



## **Análise da cinética de crescimento de *E. coli* modificada em diferentes meios de cultivo e com diferentes estratégias de indução.**

### **Analysis of the growth kinetics of modified *E. coli* in different cultivation media and with different induction strategies.**

Matheus Belchior Ramires<sup>1</sup>, Luís Felipe Minozzo Figueiredo<sup>2</sup>

#### **RESUMO**

Com o avanço dos estudos na área da biotecnologia, a produção de proteínas recombinantes vem sendo cada vez mais utilizada e aplicada nas mais diferentes áreas. Embora seja um hospedeiro conhecido e eficiente, a expressão em *Escherichia coli* pode ser altamente impactada pelas condições de cultivo e pela composição do meio utilizado, além disso o processo de indução representa um alto custo na produção. Dessa forma, neste trabalho buscou-se avaliar a cinética de crescimento de *E. coli* modificada em diferentes meios de cultivo e estratégias de indução, de forma a buscar otimizar o desempenho cinético e na expressão da proteína recombinante. Os cultivos foram acompanhados por meio da medição de densidade óptica em intervalos de tempos regulares e os dados foram manipulados matematicamente e computacionalmente para se obter a curva de crescimento dos cultivos e os parâmetros cinéticos do crescimento exponencial. Os ajustes realizados se mostraram eficientes em descrever os dados experimentais, sendo possível observar o impacto dos diferentes meios no crescimento exponencial, mostrando que meios mais complexos podem apresentar parâmetros cinéticos menores do que meios mais simples, porém com maior duração da fase exponencial, além de não mostrar impacto negativo com relação a estratégia de indução.

**PALAVRAS-CHAVE:** ajuste exponencial; cinética microbiana; curva de crescimento.

#### **ABSTRACT**

With the advancement of studies in the area of biotechnology, the production of recombinant proteins has been increasingly used and applied in the most different areas. Although it is a known and efficient host, expression in *Escherichia coli* can be highly impacted by the cultivation conditions and the composition of the medium used, in addition the induction process represents a high cost in production. Therefore, this work sought to evaluate the growth kinetics of modified *E. coli* in different cultivation media and induction strategies, in order to optimize the kinetic performance and expression of the recombinant protein. The cultures were monitored by measuring optical density at regular time intervals and the data was mathematically and computationally manipulated to obtain the growth curve of the cultures and the kinetic parameters of exponential growth. The adjustments made proved to be efficient in describing the experimental data, making it possible to observe the impact of different media on exponential growth, showing that more complex media may present smaller kinetic interruptions than simpler media, but with a longer duration of the exponential phase, in addition to not show a negative impact in relation to the induction strategy.

**KEYWORDS:** exponential fit, microbial kinetics; growth curve.

## **INTRODUÇÃO**

*Escherichia coli* é uma bactéria mesófila Gram-negativa amplamente empregada na produção de proteínas recombinantes para diversas aplicações. Dentre as vantagens que fazem desse o microrganismo mais estudado como hospedeiro para essa finalidade pode-se destacar suas mutações cromossômicas apropriadas, vários *replicons* plasmidiais com locais de clonagem convenientes, marcadores de resistência a antibióticos selecionáveis

<sup>1</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: matheusramires@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5595112272170560.

<sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: luisfigueiredo@utfpr.edu.br. ID Lattes: 8965106762277460.



úteis e várias regiões promotoras reguláveis que se combinam para fornecer sistemas de vetores hospedeiros que podem gerar grandes quantidades de proteínas recombinantes sob demanda (Kane, 1998).

Embora seja o hospedeiro procariótico mais eficiente, a expressão de proteínas recombinantes com *E. coli* pode enfrentar alguns desafios como a incapacidade de expressar efetivamente proteínas com estruturas complexas ou toxicidade, a baixa atividade de expressão dependendo do meio e condições de cultivo ou mesmo o procedimento de indução, que envolve o acompanhamento da densidade celular até que se alcance o tempo de indução e o uso de reagentes indutores de alto custo como o *Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo* (IPTG) (Zhang, 2022).

Dessa forma, a otimização do meio de cultivo utilizado e das condições do processo podem promover melhor desenvolvimento do microrganismo e conseqüentemente maior expressão da proteína de interesse. Além disso, outras estratégias de indução podem ser avaliadas de forma a reduzir os custos do processo, como o uso da lactose em substituição ao IPTG. Uma das diversas técnicas que podem ser utilizadas visando a otimização de cultivos microbianos é a realização de estudos cinéticos de crescimento em diferentes condições de cultivo. Assim, este trabalho teve como objetivo realizar a avaliação cinética preliminar do crescimento de *E. coli* modificada em diferentes meios de cultivo e estratégias de indução, de forma a buscar otimizar o desempenho cinético e na expressão da proteína recombinante.

## METODOLOGIA LABORATORIAL

Os testes cinéticos foram realizados com seis meios de diferentes composições, conforme apresentado no Tabela 1. Preparou-se também uma solução de metais suplementar, conforme descrito por Da Silva (2013). Para os meios 0, 1, 2 e 4 a indução da expressão proteica durante o crescimento microbiano foi realizada por meio de adição de solução de IPTG (filtrado em membrana de 0,22 μm) na concentração final de 0,6 mM. Já para o meio 5, utilizou-se de solução indutora (SI) (10 % v/v) cuja composição é apresentada no Tabela 1. Para o preparo dos pré-inóculos de cada repetição do teste cinético, inoculou-se alíquotas de uma mesma cultura estoque de *E. coli* modificada *overnight* a 37 °C e 250 rpm em meio LB líquido seletivo com canamicina.

Para a realização dos ensaios cinéticos inoculou-se os meios de cultura a serem testados em frascos tipo Erlenmeyer com 1,0 % (v/v) do pré-inóculo e 0,1 % (v/v) de canamicina. Para os meios 1, 3, 4 e 5, adicionou-se também a solução de metais a 0,1 % (v/v). Conduziu-se o experimento com o crescimento das culturas em *shaker* a 37 °C sob agitação de 250 rpm e acompanhamento durante 7 horas por meio da medição de absorbância em 600 nm em intervalos de tempo de 30 minutos, com o uso de espectrofotômetro *UV-vis* da marca FEMTO modelo 600 *Plus* e cubetas de vidro 10 mm, com calibração do equipamento sendo realizada antes de cada análise com amostras de branco (meios sem o inóculo). As induções foram realizadas quando a DO<sub>600</sub> atingiu valor entre 0,4 - 0,6.

Os testes foram realizados em duplicata para cada meio. Ao fim do experimento as alíquotas finais coletadas de cada foram centrifugadas e as células precipitadas foram armazenadas em congelador para posterior extração sequencial periplasmática e citoplasmática e para análise dos componentes em eletroforese.



**Tabela 1** – Composição dos meios de cultivo utilizados no teste cinético e da solução indutora (SI)

Meio	Composição (g L <sup>-1</sup> )
0	Triptona (16); Extrato de Levedura (10); NaCl (5).
1	Triptona (16); Extrato de Levedura (10); NaCl (5); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (5).
2	Glicose (10); Triptona (10); Extrato de Levedura (5); NaCl (5); MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (2,5); K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (7).
3	Glicose (8); Lactose (2); Triptona (10); Extrato de Levedura (5); MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O (0,5); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (3,4); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 12H <sub>2</sub> O (9); NH <sub>4</sub> Cl (2,7); NaSO <sub>4</sub> (0,7); Glicerol (10).
4	Mesma composição do meio 3, porém sem adição de glicose e lactose e com glicerol (40).
5	Mesma composição do meio 3, porém sem de lactose, com glicose (10) e com glicerol (60).
SI	Mesma composição do meio 3, porém sem glicose e glicerol, e com lactose (20).

Fonte: Modificado de Liew *et al.*, 2010; da Silva *et al.*, 2013.

## METODOLOGIA MATEMÁTICA E COMPUTACIONAL

O tratamento dos dados obtidos nos testes cinéticos foi realizado em linguagem de programação *Python* (v.3.11.10). Considerando que a intensidade de dispersão da luz ou turbidez, medida através da densidade ótica, é proporcional a densidade celular (Widdel, 2010), os dados de absorvância média das duplicatas foram plotados em função do tempo, para cada meio, de forma a se obter as curvas de crescimento microbiano, para tal foi utilizada a biblioteca *matplotlib.pyplot* (v.3.7.1).

Considerando-se que o tempo de geração ( $t_g$ ) é específico para certa espécie de bactéria e sendo a velocidade de crescimento microbiano específica ( $\mu$ ) proporcional à fração pela qual a população cresce em certo instante, a Equação 1 pode ser utilizada para o cálculo dos valores de  $\mu$  instantâneo em cada tempo, considerando a massa de microrganismos como análoga matematicamente à densidade ótica, de forma a identificar o valor de  $\mu_{max}$  e, a partir deste, identificar a região de crescimento exponencial, na qual ocorre divisão celular em velocidade máxima e constante, ou seja,  $\mu \approx \mu_{max}$  (Alterthum, 2020).

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dT} = \frac{(\log(X) - \log(X_0)) * 2,303}{\Delta t} \quad (1)$$

Aplicando-se a Equação 1 a quaisquer dois pontos dentro da faixa de crescimento exponencial é possível obter matematicamente um valor de  $\mu$  médio para o processo e, conseqüentemente, o tempo de geração, no qual  $X \approx 2X_0$ , simplificando a Equação 1 à razão entre  $\ln(2)$  e o tempo de geração (Alterthum, 2020).

O crescimento microbiano dentro desta faixa foi então modelado com base no crescimento exponencial representado pela Equação 2, em que se pode considerar o número de indivíduos  $N$  como análogo matemático à absorvância (OD<sub>600</sub>), e realizou-se o ajuste das curvas exponenciais aos dados (Alterthum, 2020; Widdel, 2010).

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (2)$$



A partir das equações das retas ajustadas a fase exponencial foi possível então obter os valores de  $\mu$  estimado para cada meio e, conseqüentemente, os valores de tempo de geração na fase exponencial. Para a modelagem dos dados foram utilizados recursos de manipulação e tratamento de dados da biblioteca *numpy* (v.1.24.3) e o recurso de *curve\_fit* da biblioteca *scipy.optimize* (v.1.10.1). Os procedimentos de cálculo matemático e ajuste exponencial foram realizados com os 6 meios analisados (0 a 5) e com um Meio 6, cujos dados experimentais foram extraídos do trabalho de Sezonov *et. al* (2007) a fim de validação do código desenvolvido.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta as curvas de crescimento obtidas para os meios testados (0 a 5) e para o meio de validação de código (6), em escala logarítmica, nas quais é possível verificar o comportamento característico do crescimento microbiano, tendo de início uma curta fase de adaptação (fase lag) para todos os meios – exceto para o meio 3 e 6 - seguida do crescimento exponencial e, conforme reduz-se a disponibilidade de nutrientes do meio, tem-se redução na taxa de crescimento até que se alcance a fase estacionária, na qual o número de células que se dividem se iguala ao número de células que morrem. Para os meios 3 e 6 o crescimento exponencial se deu já a partir do início do processo, o que pode indicar que a composição deste meio gerou menor estresse às células, minimizando o tempo em fase lag. Por outro lado, a fase lag para o meio 5 (60 minutos) foi mais longa do que para os demais meios (30 minutos), indicando que este foi o meio de composição mais estressante às células no início do cultivo.

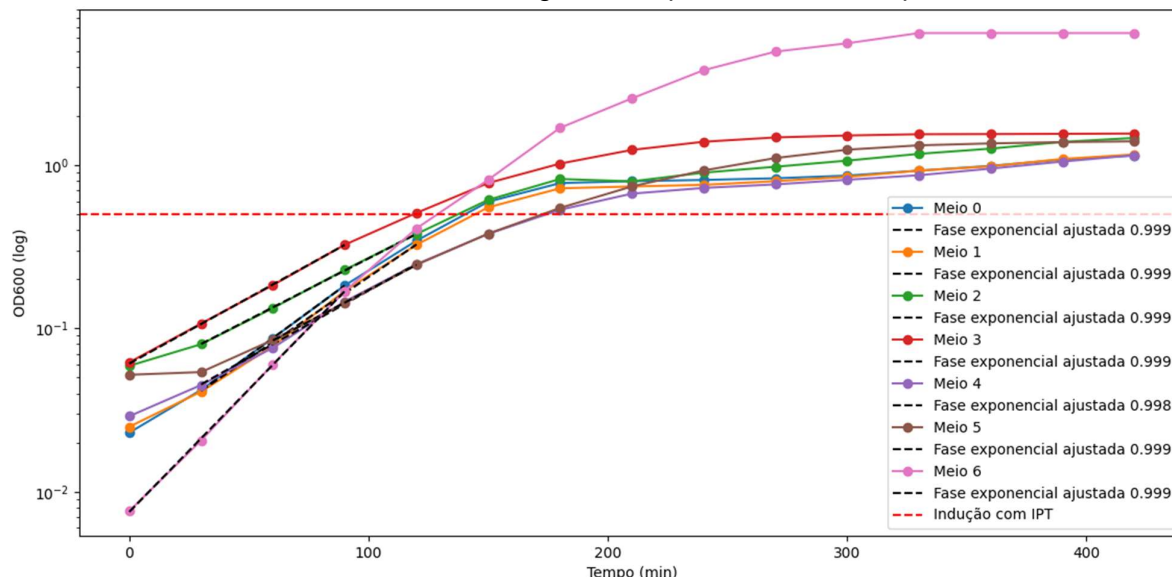
Na Figura 1 é possível verificar pelos valores de  $R^2$  que o modelo exponencial de crescimento foi ajustado de forma eficiente aos dados experimentais, inclusive para o meio de validação (meio 6), apresentando fase exponencial de 90 minutos para todos os meios, exceto para o meio 0 (60 minutos). No entanto, esses pontos podem não necessariamente representar todo o período de fase exponencial pois, embora na fase exponencial, matematicamente, a velocidade de crescimento seja constante e igual a  $\mu_{max}$ , pelos dados experimentais verificou-se aumento inicial em  $\mu$  logo no início do acompanhamento até seu máximo, e a partir deste ponto houve redução gradativa ao longo do tempo. Dessa forma, optou-se por considerar uma variação de  $t$  % de  $\mu$  com relação ao  $\mu_{max}$  para a seleção da região exponencial, sendo que  $t$  foi selecionado com base no  $R^2$  obtido, selecionando ao menos três pontos para o ajuste, obtendo-se  $t$  igual a 10 % para os meios 0, 2, 5 e 6, 20 % para os meios 1 e 3, e 25 % para o meio 4. Essa redução na atividade observada pode ser explicada pela natureza do teste, sendo que a cada 30 minutos o cultivo é interrompido para medição de absorbância, o que inevitavelmente resulta em estresse aos microrganismos, reduzindo sua atividade a cada parada e não permitindo assim a manutenção de  $\mu$  constante e máximo.

A Tabela 2 apresenta os parâmetros cinéticos ajustados pelo modelo exponencial, sendo que pelo método matemático foram obtidos os mesmos resultados que pelo ajuste. Os resultados obtidos pelo código para o meio 6 foram compatíveis aos obtidos por Sezonov *et. al* (2007) em cultivo com meio LB, sendo conhecido que o tempo de geração médio de *E. coli* se encontra em torno de 30 minutos. O meio 0, conhecido como 2xYT, foi o que apresentou melhor desempenho cinético, porém menor tempo em fase exponencial, mostrando que meios mais simples – como os 0, 1 e 6 - podem apresentar menores parâmetros cinéticos, porém menores tempos em fase exponencial. Porém, outro ponto a



ser levado em consideração se refere ao fato de que em valores de absorvância acima de 0,4 a precisão nas medidas de OD reduz, podendo gerar variações nos dados de  $\mu$  que não precise o exato momento de término da fase exponencial (Widdel, 2010).

Figura 1 – Curvas cinéticas geradas a partir dos dados experimentais



Fonte: Autor (2023).

Dentre os meios com maior adição de cofatores e reagentes suplementares, importantes para a expressão de proteínas recombinantes, é possível verificar que a estratégia de uso da glicose nos meios 3 e 5 tiveram pouco impacto no tempo de geração com relação ao meio 4. A estratégia de indução com IPTG, SI ou lactose não mostrou prejudicar o crescimento. Assim, o uso do meio 3 se apresenta como uma possibilidade promissora para a produção de proteína recombinante, do ponto de vista cinético, embora sejam ainda necessárias a realização de análises de confirmação da presença da proteína de interesse ao fim do cultivo e a otimização das condições.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos ajustados pelo modelo exponencial.

Parâmetros / Meios	0	1	2	3	4	5	6
$\mu$ (min <sup>-1</sup> )	0,024	0,022	0,017	0,18	0,018	0,017	0,034
Tg (min)	28	30	40	38	37	39	20

Fonte: Autor (2023).

## CONCLUSÃO

Tanto a abordagem matemática como a modelagem exponencial se mostraram capazes de descrever adequadamente os dados experimentais de crescimento, mostrando o meio 3 como promissor para a produção de proteínas recombinantes. Embora este estudo tenha feito uma análise cinética preliminar considerando a densidade ótica como equivalente matematicamente ao número de indivíduos e à massa de células, para testes



futuros de maiores precisão é recomendado estabelecer curvas de calibração definindo a relação entre a absorvância e a contagem bacteriana. Além disso, a fim de capturar uma possível maior extensão da fase exponencial, se faz necessário o procedimento de medições de DO com diluições a partir de certa DO crítica, além de buscar a realização do teste em condições que permitissem a medição sem interromper o cultivo, aumentando a confiabilidade nos dados e garantindo a manutenção do crescimento em fase exponencial com velocidade máxima e constante.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento através da Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018, assim como à Universidade Tecnológica Federal do Paraná com fomento interno à pesquisa.

### Disponibilidade de código

O código desenvolvido ao longo do projeto pode ser encontrado em: <[https://github.com/Mathbelch/KineticGrowth\\_E.coli](https://github.com/Mathbelch/KineticGrowth_E.coli)>.

### Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

### REFERÊNCIAS

ALTERTHUM, F. *et al.* **Biotecnologia industrial: fundamentos**. v.1, ed.2, Edgar Bluncher Ltda. p.42-44, 2020.

DA SILVA, A. J. *et al.* Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *rE. coli* fed-batch cultures. **SpringerPlus**, v. 2, p.322, 2013.

KANE, J.F.; HARTLEY, D.L. Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. **TIBTECH** v. 6, p. 95-101, 1988

LIEW, M. W. O. *et al.* **Microbial production of virus-like particle vaccine protein at gram-per-litre levels**. *Journal of Biotechnology*, v. 150, p. 224-231, 2010.

ZHANG, Z. X. *et al.* Strategies for efficient production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: alleviating the host burden and enhancing protein activity. **Microb Cell Fact** P.21-191, 2022.

WIDDEL, F. Theory and measurement of bacterial growth. *In: Di Dalam Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4., p. 1-11, 2007.

SEZONOV, G. *et al.* Fisiologia de *Escherichia coli* em caldo Luria-Bertani. **Jornal de Bacteriologia**, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.