UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Tecnologia de Fermentações

Processos de produção da proteína heteróloga mCherry por

Chlamydomonas reinhardtii

Cesar Andres Diaz Arias

Tese para obtenção do Título de Doutor Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

> São Paulo 2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Área de Tecnologia de Fermentações

Processos de produção da proteína heteróloga mCherry por

Chlamydomonas reinhardtii

Cesar Andres Diaz Arias

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho

São Paulo

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Cesar Andres Diaz Arias

Processos de produção da proteína heteróloga *mCherry* por *Chlamydomonas reinhardtii*

Comissão Julgadora da

Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho orientador/presidente

1o. examinador

20. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

A mi Madre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho. Em especial, agradeço ao professor **João Carlos** pelos ensinamentos e, sobretudo, pelo o marcante exemplo de ser humano e profissional que levarei para sempre. Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório **João Victor** e **Lívia Sena** pela parceria e apoio constante. Ao amigo **Ignácio Moguel** pelos bons momentos compartilhados. Àqueles que de tão próximos se tornaram família – **Roseane Nascimento** e **André Brito** –, obrigado pelo cuidado e carinho dispensados à mim, sobretudo nessa reta final. À minha namorada **Graciela Fonsêca** por todo amor, cumplicidade e companheirismo. Por fim, *gracias* aos que torceram e contribuíram para que essa conquista fosse alcançada.

"Eu sou um intelectual que não tem medo de ser amoroso. Amo as gentes e amo o mundo. E é porque amo as pessoas e amo o mundo que eu brigo para que a justiça social se implante antes da caridade".

Paulo Freire

ARIAS, C. A. D. **Production processes of heterologous** *mCherry* **protein by** *Chlamydomonas reinhardtii.* 2017. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ABSTRACT

This work aims to study the best conditions of the cultivation of the microalgae Chlamydomonas reindhartii genetically modified for the production of the fluorescent protein m*Cherry* from the study of the macronutrients contained in the culture medium. The mCherry protein has the advantage of being easily detected in the culture medium by conventional spectrophotometry, thus becoming an interesting molecule for the study as an expression model. Initially, three different nitrogen sources were studied to evaluate the expression of the recombinant protein. The results indicated that the best source of nitrogen for the production of m*Cherry* was NH₄NO₃. Then, to evaluate the effects generated by macronutrients (acetate, calcium chloride, magnesium sulphate, ammonium nitrate and total phosphate) contained in the TAP culture medium, a central composite 2⁵ was carried out in cultures on microplates, Results evaluated by multivariate regression. In addition, multivariate regression analysis indicated that, from the evaluated levels of the variables, the conditions that best serve the optimization of mCherry production and cell growth are: acetate, 33.35 mM; Calcium chloride, 0.45 mM; Magnesium sulfate, 0.83 mM; 10.31 mM ammonium nitrate; Total phosphate, 1.96 mM. These conditions were chosen for cultivation in tubular photobioreactor where fluorescence titre of mCherry at 608 nm of 59209 UF was obtained, corresponding to an increase of 118.5% greater than the titer of fluorescence obtained using standard TAP medium. In order to follow the production processes, a column type bioreactor was designed and a production study was carried out in a semicontinuous system. The results showed that the semicontinuous system increased 2.6 times the productivity of the biomass.

Key-Words: *Chlamydomonas reinhardtii*. Heterólogous Protein. Microalge. Photobiorreator. m*Cherry*

ARIAS, C. A. D. **Processos de produção da proteína heteróloga** *mCherry* **por** *Chlamydomonas reinhardtii.* 2017. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

RESUMO

Este trabalho tem como finalidade estudar as melhores condições do cultivo da microalga Chlamydomonas reindhartii geneticamente modificada para a produção da proteína fluorescente m*Cherry* a partir do estudo dos macronutrientes contidos no meio de cultivo. A proteína m*Cherry* possui a vantagem de ser facilmente detectada no meio de cultivo por espectofotometria convencional, convertendo-se, desta forma, em uma molécula interessante para o estudo como modelo de expressão. Inicialmente, foram estudadas três diferentes fontes de nitrogênio para avaliar a expressão da proteína recombinante. Os resultados indicaram que a melhor fonte de nitrogênio para a produção da m*Cherry* foi o NH₄NO₃. Em seguida, para avaliar os efeitos gerados pelos macronutrientes (acetato, cloreto de cálcio, sultato de magnésio, nitrato de amônio e fostato total) contidos no meio de cultivo TAP, foi realizado um planejamento composto central 2⁵, em cultivos em microplacas, sendo os resultados avaliados por regressão multivariada. Além disso, a análise realizada por regressão multivariada indicou que, dos níveis avaliados das variáveis, as condições que melhor atendem à otimização da produção de m*Cherry* e crescimento celular são: acetato, 33,35 mM; cloreto de cálcio, 0,45 mM; sulfato de magnésio, 0,83 mM; nitrato de amônio, 10,31 mM; fosfato total, 1,96 mM. Essas condições foram escolhidas para cultivo em fotobiorreator tubular, onde foi obtido título de fluorescência de m Cherry a 608 nm de 59209 UF, correspondendo a um aumento de 118,5% maior que o título de fluorescência obtido com uso de meio TAP padrão. Com a finalidade de seguir com os processos de produção foi disenhado um biorreator tipo coluna e foi reaizado um estudio de produção em sistema semicontinuo. Os resultados obtidos demostraram que o sistema semicontinuo aumento 2,6 veces a produtividade da biomassa.

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii*. Proteínas Heterólogas. Microaldas. Fotobiorreator. m*Cherry*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 3.1 Crescimento da microalga *Chlamydomonas reindhartii* 1690 (cepa selvagem) (g/L) (representada pelos círculos); crescimento da microalga *Chlamydomonas reindhartii* clonada para produção da proteína heteróloga m*Cherry* pJP30 (g/L) (representada pelos quadrados). Produção da proteína heteróloga m*Cherry* em unidades de fluorescência UF (representada pelos triângulos). As cores indicam a fonte de nitrogênio utilizada. NH4NO₃, amarelo; NH4Cl, Azul ; NaNO₃, vermelho.
- Figura 3.2 Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e acetato, apresentados em seus níveis codificados, na produção da proteína heteróloga *mCherry* por *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.
- Figura 3.3 Predição do efeito da concentração molar de acetato, em níveis codificados, na produção de biomasa (g/L) da microalga *C. reindhartii* pJP30, produtora da proteína heteróloga m*Cherry*. As estimativas foram realizadas fixando as outras variáveis no ponto central.
- Figura 3.4 Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e fostato total, apresentados em seus níveis codificados, na produção da proteína heteróloga *mCherry* por *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.
- Figura 3.5 Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e acetato, apresentados em seus níveis codificados, na concentração celular máxima de *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.
- Figura 3.6 Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, apresentados em seus níveis codificados, na concentração celular máxima de *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.
- Figura 3.7 Curvas de crescimento da microalga *Chlamydomonas reinchartii* pJP30, produtora da proteína heteróloga m*Cherry*, em fotobiorr tubular. As variáveis testadas foram o meio de cultivo TAP pa (representado pelos círculos) e o meio de cultivo TAP modificado (representado pelos quadrados).

- Figura 4.1 Produção da proteína heteróloga mCherry pela microalga Chlamydomonas reindhartii pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação de 20% de volume. As figuras correspondem a: A-B concentração celular g L-1; A1-B1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente, os triângulos representam o segundo corte.
- Figura 4.2 Produção da proteína heteróloga mCherry pela microalga Chlamydomonas reindhartii pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação 40% de volume. As figuras correspondem a: C-D concentração celular g L-1; C1-D1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente, os triângulos representam o segundo corte.
- Figura 4.3 Produção da proteína heteróloga mCherry pela microalga Chlamydomonas reindhartii pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação 60% de volume. As figuras correspondem a: E-F concentração celular g L-1; E1-F1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente os triângulos representam o segundo corte.
- Figura 5.1 Exemplo de sitema aberto de tipo carrossel. A cor preta simboliza as hélices que movimentam o cultivo (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).
- Figura 5.2 Exemplo de sistema fechado tipo placas planas (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).
- Figura 5.3 Exemplo de sistema fechado de tipo tubular com *air lift* e iluminação externa (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).
- Figura 5.4 Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry.*
- Figura 5.5 Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produçã proteína heteróloga m*Cherry*. Localização de entradas e filtros.
- Figura 5.6 Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da

proteína heteróloga m*Cherry*. Preparo de inóculo, tomada de amostras e cortes em sistemas semicontínuos realizados em câmera de fluxo laminar.

- Figura 5.7 Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Correção de pH por meio da injeção de CO₂ ao meio de cultivo.
- Figura 5.8 Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Comparação qualitativa entre os cultivos realizados em batelada no fotobiorreator tubular de 3.5L e no fotobiorreator tipo coluna (terceiro dia de cultivo).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1 Comparação entre diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas (POTVIN; ZHANG, 2010; WALKER et al., 2005; YAN et al., 2016; YAO et al., 2015).
- Tabela 2.2 Resumo das biomoléculas expressas em *Chlamydomonas reinhardtii*, organela geneticamente transformada, percentual de expressão (%) da proteína solúvel total, concentração em miligramas por litro (mg / L) e vetor de clonagem.
- Tabela 3.1- Concentrações molares (mM) dos nutrientes avaliados e suas correspondências com seus níveis codificados do planejamento experimental.
- Tabela 3.2- Coeficientes estimados pela regressão multivariada para predição da produção máxima da proteína heterologa m*Cherry* (*P*_m) e concentração celular máxima (*X*_m) de *C. reindhartii* pJP30 em função das variáveis independentes avaliadas (Os níveis codificados de acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de amônio e fosfato total, foram correspondentes a j1, j2, j3, j4 e j5, respecitvamente).
- Tabela 5.1 Comparação entre sistemas de produção para microalgas abertos e fechados.
- Tabela 5.2 Comparação entre sistemas tubular e coluna para analisar a produtividade para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ble	Gene que confere resistência a Bleomicina
СНО	Células imortalizadas de ovário de hamster chinês
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
FDA	Food and Drug administration
GnT	N-acetilglucosaminiltransferase
NL	Nitrogênio Liquido
NR	Nitrato reductase
ORF	Open Read Frame
PFV	Proteína Fluorescente Verde
PDMS	Gerally reconoced as save
GFP	Green Fluorescent Protein - Proteína verde fluorescente
GRAS	Generally regarded as safe
RbcS2	Gene que codifica ppara a subunidade 2 da rubisco
RE	Retículo Endoplasmático
OMS	Organização Mundial de Saúde
TAP	Tris acetate phosphat medium – meio tris acetate e fosfato
UF	Unidades de fluorescência
UTR	Untranslated Regions
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL	17
CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A PA Chlamydomonas reinhardtii	ARTIR DE
2.1 INTRODUÇÃO	21
2.2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.3 CONCLUSÃO	39
CAPÍTULO 3: EFEITO DOS MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CUL PARA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>mChe</i> <i>CHLAMYDOMONAS REINDHARRTII</i>	TIVO TAP <i>rry POR</i> 43
3.1 INTRODUÇÃO	44
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.3 RESULTADOS	51
3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	60
3.5 CONCLUSÕES	67
4. CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE m <i>Cl</i> Chlamydomonas reindhardtii EM SISTEMA SEMICONTÍNUO	erry POR
4.1 INTRODUÇÃO	69
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	71
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.4 CONCLUSÃO	80
CAPÍTULO 5: FABRICAÇÃO DOS FOTOBIORREATORES TIPO COL AGITAÇÃO POR INJEÇÃO COM AR.	UNA COM
5.1 INTRODUÇÃO	82
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	86
5.3 PROCEDIMENTO E RESULTADOS	86
5.4 CONCLUSÃO	91

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO GERAL	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	109
ANEXO 1	109
ANEXO 2	111

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

A produção de proteínas heterólogas, nas últimas décadas, tem sido alvo de vários estudos, sendo que são descritos, para este propósito, dois sistemas de expressão (eucariótico e procariótico). Os sistemas de expressão podem ser microorganismos, como bactérias e leveduras, bem como células animais.

No entanto, como todos os processos de produção, cada um deles apresenta vantagens e desvantagens. Assim, um sistema de produção de proteínas heterólogas com uso da microalga verde *Chlamydomonas reindhartii* tem sido avaliado por apresentar grandes vantagens para a produção deste tipo de bioprodutos, como rápido crescimento, a possibilidade de fazer modificações pós-traducionais, o baixo custo de escalonamento, entre outras. Adicionalmente, o custo de produção pode ser reduzido por ser empregado meio com uso majoritário de sais inorgânicos, o que também diminui os riscos de contaminação em relação aos cultivos heterotróficos, principalmente com uso de células animais.

Adicionalmente, as linhagens transgênicas deste tipo de microalgas são obtidas rapidamente, além de serem estáveis ao longo do tempo, diminuindo o tempo de obtenção e baixando os custos experimentais.

Considerando que a produção de proteínas heterólogas em microalgas constitui uma tecnologia relativamente nova, estudos são necessários no sentido de solucionar problemas, entre eles, aumentar os rendimentos, otimizar as vias de secreção de proteínas recombinantes ou a glicosilação realizada por estes microrganismos, entre outros. A produção de proteínas heterólogas por microalgas poderá ser competitiva quando comparada com as células CHO.

Um dos grandes êxitos dentro da biotecnologia foi o aproveitamento das proteínas fluorescentes. Estas proteínas são utilizadas para uma diversidade de aplicações, como a funcionalidade dos promotores de expressão, a localização, dinâmica e interação das proteínas, a marcação de órgãos e organelas, entre outras possibilidades. Devido à sua versatilidade, estas proteínas são indispensáveis no campo da pesquisa biológica. No entanto, metodologias como essas estão iniciando na biotecnologia com microalgas. Nesse contexto, a proteína m*Cherry* representa uma das proteínas fluorescentes mais estudadas nos últimos anos, empregada em

diversas áreas e pesquisas, o que vem facilitando a quantificação, o acompanhamento de processos, a marcação de organelas, entre outros. Em função dessas características, a proteína m*Cherry* representa um alvo interessante como modelo para a produção de proteínas heterólogas pela microalga *Chlamydomonas reindhartii*.

Meios de cultivo otimizados para o crescimento e a produção de proteínas heterólogas para microalgas configuram-se como um fator importante no melhoramento dos rendimentos e da produtividade dos processos. Microalgas são capazes de se adaptar à diferentes condições nutricionais e ambientais, desta forma, quando os elementos essenciais para a vida como carbono nitrogênio, e fósforo variam dentro do meio de cultivo, as microalgas se adaptam a essas mudanças. Adicionalmente, também outros elementos importantes na constituição celular, como enxofre e cálcio, podem exercer um papel importante no comportamento do cultivo microbiano, bem como na produção de metabólitos.

A produção de proteínas heterólogas em microalgas constitui uma tecnologia considerada nova, demandando estudos que busquem solucionar os problemas inerentes ao processo de produção, bem como aumentar rendimentos, otimizar as vias de secreção de proteínas recombinantes ou a glicosilação realizada por esses microorganismos, dentre outros fatores. As investigações podem gerar dados que contribuam para tornar o sistema de produção de proteínas heterólogas com microalgas competitivo em relação aos sistemas de produção com células de mamíferos. Nessa linha, a otimização de meios de cultivo para o crescimento e a produção de proteínas heterólogas para microalgas constitui um fator importante no melhoramento dos rendimentos e produtividade dos processos.

Com base nessa breve contextualização, a tese possui os seguintes objetivos:

- Introduzir uma visão geral do trabalho realizado (Introdução Geral -Capítulo 1).
- Apresentar, por meio de revisão da literatura, a *Chlamydomonas* reinhardtii como alternativa para a produção de proteína heteróloga e suas características gerais quando comparada com outros sistemas de expressão (Capítulo 2).
- Estudar os efeitos gerados pelos macronutrientes (Carbono, Cálcio, Enxofre, Nitrogênio, Fósforo) no crescimento e na produção da proteína

heteróloga m*Cherry.* Otimização do meio de cultivo de *C. reinhardtii* com o emprego de microplacas e escalar o processo em fotobiorreator de 3.2 L por cultivo em batelada (Capítulo 3).

- Estudar o processo da produção da proteína heteróloga m*Cherry* em processo semi continuo (Capítulo 4).
- Construir um fotobiorreator tipo coluna esterilizável para estudos de crescimento e produção de subprodutos de interesse a partir de microorganismos fotossintetizantes com agitação por injeção de ar em escala laboratorial (Capítulo 5).

CAPÍTULO 2: PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS A PARTIR DE Chlamydomonas reinhardtii

RESUMO

O objetivo desta revisão é apresentar os avanços na produção de proteínas heterólogas por Chlamydomonas reinhardtii e mostrar suas características gerais em comparação com outros sistemas de expressão. A necessidade de produzir proteínas heterólogas de interesse industrial para uso humano, bem como ensaios clínicos, kits de diagnóstico e pesquisa básica, entre outros, levou ao desenvolvimento de novas ferramentas para o estudo e otimização desse tipo de processo a partir da biotecnologia e, desta forma, promoveu o desenvolvimento tecnológico. Os microorganismos têm sido utilizados como modelo de expressão. Bactérias como Escherichia coli e leveduras como Pichia pastoris aparecem em destaque apresentando grandes vantagens nos processos de produção de biomoléculas. No entanto, nos últimos anos, outros sistemas de expressão foram testados com grande sucesso. As microalgas têm demonstrado uma grande aplicabilidade, uma vez que possuem algumas vantagens características de leveduras e bactérias, como seu rápido crescimento e os baixos custos de produção e, por outro lado, possuem as vantagens de organismos superiores como plantas, sendo que as modificações pós trasducionais das proteínas são mais próximas entre plantas e animais.

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii.* Produção. Proteínas Heterólogas. Microalgas. Fotossíntese.

2.1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as microalgas têm sido utilizadas para consumo humano e animal, produção de ácidos graxos e metabólitos secundários, como pigmentos, produção de biomassa, entre outros (ABDUL RAZACK; DURAIARASAN; MANI, 2016; BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016; KANG et al., 2015; PELIZER; DE CARVALHO; DE OLIVEIRA MORAES, 2015; SPOLAORE et al., 2006; WALKER et al., 2005). No mundo inteiro, existe um grande número de espécies de microalgas (ABOU-SHANAB et al., 2011) porém, poucas são utilizadas com êxito comercialmente, e entre elas destacam-se a Chlorella e a Spirulina (BOROWITZKA, 1999; ÖTLES; PIRE, 2001). Em pesquisas, Dunaliela salina e Haematococcus pluvialis têm demonstrado facilidade para a extração de β-caroteno e a astaxantina (ALMARAZ-DELGADO et al., 2014). Neste momento, não existe um sistema que unifique a produção eficiente de proteínas escala comercial dependendo, em muitos em dos casos, do desenvolvimento, dos custos de produção além de outros fatores (WALKER et al., 2005).

À medida que a tecnologia de DNA recombinante avança, o genoma de várias espécies de microalgas vem sendo sequenciado, revelando uma miríade de sequências de DNA exploráveis para a expressão de proteínas heterólogas (LI et al., 2011; POTVIN; ZHANG, 2010; SATJARAK; PAASCH; GRAHAM, 2016; TOURASSE et al., 2015; WANG et al., 2014). Dentre todas as espécies de microalgas, *Chlamydomonas reinhardtii* se destaca por ser amplamente utilizada em diversos estudos, como fotossíntese, motilidade celular e fototaxia.

C. reinhardtii já foi geneticamente modificada com sucesso (RASALA; MAYFIELD, 2011). Como plantas, as microalgas possuem três genomas, sendo que protocolos de modificação genética do núcleo, mitocôndria e cloroplasto estão disponíveis para diferentes espécies (ALMARAZ-DELGADO et al., 2014; SCAIFE et al., 2015).

C. reinhardtii apresenta várias vantagens em relação a outros sistemas de produção como baixo custo e crescimento rápido (Tabela 2.1), além de ser um microorganismo geralmente considerado como seguro (GRAS) pela FDA (SPECHT; MAYFIELD, 2014). Também pode ser cultivada em fotobiorreatores fechados, o que reduz o risco de dispersão de transgenes (CONTRERAS-FLORES et al., 2003;

WALKER et al., 2005; XU et al., 2009; YAN et al., 2016) e é capaz de produzir proteínas complexas com modificações pós-tradução, tais como ligações dissulfeto e N-glicosilação (ROSALES-MENDOZA; PAZ-MALDONADO; SORIA-GUERRA, 2012). Embora *Chlamydomonas* representem uma tecnologia de grande potencial, ainda não existe um sistema capaz de unir a produção eficiente de proteína heteróloga em uma escala comercial, o que depende dos componentes celulares naturais, dos processos de cultivo e da extração e purificação de proteínas (WALKER et al., 2005).

O objetivo desta revisão é apresentar a *Chlamydomonas reinhardtii* como alternativa para a produção de proteína heteróloga e suas características gerais quando comparada com outros sistemas de expressão.

2.2 REVISÃO DA LITERATURA

Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii é parte da Divisão Chlorophyta, Classe Chlorophyceae, Família Chlamydomonadacea, Ordem Volvocales e Gênero Chlamydomonas. O gênero Chlamydomonas é comumente identificado através de critérios morfológicos e entre espécies, especificamente, é usado o tamanho e a forma do corpo, bem como a forma e a posição do cloroplasto e o comprimento flagelar (HARRIS, 2001; PRÖSCHOLD; HARRIS; COLEMAN, 2005). Estão descritas, aproximadamente, 500 espécies de Chlamydomonas, podendo ser encontradas em diferentes nichos ecológicos desde amostras no solo, onde C.reinhardtii foi isolada pela primeira vez por GM Smith, no ano de 1945, até os glaciais onde encontra-se como representante o gênero C .navalis (HARRIS, 2001; PRÖSCHOLD; HARRIS; COLEMAN, 2005; TRAGIN et al., 2016). C. reinhardtii é uma alga verde biflagelada e unicelular, amplamente utilizada como modelo para estudos em diferentes áreas, incluindo genética, bioquímica e biologia celular. Algumas dessas áreas focalizam seus estudos sobre os flagelos e os corpos basais eucariotos que são semelhantes às células dos mamíferos, apesar de sua separação evolutiva em mais de 10⁹ anos (SILFLOW; LEFEBVRE, 2001). Além disso, C. reinhardtii é um microorganismo de fácil cultivo, pois é capaz de crescer heterotroficamente usando acetato como fonte de carbono sem a necessidade de luz ou cultivo mixotrófico, em que ambas as fontes de energia são utilizadas. Além disso, esta microalga unicelular é considerada um microorganismo de rápido crescimento, com um tempo de geração inferior a 10 horas (HARRIS, 2001), podendo ser cultivada em meios líquidos e sólidos, com pH neutro, sem adição de vitaminas e cofatores (BOYLE; MORGAN, 2009; CHEN; MELIS, 2013; TAM; LEFEBVRE, 1993; THERIEN et al., 2014).

Reprodução

A reprodução de *C. reinhardtii* ocorre, usualmente, de maneira assexuada no início da fase G1 de crescimento aumentando o volume celular que pode atingir mais de 10 vezes. No final do ciclo de crescimento, durante as duas fases sucessivas, S e M, começa a produção de duas células filhas. O tamanho da célula determina o número de fases de divisão que uma célula mãe pode ter, uma vez que as grandes células-tronco podem ser divididas mais vezes do que as pequenas. Dependendo das condições de cultura, *C. reinhardtii* pode se dividir em até cinco vezes para produzir um total de 32 células filhas (CROSS; UMEN, 2015). Durante esta reprodução assexuada, um tamanho mínimo deve ser alcançado para a divisão assexuada, sendo estimado em 2,2 vezes o tamanho das células pós-mitóticas (SEED; TOMKINS, 2016; VOIGT et al., 1996).

Em condições de crescimento ótimas, *C. reinhardtii* aumenta o volume celular e, neste caso, o tamanho da célula é limitado pela parede celular. Em um ciclo usual de 12h de luz e 12h escuro, o crescimento ocorre na fase de luz e a divisão celular ocorre na fase escura (CROSS; UMEN, 2015). Se o crescimento não for limitado em nutrientes, *C. reinhardtii* divide-se de forma síncronizada durante o período da escuridão em sucessivas divisões mitóticas, gerando quatro novas células (HARRIS, 2001; PRÖSCHOLD; HARRIS; COLEMAN, 2005).

Na reprodução sexuada, gametas de sexos opostos parecem gerar zigotos diploides, que podem permanecer ativos durante vários meses para germinar quando as condições forem favoráveis. As células, então, passam por um processo de meiose, seguido por uma mitose, gerando células vegetativas haplóides novamente, este ciclo de reprodução pode ser induzido por limitação de nitrogênio (HARRIS, 2001;

PRÖSCHOLD; HARRIS; COLEMAN, 2005; SEED; TOMKINS, 2016). Em condições de luz contínua, por exemplo, as células se dividem a cada 4-8 horas (PRÖSCHOLD; HARRIS; COLEMAN, 2005; SEED; TOMKINS, 2016). Teoricamente, quando a luz está disponível, a fototaxia é usada para otimizar o crescimento. Quando a fototaxia não é necessária, algumas fases da endomitose ocorrem durante o crescimento (CROSS; UMEN, 2015).

Morfologia

C. reinhardtii apresenta uma forma esférica oval e é capaz de se mover devido à presença de dois flagelos que podem ser visualizados na zona apical da célula. Geralmente, dois vacúolos são encontrados entre os corpos basais e o núcleo, sendo este último rodeado por um único cloroplasto em forma de taça que ocupa dois terços da zona basal da célula, onde o pólido é localizado. A matriz extracelular complexa é composta de carboidratos e glicoproteínas ricas em hidroxiprolina e a parede celular não contém celulose. O diâmetro de *C. reinhardtii* pode variar entre 8 a 22 µm, dependendo do ciclo celular (HARRIS, 2001; IMAM; SNELL, 1987).

O pirenóide é uma estrutura de proteína encontrada nos plastídios da maioria das algas. Sob condições de CO₂ limitantes, mais de 90% da RuBisCo é encontrado dentro do pirenóide, sendo responsável pela fixação de CO₂. Abaixo da membrana do cloroplasto, encontra-se o estigma que detecta a luz e oferece a microalga informações da direção e da intensidade, o estigma apresenta carotenóides no seu interior otorgando a esta organela uma intesa cor laranja (BORKHSENIOUS; MASON; MORONEY, 1998).

C. reinhardtii é considerada um organismo que pode ser utilizado como modelo para diferentes estudos morfológicos, gametogênese, fototaxia e estrutura e montagem do flagelo (BERTHOLD et al., 2008; SEED; TOMKINS, 2016; SILFLOW; LEFEBVRE, 2001). Cílio e flagelo são as primeiras organelas celulares a serem desenvolvidas para a mobilidade celular, *C. reinhardtii* também usa flagelos para o reconhecimento celular durante o acasalamento. Estudos revelam 75% de similaridades de proteínas entre o flagelo de *C. reinhardtii* e os espermatozóides humanos (SILFLOW; LEFEBVRE, 2001), o que transforma a microalga em modelo

para estudos flagelares e de reprodução. Esta microalga também é considerada uma plataforma poderosa para o estudo da expressão gênica (RASALA; MAYFIELD, 2015), devido a seus genomas completamente sequenciados (Specht et al. 2010) que apresentam características específicas úteis, como o genoma nuclear rico em GC (64-68 %) e o genoma de cloroplasto rico em AT (FRANKLIN et al., 2002; HARRIS, 2001).

Sistemas de expressão de proteínas heteróloga

Uma variedade de sistemas de expressão vem sendo utilizada para a produção de proteínas heterólogas. Bactérias e leveduras (AIZEMBERG et al., 2011; KNUDSEN et al., 2015) constituem sistemas tradicionais e bem-sucedidos que são freqüentemente usados (GASSER; MATTANOVICH, 2007; LAL; TULASIRAM; JAMEEL, 1997; MILLER et al., 2005). Eles apresentam vantagens, tais como genomas bem caracterizados e fáceis de manipular, bem como cultivo simples e barato em comparação com células de mamíferos. As bactérias, no entanto, apresentam algumas desvantagens, tais como, produção de proteases, ausência de modificações pós-traducionais de proteínas como a glicosilação, entre outras modificações necessárias para a montagem de proteínas mais complexas comprometendo a atividade e vida media das proteínas heterólogas (HUANG; LIN; YANG, 2012; POTVIN; ZHANG, 2010).

As leveduras podem realizar essas modificações porque elas contêm a maquinária do organismo eucariótico (FINGERUT et al., 2005), no entanto, esses sistemas geralmente produzem proteínas hiperglicosiladas (MARTÍNEZ-ANAYA; BALCÁZAR-LÓPEZ; L, 2008) que podem gerar uma resposta imune nos organismos tratados e, conseqüentemente, uma atividade terapêutica baixa ou nula (GONZÁLEZ, 2001). Para superar esses problemas, foram estudadas e aplicadas células de mamíferos, plantas e insetos para a produção de proteínas terapêuticas já aprovadas (WALSH, 2014).

Embora as células de mamífero tenham demonstrado ser uma boa plataforma de expressão para produzir proteínas heterólogas complexas (WURM, 2004), seus meios de cultura são caros (POTVIN; ZHANG, 2010; SCHIRRMANN et al., 2008), as culturas são propensas à contaminação e as células apresentam alta sensibilidade à

tensão de cisalhamento (SCHIRRMANN et al., 2008). As células de insetos são um pouco mais tolerantes às alterações osmóticas do que as células de mamíferos e expressam rendimentos elevados de proteínas recombinantes variando de 0,1% a 50% das proteínas totais. No entanto, eles exigem nutrientes complexos para o cultivo e as culturas são facilmente contaminadas, geralmente devido a infecções causadas por Baculovírus (SCHIRRMANN et al., 2008).

A N-glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais importantes no processo de maturação das proteínas nos sistemas eucariotos. Estas modificações ocorrem no retículo endoplasmático (RE) e terminam no complexo de Golgi. Este processo é semelhante em animais, insetos e plantas. A N-glicosilação é necessária para algumas proteínas porque influencia sua estabilidade, solubilidade, dobramento e atividade biológica. Uma modificação na estrutura de um glicano pode gerar mudanças na atividade ou na vida útil da glicoproteína heteróloga em comparação com a proteína nativa (CHEN et al., 2005; JIN et al., 2015; LEROUGE et al., 1998).

A N-glicosilação das proteínas difere em animais e plantas. Esta modificação pós-tradução em proteínas vegetais começa no RE. A primeira modificação consiste na transferência de um precursor de oligossacarídeos na extremidade amino terminal de um resíduo de asparagina que é constituído por glicose, manose e N-acetilglucosamina (Glc3Man9GlcNAc2). Nos seres humanos, é comum a presença de resíduos de glicoproteínas de galactose terminal de ácido β -terminal (1, 4) e de ácido siálico. Diversamente, as proteínas recombinantes derivadas de plantas possuem resíduos de β (1, 2) -xilose e a (1, 3) -fucose. Assim, o processo de humanização de glicoproteínas expresso em plantas requer a eliminação ou prevenção de fucose, resíduos de xilose e galactose e adição de ácido siálico (ARIAS GÓMEZ, 2012; CHEN et al., 2005; LEROUGE et al., 1998; WILSON, 2002).

Em *C. reinhardtii*, as glicoproteínas encontradas no cloroplasto contém resíduos α (1, 3) -fucose e β (1, 2) -xilose, o que indica que essas proteínas possuem tipo N-glicanos complexos. As reações ocorrem pela ação de fucosiltransferases e xilossiltransferases localizadas no Golgi. Sugere-se que algumas glicoproteínas em *Chlamydomonas* podem ser transportadas para o cloroplasto através do sistema endomembranar, pois ocorre de modo similar ao que acontece em *Arabidopsis* (ARIAS GÓMEZ, 2012). A análise subsequente foi a análise em sílico dos genes em algumas cepas de *C. reinhardtii* que revelou a presença de α -Mannosidase I, α -

Mannosidase II, β (1, 2) - xilossiltransferase, α (1, 3) - fucosiltransferase e a α (1,6) fucosiltransferase. А ausência de sequências ortólogas de GnT (Nacetilglucosaminiltransferase) sugere que o processo de N-glicano é mais simples em C. reinhardtii quando comparado com outros organismos (ARIAS GOMEZ, 2012). Aparentemente, a presença de resíduos de fucose ligados ao N-glicano através de uma ligação α (1, 3), juntamente com a ausência de uma sequência ortotômica de GnT I em linhagens do genoma de C. reinhardtii, sugere a existência de uma via de fucosilação independente do GnT I. Esta via foi descrita anteriormente no nematóide Caenorhabditis elegans (ARIAS GÓMEZ, 2012; PASCHINGER et al., 2004).

Muitos obstáculos ainda precisam ser superados no sentido de aumentar os níveis de expressão de proteínas heterólogas em microalgas como plataforma de expressão. A maioria dos trabalhos são realizados com *C. reinhardtii* devido à todas as vantagens descritas anteriormente. Apesar dos níveis de expressão serem baixos para este sistema, o desenvolvimento da engenharia genética tem gerado proteínas recombinantes totalmente funcionais, como anticorpos em níveis economicamente viáveis (MAYFIELD; FRANKLIN, 2005; POTVIN; ZHANG, 2010; TRAN et al., 2009, 2013). A escolha de um sistema de expressão depende das vantagens relacionadas ao custo de produção do sistema (meios de cultura, biorreator, tempo de processo, mão de obra do homem) e seus possíveis problemas de contaminação e rendimento, bem como a complexidade da proteína de interesse, quando comparados às outras plataformas existentes.

A Tabela 2.1 resume os diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas, incluindo microalgas, com os diferentes aspectos do processo de produção. Observa-se que as microalgas apresentam diversas vantagens quando comparadas a outros sistemas de expressão. Mesmo que os rendimentos não sejam considerados elevados, as expectativas relacionadas a elas são promissoras, também porque *C. reinhardtii* é considerado um sistema emergente e novo neste campo.

			Células de Animais				
	Bacteria	Levedura	mamíferos	transgênicos	Plantas	wicroaigas	
Tempo de produção	Curto	Médio	Longo	Longo	Longo	Curto	
Custo de produção	Médio	Médio	Alto	Alto	Baixo	Baixo	
Custo de escala	Alto	Alto	Alto	Alto	Baixo	Baixo	
Custo do ostocorom	Baixo	Baixo	Alto	Alto	Baixo	Baixo	
Cusio de estocagem	(-20°C)	(-20°C)	NL	NL	ТА	ТА	
Escala de Produção	Limitada	Limitodo	Limitada	Limitada	Pouco	Pouco	
	Linnada	Linnada	Linnada	Linitaua	limitada	limitada	
Propagação	Fácil	Fácil	Difícil	Difícil	Fácil	Muito Fácil	
Distribuição	Factível	Factível	Difícil	Difícil	Fácil	Muito Fácil	
Veículo de entrega	Não	Não	Não	Sim	Possível	Possível	
Tamanho do gene	Desconhecido	Desconhecido	Limitado	Limitado	Não limitado	Não limitado	
Glicosilação	Ausente	Incorreta	Correta	Correta	Diferenças menores	Diferenças menores	
Dobramento de	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim	
proteínas							
Redimento da	Médio	Alto	Médio-Alto	Médio-Alto	Alto	Normalmente	
produção	Sim	Daaaanhaaida	Cim	Sim	Daaaanhaaida	Dagaanhaaida	
RISCO	5	Desconnecido	Sim	Sim	Desconnecido	Desconnecido	
Segurança	Baixa	Desconhecida	Média	Alta	Alta	Alta	
Preocupações éticas	Baixa	Média	Média	Alta	Média	Média	
Sensibilidade ao							
esforço de	Média	Média	Alta	N/D	N/D	Baixa	
cisalhamento							

Tabela 2.1: Comparação entre diferentes sistemas de expressão de proteínas heterólogas (POTVIN; ZHANG, 2010; WALKER et al., 2005; YAN et al., 2016; YAO et al., 2015)

NL= Nitrogênio Líquido TA= Temperatura Ambiente N/D= Não Disponível

Expressão de proteínas heterólogas em Chlamydomonas reinhardtii

Nas últimas décadas, o estudo da produção de proteínas recombinantes tornou-se um tema de grande interesse para a comunidade científica. Neste contexto, algas transgênicas tornaram-se uma plataforma interessante para a produção de proteínas recombinantes. *C. reinhardtii* apresenta vantagens, tais como genomas completamente sequenciados, que permitem transformações genéticas mais fáceis e direcionadas, cultivo fácil, como mencionado anteriormente, e o baixo custo de produção, exigindo apenas a luz solar, meio de cultura mínimo e CO₂ a serem cultivados em escala (GIMPEL et al., 2015; GONG et al., 2011; MAYFIELD et al., 2007; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010).

Em comparação com as plantas, *C. reinhardtii*, como outras microalgas, não precisa de solo arável, porque cresce em meios líquidos, possui uma maior taxa de crescimento com um período de geração de, aproximadamente, 8 horas e a expressão de proteínas heterólogas pode ser alcançada em poucas semanas. Ao comparar o processo de purificação, as plantas apresentam processos mais difíceis do que *C. reinhardtii* (GONG et al., 2011; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010). Como é um sistema eucariótico, *C. reinhardtii* é capaz de produzir proteínas heterólogas que requerem modificações pós-tradução, como a formação de ligações dissulfeto e alguma glicosilação. Além disso, sendo parte do grupo de algas verdes, geralmente, é considerada como segura (GRAS). Por conta dessas vantagens, alguns grupos de pesquisa consideraram *C. reinhardtii* como um sistema interessante para o estudo da produção de proteínas heterólogas (GONG et al., 2011; PURTON; ROCHAIX, 1995; RASALA; MAYFIELD, 2015; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010).

Espécies como *C. reinhardtii, Volvox carteri*, algumas espécies de *Chlorella* e *diatomea Tricornutum phaeodactylum* foram transformadas com sucesso, proporcionando avanços no estudo da engenharia genética (LI et al., 2011). Os métodos mais utilizados para a transformação genética das microalgas são baseados na permeabilização da membrana de microorganismos, de modo que o DNA seja introduzido na célula. Para este fim, técnicas como bombardeio de partículas ou eletroporação são as mais usadas (COLL, 2006; LI et al., 2011; RASALA et al., 2010b; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010). Outra técnica chamada eletroporação em chips PDMS, com sistemas microfluídicos está sendo desenvolvida. Este sistema demonstrou aumentar a eficiência da transformação de cepas de *C. reinhardtii* em duas ordens de grandeza usando cepas selvagens sem a necessidade de equipamentos elétricos de alto custo (QU et al., 2012).

Em 1989, a primeira transformação estável de cloroplasto em *C. reinhardtii* foi obtida com sucesso (BOYNTON et al., 1988). O genoma do cloroplasto de *Chlamydomonas* é de aproximadamente 195 kb, pode ser transformado através de recombinação homóloga (HARRIS, 2001). Para competir com outros sistemas de expressão, o cloroplasto possui um ambiente único, porque contém uma grande variedade de chaperonas e isomerases que permitem o dobramento correto de proteínas que exigem desse tipo de modificação pós-tradução (KIM; MAYFIELD, 1997).

O cloroplasto, em comparação com o núcleo, não é capaz de realizar a glicosilação protéica, uma modificação pós-tradução muito importante em muitas proteínas terapêuticas. Também não apresenta uma via de secreção de proteínas aos meios de cultura, por isso eles requerem um passo adicional para a lisagem celular (DAUVILLÉE et al., 2010; KIM; MAYFIELD, 1997; LEHTIMÄKI; KOSKELA, MINNA; MULO, 2015; RASALA et al., 2010b; TRAN et al., 2009). Algumas das opções de métodos de transformação no núcleo são a agitação com pérolas de vidro e a eletroporação (EICHLER-STAHLBERG et al., 2009). O DNA no núcleo compreende 17 grupos de ligação correspondentes a 17 cromossomos e, como mencionado anteriormente, é caracterizado por seu alto teor de GC (62-64%) (HARRIS, 2001; MERCHANT et al., 2010). O genoma nuclear tem um tamanho estimado de, aproximadamente, 121 Mb, onde o DNA é inserido aleatoriamente e, freqüentemente, gera exclusões de DNA na região inserida, o que causa algumas dificuldades na análise do mutante e, principalmente, na baixa expressão da proteína heteróloga.

Os níveis de expressão de proteína heteróloga dependem de uma variedade de fatores, por exemplo, otimização de códons de proteínas recombinantes, o tipo de promotor, regiões não traduzidas (UTRs), silenciamento de genes, presença de proteases e outras moléculas nos meios de cultivo. Além disso, outro fator importante que pode afetar a expressão heteróloga é a dificuldade de manutenção dos clones em condições seletivas (DORON; SEGAL; SHAPIRA, 2016).

Ambos os genomas do núcleo e do cloroplasto têm uso diferente de códons, uma vez que no cloroplasto há maior ocorrência de nucleotídeos adenina e timina na terceira posição, enquanto no núcleo a guanina e a citosina são predominantes. A Proteína Fluorescente Verde (PFV) foi aumentada em 80 vezes na acumulação de proteína, enquanto no núcleo aumentou apenas 5 vezes, quando os genes recombinantes foram anteriormente códon otimizados (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010). Os níveis de expressão registrados até agora por esta microalga estão na gama de 0,16 a 5% da proteína solúvel total. A Tabela 2.2 apresenta a produção baseada em diferentes genomas transformados (núcleo e cloroplasto) (ALMARAZ-DELGADO et al., 2014; LI et al., 2011).

O promotor é um elemento importante para iniciar o processo de transcrição e os mais aplicados para a expressão de genes em microalgas são: RbcS2, Hsp70, psaD e psbA do gênero *Chlamydomonas*, NR de *Thalassiosira pseudonana*, 35S *Vírus do mosaico da couve-flor* (freqüentemente usado em dinoflagelados) e Fcp de *Phaeodactylum tricornutum* e *Thalassiosira pseudonana* (GONG et al., 2011; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010).

Alguns promotores de fusão tais como HSP70A (proteína de choque térmico 70A) / RBCS2 e HSP70A / β2TUB (β2 tubulina) mostraram aumentar a expressão de proteínas heterólogas no núcleo. Consistentemente, alguns promotores induzíveis, como o NR que codifica uma redutase de nitrato, também foram estudados para a expressão de proteínas. Neste caso, a atividade do promotor é suprimida com a presença de amônia no meio e ativada quando a amônia é substituída por nitrato (LI et al., 2011). A introdução de intrões endógenos também é utilizada como técnica para aumentar a expressão do transgene no núcleo. A inserção de RbcS2 endógeno no gene Ble (confere resistência à zeomicina) aumenta significativamente a expressão do gene Ble (LUMBRERAS; STEVENS; PURTON, 1998). Reforçando esta teoria, um grupo demonstrou que ligar o gene de expressão da xilanase ao Ble no mesmo ORF ("Open Read Frame" ou quadro de leitura aberto) à auto-clivagem do peptídeo 2A resultou em um aumento de 100 vezes na atividade da xilanase (RASALA et al., 2012).

Além dos promotores, as UTR ("Untranslated Regions" ou regiões não traduzidas) foram reconhecidas como fatores cruciais para a expressão de genes heterólogos no cloroplasto de *C. reinhardtii*. Existem algumas UTR comumente utilizadas, como atpA, rbcL e psbD (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010), mas a mais bem sucedida é a UTR psbA em combinação com o promotor psbA (MANUELL et al., 2007) que resultou em 5% de proteínas heterólogas do total de proteínas (Tabela 2.2).

Além da estratégia de maquinaria genética, uma estratégia química também foi testada como alternativa para a acumulação heteróloga de proteínas. Ofereceram

concentrações crescentes de selenocistamina diselenida ao meio de cultivo de *C. reinhardtii* e, ao comparar o acúmulo de três proteínas expressas no cloroplasto, as que continham ligações dissulfeto resultaram em aumento significativo de acumulo, comparado às proteínas sem ligações dissulfeto. Essas experiências sugerem que a formação de ligações dissulfuro também podem ser uma etapa limitante na velocidade de acúmulo da proteína recombinante (FERREIRA-CAMARGO et al., 2015).

E importante notar que a expressão das proteínas recombinantes também pode ser afetada por mecanismos reguladores, como as taxas de síntese protéica ou os mecanismos de degradação. Nas bactérias, as proteases são necessárias para clivar e degradar proteínas anormais (LARA, 2011), o que é um obstáculo ao usar este sistema para a expressão da proteína recombinante. Esse mesmo sistema de degradação de proteínas reconhecidas como não próprias tem sido descrito em microorganismos fotossintéticos, uma vez que a atividade proteolítica mostrou a degradação da proteína D1 armazenada no cloroplasto (PREISS; SCHRADER; JOHANNINGMEIER, 2001). Por outro lado, a expressão de vacinas em microalgas pode ser afetada por este processo (PREISS; SCHRADER; JOHANNINGMEIER, 2001; SURZYCKI et al., 2009a).

Chlamydomonas reinhardtii como plataforma alternativa para a produção de biomoléculas

A Tabela 2.2 apresenta biomoléculas que foram expressas com sucesso em *C. reinhardtii.* Os dados atuais exibidos nesta tabela apontam que o promotor psbA é amplamente utilizado para a transformação do cloroplasto de microalgas. Este promotor é um poderoso fotoinibitor, uma vez que inibe a produção da proteína D1 que é essencial para a atividade do fotossistema II. O maior nivel de expressão de proteína heteróloga foi de 20,9% da porcentagem de proteína total (SURZYCKI et al., 2009b) mas, é relevante observar que a média de expressão é de 2,1% (Tabela 2.2). Por outro lado, a expressão mais baixa foi de 0,05% quando o promotor CaMV35S foi utilizado para a expressão de Angiotensina II fundida contra o antígeno da cápside do vírus da Hepatite B (HBcAg) (SORIA-GUERRA et al., 2014), seguida de Gregory et al. (2013) e Tran et al. (2013) (Tabela 2.2), que expressaram, respectivamente, CtxB-Pfs25 (0,09%) e CD22CH23Gel (0,1-0,2%), ambos os genes heterólogos conduzidos

pelo promotor psbA. É importante notar que a maioria das proteínas foram clonadas no cloroplasto e apenas três delas no núcleo.

Tabela 2.2: Resumo das biomoléculas expressas em *Chlamydomonas reinhardtii*, organela geneticamente transformada, percentual de expressão (%) da proteína solúvel total, concentração em miligramas por litro (mg / L) e vetor de clonagem.

Proteínas Heterólogas	*** (%) Da Proteína total	Expressão (mg/l)	Vetor
	solúvel	(9, –)	
14FN3 (Décimo quarto domínio da fibronectina tipo III humano) (ch) **	3	UN*	psbA / D1 Linhagem deficiente em D1 (RASALA et al., 2010a)
VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular humano) (ch) **	2	UN*	psbA / D1 Linhagem deficiente em D1 (RASALA et al., 2010a)
HMGB1 (Proteína do grupo de mobilidade elevada B1) (ch) **	2.5	UN*	psbA / D1 Linhagem deficiente em D1 (RASALA et al., 2010a)
Endolisinas – Pal e Cpl1	1	1.3 mg/g de peso seco celular	Sitio de inserção psbH / Vetor pSRSap / Promotor psaA (STOFFELS et al., 2017)
Hormônio de crescimento	UN*	0.5	Sitio de inserção psbH / Vetor pASapl / Promotor psaA e atpA (WANNATHONG et al., 2016)
14FN3 (Décimo quarto domínio da fibronectina tipo III humano) (ch) **	0.21	UN*	16S atpA / (RASALA et al., 2011)
Xilanase (nu)**	0.25	UN*	Ble 2A sistema de expressão (RASALA et al., 2012)
Imunotoxina (αCD22HCH23PE40) (ch) **	0.2-0.3	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (TRAN et al., 2013)

CD22 (Anticorpo de cadeia simples (scFv) dirigido contra o antígeno de superfície celular CD22) (ch)**	0.6-0.7	UN*	psbA / Linhagem deficiente (TRAN et al., 2013)
CD22Gel (CD22-scFv Geneticamente ligado à gelonina, uma proteína inativadora de ribossomos de <i>G. multiflorum</i>) (ch) **	0.2-0.3	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (TRAN et al., 2013)
CD22CH23Gel (CD22-scFv geneticamente fusionado) (ch) **	0.1-0.2	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (TRAN et al., 2013)
M-SAA (Proteína milóide A sérica bovina) (ch) **	5	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (MANUELL et al., 2007)
Imunotoxina (αCD22HCH23PE40) (ch) **	3.0-4.0	0.3-0.4	psbA / Linhagem deficiente em D1 (MANUELL et al., 2007)
CtxB-Pfs25 [Uma proteína quimérica constituída por 25-kDa Proteína de superfície do <i>Plasmodium falciparum</i> (Pfs25) fundida na subunidade do Toxina da cólera (CtxB)] (ch)* *	0.09	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (GREGORY; DOERNER; MAYFIELD, 2013)
PFs25 (25-kDa Proteína de superfície do <i>Plasmodium</i> falciparum) (ch) **	0.5	125	psbA / Linhagem deficiente em D1 (GREGORY; DOERNER; MAYFIELD, 2013)
PFs28 (28-kDa Proteína de superfície do <i>Plasmodium</i> falciparum) (ch) **	0.2	50	psbA / Linhagem deficiente em D1 (GREGORY et al., 2012a)
variable domains of camelid heavy chain only antibodies (VHH) (ch) **	up to 5	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (RASALA et al., 2014)
Proteína sintética NCQ contendo péptidos bioativos que apresentam	0.16-2.4	UN*	Sitio de inserção tscA / Promotores rbcL or atpA

diferentes atividades (Anti- hipertensivo, antioxidante, antimicrobiano, opioide e hipocolesterolêmico) (ch)**			(CAMPOS-QUEVEDO et al., 2013)
Decarboxilase de ácido glutâmico humano 65 (Hgad65) (ch) **	0.25-0.3	UN*	psbA exon V - 5s rRNA região intergênica / pXW- GAD-His vetor / rbcL promotor (WANG et al., 2008)
Proteína de fusão compreendendo a proteína VP1 do vírus da febre aftosa e a subunidade B da toxina da cólera (CTBVP1) (ch) **	3-4	≈ 40****	Sitio de inserção chIL / Vetor pACTBVP1 / Promotor atpA (SUN et al., 2003)
Proteína de fusão compreendendo o domínio de ligação de fibronectina D2 de <i>staphylococcus aureus</i> e a subunidade de toxina B de cólera (CTBD2) (ch) **	0.7	260	Sitio De inserção tscA / Promotor rbcL (DREESEN; HAMRI; FUSSENEGGER, 2010)
Proteína estrutural E2 do vírus da peste suína clássica (ch) **	1.5-2.0	UN*	Sitio de inserção chIL / Vetor p64E2 / Promotor atpA (HE et al., 2007)
Eritroproteína Humana (nu)**	UN*	0.1	Sitio de inserção aleatória / Vector de expressão no plasmídeo pEPO6 / HSP70A/ Promotor tandem RBCS2 (EICHLER-STAHLBERG et al., 2009)
HSV8-1sc e HSV8-scFv Anticorpo humano IgA monoclonal anti-herpes, grande cadeia única (Lsc) e um fragmento anticorpo (scFv) de cadeia única variável) (ch)**	0.5	UN*	p322- <i>atpA</i> -HSV8 / Vetores p322- <i>rbcL</i> -HSV8 / Promotores atpA ou rbcL (MAYFIELD; FRANKLIN; LERNER, 2003)
Indução de apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral humana (TRAIL) (ch) **	0.43-0.67	UN*	Sitio de inserção chIL / Vetor p64TRAIL / Promotor atpA (YANG et al., 2006)

Anticorpo monoclonal humano (mAb), contra o antígeno protetor de antrac 83 (PA83); Potencialmente bloqueia os efeitos da toxina do antraz (ch) **	UN*	100 µg of Proteína purificada por 1 g de biomassa de algas seca	psbA / Linhagem deficiente em D1 (TRAN et al., 2009)
Proteína VP28 do vírus da síndrome da mancha branca (ch)**	0.2 to 20.9% proteína celular total (0.1 to 10.5%TSP)	UN*	Sitio de inserção 16S / Vetores pBA155 pSR229 / Promotores psbA e atpA (SURZYCKI et al., 2009a)
Proteína de superfície de <i>P. falciparum</i> Pfs48/45 domínio C-terminal (ch) **	UN*	UN*	psbA / Linhagem deficiente em D1 (JONES et al., 2013)
Proteína E7 humana de papilomavírus tipo 16, mutante atenuado (E7GGG) (ch) **	0.12	UN*	Sitio de inserção aleatorio / Vetor pCG2 / Promotor psbD (DEMURTAS et al., 2013)
Angiotensina II fundida com o antígeno da cápside do vírus da hepatite B (HBcAg) (nu) **	0.05	UN*	Local de inserção aleatório / Vetor HBcAgl / Promotor CaMV 35S (SORIA-GUERRA et al., 2014)

Até a presente data, mais de 20 proteínas terapêuticas foram expressas com sucesso em microalgas, principalmente em *C. reinhardtii* (LI et al., 2011) que se mostra uma plataforma de expressão versátil. Em um estudo realizado em 2011, esta microalga foi investigada para a expressão no cloroplasto de 7 proteínas humanas recombinantes, incluindo eritropoietina humana, fibronectina humana, interferon B1 humano, proinsulina humana, fator de crescimento endotelial (VEGF) e proteína de mobilidade B1 (HMGB1). Os níveis de expressão de mRNA foram comparados para cada proteína e observou-se que pelo menos 5 das 7 proteínas tinham valores de expressão detectáveis e 3 deles tinham proteínas acumuladas acima de 1% (RASALA et al., 2010a). Uma variedade de biomoléculas foi expressa em *C. reinhardtii*:
antimicrobianas (STOFFELS et al., 2017), nutracêuticas (MANUELL et al., 2007), hormônio de crescimento (WANNATHONG et al., 2016) e enzima industrial (RASALA et al., 2012). Mesmo que sejam todas biomoléculas comercialmente interessantes, *C. reinhardtii* apresenta características emergentes que tornam este organismo único como uma plataforma de expressão heteróloga. Seu cloroplasto foi revelado como um excelente ambiente para a produção de imunotoxinas (TRAN et al., 2013), vacinas (GREGORY et al., 2012b; GREGORY; DOERNER; MAYFIELD, 2013) e anticorpos (MAYFIELD; FRANKLIN; LERNER, 2003) que são difíceis de produzir em outros sistemas.

As imunotoxinas são anticorpos que podem ser fundidos geneticamente ou quimicamente com toxinas eucarióticas ativas. Essas moléculas quiméricas direcionan a toxina à células cancerosas que iniciam a apoptose. As imunotoxinas geneticamente fundidas não podem ser produzidas e acumuladas em sistemas eucarióticos tradicionais como células CHO, leveduras ou células de insetos, porque a toxina inibiria a proliferação dessas células. Curiosamente, o cloroplasto de algas devido à sua origem procariótica e à presença de proteínas nucleares importadas, é capaz de manipular a expressão complexa da proteína, como imunotoxinas, sem efeitos deletérios devidos à porção de toxina da proteína (ALMARAZ-DELGADO et al., 2014; TRAN et al., 2013).

Um grande anticorpo de cadeia simples (Isc) dirigido contra uma glicoproteína do vírus herpes simplex D (HSV8) foi expresso com os promotores atpA e rbcL no cloroplasto (MAYFIELD et al., 2003). Neste plastídio, o anticorpo Isc forma ligações dissulfeto e, embora não contenha modificações pós-traducionais, demonstrou-se, por ensaios ELISA, que se liga ao vírus do herpes simplex D (HSV8) (MAYFIELD; FRANKLIN; LERNER, 2003).

O cloroplasto de *C. reinhardtii* também é uma ótima alternativa para a produção de proteínas como vacinas (Tabela 2.2). Observou-se que os ratos alimentados durante 5 semanas com microalgas transformadas expressaram a proteína D2 com um domínio de ligação da fibronectina de *Staphylococcus aureus*, fundido com a toxina B da cólera promoveram a proteção de 80% dos ratos contra a infecção. Além disso, foi descrito por outros autores que vacinas à base de microalgas podem ser mantidas por, aproximadamente, 18 meses à temperatura ambiente. Alguns estudos realizados com outras moléculas apresentaram resultados satisfatórios, no entanto, a

utilização das microalgas como vacinas orais em humanos ainda não possui evidência científica capaz de assegurar seu uso. (DREESEN; HAMRI; FUSSENEGGER, 2010).

Historicamente, as plantas, como organismos fotossintéticos, foram utilizadas como plataforma para a produção de vacinas. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) concluiu que as diretrizes existentes para o desenvolvimento e avaliação de vacinas poderiam ser aplicadas às plantas. No entanto, incidentes negativos como o ocorrido com a Prodigene Corp., em 2009, começaram a causar preocupação pública, uma vez que o Departamento de Agricultura dos EUA multou a empresa e exigiu que vários produtos projetados para vacinas orais fossem descartados (RYBICKI, 2009). Além disso, o uso de vacinas feitas em plantas pode ser arriscado para a saúde humana, considerando que elas podem causar tolerância oral, alergenicidade, dosagem inconsistente, exposição ao trabalhador e exposição acidental a antígenos. Mesmo que esses riscos fossem controlados (KIRK et al., 2005), haveria a necessidade de uma padronização de processos para garantir a não toxicidade, a estabilidade e o conteúdo de antígenos, resultando em custos e prazos adicionais para comercialização destes produtos (RYBICKI, 2009). Embora o panorama não seja muito encorajador, estão surgindo novas tecnologias, como o uso de C. reinhardtii para a produção de vacinas. Quando comparadas às plantas, as linhagens transformadas por microalgas são muito estáveis e mais fáceis e rápidas de obter (MAYFIELD; FRANKLIN; LERNER, 2003; SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010); existe um risco muito menor de fluxo de genes, como já foi relatado, para uma variedade de culturas de plantas (BUSCONI et al., 2014; LOUREIRO et al., 2016); eles podem ser cultivados em fotobiorreactores contidos, reduzindo o risco de ataque de predadores ou patógenos e o processo de purificação é potencialmente mais simples, uma vez que o volume de biomassa é menor e há a compressão de apenas um tipo de célula (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010; YAO et al., 2015).

De modo diferente do cloroplasto, o núcleo consegue direcionar as proteínas ao meio de cultivo mediante peptídeos sinais, porém, tem sido descrito menor expressão de proteína no núcleo de *C. reinhardtii* comparada com a expressão do clorosplasto. Um exemplo é a eritropoietina, um pequeno hormônio que exibe duas ligações dissulfeto e específica N- e O-glicosilação em quatro posições na sua forma madura. Para ser expresso com êxito, o gene humano que codifica a proteína da

eritropoietina foi dividido artificialmente em dois exões e adaptado ao uso do códon nuclear de *C. reinhardtii*, e foi secretado no meio de cultivo satisfatoriamente (Tabela 2.2) (EICHLER-STAHLBERG et al., 2009).

Outra proteína expressa no núcleo foi produzida por Rasala et al (2012). Eles demonstraram que as cepas de *C. reinhardtii* transformadas com ble-2A-GFP eram resistentes à zeocina e acumulavam altos níveis de GFP citosólica que foi detectada pela análise de fluorescência. Este vetor ble-2A foi utilizado para expressar um gene, codificando para a enzima xilanase industrial que resultou em um grande aumento (cerca de 100 vezes) nesta atividade enzimática.

2.3 CONCLUSÃO

O desenvolvimento humano está intrinsecamente relacionado com nossa capacidade de usar organismos vivos para nosso benefício, desde alimentos até fabricação de nanomateriais curativos (YAO et al., 2015). De fato, o uso de organismos vivos em bioprocessos e produtos é uma parte importante da economia atual, movendo € 2 trilhões e empregando mais de 22 milhões de pessoas em 2015 na Europa (CRISTÓBAL et al., 2016). Somente nos Estados Unidos, a bioeconomia gerou US \$ 369 bilhões e 4 milhões de empregos diretos em 2013, com estimativas anuais de crescimento do emprego de 2% (GOLDEN et al., 2015). Neste contexto, a bioeconomia das microalgas é inserida. O mercado mundial de microalgas está crescendo de forma constante, aproveitando em 1999 uma produção de peso seco de 1000 toneladas, com um aumento de 500% na produção nos próximos 5 anos, atingindo um valor de mercado de € 1 bilhão. Em 2011, o mercado global de microalgas aumentou para € 2,4 bilhões, com uma produção de 9000 toneladas de peso seco. No entanto, quando comparado com algumas commodities, como o trigo, a produção de microalgas representa apenas 0,001% em peso. Além disso, apesar de sua possível aplicação em outros nichos, mais de 75% do volume de produção de produtos à base de microalgas são direcionados ao mercado de alimentos saudáveis, como suplementos alimentares (CHACÓN-LEE; GONZÁLEZ-MARIÑO, 2010).

No entanto, o emprego de cepas recombinantes pode apresentar-se como uma oportunidade para este mercado, seguindo o exemplo de outra classe de

microorganismos, como o uso de tecnologias recombinantes para a produção de uma antimaláricapor levedura (PADDON et al., 2013) ou a produção de outros produtos de alto valor através da tecnologia recombinante (GANGL et al., 2015). De fato, a tecnologia das microalgas tem um longo caminho a seguir para atingir as demandas do mercado, como o rendimento do produto, proteção de culturas, extração de produtos e desenvolvimento de bioprocessos. No entanto, apesar de demandar tempo, esse caminho tem grandes expectativas, uma vez que várias tecnologias ainda não foram amplamente aplicadas às microalgas e, menos ainda, às microalgas recombinantes, como tem sido para outros microorganismos (COOPER et al., 2014; STEENSELS et al., 2014). Por exemplo, a tecnologia de reprodução, amplamente disseminada para o desenvolvimento de culturas não tem sido muito aplicada em microalgas, mesmo com o sucesso em culturas como milho, trigo e soja. Ainda assim, as microalgas retêm vantagens de interesse em termos de velocidade de desenvolvimento em comparação com plantas superiores, como um ciclo de vida mais curto, o fato de serem organismos unicelulares simplificam os métodos de transformação e permitem metodologías de alto rendimento para triagem, além de simplificar a mutagênese por UV ou química (LARKUM et al., 2012). Embora os programas de desenvolvimento estejam pouco focados, devido ao pouco conhecimento do ciclo de vida das microalgas (CARRIER et al., 2014), isso só demonstra a importância da pesquisa básica para a tecnologia de microalgas.

Além disso, as técnicas recombinantes, como a recombinação homóloga, são importantes no desenvolvimento de microalgas recombinantes, embora apenas esteja disponível para a modificação do cloroplasto no organismo modelo *C. reinhardtii.* A recombinação homóloga permite uma ampla coleção de técnicas de alto rendimento para o desenvolvimento de cepas produtoras, como a triagem celular ativada por fluorescência (KATO; YOSHIZUKA; PARK, 2010). As cepas poderiam ser desenvolvidas com proteínas repórter simples para detectar proteínas tais como proteínas fluorescentes, sendo posteriormente substituídas pela proteína desejada com recombinação homóloga. Ferramentas inovadoras estão sendo desenvolvidas neste sentido, como o sistema CrispR Cas9 para microalgas (NYMARK et al., 2016; SHIN et al., 2016; WANG et al., 2016) que tem potencial para auxiliar a recombinação homóloga de proteínas heterólogas (DICKINSON et al., 2013).

Outro ponto a ser abordado na tecnologia de microalgas é o desenvolvimento de kit robusto de ferramentas recombinantes para uma maior variedade de espécies de microalgas. De entre as espécies recombinantes estudadas estão Chlamydomonas reinhardtii, uma microalga de água doce verde, que possui um bom desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular. Por essa razão, C. reinhardtii tem sido utilizada como plataforma para a produção de proteínas heterólogas (EICHLER-STAHLBERG et al., 2009; MAYFIELD et al., 2007; RASALA; MAYFIELD, 2011), conseguindo uma produtividade economicamente viável na expressão em cloroplasto (Tabela 2.2) (MAYFIELD et al., 2007). A expressão nuclear, apesar de suas características interessantes, como a modificação pós-traducional complexa e a capacidade de secreção, não alcançou níveis economicamente viáveis de expressão protéica (Tabela 2.2). No entanto, na última década, o desenvolvimento de vetores apresentou algum progresso, utilizando técnicas como a otimização de códons e o desenvolvimento de vetores de expressão apropriados (FUHRMANN; OERTEL; HEGEMANN, 1999; HEITZER; ZSCHOERNIG, 2007). Apesar do grande salto exigido para a expressão da proteína nas microalgas, o interesse econômico é desejável, as estratégias recombinantes apresentam aumento de alto rendimento. Por exemplo, o emprego de intrões endógenos de RuBisCo aumentou os níveis de expressão de proteínas heterólogas em até 450% (EICHLER-STAHLBERG et al., 2009). Embora C. reinhardtii seja uma plataforma tão valiosa para a expressão da proteína, outras espécies de microalgas ainda não foram avaliadas, apesar de algumas tentativas (CARRIER et al., 2014).

Além disso, é necessário enfatizar que o desenvolvimento do processo de produção de proteínas heterólogas não termina com a seleção das linhagens recombinantes. O processo de produção e a ampliação dos estudos são essenciais para tornar esta tecnologia viável e competitiva no futuro, uma vez que já foi demonstrada que os rendimentos podem ser incrementados com estudo de processos em cultivos alimentados (FERREIRA et al., 2012) ou em processos contínuos (MATSUDO et al., 2011). Para o incremento desses rendimentos, foram aplicados parâmetros importantes como temperatura, pH, concentração de CO₂, agitação, intensidade da luz, processos de purificação, entre outros. (POTVIN; ZHANG, 2010). O desenvolvimento de meios de cultivo de alto rendimento ainda encontra-se em fases iniciais de estudo, sendo que as iniciativas para desenvolver meios mais adequados

para cepas não-OGM estão começando a aparecer (DICKINSON et al., 2013; RADZUN et al., 2015). Essas mesmas técnicas podem ser aplicadas à cepas recombinantes, que resultará em um impacto positivo na produtividade da proteína recombinante.

CAPÍTULO 3: EFEITO DOS MACRONUTRIENTES DO MEIO DE CULTIVO TAP PARA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE *mCherry POR* CHLAMYDOMONAS REINDHARRTII

RESUMO

Este trabalho tem como finalidade estudar as melhores condições do cultivo da microalga Chlamydomonas reindhartii geneticamente modificada para a produção da proteína fluorescente mCherry a partir do estudo dos macronutrientes contidos no meio de cultivo. A proteína mCherry possui a vantagem de ser facilmente detectada no meio de cultivo por espectofotometria convencional, tornando-se, desta forma, em uma molécula interessante para o estudo como modelo de expressão. Inicialmente, foram estudadas três diferentes fontes de nitrogênio para avaliar a expressão da proteína recombinante. Em seguida, para avaliar os efeitos gerados pelos macronutrientes (acetato, cloreto de cálcio, sultato de magnésio, nitrato de amônio e fostato total) contidos no meio de cultivo TAP, foi realizado um planejamento composto central rotacional 2⁵, em cultivos em microplacas, sendo os resultados avaliados por regressão multivariada. Os resultados indicaram que a melhor fonte de nitrogênio foi o NH4NO3 para produção de mCherry. Além disso, a análise realizada por regressão multivariada indicou que, dos níveis avaliados das variáveis, as condições que melhor atendem à otimização da produção de mCherry e crescimento celular são: acetato, 33,345 mM; cloreto de cálcio, 0,450 mM; sulfato de magnésio, 0,830 mM; nitrato de amônio, 10,310 mM; fosfato total, 1,960 mM. Essas condições foram escolhidas para cultivo em fotobiorreator tubular, onde foi obtido título de fluorescência de m Cherry a 608 nm de 59209, correspondendo a um aumento de 118,5% maior que o título de fluorescência obtido com uso de meio TAP padrão.

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii.* Proteínas heterólogas. Microalgas. Fotossíntese. Produção. Mixotrópico. m*Cherry.*

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de proteínas heterólogas, nas últimas décadas, tem sido alvo de vários estudos (AHMAD et al., 2014; ARIAS et al., 2017; CHEN et al., 2005; KANG et al., 2015; MANUELL et al., 2007; WURM, 2004), sendo que são descritos, para este fim, dois sistemas de expressão: eucariótico e procariótico. O sistema procariótico possui algumas vantagens como a fácil obtenção dos clones e os altos rendimentos de expressão. Por outro lado, quando algumas proteínas eucarióticas foram expressas em procariotos, resultaram em desvantagens como corpos de inclusão, baixo dobramento de proteínas no citoplasma, mínimas modificações pós-tradução e produção de endotoxinas (KODATI; DORBHA; KUNAPARAJU, 2016).

No entanto, microrganismos procarióticos destacam-se na produção de proteínas heterólogas. *Escherichia coli,* por exemplo, aparece em evidência por ter sido o microorganismo selecionado para a produção da primeira proteína heteróloga utilizada em humanos (insulina humana) pela empresa *Genentech*, sendo considerada uma das primeiras escolhas para produção de proteínas heterólogas (BRIAND et al., 2016; LARA, 2011).

Aproximadamente 70% dos produtos farmacêuticos gerados a partir de proteínas heterólogas produzidas mundialmente são viabilizados em células de mamíferos, sendo que, as células imortalizadas de ovário de hamster chinês (CHO) são as mais utilizadas para produção de proteínas heterólogas (WURM, 2004). Estudos demonstram que a viabilidade celular é mantida por até três semanas neste tipo de sistema, e que os rendimentos acumulados atingiram produções de 4,7 g/L com produtividades específicas de ~90 pg/célula/dia. Já para alguns tipos de anticorpos recombinantes, a produtividade específica ficou na faixa de 20-80 pg/célula/dia. Segundo Wurm (2004), cultivos como estes devem ser direcionados para processos semicontínuos e contínuos em que têm sido atingidas elevadas concentrações celulares (WURM, 2004).

No entanto, outros sistemas de expressão estão sendo estudados para a produção deste tipo de biomoléculas. Por exemplo, estudos vêm sendo realizados com células de inseto com o intuito de melhorar a glicosilação e fazer com que este sistema se aproxime mais da glicosilação em humanos (YU et al., 2016). Outro sistema muito estudado é o que se constitui de leveduras, que já demonstrou produzir

grande número de biomoléculas, como anticorpos e os fragmentos de anticorpos (ARIAS et al., 2017).

Nas últimas décadas, outros sistemas tem se tornado interessantes para a produção de proteínas heterólogas, como é o caso da microalga verde *Chlamydomonas reindhartii*, sistema que possui grandes vantagens para a produção deste tipo de bioprodutos (DORON; SEGAL; SHAPIRA, 2016; FERREIRA-CAMARGO et al., 2015; MANUELL et al., 2007; RASALA et al., 2010a), como seu rápido crescimento (SPECHT; MIYAKE-STONER; MAYFIELD, 2010), as modificações póstradução (GONG et al., 2011; RASALA; MAYFIELD, 2015), o baixo custo de escalonamento, entre outras (POTVIN; ZHANG, 2010; WALKER et al., 2005; YAN et al., 2016).

C. reindhartii constitui, como mencionado anteriormente, uma alternativa promissora como sistema de expressão para a produção de proteínas recombinantes visadas para serem utilizadas terapeuticamente em mamíferos (RASALA et al., 2013). Um dos motivos mais importantes para estudar outros sistemas de expressão é o custo de produção. Sabe-se que os custos de produção das microalgas são baixos, quando comparados com células de mamíferos. Em consonância, as linhagens transgênicas deste tipo de microalgas são obtidas rapidamente, além de serem estáveis no tempo (MANUELL et al., 2007), diminuindo o tempo de obtenção e baixando os custos experimentais.

No entanto, considerando que a produção de proteínas heterólogas em microalgas é uma tecnologia relativamente nova, estudos são necessários no sentido de solucionar problemas, como aumentar os rendimentos, otimizar as vias de secreção de proteínas recombinantes ou a glicosilação realizada por estes microrganismos, entre outros. Desta forma, a partir do momento em que os estudos oferecerem resultados conclusivos, a produção de proteínas heterólogas por microalgas poderá ser competitiva em relação às células CHO (MATHIEU-RIVET et al., 2014).

Meios de cultivo otimizados para o crescimento e a produção de proteínas heterólogas para microalgas configuram-se como um fator importante no melhoramento dos rendimentos e da produtividade dos processos. Microalgas são capazes de se adaptar à diferentes condições nutricionais e ambientais. Desta forma, quando os elementos essenciais para a vida como carbono, nitrogênio, e fósforo variam dentro do meio de cultivo, as microalgas se adaptam a essas mudanças. Um nutriente em baixas concentrações ou na sua forma não solúvel pode gerar baixo crescimento; de modo contrário, nutrientes que são fornecidos em quantidades excessivas podem propiciar efeitos tóxicos dentro das células (RADZUN et al., 2015).

A otimização de meios de cultivo baseia-se em experimentos para otimizar as concentrações de nutrientes que podem suportar os microrganismos e, dessa forma, aumentar as concentrações celulares e as velocidades de crescimento (MATELES; BATTAT, 1974). Estes processos podem ser visualizados em diferentes cultivos celulares como leveduras (PFANNEBECKER et al., 2016) ou células animais (JERUMS; YANG, 2005).

No âmbito da biotecnologia, um dos grandes êxitos constitui-se no aproveitamento das proteínas fluorescentes, utilizadas para uma diversidade de aplicações, como a funcionabilidade dos promotores de expressão, a localização, dinâmica e a interação das proteínas (GONZALEZ; PETRUCCELLI, 2010; RASALA et al., 2013), a marcação de órgãos e organelas, entre outras possibilidades. Devido à sua versatilidade, estas proteínas são indispensáveis no campo da pesquisa biológica, mas as metodologias para o seu aproveitamento ainda se encontram em estágios iniciais de estudo no campo da biotecnologia com microalgas (RASALA et al., 2013).

A proteína m*Cherry* é uma das proteínas fluorescentes mais trabalhadas na área das ciências biológicas das últimas décadas. Considerada uma variante direta da mRFP1, m*Cherry* possui excitação máxima de 587 nm, emissão máxima de 610 nm e coeficiente de extinção de 72.000 M⁻¹ cm⁻¹ (LEE; LIM; THORN, 2013; SHANER et al., 2009). A proteína m*Cherry* tem sido empregada em diferentes áreas e em diferentes pesquisas, facilitando a quantificação, o acompanhamento de processos, a marcação de organelas, entre outras ações (LARINA et al., 2010; NELSON; CAI; NEBENFÜHR, 2007; NORRIS et al., 2015; PUMPLIN; HARRISON, 2009).

Nesse contexto, o trabalho objetiva estudar os efeitos gerados pelos macronutrientes (acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, fosfato total, bem como fonte de nitrogênio) no crescimento de *C. reindhartii* e na produção da proteína heteróloga m*Cherry* por este microrganismo.

A escolha pela proteína heteróloga m*Cherry* se justifica em decorrência de sua versatilidade que a torna um alvo de estudo interessante como modelo para a produção de proteínas heterólogas pela microalga *Chlamydomonas reindhartii*.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos

A linhagem de *Chlamydomonas reindhartii* produtora da proteína heteróloga m*Cherry* pJP30 foi obtida no trabalho de doutorado de João Victor Dutra Molino e foi gentilmente doada por ele para o estudo de cultivo neste projeto (MOLINO, 2017). Também foi utilizada uma cepa selvagem de Chlamydomonas *reindhartii cc* 1690.

Meios de cultivo

O meio de cultivo padrão TAP foi utilizado como ponto de partida para a realização do estudo dos efeitos dos macronutrientes na produção da proteína heteróloga m*Cherry* por *C. reindhartti* geneticamente modificada. O preparo do meio de cultivo foi realizado como segue. Foram misturados 10 mL L⁻¹ de solução estoque A (500 mL) contendo NH₄Cl 20g, CaCl₂ 2,5g, MgSO₄ ·7H₂O 5g. Foi adicionado 1mL L⁻¹ partindo de uma solução tampão estoque (100 mL) contendo K₂HPO₄ 10,8g, KH₂PO₄ 5,6g. Foi adicionado ácido acético glacial 1mL L⁻¹, uma solução contendo 20mL L⁻¹ de Tris base 1M e, finalmente, 1mL L⁻¹ de micronutrientes, segundo Hutner 1950 (HUTNER et al., 1950).

No estudo das fontes de nitrogênio, todas as fontes de nitrogênio tiveram suas concentrações fixadas mantendo a molaridade inicial de nitrogênio no meio de cultivo TAP padrão, que utiliza NH₄Cl como fonte de nitrogênio. Por outro lado, quando foi avaliada a superfície de resposta do planejamento composto central 2⁵, foram mantidas as molaridades do meio TAP padrão como o ponto central, de nível codificado 0 (zero) do desenho experimental. A partir disso, todos os componentes foram diminuídos 10 vezes para o ponto -2,378. A partir desses dados, foram feitos

os cálculos para os pontos -1,+1, e +2,378. Os micronutrientes e o Tris base foram fixados nas concentrações do meio padrão. Após o preparo dos meios de cultivo, estes foram esterilizados por calor úmido por 20 min 121°C e inoculados assepticamente nas microplacas. Nos cultivos em fotobiorreator, foi utilizado o meio otimizado simultaneamente para a produção de *mCherry* e crescimento celular, bem como foi utilizado o meio TAP padrão para fins de comparação dos resultados.

Cultivos em Microplaca

Avaliação da fonte de nitrogênio

No estudo, foram testadas três fontes de nitrogênio diferentes (NH₄)NO₃, NaNO₃, e NH₄Cl. O objetivo foi avaliar o efeito destas no crescimento da microalga e na produção da proteína heteróloga. O crescimento celular foi acompanhado pela absorbância a 750nm e correlacionadas com a massa seca com a absorbância a partir de uma curva de calibração realizada previamente. Todos os cultivos foram realizados em microplaca de 96 poços preta (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA). O volume final foi de 200 µl para todos os ensaios, sendo constituído de 180 µl de meio de cultivo e 20 µl de inóculo com densidade ótica inicial de cultivo de 0,1. A agitação foi mantida em 850 rpm no agitador rotativo de microplacas CAT 02-217-757 da Thermo Fisher Scientific INC (MP Shaker) Fisher Scientific AG – (Neuhofstrasse 11 - CH 4153 Reinach – Suisse). A iluminação foi mantida constante em (50 ± 10 µmol de fótons m⁻ ²s⁻¹), a temperatura foi ajustada a 25° ± 1° C e o tempo final do cultivo foi de 66 horas. A fluorescência da m*Cherry* foi analisada utilizando um leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça) excitando em um comprimento de onda de 575 nm e analisando a emissão em 608 nm.

Avaliação dos Macronutrientes no crescimento e na produção de mCherry

O planejamento composto central rotacional 2⁵ foi realizado para avaliar os efeitos gerados pelos macronutrientes na produção de proteínas heterólogas, tendo como modelo de estudo a proteína m*Cherry*. As variáveis independentes analisadas

foram acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de amônio e fosfato total (soma das molaridades de K₂HPO₄ e KH₂PO₄), e as variáveis resposta foram fluorescência da proteína heteróloga e concentração celular final. O estudo foi conduzido em microplacas de 96 poços preta (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA), o volume final foi de 200 µl para todos os ensaios, sendo constituído de 180 µl de meio de cultivo e 20 µl de inóculo com densidade ótica de cultivo inicial de 0,1 a 750nm. A agitação foi mantida em 850 rpm no agitador rotativo de microplacas CAT 02-217-757 da Thermo Fisher Scientific INC (MP Shaker) Fisher Scientific AG – (Neuhofstrasse 11 - CH 4153 Reinach – Suisse). A iluminação foi mantida constante em (50 ± 10 µmol de fótons m⁻²s⁻¹). Neste caso, o tempo final do cultivo foi de 120 horas. A temperatura foi mantida em 25° ± 1° C. O estudo foi conduzido por duplicata experimental e todas as observações foram analisadas com 5 repetições analíticas para cada ponto. A fluorescência da m*Cherry* foi analisada utilizando um leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça) excitando em um cumprimento de onda de 575 nm e analisando a emissão em 608 nm.

Desenho experimental e análise dos resultados

As análises estatísticas foram feitas no programa Statística 13. O planejamento composto central rotacional 2^5 (MATEUS et al., 2001) teve como variáveis independentes as concentrações molares de acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de amônio e fosfato total, em níveis codificados. Para o valor codificado de -2,378, a concentração molar da variável independente foi diminuída em 10 vezes seu valor no meio de cultivo padrão e a partir desse valor foram calculados os valores para +2,378 +1 e -1. Os pontos centrais foram definidos como as concentrações molares desses sais presentes no meio TAP padrão (Tabela 3.1). A relação entre as variáveis de resposta (*Y_i*) e as variáveis independentes foi descrita por um modelo de segundo grau a partir da equação 3.1.

$$Y_{i} = a_{i} + \sum_{j} b_{ij} X_{j} + \sum_{j} c_{ij} X_{j}^{2} + \sum_{j} d_{ijj} X_{jj}$$
(3.1)

Onde, Y_1 = produção máxima de m*Cherry* (Pm, Tabela 3.2), Y_2 = concentração celular máxima (Xm, Tabela 3.2), as variáveis dependentes = *i*, as variáveis independentes = *j*, interações = *j*', o intercepto = *a*_i, os coeficientes lineares = *b*_{ij}, os coeficientes quadráticos = *c*_{ij}, e finalmente a interação entre os coeficientes = *d*_{ijj}. Os níveis codificados de acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de amônio e fosfato total, foram correspondentes a j1, j2, j3, j4 e j5, respecitvamente. Foi realizada regressão multivariada, com P < 0,10, para calcular os coeficientes da equação 3.1 (Tabela 3.2), e a partir das equações obtidas para correlacionar as variáveis dependentes com as variáveis independentes foi possível a obtenção das superfícies de resposta. Em todas as regressões, a análise da variância foi determinada com *p*<0,05 (MOROCHO-JÁCOME; SATO; DE CARVALHO, 2016).

Tabela 3.1- Concentrações molares (mM) dos nutrientes avaliados e suas correspondências com seus níveis codificados do planejamento experimental.

Variável		Níveis co	dificados das	s variáveis	
independente	-2,3784	-1	0	+1	+2,3784
Acetato	1,755	10,908	17,550	24,192	33,345
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,045	0,280	0,450	0,621	0,856
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,083	0,516	0,830	1,145	1,579
NH₄NO₃ Fosfato Total*	0,748 0.103	4,649 0.641	7,480 1.031	10,310 1.422	14,212 1.960

* A relação de 1,5 entre K₂HPO₄ e KH₂PO₄, utilizada no meio TAP padrão, foi mantida em todos os níveis de fosfato total avaliados.

Cultivos em fotobiorreator tubular

Os cultivos em fotobiorreator tubular foram realizados com volume efetivo de trabalho de 3,2 litros e o tempo de acompanhamento dos cultivos foi de 13 dias. A temperatura foi mantida em 25° \pm 1° C. A iluminação foi mantida constante em 50 \pm 10 µmol de fótons m⁻²s⁻¹. Estes cultivos foram realizados em batelada e o inóculo teve a concentração inicial de 0,05 g L⁻¹. Foram testados os meios de cultivo TAP padrão

e o meio de cultivo TAP modificado pelo planejamento experimental realizado anteriormente em microplaca. No meio TAP modificado os valores alterados em relação ao meio TAP padrão foram: fonte nitrogênio, nitrato de amônio, que no meio modificado se utilizou o nível codificado 1 (10,310 mM), o acetato no nível codificado 2,3784 (33,345 mM) e o fosfato total no nível codificado 2,3784 (1,960 mM, sendo que desta concentração 1,178 mM corresponde ao K₂HPO₄ e 0,782 mM corresponde ao KH₂PO₄). Os outros componentes foram fixados no ponto central do planejamento nas mesmas concentrações do meio de cultivo TAP original. O pH foi acompanhado ao longo do processo sendo que o pH inicial foi de 7,0. Foi adicionado 0,1 mL de polietilenglicol ao cultivo para controlar a espuma. A fluorescência da m*Cherry* e a biomassa foram analisadas segundo o descrito anteriormente.

3.3 RESULTADOS

Influência da fonte de nitrogênio no crescimento e na produção da proteína heteróloga m*Cherry*

Na primeira fase do estudo, foram avaliadas três fontes alternativas de nitrogênio (NH₄NO₃, NH₄Cl e NaNO₃), com o objetivo de avaliar o efeito gerado no crescimento celular da microalga *C. reinhardtii* e na produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Adicionalmente, visou-se comparar esses dados com as mesmas condições cultivando uma cepa selvagem de *Chlamydomonas* (1690). A Figura 3.1 apresenta os dados coletados referentes à biomassa e fluorescência da m*Cherry* (608 nm) por tempo definido de 66 horas de cultivo. Pode-se observar que a *C. reinhardtii* produtora da proteína heteróloga m*Cherry* pJP30 apresentou crescimento celular médio de 0,57 g L⁻¹ em todas as fontes de nitrogênio testadas, isto é, aproximadamente, 21,3% maior comparado com o crescimento médio apresentado pela cepa silvestre de *C. reinhardtii* 1690 que foi de 0,47 g L⁻¹. Os resultados de análise de variância demostraram que a concentração celular no tempo final entre as duas linhagens apresentam diferenças significativas, com *p* = 0,01737 e intervalo de confiança de 0,95.

Figura 3.1 – Crescimento da microalga Chlamydomonas reindhartii 1690 (cepa selvagem) (g/L) (representada pelos círculos); crescimento da microalga Chlamydomonas reindhartii clonada para produção da proteína heteróloga m Cherry pJP30 (g/L) (representada pelos quadrados). Produção da proteína heteróloga m Cherry em unidades de fluorescência UF (representada pelos triângulos). As cores indicam a fonte de nitrogênio utilizada. NH4NO₃, amarelo; NH4CI, Azul ; NaNO₃, vermelho.



A linhagem selvagem 1690 apresentou a maior concentração celular máxima quando foi utilizado NaNO₃ como fonte de nitrogênio⁻ atingindo uma velocidade específica de crescimento de 0,042 h⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,0052 g L⁻¹ h⁻¹. No entanto, esta linhagem apresentou uma diminuição da concentração celular final de 4,3% quando foi cultivada com NH₄Cl, apresentando velocidade específica de crescimento de 0,057 h⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,0049 g L⁻¹ h⁻¹. Finalmente, apresentou diminuição de 14,6% quando foi cultivada com NH₄NO₃, sendo que esta última revelou diferença estatística significativa com *p*=0,01486 apresentando velocidade específica de 0,0042 g L⁻¹ h⁻¹.

Ao serem avaliados os mesmos parâmetros na linhagem pJP30, encontrou-se que, de modo semelhante à linhagem selvagem 1690, a máxima concentração celular foi registrada quando utilizou-se NaNO₃ como fonte de nitrogênio, apresentando 0,6 g L⁻¹, com velocidade específica de crescimento de 0,042 h⁻¹ e produtividade volumétrica de 0,0065 g L⁻¹ h⁻¹. Neste caso, a concentração celular máxima (*X*_m) diminuiu 4,7% ao se utilizar NH₄Cl, porém apresentou a maior velocidade específica de crescimento

com 0,075 h⁻¹ e uma produtividade volumétrica de 0.0062 g L⁻¹ h⁻¹. Finalmente, *X*_m diminuiu 8,4% quando se utilizou NH₄NO₃ como fonte de nitrogênio, sendo a velocidade específica de crescimento de 0,066 h⁻¹ e registrando produtividade volumétrica de 0.0059 g L⁻¹ h⁻¹. Entretanto, estes resultados não apresentaram evidências estatísticas significativas.

Para finalizar, as duas linhagens apresentaram o melhor crescimento com NaNO₃ como fonte de nitrogênio. No entanto, foi evidenciada uma diminuição do crescimento de 16,1% da linhagem selvagem 1690 em relação à linhagem pJP30 (p=0,0086).

Ao avaliar o efeito das diferentes fontes de nitrogênio na produção da proteína heteróloga m*Cherry*, os resultados indicaram que a maior produção de m*Cherry* foi atingida ao se utilizar NH₄NO₃ como fonte de nitrogênio. A produção diminuiu em 10% ao se utilizar o NH₄Cl e 14% ao se utilizar NaNO₃ como fontes de nitrogênio. Esta análise evidenciou diferenças estatísticas significativas com p=0,01568 e p=0,03598, respectivamente. Decidiu-se, a partir disso, trocar a fonte de nitrogênio NH₄Cl do meio de cultivo TAP padrão por NH₄NO₃ como a nova fonte de nitrogênio a ser utilizada visando à produção da proteína heteróloga m*Cherry*.

Análise de regressão multivariada

Foi realizado um planejamento central composto rotacional 2⁵ para avaliar os efeitos e as interações das 5 variáveis independentes (Tabela 3.1) na produção da proteína heteróloga m*Cherry* e na produção de biomassa. A partir dos resultados obtidos (Anexo 1), foram realizadas regressões multivariadas para correlacionar essas variáveis. Os coeficientes das equações correspondentes às regressões multivariadas para correlacionar estas variáveis dependentes com as variáveis independentes (equação 3.1) são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Coeficientes estimados pela regressão multivariada para predição da produção máxima da proteína heterologa m*Cherry* (*P*_m) e concentração celular máxima (*X*_m) de *C. reindhartii* pJP30 em função das variáveis independentes avaliadas (Os níveis codificados de acetato, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, nitrato de amônio e fosfato total, foram correspondentes a j1, j2, j3, j4 e j5, respecitvamente).

$\begin{array}{ccccc} y_i & i=1 & i=2\\ a_i & 7387,3 & 0,456\\ b_{ij} & & & \\ & j=1 & 348,9 & 0,08\\ & j=2 & 0 & 0\\ & j=3 & 0 & 0\\ & j=4 & 0 & 0,02\\ & j=5 & 66,7 & 0\\ C_{ij} & & & \end{array}$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
j=2 0 0 j=3 0 0 j=4 0 0,02 j=5 66,7 0
j=3 0 0 j=4 0 0,02 j=5 66,7 0
j=4 0 0,02 j=5 66,7 0 _{Cij}
j=5 66,7 0 _{Cij}
Cij
j=1 77,4 -0,01
j=2 0 -0,03
j=3 0 -0,03
j=4 -86,1 -0,05
j=5 0 -0,03
dijj'
jj' = 1,2 0 0
jj' = 1,3 0 0
jj' = 1,4 0 0,015
jj' = 1,5 0 0
jj' = 2,3 0 -0,02
jj' = 2,4 0 0
jj' = 2,5 0 0
jj' = 3,4 0 0
jj' = 3,5 0 0
jj' = 4,5 0 0

** R2 ajustado = 0,90

As variáveis que tiveram efeito sobre a produção da m*Cherry* foram a concentração molar de acetato, de nitrato de amônio e de fosfato total. O modelo ajustado resultou em um R² ajustado de 0,77 (Tabela 3.2). A Figura 3.2 indica como o acetato apresentou efeito positivo na produção da proteína heteróloga m*Cherry* tanto na forma linear como na forma quadrática, sendo que esta variável apresentou incremento médio de 6% entre cada nível desta análise. De fato, considerando os pontos centrais das demais variáveis independentes, o aumento do nível codificado

de acetato de -2,3784 para 2,3784 levou a uma estimativa de aumento da ordem de 32 % na produção de m*Cherry*, embora o aumento para cada nível que se aumenta desta variável independente leve progressivamente a uma diminuição percentual do incremento da produção de mCherry. Essa análise, em conjunto com a análise do crescimento celular, que estima é desprezível a produção de célula a partir do nível codificado de acetato correspondente a 2,3784 (Figura 3.3), indica que um aumento da concentração molar de acetato para valores maiores que 33,345 mM poderia não levar a um aumento da produção de mCherry.

A fonte de nitrogênio (NH₄NO₃) apresentou sinal negativo de seu coeficiente quadrático na análise da regressão multivariada (-86,1), sendo que a maior produção de m*Cherry* foi atingida no nível 0 do planejamento (Figura 3.2). Por outro lado, a análise da regressão multivariada demonstrou que o fosfato apresentou efeito positivo na forma linear. Esses resultados são apresentados na Tabela 3.2 e na Figura 3.4.

Figura 3.2 – Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e acetato, apresentados em seus níveis codificados, na produção da proteína heteróloga *mCherry* por *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.



Figura 3.3 – Predição do efeito da concentração molar de acetato, em níveis codificados, na produção de biomasa (g/L) da microalga *C. reindhartii* pJP30, produtora da proteína heteróloga m*Cherry*. As estimativas foram realizadas fixando as outras variáveis no ponto central.



Figura 3.4 – Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e fostato total, apresentados em seus níveis codificados, na produção da proteína heteróloga *mCherry* por *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.



A análise da regressão multivariada para biomassa apresentou um R² ajustado de 0,90. Neste caso, todas as variáveis independentes apresentaram efeito estatisticamente significativo no crescimento celular (Tabela 3.2). Todas as variáveis apresentaram coeficientes quadráticos negativos (Tabela 3.2), indicando que o ponto de maximização de concentração celular máxima está na faixa de concentração estudada para todos os nutrientes avaliados neste trabalho (Figuras 3.5 e 3.6).

Adicionalmente, houve interação positiva entre acetato e a fonte de nitrogênio e interação negativa entre os nutrientes cloreto de cálcio e sulfato de magnésio (Tabela 3.2).

Figura 3.5 – Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de NH₄NO₃ (fonte de nitrogênio) e acetato, apresentados em seus níveis codificados, na concentração celular máxima de *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central



Figura 3.6 – Superfície de resposta do efeito das concentrações molares de cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, apresentados em seus níveis codificados, na concentração celular máxima de *C. reindhartii* pJP30. As demais variáveis independentes tiveram seus níveis fixados no ponto central.



Cultivo em fotobiorreator tubular

Os cultivos em fotobiorreator tubular foram realizados durante 13 dias com volume de 3,2 L, com vistas a comparar as diferenças entre os meios de cultivo TAP e TAP modificado. Observou-se que os cultivos apresentaram crescimento de biomassa similar durante os primeiros 5 dias, sem que houvesse fase lag. Isso decorre de se ter trabalhado com os mesmos nutrientes no preparo do inóculo, com exceção para a fonte de nitrogênio, que foi o cloreto de amônio. No entanto, como esperado, a troca da fonte de nitrogênio não afetou o início do processo, uma vez que com o uso do NH₄NO₃, utilizado no meio TAP modificado, há a presença do íon amônio. C. reinhardtii atingiu velocidade específica de crescimento máxima idêntica (0,0339 h⁻¹) nos dois meios de cultivo, sendo este valor calculado pela relação linear que ocorreu entre o logaritimo neperiano da concentração celular em função do tempo nos três primeiros dias de cultivo. A contagem celular no dia 6 de cultivo foi de 2,7 · 10⁹ células mL⁻¹ para o meio de cultivo TAP padrão e de 3,78 · 10⁹ células mL para o meio de cultivo TAP modificado. No sétimo dia de cultivo, correspondente à estabilização do crescimento celular, a concentração celular foi 20,7% mais alta no meio de cultivo TAP modificado que no meio de cultivo TAP padrão (Figura 3.7). A produtividade volumétrica para biomassa foi maior no meio de cultivo modificado, sendo de 0,008 g

L⁻¹ h⁻¹ quando foi comparada com o meio de cultivo TAP padrão, que apresentou produtividade volumétrica para biomassa de 0,007 g L⁻¹ h⁻¹. Os dados demostraram que após atingir a máxima concentração celular, esta se manteve estável. A partir do oitavo dia de cultivo, na tentativa de restabelecer o crescimento celular, foi corrigido o pH diariamente para 7,0 ± 0,3, mas não houve êxito nesse sentido, embora tenha propiciado, como comentado, a manutenção da concentração celular (Figura 3.7).

Figura 3.7 – Curvas de crescimento da microalga Chlamydomonas reindhartii pJP30, produtora da proteína heteróloga mCherry, em fotobiorreator tubular. As variáveis testadas foram o meio de cultivo TAP padrão (representado pelos círculos) e o meio de cultivo TAP modificado (representado pelos quadrados).



A produção da proteína heteróloga m*Cherry* foi analisada durante o percurso do experimento. A produção da m*Cherry* foi equivalente para os dois cultivos até o terceiro dia do processo, sendo que a partir do quarto dia o meio de cultivo TAP modificado apresentou aumento na produção da m*Cherry*. A partir do dia 6 de cultivo, a produção de m*Cherry* no meio de cultivo TAP modificado apresentou um aumento ainda maior, comparado com os resultados obtidos até essa etapa do processo (Figura 3.8). O meio de cultivo TAP modificado demostrou maior produção da proteína heteróloga m*Cherry*, apresentando produção de 60401 Unidades de fluorescência (UF) no sétimo dia do cultivo, sendo 159,7% maior do que o valor obtido no meio de cultivo TAP padrão que foi de 23256 (UF). Mesmo considerando o máximo valor obtido

de fluorescência de m*Cherry* no meio TAP normal, que ocorreu no 11º dia (27806 unidades de fluorescência), a diferença de fluorescência é ainda significativamente maior (117,2%). É importante evidenciar que mesmo após a estabilização do crescimento celular, para ambos os meios, não houve uma evidência de perda de fluorescência no sobrenadante do meio, o que indica que provavelmente não houve formação de proteases e que a proteína fluorescente é estável nas condições do fotobiorreator.

Figura 3.8 – Produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga *Chlamydomonas reindhartii* pJP30 recombinante. As variáveis testadas foram o meio de cultivo TAP padrão (representado pelos circulos) e o meio de cultivo TAP modificado (representado pelos quadrados).



3.4 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O nitrogênio é um importante componente nos meios de cultivo, sendo que a concentração e a qualidade, que determina a facilidade com que o microrganismo captura e metaboliza o nitrogênio, são parâmetros a serem considerados quando se trata de cultivo de microrganismos. Mas não somente a fonte de nitrogênio é importante, mas, dependendo da fonte de nitrogênio, também a forma que ela é adicionada ao cultivo interfere no crescimento microbiano. Um exemplo disso é o

efeito da fonte de nitrogênio no cultivo da cianobactéria filamentosa *Spirulina platensis.* Embora a preferência dessa cianobactéria seja pelo amônio (BOUSSIBA, 1989), os melhores rendimentos em biomassa com uso de processo descontínuo de cultivo são descritos quando se utiliza o nitrogênio na forma de nitrato (ZARROUK, 1966; PAOLETTI et al., 1975). Isso porque nos valores de pH dos cultivos de *S. platensi*s, normalmente acima de 9,5, o íon amônio está em equilíbrio com a amônia, que é tóxica para os microrganismos. De fato, como assinalam Belkin & Boussiba (1991), a amônia já apresenta efeito inibitório em concentrações da ordem de 10 mM. Assim, para que estes sais de amônio possam ser utilizados em meios com características mais alcalinas, seria importante utilizar o processo descontínuo alimentado (FERREIRA et al., 2010).

Estudos realizados com *Porphyridium purpureum*, uma microalga vermelha que é industrialmente atrativa por produzir Fitobiliproteínas (PB), exopolissacarídeos sulfatados, entre outras moléculas de grande importância nas indústrias farmacêutica e de alimentos, demostraram que o nitrogênio na forma de nitrato apresentava maior efeito negativo no crescimento da biomassa, quando avaliada pela metodologia de superfície de resposta (KATHIRESAN et al., 2006).

Estes trabalhos sugerem que a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada para o crescimento microbiano é particular para cada tipo de microrganismo. Desta forma, os nossos resultados indicaram que a fonte de nitrogênio que ofereceu a melhor produtividade para o crescimento da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* foi obtida quando o nitrogênio foi fornecido na forma de nitrato NaNO₃ (Figura 3.1). No entanto, a menor velocidade específica de crescimento foi atingida com esta fonte de nitrogênio, um resultado, em partes, já esperado uma vez que a incorporação de nitratos requer a redução do íon nitrato pela ação de nitrato redutases até amônia, com custo energético para as células (HATORI & MYERS, 1966). Esse fenômeno foi verificado tanto na linhagem selvagem 1690, como na linhagem transformada pJP30, produtora da proteína heteróloga m*Cherry* (Figura 3.1).

Adicionalmente, os resultados obtidos a partir deste estudo, demonstraram que as maiores velocidades específicas de crescimento foram atingidas quando o nitrogênio foi fornecido na forma de amônio. Assim, tanto nos cultivos com a linhagem selvagem 1690 como com a linhagem produtora de *mCherry* (cepa pJP30), as maiores velocidades específicas de crescimento foram obtidas com fontes de nitrogênio que

apresentam amônio em sua composição. A assimilação de nitrato até glutamato requer dez (10) elétrons e um (1) ATP o que explica o fato de a assimilação do nitrato requerer mais energia que a assimilação do NH₄ (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000). Por outro lado, como o nitrogênio na forma de amônia possui o mesmo nível de oxidação dos componentes orgânicos da célula, este composto não precisa ser oxidado ou reduzido e isso faz com que a assimilação seja mais rápida e gere menor custo energético para a célula (STAINER, 1992).

No entanto, as maiores produtividades volumétricas de biomassa foram registradas com NaNO₃ como fonte de nitrogênio. Provavelmente, a incorporação rápida do íon amônia resultou na formação de biomassa a partir da formação do ácido glutâmico, da asparagina e da glutamina que atuam como precursores de proteínas e macro moléculas celulares, tudo isso em tempo relativamente curto devido à fácil incorporação do nitrogênio. Consequentemente, a rapidez com que esse fenômeno foi desenvolvido causou a diminuição dos níveis de amônia no meio, e prejudicou a atividade de algumas enzimas, como é o caso da α-cetoglutarato desidrogenase, enzima que possui pouca afinidade ao substrato e que, em baixas quantidades, não consegue atuar (STAINER, 1992), o que contribuiu para que a célula procurasse outras vias dependentes de ATP, incrementando o gasto energético e diminuindo a produção de biomassa.

Por outro lado, a maior produção da proteína heteróloga m *Cherry* foi registrada quando foi utilizado o NH₄NO₃ como fonte de nitrogênio (Figura 3.1), uma fonte bastante versátil, possuindo o nitrogênio na forma amoniacal e na forma de nitrato, sendo que a célula pode optar pela via pela qual vai assimilar o nitrogênio. Provavelmente, a forma amoniacal vai ser a primeira a ser assimilada baseando-se na possibilidade de o gasto energético ser menor. No entanto, em algum momento do cultivo, quando os níveis de amônia estiverem baixos, a reserva de nitrogênio na forma de nitrato.

No que se refere à produtividade volumétrica final para biomassa, nossos resultados indicaram que a maior produtividade volumétrica de biomassa foi atingida com a linhagem recombinante pJP30 do que com a linhagem selvagem. Considerando que o nosso meio de cultivo foi alterado na fonte de nitrogênio, inicialmente, faz-se necessário comparar os nossos resultados com outros trabalhos considerando

unicamente o NH₄Cl como fonte de nitrogênio, que é a fonte de nitrogênio do meio de cultivo TAP original onde foi atingida produtividade volumétrica de 0.0062 g L⁻¹ h⁻¹.

GIMPEL et al., 2015, que utilizaram C. reinhardtii como plataforma de expressão, obtiveram máximas produtividades de 0,051±0,016 g L⁻¹ dia⁻¹(GIMPEL et al., 2015), que correspondem a 0,0021 \pm 0,0007 g L⁻¹ h⁻¹. Se comparados os processos, pode-se observar que a temperatura nos dois casos foi similar, sendo 25°C ± 1°C neste trabalho e 23,1°C ± 4,7°C no trabalho desses autores. Essa variação é dada, seguramente, pela diferença de volume de trabalho dos cultivos, sendo que processos de grande escalonamento, como os de GIMPEL et al. (2015), são mais difíceis de controlar os parâmetros ambientais. Outra diferença foi o pH trabalhado nos cultivos, visto que algumas observações realizadas pelo nosso grupo de trabalho (estudos não preliminares não publicados) sugerem que pH entre 6 e 6,5, faixa de trabalho desses autores, limita um pouco o crescimento da nossa linhagem de C. reinhardtii, sendo que com pH entre 7,0 e 7,5 foi obtido melhor resultado. Ainda que estes dados não sejam preliminares, a diferença do pH, se comparado com o trabalho de Gimpel et al. (2015), poderia ser uma das causas da diferença de produtividade. De fato, estudos sugerem que C. reinhardtii cresça melhor em pH alcalinos que em pH ácidos (FETT; COLEMAN, 1994). Finalmente, existem outras diferenças importantes a serem consideradas como, por exemplo, a proteína heteróloga, os vetores utilizados, o sítio de clonação, entre outros que fazem com que cada processo precise de requerimentos nutricionais e parâmetros de cultivo diferentes.

Análise de regressão multivariável

A equação resultante da análise que correlaciona a regressão dos coeficientes apresentou duas soluções para duas respostas diferentes. A primeira delas foi a produção da proteína heteróloga m*Cherry* (Y_i: i=1) e a segunda foi a produção de biomassa (Y_i: i=2) (Tabela 3.2). Tendo em vista que neste trabalho se visa à obter condições que conduzam a maiores produções de *mCherry*, inicialmente se focou na equação e correspondentes superfícies de resposta da produtividade em m*Cherry* em função das variáveis independentes avaliadas. Dessa forma, como visto no item 3.3 (Resultados), os níveis de acetato e fosfato que levaram às maiores produções de

mCherry foram correspondentes a 2,3784. Observando os resultados referentes aos sais cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, não foram observadas diferenças nas produções da proteína fluorescente, indicando que as concentrações molares desses sais no meio TAP padrão já são suficientes para a produção da proteína em questão. Dessa forma, faltou estimar qual seria a concentração de nitrato de amônio que pudesse maximizar a produção deste metabólito. No caso deste nutriente, pensando inicialmente na formação de células, uma vez que são estas que produzem os metabólitos de interesse, o nível que maximiza o crescimento celular é 1, ou seja, 10,310 mM (Tabela 3.1). Considerando que nessas condições a perda de fluorescência no sobrenadante é desprezível (2,0%) em relação àquela obtida no menor nível da fonte de nitrogênio que proporcione crescimento celular pela equação estimada para concentração celular máxima (nível 1), e considerando que em cultivo em fotobiorreator a demanda por nitrogênio seria maior, devido à maior formação de células, optou-se por fixar a concentração de nitrato de amônio em 10,130 mM para o cultivo celular visando à obtenção de mCherry nos cultivos em fotobiorreatores tubulares.

Estes resultados são diferentes dos obtidos por outros estudos que informaram que cultivos mixotróficos com *C. reinhardtii* aceitaram concentrações de 10 g L⁻¹ (166,5 mM) de acetato atingindo concentrações de 2,15 g L⁻¹ de biomassa e produtividades de 6,48 g L⁻¹ dia⁻¹ (0,27 g L⁻¹ h⁻¹)(MOON et al., 2013). Assim, os nossos resultados indicaram que um aumento gradativo da concentração de acetato não resultaria em grandes aumentos da biomassa, o que poderia ser explicado pelo fato de outros componentes no meio de cultivo serem limitantes em algum momento do cultivo. No entanto, as condições dos cultivos podem influenciar na obtenção desses dados; por exemplo, a diferença de volume de trabalho e a troca de gases dentro do cultivo, a intensidade luminosa, a linhagem, entre outras.

Por outro lado, o nitrogênio apresentou uma influência parabólica no cultivo celular, atingindo o ponto máximo dentro dos parâmetros deste estudo para biomassa (Figura 3.5). Ao avaliar os resultados obtidos com a m*Cherry,* foi observado que o nitrogênio na sua forma quadrática também teve efeito negativo na produção da proteína, embora, como comentado anteriormente, esse efeito não seja pronunciado na faixa de concentração de 4,649 a 10,310 mM deste nutriente. Esse fenômeno pode ser atribuído a um processo simultâneo: possivelmente, o nitrogênio no nível 2,3784

deste estudo atingiu uma concentração que foi prejudicial para o crescimento da microalga, limitando, portanto, a produção da proteína heteróloga. Estudos realizados com *Arthrospira platensis* demonstram que a amônia pode ser tóxica para a célula dependendo da concentração oferecida no meio de cultivo (FERREIRA et al., 2010) ou, dependendo do pH, sendo que em pH básicos, o nitrogênio é encontrado em forma de amônia e essa amônia não protonada é capaz de atravessar a membrana celular e mudar o pH no citosol, equilibrando essas concentrações dentro e fora da célula, podendo inibir a atividade das enzimas citosólicas. Por outro lado, o nitrogênio em forma de NH₄ não consegue atravessar a membrana celular (KADAM; BOONE, 1996). Para finalizar, pode-se afirmar que segundo os resultados obtidos, tudo parece indicar que diferentes concentrações dos macronutrientes do meio de cultivo TAP apresentam efeitos na produção de biomassa e na produção de proteínas heterólogas por *C. reinhardtii*.

Cultivos em fotobioreator tubular

Como comentado anteriormente, a predição dos efeitos das variáveis indenpendentes no crescimento celular e produção de mCherry, obtida pelas regressões multivaradas, indicou a utilização do nível 2,3784 para as variáveis acetato e fosfato total, o nível 1 para o nitrato de amônio e o nível 0 para os sais cloreto de cálcio e sulfato de magnésio. Para comprovar os efeitos gerados pelos macronutrientes na produção da proteína heteróloga m*Cherry* e no incremento da biomassa, obtidos a partir de cultivos em microplacas, o processo foi escalonado para a fotobiorreator tubular com volume final de 3,2 L. Para fins de comparação, neste tipo de fotobiorreator, a linhagem de *C. reinhardtii* produtora de m*Cherry* foi cultivada no meio TAP modificado, com base nos resultados obtidos nos cultivos em microplaca, bem como no meio TAP padrão. No Anexo 2 são apresentadas fotos dos fotobiorreatores com cultivo da microalga em ambos os meios de cultivo.

Os resultados obtidos em fotobiorreator apresentaram incremento da biomassa do meio de cultivo TAP modificado de 20,7% (Figura 3.7), comparado com o meio de cultivo TAP padrão, resultado que difere um pouco dos resultados obtidos nos testes preliminares para a escolha da fonte de nitrogênio em microplaca, nos quais no cultivo

com meio TAP modificado os resultados de concentração celular máxima foram praticamente iguais aos obtidos no meio TAP padrão. Os resultados indicaram que a produtividade volumétrica e a velocidade específica de crescimento na microalga C. reinhardtii foram mais altas nos cultivos em fotobiorreator que nos cultivos realizados em microplaca. A máxima concentração celular da linhagem pJP30 obtida em microplaca com uso de NH4CI (meio TAP padrão) foi de 0,55 g L⁻¹ (Figura 3.1). Por outro lado, com este mesmo meio, no fotobiorreator, foi obtida a máxima concentração celular de 1,16 g L⁻¹ no sétimo dia de cultivo (Figura 3.7). Este resultado é similar aos dados obtidos com Arthrospira platensis em cultivos em batelada com uso de fonte de carbono complementar orgânica, que atingiram concentrações acima de 1,0 g L⁻¹, obtendo valores de até 1,6 g L⁻¹ (BEZERRA et al., 2014). Estudos anteriores indicaram que linhagens de C. reinhardtii apresentaram velocidades específicas de crescimento entre 1,18-1,70 dia⁻¹ (GIMPEL et al., 2015), Contudo, outros autores sugerem que, em cultivos mixotróficos de Arthrospira platensis, a concentração de biomassa aumentou, aproximadamente, 2,3 vezes comparada com cultivos fotoautótrofos, e que as velocidades específicas de crescimento aumentaram quando foi incrementada a intensidade e o fornecimento da luz (MATSUDO et al., 2015). Possivelmente, a maior disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo TAP modificado, junto com os parâmetros mencionados anteriormente, influenciaram na maior velocidade de crescimento e na concentração da biomassa. Dessa forma, os resultados obtidos em cultivos realizados em fotobiorreator, neste trabalho, comparados com os obtidos na microplaca e com os descritos na literatura podem ser justificados.

A produção da proteína heteróloga m*Cherry* foi maior no meio de cultivo TAP modificado que no meio TAP padrão. Segundo a análise de regressão dos coeficientes das equações obtidas nas regressões multivariadas para os resultados obtidos em microplaca, o meio modificado apresentaria uma estimativa de título de proteína fluorescente de 8474 unidades de fluorescência, sendo 30,0% maior que o título obtido em meio TAP padrão (Figura 3.1). Porém, em fotobiorreator tubular, esse aumento foi de 117,2%, ou seja, foi ampliado com o aumento da escala. Isso indica que as condições de crescimento em fotobiorreator levam a alterações metabólicas que estimulam o crescimento celular e a produção de *mCherry*.

3.5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a fonte de nitrogênio utilizada e a concentração de nutrientes no meio de cultivo apresentam efeitos na produção de biomassa e na produção de m*Cherry* por *C. reinhardtii* pJP30. A análise dos resultados demostrou que altas concentrações de NH4NO3 podem gerar efeito negativo no crescimento da microalga. No entanto, o nitrato de amônio em concentrações próximas a 10 mM demostraram bom crescimento da microalga e expressão da proteína heteróloga, apresentando-se como uma alternativa para o cultivo deste microrganismo. Concentrações de acetato acima de valores da ordem de 30 mM não levam a um incremento no crescimento celular e as concentrações molares dos sais cloreto de cálcio e sulfato de magnésio no meio TAP padrão são suficientes para suportar o crescimento celular e a produção de m Cherry nas condições deste trabalho, que envolveram microplacas e fotobiorreatores tubulares. O aumento da concentração de fosfato total para 1,960 mM aumenta a produção de m*Cherry*, embora leve a menor crescimento celular. Com o meio TAP modificado, em cultivo em fotobiorreator tubular, foi possível a obtenção de concentração celular de 1,41 g L⁻¹ e 60401 unidades de fluorescência de m*Cherry* no sobrenadante. Esses resultados foram, respectivamente, 20,7% e 117,2% maiores que os obtidos com cultivo desta microalga em meio TAP padrão.

4. CAPÍTULO 4: PRODUÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE m*Cherry* POR *Chlamydomonas reindhardtii* EM SISTEMA SEMICONTÍNUO

RESUMO

A produção de proteínas heterólogas constitui uma metodología biotecnológica que tem apresentado avanços nos últimos anos na área da pesquisa. Plataformas de expressão como bactérias, leveduras, plantas, insetos e células animais têm sido utilizadas com esta finalidade obtendo sucesso. A produção de proteínas recombinantes em microalgas é uma alternativa para produção de proteínas recombinantes que está sendo estudada atualmente por vários grupos de pesquisa ao redor do mundo. A proteína mCherry possui a vantagem de ser facilmente detectada em meios de cultivo por análises de fluorescência, convertendo-se em um exelente alvo como modelo de produção deste tipo de biomoléculas. Pesquisas anteriores demonstraram que cultivos semicontínuos podem aumentar a produção de biomassa com microalgas e ser mantida estável por períodos de tempo mais longos, aumentando a produtividade. Este trabalho teve como finalidade estudar a produção da proteína mCherry em sistema semicontínuo em fotobiorreator tipo coluna de bolhas. O estudo demonstrou que o sistema semicontínuo de produção aumentou a produtividade da m*Cherry* em até quase três vezes com relação ao que foi obtido com o cultivo em batelada. O cultivo foi mantido em condições assépticas por um período de oito dias, que englobou dois cortes sucessivos. Ao longo dos ciclos de produção, foi possível a obtenção de concentrações celulares acima de 1,2 g L⁻¹ e produção da proteína m*Cherry* de 419 UF h^{-1} .

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii*. Proteínas heterólogas. Microalgas. Mixotrófico. Produção. Semicontínuo. m*Cherry*.

4.1 INTRODUÇÃO

Os cultivos microbianos têm como objetivo a produção de subprodutos de interesse econômico, seja em termos de biomassa ou subprodutos do metabolismo dos microrganismos. Para isso, têm sido desenvolvidos diferentes processos de produção, sendo o primeiro deles o sistema descontínuo ou batelada. Neste processo, os nutrientes são fornecidos apenas no começo do cultivo e nenhuma adição de nutriente é feita durante o transcurso do cultivo até finalizar o processo de produção (BRESAOLA, 2016). Este processo é o mais comumente empregado por indústrias de alimentos e em processos onde não seja necessário o controle das concentrações de nutrientes no decorrer do cultivo microbiano. Neste processo, para cada cultivo, é adicionado um inóculo. Isso leva a tempos mortos e, no caso de haver fases lag de crescimento, pode levar a menores produtividades volumétricas.

Diferente do sistema em batelada, os processos semicontínuos, ou bateladas repetidas, oferecem altas produtividades por manter as células no reator entre um processo e outro, minimizando tempos mortos e tempos de adaptação (HENRARD, 2009). De fato, estes sistemas caracterizam-se pela remoção de uma porcentagem de meio com células no final do cultivo, com a correspondente adição de meio novo. O cultivo deve atingir a concentração celular de corte e isso deve ser efetuado quando o microrganismo encontra-se na concentração celular máxima. Dentre as várias variáveis que interferem num cultivo microbiano, quando se trata do processo semicontínuo, a fração de corte merece destaque (REICHERT et al., 2006), uma vez que é variável que determina simultanemente a taxa de renovação do meio de cultivo e a diluição da concentração celular para o novo ciclo do processo.

Existem diferentes tipos de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas. No entanto, sistemas de cultivo envolvendo a movimentação e/ou homogeneização do meio com o emprego de ar é considerado um dos mais apropriados para este propósito, principalmente, por ser de fácil construção e apresentar baixo stress mecânico. Esses sistemas fazem com que a transferência de O₂ e CO₂ entre o meio de cultivo e a célula seja bastante eficiente. Adicionalmente, as células são mantidas em suspensão, assegurando a disponibilidade de nutrientes para elas e garantindo sua movimentação entre as regiões iluminadas e as não iluminadas.

Esses sistemas apresentam vantagem frente à agitação mecânica, uma vez que grande porcentagem dos organismos fotossintetizantes apresenta parede celular frágil, sendo que alguns deles possuem organelas de motilidade, e outros apresentam morfologia filamentosa. Essas caraterísticas conferem a estes microrganimos sensibilidade ao estresse físico. Altos níveis de turbulência aumentam o fornecimento de luz e a troca gasosa, porém, níveis acima do ponto ótimo podem limitar o crescimento atribuído, o que pode ser atribuído ao dano celular (MATSUDO, 2010).

Sabe-se que as fontes de nitrogênio podem influenciar no crescimento dos microrganismos e na produção de proteínas heterólogas. Em microlagas como C. reinhardtii, foi demostrado no capítulo anterior que diferentes fontes de nitrogênio apresentam efeito tanto no crescimento como na produção destas biomoléculas. As fontes de nitrogênio como o amônio, do ponto de vista energético, são consideradas preferíveis para a assimilação pelos microrganismos, comparado com fontes de nitrogênio na forma de nitratos (HATORI & MYERS, 1966). O amônio é encontrado em forma de amônia em meios de cultivo com valores altos de pH, podendo entrar na célula por difusão, e não necessitando sofrer alterações para ser utilizado pela célula. No entanto, estudos têm demostrado que altas concentrações de amônia podem ser toxicas para as células (FERREIRA et al., 2010; KADAM; BOONE, 1996). Em cultivos onde o pH atinge valores acima de 9,3, a porcentagem de amônia encontrada no meio de cultivo é maior que a porcentagem de amônio, e em meios de cultivo com valores de pH menores que 8 a porcentagem de amônia é menor do que 10% (MATSUDO, 2010). Por esse motivo, o valor de pH deve ser controlado ao longo do processo de produção. Adicionalmente, quando se trata do cultivo de microrganismos fotossintetizantes, o valor de pH está associado à quantidade de gás carbônico dissolvido no sistema (MATSUDO et al., 2012).

O objetivo deste estudo foi avaliar a fração de corte em processo semicontínuo de cultivo de *C. reinhardtii* para produção da proteína heteróloga m*Cherry* em fotobiorreator tipo coluna com agitação em sistema de coluna de bolhas com controle do pH.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem de *Chlamydomonas reindhartii* produtora da proteína heteróloga m*Cherry* pJP30 foi obtida no trabalho de doutorado de João Victor Dutra Molino e gentilmente doada por ele para o estudo de cultivo neste projeto (MOLINO, 2017).

Meios de cultivo

O meio de cultivo TAP modificado para a produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga geneticamente modificada *C. reindhartii* foi utilizado para a realização deste estudo. O preparo do meio de cultivo foi realizado da seguinte forma: foram misturados 10 mL L⁻¹ de solução estoque A (500 mL), contendo NH₄NO₃ 20,67g, CaCL₂ 2,5g, MgSO₄ 5g. Foi adicionado 1mL L⁻¹ partindo de uma solução tampão estoque (100 mL), contendo K₂HPO₄ 20,52g, KH₂PO₄ 10,68g. Foi adicionado ácido acético glacial 1,9 mL L⁻¹, em seguida 20mL L⁻¹ de uma solução contendo Tris base 1M e, finalmente, 1mL L⁻¹ de micronutrientes segundo Hutner 1950 (HUTNER et al., 1950). Após o preparo do meio de cultivo, o pH foi fixado em 7,0 ± 0,2 com KOH e, em seguida, foi esterilizado por calor úmido por 15 min a 121°C e inoculado assepticamente nos fotobiorreatores tipo coluna com agitação por injeção de ar com volume efetivo de trabalho de 220 mL.

Inóculo e cultivo em fotobiorreator tipo coluna

C. reindhartti geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry* foi cultivada em erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo TAP modificado, por 5 dias sob condições de luz constantes (50 ± 10 µmol de fótons m⁻² s⁻¹), a temperatura foi ajustada a 25°C e a agitação foi mantida em 250 rpm. Quando o cultivo atingiu 0,8 de absorbância, 22 mL dele foram inoculados

assepticamente em fotobiorreatores tipo coluna, contendo 198 mL de meio de cultivo TAP modificado. Os fotobiorreatores tipo coluna têm uma altura de 25 cm e um diâmetro de 5 cm. São fechados e em sua parte superior há entrada para eletrodo de pH, sistema de retirada de amostras, entrada de ar e gás carbônico, bem como saída de gases. O cultivo iniciou com 0,1 g L⁻¹ de massa seca, o que corresponde a 0,08 de absorbância, a temperatura foi ajustada a 25° ± 1° C, a agitação foi realizada com compressor de ar SEVEN STAR S-6000, a vazão foi mantida em 0,5 VVM. O pH foi medido com eletrodo tipo meia célula (Mettler Toledo Greifensee, Suiça) e foi mantido em 7,0 ± 0,2 com adição de CO2, utilizando um potenciômetro M300 para medição de pH (Mettler Toledo Greifensee, Suiça), ativando a entrada de CO2 com uma eletroválvula solenóide ACL 20E (Cavenago di Brianza, Italia) acoplada ao transmissor. A iluminação foi mantida constante em (65 \pm 5 µmol de fótons m⁻²s⁻¹). Amostras foram realizadas tirando do cultivo 2 mL a cada 24 h, centrifugadas, em seguida, por 10 minutos a 1484 x g. As células foram ressuspensas no volume inicial e foram feitas análises por espectrofotometria do sobrenadante e das células separadamente.

Cultivo semicontínuo para produção da proteína mCherry

Foram realizados cultivos semicontínuos para produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga *C. reindhartti* geneticamente modificada como mencionado anteriormente. Os cultivos foram realizados por tempo total de 8 dias divididos em dois cortes, assim que finalizado o cultivo em batelada. Os cultivos foram divididos em três blocos sendo a variável independente o volume de meio a ser retirado em cada corte. Desta forma, volumes de 20%, 40% e 60% foram separados dos cultivos iniciais quando os cultivos em batelada iniciais atingiram a concentração celular de corte (ponto de máximo da fase de crescimento). A partir disso, foram tomadas amostras para acompanhar o crescimento celular e a produção da m*Cherry*. Os cortes foram realizados tendo como indicativo a estabilização do crescimento celular e, nesse momento, porcentagens de meio de cultivo TAP modificado novo foram adicionados novamente para restabelecer o volume inicial. Água deionizada esterilizada foi adicionada diariamente para restabelecer o volume perdido por evaporação.
Técnicas analíticas

Determinação da concentração de biomassa

A quantificação da biomassa foi medida por absorbância a 750 nm e correlacionada com a concentração expressa em massa seca a partir de uma curva de calibração realizada previamente. As amostras foram coletadas em microplaca de 96 poços preta (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA). O volume final foi de 200 µl para todas as análises.

Determinação do acompanhamento na fluorescência da proteína heteróloga m*Cherry*

A quantificação da m*Cherry* foi analisada excitando a amostra em um comprimento de onda de 575 nm e analisando a emissão em 608 nm. Para essas análises, foi utilizando um leitor de placas Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Suíça) e as amostras foram coletadas em microplaca de 96 poços preta (Corning Costar, Tewksbury, MA, EUA). O volume final foi de 200 µl para todas as análises.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que, após cinco dias, todos os cultivos em batelada chegaram ao ponto final da fase de crescimento, apresentando concentração celular média de 1,3 \pm 0,04 g L⁻¹. A produtividade volumétrica para biomassa foi de 0,0100 \pm 0,0004 g L⁻¹ h⁻¹ com desvio padrão de 0,0004 g L⁻¹ h⁻¹. A velocidade específica de crescimento máxima média foi de 0,58 \pm 0,08 dia⁻¹. A produção de m*Cherry* apresentou média de 23422 \pm 665,3 unidades de fluorescência (UF). Finalmente, a produção da m*Cherry* foi de 174 \pm 5,8 UF h⁻¹.

A partir do quinto dia de produção, foi realizado o primeiro corte para todos os cultivos (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3). Nesta parte do processo, o experimento se dividiu em três condições: sistema de cultivo semicontínuo com taxa de renovação de 20% de volume (Figura 4.1), sistema de cultivo semicontínuo com taxa de renovação 40% de

volume (Figura 4.2) e, por último, sistema de cultivo semicontínuo com taxa de renovação 60% (Figura 4.3).

Figura 4.1 – Produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga *Chlamydomonas reindhartii* pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação de 20% de volume. As figuras correspondem a: A-B concentração celular g L⁻¹; A1-B1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente, os triângulos representam o segundo corte.



Foram realizados dois sistemas semicontínuos de produção onde foi trocado 20% do volume efetivo de trabalho. O primeiro deles (Figura 4.1 : A-A1) apresentou, no seu primeiro corte, produtividade volumétrica para biomassa de 0,0014 g L⁻¹ h⁻¹, velocidade específica de crescimento máxima de 0,03 dia⁻¹ e atingiu produção de m*Cherry* de 120 UF h⁻¹. A maior concentração celular atingida foi de 1,28 g L⁻¹ (Figura 4.1: A-A1). O segundo experimento, com taxa de renovação 20% de volume efetivo de trabalho (Figura 4.1: B-B1), apresentou, no seu primeiro corte, produtividade

volumétrica de 0,0028 g L⁻¹ h⁻¹, comparando-se os dois experimentos. Apresentou velocidade específica de crescimento de 0,08 dia⁻¹ e atingiu produção de m*Cherry* de 117 UF h⁻¹. A maior concentração celular atingida foi de 1,38 g L⁻¹.

As médias dos experimentos indicaram que a produtividade da biomassa do primeiro corte com taxa de renovação de 20% diminuiu 79% comparada com a produtividade obtida no cultivo em batelada. A velocidade específica diminuiu 91% e a produção de m*Cherry* diminuiu em 32%, aproximadamente, comparado com o cultivo em batelada.

Ainda para o primeiro experimento (Figura 4.1 A), o segundo corte apresentou produtividade volumétrica de biomassa de 0,0018 g L⁻¹ h⁻¹. A velocidade específica de crescimento foi de 0,048 dia⁻¹ e atingiu-se a produção de m*Cherry* de 106 UF h⁻¹, sendo que a maior concentração celular atingida foi de 1,30 g L⁻¹. O segundo experimento (Figura 4.1 B) apresentou, no segundo corte , produtividade volumétrica de 0,0016 g L⁻¹ h⁻¹ e velocidade específica de crescimento máxima de 0,051 dia⁻¹. Atingiu produção de m*Cherry* de 98,9 UF h⁻¹ e, finalmente, a maior concentração celular foi de 1,42 g L⁻¹.

As médias dos experimentos indicaram que a produtividade de biomassa do segundo corte do experimento de taxa de renovação de 20% diminuiu aproximadamente 83% comparado com o cultivo realizado em batelada. A velocidade específica de crescimento diminuiu, aproximadamente, em 92% e a produção de mCherry diminuiu, aproximadamente, 41%. Dessa forma, conclui-se que mesmo após o segundo ciclo do processo semi-contínuo não houve uma melhora nem no crescimento celular, nem na produção de mCherry, se comparado com o processo descontínuo, o que indica que esta fração de corte de 20% não seria apropriada para a produção de mCherry por esta microalga. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Reichert et al. (2006), que verificaram que com a menor taxa de renovação de meio (25%) havia prejuízo no crescimento de Spirulina platensis, evidenciado pelas menores produtividades em células e velocidades específicas de crescimento máximas. De fato, com menores taxas de renovação de meio, há menor remoção de materiais residuais de metabolismo, que podem ser tóxicos para as células e, no caso de materiais particulados, levar a um maior sombreamento do cultivo devido à turvação que provocam no meio de cultivo. Em trabalho que difere deste, por se tratar de processo descontínuo alimentado repetitivo, mas que emprega o mesmo princípio, que é renovação parcial do meio de cultivo e o aproveitamento das células de uma batelada para outra subsequente, Matsudo et al (2009) também obtiveram resultado semelhante, no qual os piores resultados no cultivo de *Arthrospira platensis* foram obtidos com as menores taxas de renovação de meio, ou seja com os menores valores de corte do sistema.

Paralelamente, foram realizados dois cultivos semicontínuos com taxa de renovação de 40% do volume total de trabalho. O primeiro deles (Figura 4.2: C-C1), apresentou no primeiro corte produtividade volumétrica de biomassa de 0,0043 g L⁻¹ h⁻¹, velocidade específica de crescimento máxima de 0,144 dia⁻¹, produção de m*Cherry* de 99,2 UF h⁻¹ e a maior concentração registrada foi de 1,34 g L⁻¹. O segundo experimento (Figura 4.2:D-D1) apresentou produtividade volumétrica de biomassa de 0,0064 g L⁻¹ h⁻¹. A velocidade específica de crescimento foi de 0,282 dia⁻¹ e a produção de m*Cherry* atingiu 114,0 UF h⁻¹, sendo que a máxima concentração celular registrada foi de 1,31 g L⁻¹.

As médias dos experimentos indicaram que a produtividade da biomassa do primeiro corte de taxa 40% diminuiu, aproximadamente, 46% comparado com o cultivo em batelada. No entanto, a perda foi menor quando comparada com o primeiro corte do experimento com taxa de renovação de 20% de volume. A velocidade específica de crescimento máxima diminuiu 63% comparada com a velocidade obtida no cultivo em batelada. Finalmente, a produção da m*Cherry* diminuiu 39% comparada com o cultivo em batelada. No entanto, para a produção de mCherry, a perda foi 7% maior se comparado com o primeiro corte do cultivo com taxa de renovação 20%.

Figura 4.2 – Produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga *Chlamydomonas reindhartii* pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação 40% de volume. As figuras correspondem a: C-D concentração celular g L⁻¹; C1-D1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente, os triângulos representam o segundo corte.



O segundo corte do primeiro experimento realizado com taxa de renovação de 40% (Figura 4.2:C-C1) apresentou produtividade volumétrica de biomassa de 0,0035 g L⁻¹ h⁻¹, velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,185 dia⁻¹, produção de *mCherry* foi de 368 UF h⁻¹ e a maior concentração celular atingida foi de 1,1 g L⁻¹. O segundo experimento (Figura 4.2: D-D1) apresentou produtividade volumétrica de biomassa de 0,0036 g L⁻¹ h⁻¹. A velocidade específica foi de 0,221 dia⁻¹, a produção de m*Cherry* atingiu 426 UF h⁻¹ e a concentração celular máxima registrada também foi de 1,1 g L⁻¹.

As médias dos experimentos indicaram que a produtividade da biomassa do segundo corte de taxa de renovação de 40% diminuiu 96% comparado com o cultivo em batelada. Essa perda na produtividade foi maior que no cultivo com taxa de

renovação de 20%. Por outro lado, comparando-se com o cultivo em batelada, a velocidade específica de crescimento máxima diminuiu em 65% e a produção de m*Cherry* aumentou 126%. Assim, com a fração de corte de 40% ainda não se tem boas perspectivas de manutenção de condições ideais de crescimento celular ao longo dos ciclos de produção, embora se observe uma melhora na atividade de fluorescência no sobrenadante ao longo dos ciclos.

Figura 4.3 – Produção da proteína heteróloga m*Cherry* pela microalga *Chlamydomonas reindhartii* pJP30 recombinante em sistema semicontínuo com taxa de renovação 60% de volume. As figuras correspondem a: E-F concentração celular g L⁻¹; E1-F1 produção da proteína heteróloga mCherry UF. Os quadrados representam o cultivo realizado em batelada, os círculos representam o primeiro corte e, finalmente os triângulos representam o segundo corte.



Por último, foram realizados dois cultivos com taxa de renovação de 60% do volume efetivo de trabalho (Figura 4.3). O primeiro deles (Figura 4.3: E-E1) apresentou, para o primeiro corte, produtividade volumétrica para biomassa de 0,0077 g L⁻¹ h⁻¹, velocidade específica de crescimento máxima de 0,351 dia⁻¹, produção de

m*Cherry* de 139 UF h⁻¹ e a maior concentração celular atingida foi de 1,35 g L⁻¹. O segundo experimento (Figura 4.3 F-F1) apresentou produtividade volumétrica para biomassa de 0,0086 g L⁻¹h⁻¹. A velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,396 dia⁻¹ e a produção da m*Cherry* foi de 144 UF h⁻¹, sendo que a máxima concentração celular foi de 1,3 g L⁻¹.

Comparando com os resultados da batelada, as médias dos experimentos indicaram que a produtividade da biomassa do primeiro corte de taxa de renovação de 60% diminuiu 18%. Adicionalmente, velocidade específica de crescimento máxima diminuiu em 36% e a produção de m*Cherry* diminuiu 19%. Estas foram as menores quedas obtidas no primeiro ciclo de produção em comparação o processo de batelada que antecedeu o processo semicontínuo. Considerando as concentrações celulares máximas (X_m) observa-se que nos dois experimentos X_m retornou ao valor do final do processo descontínuo (Figura 4.3).

O segundo corte dos cultivos, com taxa de renovação 60% do volume efetivo de trabalho (Figura 4.3), apresentou produtividade volumétrica para biomassa de 0,011 g L⁻¹ h⁻¹ no primeiro experimento (Figura 4.3 E-E1). A velocidade específica de crescimento máxima foi de 0,523 dia⁻¹, a produção de m*Cherry* atingiu 419 UF h⁻¹ e a maior concentração celular atingida foi de 1,35 g L⁻¹. O segundo experimento (Figura 4.3 F-F1) apresentou produtividade volumétrica para biomassa também de 0,011 g L⁻¹h⁻¹. A velocidade específica de crescimento máxima foi de crescimento máxima foi de 0,525 dia⁻¹ e a produção da m*Cherry* foi de 490 UF h⁻¹. A máxima concentração celular foi de 1,3 g L⁻¹.

Na comparação dos resultados do segundo corte com taxa de renovação de 60% com o processo de batelada, as médias dos experimentos indicaram que a velocidade específica de crescimento máxima diminuiu em 9,7%. Por outro lado, a produtividade da biomassa aumentou 10% e a produção de m*Cherry* aumentou 168%. Adicionalmente, com esta fração de corte, em todos os ciclos foi possível a restauração da concentração celular anterior ao corte. Ainda que a produção de biomassa nestes cultivos atingiu concentrações da ordem de 1,4 g L⁻¹, estes valores podem ainda ser melhorados, pois estudos em fotobiorreatores tubulares demonstraram que podem ser atingidas concentrações da ordem de 12 g L⁻¹ (FERREIRA et al., 2010). Porém, os resultados aqui obtidos indicam que o processo semi-contínuo com fração de corte de 60% é promissor para produção de proteínas recombinantes por *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados demonstraram que a fluorescência foi detectada em todos os cultivos ao longo do processo. Adicionalmente, não foi detectado nenhum indício de contaminação durante o decorrer dos cultivos, apresentando exitosamente a condução do experimento durante os cortes.

Foi observado que a produtividade volumétrica da biomassa diminuiu nos dois cortes em praticamente todos os experimentos, apresentando maior perda nos segundos cortes. A exceção é o experimento com fração de corte de 60%, em que a produtividade em células no segundo corte foi 10% que nos cultivos em batelada. Ao comparar as variáveis dependentes frente às frações de corte estudadas, quanto maior a fração de corte maior a produtividade em células e a velocidade específica de crescimento máxima nos ciclos de produção. Com fração de corte de 60% foi possível obter produtividades em células de 0,011 g L⁻¹ h⁻¹.

A produção da proteína heterologa m*Cherry* diminuiu com relação aos cutlivos realizados em batelada no corte de 20%. No entanto, apresentou melhoras nos segundos cortes de 40% e 60%, sendo ainda melhores as produções atingidas em 60%, chegando a ser 2,6 vezes maiores em relação aos cultivos realizados em batelada. Esse fenômeno foi visualizado em todos os experimentos, o que permite supor que o processo apresenta tendência a melhorar ou estabilizar caso haja adição de mais cortes ao processo.

Sugere-se que estudos posteriores sejam focados em aumentar as frações de corte. Observou-se que o cultivo foi mantido satisfatoriamente por dois corte. No entanto, futuros estudos podem ser direcionados no sentido de manter por maiores tempos de produção, aumentando o número de cortes. Nessas condições será possível verificar a estabilidade da cepa para a produção da proteína fluorescente, bem como verificar o quanto é robusto o processo frente a possíveis contaminações. Finalmente, o fotobiorreator tipo coluna com agitação por coluna de bolhas demostrou ser uma boa alternativa para o cultivo de microalgas como *C. reindhartti,* apresentando concentrações celulares acima de até 1,4 g L⁻¹ e produção da proteína m*Cherry* de 419 UF h⁻¹.

CAPÍTULO 5: FABRICAÇÃO DOS FOTOBIORREATORES TIPO COLUNA COM AGITAÇÃO POR INJEÇÃO COM AR.

RESUMO

Microalgas são cultivadas em escala pequena, piloto e industrial para diferentes objetivos (alimentos, farmacêutico, cosmético, entre outros). O processo de produção das microalgas poderia ser dividido em dois grandes grupos: os sistemas abertos e os sistemas fechados. Os sitemas fechados apresentam algumas ventagems, como por exemplo, o fato de serem mais fáceis de controlar. Devido ao seu tamanho, são ideais para trabalhos em escala laboratorial e parâmetros como temperatura, pH, luminosidade, entre outros, são controlados mais facilmente. Objetiva-se descrever o processo de construção de fotobiorreator fechado tipo coluna com agitação por injeção de ar "*Air-lift*", apresentar a forma em que os cultivos foram realizados e mostrar alguns dos resultados obtidos com este sistema. O sistema de fotobiorreator em coluna apresentou concentração celular máxima de 1,37 g L⁻¹ e produtividade de 0,014 g L⁻¹ h⁻¹, comparado com o fotobiorreator tubular o qual apresentou 1,2 g L⁻¹, e produtividade para biomassa de 0,009g L⁻¹ h⁻¹ após 5 dias de cultivo. A maior produtividade foi registrada para o crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* geneticamente modificada no fotobiorreator tipo coluna.

Palavras-chave: *Chlamydomonas reinhardtii.* fotobiorreator. Microalgas. Coluna de burbulhas. *Air-lift.* Semicontínuo. m*Cherry.*

5.1 INTRODUÇÃO

O cultivo das microalgas em grande escala, nas últimas décadas, vem se tornando uma tecnologia de interesse para diferentes tipos de bioprodutos. É considerada uma tecnologia benéfica em relação ao meio ambiente, uma vez que incorpora CO₂ no processo, gerando biomassa. A fixação de CO₂ e a produção de O₂ são maiores que em plantas superiores, o que contribui para a remoção do gás poluente do meio ambiente (XU et al., 2009). Quando comparadas com as plantas, as microalgas apresentam maiores rendimentos fotossintéticos e a produtividade de biomassa é mais alta, assim como as taxas de crescimento (XU et al., 2009).

No passado, para a produção de microalgas eram utilizadas águas naturais, como pequenas lagoas artificiais. Na década de 1950, pela primeira vez, utilizou-se a luz solar e a água marinha (água-sal) para o cultivo massivo de microalgas que continham, na sua composição, diferentes tipos de proteínas, tornando o cultivo uma alternativa para alimento animal e humano. Já nos anos 1960 e 1970, as microalgas demonstraram aplicações promissoras na produção de combustíveis, tratamento de águas residuais, como trocadores iônicos, biofertilizantes, obtenção de compostos terapêuticos, entre outros (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).

Os sistemas de cultivo abertos (*open*) foram inicialmente realizados a campo aberto e utilizam a luz natural como fonte de iluminação. Estes sistemas são ainda muito utilizados, pois apresentam baixos custos de instalação e execução. Como exemplo, o sistema de carrossel que foi, inicialmente, o sistema de escolha no desenvolvimento de cultivos em massa, devido à sua facilidade de operação e de construção mas, ele é inapropiado para o desenvolvimento de sistemas de alta produtividade (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).

O sistema carrossel (Figura 5.1) tem demonstrado produções em concentrações celulares de 0,7g/L (massa seca). Carateriza-se por possuir canais de circuito fechado de baixa profundidade (15-20 cm) e o meio de cultivo é impulsionado por hélices giratórias. Este sistema tem como principal vantagem o custo de produção da biomassa, entretanto, por ser um sistema aberto de produção tem como desvantagens a fácil comtaminação, o custo da recuperação dos bioprodutos diluídos no meio e a dificuldade de controlar a temperatura. Essas desvantagens estimularam o desenvolvimento de diferentes tipos de fotobiorreatores, a partir de materiais

transparentes como vidro e algums tipos de policarbonatos (CONTRERAS-FLORES et al., 2003). A tabela 5.1 apresenta um breve resumo das carateristicas destes dois sistemas (XU et al., 2009).

	Sistema Aberto	Sistema fechado
Risco de contaminação	Alto	Baixo
Perda de CO ₂	Alto	Baixo
Perda por evaporação	Alto	Baixo
Uso eficiente da luz	Baixo	Alto
Relação Área/volume	Baixo	Alto
Área requerida	Alto	Baixo
Controle do processo	Dificil	Fácil
Produtividade de biomassa	Baixo	Alto
Custo de investimento	Baixo	Alto
Custo de operação	Baixo	Alto
Custo de coleta	Alto	Baixo
Aumento de escala	Fácil	Difícil

Tabela 5.1 – Comparação entre sistemas de produção para microalgas abertos e fechados.

(XU et al., 2009)

Figura 5.1 – Exemplo de sitema aberto de tipo carrossel. A cor preta simboliza as hélices que movimentam o cultivo (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).



Devido a essas desvantagens, nas últimas décadas, a implementação de fotobiorreatores de placas planas (Figura 5,2) e tubulares (Figura 5,3) tem sido realizada para a otimização dos processos. Estes sistemas demonstraram aumentar a densidade celular 3 vezes quando foram comparados com os sistemas convencionais de carrossel. Além disso, facilitaram o controle da contaminação e o controle sob as condições de cultivo tais como temperatura, pH, intensidade luminosa, entre outros (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).

Figura 5.2 – Exemplo de sistema fechado tipo placas planas (CONTRERAS-FLORES et al., 2003)



Figura 5.3 – Exemplo de sistema fechado de tipo tubular com *air lift* e iluminação externa (CONTRERAS-FLORES et al., 2003)



No final dos anos 1980, foram descritas tecnologias que consistiam em manter concentrações celulares superiores a 3 g/L, denominados de alta densidade celular (ADC) e concentrações de 15 a 80 g/L, denominados de ultra alta densidade celular (UADC). Com o aumento da densidade celular, é possível diminuir a fotoinibição em condições de alta intensidade de luz. Paralelamente, altas densidades celulares

aumentam a dificuldade do suprimento de luz devido ao efeito de sombra entre as células. Por isso, quando os nutrientes não são limitantes, a mistura do cultivo é determinante para a eficiência fotossintética e a produtividade (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).

Um problema intrínseco ao cultivo de alta densidade celular é a produção de substâncias autoinibitórias por parte das microalgas (por exemplo, o pigmento *marenina* produzida em diatomeas). Esas substâncias são acumuladas durante o cultivo e podem interferir na produtividade do processo. A solução encontrada para o problema foi a inclusão de etapas de filtração e ultrafiltração em processos contínuos e semi-contínuos. Com isso, foi possível eliminar as subtâncias autoinibitórias. Além disso, a adição de meio de cultivo ao processo aumentou a concentração celular dentro do cultivo (CONTRERAS-FLORES et al., 2003).

No âmbito dos estudos do cultivo de microalgas, existem muitos desafios, sendo que, estudos para minimizar a contaminação, o estudo da transferência de CO₂, o controle das condições de cultivo são alguns deles. Um exemplo particular deste sistema diz respeito à intensidade de luz aplicada no sistema. Embora a luz direta do sol possa ser um fator economicamente atrativo em sistemas abertos, é possível que altos níveis de intensidae luminosa possam levar à fotoinibição do sistema, tornando-se necessário o entendimento e o estudo destes processos (XU et al., 2009).

Por outro lado, intensidades de luz baixa podem limitar a atividade fotossintética e, com isso, a produtividade do processo fica afetada. Como a otimização da intensidade de luz é particular para cada espécie de microalga, a implementação de diferentes desenhos e novos conceitos em operação para o desenvolvimento de novos fotobiorreatores tornam-se necessários (XU et al., 2009).

Dentro dos sitemas fechados de produção, podemos encontrar diversos tipos de fotobiorreatores. Alguns modelos constantemente utilizados são o tubular e o tipo coluna, cujas vantagens residem no fato de possuírem alta relação da superfície irradiada por volume (MOLINO, 2017).

Um dos aspectos mais importantes a ser considerado no momento de projetar o desenho de um fotobiorreator é que as suas partes sejam de fácil manipulação e suportem autoclavagem, impresncindível para garatir a esterilidade e diminuir as posibilidades de contaminação de um cultivo. O objetivo deste trabalho é descrever o processo de construção de fotobiorretaores tipo coluna com agitação por injeção de ar "*Air-lift*", apresentar a forma em que os cultivos foram realizados e mostrar alguns dos resultados obtidos com este sistema.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Para a construção do fotobiorreator foram utilizados os seguintes materiais:

1. frasco de vidro (TECNAL) 25 cm de largura X 5 cm de diametro X 1,5 mm espessura

2. Silicone Acético sem solventes orgânicos para aquários, incolor, transparente (TITAN; SELENA, Curitiba);

- 3. Chapas de acrílico de 3 mm e 5 mm;
- 4. Parafusos de 4 cm X 3 mm, porcas e arruelas;
- 5. Furadeira BLACK & DECKER HD 500;
- 6. Mangueira autoclavável 1,5 mm parte interna X 4 mm parte externa;
- 7. MDF 6mm (suporte);
- 8. Filtro para seringa FPE-204-030 Jet Biofil 0,22 µm;
- 9. Filtro esterilizável (Sartorius stedim biotech Midisart 2000) 0,2 µm.

Cultivo em batelada e semicontínuo para produção da proteína mCherry

O cultivo para produção da proteína heteróloga m*Cherry* foi desscrito no capítulo IV.

Técnicas analíticas

As técnicas analíticas foram descritas no capítulo IV.

5.3 PROCEDIMENTO E RESULTADOS

Construção dos fotobiorreatores

Em primeiro lugar, foi medido o diâmetro do frasco de vidro TECNAL. Uma vez obtido esse dado, as chapas de acrílico foram cortadas com auxílio da furadeira HD 500 para fazer a tampa. A chapa de acrílico de 3 mm foi colocada na parte de baixo e a chapa de acrílico de 5 mm foi colocada na parte de cima. Parafusos de 4 cm x 3 mm, com suas respectivas porcas e arruelas foram colocados equidistantemente com o objetivo de segurar e fazer pressão nas chapas de acrílico de maneira a fechar, de forma confiável. Para testar o vedamento, adicionou-se água ao frasco e virou-se para baixo buscando vazamentos laterais (Figura 5,4).

Figura 5.4 – Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*



Uma vez realizado esse teste, foram abertos 4 furos na tampa acrílica de 5 mm procurando a broca que se ajustasse ao diâmetro justo da mangueira. A primeira entrada foi utilizada para entrada de ar, a segunda entrada para coleta de amostras, a terceira para entrada do eletrodo de pH e, por último, o fotobiorreator apresentaria saída de ar. Filtros foram colocados na entrada e na saída dor ar, sendo que na entrada foi colocado o filtro Midisart 2000 e na saída foi colocado o filtro FPE-204-030 da Jet Biofil. Uma seringa de 3 mL foi colocada no local destinado à coleta de amostras

(Figura 5.5). Para finalizar, foi colocado o silicone para conseguir a vedação (Figura 5.4).

Figura 5.5 – Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Localização de entradas e filtros.



A mangueira destinada à entrada de ar foi cortada tem comprimento de 24 cm, desde a tampa até o fundo do frasco, e 4 cm para fora do fotobiorreator. A mangueira destinada à coleta de amostras possui um comprimento de 18 cm, desde a tampa até o fundo do frasco, e 3 cm para fora do fotobiorreator. A mangueira destinada para saída de ar tem 2 cm, desde a tampa até o fundo do frasco, e 10 cm para fora do fotobiorreator. A entrada para o eletrodo de pH foi feita sob medida e foi gravada a forma de torno para o eletrodo encaixar rosqueado e, dessa forma, vedar completamente o fotobiorreator. Por último, é importante destacar que este sistema pode ser autoclavado completamente apresentando resistência à esterilização por calor úmido.

Inóculo, coleta de amostras e cortes em sistemas semicontínuos

No sentido de evitar contaminações, o inóculo foi feito com medidas estritas de assepsia em câmera de fluxo laminar, similar aos cortes nos sistemas contínuos de

produção e as coletas de amostra. A luz UV foi ligada 15 minutos antes de cada procedimento, junto com o fluxo de ar. Alcool 70% foi distribuído em toda a área de trabalho, nos materiais a serem utilizados e nos fotobiorreatores. Uma das vantagens mais atrativas desta configuração de biorreator é o seu tamanho que, junto com a simplicidade das suas conexões, pertmitiram a elaboração de uma sistema de fácil manipulação (Figura 5.6).

Figura 5.6 – Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Preparo de inóculo, coleta de amostras e cortes em sistemas semicontínuos realizados em câmera de fluxo laminar.



Controle do pH

Os cultivos foram realizados com controle de pH como apresentado no capítulo IV. Um cilindro de gás CO₂ foi acoplado ao sistema para fazer injeção, uma vez que o pH atingisse um valor máximo de 7,2. Essas conexões foram feitas antes do ar passar pelo filtro Midisart 2000, como apresentado na Figura 5,7.

Figura 5.7 – Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Correção de pH por meio da injeção de CO₂ ao meio de cultivo.



Cultivo em batelada comparado com fotobiorreator tubular de 3,5 L

Os cultivos em batelada demonstraram que a produtividade volumétrica de biomassa foi mais alta ao longo dos cultivos realizados em fotobiorreator tipo coluna quando comparado com o fotobiorreator tubular. Esses dados são apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.8. Alguns fatores podem ter influenciado estes resultados, como o controle de pH, que foi realizado no fotobiorreator tipo coluna, ou a agitação que, evidentemente, foi mais eficiente no fotobiorreator tipo coluna.

Tabela 5.2 - Comparação entre sistemas tubular e coluna para analisar a produtividade para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*.

DIA	Produtividade fotobiorreator tubular g L ⁻¹ h ⁻¹	Produtividade fotobiorreator tipo coluna g L ⁻¹ h ⁻¹
1	0.0033	0.0059
2	0.0038	0.0074
3	0.0055	0.0097
4	0.0084	0.0119
5	0.0093	0.0104

Figura 5.8 – Construção dos fotobiorreatores tipo coluna para cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Comparação qualitativa entre os cultivos realizados em batelada no fotobiorreator tubular de 3.5L e no fotobiorreator tipo coluna (terceiro dia de cultivo).



5.4 CONCLUSÃO

O fotobiorreator tipo coluna resultou em maiores valores de produtividade volumétrica para biomassa, seu tamanho favoreceu a fácil manutenção dos cultivos, a amostragem, e manipulação durante os cortes. O pH foi mantido com sucesso durante todos os processos de produção. Este tipo de fotobiorreator demostrou que é um sistema com grandes possibilidades para pesquisa e como um primeiro passo no estudo de cultivos em escala laboratorial. No entanto, apresentou uma única

desvantagem, ao ser comparado com o fotobiorreator tubular, que foi a maior perda de volume ao longo do processo. No entanto, essa perda foi facilmente detectável e, diariamente, foi corrigida com água destilada estéril. Futuros estudos poderiam ser encaminhados com vistas a acoplar algum tipo de destilador capaz de repor o volume de água perdido no processo.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO GERAL

Este trabalho apresenta uma visão geral da produção de proteínas heterólogas em microalgas focando, essencialmente, a microalga *C. reinhardtii* e comparando com outros sistemas de expressão. Ainda que *C. reinhardtii* apresente indícios de ser uma promisora e econômica plataforma para a produção deste tipo de moléculas, é necessário demonstrar a sua viabilidade no sentido de aumentar as produtividades e os rendimentos de produção. Para isso, foram testadas várias fontes de nitrogênio e os resultados indicaram que a fonte de nitrogênio tem efeito tanto no crescimento como na produção de proteínas heterólogas pela microalga.

Visando melhorar ainda mais o processo de produção, foram testados todos os macronutrientes do meio de cultivo TAP padrão e os resultados obtidos neste estudo apontaram que todos eles apresentam efeito sobre o crescimento de *C. reinhardtii* e alguns deles apresentam efeitos na produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Este estudo gerou, como resultado, uma equação que descreve o processo de produção. Para comprovar que os resultados obtidos podem ser usados em escalas maiores, o processo de produção foi escalado de microplaca a fotobiorreator de 3.2 L e os resultados obtidos demostraram que as principais tendências encontradas em microplaca se mantinham no fotobiorreator, comprovando os resultados obtidos na microplaca. Como resultado final, foi obtido um meio de cultivo TAP modificado que otimiza a produção de biomassa e da proteína heteróloga.

Na sequência, foi proposto continuar com a otimização da produção da proteína heteróloga estudando sistema semicontínuo e comparando com os resultados obtidos em batelada. Para isso, foi desenhado um fotobiorreator tipo coluna que ofereceu as produções mais altas, tanto na produção da mCherry como na produção da biomassa, sendo que a produção da m*Cherry* foi quase triplicada no processo semicontínuo.

Sugere-se a realização de outros estudos e considerem adicionar tempo aos sistemas semicontínuos, implementar sistemas contínuos de produção, melhorar e aperfeiçoar os fotobiorreatores e, possivelmente, acoplar sistemas de purificação ao processo de produção, com vistas a aumentar ainda mais o aproveitamento deste tipo de porcesso.

REFERÊNCIAS

ABDUL RAZACK, S.; DURAIARASAN, S.; MANI, V. Biosynthesis of silver nanoparticle and its application in cell wall disruption to release carbohydrate and lipid from C. vulgaris for biofuel production. **Biotechnology Reports**, v. 11, p. 70–76, 2016.

ABOU-SHANAB, R. A. I. et al. Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 3079–3085, 2011.

AHMAD, M. et al. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–17, jun. 2014.

AIZEMBERG, R. et al. Optimal Conditions for Biomass and Recombinant Glycerol Kinase Production Using the Yeast Pichia pastoris. **Food Technolo. Biotechnol.**, v. 49, n. 3, p. 329–335, 2011.

ALMARAZ-DELGADO, A. et al. Production of therapeutic proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 57, 2014.

ARIAS, C. A. D. et al. Cultivation of Pichia pastoris carrying the scFv anti LDL (-) antibody fragment. Effect of preculture carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–8, 2017.

ARIAS GÓMEZ, C. L. "Caracterización de la ruta de N -glicosilación de proteínas en el sistema de endomembranas del alga verde. 2012.

BENAVENTE-VALDES, J. R. et al. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophycae species. **Biotechnology Reports**, v. 10, p. 117–125, 2016.

BERTHOLD, W. P. et al. Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in Chlamydomonas by Immediate Light-Induced Depolarization. **The Plant Cell**, v. 20, n. June, p. 1665–1677, 2008.

BEZERRA, R. P. et al. Ethanol effect on batch and fed-batch Arthrospira platensis growth. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 4, p. 687–692, 2014.

BORKHSENIOUS, O. N.; MASON, C. B.; MORONEY, J. V. The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Physiology**, v. 116, p. 1585–91, 1998.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.

BOYLE, N. R.; MORGAN, J. A. Flux balance analysis of primary metabolism in Chlamydomonas reinhardtii. **BMC Systems Biology**, v. 3, p. 14, 2009.

BOYNTON, J. E. et al. Chloroplast Transformation in Chlamydomonas with High Velocity Microprojectiles. **Science**, v. 240, p. 1534–1537, 1988.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365–372, 2000.

BRESAOLA, M. D. Avaliação do crescimento de Ankistrodesmus braunii em reator tubular empregando diferentes concentrações de nitrato em diferentes condições de cultivo. [s.l: s.n.].

BRIAND, L. et al. A self-inducible heterologous protein expression system in Escherichia coli. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 33037, 2016.

BUSCONI, M. et al. Gene flow from transgenic rice to red rice (Oryza sativa L.) in the field. **Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 22–27, 2014.

CAMPOS-QUEVEDO, N. et al. Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 113, n. 2, p. 217–225, 2013.

CARRIER, G. et al. Comparative transcriptome of wild type and selected strains of the microalgae Tisochrysis lutea provides insights into the genetic basis, lipid metabolism and the life cycle. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

CARVALHO, J. C. M. et al. Cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis (Cyanophyceae) by Fed-Batch Addition of ammonium Chloride at exponetially increasing Feeding rates. **Journal of Phycology**, v. 40, n. 3, p. 589–597, 2004.

CHACÓN-LEE, T. L.; GONZÁLEZ-MARIÑO, G. E. Microalgae for "Healthy" Foods-

Possibilities and Challenges. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 6, p. 655–675, 2010.

CHEN, H. C.; MELIS, A. Marker-free genetic engineering of the chloroplast in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Biotechnology Journal**, v. 11, n. 7, p. 818–828, 2013.

CHEN, M. et al. Modification of plant N-glycans processing: The future of producing therapeutic protein by transgenic plants. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 3, p. 343–360, 2005.

COLL, J. M. Review. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 4, p. 316–330, 2006.

CONTRERAS-FLORES, C. et al. Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. **Inverciencia**, v. 28, n. 8, p. 450–456, 2003.

COOPER, M. et al. Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US corn-belt: Discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 21, p. 6191–6194, 2014.

CRISTÓBAL, J. et al. Environmental sustainability assessment of bioeconomy value chains. **Biomass and Bioenergy**, v. 89, 2016.

CROSS, F. R.; UMEN, J. G. The Chlamydomonas cell cycle. **Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 370–392, 2015.

DAUVILLÉE, D. et al. Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in Chlamydomonas starch granules. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.

DEMURTAS, O. C. et al. A Chlamydomonas-Derived Human Papillomavirus 16 E7 Vaccine Induces Specific Tumor Protection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–9, 2013.

DICKINSON, J. D. et al. Engineering the Caenorhabditis elegans Genome Using Cas9Triggered Homologous Recombination. **Nature methods**, v. 10, n. 10, p. 1028–1034, 2013.

DORON, L.; SEGAL, N.; SHAPIRA, M. Transgene Expression in Microalgae-From

Tools to Applications. Frontiers in plant science, v. 7, n. April, p. 505, 2016.

DREESEN, I. A. J.; HAMRI, G. C. E.; FUSSENEGGER, M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from Staphylococcus aureus infection. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 3, p. 273–280, 2010.

EICHLER-STAHLBERG, A. et al. Strategies to facilitate transgene expression in Chlamydomonas reinhardtii. **Planta**, v. 229, n. 4, p. 873–883, 2009.

FERREIRA, L. S. et al. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 5, p. 1271–1277, 2010.

FERREIRA, L. S. et al. Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO2 from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, p. 379–385, 2012.

FERREIRA-CAMARGO, L. S. et al. Selenocystamine improves protein accumulation in chloroplasts of eukaryotic green algae. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 126, 2015.

FETT, J. P.; COLEMAN, J. R. Regulation of Periplasmic Carbonic Anhydrase Expression in Chlamydomonas reinhardtii by Acetate and pH. **Plant physiology**, v. 106, p. 103–108, 1994.

FINGERUT, E. et al. Vaccine and adjuvant activity of recombinant subunit B of E. coli enterotoxin produced in yeast. **Vaccine**, v. 23, p. 4685–4696, 2005.

FRANKLIN, S. et al. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. **Plant J**, v. 30, n. 6, p. 733–744, 2002.

FUHRMANN, M.; OERTEL, W.; HEGEMANN, P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in Chlamydomonas reinhardtii. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 19, n. 3, p. 353–361, 1999.

GANGL, D. et al. Biotechnological exploitation of microalgae. Journal of **Experimental Botany**, v. 66, n. 22, p. 6975–6990, 2015.

GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Antibody production with yeasts and filamentous fungi: on the road to large scale? **Biotechnology letters**, v. 29, n. 2, p. 201–12, fev.

2007.

GIMPEL, J. A. et al. Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 2, p. 339–345, 2015.

GOLDEN, J. et al. An Economic Impact Analysis of the U.S. Biobased Products Industry. Nort Carolina: [s.n.].

GONG, Y. et al. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: Progress and prospects. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 12, p. 1879–1890, 2011.

GONZÁLEZ, A. S. Estudio de la producción heteróloga de una lipasa del hongo Rhizopus oryzae en la levadura metilotrófica Pichia pastoris. p. 129, 2001.

GONZALEZ, C. D.; PETRUCCELLI, S. "Construcción y expresión de una proteína de fusión C-terminal entre la cadena kappa del anticuerpo 14D9 y una proteína fluorescente roja". 2010.

GREGORY, J. A. et al. Algae-produced pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2012a.

GREGORY, J. A. et al. Algae produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012b.

GREGORY, J. A.; DOERNER, D. Z.; MAYFIELD, S. P. Alga-produced cholera toxin Pfs25 fusion proteins as oral vacines. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 3917–3925, 2013.

HARRIS, E. H. Chlamydomonas As a Model Organism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol**, v. 52, p. 363–406, 2001.

HE, D. M. et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in Chlamydomonas reinhardtii chroloplasts. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, n. 1, p. 26–30, 2007.

HEITZER, M.; ZSCHOERNIG, B. Construction of modular tandem expression vectors for the green alga Chlamydomonas reinhardtii using the Cre/lox-system.

BioTechniques, v. 43, n. 3, p. 324–332, 2007.

HENRARD, A. Cultivo semicontínuo das microalgas Cyanobium sp. e Chlorella sp. [s.l.] Universidade federal de rio grande FURG, 2009.

HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–399, 2012.

HUTNER, S. H. et al. Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms Author (s): S. H. Hutner, L. Provasoli, Albert Schatz and C. P. Haskins Reviewed work (s): Published by : American Philosophical Society Stable URL : http://. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 94, n. 2, p. 152–170, 1950.

IMAM, S. H.; SNELL, W. J. Degradation of the Framework of the Chlamydomonas Cell Wall by Proteases Present in a Commercially Available alpha-Amylase Preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1701–1704, 1987.

JERUMS, M.; YANG, X. Optimization of Cell Culture Media. **BioProcess International** International, v. 21, n. 1, p. 38–44, 2005.

JIN, T. et al. A new transient expression system for large-scale production of recombinant proteins in plants based on air-brushing an Agrobacterium suspension. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 36–40, 2015.

JONES, C. S. et al. Heterologous expression of the C-terminal antigenic domain of the malaria vaccine candidate Pfs48/45 in the green algae Chlamydomonas reinhardtii. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1987–1995, 2013.

KADAM, P. C.; BOONE, D. R. Influence of pH on ammonia accumulation and toxicity in halophilic, methylotrophic methanogens. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4486–4492, 1996.

KANG, N. K. et al. Heterologous overexpression of sfCherry fluorescent protein in Nannochloropsis salina. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 10–15, 2015.

KATHIRESAN, S. et al. Culture Media Optimization for Growth and Phycoerythrin Production from Porphyridium purpureum. **Biotechnology and Bioengineering**, v.

96, p. 456–463, 2006.

KATO, T.; YOSHIZUKA, K.; PARK, E. Y. New strategy for rapid isolation of stable cell lines from DNA-transformed insect cells using fluorescence activated cell-sorting. **Journal of Biotechnology**, v. 147, n. 2, p. 102–107, 2010.

KIM, J.; MAYFIELD, S. P. Protein disulfide isomerase as a regulator of chloroplast translational activation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 278, n. 5345, p. 1954–7, 1997.

KIRK, D. D. et al. Risk analysis for plant-made vaccines. **Transgenic Research**, v. 14, n. 4, p. 449–462, 2005.

KNUDSEN, J. D. et al. Exploring the potential of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (GPD2) promoter for recombinant gene expression in Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology Reports**, v. 7, p. 107–119, 2015.

KODATI, B.; DORBHA, S.; KUNAPARAJU, R. K. Heterologus Protein Expression in Different Host Systems. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 4, p. 1068–1074, 2016.

LAL, S. K.; TULASIRAM, P.; JAMEEL, S. Expression and characterization of the hepatitis E virus ORF3 protein in the methylotrophic yeast, Pichia pastoris. **Gene**, v. 190, p. 63–67, 1997.

LARA, A. Recombinant protein production in Escherichia coli. **Revista Mexicana de Ingenieria Quimica**, v. 10, n. 2, p. 209–223, 2011.

LARINA, I. V et al. Murine Embryonic Development. v. 292, n. 3, p. 333–341, 2010.

LARKUM, A. W. D. et al. Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 198–204, 2012.

LEE, S.; LIM, W. A.; THORN, K. S. Improved Blue, Green, and Red Fluorescent Protein Tagging Vectors for S. cerevisiae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 4–11, 2013.

LEHTIMÄKI, N.; KOSKELA, MINNA, M.; MULO, P. Post-translational modifications of chloroplast proteins: An emerging field. **Plant Physiology**, v. 168, n. July, p. pp.00117.2015, 2015.

LEROUGE, P. et al. N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. **Plant molecular biology**, v. 38, n. 1–2, p. 31–48, 1998.

LI, J. W. et al. Construction of a fusion gene containing hepatitis B virus L gene and Mycobacterium tuberculosis Ag85B gene and its expression in Pichia pastoris. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 60, p. 12840–12846, 2011.

LOUREIRO, I. et al. Pollen-mediated gene flow in the cultivation of transgenic cotton under experimental field conditions in Spain. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 22–28, 2016.

LUMBRERAS, V.; STEVENS, D. R.; PURTON, S. Efficient foreign gene expression in Chlamydomonas reinhardtii mediated by an endogenous intron. **Plant Journal**, v. 14, n. February, p. 441–447, 1998.

MANUELL, A. L. et al. Robust expression of a bioactive mammalian protein in Chlamydomonas chloroplast. **Plant Biotechnology Journal**, v. 5, p. 402–412, 2007.

MARTÍNEZ-ANAYA, C.; BALCÁZAR-LÓPEZ, E.; L, E. D. J. Artemisa Celulasas fúngicas : Aspectos biológicos y aplicaciones en la industria energética. 2008.

MATELES, R. I.; BATTAT, E. Continuous Culture Used for Media Optimization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 901–905, 1974.

MATHIEU-RIVET, E. et al. Protein N-glycosylation in eukaryotic microalgae and its impact on the production of nuclear expressed biopharmaceuticals. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. July, p. 1–13, 2014.

MATSUDO, M. C. et al. Repeated fed-batch cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 52–57, 2009.

MATSUDO, M. C. Cultivo continuo de Arthospira (Spirulina) platensis en fotobioreactor tubular utilizando uréia como fonte de nitrogênio e CO2 puro ou proveniente de fermentacao alcoólica. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

MATSUDO, M. C. et al. CO2 from alcoholic fermentation for continuous cultivation of Arthrospira (Spirulina) platensis in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 650–656, 2011.

MATSUDO, M. C. et al. Use of acetate in fed-batch mixotrophic cultivation of Arthrospira platensis. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1721–1728, 2015.

MAYFIELD, S. P. et al. Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts as protein factories. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 126–133, 2007.

MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E. Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae. **Vaccine**, v. 23, n. 15 SPEC. ISS., p. 1828–1832, 2005.

MAYFIELD, S. P.; FRANKLIN, S. E.; LERNER, R. A. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 438–442, 2003.

MERCHANT, S. S. et al. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. **Science**, v. 318, n. 5848, p. 245–250, 2010.

MILLER, K. D. et al. Production, purification, and characterization of human scFv antibodies expressed in Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris, and Escherichia coli. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 2, p. 255–267, ago. 2005.

MOLINO, J. **Produção de proteínas heterólogas em microalga**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

MOON, M. et al. Mixotrophic growth with acetate or volatile fatty acids maximizes growth and lipid production in Chlamydomonas reinhardtii. **Algal Research**, v. 2, n. 4, p. 352–357, 2013.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; SATO, S.; DE CARVALHO, J. C. M. Ferric sulfate coagulation and powdered activated carbon adsorption as simultaneous treatment to reuse the medium in Arthrospira platensis cultivation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 4, p. 901–910, 2016.

NELSON, B. K.; CAI, X.; NEBENFÜHR, A. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. **Plant Journal**, v. 51, n. 6, p. 1126–1136, 2007.

NORRIS, A. D. et al. Efficient genome editing in caenorhabditis elegans with a toolkit of dual-marker selection cassettes. **Genetics**, v. 201, n. 2, p. 449–458, 2015.

NYMARK, M. et al. A CRISPR/Cas9 system adapted for gene editing in marine algae. **Scientific reports**, v. 6, n. April, p. 24951, 2016.

OTLES, S.; PIRE, R. Fatty Acid Compositon of Chlorella and Spirulina Microalgae Species. Journal of AQAC INTERNACIONAL, v. 84, Nº6, p. 1708–1714, 2001.

PADDON, C. J. et al. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 528–32, 2013.

PASCHINGER, K. et al. Molecular basis of anti-horseradish peroxidase staining in Caenorhabditis elegans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 48, p. 49588–49598, 2004.

PELIZER, L. H.; DE CARVALHO, J. C. M.; DE OLIVEIRA MORAES, I. Protein production by Arthrospira (Spirulina) platensis in solid state cultivation using sugarcane bagasse as support. **Biotechnology Reports**, v. 5, n. 1, p. 70–76, 2015.

PFANNEBECKER, J. et al. Culture medium optimization for osmotolerant yeasts by use of a parallel fermenter system and rapid microbiological testing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 14–22, 2016.

POTVIN, G.; ZHANG, Z. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 910–918, 2010.

PREISS, S.; SCHRADER, S.; JOHANNINGMEIER, U. Rapid, ATP-dependent degradation of a truncated D1 protein in the chloroplast. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 16, p. 4562–4569, 2001.

PRÖSCHOLD, T.; HARRIS, E. H.; COLEMAN, A. W. Portrait of a species: Chlamydonomas reinhardtii. **Genetics**, v. 170, n. 4, p. 1601–1610, 2005.

PUMPLIN, N.; HARRISON, M. J. Live-Cell Imaging Reveals Periarbuscular Membrane Domains and Organelle Location in Medicago truncatula Roots during Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. **Plant Physiology**, v. 151, n. 2, p. 809–819, 2009.

PURTON, S.; ROCHAIX, J.-D. Characterisation of the ARG7 gene of Chlamydomonas reinhardtii and its application to nuclear transformation. **European Journal of Phycology**, v. 30, n. 2, p. 141–148, 1995.

QU, B. et al. Droplet electroporation in microfluidics for efficient cell transformation with or without cell wall removal. **Lab on a Chip**, v. 12, n. 21, p. 4483, 2012.

RADZUN, K. A. et al. Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 65, 2015.

RASALA, B. A et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 719–733, 2010a.

RASALA, B. A. et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, n. 6, p. 719–733, 2010b.

RASALA, B. A. et al. Improved heterologous protein expression in the chloroplast of chlamydomonas reinhardtii through promoter and 5' untranslated region optimization. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, n. 6, p. 674–683, 2011.

RASALA, B. A. et al. Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in Chlamydomonas reinhardtii by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43349, 2012.

RASALA, B. A. et al. Expanding the spectral palette of fluorescent proteins for the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. **Plant Journal**, v. 74, n. 4, p. 545–556, 2013.

RASALA, B. A. et al. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. The Microalga Chlamydomonas reinhardtii as a Platform for the Production of Human Protein Therapeutics. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 1, p. 50–54, 2011.

RASALA, B. A.; MAYFIELD, S. P. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. **Photosynthesis research**, v. 123, n. 3, p. 227–239, 2015.

ROSALES-MENDOZA, S.; PAZ-MALDONADO, L. M. T.; SORIA-GUERRA, R. E.

Chlamydomonas reinhardtii as a viable platform for the production of recombinant proteins: Current status and perspectives. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 3, p. 479–494, 2012.

RYBICKI, E. P. Plant-produced vaccines: promise and reality. **Drug Discovery Today**, v. 14, n. 1–2, p. 16–24, 2009.

SATJARAK, A.; PAASCH, A. E.; GRAHAM, L. E. Complete Chloroplast Genome Sequence of Phagomixotrophic Green Alga Cymbomonas tetramitiformis. v. 4, n. 3, p. 5–6, 2016.

SCAIFE, M. A. et al. Establishing Chlamydomonas reinhardtii as an industrial biotechnology host. **Plant Journal**, v. 82, n. 3, p. 532–546, 2015.

SCHIRRMANN, T. et al. Production systems for recombinant antibodies. **Frontiers in Bioscience**, n. 6, p. 4576–4594, 2008.

SEED, C. E.; TOMKINS, J. L. Flow cytometric methods for indirect analysis and quantification of gametogenesis in Chlamydomonas reinhardtii (Chlorophyceae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–21, 2016.

SHANER, N. C. et al. Evaluating and improving the photostability of fluorescent proteins. v. 7191, p. 719105, 2009.

SHIN, S.-E. et al. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in Chlamydomonas reinhardtii. **Scientific reports**, v. 6, n. April, p. 27810, 2016.

SILFLOW, C. D.; LEFEBVRE, P. A. Assembly and motility of eukaryotic cilia and flagella. Lessons from Chlamydomonas reinhardtii. **Plant physiology**, v. 127, n. 4, p. 1500–1507, 2001.

SORIA-GUERRA, R. E. et al. Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in Chlamydomonas reinhardtii as a candidate hypertension vaccine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 116, n. 2, p. 133–139, 2014.

SPECHT, E. A.; MAYFIELD, S. P. Algae-based oral recombinant vaccines. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2014.

SPECHT, E.; MIYAKE-STONER, S.; MAYFIELD, S. Micro-algae come of age as a

platform for recombinant protein production. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 10, p. 1373–1383, 2010.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. Journal of bioscience and bioengineering, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STEENSELS, J. et al. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 22, p. 6965–6975, 2014.

STOFFELS, L. et al. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against Streptococcus pneumoniae in the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii. 2017.

SUN, M. et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> chloroplast. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1087–1092, 2003.

SURZYCKI, R. et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. **Biologicals**, v. 37, n. 3, p. 133–138, 2009a.

SURZYCKI, R. et al. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. **Biologicals**, v. 37, n. 3, p. 133–138, 2009b.

TAM, L. W.; LEFEBVRE, P. A. Cloning of flagellar genes in Chlamydomonas reinhardtii by DNA insertional mutagenesis. **Genetics**, v. 135, n. 2, p. 375–384, 1993.

THERIEN, J. B. et al. Growth of Chlamydomonas reinhardtii in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of Synechococcus sp. PCC 7002. **Biotechnology for biofuels**, v. 7, n. 1, p. 154, 2014.

TOURASSE, N. J. et al. The complete mitochondrial genome sequence of the green microalga Lobosphaera (Parietochloris) incisa reveals a new type of palindromic repetitive repeat. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 580, 2015.

TRAGIN, M. et al. Diversity and ecology of green microalgae in marine systems: an overview based on 18S rRNA gene sequences. **Perspectives in Phycology**, v. in press, n. 3, p. 70176, 2016.

TRAN, M. et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody

in algal chloroplasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 4, p. 663–673, 2009.

TRAN, M. et al. Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 1, p. E15-22, 2013.

VOIGT, J. et al. Alteration of the Cell Surface during the Vegetative Cell Cycle of the Unicellular Green Alga Chlamydomonas reinhardtii. **Plant and Cell Physiology**, v. 37, n. 6, p. 726–733, 1996.

WALKER, T. L. et al. Microalgae as bioreactors. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 11, p. 629–641, 2005.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 992–1000, 2014.

WANG, D. et al. Nannochloropsis Genomes Reveal Evolution of Microalgal Oleaginous Traits. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 1, 2014.

WANG, Q. et al. Genome editing of model oleaginous microalgae Nannochloropsis spp. by CRISPR/Cas9. **Plant Journal**, p. 1071–1081, 2016.

WANG, X. et al. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). **BMC Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 87, 2008.

WANNATHONG, T. et al. New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga Chlamydomonas reinhardtii. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5467–5477, 2016.

WILSON, I. B. H. Glycosylation of proteins in plants and invertebrates. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 5, p. 569–577, 2002.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–8, nov. 2004.

XU, L. et al. Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities. **Engineering in Life Sciences**, v. 9, n. 3, p. 178–189, 2009.

YAN, N. et al. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1–24, 2016.

YANG, Z. et al. Expression of human soluble TRAIL in Chlamydomonas reinhardtii chloroplast. **Chinese Science Bulletin**, v. 51, n. 14, p. 1703–1709, 2006.

YAO, J. et al. Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 28549–28565, 2015.

YU, K. et al. Transcriptome analyses of insect cells to facilitate baculovirus-insect expression. **Protein and Cell**, v. 7, n. 5, p. 373–382, 2016.
ANEXOS

ANEXO 1

Acetato	Calcio	Sulfato	Nitrogenio	Fosforo	Biomassa g/L	m <i>Cherry</i> UF
-1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	0.220772604	7050.456943
-1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	0.220892461	7041.847777
-1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	0.242410920	7015.436028
-1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	0.242966288	7334.568519
-1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	0.228925628	7376.38947
-1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	0.218272874	7185.991634
-1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	0.247326379	6787.019187
-1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.249101122	7357.176957
-1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	0.217516320	7266.486314
-1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	0.221135899	7319.823588
-1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	0.239722841	7013.103574
-1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	0.241721247	7194.112031
-1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	0.224712306	6809.184323
-1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	0.200069557	7340.376921
-1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	0.239252005	7412.473857
-1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.241711614	7448.638265
1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	0.224082394	7290.283714
1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	0.285414654	7815.76339
1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	0.393761369	8018.98245
1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	0.373814875	7724.115668
1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	0.377953451	7705.637901
1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	0.387442485	7742.547968
1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	0.478519529	7764.083386
1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.469416805	7748.638265
1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	-1.00000	0.356136971	7810.630172
1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	1.00000	0.396779028	7788.021733
1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	-1.00000	0.474216151	7750.970719
1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	1.00000	0.471423218	7798.731472
1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	-1.00000	0.333932582	7698.28817
1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	1.00000	0.380738363	7889.351641
1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	-1.00000	0.387640455	7896.187597
1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	1.00000	0.387640455	7710.771119
-2.37841	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.172161582	6530.462854
2.37841	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.580139111	9017.209239
0.00000	-2.37841	0.00000	0.00000	0.00000	0.288159449	7539.772211
0.00000	2.37841	0.00000	0.00000	0.00000	0.287089356	7581.488133
0.00000	0.00000	-2.37841	0.00000	0.00000	0.282487959	7327.032372
0.00000	0.00000	2.37841	0.00000	0.00000	0.284301760	7744.764481
0.00000	0.00000	0.00000	-2.37841	0.00000	0.174724451	6929.576248

0.00000	0.00000	0.00000	2.37841	0.00000	0.163766716	6768.143585
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	-2.37841	0.248266455	7136.553151
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	2.37841	0.287045479	7606.267618
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.455516320	7154.144312
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.482798287	7363.196781
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.470556450	7588.092207
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.460872131	7275.422843
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.402915995	7334.382104
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.488359016	7438.255888
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.489170677	7446.235337
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.478737297	7370.430572
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.460781169	7354.589658
0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.468860349	7394.719014

ANEXO 2

ANEXO 2 – Cultivo da microalga *C. reinhardtii* geneticamente modificada para produção da proteína heteróloga m*Cherry*. Comparação qualitativa entre os cultivos realizados em batelada com o meio de cultivo TAP modificado (esquerda) e o meio de cultivo TAP padrão (direita). Setimo dia de cultivo.

