significativos. A temperatura de fermentação possui um efeito significativo num nível de 99% de confiança, sendo o seu efeito sobre a resposta negativo. Isto é, para este caso, o rendimento em biomassa diminui com o aumento da temperatura, na região em estudo. O efeito do oxigénio dissolvido no meio de fermentação também se mostrou significativo, num nível de 99% de confiança, mas o seu efeito sobre a resposta é positivo, obtendo-se melhores rendimentos em biomassa para elevadas percentagens de oxigénio dissolvido.

Tabela 4.8: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta rendimento em biomassa**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	0,32	6,718E-3	
A: Temperatura	-0,040	6,718E-3	-5,95***
B: Oxigénio dissolvido	0,049	6,718E-3	7,37***
AB	-3,500E-3	6,718E-3	-0,52

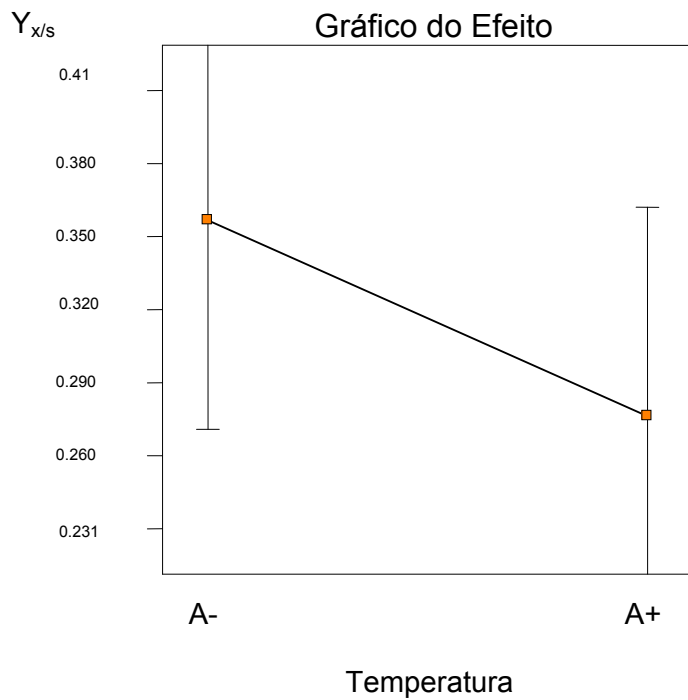


Figura 4.8 – Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta rendimento em biomassa.

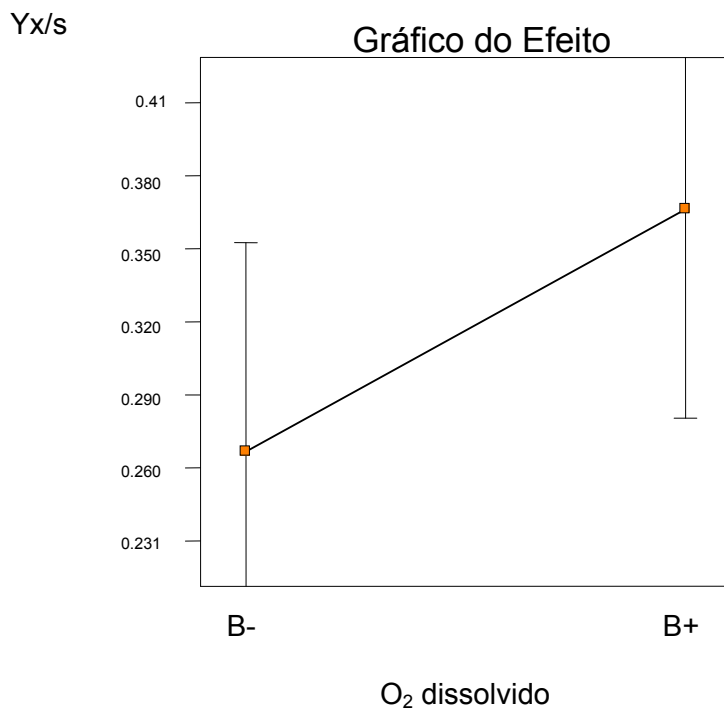


Figura 4.9 – Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta rendimento em biomassa.

O efeito da interacção não se mostrou estatisticamente significativo, o que permite fazer uma análise separada dos efeitos acima.

A influência dos efeitos temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido sobre a resposta rendimento em biomassa pode ser observado nas figuras 4.8 e 4.9, respectivamente. No anexo D vem ilustrado o gráfico de probabilidade normal para esta resposta.

A figura 4.8, mostra que quando o factor A (temperatura de fermentação) passa do seu nível inferior para o seu nível superior produz um efeito negativo na resposta, o que se traduz numa diminuição do rendimento em biomassa.

A figura 4.9 mostra que um aumento da percentagem do oxigénio dissolvido produz um aumento considerável da resposta rendimento em biomassa.

Comparando estes resultados com os obtidos para o rendimento em biomassa quando a indução da produção da proteína é efectuada no início da fase exponencial verifica-se que, para ambos os casos, a temperatura de fermentação tem um efeito negativo na resposta rendimento em biomassa, sendo apenas estatisticamente significativo quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Relativamente à concentração de oxigénio dissolvido verifica-se que, em ambos os casos, este factor tem um efeito positivo sobre a resposta. No entanto, quando a indução da produção é efectuada no início da fase exponencial este factor não é estatisticamente significativo enquanto que quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial a concentração de oxigénio dissolvido é altamente significativa.

4.1.7 ANÁLISE DA RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA EM UNIDADES ARBITRÁRIAS

Na tabela 4.9 vêm descritas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de Student para a resposta produção de fluorescência máxima em unidades arbitrarias, quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento. No anexo D pode ser observado o respectivo gráfico de probabilidade normal.

Tabela 4.9: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a **resposta produção máxima de fluorescência arbitrária**, de acordo com um planeamento factorial 2^2 , quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t_{cal}
Média	31161,96	4421,45	
A: Temperatura	24440,96	4421,45	5,53***
B: Oxigénio dissolvido	1878,77	4421,45	0,42
AB	1672,40	4421,45	0,38

Pela análise da tabela acima, verifica-se que o efeito temperatura de fermentação é estatisticamente significativo para um nível de 99% de confiança, e que esse efeito sobre a resposta é positivo. Os efeitos “concentração de oxigénio dissolvido” e o “efeito de interacção” não se mostraram significativos para a resposta em causa.

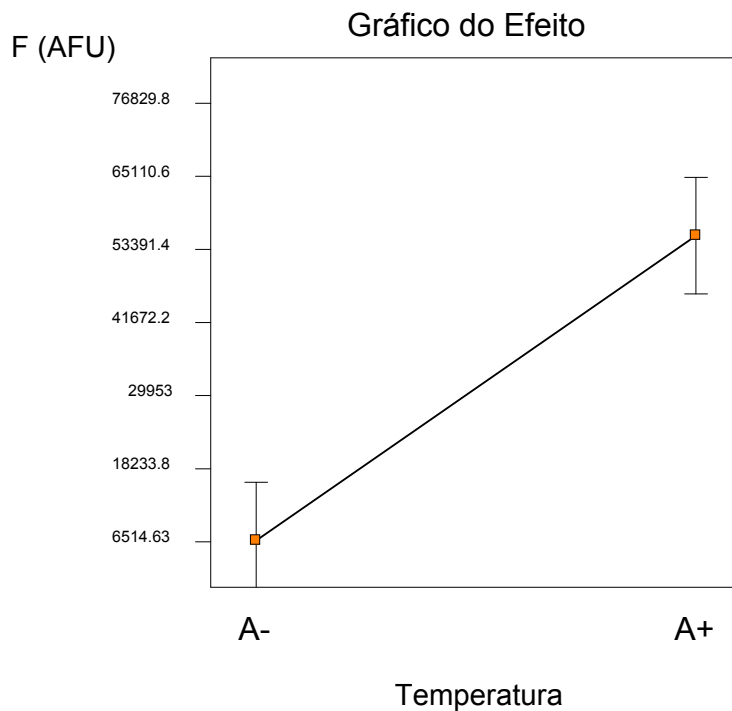


Figura 4.10: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias.

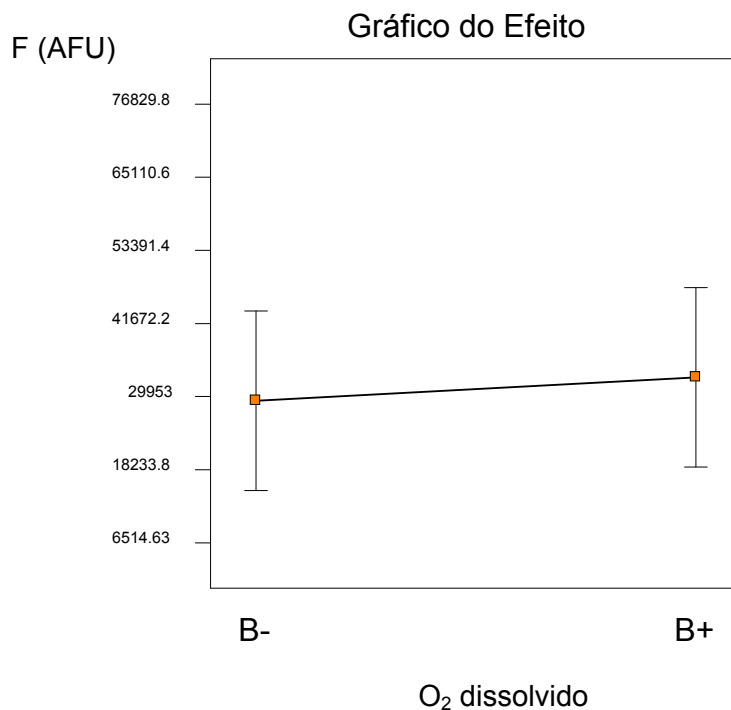


Figura 4.11: Efeito de factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias.

Através da observação da figura 4.10 pode ser concluído que um aumento da temperatura de fermentação conduz a um aumento da intensidade de fluorescência e que a intensidade de fluorescência é independente da concentração de oxigénio dissolvido, na região estudada. A produção de fluorescência mais elevada obtém-se para as condições (A, B) de 40°C e 40%, sendo o seu valor de 59.154 AFU. Como foi referido anteriormente, apesar de na reacção de formação do cromóforo da GFP ser necessário oxigénio, este não é um factor dominante para a produção de fluorescência, estando este facto bem documentado na literatura.

Comparando estes resultados com os obtidos para o planeamento com indução da produção no início da fase exponencial, verifica-se exactamente o mesmo comportamento, isto é, a produção de fluorescência por YEFP é máxima para as condições de 40°C e 40% de oxigénio dissolvido. Em ambas as situações a temperatura de fermentação é altamente significativa, sendo a concentração de oxigénio dissolvido favorável no seu nível superior mas não determinante.

4.1.8 ANÁLISE DA RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA NORMALIZADA

Na tabela 4.10 estão descritas as estimativas dos efeitos, os erros-padrão e os resultados relativos ao teste t de Student para a resposta produção máxima de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa, quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento. No anexo D pode ser observado o respectivo gráfico de probabilidade normal.

Tabela 4.10: Estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t de Student para a resposta produção máxima de fluorescência normalizada, de acordo com um planeamento factorial 2², quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Efeitos	Estimativa	Erro-Padrão	t _{cal}
Média	18749,90	1988,16	
A: Temperatura	15659,46	1988,16	7,88***
B: Oxigénio dissolvido	542,98	1988,16	0,27
AB	736,71	1988,16	0,37

Quando se analisa a produção de fluorescência em unidades normalizadas, verifica-se que, tal como para a fluorescência em unidades arbitrárias, apenas o efeito da temperatura de fermentação é estatisticamente significativo num nível de 99% de confiança e que esse efeito é positivo.

Observando as figuras 4.12 e 4.13 e comparando com as figuras 4.10 e 4.11 para fluorescência em unidades arbitrárias, verifica-se o mesmo comportamento da influência dos efeitos sobre a resposta.

Na figura 4.12, um aumento do factor temperatura do seu nível inferior (A-) para o seu nível superior (A+) conduz a um aumento acentuado da resposta produção de fluorescência em unidades normalizadas pela concentração de biomassa. Na figura 4.13 verifica-se que um aumento da concentração de oxigénio dissolvido não produz variação na resposta em estudo.

Comparando estes resultados com os obtidos para o planeamento com indução da produção no início da fase exponencial verifica-se que, para este último, para além da temperatura de fermentação, também o oxigénio dissolvido e o factor de interacção são estatisticamente significativos. Este facto poderá ser justificado pela diferença na fase de indução de produção, podendo concluir-se que, quando a

indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial, o estado da cultura é mais susceptível às variações da concentração de oxigénio dissolvido.

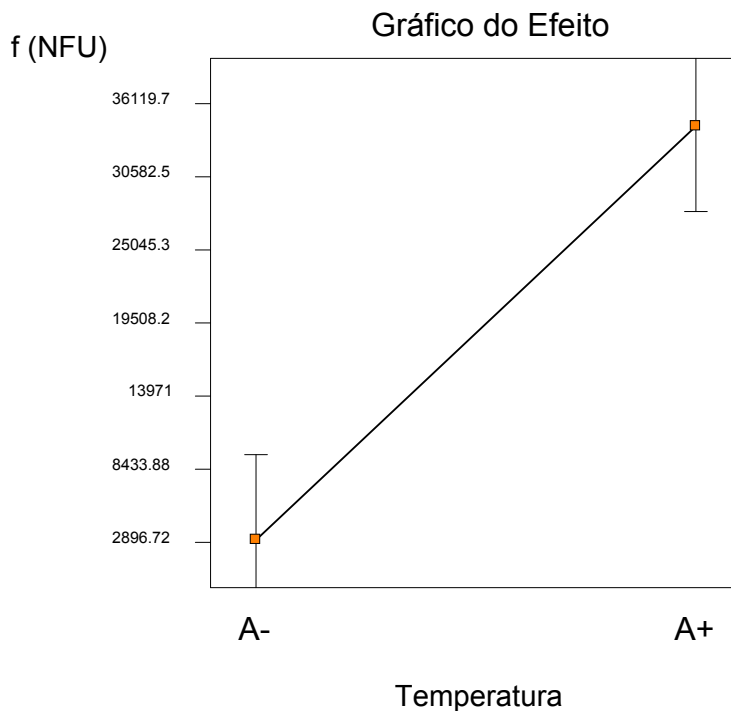


Figura 4.12: Efeito do factor principal A (Temperatura de fermentação) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas pela concentração de biomassa.

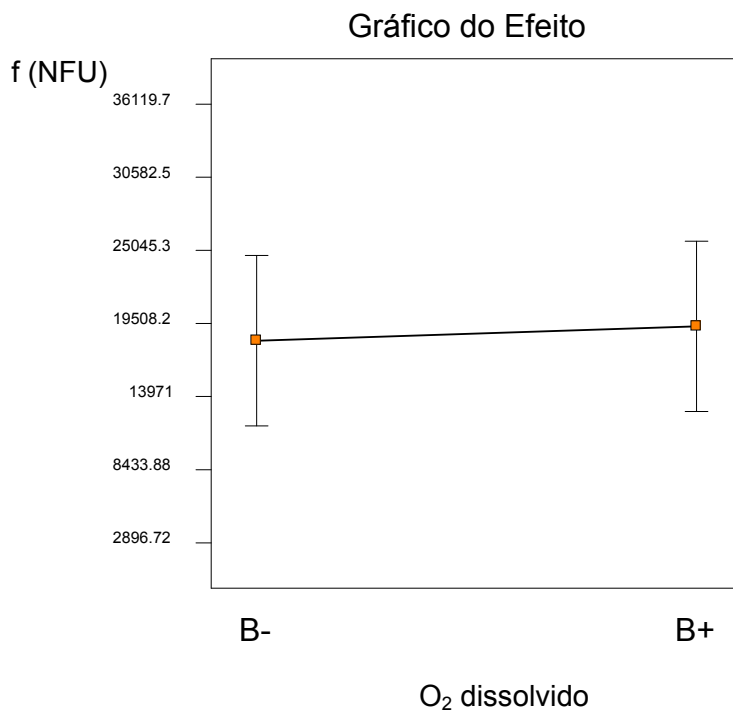


Figura 4.13: Efeito do factor principal B (concentração de oxigénio dissolvido) na resposta produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas pela concentração de biomassa.

4.2 ANÁLISE DAS RESPOSTAS

Para efectuar a análise estatística das várias respostas utilizou-se a metodologia de superfícies de resposta (RSM-“Response Surface Methodology”) que é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas para analisar os efeitos de várias variáveis independentes. Na maioria dos problemas de RSM, a relação entre as respostas e as variáveis independentes é desconhecida. Assim, o primeiro passo em RSM é aproximar a função (f) na região das variáveis independentes. Se a resposta for bem modelada por uma função linear das variáveis independentes, então a função de aproximação é um modelo de primeira ordem. Se existir curvatura no sistema ou na região de óptimo, então um polinómio de grau superior, como um modelo de segunda ordem, deverá ser usado para aproximar a resposta.

Segundo Moldavsky e Cohen, 1996, existem três critérios principais (três testes estatísticos) para a validação de modelos:

1 – Análise de variância, para determinar a significância de cada termo na equação ajustada e para determinar a qualidade do ajuste em cada caso. O valor de F de Fischer calculado é comparado com o F teórico ($F_{\alpha, p-1, n-p}$) onde α é o risco escolhido, sendo normalmente de 0,05; n é o número total de ensaios e p é o número de termos no modelo.

2 – Coeficiente de correlação múltipla ou de determinação (R^2).

3 – Teste da falta de ajuste, que indica se a falta de ajuste entre os valores experimentais e calculados pelas equações de modelo pode ser explicada pelo erro experimental. Os critérios de aceitabilidade podem ser resumidos, conforme consta na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Critérios para validação de diferentes modelos (Moldavsky e Cohen, 1996).

Análise de Variância	Coeficiente de correlação	Falta de ajuste	Validação do modelo
	$R^2 > 0,9$	-----	Sim
$P < 0,1$	$0,7 < R^2 < 0,9$	$P > 0,01$ $P < 0,01$	Sim Não
	$R^2 < 0,4$	-----	Não
$P > 0,1$	-----	-----	Não

A) – QUANDO A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE YEFP É EFECTUADA NO ÍNICIO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO

4.2.1 ANÁLISE DA RESPOSTA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO

Os ensaios experimentais foram efectuados utilizando os níveis dos factores (temperatura de fermentação e percentagem de oxigénio dissolvido) segundo a matriz de planeamento ilustrada na tabela 3.5. Todos os ensaios foram realizados de uma forma aleatória e o aumento da concentração de biomassa foi monitorizado ao longo do tempo de fermentação, conforme vem descrito no procedimento experimental (pontos 3.4 e 3.7.1).

Através dos dados experimentais obtidos para cada ensaio do planeamento, foi calculada a taxa específica máxima de crescimento, apresentada na tabela 4.1. Neste caso foi postulado que a taxa específica máxima de crescimento era descrita por uma função polinomial de primeira ordem.

Através da análise da variância é possível verificar a adequação ou não, do modelo postulado aos dados experimentais, utilizando os critérios descritos na tabela 4.11.

Pela observação da tabela 4.3 pode-se constatar que o efeito da temperatura de fermentação (A) e o efeito de interação (AB) se apresentam como significativos para a resposta taxa específica máxima de crescimento, ao nível de 99% de confiança. Como o efeito da temperatura de fermentação é negativo, significa que a maior taxa específica máxima de crescimento vai ser obtida nos níveis inferiores de temperatura de fermentação. No entanto, é de salientar que o valor médio obtido para a taxa específica de crescimento nas condições do ponto central foi o maior valor observado para esta resposta.

Tabela 4.12: Análise de variância para o modelo representativo da taxa específica máxima de crescimento de *E.coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	7,493E-3	2	3,746E-3	83,02	0,0119
Curvatura	0,033	1	0,033	730,64	0,0014
Residual	9,025E-5	2	4,513E-5		
Falta de ajuste	7,225E-5	1	7,225E-5	4,01	0,2947
Erro puro	1,800E-5	1	1,800E-5		
Total	0,041	5			

$R^2 = 0,9881$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Através da análise da variância obtida para esta resposta (tabela 4.12) verifica-se que o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo linear foi de 0,9881. O que indica que o modelo é estatisticamente significativo. No entanto, quando se compara a probabilidade do modelo linear ($P = 0,0119$) ser significativo com a probabilidade de a curvatura apresentada pelo modelo ($P = 0,0014$) ser significativa, verifica-se que a probabilidade de a curvatura ser significativa é superior, o que indica que um modelo de segunda ordem é mais adequado para descrever a resposta taxa específica máxima de crescimento em função da temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, na região de estudo.

Por outro lado, quando se analisa a significância do modelo, pela comparação de F calculado (MQ_R/MQ_r é 83,02) com o valor de F tabelado (99,00 para 99% confiança), verifica-se que o modelo não é estatisticamente significativo para 99% de confiança. Para 95% de confiança o valor de $F_{2,2}$ tabelado tem o valor de 19,00 que comparado com o F calculado para o modelo linear mostra a sua significância estatística, para este nível de confiança.

Por outro lado, utilizando o mesmo teste para determinar a significância da curvatura apresentada pelo modelo, verifica-se que a curvatura é significativa, pois F calculado (730,64) é bastante superior a F tabelado que é 98,50 para 99% de confiança. Estes dados permitem concluir, que apesar de a variação da resposta taxa específica máxima de crescimento em função dos factores em estudo, na região definida para estas variáveis independentes, poder ser representado por um modelo matemático de primeira ordem, um modelo de segundo grau seria mais adequado. Esta conclusão é reforçada pelo valor obtido para esta resposta nas condições de temperatura e concentração de oxigénio dissolvido do ponto central, que foi o maior valor observado para esta resposta.

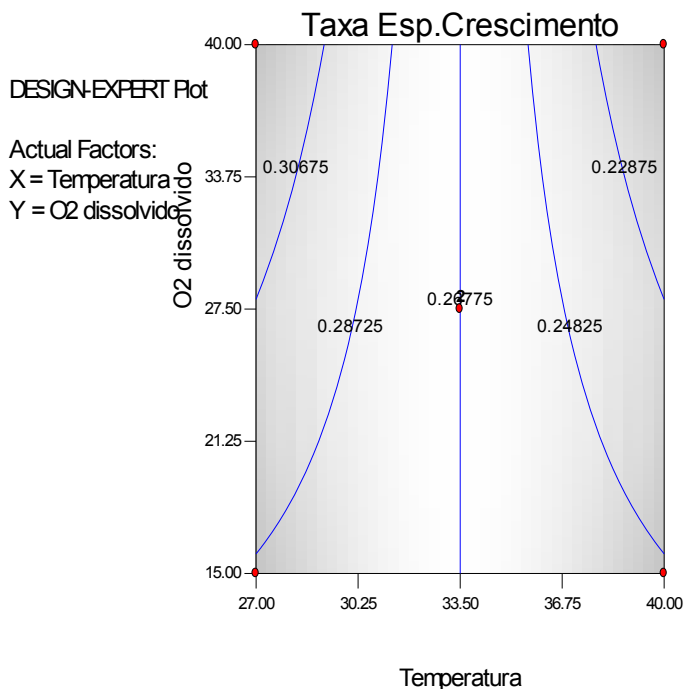


Figura 4.14 – Curvas de nível descritas pelo modelo da taxa específica máxima de crescimento de *E.coli* M15, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

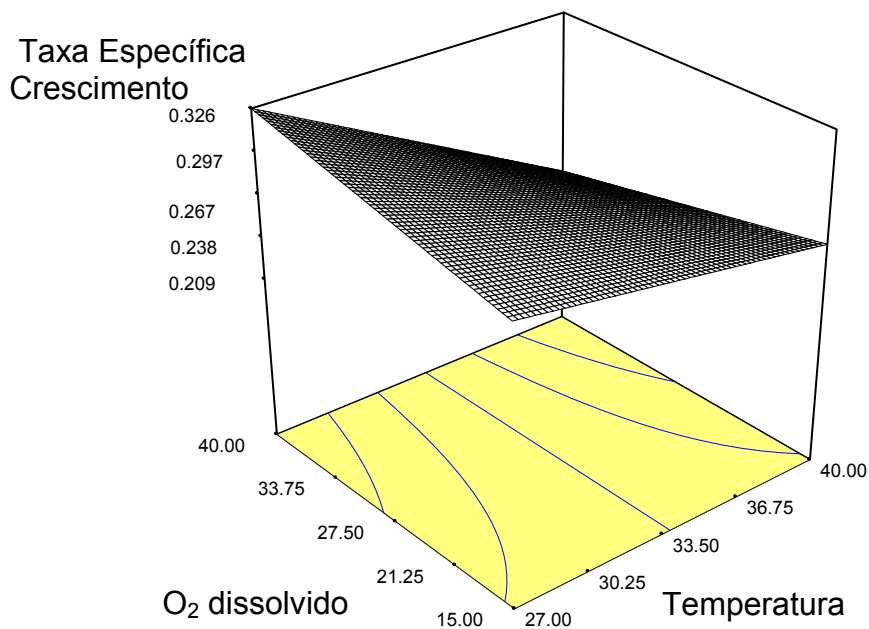


Figura 4.15 – Superfície de resposta descrita pelo modelo da taxa específica máxima de crescimento em *E. coli* M15, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

O modelo linear então obtido para descrever a resposta taxa específica máxima de crescimento, na região estudada, pode ser expresso por:

$$\hat{Y} = +0,027 - 0,038 * X_1 - 0,020 * X_1 * X_2$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para a taxa específica máxima de crescimento, X_1 e X_2 representam as variáveis temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, respectivamente.

Na figura 4.14 são mostradas as curvas de nível estimadas pelo modelo. Este modelo apresenta valores máximos quando se trabalha no nível inferior de temperatura de fermentação e maior nível de concentração de oxigénio dissolvido.

A figura 4.15 mostra a representação tridimensional da superfície de resposta para a taxa específica máxima de crescimento na região estudada.

4.2.2 ANÁLISE DA RESPOSTA RENDIMENTO EM BIOMASSA

Analisando a tabela 4.4. pode-se verificar que nenhum dos efeitos se mostrou significativo na resposta rendimento em biomassa.

Este facto é suportado pela análise de variância do modelo, demonstrando a inadequação de uma equação de primeira ordem para descrever o comportamento da resposta.

Através da análise desta resposta (tabela 4.13) verifica-se que o coeficiente de determinação (R^2) para o modelo linear foi de 0,6082. Este valor mostra a falta de qualidade do modelo, no ajuste dos dados experimentais.

Este facto é confirmado pelo valor de F calculado (0,52) para o modelo, que é inferior ao valor de F tabelado ($F_{3,2}=19,16$ para 95% de confiança), revelando uma regressão não significativa. Pelos critérios definidos na tabela 4.11, a probabilidade do modelo ser significativa ($P=0,7413$) é superior a 0,1, ou seja, o modelo não pode ser validado. Também para esta resposta, rendimento em biomassa, o valor obtido experimentalmente para as condições do ponto central foi o mais elevado. Tal poderá indicar que um modelo de segunda ordem seria provavelmente mais adequado para descrever a variação do rendimento em biomassa em função da temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, na região de estudo.

Como o modelo polinomial de primeira ordem não é adequado para descrever a resposta em estudo, este não é apresentado.

Tabela 4.13: Análise de variância para o modelo representativo do rendimento em biomassa para *E.coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	0,038	3	0,013	0,52	0,7413
Residual	0,085	2	0,0425		
Falta de ajuste	0,060	1	0,060	2,44	0,3623
Erro puro	0,025	1	0,025		
Total	0,12	5			

$R^2 = 0,6082$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

4.2.3 ANÁLISE DA RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA ARBITRÁRIA

Quando se analisa a produção de fluorescência arbitrária nos ensaios efectuados para o planeamento factorial (tabela 4.1), pode ser observado que a intensidade de fluorescência máxima obtida corresponde ao ensaio para o ponto central.

Este facto sugere a existência de um ponto máximo central, uma vez que para todos os outros pontos do planeamento, a intensidade de fluorescência foi menor.

Observando a tabela de significância estatística dos efeitos, tabela 4.5, concluiu-se que tanto a temperatura de fermentação como a concentração de oxigénio dissolvido são estatisticamente significativos e têm um efeito positivo na resposta produção máxima de fluorescência arbitrária. O que significa que para um modelo linear a maior produção de fluorescência arbitrária vai ser obtida para maiores temperaturas de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido.

Analisando a tabela de variância, para a resposta produção máxima de fluorescência arbitrária (tabela 4.14), verifica-se que o modelo linear apresenta um coeficiente de determinação bastante elevado, $R^2 = 0,926$.

No entanto, o valor de F calculado ($F=113,02$) para a curvatura do modelo é bastante superior ao F tabelado (10,13 para 95% de confiança) denotando a significância estatística da curvatura do modelo. Daqui pode ser concluído que um polinómio de segundo grau seria mais adequado para descrever a resposta. O facto de a probabilidade da curvatura ser significativa ($P=0,0018$) e superior à probabilidade do modelo linear ($P=0,0088$) sugere também uma melhor adequação de um modelo quadrático na descrição da resposta “produção máxima de fluorescência arbitrária”, na região em estudo.

Tabela 4.14: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência arbitrária em *E.coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	7,348E8	1	7,348E8	37,39	0,0088
Curvatura	2,221E9	1	2,221E9	113,02	0,0018
Residual	5,895E7	3	1,965E7		
Falta de ajuste	5,381E7	2	2,691E7	5,23	0,2953
Erro puro	5,142E6	1	5,142E6		
Total	3,015E9	5			

$R^2 = 0,9257$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

O modelo linear obtido para descrever o comportamento da resposta “produção máxima de fluorescência arbitrária”, na região em estudo, pode ser expresso por (descreve-se o modelo linear obtido para o planeamento factorial, apesar de um modelo quadrático ser mais indicado para descrever o comportamento da resposta):

$$\hat{Y} = +24499,53 + 13553,73 * X_1 + 2931,41 * X_2$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para a produção de fluorescência arbitrária, X_1 e X_2 representam as variáveis temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido.

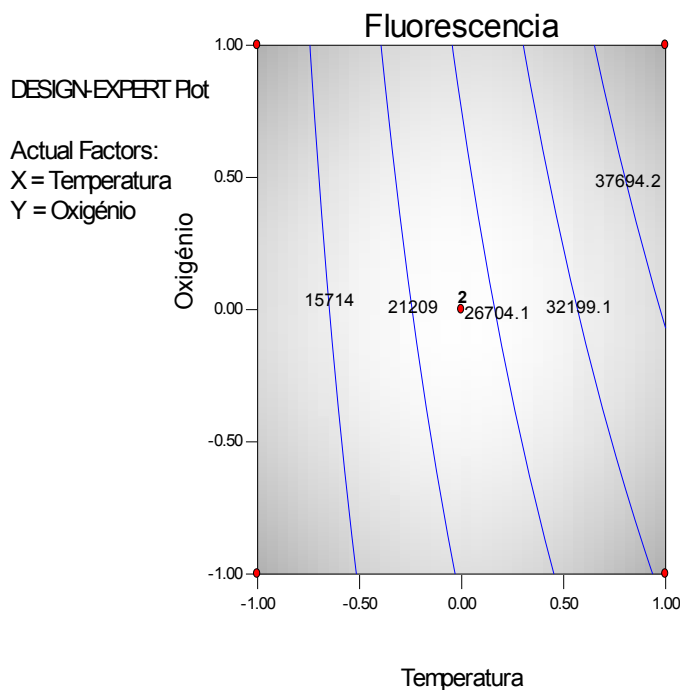


Figura 4.16 – Curvas de nível descritas pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência em unidades arbitrárias, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

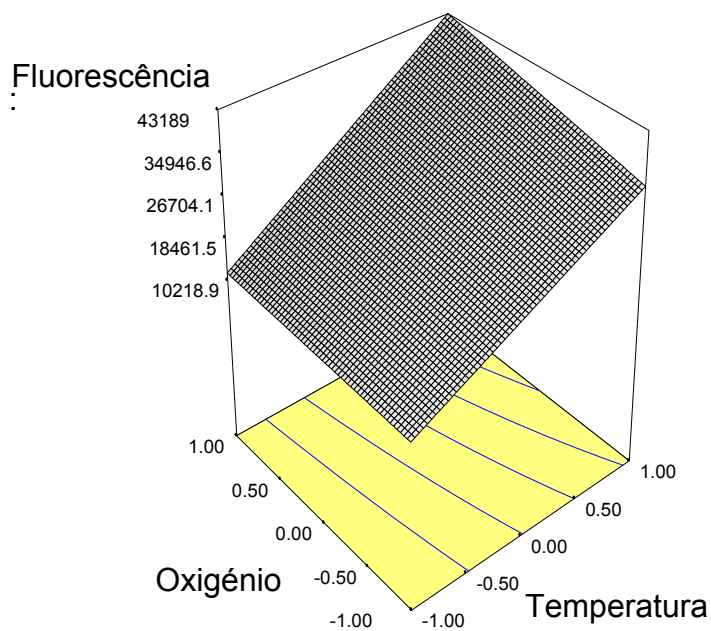


Figura 4.17 – Superfície de resposta descrita pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência arbitraria em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

A figura 4.16 mostra as curvas de nível estimadas pelo modelo. Este modelo apresenta valores máximos no nível superior de temperatura e nível superior de percentagem de oxigénio dissolvido. A figura 4.17 mostra o modelo tridimensional para a produção de fluorescência arbitrária.

De acordo com a figura 4.17, o plano apresenta uma inclinação máxima correspondente ao ponto do planeamento: Temperatura de fermentação +1 e oxigénio dissolvido +1.

No entanto, pelos resultados apresentados na tabela 4.1 para F (AFU) – produção máxima de fluorescência arbitrária, verifica-se que o valor de intensidade de fluorescência obtido no ponto central do planeamento factorial é bastante superior à fluorescência para o ponto máximo do plano, sendo de ~ 66000 AFU para o ponto central e de 43000 AFU para o ponto máximo do plano.

4.2.4 ANÁLISE DA “RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA” EM UNIDADES NORMALIZADAS

Quando a intensidade de fluorescência da amostra é normalizada pela concentração de biomassa presente, o comportamento da resposta descrita por esta variável não é semelhante ao relativo à intensidade de fluorescência arbitrária, uma vez que a fluorescência máxima obtida não corresponde ao ponto central.

Pela análise da tabela 4.1, verifica-se que a resposta intensidade de fluorescência normalizada, apresenta um máximo no ponto (+1,+1) do planeamento factorial.

Tabela 4.15: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas em *E.coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	1,001E9	3	3,335E8	24906,72	0,0047
Curvatura	1,337E8	1	1,337E8	9980,84	0,064
Residual	13390,66	1	13390,66		
Erro puro	13390,66	1	13390,66		
Total	1,134E9	5			

$R^2 = 1,0$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Relativamente à análise de variância para a resposta produção de fluorescência normalizada, verifica-se um coeficiente de correlação elevado ($R^2 = 1,0$) o que mostra que um modelo linear é adequado para representar a resposta considerada na região de estudo.

No entanto, o modelo apresenta uma curvatura significativa ao nível de 95% de confiança (F calculado = 9980,84 e F tabelado de 10,13 para 95% de confiança). Para o mesmo nível de confiança o modelo linear é significativo pois o seu F calculado é superior ao F tabelado. No entanto, comparando a probabilidade do modelo ser significativo ($p=0,0047$), esta é superior à probabilidade da curvatura ser significativa ($p=0,064$) podendo concluir-se que um modelo de primeira ordem é adequado para descrever a resposta em causa.

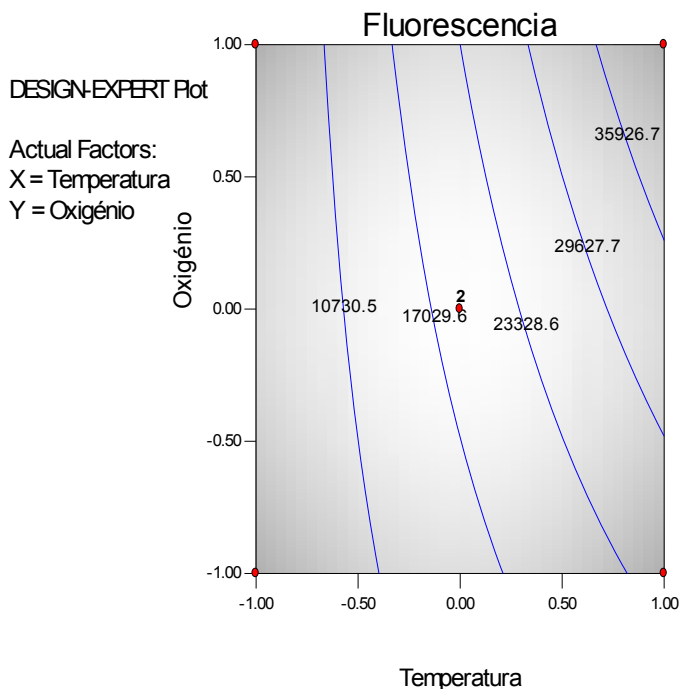


Figura 4.18 – Curvas de nível descritas pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência em unidades normalizadas, quando a indução da produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

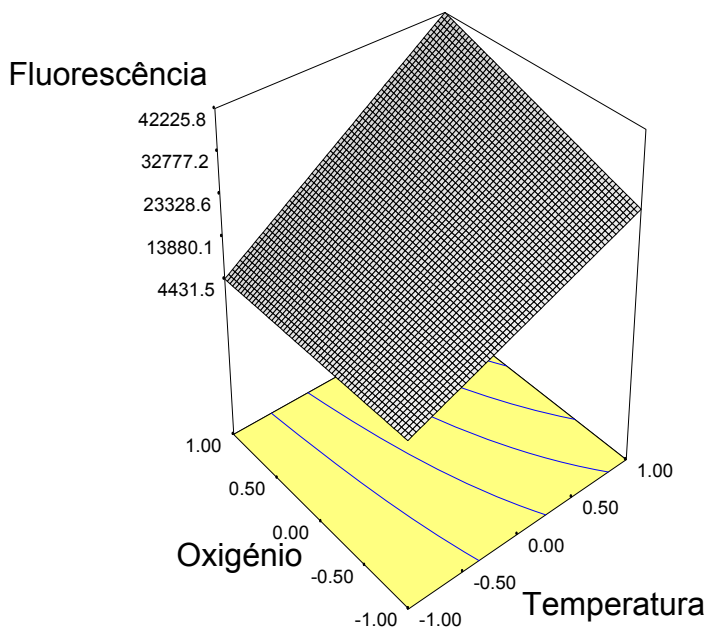


Figura 4.19 – Superfície de resposta descrita pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência normalizada em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no início da fase exponencial de crescimento.

O modelo obtido para descrever o comportamento da resposta “produção máxima de fluorescência” em unidades normalizadas, na região em estudo, pode ser expresso por:

$$\hat{Y} = +19088,87 + 14626,00 * X_1 + 4239,77 * X_2 + 4271,14 * X_1 * X_2$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para a produção de fluorescência normalizada, X_1 e X_2 representam as variáveis temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, respectivamente, em termos codificados.

A figura 4.18 mostra as curvas de nível estimadas pelo modelo. Este modelo apresenta valores máximos no nível superior de temperatura e nível superior de concentração de oxigénio dissolvido.

A figura 4.19 mostra o modelo tridimensional para a produção de fluorescência normalizada.

De acordo com a figura 4.19, o plano apresenta uma inclinação máxima correspondente ao ponto do planeamento: Temperatura de fermentação +1 e concentração de oxigénio dissolvido +1.

B) – QUANDO A INDUÇÃO DA PRODUÇÃO DE YEFP É EFECTUADA NO MEIO DA FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO

4.2.5 ANÁLISE DA RESPOSTA TAXA ESPECÍFICA MÁXIMA DE CRESCIMENTO

Para analisar a resposta taxa específica máxima de crescimento foi efectuado um planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central. Para este planeamento, todos os ensaios foram efectuados com indução de produção de YEFP no meio da fase exponencial de crescimento.

Com base na tabela 4.7, foi verificado que nenhum dos factores estudados era significativo na resposta taxa específica máxima de crescimento, quando a indução da produção de YEFP foi efectuada no meio da fase exponencial.

Tabela 4.16: Análise de variância para o modelo representativo da taxa específica máxima de crescimento em *E. coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	3,947E-3	3	1,316E-3	0,62	0,7055
curvatura	0,013	1	0,013	5,97	0,2473
Residual	2,113E-3	1	2,113E-3		
Erro puro	2,113E-3	1	2,113E-3		
Total	0,019	5			

$$R^2 = 0,6514$$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Pela análise da tabela de variância (tabela 4.16) para a resposta taxa específica máxima de crescimento, verifica-se que o modelo não é significativo (P é superior a 0,1).

Este facto é reforçado pelo coeficiente de correlação baixo ($R^2 = 0,6514$). Da mesma forma, comparando o F calculado (0,62) para o modelo linear com o F tabelado (215,7) verifica-se que o primeiro é muito inferior ao segundo, demonstrando a não significância do modelo linear.

Uma vez que a soma quadrática de erro puro apresenta um valor pequeno (insignificante quando comparado com a soma quadrática total), a variação entre os valores experimentais e os valores previstos pelo modelo deve-se à falta de ajuste do modelo e não a erros aleatórios.

Como o modelo polinomial de primeira ordem não é adequado para descrever a resposta em estudo, este não é apresentado.

4.2.6 ANÁLISE DA RESPOSTA RENDIMENTO EM BIOMASSA

Pela análise da tabela 4.8 verifica-se que os dois efeitos principais são significativos na resposta rendimento em biomassa, quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, apresentando a temperatura de fermentação um efeito negativo na resposta em estudo e a concentração de oxigénio dissolvido um efeito positivo. Isto significa que na região analisada, são obtidos melhores rendimentos em biomassa para temperaturas de fermentação mais baixas e elevadas concentrações de oxigénio dissolvido.

Tabela 4.17: Análise de variância para o modelo representativo da resposta rendimento em biomassa de *E.coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	0,016	2	8,101E-3	70,59	0,0140
Curvatura	6,816E-3	1	6,816E-3	59,40	0,0164
Residual	2,295E-4	2	1,147E-4		
Falta de ajuste	4,900E-5	1	4,900E-5	0,27	0,6942
Erro puro	1,805E-4	1	1,805E-4		
Total	0,023	5			

$R^2 = 0,9860$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Pela análise da tabela de variância (tabela 4.17) para a resposta rendimento em biomassa verifica-se uma adequação do modelo linear aos dados experimentais.

Comparando o F tabelado (19,16 para 95% de confiança) com o F calculado para o modelo linear e F calculado para a curvatura, 70,59 e 59,40, respectivamente, verifica-se que ambos são significativos. No entanto, o erro da falta de ajuste do modelo linear não é significativo (F calculado = 0,27), o que permite concluir que o modelo linear ajusta os dados experimentais, na região em estudo, para a resposta rendimento em biomassa.

Para consolidar esta ideia, verifica-se que o modelo linear apresenta um bom coeficiente de correlação, R^2 de 0,9860, conseguindo explicar 96,57% (SQ regressão/SQ total) da variação total em torno da média, sendo os restantes 2,3% explicados pelos resíduos ((SQtotal – SQ ep)/(SQT)).

O modelo obtido para descrever o rendimento em biomassa, quando a indução da produção de proteína YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, na região em estudo, pode ser expresso por:

$$\hat{Y} = +0,32 - 0,040 * X_1 + 0,049 * X_2$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para o rendimento em biomassa,

X_1 e X_2 representam as variáveis temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, respectivamente, em termos codificados.

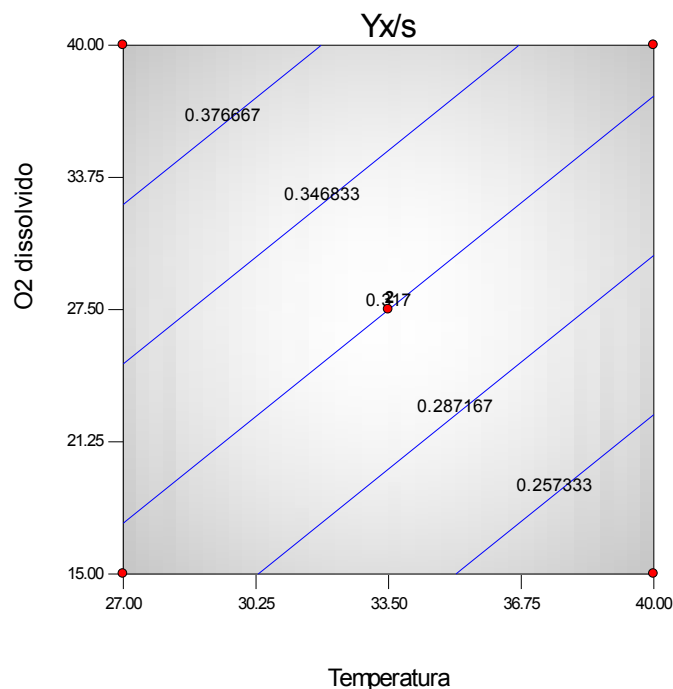


Figura 4.20 - Curvas de nível descritas pelo modelo. \hat{Y} representa o rendimento em biomassa, quando a indução da produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

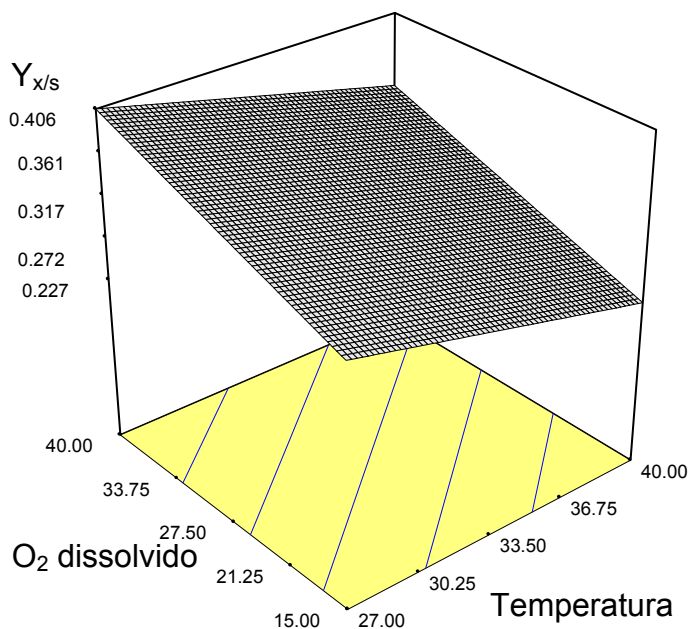


Figura 4.21 – Superfície de resposta descrita pelo modelo. \hat{Y} representa o rendimento em biomassa em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

A figura 4.20 mostra as curvas de nível estimadas pelo modelo. Este modelo apresenta um rendimento máximo em biomassa quando a fermentação é efectuada a baixas temperaturas e percentagem de oxigénio dissolvido máximo.

Outro facto importante, é o rendimento em biomassa no ponto central ser inferior ao rendimento máximo obtido pelo modelo, reforçando a hipótese de que o modelo linear descreve a resposta rendimento em biomassa, na região em estudo.

A figura 4.21 mostra a superfície tridimensional para a resposta rendimento em biomassa, apresentando um plano com inclinação máxima no ponto $(T;O_2)=(-1;+1)$.

4.2.7 ANÁLISE DA “RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCÊNCIA ARBITRÁRIA”

Pela análise da tabela 4.9, verifica-se que apenas o efeito da temperatura de fermentação é significativo na resposta produção de fluorescência pela YEFP, apresentando um efeito positivo na resposta em estudo. Pela análise da tabela 4.2 pode ser observado que o aumento da intensidade de fluorescência arbitraria poderá seguir uma tendência quadrática, uma vez que os maiores valores de fluorescência arbitraria foram obtidos para as condições experimentais do ponto central.

Tabela 4.18: Análise de variância para o modelo representativo da produção máxima de fluorescência arbitraria em *E. coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	2,3896E9	1	2,389E9	69,26	0,0036
Curvatura	2,071E9	1	2,071E9	60,04	0,0045
Residual	1,035E8	3	3,450E7		
Falta de ajuste	2,531E7	2	1,265E7	0,16	0,8692
Erro puro	7,820E7	1	7,820E7		
Total	4,564E9	5			

$R^2 = 0,9585$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Pela análise da tabela de variância para a resposta “produção máxima de fluorescência arbitraria” (tabela 4.18), pode-se verificar que tanto o modelo linear como a curvatura são significativos, num nível de 95% de confiança, uma vez que o F calculado é superior ao F tabelado (10,13 para 95% de confiança). Também as probabilidades de o modelo linear e a curvatura serem estatisticamente significativos são elevadas, sendo maiores no caso do modelo ($p=0,0036$). Também o factor de correlação, R^2 , para o modelo linear apresenta um valor elevado indicando uma boa correlação linear dos factores em estudo.

Adicionalmente, se se efectua um teste F à razão MQ_{faj}/MQ_{ep} que neste caso é de 0,16, verifica-se que este valor não é significativo e não existe por isso falta de ajuste do modelo linear aos dados experimentais obtidos.

Analisando a percentagem de variação que pode ser explicada pelo modelo (SQ_{modelo}/SQ_{total}), de 52,4%, e comparando com a percentagem de variação explicável

($SQ_{total} - SQ_{ep} / SQ_{total}$), de 98,3%, verifica-se que 45,9% da variação total em torno da média é devida aos erros aleatórios.

Atendendo a que o modelo apresenta uma curvatura significativa e que existem erros aleatórios elevados associados ao modelo linear, pode-se concluir que um modelo de segundo grau seria mais adequado para descrever a resposta “produção máxima de fluorescência arbitrária” pela YEFP, quando a indução de sua produção é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, na região de estudo.

O modelo Linear obtido para descrever produção máxima de fluorescência arbitrária, quando a indução da produção de proteína YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, na região em estudo, pode ser expresso por:

$$\hat{Y} = +31161,97 + 24440,96 * X_1$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para a produção máxima de fluorescência arbitrária.

X_1 - representa a variável temperatura de fermentação em termos codificados.

A resposta em estudo é representada por uma recta. No entanto, para se visualizar melhor a variação da produção máxima de fluorescência arbitrária foi representada a superfície de resposta em função das duas variáveis independentes, figura 4.22.

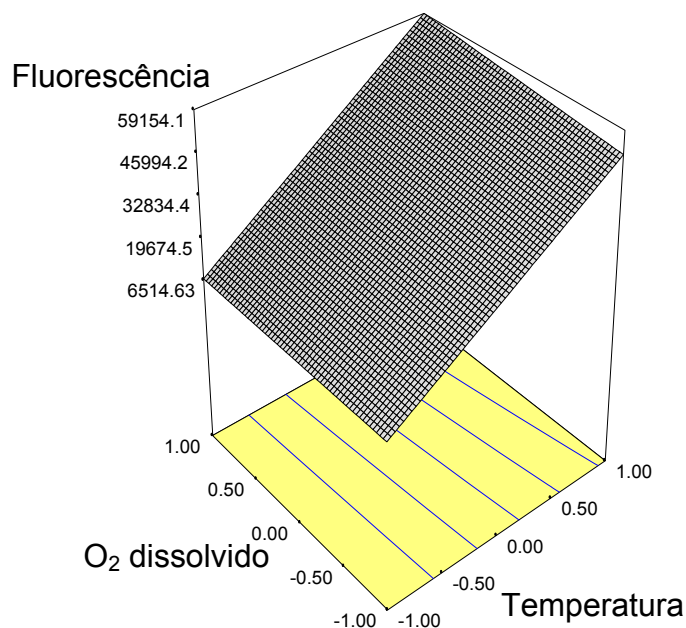


Figura 4.22 – Superfície de resposta descrita pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência arbitrária em *E.coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Como pode ser observado pela figura acima, a produção de fluorescência é máxima para o ponto (+1,+1), isto é, temperatura de 40°C e concentração de oxigénio dissolvido de 40%.

4.2.8 - ESTUDO DA “RESPOSTA PRODUÇÃO MÁXIMA DE FLUORESCENCIA NORMALIZADA”

Pela análise da tabela 4.10, observa-se que o efeito principal temperatura de fermentação foi significativo, tendo este factor um efeito positivo na resposta estudada.

Estes dados permitem concluir que a produção máxima de fluorescência normalizada é favorecida em condições de elevada temperatura de fermentação.

Tabela 4.19: Análise de variância para o modelo representativo da produção de fluorescência máxima normalizada em *E. coli*, na região em estudo.

Fonte	SQ	GL	MQ	F	P
Modelo	2,809E8	1	9,809E8	153,57	0,0011
Curvatura	2,826E8	1	2,826E8	44,24	0,0069
Residual	1,91E7	3	6,387E6		
Falta de ajuste	3,350E6	2	1,675E6	0,11	0,9084
Erro puro	1,581E7	1	1,581E7		
Total	1,283E9	5			

$R^2 = 0,9808$

SQ = Soma Quadrática; GL = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

Pela análise da tabela de variância do modelo (tabela 4.19), pode ser observado que o modelo linear é significativo, apresentando um F calculado (153,57) superior ao F tabelado (19,16).

A curvatura do modelo, apesar de significativa (F calculado de 44,24), apresenta uma significância inferior à apresentada pelo modelo, o que revela que um modelo linear é adequado para descrever a produção máxima de fluorescência normalizada, na região estudada.

O modelo linear apresenta um factor de correlação consistente com as observações acima descritas (R^2 de 0,9808).

O modelo obtido para descrever a produção de fluorescência normalizada, quando a indução da produção de proteína YEFP é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento, na região em estudo, pode ser expresso por:

$$\hat{Y} = +18749,9 + 15659,46 * X_1$$

Onde:

\hat{Y} – é a variável de resposta estimada para a produção máxima de fluorescência normalizada,

X_1 - representa a variável temperatura de fermentação em termos codificados.

A resposta em estudo é representada por uma recta. No entanto, para se visualizar melhor a variação da produção máxima de fluorescência normalizada a superfície de resposta foi representada em função das duas variáveis independentes na figura 4.23, podendo ser observado que esta superfície apresenta uma produção máxima de fluorescência normalizada quando a temperatura de fermentação é máxima e a percentagem de oxigénio dissolvido também é máximo. Isto é, o plano apresenta um ponto máximo com coordenadas $(T; O_2) = (40^\circ\text{C}; 40\%)$.

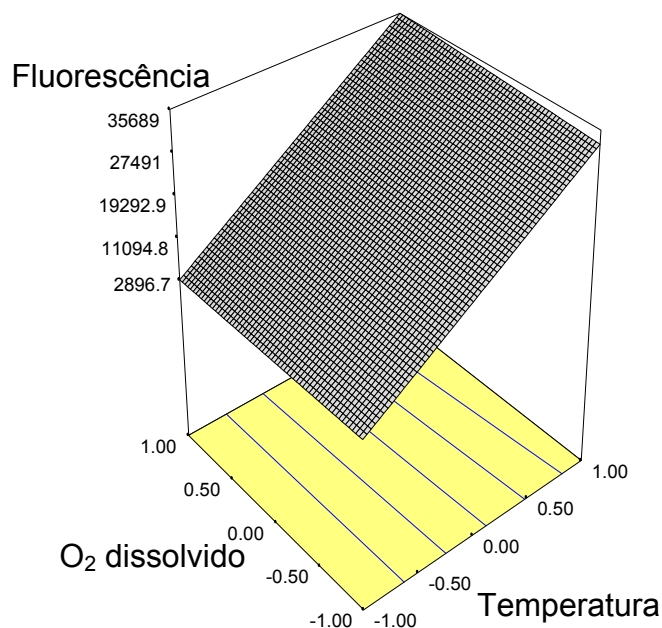


Figura 4.23 – Superfície de resposta descrita pelo modelo. \hat{Y} representa a produção máxima de fluorescência normalizada em *E. coli* M15, quando a indução de produção de proteína é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

4.3 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MOMENTO DE INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE YEFP NO AUMENTO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA

Para analisar e determinar qual a fase de crescimento da bactéria na qual deve ser efectuada a indução da produção de proteína, foram efectuadas três fermentações com as condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido correspondentes ao ponto central, 33,5°C e 27,5%, respectivamente. Em cada fermentação, a indução da produção de YEFP foi efectuada no início, meio e fim da fase exponencial de crescimento correspondendo a aproximadamente D.O.600 nm de 0,4; 3 e 5, respectivamente. Em cada ensaio foi retirada uma amostra 6 horas após a indução da produção de proteína e outra no final da fermentação, sendo estas amostras analisadas por Western Blot para verificar se a intensidade de fluorescência obtida por fluorimetria correspondia a um aumento efectivo da quantidade de proteína. Na tabela 4.20 vêm descritas as intensidades de fluorescência obtidas em cada ensaio em função do momento de indução de YEFP.

Na figura 4.24 vem o gel obtido por western blot para cada amostra. Para todos os ensaios foram analisadas as amostras correspondentes a 6 e 21 horas após a indução de produção. A espessura e brilho da banda são proporcionais à quantidade de YEFP existente em cada amostra

Tabela 4.20 – Valores da intensidade de fluorescência (AFU) 6 horas e 21 horas após a indução da produção de proteína; densidade óptica a 600 nm no momento da Indução para cada ensaio.

ensaio	Fase de indução	D.O. 600 nm	Intensidade de fluorescência (AFU)	
			6h após	21h após
			Indução	Indução
1	Início	0,4	9.196	60.755
2	Meio	3,0	47.212	57.019
3	fim	5,0	35.345	31.449

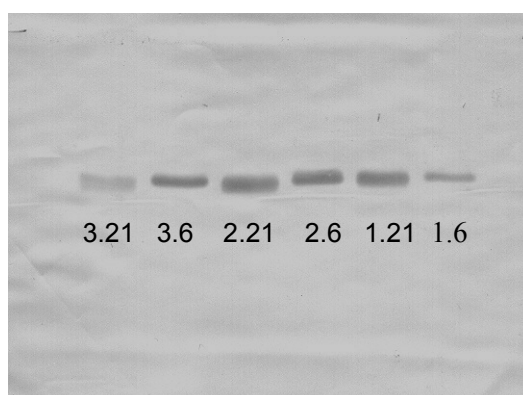


Figura 4.24 – Gel obtido por western blot para cada ensaio; banda 1.6 – ensaio 1, 6h após indução; banda 1.21 - ensaio 1, 21h após indução; banda 2.6 - ensaio 2, 6h após indução; banda 2.21 - ensaio 2, 21h após indução; banda 3.6 - ensaio 3, 6h após indução; banda 3.21 - ensaio 3, 21h após indução (Veloso, 2006).

Como pode ser verificado pela figura 4.24, as bandas inicial (2.6) e final (2.21) para o ensaio 2, são as que apresentam maior espessura, quando comparadas com as bandas dos outros ensaios. Em termos de intensidade de fluorescência apresentada por estas amostras, verifica-se concordância dos valores, tendo-se obtido 47.212 AFU para a amostra 2.6 e 57.019 AFU para a amostra 2.21. É de referir que a intensidade de fluorescência máxima obtida para esta fermentação foi de 77.201 AFU, 8 horas após a indução. É referenciado na literatura uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação, após a intensidade de fluorescência ter atingido o seu valor máximo (Kentaro et al., 2004). Para o ensaio 1 observa-se que a banda relativa à quantidade de proteína na amostra referente a 6 horas após indução é menos espessa e brilhante que a banda relativa às 21 horas após indução, mostrando o aumento da quantidade de proteína ao longo da fermentação. Em termos de fluorescência obtida para estas amostras, verifica-se concordância com os dados de Western Blot, obtendo-se 9.196 AFU para a amostra 1.6 e 60.755 para a amostra 1.21. Para o ensaio 3, a banda referente às 21 horas após indução, apesar de ser mais espessa, é menos brilhante que a banda referente a 6 horas após indução. Verifica-se ainda que a intensidade de fluorescência apresentada pela amostra 3.21 é a menor de todas as analisadas. Foi então concluído que se obtém maior quantidade de proteína quando a indução da sua produção é efectuada no meio da fase exponencial de crescimento.

Por esse motivo foi seleccionada a fase de crescimento correspondente a uma D.O. 600 nm de 3,0 (meio da fase exponencial) para validar que a variação da intensidade de fluorescência obtida para cada ensaio do planeamento factorial correspondia a um aumento da quantidade de proteína produzida.

Para tal, para todos os ensaios do planeamento factorial 2², com indução da produção de YEFP no meio da fase exponencial, foi analisada por western blot uma amostra recolhida aproximadamente 11 horas após a indução.

Na tabela 4.21 vêm descritas, para essas experiências, as condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido, tempo de indução e respectiva fluorescência obtida por espectrofluorimetria.

Tabela 4.21 – Temperatura de fermentação (°C), concentração de oxigénio dissolvido (%), tempo de indução (h) e fluorescência para cada ensaio do planeamento factorial 2² com indução de produção no meio da fase exponencial.

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Oxigénio dissolvido (%)	Tempo de Indução (h)	Fluorescência (AFU)
1	27	15	8	4.168
2	27	40	10	6.927
3	33,5	27,5	10	72.738
4	40	40	11	51.621
5	40	15	16	51.112

Na figura 4.24 apresenta-se o respectivo gel obtido por western blot.

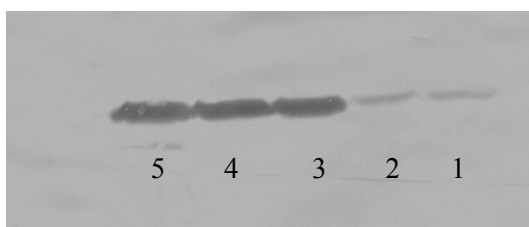


Figura 4.24 – Gel western blot obtido para cada condição do ensaio do planeamento factorial 2² com indução da produção no meio da fase exponencial. A numeração corresponde à da tabela anterior.

Quando se compara a espessura e o brilho de cada banda com as respectivas intensidades de fluorescência obtidas por espectrofluorimetria verifica-se uma concordância dos dados. Para o ensaio 1 a fluorescência obtida foi de 4.168 AFU a que corresponde a menor fluorescência, comparando com os outros ensaios, e corresponde também à menor espessura e brilho da banda do gel (figura 4.24). Em contraste, são apresentados os ensaios 3, 4 e 5 onde se obteve uma fluorescência na ordem dos 70.000 e 50.000 AFU's, sendo as bandas correspondentes de espessura e brilho bastante superior aos ensaios 1 e 2. A partir destes dados, pode ser concluído que a fluorescência medida por espectrofluorimetria é um bom método para estimar a produção de EYFP.

Na figura 4.26 vêm descritas as variações da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação para o planeamento factorial 2² com indução da produção no meio da fase exponencial.

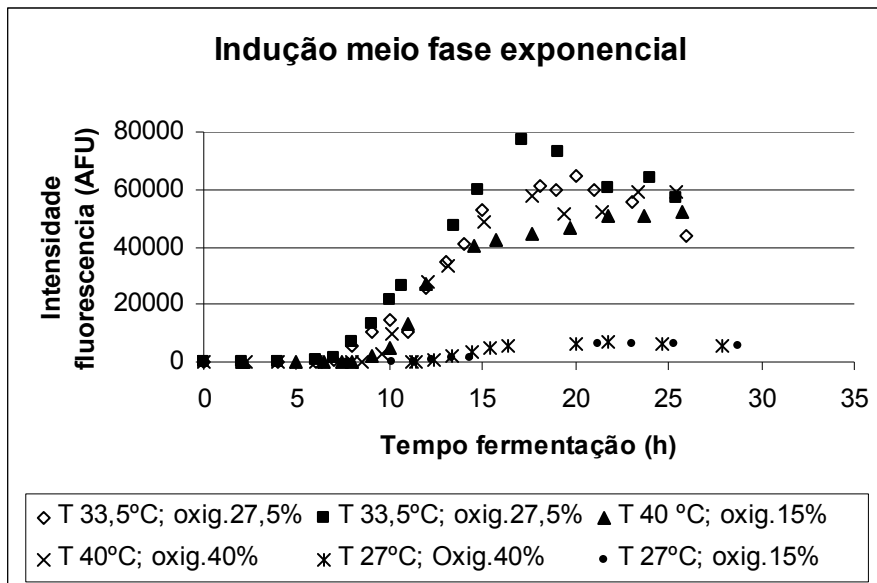


Figura 4.26 – Variação da intensidade de fluorescência (AFU) ao longo do tempo de fermentação (h) para as condições do planeamento 2², com indução da produção no meio da fase exponencial.

Como pode ser verificado pela figura acima, e comparando com os ensaios correspondentes às linhas 1 e 2 da figura 4.24, os ensaios com temperatura de fermentação de 27°C são os que produzem menor intensidade de fluorescência. Os ensaios relativos ao ponto central correspondem aos valores máximos de fluorescência média, tal como se pode observar na figura 4.24 (banda 3 do gel). A intensidade de fluorescência apresentada pelos ensaios correspondentes à temperatura de 40°C, também bastante elevada, correspondendo às bandas 4 e 5 da figura 4.24. Pelos dados apresentados pode-se garantir que nas bandas 1 e 2 existe menor quantidade de YEFP comparativamente com as bandas 3, 4 e 5, mas não se pode afirmar que exista diferença de quantidade de proteína entre estas três últimas amostras.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no decorrer do presente trabalho, permitiram tirar as seguintes conclusões:

- A fase de crescimento (início da fase exponencial ou meio da fase exponencial) na qual é efectuada a indução da produção da proteína YEFP, afecta a quantidade de fluorescência final obtida, sendo o meio da fase exponencial o momento mais favorável para se efectuar a indução da produção, obtendo-se para o ponto central a fluorescência máxima média de 70.577 AFU.
- Foi também verificado que a fase de crescimento na qual é efectuada a indução influencia o efeito dos factores “temperatura de fermentação” e “concentração de oxigénio dissolvido” nas respostas estudadas.
- Após análise conjunta dos dados experimentais é possível concluir que para maximizar a produção de fluorescência pela *E. coli* M15, quando a indução da produção é efectuada no início da fase exponencial, devem ser utilizadas as condições de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido correspondentes ao ponto central, isto é, temperatura de fermentação de 33.5°C e concentração de oxigénio dissolvido de 27.5%. Nestas condições os parâmetros definidos para caracterizar a fermentação apresentaram os seguintes valores: taxa específica de crescimento de 0,424 h⁻¹; Rendimento em biomassa de 0,522 g/g e produção máxima de fluorescência de 65.313,5 AFU. No entanto, as condições definidas para o ponto central não foram óptimas para o parâmetro produção de fluorescência normalizada. Para este parâmetro o óptimo foi obtido para o ponto (+1, +1), isto é (40°C, 40%), obtendo-se 42.225,8 NFU.
- Quando a indução da produção de YEFP é efectuada no meio da fase exponencial, também as condições do ponto central se apresentaram como óptimas para maximizar a produção de fluorescência de YEFP em *E.coli* M15, obtendo-se os seguintes parâmetros: Taxa específica de crescimento de 0,410 g/g; Produção de fluorescência de 70.576,9 AFU. Os restantes parâmetros que caracterizam a fermentação não foram máximos para as condições do ponto central, sendo o rendimento em biomassa máximo para as condições de 27°C e 40% de oxigénio dissolvido, obtendo-se 0,410 g/g. A produção de fluorescência normalizada pela concentração de biomassa foi máxima para o ponto (+1, +1), isto é, (40°C, 40%) obtendo-se 35.689,0 NFU.
- Foi também concluído que grande parte das respostas estudadas deveriam ser modeladas por um polinómio de segundo grau ou grau superior.

6 RECOMENDAÇÕES

Para complementar este estudo, e uma vez que as respostas estudadas seriam melhor ajustadas por um polinómio de segundo grau, recomenda-se o seguinte estudo adicional:

Utilização de um planeamento factorial completo 2^2 em estrela e com repetição no ponto central, conforme matriz apresentada na Tabela 6.1. Os níveis das variáveis a utilizar nos ensaios são também apresentados na mesma tabela. A metodologia de superfície de resposta deverá ser utilizada. O planeamento em estrela consiste basicamente em acrescentar ao planeamento já existente um outro planeamento idêntico, porém girado em 45 graus em relação à orientação de partida. O resultado é uma distribuição ortogonal, como mostra a Figura 6.1.

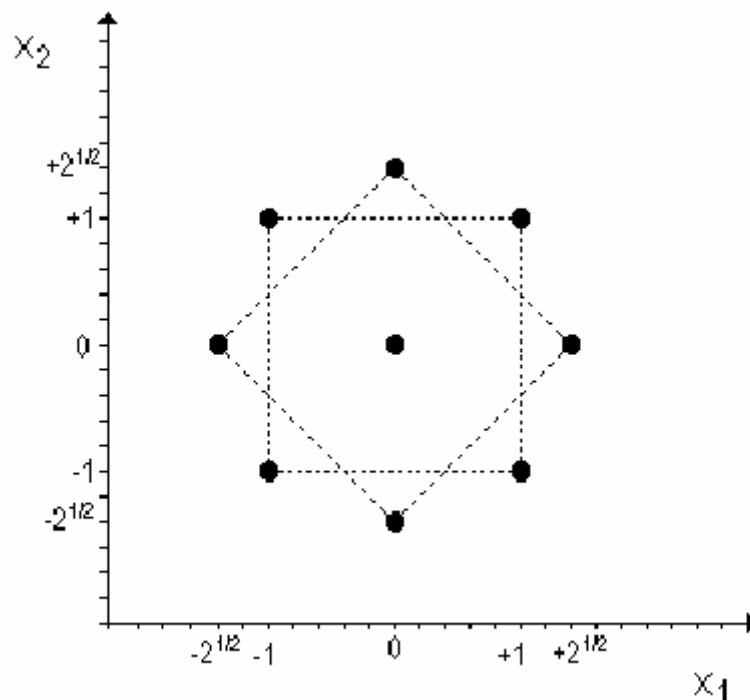


Figura 6.1 - Planeamento em estrela (Barros Neto *et al.*, 1995).

Os dados deveram ser ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem, expresso pela equação:

$$\hat{Y}_i = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_{12} * X_1 * X_2 + b_{11} * (X_1)^2 + b_{22} * (X_2)^2$$

Onde:

\hat{Y}_i representa a variável de resposta,
 b_0 - o coeficiente de interceção,
 b_1 e b_2 - os coeficientes lineares,
 b_{11} e b_{22} - os coeficientes quadráticos,
e X_1 e X_2 representam as variáveis estudadas.

A avaliação desta superfície indica onde existem as condições óptimas dentro da área experimental estudada.

Tabela 6.1 – Matriz do planeamento experimental segundo um factorial 2^2 em estrela e com repetição no ponto central.

Ensaio	Nível da variável		Factor	
	T (°C)	O2 dissolv. (%)	T (°C)	O2 dissolv. (%)
1	-1	-1	27	15
2	+1	-1	40	15
3	-1	+1	27	40
4	+1	+1	40	40
5	+√2	0	42,7	27,5
6	-√2	0	24,3	27,5
7	0	+√2	33,5	45,2
8	0	-√2	33,5	10
9	0	0	33,5	27,5
10	0	0	33,5	27,5
11	0	0	33,5	27,5

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeer A. Alnuami, Buthaina Zeedi, Shahnaz M. Qadri, S. Salman Ashraf.** (2008). Oxyradical-induced GFP damage and loss of fluorescence. *International journal of Biological Macromolecules*. 43, 182-186.
- Alba, M. J. G. e Calvo, E. G.** (2000). Characterization of bioreaction processes: aerobic *Escherichia coli* cultures. *Journal of Biotechnology*. 84, 107-118.
- Albano, C.R., Randers-Eichhorn, L., Bentley, W.E. e Rao, G.** (1998). Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnology Progress*, 14, 351-354.
- Alexeeva, S., Hellingwerf, J. K. e Mattos M. J. T.** (2002). Quantitative assessment of oxygen availability: perceived aerobiosis and its effect on flux distribution in the respiratory chain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 184 (5). 1402-1406.
- Andrea Vera, Nuria González-Montalbán, Anna Arís, Antonio Villaverde** (2007). The Conformational Quality of Insoluble Recombinant Proteins is Enhanced at Low Growth Temperatures. *Biotechnology and Bioengineering*. 96 (6), 1101-1106.
- Bailey, J.E. e Ollis, D.F.** (1986). *Biochemical Engineering Fundamentals*, McGraw-Hill Book Co., Singapore.
- Baneyx F., Mujacic M.** (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol*, 22, 1399-1408.
- Baneyx F., Palumbo J. L.** (2003). Improving heterologous protein folding Via molecular chaperone and foldase co-expression. *Methods Mol Biol*. 205, 171-197.
- Belpaire, I. M.; Bindels, F.; Corvini, P.; Gerin, P. A.** (2005). Method for monitoring the fate of green fluorescent protein added to aerobic and anaerobic wastewater sludge. 39. 4933-4940.
- Berney, M., Weilenmann, H., Ihssen, J., Bassin, C. e Egli, T.** (2006). Specific growth rate determines the sensitivity of *Escherichia coli* to thermal, UVA, and solar disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (4). 2586-2593.
- Blight, M. A. and Holland, I. B.** (1994). Heterologous protein secretion and the versatile *Escherichia coli* haemolysin translocator. *Trends in Biotechnology*. 12, 450-455.
- Bortolussi, R., Ferrieri, P., Quie, G.P.** (1983). Influence of Growth Temperature of *Escherichia coli* on K1 Capsular Antigen Production and Resistance to Opsonization. *Infection and Immunity*. 39(3), 1136-1141.
- Brunori, M., and G. Rotilio.** (1984). Biochemistry of oxygen radical species. *Methods Enzymol*. 105, 22-35.
- Button, D. K.** (1998). Nutrient Uptake by Microorganisms according to Kinetic Parameters from Theory as Related to Cytoarchitecture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3), 636-645.

Carlson, R. e Srienc, F. (2004). Fundamental *Escherichia coli* biochemical pathways for biomass and energy production: Identification of reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 85 (1), 1-19.

Cha, H.J., Wu, C.F., Valdes, J.J., Rao, G. e Bentley, W.E. (2000). Observations of green fluorescent protein as a fusion partner in genetically engineered *Escherichia coli*: Monitoring protein expression and solubility. *Biotechnology and Bioengineering*, 67 (5), 565-574.

Chae, H.J., Delisa, M.P., Cha, H.J., Weigand, W.A., Rao, G. e Bentley, W.E. (2000). Framework for online optimization of recombinant protein expression in high-cell-density *Escherichia coli* cultures using GFP-fusion monitoring. *Biotechnology and Bioengineering*, 69 (3), 275-285.

Chong Zhang e Xin-Hui Xing. (2008). Quantification of specific bacterial strain in an anaerobic mixed culture for biohydrogen production by the aerobic fluorescence recovery (AFR) technique. *Biochemical Engineering Journal*. 39. 581-585.

Delisa, M.P., Li, J.C., Rao, G., Weigand, W.A. e Bentley, W.E. (1999). Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*, 65 (1), 54-64.

Delisa, M.P., Chae, H.J., Weigand, W.A., Valdes, J.J., Rao, G. e Bentley, W.E. (2001). Generic model control of induced protein expression in high cell density cultivation of *Escherichia coli* using on-line GFP-fusion monitoring. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24 (2), 83-91.

Esener, A. A., Roels, J. A. e Kossen, N. W. F. (1981). The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1401-1405.

Farr, S. B., Kogoma T. (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews*, 55(4), 561-585.

Floyd, R. A. (1990). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 2587-2597.

Gerdes, H.H. e Kaether, C. (1996). Green fluorescent protein: Applications in cell biology. *Febs Letters*, 389 (1), 44-47.

Gill, R.T., Valdes, J.J. e Bentley, W.E. (2000). A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 2 (3), 178-189.

Goldberg, J. J., Bramley, A. J., Sjogren, R. E., Pankey, J. W. (1994). Effects of Temperature and Oxygen Tension on Growth of *Escherichia coli* in Milk. *Journal of Dairy Science*. 77(11), 3338-3346.

Hill, O., and H. Allen. (1978). The chemistry of dioxygen and its reduction products, 5-12. In D. W. Fitzsimons (ed.), *Oxygen free radicals and tissue damage*. Elsevier Science Publishing, Inc., New York.

Holms, H. (1996). Flux analysis and control of the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Fems Microbiology Reviews*, 19 (2), 85-116.

- Hondorp, E. R., Matthews R. G.** (2004). Oxidative stress inactivates Cobalamin-Independent Methionine Synthase (MetE) in *Escherichia coli*. *Plos Biology*, 11(2); 1738-1753.
- Horitsu, H., Yahashi, Y., Takamizawa, K., Kawai, K., Suzuki, T., Watanabe, N.** (1992). Production of Xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of Production Rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 40,1085-1091.
- Hu, S.Y., Wu, J.L. e Huang, J.H.**, (2004). Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 107 (2), 161-171.
- Huang, R.C., Lam, E., Chen, Y.H., Hackett, J., Lam, T.L., Liu, D., Ma, M.C., Siu, K.L., Sivakesava, S., Xu, Z.N., Wong, R.S.C. e Wong, W.K.R.** (1999). Human epidermal growth factor excreted by recombinant *Escherichia coli* K-12 has the correct N-terminus and is fully bioactive. *Process Biochemistry*, 35 (1-2), 1-5.
- Jeong, K. J. e Lee, S. Y.** (1999). High-level production of human leptin by fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* and its purification. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 3027-3032.
- Jeong, K.J., Choi, J.H., Yoo, W.M., Keum, K.C., Yoo, N.C., Lee, S.Y. e Sung, M.H.** (2004). Constitutive production of human leptin by fed-batch culture of recombinant rpoS(-) *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 36 (1), 150-156.
- Jiménez-Banzo, A., Nonell, S., Hofkens, Flors, C.** (2008). Singlet Oxygen Photosensitization by EGFP and its Chromophore HBDI. *Biophysical Journal*. 94(1),168–172.
- Jones, J.J., Bridges, A.M., Fosberry, A.P., Gardner, S., Lowers, R.R., Newby, R.R., James, P.J., Hall, R.M. e Jenkins, O.** (2004). Potential of real-time measurement of GFP-fusion proteins. *Journal of Biotechnology*, 109 (1-2), 201-211.
- Kang, D.G., Kim, Y.K. e Cha, H.J.** (2002). Comparison of green fluorescent protein expression in two industrial *Escherichia coli* strains, BL21 and W3110, under co-expression of bacterial hemoglobin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59 (4-5), 523-528.
- Karp, P.D., Riley, M., Saier, M., Paulsen, I.T., Collado-Vides, J., Paley, S.M., Pellegrini Toole, A., Bonavides, C. e Gama-Castro, S.** (2002). The EcoCyc Database. *Nucleic Acids Research*, 30 (1), 56-58.
- Kayser, A., Weber, J., Hecht, V. e Rinas, U.** (2005). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* in glucose-limited continuous culture. I. Growth-rate dependent metabolic efficiency at steady state. *Microbiology*, 151, 693–706.
- Kentaro O., Zenichiro K., Eiji M., Ailian L., Kazuyuki H., Yutaka Y., Hidenori O., Naomi K.** (2004). Systematic optimization of active protein expression using GFP as a folding reporter. *Protein Expression and purification*. 36. 327-332.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, Y.K. e Chang, H.N.** (2004). High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26 (3), 147-150.

Korz, D. J., Rinas, U., Hellmuth, K., Sanders, E. A., and Deckwer, W.-D. (1995). Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 39, 59-65.

Kovárová, K., Zehnder, A. J. B. e Egli, T. (1996). Temperature-Dependent growth kinetics of *Escherichia coli* ML 30 in glucose-limited continuous culture. *Journal of Bacteriology*. 178 (15), 4530-4539.

Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*. 14, 98-105.

Li, J.C., Wang, S., VanDusen, W.J., Schultz, L.D., George, H.A., Herber, W.K., Chae, H.J., Bentley, W.E. e Rao, G. (2000). Green fluorescent protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Real-time studies of the GAL1 promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 70 (2), 187-196.

Liu, S., Bugos, R.C., Dharmasiri, N. e Su, W.W., (2001). Green fluorescent protein as a secretory reporter and a tool for process optimization in transgenic plant cell cultures. *Journal of Biotechnology*, 87, 1-16.

Ludger Poppenborg, Karl Friehs, Erwin Flaschel (1997). The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. *Journal of Biotechnology*. 58, 79-88.

March, J.C., Rao, G. e Bentley, W.E., (2003). Biotechnological applications of green fluorescent protein. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62, 303-315.

Margolin, W., (2000). Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods*, 20, 62-72.

Martinez-Antonio, A., Salgado, H., Gama-Castro, S., Gutierrez-Rios, R.M., Jimenez-Jacinto, V. E Collado-Vides, J. (2003). Environmental conditions and transcriptional regulation in *Escherichia coli*: A physiological integrative approach. *Biotechnology and Bioengineering*, 84 (7), 743-749.

Mónica Martínez-Alonso, Elena García-Fruitós, Antonio Villaverde, (2008). Yield, Solubility and Conformational Quality of Soluble Proteins Are Not Simultaneously Favored in Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*. 101. 1353-1358.

Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., and Schaechter, M. (1990). Physiology of the bacterial cell – a molecular approach. Sinauer Associates, Sunderland.

Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R. E. (1995). Planejamento e otimização de experimentos. Editora da Unicamp.

Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T. (1998). Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*. 64. 1694-1699.

O. Shimomura, (1979). Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein. *Febs Letters*, 104 (2), 220-222.

Patterson, G., Day, R.N. e Piston, D. (2001). Fluorescent protein spectra. *Journal of Cell Science*, 114 (5), 837-838.

Phillips Jr, N. G. (1997). Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Current Opinion in Structural Biology*, 7, 821-827.

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

Poppenborg, L., Friehs, K. e Flaschel, E. (1997). The green fluorescent protein is a versatile reporter for bioprocess monitoring. *Journal of Biotechnology*, 58 (2), 79-88.

Prytz, I., Sanden, A.M., Nystrom, T., Farewell, A., Wahlstrom, A., Forberg, C., Pragai, Z., Barer, M., Harwood, C. e Larsson, G. (2003). Fed-batch production of recombinant β -galactosidase using the universal stress promoters *uspA* and *uspB* in high cell density cultivations. *Biotechnology and Bioengineering*, 83 (5), 595-603.

Randers-Eichhorn, L., Albano, C.R., Sipior, J., Bentley, W.E. e Rao, G. (1997). On-line green fluorescent protein sensor with LED excitation. *Biotechnology and Bioengineering*, 55 (6), 921-926.

Ratkowsky, D. A., Olley, J., McMeekin, T. A. e Ball, A. (1982). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *Journal of Bacteriology*, 154, 1222-1226.

Reischer, H., Schotola, I., Striedner, G., Potschacher, F. e Bayer, K. (2004). Evaluation of the GFP signal and its aptitude for novel on-line monitoring strategies of recombinant fermentation processes. *Journal of Biotechnology*, 108 (2), 115-125.

Richards, H.A., Halfhill, M.D., Millwood, R.J. e Stewart, C.N. (2003). Quantitative GFP fluorescence as an indicator of recombinant protein synthesis in transgenic plants. *Plant Cell Reports*, 22 (2), 117-121.

Rocha, I. C. A. P. (2003). Model-Based Strategies For Computer-Aided Operation of a Recombinant *E. coli* Fermentation. Tese de Doutoramento. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho. Portugal.

SEN, R., SWAMINATHAN, T.S. (1997). Application of Response-Surface Methodology to Evaluate the Optimum Environmental Conditions for the Enhanced Production of Surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 47, 358-363.

Seo, J.H., Kang, D.G. e Cha, H.J. (2003). Comparison of cellular stress levels and green fluorescent-protein expression in several *Escherichia coli* strains. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 37 (Pt 2), 103-107.

Sigüenza, R., Flores, N., Hernández, G., Martínez, A., Bolivar, F. e Valle, F. (1999). Kinetic characterization in batch and continuous culture of *Escherichia coli* mutants affected in phosphoenolpyruvate metabolism: differences in acetic acid production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 587-592.

- Silva, C. J. S. M.** (1999). Planejamento e otimização de parâmetros no processo fermentativo de obtenção de xilitol empregando o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia. Brasil.
- Sorensen H. P.; Mortensen K. K.** (2005a). Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal Biotechnol.* 115, 113-128.
- Su, W.W.**, (2005). Fluorescent proteins as tools to aid protein production. *Microbial Cell Factories*, 4.
- Susanne E. Swalley, John R. Fulghum, Stephen P. Chambers.** (2006). Screening factors effecting a response in soluble protein expression: formalized approach using design experiments. 351, 122-127.
- Tabandeh, F.; Khodabandeh, M.; Yakhchali, B.; Habib-Ghomi, H.; Shariati, P.** (2008). Response surface methodology for optimizing the induction conditions of recombinant interferon beta during high cell density culture. *Chemical Engineering Science.* 63. 2477-2483.
- Timmons, L., Becker, J., Barthmaier, P., Fyrberg, C., Shearn, A. e Fyrberg, E.** (1997). Green fluorescent protein/beta-galactosidase double reporters for visualizing *Drosophila* Gene expression patterns. *Developmental Genetics*, 20, 338-347.
- Veloso, A.C.A.** (2006). Otimização de Estratégias de Alimentação para a Identificação de Parâmetros de um Modelo de E. Coli. Utilização do Modelo em Monitorização e Controlo. Tese de Doutoramento. Departamento de Engenharia Biológica. Universidade do Minho. Portugal.
- Xu, B., Jahic, M., e Enfors, S. O.** (1999). Modeling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress.* 15, 81-90.
- Yang, F., Moss, L.G. e Phillips, G.N.Jr.** (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14, 1246-1251.
- Yang, J., Moyana, T., Mackenzie, S., Xia, Q., and Xiang, J.** (1998). One hundred seventy-fold increase in excretion of an FV fragment-tumor necrosis factor alpha fusion protein (sFV/TNF-a) from *Escherichia coli* caused by the synergistic effects of glycine and Triton X-100. *Applied and Environmental Microbiology.* 64, 2869-2874.
- Yuan, C., Reuland, J.M., Lee, L. e Huang, A.J.W.** (2004). Optimized expression and refolding of human keratopithelin in BL21 (DE3). *Protein Expression and Purification*, 35 (1), 39-45.
- Zhao, J. e Shimizu, K.** (2003). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli* K12 grown on C13-labeled acetate and glucose using GG-MS and powerful flux calculation method. *Journal of Biotechnology*, 101 (2), 101-117.
- Zupan, A.L., Trobec, S., Gaberc-Porekar, V. e Menart, V.** (2004). High expression of green fluorescent protein in *Pichia pastoris* leads to formation of fluorescent particles. *Journal of Biotechnology*, 109 (1-2), 115-122.

ANEXOS

ANEXO A

Neste anexo são apresentados exemplos de curvas de calibração referentes aos diferentes métodos analíticos descritos no capítulo 3.

A.1 – Curva de calibração de biomassa

A curva de calibração da densidade óptica *versus* peso seco para a biomassa foi determinada por leitura da densidade óptica de suspensões, em duplicado, obtidas por diluição de uma suspensão de células de densidade óptica e de concentração em peso seco conhecidas. A densidade óptica destas suspensões está compreendida entre 0,1 e 0,8 unidades de absorvância (tabela A.1.2). A determinação da concentração em peso seco da suspensão celular inicial é efectuada gravimetricamente (tabela A.1.1).

Nas tabelas seguintes são apresentados os valores utilizados no cálculo da concentração em peso seco das suspensões celulares e respectiva densidade óptica a 600nm.

Tabela A.1.1 – Valores utilizados para o cálculo da concentração em peso seco da suspensão calcular.

Filtro n.º	Peso (g)				Concentração de biomassa (g/kg)
	Filtro	Filtro + biomassa	Biomassa	Suspensão total filtrada	
1	0,0699	0,0980	0,0281	10	2,81
2	0,0699	0,0833	0,0134	5	2,68
Média					2,745

Tabela A.1.2 – Valores da concentração em peso seco das suspensões celulares utilizadas para a curva de calibração da biomassa.

Balão N.º	Peso (g)		Densidade óptica (600 nm)			Concentração De biomassa (g/kg)
	Suspensão Celular	Água Destilada	Ensaio 1	Ensaio 2	Média	
1	1	149	0,0555	0,0545	0,0548	0,0183
2	1	99	0,0822	0,0829	0,0826	0,0275
3	1	49	0,1594	0,1703	0,1649	0,0549
4	1	24	0,3065	0,3366	0,3216	0,1098
5	1	19	0,3948	0,3916	0,3932	0,1373
6	1	14	0,5469	0,5217	0,5343	0,1830
7	1	9	0,7699	0,7585	0,7642	0,2745

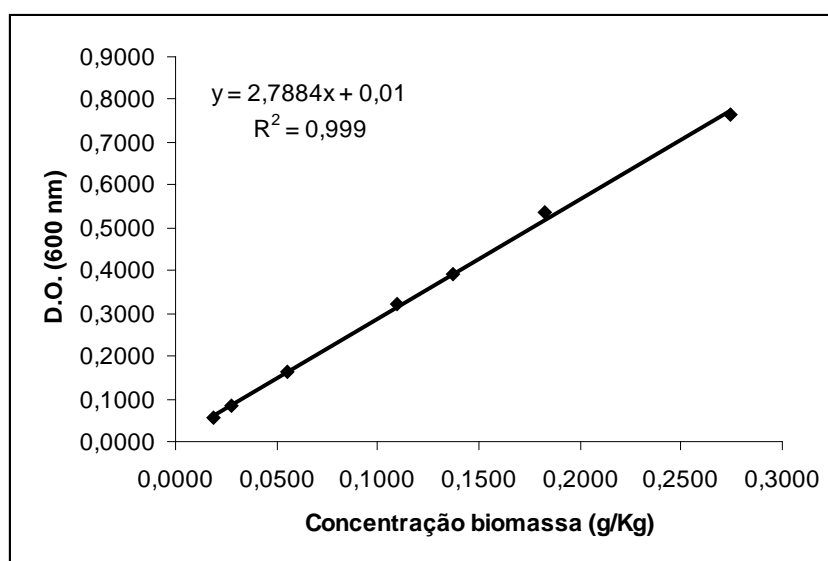


Figura A.1.1 – Curva de calibração de biomassa.

A.2 – Curva de calibração de acetato

A concentração de acetato foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). A curva de calibração para a determinação da concentração de acetato foi obtida a partir 7 soluções padrão cujas concentrações variavam entre 0,1 e 7,5 gramas de acetato por quilograma de solução. Foi utilizada uma solução mãe de 50g/kg de acetato, a partir da qual foram preparadas as soluções padrão para construir a curva de calibração.

Na tabela que se segue são apresentados os valores utilizados na construção da curva de calibração para o acetato.

Tabela A.2.1 – Valores utilizados na curva de calibração do acetato

Solução Padrão	Peso (g)		Concentração De acetato (g/kg)	Área
	Solução mãe	Solução total		
1	0,2	100	0,1	108
2	1	100	0,5	284
3	2	100	1,0	529
4	3	100	1,5	723
5	5	100	2,5	1121
6	10	100	5	2245
7	15	100	7,5	3622

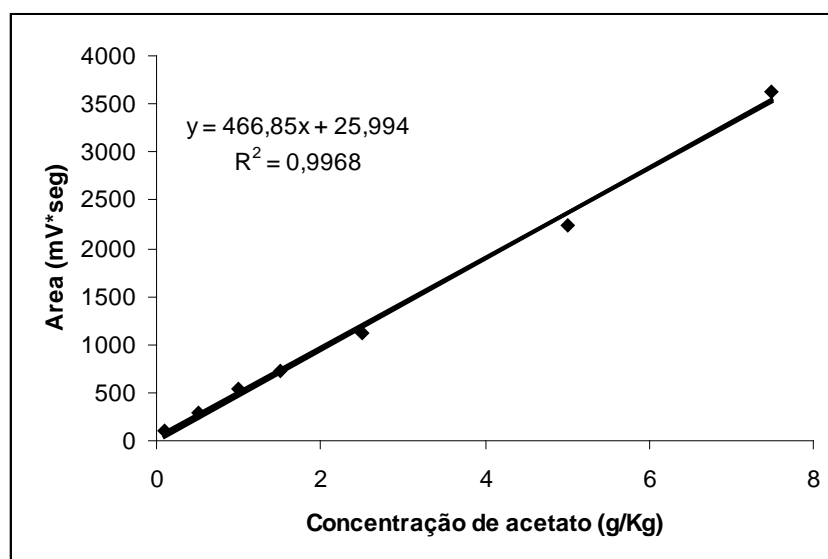


Figura A.2.1 – Curva de calibração de acetato.

A.3 – Curva de calibração de Glucose

A concentração de glucose foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). A curva de calibração para a determinação da concentração de glucose foi obtida a partir 7 soluções padrão cujas concentrações variavam entre 0,1 e 7,5 gramas de glucose por quilograma de solução. Foi utilizada uma solução mãe de 50g/kg de glucose, a partir da qual foram preparadas as soluções padrão para construir a curva de calibração.

Na tabela que se segue são apresentados os valores utilizados na construção da curva de calibração para o acetato.

Tabela A.3.1 – Valores utilizados na curva de calibração da glucose

Solução Padrão	Peso (g)		Concentração de glucose (g/kg)	Área
	Solução mãe	Solução total		
1	0,2	100	0,1	123
2	1	100	0,5	658
3	2	100	1,0	1341
4	3	100	1,5	2051
5	5	100	2,5	3261
6	10	100	5	6288
7	15	100	7,5	9522

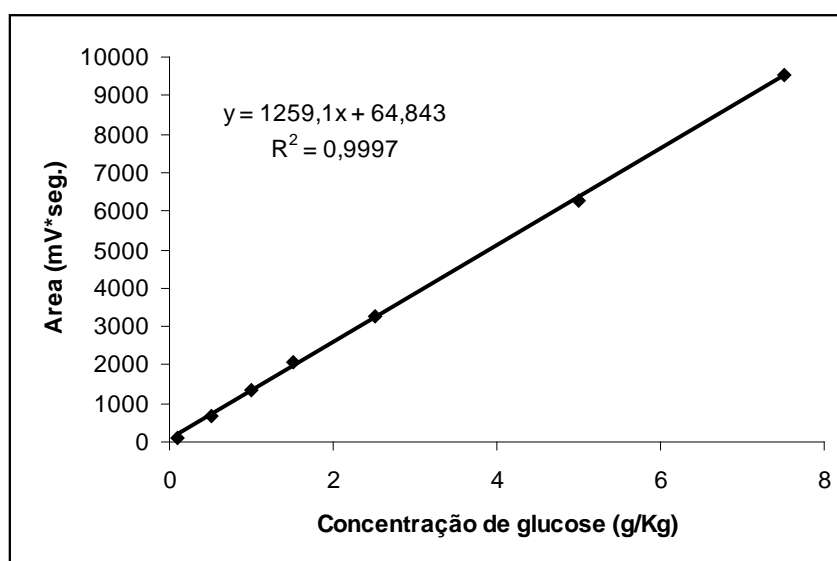


Figura A.3.1 – Curva de calibração de glucose.

A.4 – Estudo da linearidade do espectrofluorímetro

Para estudar a linearidade do espectrofluorímetro, foram efectuadas várias diluições do meio de cultura correspondente ao ensaio numero 6 do planeamento factorial com indução no meio da fase exponencial, para 21,75 horas de fermentação.

Na tabela A.4.1 vem descritas as diluições efectuadas, a fluorescência (AFU), densidade óptica (600 nm) da diluição e respectiva concentração de biomassa (g/kg).

Tabela A.4.1 – diluições, fluorescência (AFU) e densidade óptica (600 nm) obtidas a partir de uma amostra do meio da fermentação 6 do planeamento factorial com indução no meio da fase exponencial para 21,75 horas de fermentação.

Diluição	Fluorescência média (AFU)	D.O. média (600 nm)
100	1000	0,0566
125	565,7	0,047
150	461,9	0,03773
250	242,8	0,0226
500	88,9	0,01132
750	59,1	0,0075
1000	29,7	0,0057

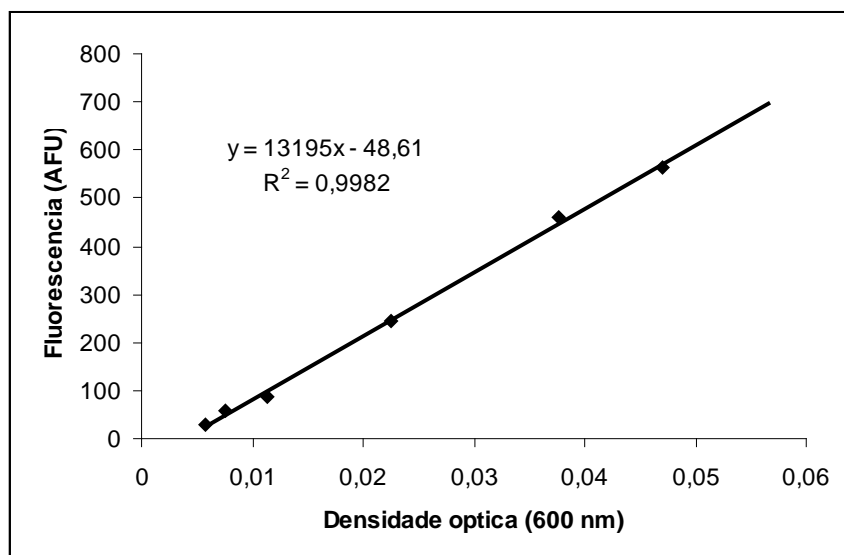


Figura A.4.1 – Fluorescência obtida em função da densidade óptica da amostra.

ANEXO B

Exemplo de determinação das respostas analisadas na construção dos planeamentos factoriais

Para exemplificar os cálculos efectuados na determinação das respostas estudadas nos planeamentos factoriais, vai ser utilizada a fermentação Batch referente ao planeamento factorial com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial de crescimento, referente ao ensaio 5 da tabela 4.2.

B.1 – Determinação da taxa específica máxima de crescimento μ_{\max} (h^{-1})

Para determinar a taxa específica máxima de crescimento para cada fermentação, referente a cada ensaio dos planeamentos factoriais, utilizou-se a linearização da equação B.1.1

$$\mu = 1/X * dX/dt \quad \text{equação B.1.1}$$

onde:

μ - Taxa específica de crescimento (h^{-1})

X - Concentração de biomassa (g/Kg)

dX/dt - Variação da concentração de biomassa ao longo do tempo de fermentação (g/Kg*h)

linearizando fica:

$$\ln(x) = \ln(x_0) + \mu * t \quad \text{equação}$$

B.1.2

A partir dos valores experimentais de concentração de biomassa em função do tempo de fermentação, mostrados na tabela B.1.1 construiu-se o respectivo gráfico de crescimento, figura B.1.1, e determinou-se os pontos correspondentes à fase exponencial de crescimento.

Tabela B.1.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg) versus tempo de fermentação (h), para o ensaio 5.

Amostra	Tempo Fermentação (h)	D.O (600 nm)					Conc. Biom. (g/Kg)
		D.O. 1	Dil. 1	D.O. 2	Dil. 2	D. O. média	
1	0,00	0,2832	1			0,283	0,100
2	2,00	0,22	2			0,440	0,155
3	4,00	0,4433	2			0,887	0,312
4	6,00	0,4114	5			2,057	0,723
5	6,50	0,2668	10			2,668	0,938
6	7,00	0,3252	10	0,3278	10	3,265	1,148
7	8,00	0,2105	25	0,2056	25	5,201	1,829
8	9,00	0,2162	25	0,2159	25	5,401	1,899
9	10,00	0,2129	25	0,21	25	5,286	1,858
10	11,00	0,2172	25	0,2176	25	5,435	1,911
11	12,00	0,1106	50	0,1144	50	5,625	1,978
12	13,00	0,1102	50	0,1161	50	5,658	1,989
13	14,00	0,2369	25	0,2244	25	5,766	2,027
14	15,00	0,2304	25	0,243	25	5,918	2,080
15	18,08	0,2349	25	0,2243	25	5,740	2,018
16	19,00	0,2334	25	0,2241	25	5,719	2,010
17	20,00	0,2428	25	0,2356	25	5,980	2,102
18	21,00	0,2303	25	0,2422	25	5,906	2,076
19	23,00	0,222	25	0,2282	25	5,628	1,978
20	26,00	0,2239	25	0,2231	25	5,588	1,964

Com os valores da tabela B.1.1 foi efectuada a curva de crescimento de E.coli M15 mostrada na figura B.1.1

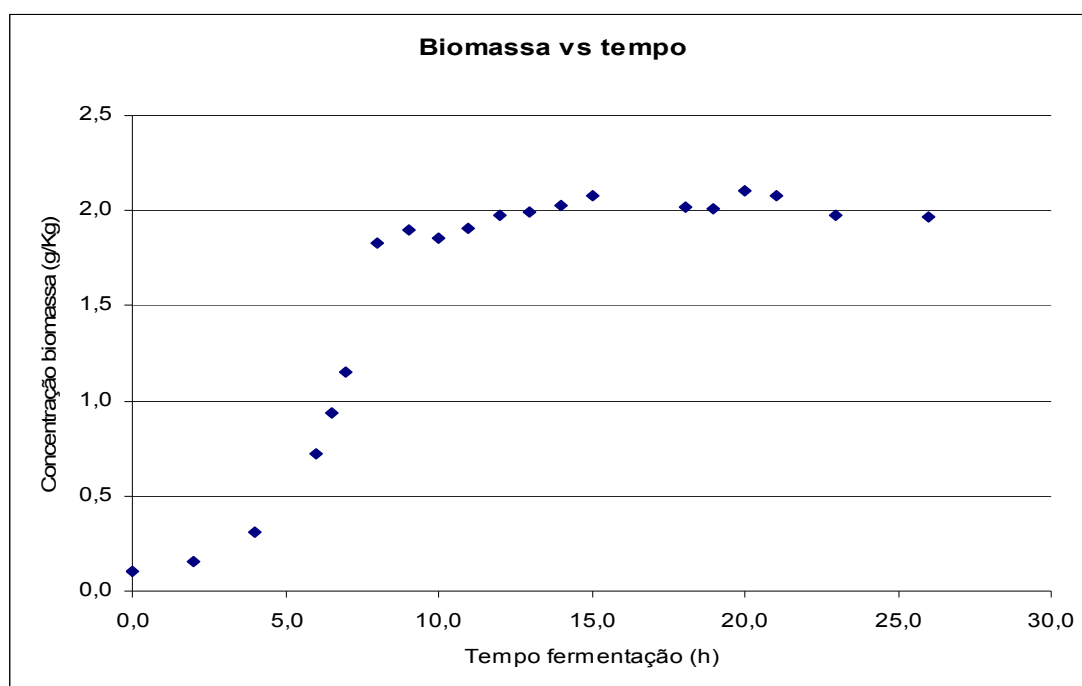


Figura B.1.1 – Curva de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 5, ponto (0,0), do planeamento factorial 2^2 com indução no meio da fase exponencial de crescimento.

A partir do gráfico representado na figura B.1.1, foram determinados os pontos experimentais correspondentes à fase exponencial de crescimento,

para este ensaio. Sendo a fase exponencial de crescimento, definida entre 4 e 8 horas de fermentação.

Tabela B.1.2 – valores de concentração de biomassa (g/Kg) e respectivos logaritmos em função do tempo de fermentação (h), para o ensaio 5 do planeamento factorial representado na tabela 4.2.

Tempo Fermentação (h)	Concentração de Biomassa (g/Kg)	Ln (x)
4,0	0,312	-1,166
6,0	0,723	-0,324
6,5	0,938	-0,064
7,0	1,148	0,138
8,0	1,829	0,604

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela B.1.2), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura B.1.1.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 5, corresponde ao coeficiente angular da recta representada na figura B.1.2, sendo o seu valor de $0,4418 \text{ h}^{-1}$.

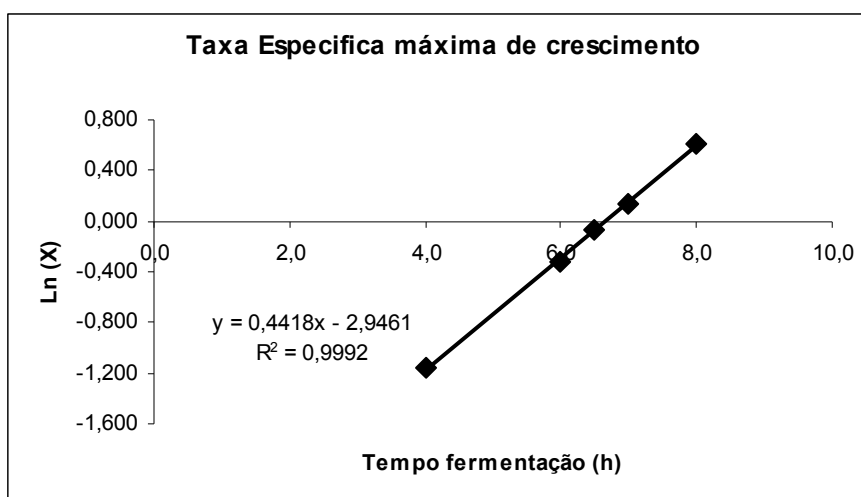


Figura B.1.2 – representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica de crescimento para o ensaio 5.

Para confirmar que os pontos experimentais seleccionados para representar a fase exponencial de crescimento foram os correctos,

representou-se graficamente a variação da taxa específica de crescimento ao longo do tempo de fermentação, figura B.1.3.

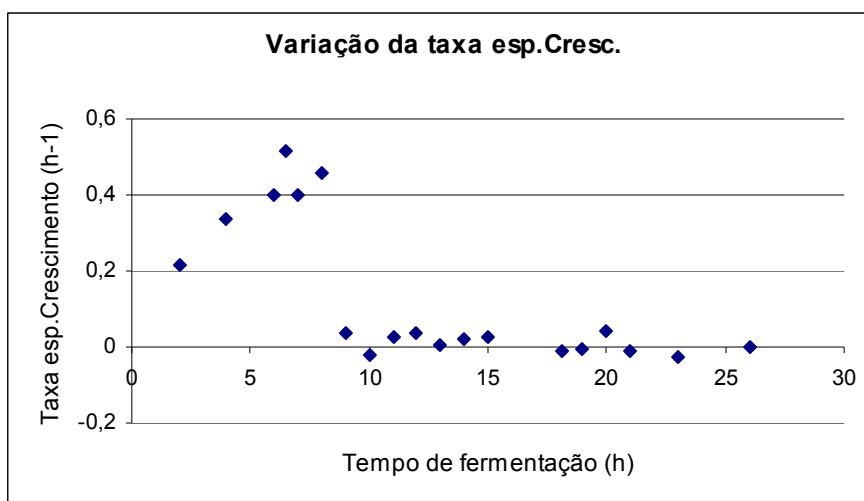


Figura B.1.3 – Variação da taxa específica de crescimento da E.coli M15 ao longo do tempo de fermentação, para o ensaio 5.

Como pode ser observado pela figura acima, a taxa específica de crescimento é máxima em torno do valor de 0,4 (h⁻¹) para os pontos entre 4 e 8 horas de fermentação. Para os restantes tempos de fermentação a taxa específica de crescimento tem um valor próximo de zero, como era esperado.

Para o ponto correspondente a 2 horas de fermentação, a taxa específica de crescimento não possui um valor próximo de 0,4 h⁻¹, pelo que não foi considerado como fazendo parte da fase exponencial de crescimento da E.coli M15 no ensaio 5.

B.2 – Rendimento em biomassa - $\gamma_{X/S}$ (g biomassa / g glucose)

O rendimento em biomassa foi obtido dividindo a quantidade de biomassa produzida (g) pela quantidade de substrato consumido (g) durante a fermentação (tabela B.2.1).

A partir da expressão cinética (equação B.2.1):

$$\gamma_{X/S} = \Delta X / (-\Delta S) = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad \text{equação B.2.1}$$

Sendo:

ΔX – Diferença da concentração de biomassa inicial (X_i) e concentração de biomassa no final da fermentação (X_f)

$(-\Delta S)$ – Diferença da concentração de glucose inicial (S_i) e concentração de glucose no final da fermentação (S_f)

e com os valores correspondentes, da tabela B.2.1, de S_i de 5,084 g/Kg, S_f de 0 g/Kg, X_i de 0,155 e X_f de 2,080 (correspondente ao valor máximo de concentração de biomassa obtido) obteve-se um rendimento em biomassa global de 0,379 g biomassa / g glucose.

Tabela B.2.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 5.

Tempo (h)	Biomassa (g/Kg)	Glucose (g/Kg)
0,0	0,100	3,567
2,0	0,155	5,084
4,0	0,312	3,773
6,0	0,723	2,388
6,5	0,938	2,310
7,0	1,148	2,107
8,0	1,829	0,534
9,0	1,899	0,000
10,0	1,858	0,000
11,0	1,911	0,000
12,0	1,978	0,000
13,0	1,989	0,000
14,0	2,027	0,000
15,0	2,080	0,000
18,1	2,018	0,000
19,0	2,010	0,000
20,0	2,102	0,000
21,0	2,076	0,000
23,0	1,978	0,000
26,0	1,964	0,000

O valor de rendimento em biomassa também foi calculado a partir do coeficiente angular da recta $\Delta X = f(-\Delta S)$.

Sendo assim, foi representado graficamente a variação da concentração de biomassa em função da variação da concentração de glucose para todos os pontos de fermentação e aproximado a uma recta, por regressão pelo método dos mínimos quadrados (figura B.2.1).

Como pode ser observado, o valor de rendimento em biomassa é igual a 0,38 g biomassa / g glucose, calculado pelos dois métodos expostos.

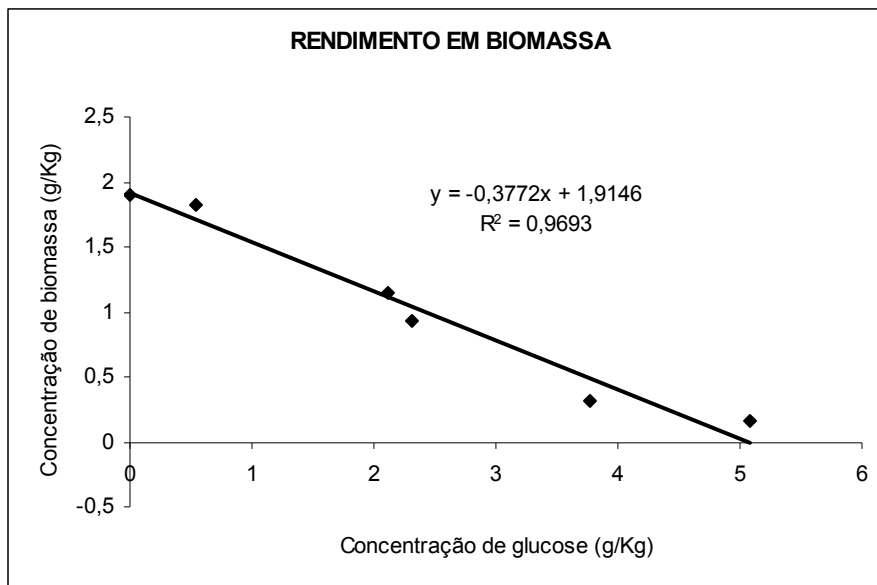


Figura B.2.1 – Equação de regressão pelo método de mínimos quadrados da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) para o ensaio 5.

B.3 - Produção de fluorescência em unidades arbitrárias e normalizadas

A produção de fluorescência arbitrária foi obtida a partir do coeficiente angular, que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$.

A fluorescência arbitrária em cada ponto experimental (tabela B.3.1), foi obtida por leitura directa da amostra, num espectrofluorímetro.

Com base nos valores experimentais de fluorescência arbitrária para cada ponto da fermentação (tabela B.3.1), foi construído o gráfico fluorescência arbitrária vs tempo de fermentação e aproximado por regressão linear, figura B.3.1.

A produção de fluorescência arbitrária F (AFU) é dada directamente pelo coeficiente angular da recta de regressão da fluorescência arbitrária vs tempo de fermentação, que é de 5110,3 AFU/h.

Uma vez obtido o valor experimental de fluorescência arbitrária de cada amostra no fluorímetro, esta foi dividida pela respectiva concentração de biomassa. Representando graficamente estes valores em função do tempo de fermentação (figura B.3.1) obtêm-se directamente, através do respectivo

coeficiente angular da recta de regressão, a produção de fluorescência normalizada.

Tabela B.3.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), fluorescência arbitrária (AFU) e fluorescência normalizada pela biomassa (NFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 5.

Tempo	Biomassa (g/Kg)	Fluorescência	
		AFU	NFU(AFU/g/Kg)
0,0	0,100	30,3	304,1867
2,0	0,155	43,2	279,5368
4,0	0,312	61,6	197,5365
6,0	0,723	111,0	153,426
6,5	0,938		
7,0	1,148	835,3	727,678
8,0	1,829	5661,4	3096,137
9,0	1,899	10252,0	5399,086
10,0	1,858	14781,5	7953,838
11,0	1,911		
12,0	1,978	26064,8	13180,65
13,0	1,989	34461,5	17326,69
14,0	2,027	41017,5	20234
15,0	2,080		
18,1	2,018	61227,5	30341,75
19,0	2,010	60035,0	29861,34
20,0	2,102	64435,0	30649,73
21,0	2,076	59601,3	28704,47
23,0	1,978	55647,5	28127,82
26,0	1,964	43937,5	22367,82

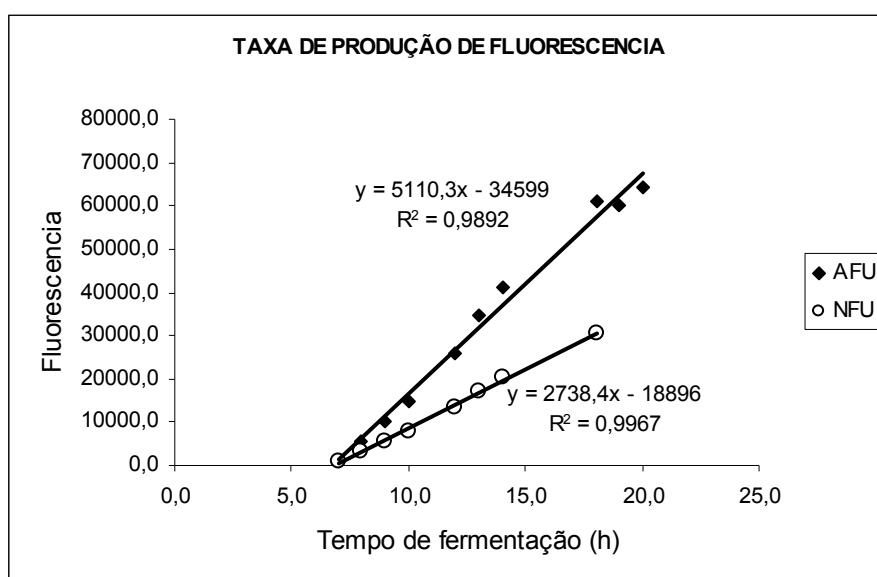


Figura B.4.1 – Rectas de regressão linear para a fluorescência arbitrária (AFU) e fluorescência normalizada (NFU) em função do tempo de fermentação (h), para o ensaio 5.

Estes parâmetros foram também calculados pela diferença entre o valor de fluorescência máxima obtida durante a fermentação e o valor de fluorescência antes da indução da produção de YEFP.

ANEXO C

Neste anexo vem descrito todos os resultados experimentais obtidos em todas as fermentações, bem como as respectivas respostas estudadas nos planeamentos factoriais 2^2 , com repetição no ponto central.

A matriz do planeamento experimental vem descrita na tabela C.1, onde são definidas as condições operatórias de temperatura de fermentação e concentração de oxigénio dissolvido efectuadas em cada fermentação, sendo também apresentado o momento de indução da produção de proteína.

Tabela C.1 – Matriz do planeamento experimental segundo dois planeamentos factoriais 2^2 , com repetição no ponto central.

Ensaio	Nível da variável		Factor		Momento de Indução
	T (°C)	O2 dissolv. (%)	T (°C)	O2 dissolv. (%)	
1	-1	-1	27	15	Início
2	+1	-1	40	15	Início
3	-1	+1	27	40	Início
4	+1	+1	40	40	Início
5	0	0	33,5	27,5	Início
6	0	0	33,5	27,5	Início
1	-1	-1	27	15	Meio
2	+1	-1	40	15	Meio
3	-1	+1	27	40	Meio
4	+1	+1	40	40	Meio
5	0	0	33,5	27,5	Meio
6	0	0	33,5	27,5	Meio

Início – indução da produção de GFP no início da fase exponencial de crescimento (D.O.600nm= 0,4)

Meio – indução da produção de GFP no meio da fase exponencial de crescimento (D.O.600nm=3,0)

Na tabela C.2 vêm descritas todas as respostas obtidas para o primeiro planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial de crescimento.

Tabela C.2: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ

(h⁻¹), rendimento em biomassa $Y_{x/s}$ (g biomassa / g glucose), taxa específica de consumo de glucose (-q_S) (g glucose/ g biomassa * h), taxa específica de produção de fluorescência q_F(AFU / h), taxa específica de produção de fluorescência normalizada q_F(NFU / h), taxa específica de produção de acetato (-q_A) (g acetato / g biomassa *h), taxa específica de consumo da acetato (q_A) (g acetato / g biomassa * h), no planeamento factorial 2², com repetição no ponto central, para indução da produção de GFP no início da fase exponencial.

Ensaio	Variáveis		Respostas						
	T (°C)	O ₂ dissolvido (%)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	(-q _S) (g/gh)	F (AFU)	f (NFU/h)	(-q _A) (g/gh)	(q _A) (g/gh)
1	-1	-1	0,290	0,329	0,303	10219	4494	0,038	0,020
2	+1	-1	0,254	0,259	0,515	32917	25204	0,039	0,026
3	-1	+1	0,322	0,457	0,313	11673	4432	0,020	0,041
4	+1	+1	0,205	0,193	0,373	43189	42226	0,038	0
5	0	0	0,428	0,411	0,464	63710	29019	0,243	0,267
6	0	0	0,422	0,633	0,167	66917	29183	0,138	0,048

C.1 – Ensaio 1, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 1, vêm descritos na tabela C.1.1 e representados graficamente na figura C.1.1.

Na tabela C.1.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.1.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 1.

Tempo fermentação (h)	Conc. biomassa (g/Kg)	Conc. glucose (g/Kg)	Conc. acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescência AFU	Intensidade fluorescência NFU
0,0	0,117	6,618	0,102	0,0	0
2,0	0,171	5,986	0,114	87,8	515,1771
3,0	0,203	5,239	0,114	172,6	848,8747
4,0	0,253	3,304	0,000	428,1	1694,333
5,3	0,319	5,271	0,174	602,4	1885,587
6,0	0,382	4,232	0,188	722,5	1893,145
7,0	0,492	3,798	0,239	1024,1	2081,546
8,0	0,652	4,213	0,369	1385,6	2123,566
9,0	0,924	4,505	0,508	1812,9	1962,997
10,0	1,242	1,585	0,386	2295,9	1847,919
11,0	1,631	0,987	0,506	2771,6	1699,068
12,0	1,926	0,000	0,440	3713,5	1928,004
13,0	1,998	0,000	0,325	4250,9	2127,401
14,2	2,079	0,000	0,414	5186,6	2495,282
17,2	2,021	0,000	0,123	7054,5	3490,589
19,0	2,077	0,000	0,000	8986,3	4326,938
20,0	2,057	0,000	0,000	10306,8	5009,406
22,7	2,053	0,000	0,000	10296,0	5014,892
25,0	1,977	0,000	0,000	9577,8	4845,515

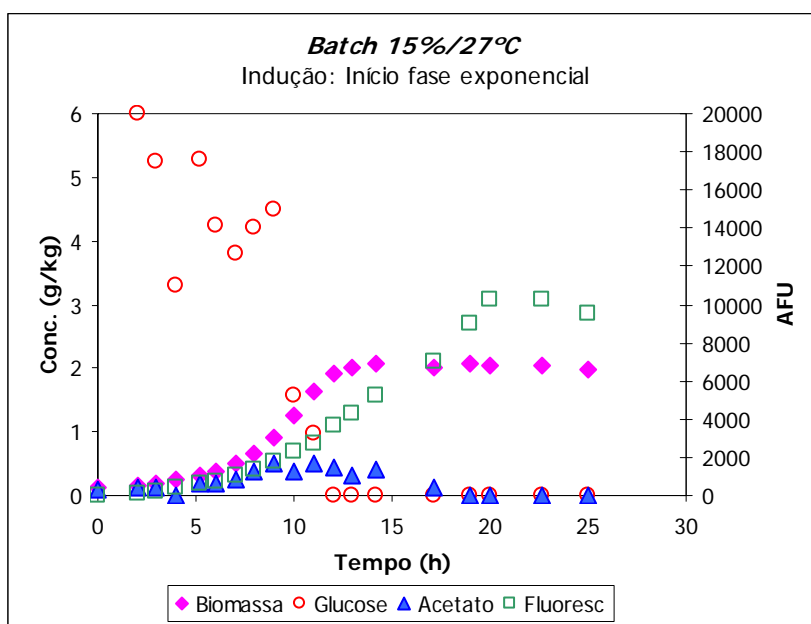


Figura C.1.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 1, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial de crescimento.

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.1.1), foi

representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.1.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E. coli M15 para o ensaio 1, corresponde ao coeficiente angular da recta representada na figura C.1.2, sendo o seu valor de $0,2896 \text{ h}^{-1}$.

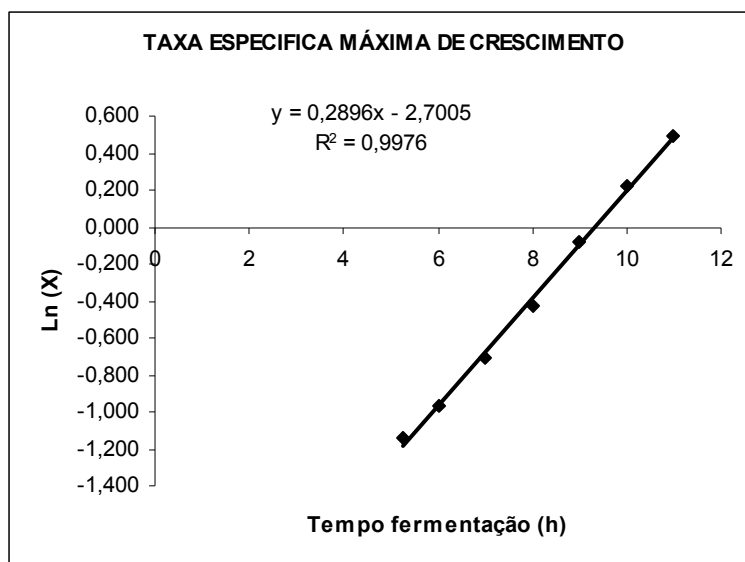


Figura C.1.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 1.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo, os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.1.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 1 de $0,3288 \text{ g biomassa produzidas / g glucose consumidas}$.

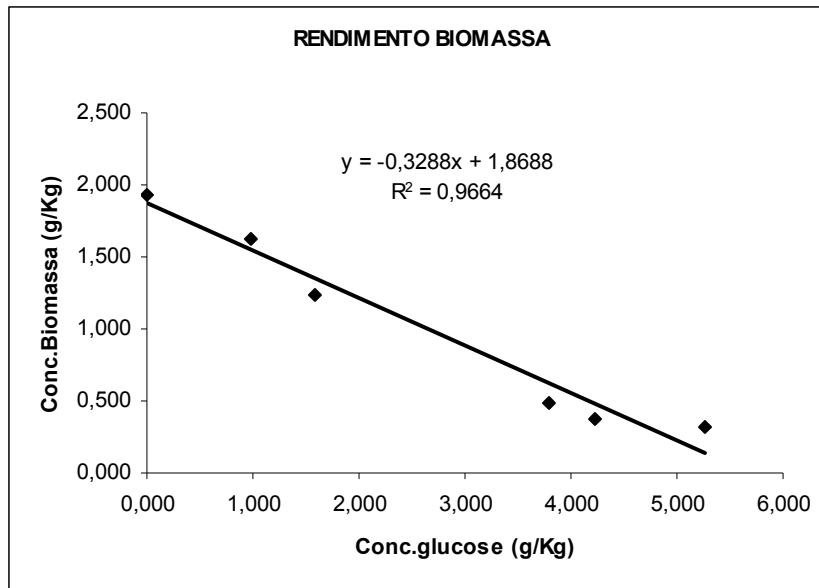


Figura C.1.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 1. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.1.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.1.2.

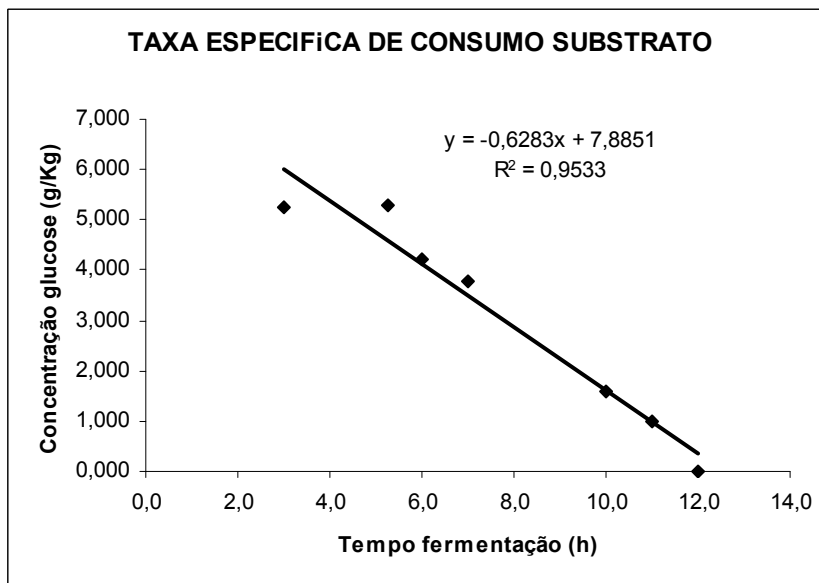


Figura C.1.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.1.5.

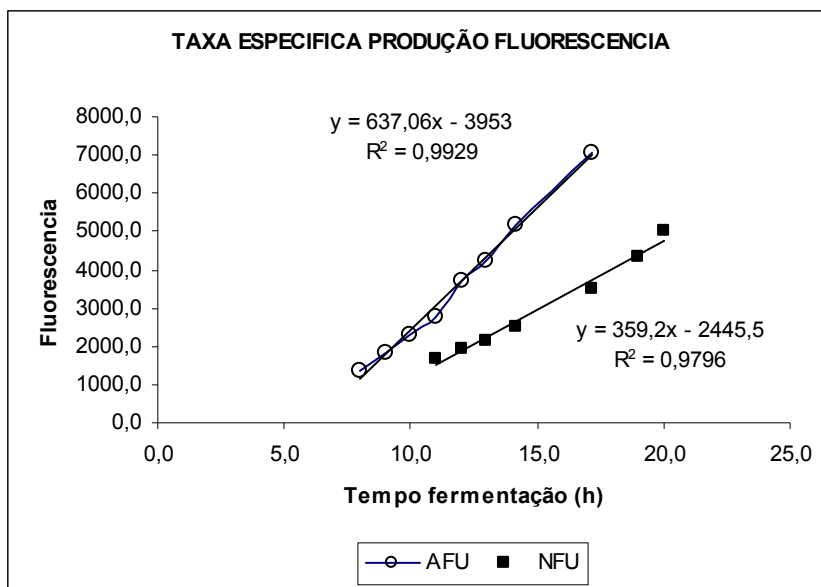


Figura C.1.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão.

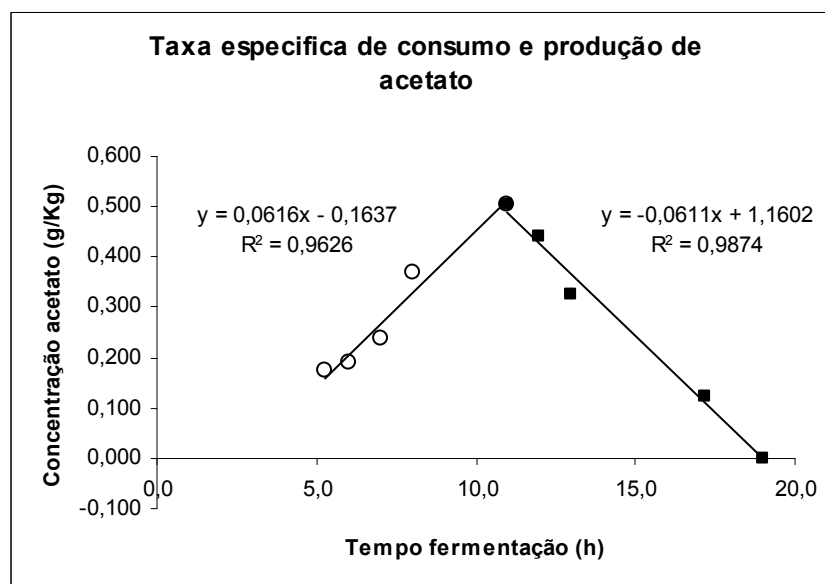


Figura C.1.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 1.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir do coeficiente angular das rectas: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente, representado na figura C.1.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.1.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de produção e consumo de acetato.

Tabela C.1.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($(-qA)$), para o ensaio 1.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h ⁻¹)	0,2896
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,3288
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,303
X	(g/Kg)	2,077
dS/dt	(g/Kgh)	0,6283
qF	(AFU)	637,06
qF	(NFU)	359,2
$qA = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,038
X	(g/Kg)	1,631
dA/dt	(g/Kgh)	0,038
$(-qA) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,029
X	(g/Kg)	2,077
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,0611

C.2 – Ensaio 2, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 2, vem descritos na tabela C.2.1 e representados graficamente na figura C.2.1.

Na tabela C.2.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.2.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 2.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU).	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,085	5,786	0,000	61,4	719,1
2,0	0,121	5,094	0,000	69,7	573,9
3,0	0,145	6,028	0,083	215,2	1484,2
4,0	0,178	5,637	0,095	448,1	2519,2
5,4	0,232	6,651	0,176	696,9	3004,7
6,0	0,255	5,830	0,190	768,9	3012,6
7,0	0,309	3,959	0,187	870,9	2814,3
8,0	0,367	4,169	0,300	1154,6	3147,4
9,1	0,483	3,904	0,386	1614,6	3345,0
10,0	0,610	3,222	0,487	2201,8	3608,7
11,4	0,956	1,899	0,689	3919,8	4101,4
13,6	1,469	0,000	1,358	12499,6	8510,1
14,6	1,439	0,000	1,138	25000,0	17378,4
16,3	1,519	0,000	1,080	27359,3	18014,7
18,2	1,427	0,000	1,081	30969,0	21704,1
20,3	1,385	0,000	0,926	30617,0	22104,1
22,3	1,280	0,000	0,831	32987,0	25777,9
23,3	1,336	0,000	0,956	31986,5	23943,6

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.2.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.2.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 2, corresponde ao coeficiente angular da recta representada na figura C.2.2, sendo o seu valor de $0,2536 \text{ h}^{-1}$.

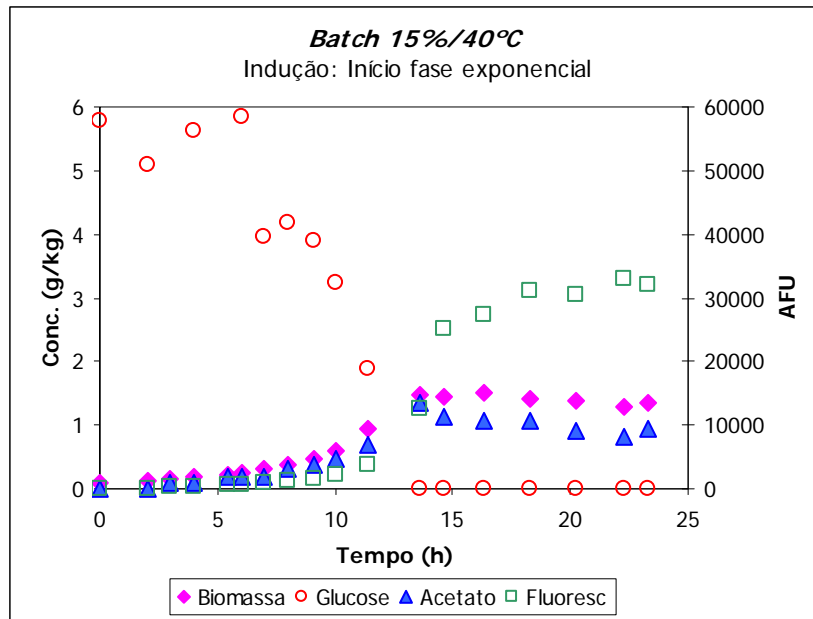


Figura C.2.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 1, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial de crescimento.

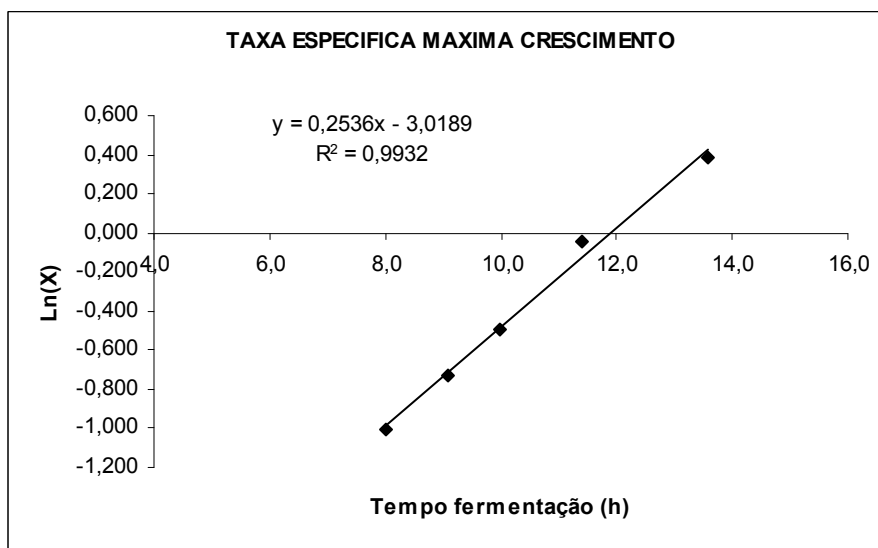


Figura C.2.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 1.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.2.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 2 de 0,2591 g biomassa produzida / g glucose consumida.

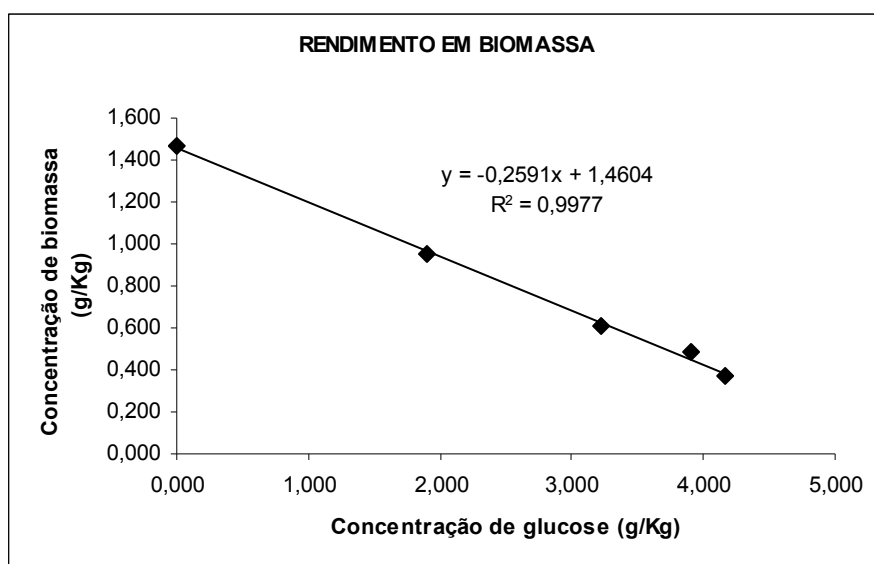


Figura C.2.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 2. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.2.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.2.2.

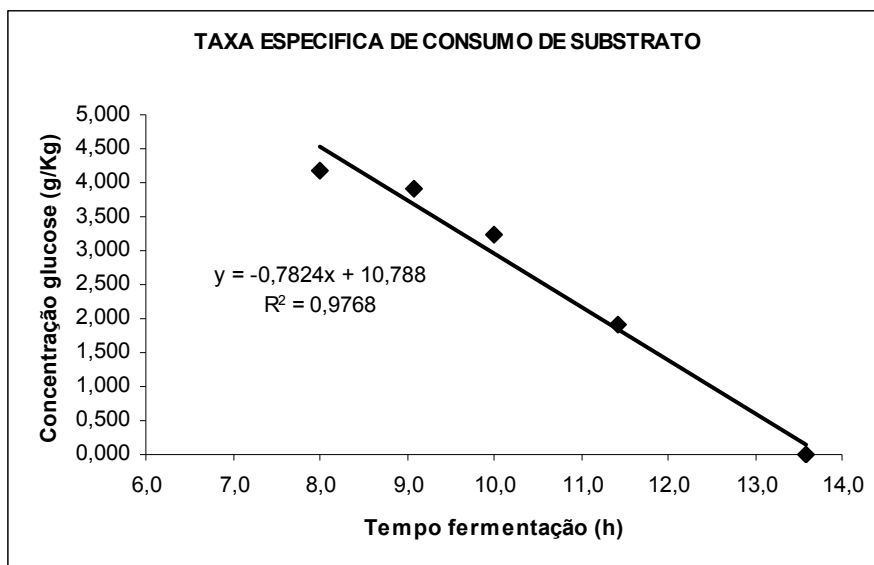


Figura C.2.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.2.5.

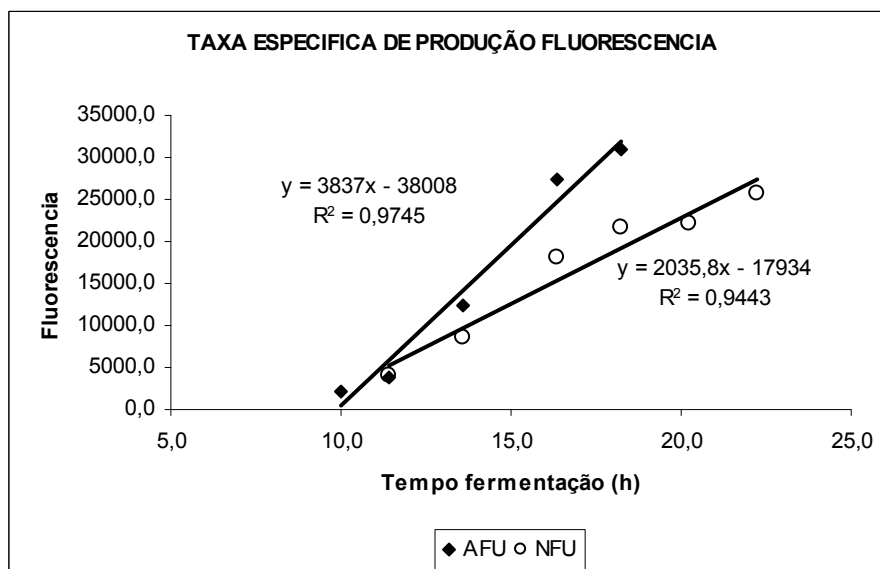


Figura C.2.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão.

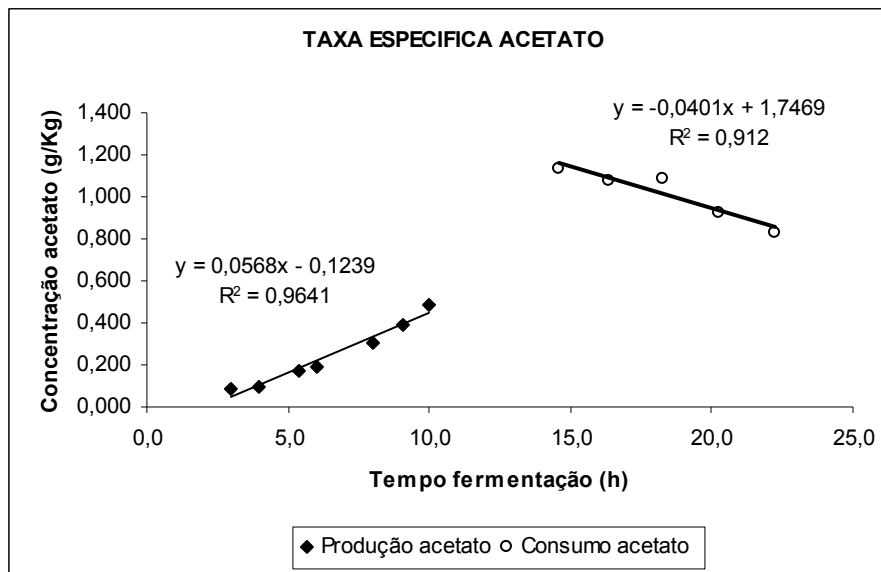


Figura C.2.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 2.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir do coeficiente angular das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente, representadas na figura C.2.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.2.2 vem descritos os valores de todas as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de produção e consumo de acetato.

Tabela C.2.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} ., rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose (-qs), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ((-qA)), para o ensaio 2.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,2536
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,2591
$(-qs) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,515
X	(g/Kg)	1,519
dS/dt	(g/Kgh)	0,7824
qF	(AFU)	3837
qF	(NFU)	2035,8
$qA = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,039
X	(g/Kg)	1,469
dA/dt	(g/Kgh)	0,0568
$(-qA) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,026
X	(g/Kg)	1,519
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,0401

C.3 – Ensaio 3, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 3, vem descritos na tabela C.3.1 e representados graficamente na figura C.3.1.

Na tabela C.3.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.3.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 3.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,00	0,094	4,983	0,000	94,1	1000,5
2,00	0,129	4,746	0,000	139,8	1082,5
3,00	0,148	4,955	0,064	170,6	1150,8
4,00	0,093	4,755	0,080	283,0	3044,4
6,00	0,309	4,252	0,173	616,3	1992,2
7,00	0,423	4,032	0,192	874,5	2066,4
8,00	0,585	3,668	0,226	1288,7	2202,9
9,00	0,750	3,504	0,278	1668,4	2225,9
10,00	1,065	2,550	0,343	2487,4	2336,7
11,00	1,575	1,505	0,356	3566,6	2265,2
11,75	1,958	0,721	0,402	4709,3	2405,5
14,75	2,135	0,000	0,391	7824,9	3664,6
16,50	2,223	0,000	0,271	8173,9	3677,4
19,08	2,250	0,000	0,000	9549,3	4244,2
21,25	2,217	0,000	0,000	11493,5	5183,2
22,25	2,142	0,000	0,000	11812,5	5514,0
23,58	2,074	0,000	0,000	11526,0	5556,9
25,25	2,081	0,000	0,000	10900,8	5237,7

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.3.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.3.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 3, corresponde ao coeficiente angular da recta representada na figura C.3.2, sendo o seu valor de $0,3215 \text{ h}^{-1}$.

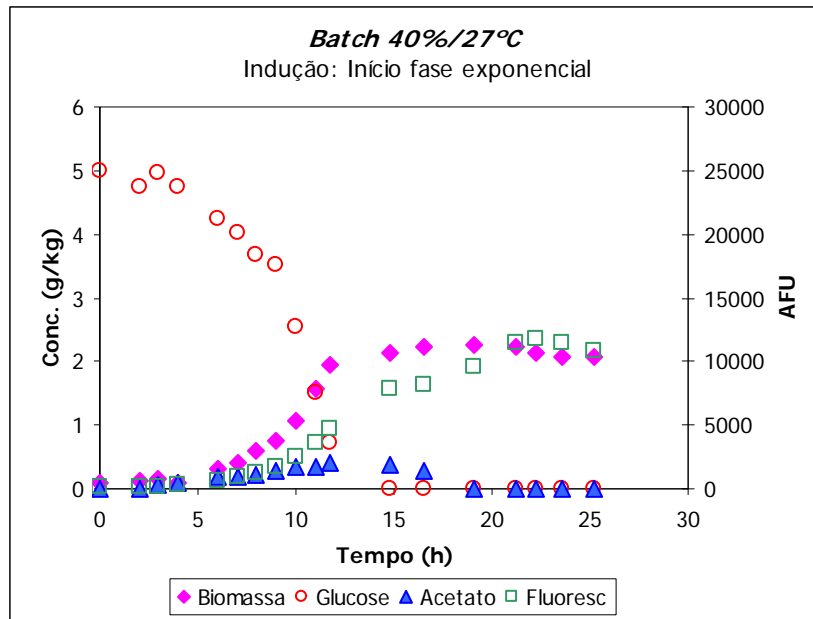


Figura C.3.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 3, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial de crescimento.

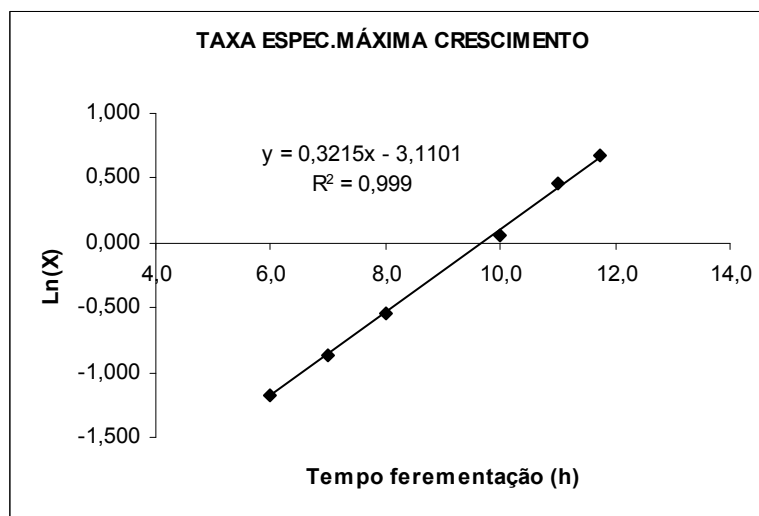


Figura C.3.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa especifica máxima de crescimento para o ensaio 3.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.3.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 3 de 0,457 g biomassa produzida / g glucose consumida.

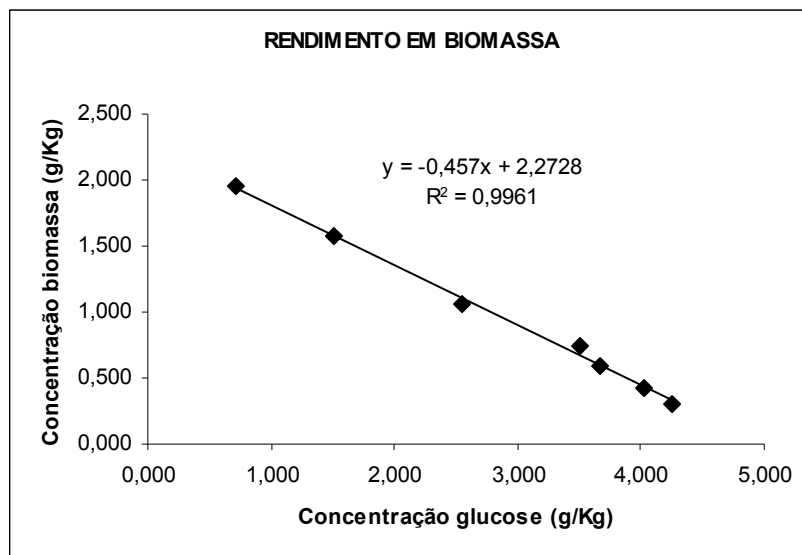


Figura C.3.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 3. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.3.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.3.2.

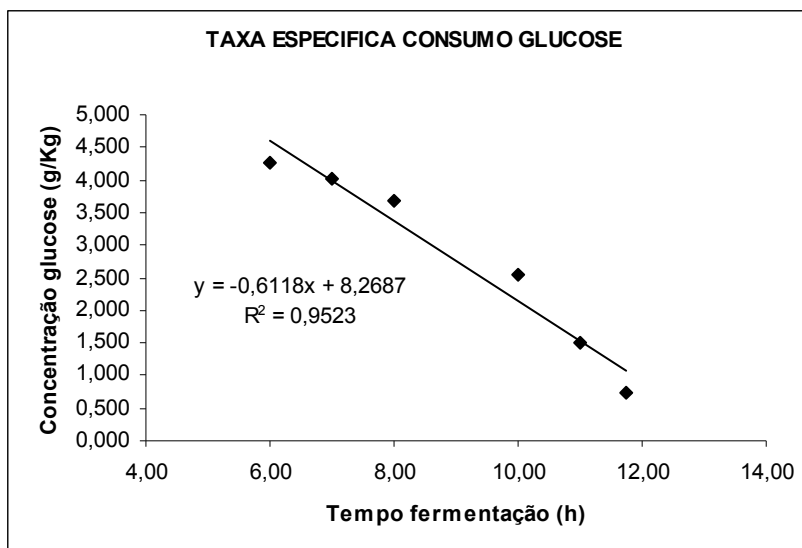


Figura C.3.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.3.5.

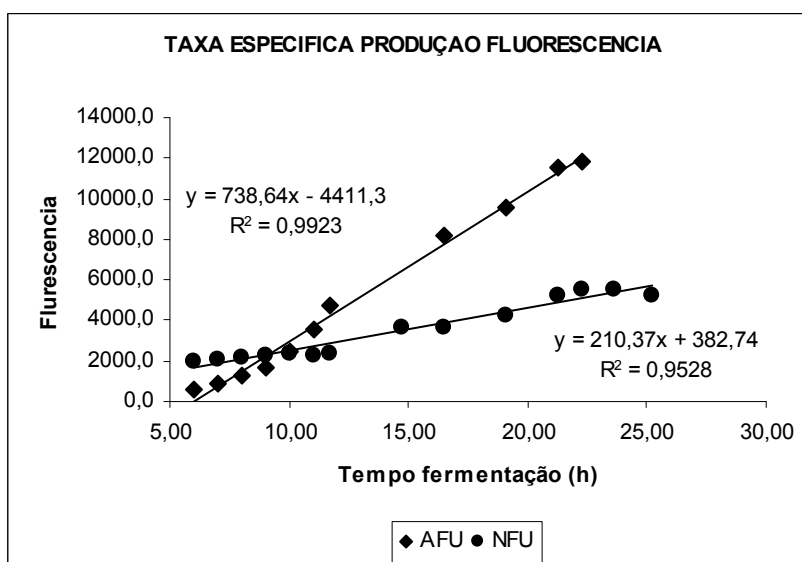


Figura C.3.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão.

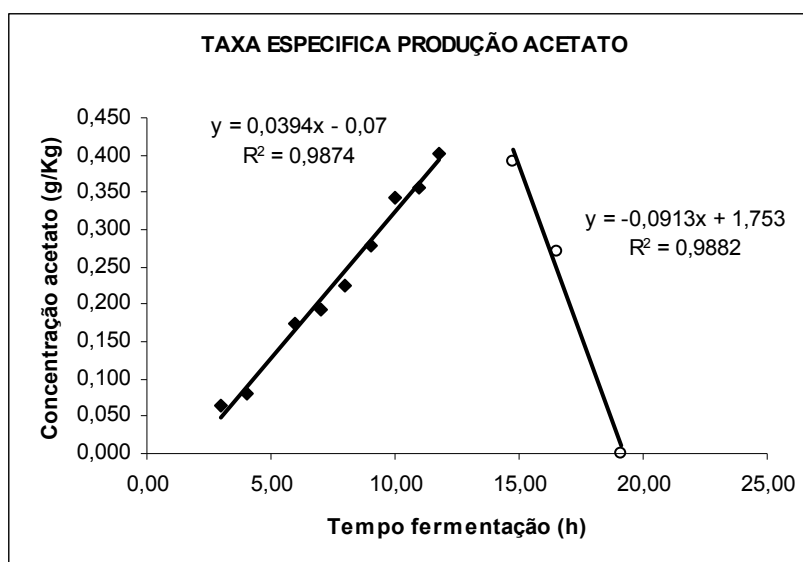


Figura C.3.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 3.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir do coeficiente angular das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente, representadas na figura C.3.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.3.2 vem descritos os valores de todas as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de produção e consumo de acetato.

Tabela C.3.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} ., rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 3.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,3215
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,457
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,313
X	(g/Kg)	1,958
dS/dt	(g/Kgh)	0,6118
qF	(AFU)	738,64
qF	(NFU)	210,37
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,020
X	(g/Kg)	1,958
dA/dt	(g/Kgh)	0,0394
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,041
X	(g/Kg)	2,250
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,0913

C.4 – Ensaio 4, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 4, vem descritos na tabela C.4.1 e representados gráficamente na figura C.4.1.

Na tabela C.4.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.4.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 4.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,066	5,036	0,00	54,4	826,0
2,0	0,090	4,937	0,07	81,4	900,7
3,0	0,095	4,920	0,08	2460,6	25770,5
4,0	0,108	4,797	0,09	5271,7	48972,2
6,3	0,161	4,570	0,15	12347,0	76600,1
7,0	0,177	4,363	0,18	14626,4	82746,3
8,0	0,221	4,224	0,22	17867,2	80896,6
9,0	0,256	3,875	0,25	21661,8	84551,7
10,0	0,324	3,760	0,33	27959,6	86259,4
11,0	0,396	3,453	0,40	33397,3	84443,3
14,7	0,899	0,687	0,76	-	-
16,7	1,268	0,000	0,84	-	-
19,3	1,168	0,000	1,16	37497,2	32097,7
22,0	1,020	0,000	0,93	42282,6	41459,1
24,0	1,003	0,000	1,10	43270,6	43126,5*
25,0	1,003	0,000	1,07	42951,1	42838,2

*Para o calculo da fluorescência normalizada foi considerado este valor. Houve mudança da sensibilidade no espectroflurímetro.

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.4.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.4.2.

A taxa especifica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 4, corresponde ao coeficiente angular da recta representada na figura C.4.2, sendo o seu valor de 0,2049 h⁻¹.

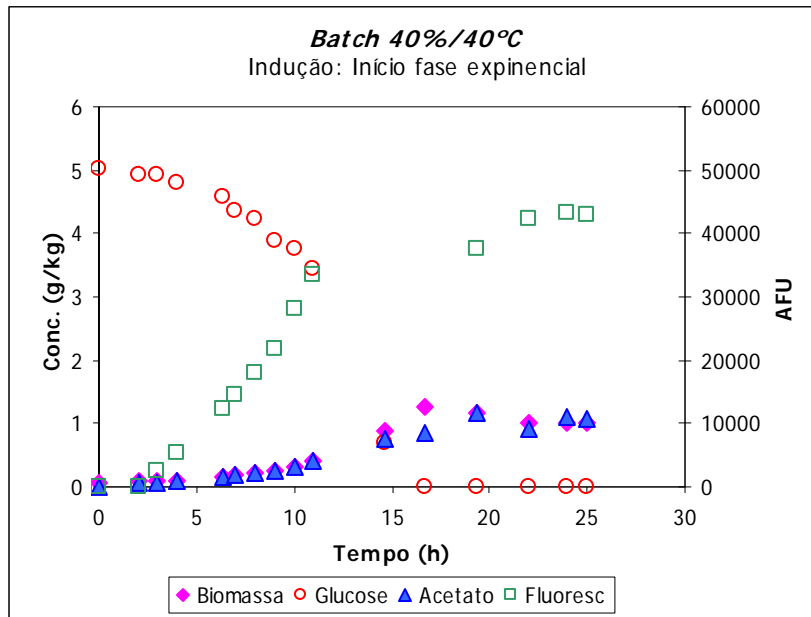


Figura C.4.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 4, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial de crescimento.

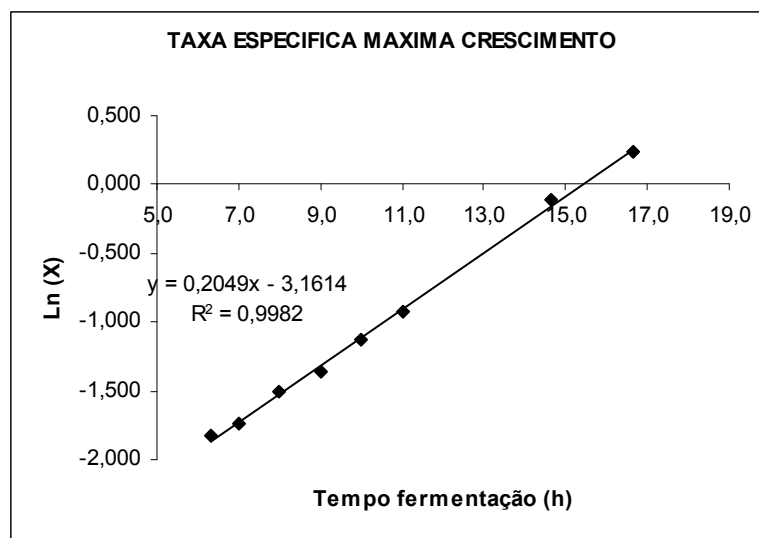


Figura C.4.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 4.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.4.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio de 0,1933 g biomassa produzida / g glucose consumida.

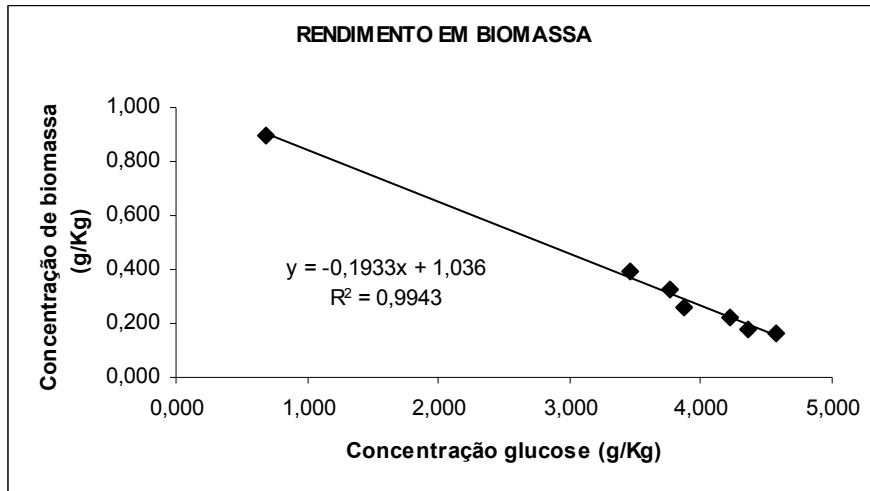


Figura C.4.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 4. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.4.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.4.2.

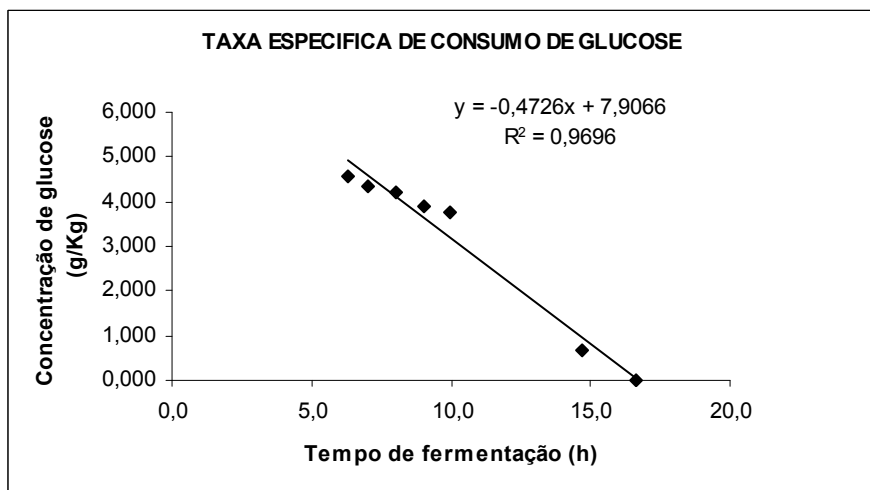


Figura C.4.4 – Determinação da taxa específica de consumo de substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/kg) ao longo do tempo de fermentação (h).

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.4.5.

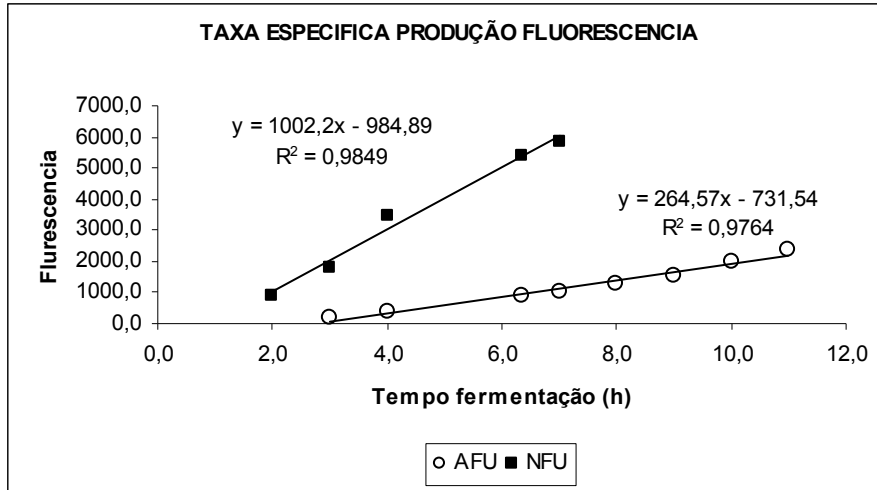


Figura C.4.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão.

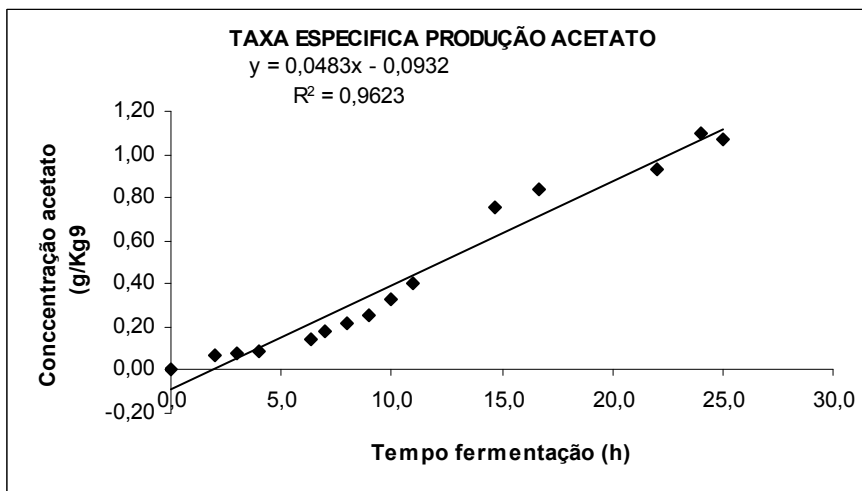


Figura C.4.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 4.

Para este ensaio não houve consumo de acetato durante a fermentação. A taxa específica de produção de acetato, foi calculada a partir do coeficiente angular da recta de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$, representada na figura C.4.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato.

Na tabela C.4.2 vem descritos os valores de todas as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.4.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_S$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($-q_A$), para o ensaio 4.

Respostas calculadas	Valores
μ_{max} (h ⁻¹)	0,2049
$\gamma_{X/S}$ (g/g)	0,1933
$(-q_S) = 1 / X * dS/dt$ (g/gh)	0,4726
X (g/Kg)	1,268
dS/dt (g/Kgh)	0,4726
qF (AFU)	264,57
qF (NFU)	1002,2
$q_A = 1 / X * dA/dt$ (g/gh)	0,038
X (g/Kg)	1,268
dA/dt (g/Kgh)	0,0483
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$ (g/gh)	0,0
X (g/Kg)	---
d(-A)/dt (g/Kgh)	---

C.5 – Ensaio 5, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU)

em função do tempo de fermentação, para o ensaio 5, vem descritos na tabela C.5.1 e representados graficamente na figura C.5.1.

Na tabela C.5.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.5.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 5.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU).	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,093	3,745	0,195		
1,6	0,117	2,894	0,232		
2,5	0,070	2,883	0,248	99,5	1420,679
4,0	0,241	2,480	0,407	502,3	2086,604
5,1	0,398	2,292	0,556	1429,8	3588,06
6,0	0,570	1,795	0,579	2569,6	4509,129
7,0	0,877	1,489	1,108	4612,6	5260,842
8,3	1,518	0,479	1,608	9195,5	6058,976
9,5	1,885	0,000	2,007	14956,3	7935,286
10,5	2,189	0,000	1,555	20350,5	9295,383
11,5	2,072	0,000	1,368	25409,8	12260,9
12,5	2,239	0,000	0,666	32445,0	14488,2
13,5	2,277	0,000	0,278	41750,5	18334,13
14,5	2,185	0,000	0,000	53029,0	24270,47
15,5	2,219	0,000	0,000	61187,0	27571,71
16,5	2,195	0,000	0,000	63710,0	29018,91
18,5	2,199	0,000	0,000	61951,3	28178,35
20,9	2,062	0,000	0,000	62428,8	30271,23
24,0	2,165	0,000	0,000	60755,0	28066,2
26,5	2,164	0,000	0,000	49610	22926,99

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.5.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.5.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 5, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.5.2.

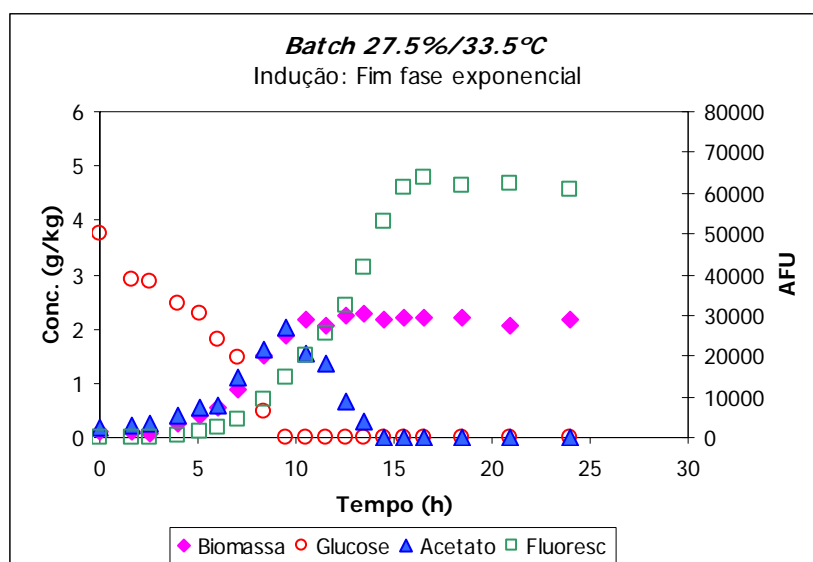


Figura C.5.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 5.

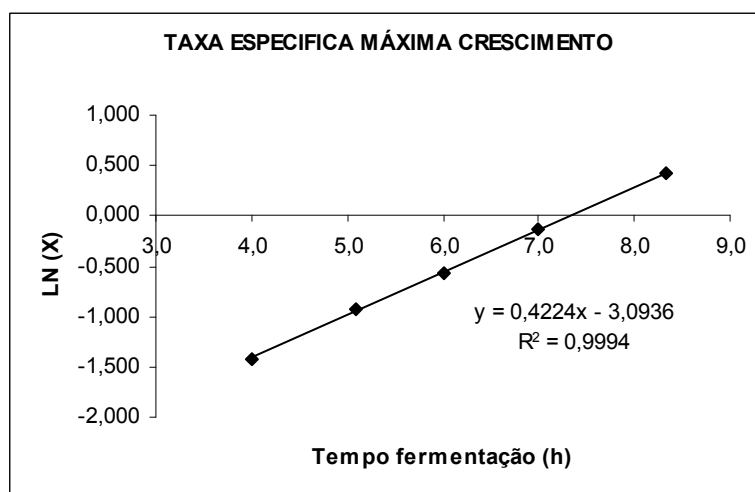


Figura C.5.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 5.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.5.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio de 0,6326 g biomassa produzida / g glucose consumida.

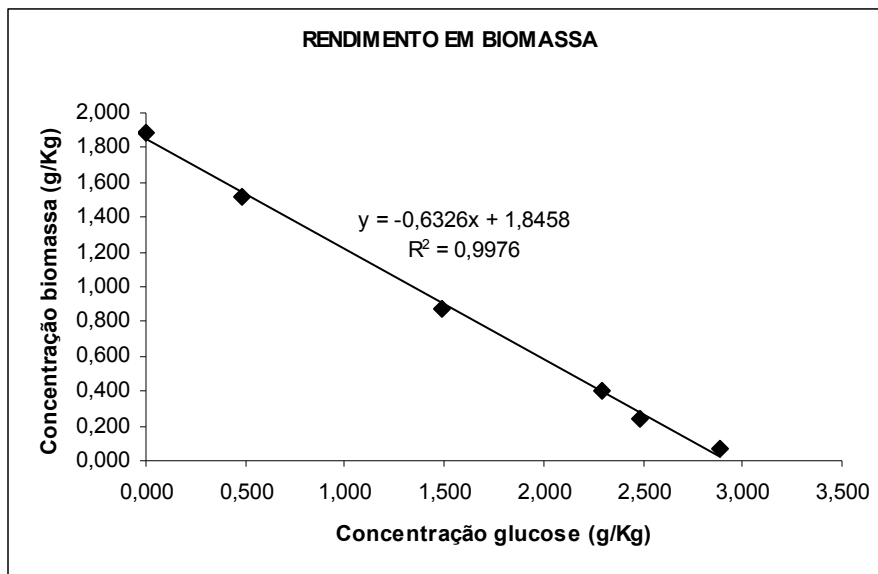


Figura C.5.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 5. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.5.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.5.2.

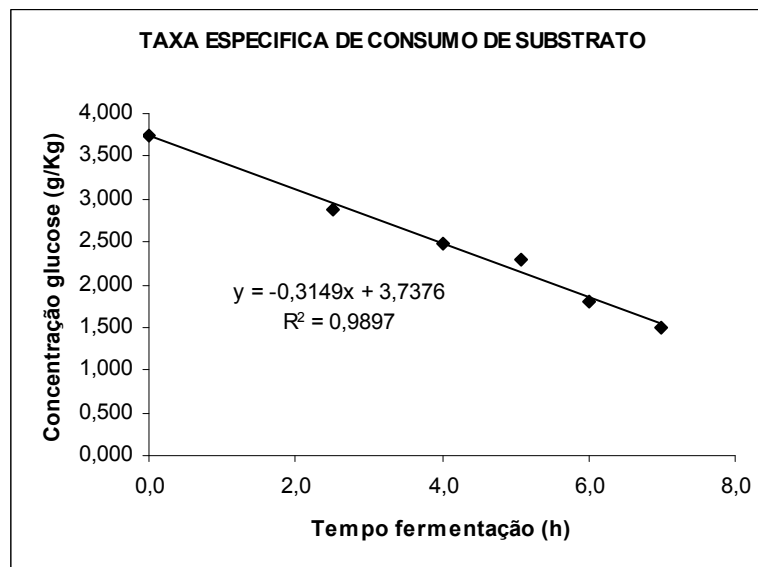


Figura C.5.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da

intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.5.5.

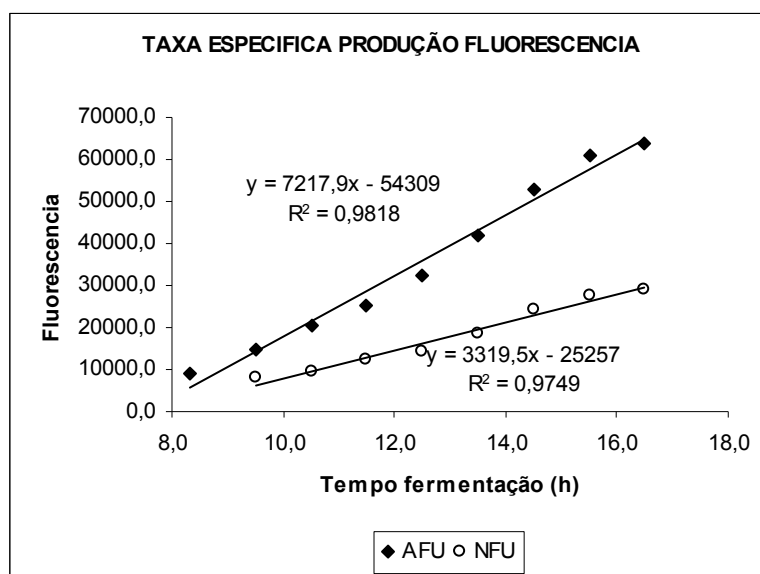


Figura C.5.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 5.

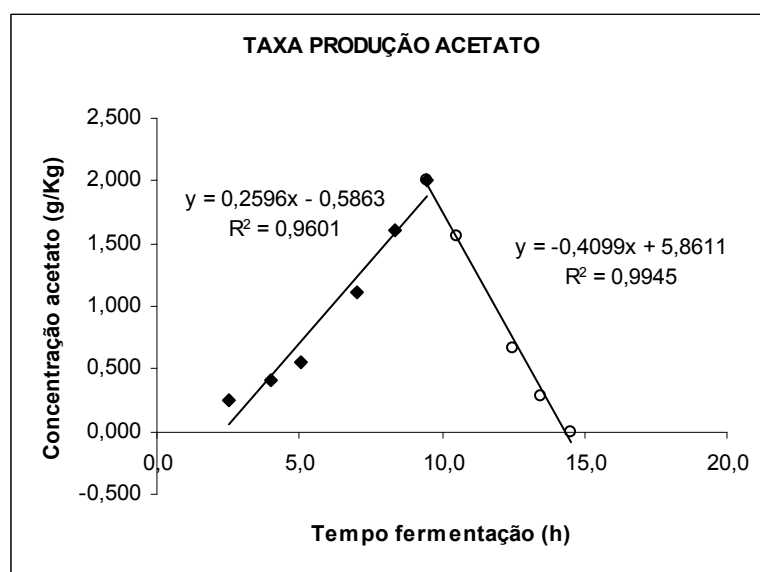


Figura C.5.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 5.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.5.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.5.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.5.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (q_F), taxa específica de produção de acetato (q_A), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 5.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,4224
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,6326
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,167
X	(g/Kg)	1,885
dS/dt	(g/Kgh)	0,3149
q_F	(AFU)	7217,9
q_F	(NFU)	3319,5
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,138
X	(g/Kg)	1,885
dA/dt	(g/Kgh)	0,2596
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,048
X	(g/Kg)	2,277
$d(-A)/dt$	(g/Kgh)	0,1099

C.6 – Ensaio 6, com indução da produção de proteína no início da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 6, vem descritos na tabela C.6.1 e representados graficamente na figura C.6.1.

Na tabela C.6.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.6.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 6.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU).	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,1	0,074	4,021	0,210	0,0	
2,1	0,137	4,168	0,380	0,0	
3,4	0,207	3,586	0,549	394,0	1905,912
4,5	0,318	3,808	0,634	1117,6	3514,275
5,4	0,482	3,393	0,861	2079,6	4314,719
6,4	0,744	2,728	1,303	3627,9	4877,21
7,5	1,199	1,612	1,915	6316,1	5267,836
8,4	1,713	0,309	2,407	10223,8	5969,468
9,4	1,890	0,000	2,557	14148,3	7483,905
11,4	2,072	0,000	1,647	25711,8	12409,26
12,5	2,123	0,000	0,911	36621,5	17246,67
13,5	2,088	0,000	0,181	46904,5	22461,25
14,5	2,149	0,000	0,000	55882,5	26005,36
15,5	2,098	0,000	0,000	62943,5	30002,98
16,3	2,165	0,000	0,000	67311,0	31088,47
19,8	1,956	0,000	0,000	59033,5	30188,01
22,3	1,931	0,000	0,000	59870,5	30999,16
26,4	1,890	0,000	0,000	53069,0	28071,55
28,5	1,810	0,000	0,000	53485,5	29556

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.6.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.6.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 6, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.6.2.

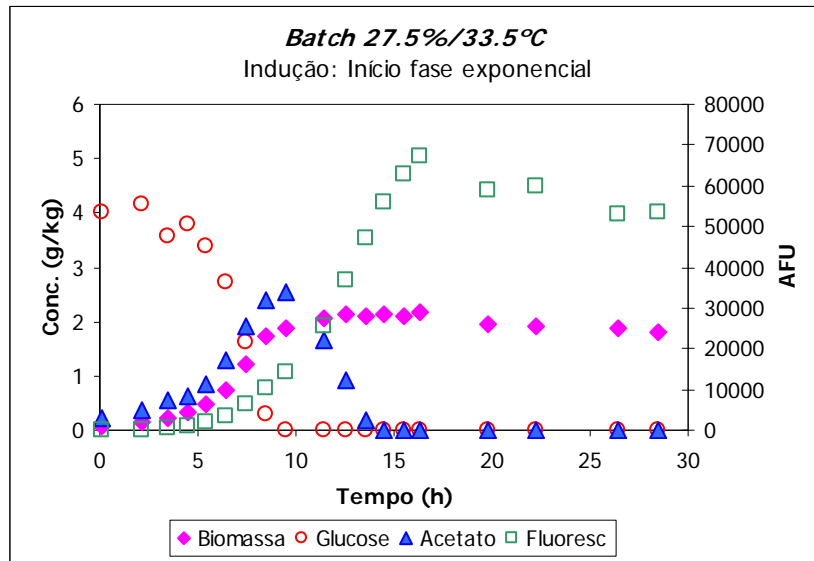


Figura C.6.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 6.

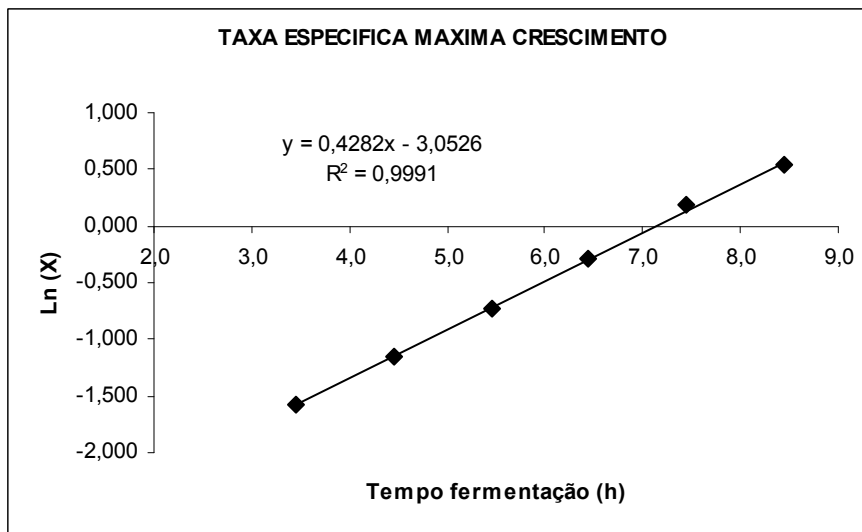


Figura C.6.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 6.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.6.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 6 de 0,4106 g biomassa produzida / g glucose consumida.

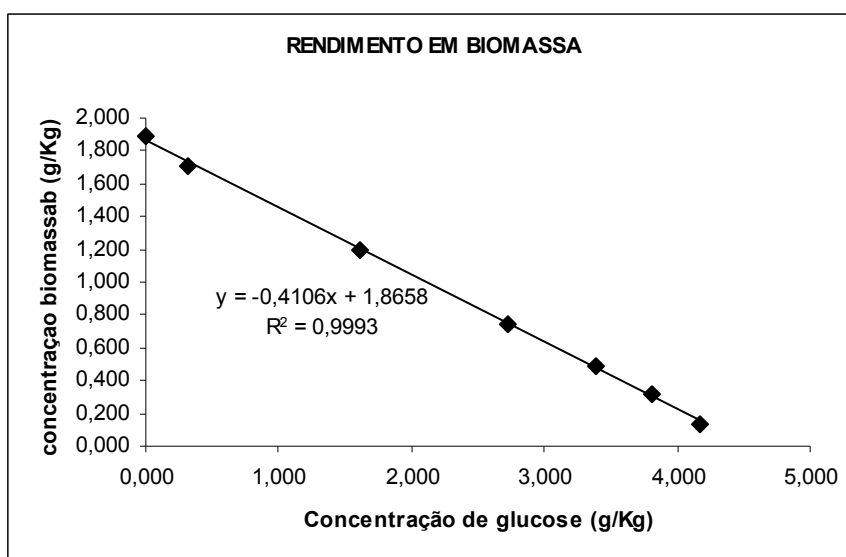


Figura C.6.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 6. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.6.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.6.2.

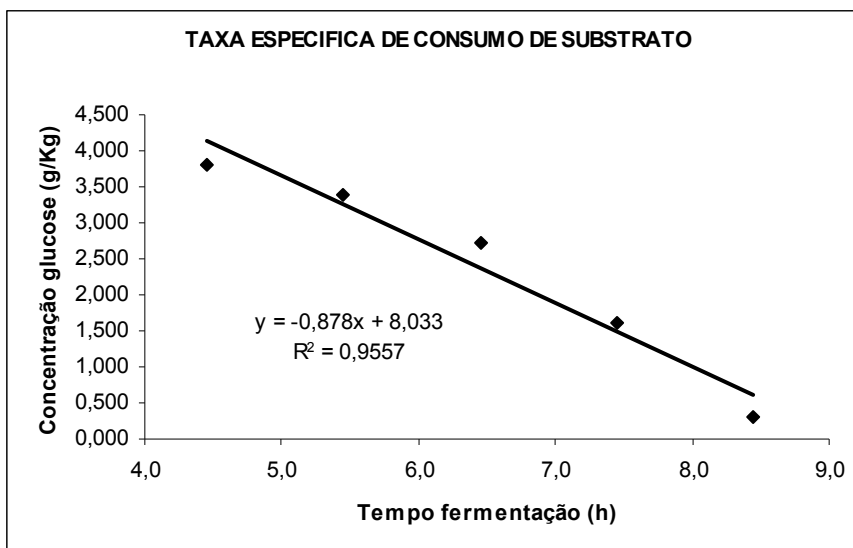


Figura C.6.4 – Determinação da taxa específica de consumo da substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 6

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.6.5.

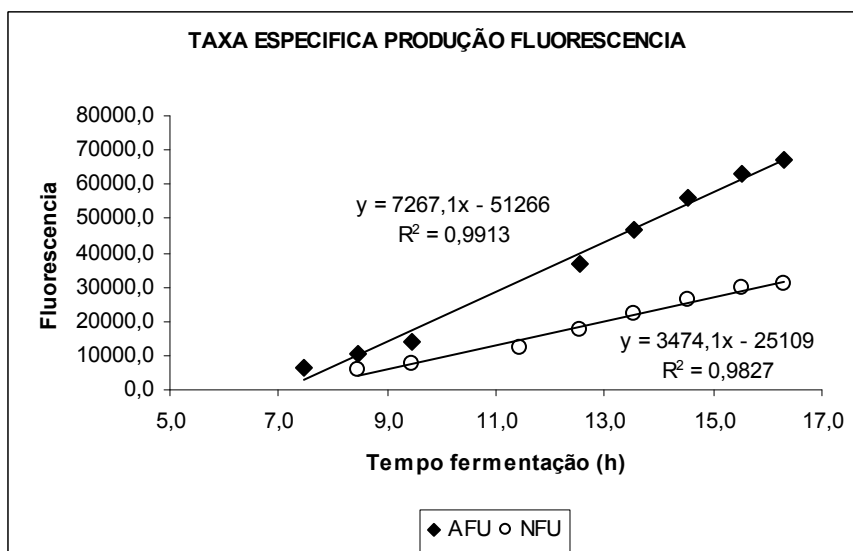


Figura C.6.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 6.

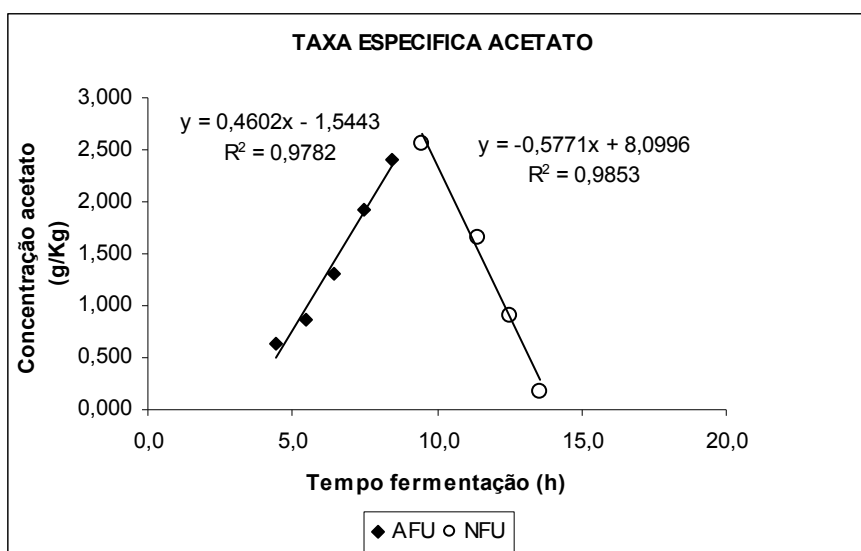


Figura C.6.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 6.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.6.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.6.2 vem descritos os valores de todas as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.6.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} ., rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 6.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,4282
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,4106
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,464
X	(g/Kg)	1,890
dS/dt	(g/Kgh)	0,878
qF	(AFU)	7267,1
qF	(NFU)	3474,1
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,243
X	(g/Kg)	1,890
dA/dt	(g/Kgh)	0,4602
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,267
X	(g/Kg)	2,165
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,5771

Na tabela C.3 vem descritas todas as respostas obtidas para o segundo planeamento factorial 2^2 , com repetição no ponto central, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial de crescimento.

Tabela C.3: Valores obtidos para a taxa específica máxima de crescimento μ (h⁻¹), rendimento em biomassa Y_{x/s} (g biomassa / g glucose), taxa específica de consumo de glucose (-q_S) (g glucose/ g biomassa * h), taxa específica de produção de fluorescência q_F(AFU / h), taxa específica de produção de fluorescência normalizada q_F(NFU / h), taxa específica de produção de acetato (-q_A) (g acetato / g biomassa *h), taxa específica de consumo da acetato (q_A) (g acetato / g biomassa * h), no planeamento factorial 2^2 , para indução da produção de GFP no meio da fase exponencial.

Ensaio	Variáveis		Respostas						
	T (°C)	O ₂ dissolvido (%)	μ (h ⁻¹)	Y _{x/s} (g/g)	(-q _S) (g/gh)	F (AFU)	f (NFU)	(-q _A) (g/gh)	(q _A) (g/gh)
1	-1	-1	0,263	0,304	0,245	6515	3284	0,176	0,162
2	+1	-1	0,345	0,231	0,324	52052	33130	0,163	0,057
3	-1	+1	0,308	0,410	0,393	6927	2897	0,020	0,028
4	+1	+1	0,333	0,323	0,444	59154	35689	0,079	0,040
5	0	0	0,442	0,379	0,395	64324	30496	0,036	0,063
6	0	0	0,377	0,398	0,369	76830	36120	0,070	0,069

C.7 – Ensaio 1, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 1, vem descritos na tabela C.7.1 e representados graficamente na figura C.7.1.

Na tabela C.7.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.7.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 1

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,071	5,5	0,332	0,0	
2,0	0,097	3,9	0,388	0,0	
4,1	0,147	5,3	0,456	0,0	
6,3	0,261	4,9	0,559	115,6	442,4438
7,8	0,387	4,3	1,154	135,4	349,7743
10,1	0,607	3,8	1,327	188,1	309,8223
11,3	0,942	2,8	1,794	246,9	262,0549
12,3	1,284	1,9	3,125	450,5	350,7931
13,3	1,703	0,0	3,533	1084,0	636,4165
14,3	1,675	0,0	2,292	1683,6	1005,052
15,3	1,738	0,0	1,914	2250,8	1294,693
16,4	1,716	0,0	1,575	2568,9	1496,603
19,2	1,971	0,0	0,462	4168,3	2114,416
21,2	2,032	0,0	0,121	6072,5	2987,801
23,0	1,984	0,0	0,121	6514,6	3284,156
25,3	1,903	0,0	0,174	5946,3	3125,008
28,8	1,675	0,0	0,000	5261,3	3141,564

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.7.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.7.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 1, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.7.2.

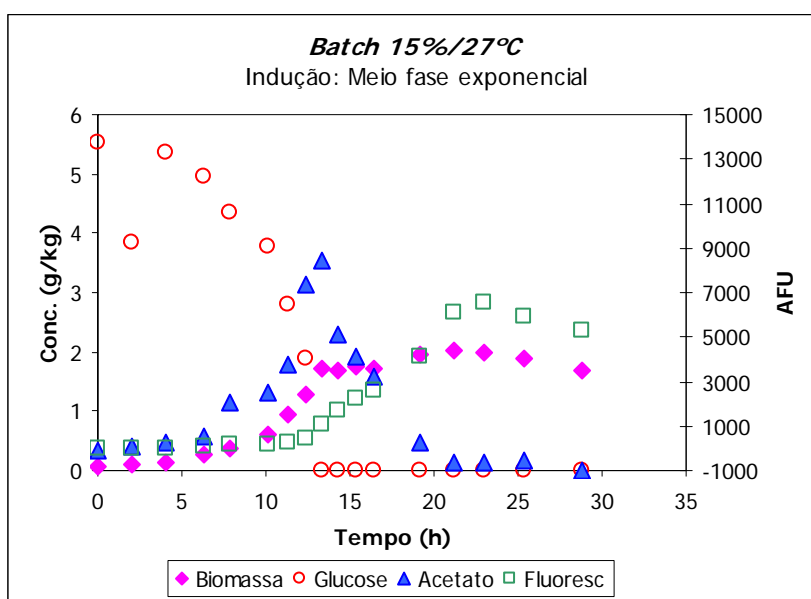


Figura C.7.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 1.

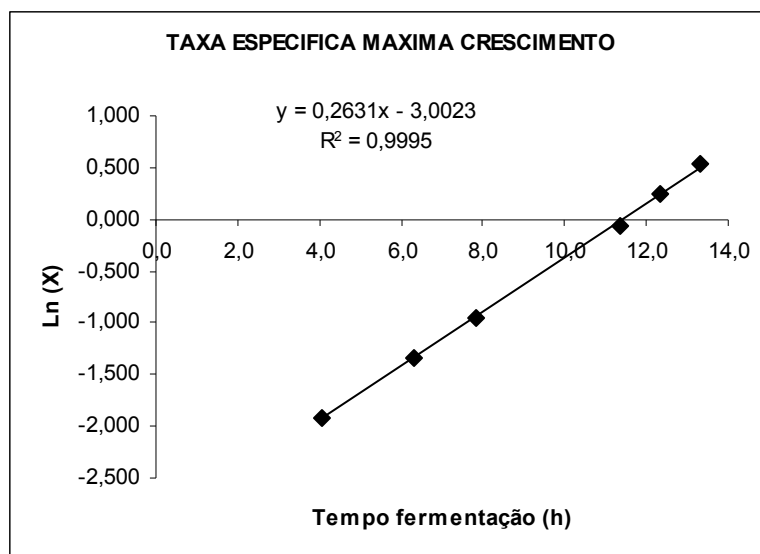


Figura C.7.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 1.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado na figura C.7.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 1 de 0,3036 g biomassa produzida / g glucose consumida.

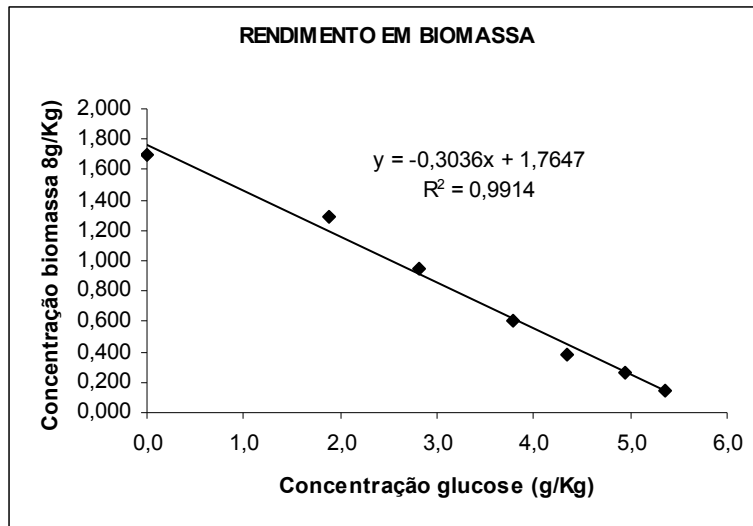


Figura C.7.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 1. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.7.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.7.2.

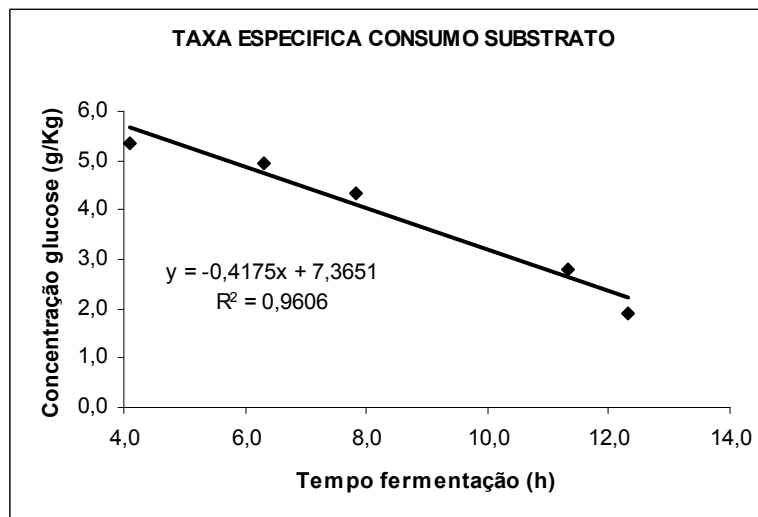


Figura C.7.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 1

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da

intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.7.5.

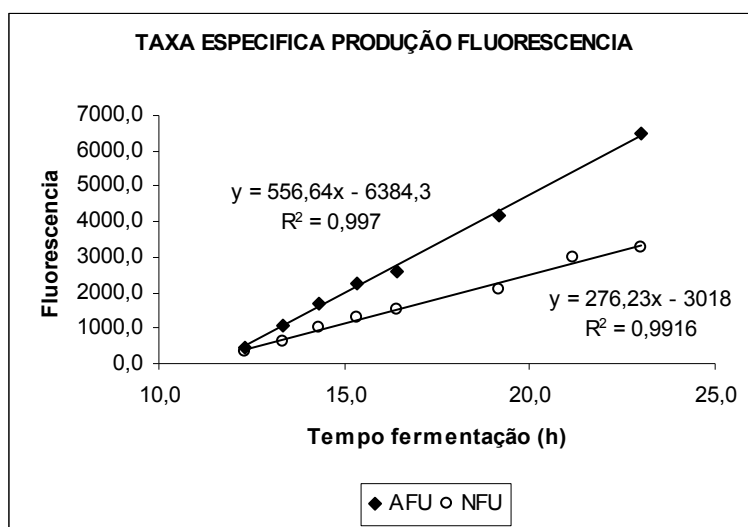


Figura C.7.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 1.

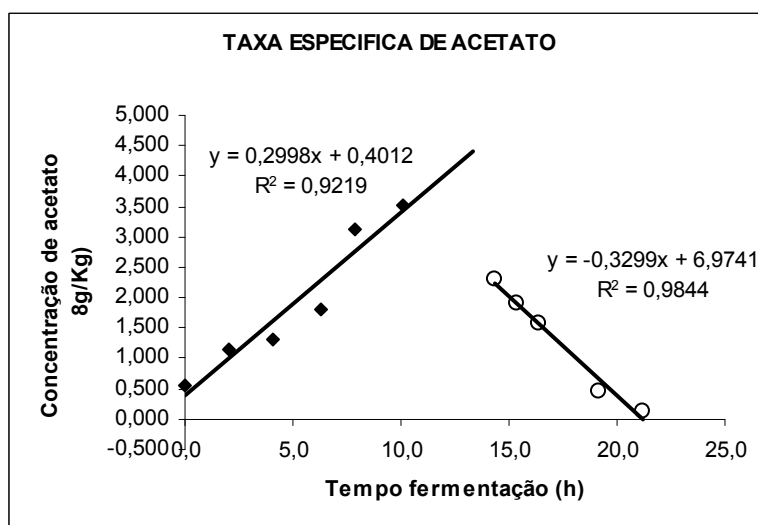


Figura C.7.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 1.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.7.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da

produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.7.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.7.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose (-qs), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ((-qA)), para o ensaio 1.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,2631
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,3036
$(-qs) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,245
X	(g/Kg)	1,703
dS/dt	(g/Kgh)	0,4175
qF	(AFU)	556,64
qF	(NFU)	276,23
$qA = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,176
X	(g/Kg)	1,703
dA/dt	(g/Kgh)	0,2998
$(-qA) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,162
X	(g/Kg)	2,032
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,3299

C.8 – Ensaio 2, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 2, vem descritos na tabela C.8.1 e representados graficamente na figura C.8.1.

Na tabela C.8.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.8.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 2.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,2	0,064	6,302	0,093	38,5	605,9
2,2	0,149	5,990	0,164	67,7	454,7
5,0	0,327	3,888	0,305	109,9	
6,5	0,541	4,467	0,650	165,1	305,3
7,5	0,792	3,040	0,849	183,8	231,9
8,0	1,006	2,299	1,020	242,1	240,5
9,1	1,537	0,000	1,322	1853,3	1205,8
10,0	1,593	0,000	1,606	4940,8	3100,7
11,0	1,584	0,000	1,164	13478,6	8508,2
12,0	1,587	0,000	1,421	26986,8	17002,0
14,5	1,412	0,000	1,120	40524,0	28701,0
15,7	1,456	0,000	0,813	42167,5	28963,6
17,7	1,446	0,000	0,715	44223,5	30578,9
19,7	1,500	0,000	0,812	46626,0	31078,5
21,7	1,576	0,000	0,538	50660,0	32138,8
23,7	1,539	0,000	0,311	51112,5	33203,4
25,7	1,566	0,000	0,169	52235,5	33361,5

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.8.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.8.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 2, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.8.2.

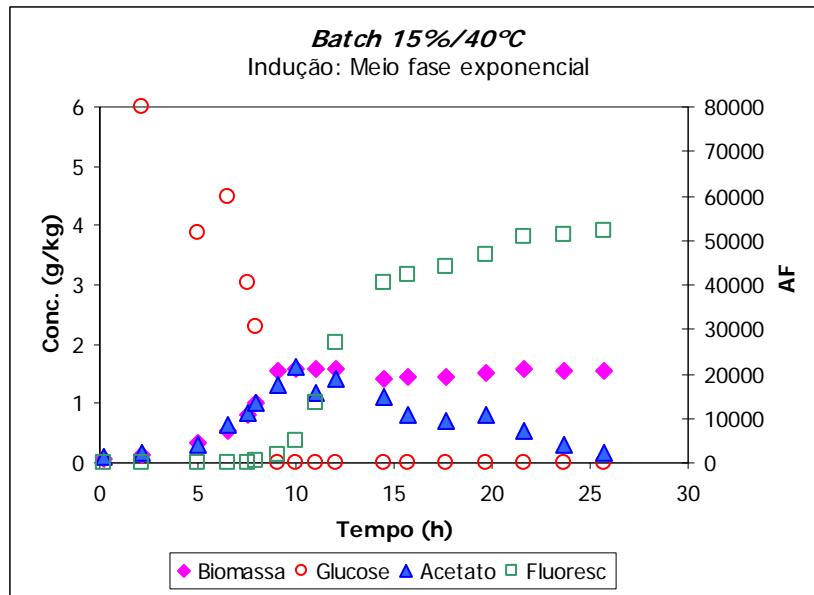


Figura C.8.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 2.

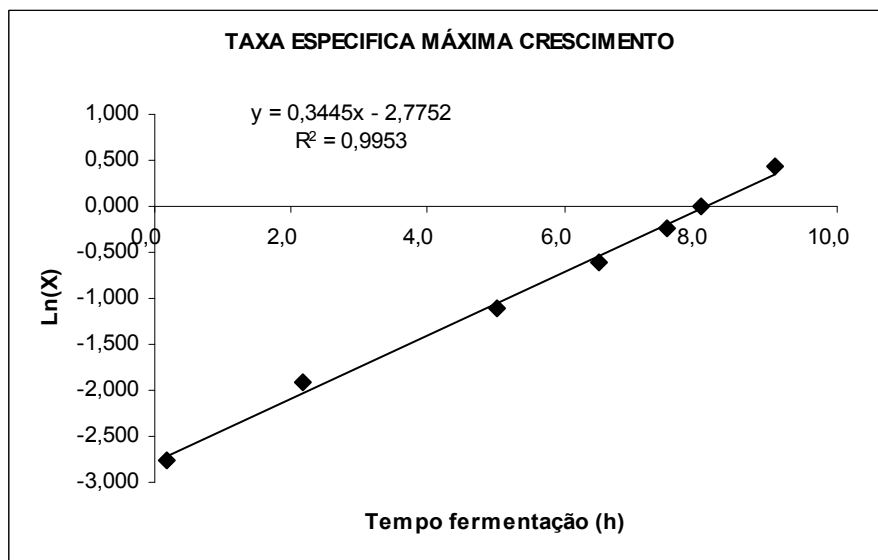


Figura C.8.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 2.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.8.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 2 de 0,2311 g biomassa produzida / g glucose consumida.

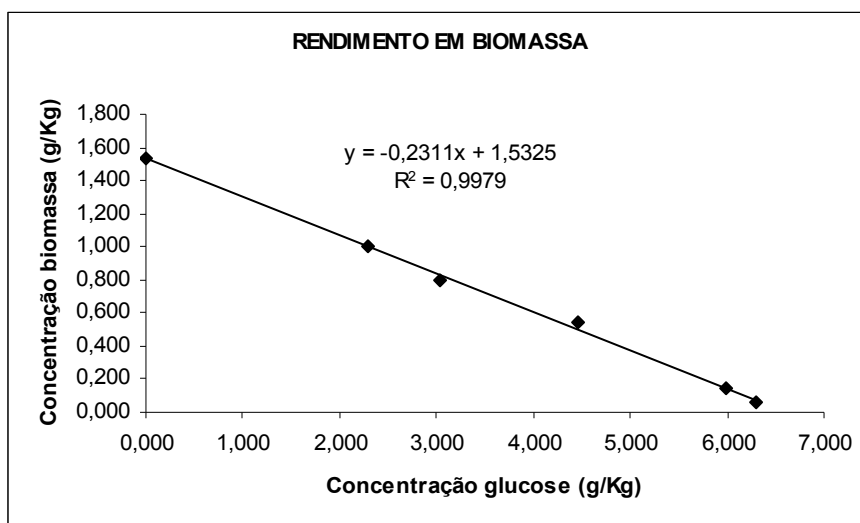


Figura C.8.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 2. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.8.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.8.2.

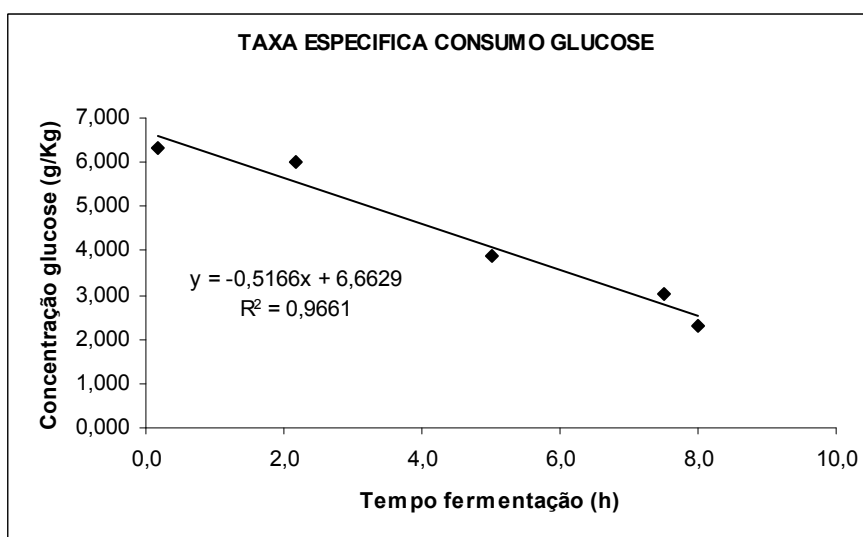


Figura C.8.4 – Determinação da taxa específica de consumo da substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 2

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.8.5.

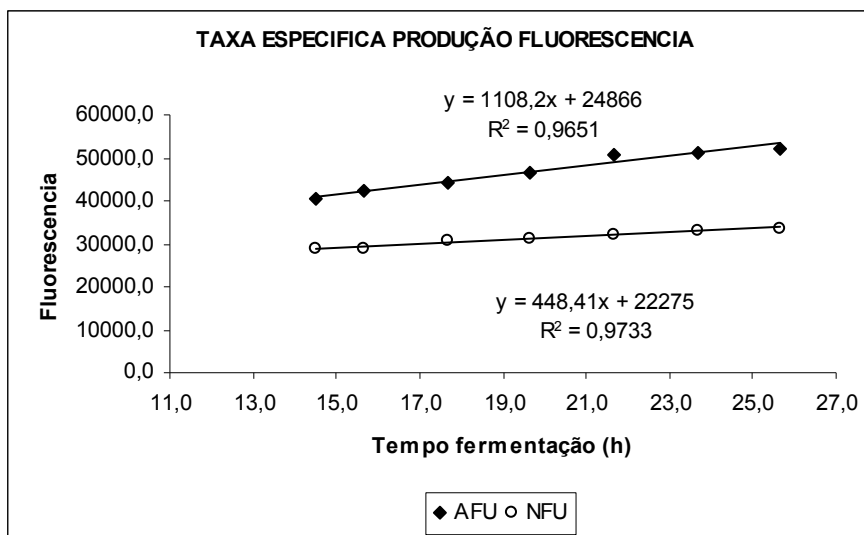


Figura C.8.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 2.

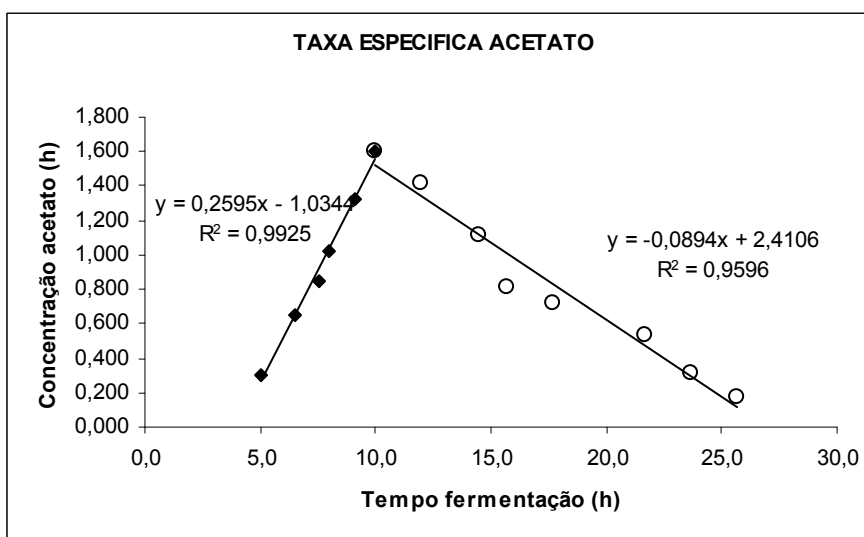


Figura C.8.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 2.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.8.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.8.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.8.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (q_F), taxa específica de produção de acetato (q_A), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 2.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,3445
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,2311
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,324
X	(g/Kg)	1,593
dS/dt	(g/Kgh)	0,5266
q_F	(AFU)	1108,2
q_F	(NFU)	448,41
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,163
X	(g/Kg)	1,576
dA/dt	(g/Kgh)	0,0894
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,057
X	(g/Kg)	1,576
$d(-A)/dt$	(g/Kgh)	0,0894

C.9 – Ensaio 3, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 3, vem descritos na tabela C.9.1 e representados graficamente na figura C.9.1.

Na tabela C.9.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.9.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 3.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
1,8	0,084	6,331	0,068		
3,7	0,129	6,796	0,089		
5,7	0,192	5,649	0,105		
7,7	0,346	6,158	0,168		
8,7	0,412	6,454	0,228		
10,7	0,723	4,255	0,308		
11,2	0,864	3,978	0,312	235,8	272,8776
11,4	0,929	3,805	0,376	251,3	270,5626
12,4	1,293	2,827	0,461	734,7	568,0495
13,4	1,758	2,009	0,451	1800,6	1024,12
14,4	2,370	0,412	0,521	3252,9	1372,31
15,4	2,412	0,000	0,442	4566,6	1893,207
16,4	2,467	0,000	0,313	5558,5	2252,702
20,0	2,388	0,000	0,088	6178,4	2587,322
21,8	2,391	0,000	0,000	6927,4	2896,717
24,7	2,122	0,000	0,000	6077,0	2863,703
27,9	2,108	0,000	0,000	5400,0	2561,651

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.9.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.9.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 3, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.9.2.

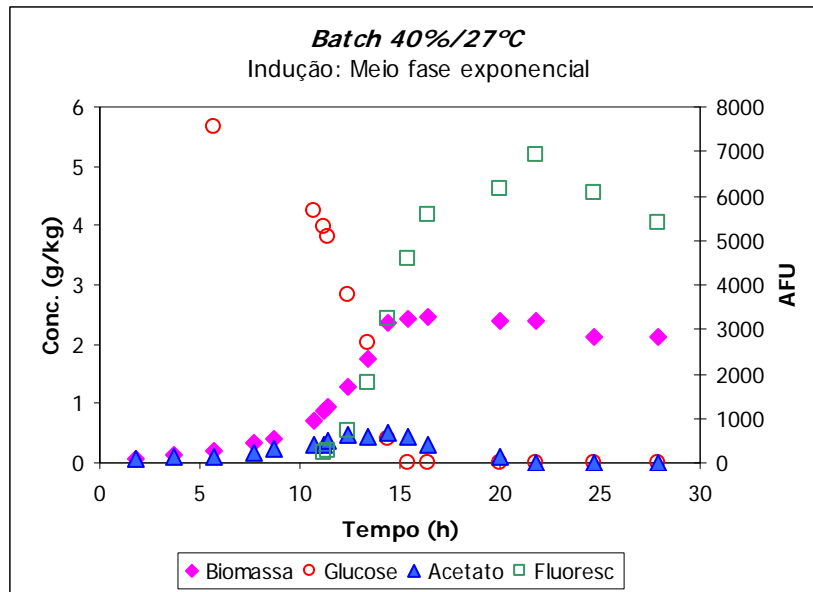


Figura C.9.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 3.

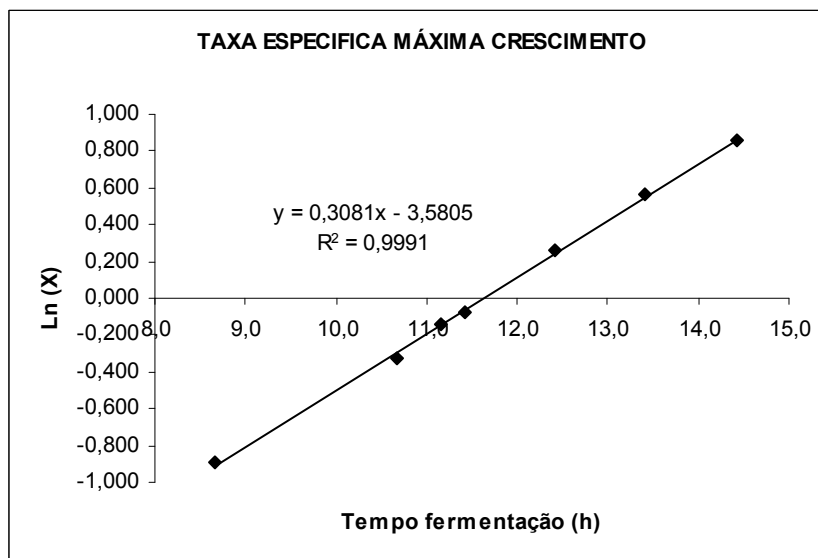


Figura C.9.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 3.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.9.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 3 de 0,4099 g biomassa produzida / g glucose consumida.

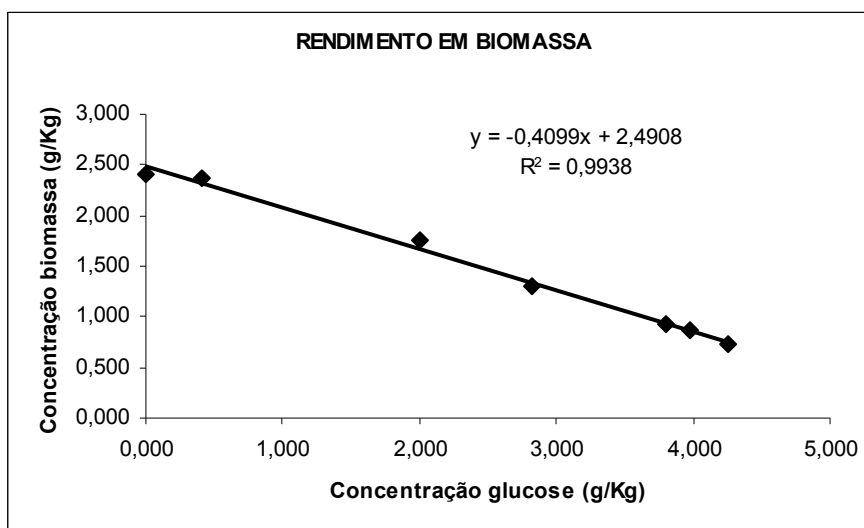


Figura C.9.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 3. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.9.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.9.2.

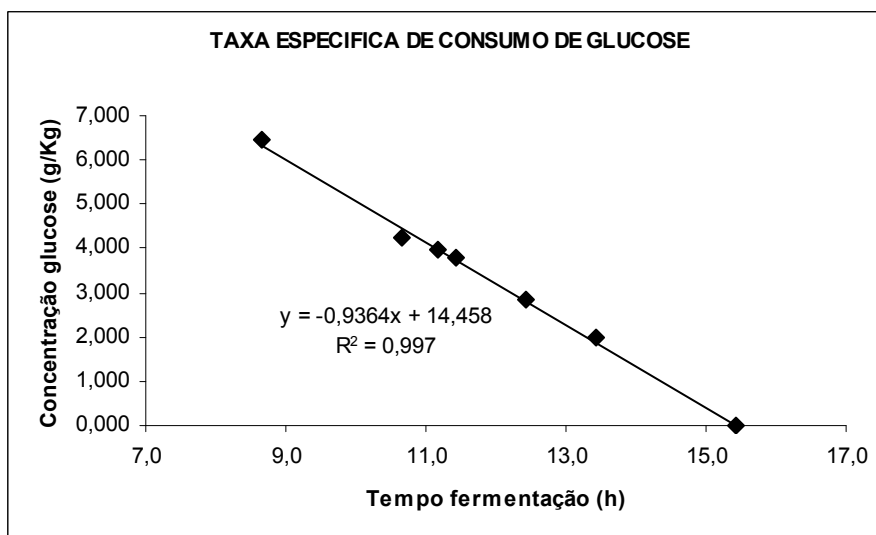


Figura C.9.4 – Determinação da taxa específica de consumo da substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 3

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(NT)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.9.5.

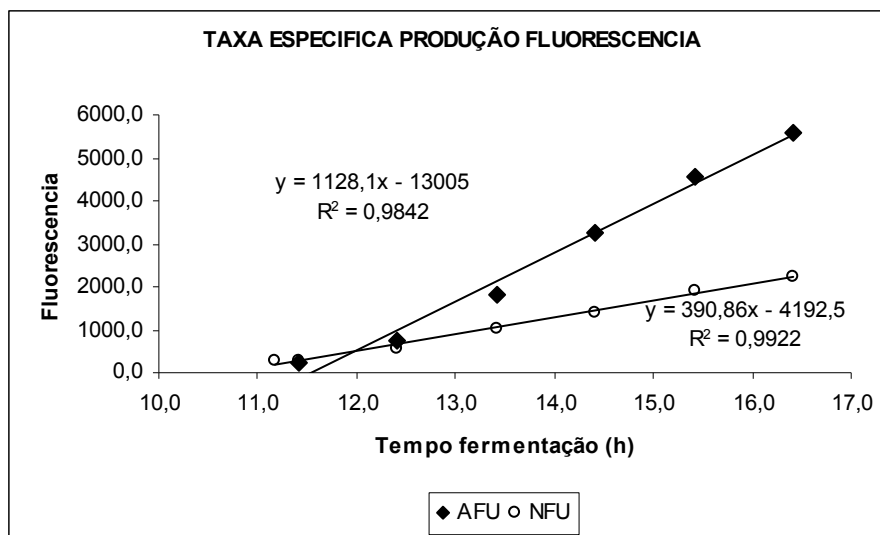


Figura C.9.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 3.

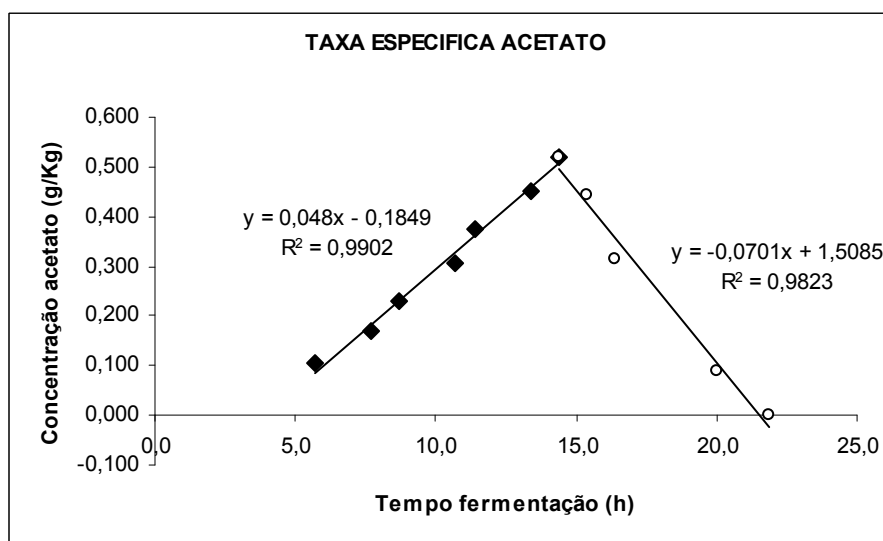


Figura C.9.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 3.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.9.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.9.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.9.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($(-qA)$), para o ensaio 3.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,3081
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,4099
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,393
X	(g/Kg)	2,467
dS/dt	(g/Kgh)	0,9364
qF	(AFU)	1128,1
qF	(NFU)	390,86
$qA = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,020
X	(g/Kg)	2,370
dA/dt	(g/Kgh)	0,048
$(-qA) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,028
X	(g/Kg)	2,467
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,0701

C.10 – Ensaio 4, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 4, vem descritos na tabela C.10.1 e representados graficamente na figura C.10.1.

Na tabela C.10.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.10.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 4.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,064	2,958	0,000	42,9	669,1
2,3	0,120	4,615	0,124	65,3	545,3
4,0	0,093	4,714	0,179	75,6	815,1
6,0	0,381	4,208	0,307	160,4	421,6
8,0	0,747	3,149	0,601	283,4	379,2
8,5	0,922	1,960	0,586	322,7	350,0
9,6	1,362	0,892	1,040	2958,0	2171,6
10,6	1,685	0,000	1,197	9618,6	5709,0
12,1	1,551	0,000	1,100	28142,8	18142,1
13,1	1,595	0,000	0,947	33221,0	20825,8
15,1	1,582	0,000	0,885	48932,5	30930,8
17,7	1,635	0,000	0,651	57709,0	35292,3
19,4	1,524	0,000	0,504	51621,3	33882,1
21,4	1,513	0,000	0,485	52183,8	34500,1
23,4	1,615	0,000	0,354	58912,5	36479,3
25,4	1,648	0,000	0,176	59437,5	36068,3

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.10.1), foi representada gráficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.10.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 4, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.10.2.

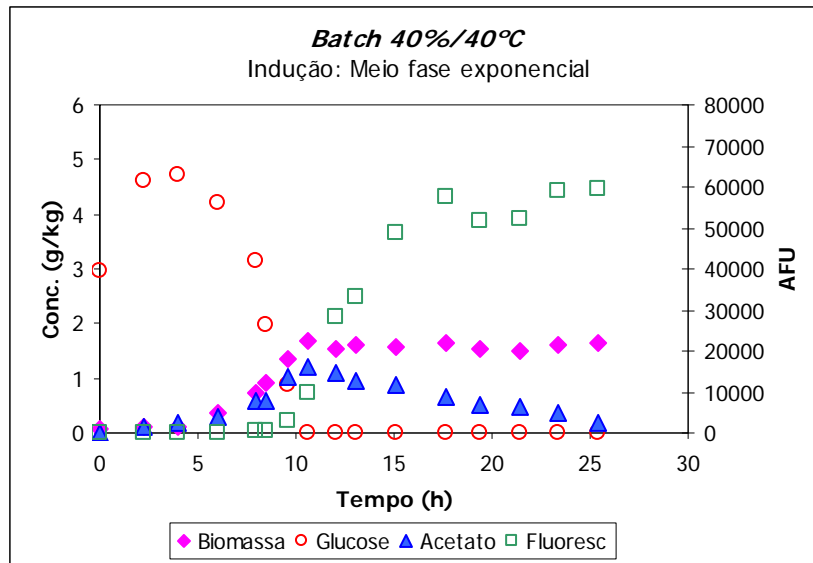


Figura C.10.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 4.

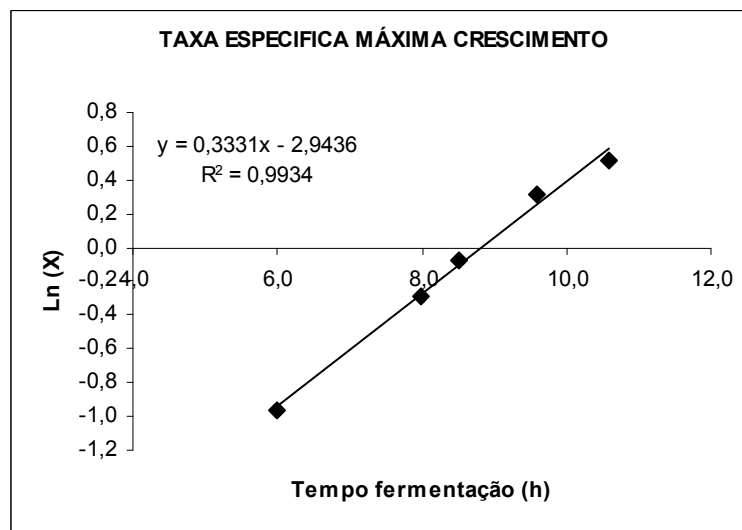


Figura C.10.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa (Ln(X)) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 4.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.10.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 4 de 0,3225 g biomassa produzida / g glucose consumida.

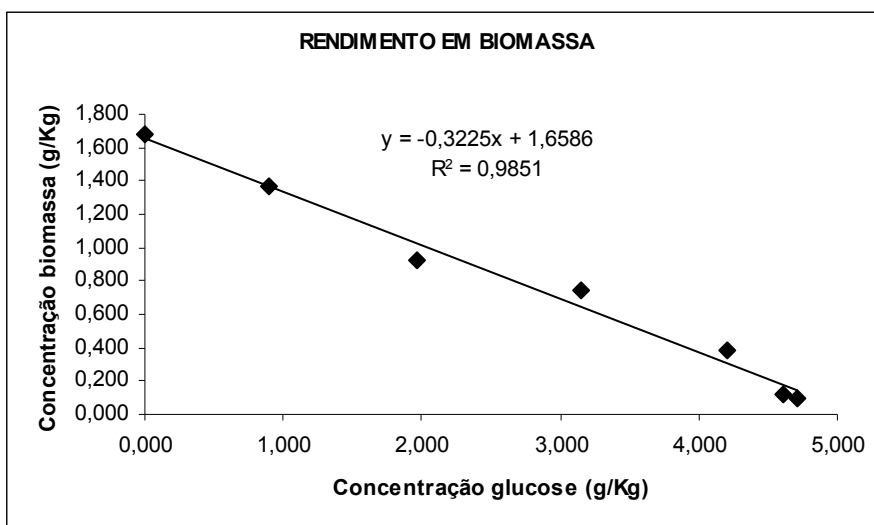


Figura C.10.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 4. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.10.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.10.2.

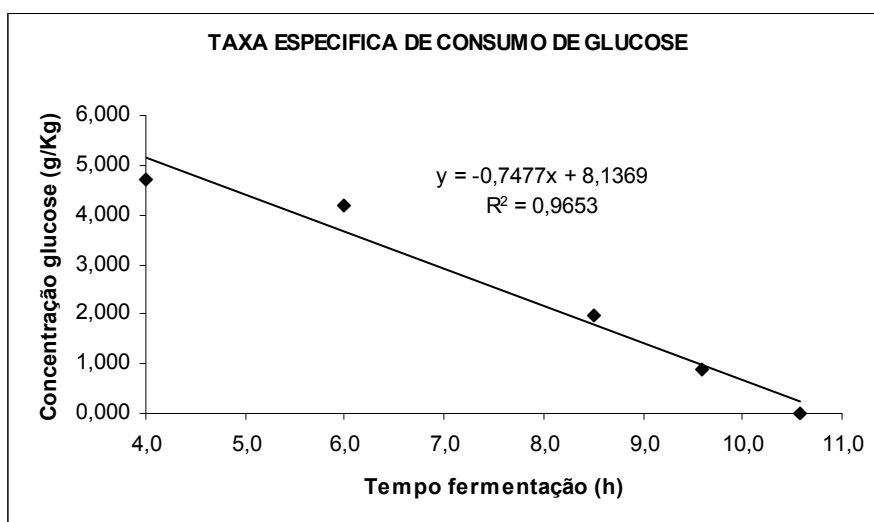


Figura C.10.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 4

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.10.5.

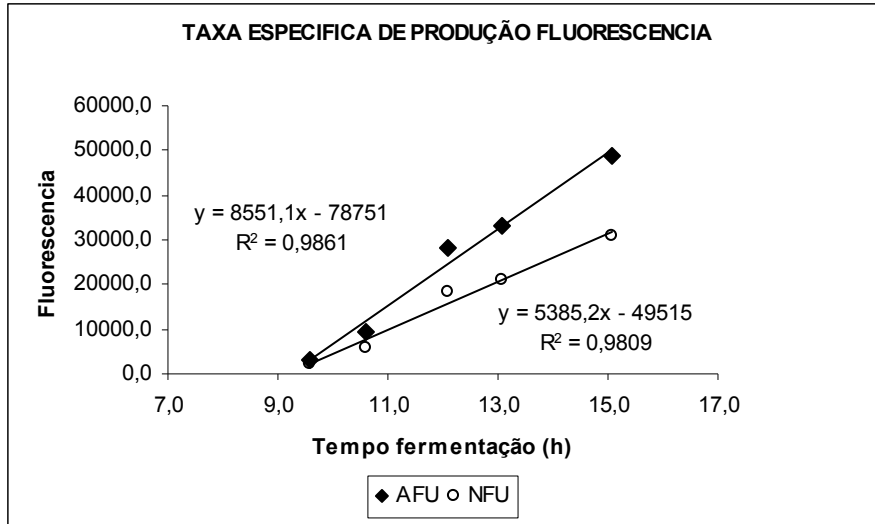


Figura C.10.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respective rectas de regressão, para o ensaio 4.

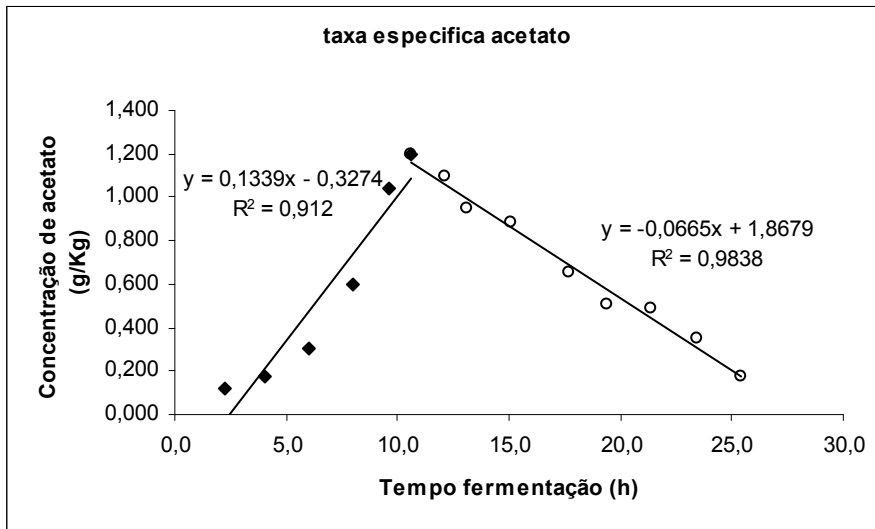


Figura C.10.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 4.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.10.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.10.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.10.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (q_F), taxa específica de produção de acetato (q_A), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 4.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,3331
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,3225
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,444
X	(g/Kg)	1,685
dS/dt	(g/Kgh)	0,7477
q_F	(AFU)	8551,1
q_F	(NFU)	5385,2
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,079
X	(g/Kg)	1,685
dA/dt	(g/Kgh)	0,1339
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,040
X	(g/Kg)	1,648
$d(-A)/dt$	(g/Kgh)	0,0665

C.11 – Ensaio 5, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 5, vem descritos na tabela C.11.1 e representados graficamente na figura C.11.1.

Na tabela C.11.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.11.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 5.

Tempo (h)	[Biomassa] (g/Kg)	[Glucose] (g/Kg)	F (AFU)	f (NFU)
0,0	0,100	3,567	30,3	304,2
2,0	0,155	5,084	43,2	279,5
4,0	0,312	3,773	61,6	197,5
6,0	0,723	2,388	111,0	153,4
6,5	0,938	2,310	-	-
7,0	1,148	2,107	835,3	727,7
8,0	1,829	0,534	5661,4	3096,1
9,0	1,899	0,000	10252,0	5399,1
10,0	1,858	0,000	14781,5	7953,8
11,0	1,911	0,000	10138,0	5305,9
12,0	1,978	0,000	26064,8	13180,7
13,0	1,989	0,000	34461,5	17326,7
14,0	2,027	0,000	41017,5	20234,0
15,0	2,080	0,000	52753,0	25358,0
18,1	2,018	0,000	61227,5	30341,7
19,0	2,010	0,000	60035,0	29861,3
20,0	2,102	0,000	64435,0	30649,7
21,0	2,076	0,000	59601,3	28704,5
23,0	1,978	0,000	55647,5	28127,8
26,0	1,964	0,000	43937,5	22367,8

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.11.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.11.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 5, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.11.2.

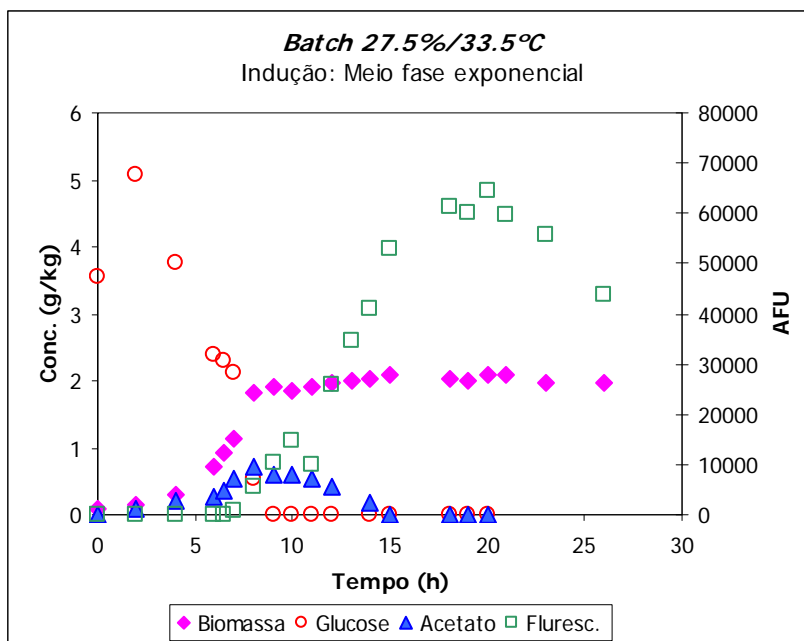


Figura C.11.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 5.

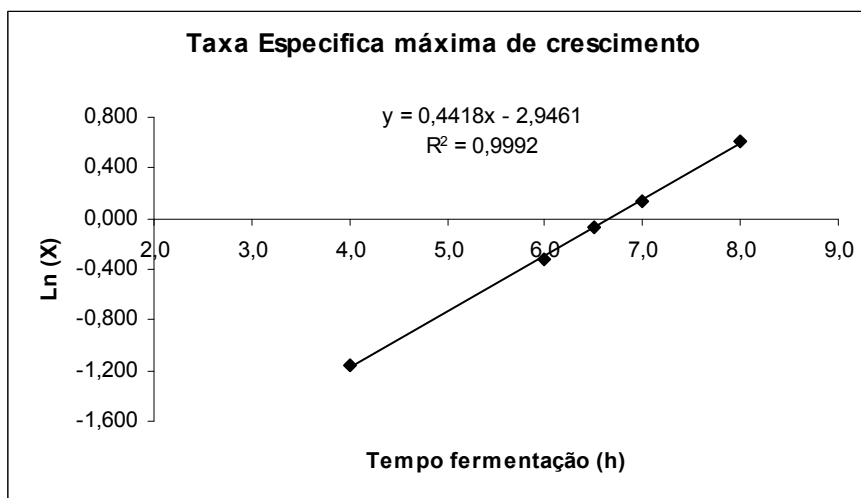


Figura C.11.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 5.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.11.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 5 de 0,3772 g biomassa produzida / g glucose consumida.

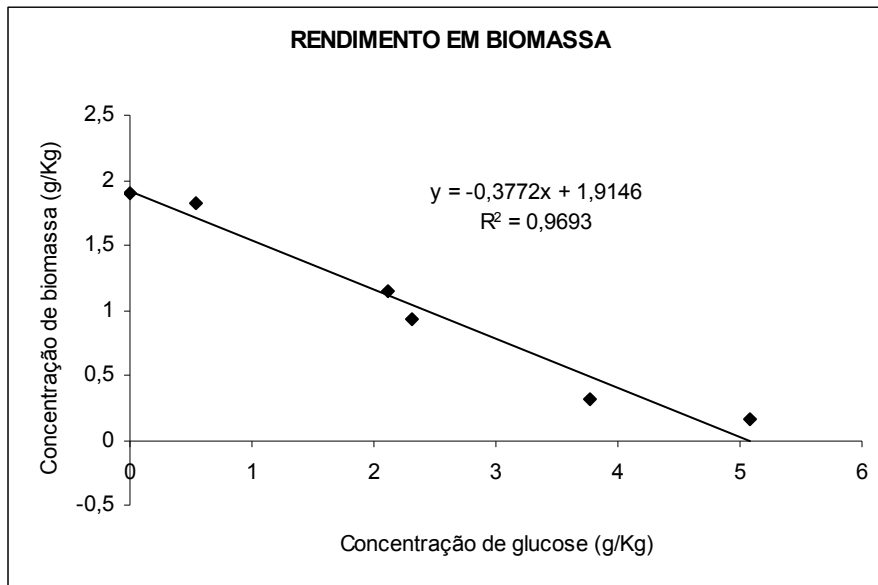


Figura C.11.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 5. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.11.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.11.2.

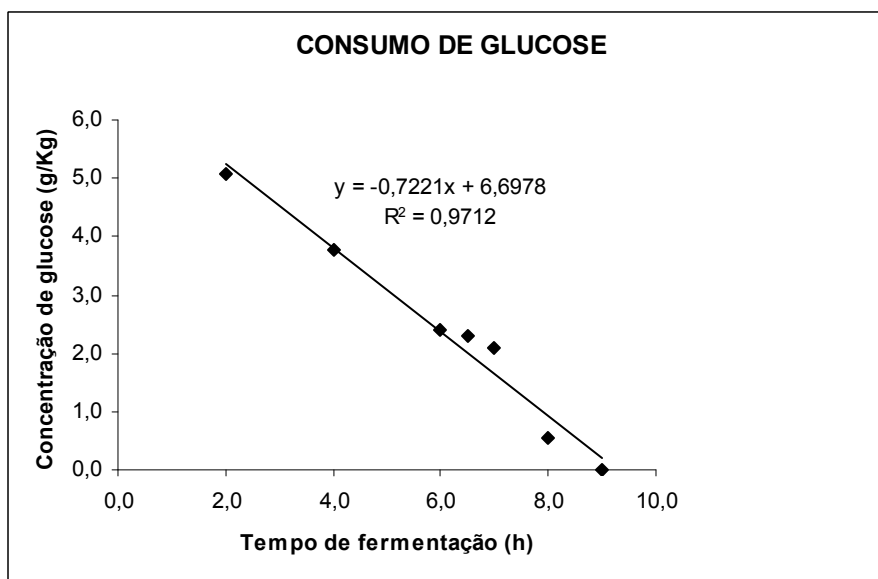


Figura C.11.4 – Determinação da taxa específica de consumo do substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 5

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.11.5.

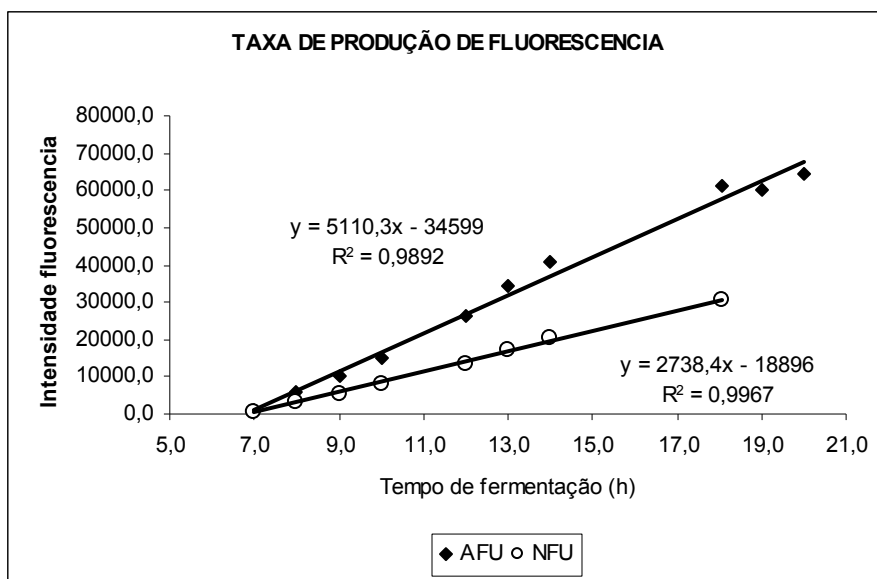


Figura C.11.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 5.

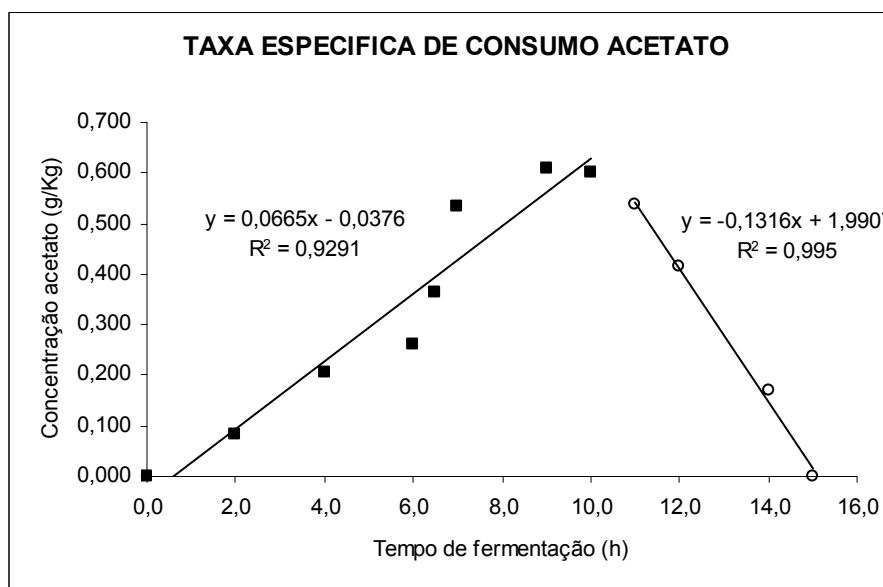


Figura C.11.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 5.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.11.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo do acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.11.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.11.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (q_F), taxa específica de produção de acetato (q_A), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 5.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,4418
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,3772
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,395
X	(g/Kg)	1,829
dS/dt	(g/Kgh)	0,7221
qF	(AFU)	5110,3
qF	(NFU)	2738,4
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,036
X	(g/Kg)	1,858
dA/dt	(g/Kgh)	0,0665
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,0633
X	(g/Kg)	2,080
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,1316

C.12 – Ensaio 6, com indução da produção de proteína no meio da fase exponencial.

Os valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e fluorescência (AFU e NFU) em função do tempo de fermentação, para o ensaio 6, vem descritos na tabela C.12.1 e representados graficamente na figura C.12.1.

Na tabela C.12.1 vem a sombreado os pontos considerados, para a fase exponencial de crescimento.

Tabela C.12.1 – Valores de concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias (AFU) e unidades normalizadas (NFU) para o ensaio 6.

Tempo fermentação (h)	Concentração biomassa (g/Kg)	Concentração glucose (g/Kg)	Concentração acetato (g/Kg)	Intensidade fluorescencia (AFU)	Intensidade fluorescencia (NFU)
0,0	0,100	3,686	0,000	93,5	930,2849
2,0	0,141	3,525	0,000	134,7	954,4736
4,0	0,413	3,886	0,122	219,9	532,4507
6,0	0,773	2,963	0,263	371,2	480,0538
7,0	1,278	2,245	0,397	1669,3	1306,419
8,0	1,618	1,055	0,610	7015,5	4335,815
9,0	1,941	0,000	0,744	13415,3	6909,856
10,0	1,877	0,000	0,712	21280,5	11335,65
10,7	1,916	0,000	0,638	26770,5	13972,24
13,5	2,039	0,000	0,225	47212,0	23154,23
14,8	2,169	0,000	0,000	59721,5	27532,87
17,2	2,109	0,000	0,000	77201,0	36599,71
19,1	2,113	0,000	0,000	72737,5	34426,26
21,8	1,990	0,000	0,000	60695,0	30502,99
24,0	1,964	0,000	0,000	64131,3	32648,11
25,4	1,973	0,000	0,000	57018,8	28897,97

Com os valores correspondentes ao logaritmo neperiano de concentração de biomassa (g/Kg) em função do tempo de fermentação (tabela C.12.1), foi representada graficamente a linearização da função $\mu = 1/X * dX/dt$ (equação B.1) na figura C.12.2.

A taxa específica máxima de crescimento da E.coli M15 para o ensaio 6, corresponde ao coeficiente angular da recta de regressão representada na figura C.12.2.

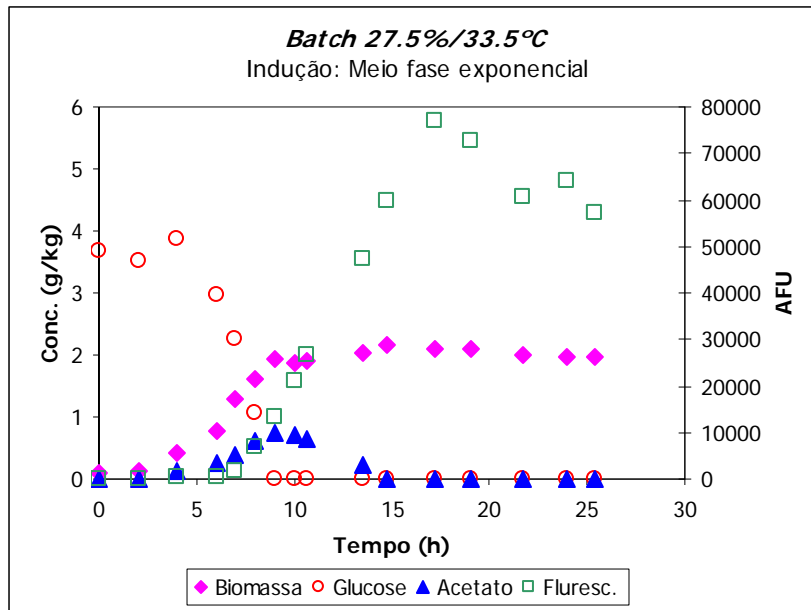


Figura C.12.1 – Variação da concentração de biomassa (g/Kg), concentração de glucose (g/Kg), concentração de acetato (g/Kg) e intensidade de fluorescência (AFU) em função do tempo de fermentação (h) para o ensaio 6.

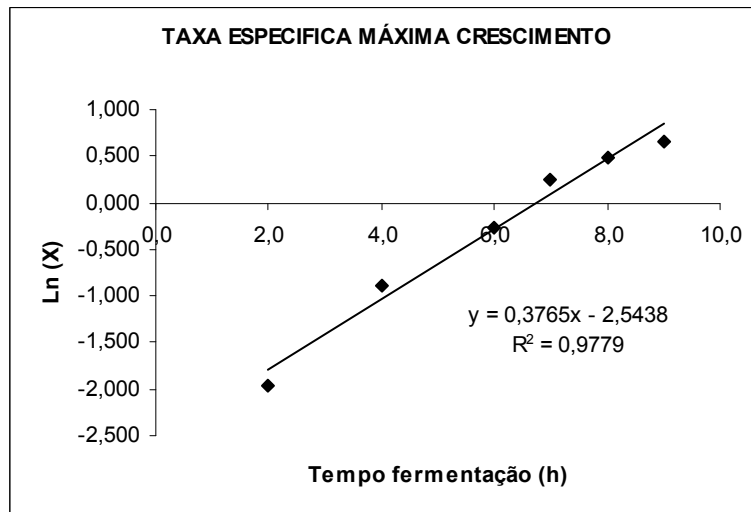


Figura C.12.2 - Representação gráfica da equação linearizada, logaritmo da concentração de biomassa ($\ln(X)$) vs tempo de fermentação, da taxa específica máxima de crescimento para o ensaio 6.

Como para a construção do planeamento factorial foram utilizadas as respostas calculadas a partir dos coeficientes angulares das respectivas rectas de regressão, vão ser apresentados em baixo os respectivos gráficos.

O valor do rendimento em biomassa, foi calculado a partir do coeficiente angular da recta de regressão da variação da concentração de biomassa (g/Kg) em função da variação da concentração de glucose (g/Kg) e está representado

na figura C.12.3, sendo o valor de rendimento em biomassa para o ensaio 6 de 0,3772 g biomassa produzida / g glucose consumida.

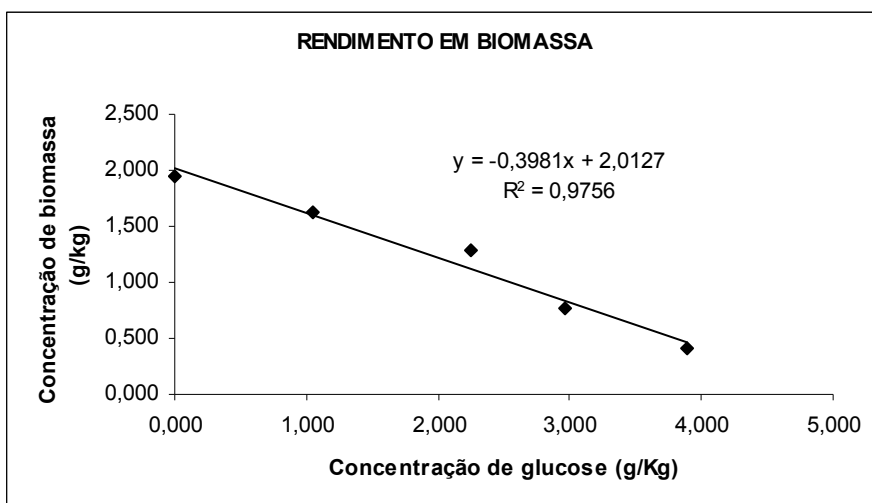


Figura C.12.3 – Determinação do rendimento em biomassa para o ensaio 6. Recta de regressão linear para a concentração de biomassa (g/Kg) versus Concentração de glucose (g/Kg).

A taxa específica de consumo de substrato foi calculada através do coeficiente angular da recta que traduz o consumo de glucose ao longo da fermentação : $\Delta S = f(\Delta t)$, representada na figura C.12.4.

O coeficiente angular obtido, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fase exponencial de crescimento. Sendo estes valores apresentados na tabela C.12.2.

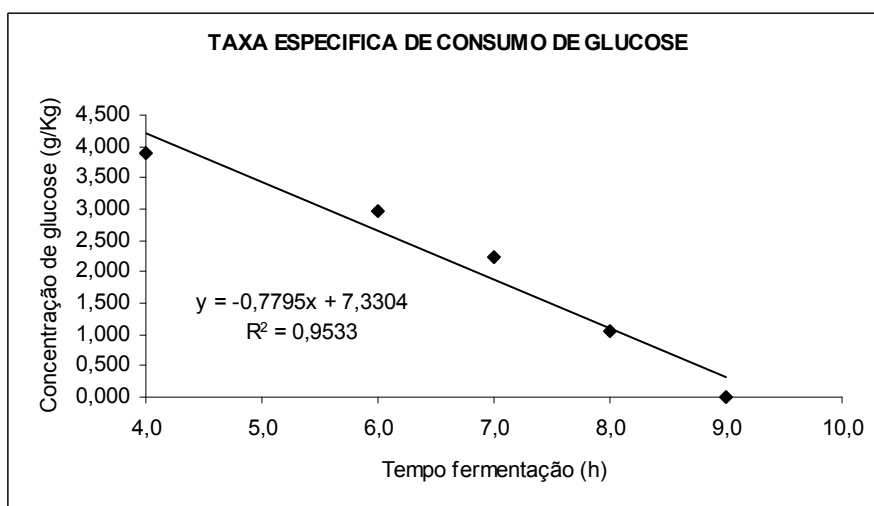


Figura C.12.4 – Determinação da taxa específica de consumo da substrato através da recta de regressão da variação da concentração de substrato (g/Kg) ao longo do tempo de fermentação (h).para o ensaio 6

A taxa específica de produção de fluorescência arbitrária e normalizada, foram obtidas a partir do coeficiente angular que traduz o aumento da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação: $\Delta AFU = f(\Delta t)$, $\Delta NFU = f(\Delta t)$ representado na figura C.12.5.

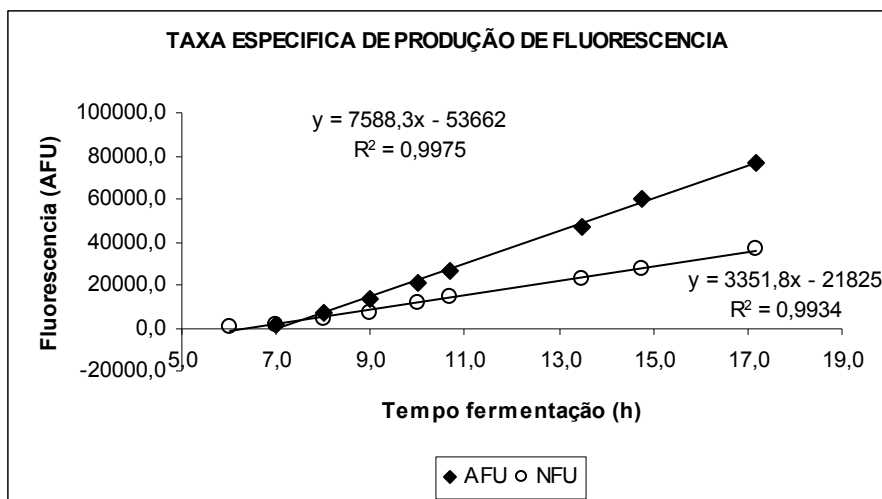


Figura C.12.5 – Variação da intensidade de fluorescência ao longo do tempo de fermentação em unidades arbitrárias e normalizadas. Respectivas rectas de regressão, para o ensaio 6.

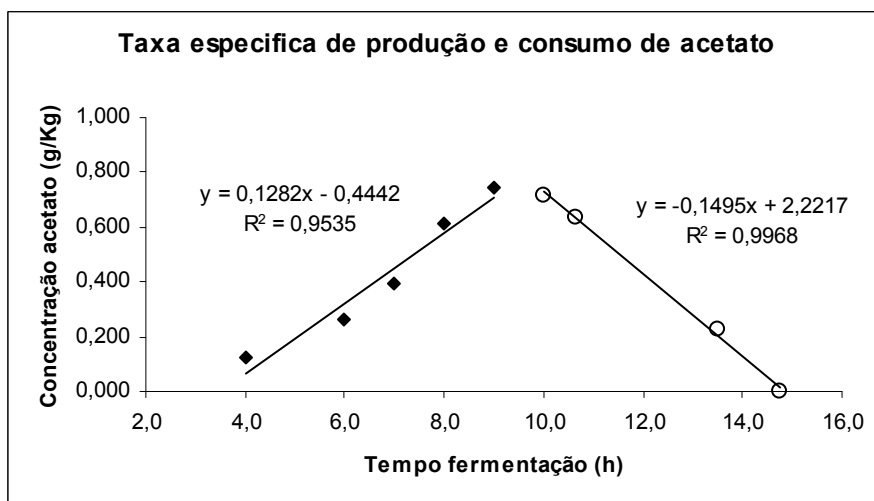


Figura C.12.6 – Rectas de regressão utilizadas na determinação da taxa específica de produção e consumo de acetato, para o ensaio 6.

A taxa específica de produção e consumo de acetato, foram calculadas a partir dos coeficientes angulares das rectas de regressão: $\Delta(A) = f(\Delta t)$ e $\Delta(-A) = f(\Delta t)$, respectivamente e representadas na figura C.12.6.

O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz a produção de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da produção de acetato. O coeficiente angular obtido na recta de regressão que traduz o consumo de acetato, foi dividido pela concentração de biomassa no final da fermentação.

Na tabela C.12.2 vem descritos os valores de todos as respostas calculadas bem como a concentração de biomassa utilizada na determinação da taxa específica de consumo de glucose, taxa específica de acetato.

Tabela C.12.2 – Valores de taxa específica máxima de crescimento μ_{max} , rendimento em biomassa ($\gamma_{X/S}$), taxa específica de consumo de glucose ($-q_s$), concentração de biomassa (X), taxa específica de produção de fluorescência (qF), taxa específica de produção de acetato (qA), taxa específica de consumo de acetato ($(-q_A)$), para o ensaio 6.

Respostas calculadas		Valores
μ_{max}	(h-1)	0,3765
$\gamma_{X/S}$	(g/g)	0,3981
$(-q_s) = 1 / X * dS/dt$	(g/gh)	0,369
X	(g/Kg)	2,113
dS/dt	(g/Kgh)	0,7795
qF	(AFU)	7588,3
qF	(NFU)	3351,8
$q_A = 1 / X * dA/dt$	(g/gh)	0,070
X	(g/Kg)	1,941
dA/dt	(g/Kgh)	0,1282
$(-q_A) = 1 / X * d(-A)/dt$	(g/gh)	0,069
X	(g/Kg)	2,169
d(-A)/dt	(g/Kgh)	0,1495