

UFSCar – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Valdemir Moretto Cardoso

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE A DE  
SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO EM *Escherichia coli*: ANÁLISE  
ECONÔMICA E INFLUÊNCIA DA PLATAFORMA DE  
EXPRESSÃO

São Carlos - SP  
2019

UFSCar – UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Valdemir Moretto Cardoso

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE A DE  
SUPERFÍCIE DE PNEUMOCOCO EM *Escherichia coli*: ANÁLISE  
ECONÔMICA E INFLUÊNCIA DA PLATAFORMA DE  
EXPRESSÃO

Tese apresentada à Banca Examinadora do  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Química da Universidade Federal de São Carlos,  
atendendo ao requisito para a obtenção do título de  
Doutor em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos - SP  
2019

Cardoso, Valdemir Moretto

PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE A DE SUPERFÍCIE  
DE PNEUMOCOCCO EM Escherichia coli: ANÁLISE ECONÔMICA E  
INFLUÊNCIA DA PLATAFORMA DE EXPRESSÃO / Valdemir Moretto  
Cardoso. -- 2019.

165 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,  
São Carlos

Orientador: Profª. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

Banca examinadora: Profª. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, Dra. Viviane  
Maimoni Gonçalves, Prof. Dr. Alvaro de Batista Neto, Prof. Dr. Adilson José  
da Silva, Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior

Bibliografia

1. Análise econômica de processo. 2. Biorreator. 3. ClearColi. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE VALDEMIR MORETTO CARDOSO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 24 DE JULHO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:

  
Teresa Cristina Zangirolami  
Orientadora, UFSCar

  
Viviane Maimoni Gonçalves  
Instituto Butantan

  
Álvaro de Baptista Neto  
UNESP

  
Adilson José da Silva  
UFSCar

  
Ruy de Sousa Júnior  
UFSCar

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mulher e ao meu filho,  
por me motivarem e estarem sempre comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro agradeço a Deus, a Jesus e à santíssima mãe Maria, pela minha vida e por todas as oportunidades recebidas ao longo dela.

À minha mulher e ao meu filho por todos os momentos que compartilhamos juntos, pela paciência e compreensão nos momentos que estive ausente, para executar as atividades ligadas a este trabalho.

Aos meus familiares mais próximos (pais, irmãos, sogros e cunhada) pela preocupação e torcida, para que esse doutorado fosse bem-sucedido.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), ao programa de pós-graduação de Engenharia Química (PPGEQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela disponibilização de suas instalações para o aprendizado, pelo meu ingresso no programa de doutorado e pelo suporte financeiro.

Em relação às atividades desenvolvidas neste doutorado, preciso agradecer muito à minha orientadora Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, que me acolheu e apoiou no desenvolvimento do novo tema do doutorado nesses três últimos anos contribuindo não somente para o aprimoramento do trabalho, mas também para o meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço também a todos os docentes e técnicos do departamento de engenharia química da UFSCar, que sempre se mostraram dispostos a sanar dúvidas e pelo suporte nos momentos de necessidade. Em especial aos professores doutores Antônio Carlos Luperni Horta e Adilson José da Silva, que apoiaram as atividades experimentais nos laboratórios sob as suas responsabilidades, Marco Giulietti, meu falecido ex-orientador, José Maria Bueno e Edson Luiz Silva, pelo suporte e amparo em minha transição de temas no doutorado.

Aos amigos e colegas de PPGEQ pelo convívio durante todo o período do desenvolvimento da minha pós-graduação, destacando Gilson Campani Jr., Cíntia R. Sargo, Sheyla A. H. Paredes, Thiago Mesquita, Matheus Harth, pelos ensinamentos, esclarecimentos de dúvidas e envolvimento em atividades que apoiaram o término desse doutorado.

Ao Instituto Butantan, representado pela pesquisadora Dra. Viviane Maimoni Gonçalves, pela parceria acadêmica, sugestões e atividades experimentais complementares que permitiram o aperfeiçoamento dessa Tese.

## RESUMO

As infecções causadas pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* constituem problemas de saúde pública no âmbito nacional e mundial. A proteína de superfície A do pneumococo (PspA) é reconhecida como um dos fatores de virulência desta bactéria e tem se destacado pelo seu desempenho em cobertura e proteção quando presente em vacinas conjugadas ou de subunidades antigênicas. Para a obtenção em larga escala, PspA pode ser produzida por células da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* geneticamente modificadas. Porém, as linhagens de *E. coli* comumente empregadas como plataformas de expressão de proteínas recombinantes produzem lipopolissacarídeos (LPS), que podem causar inflamações e outras reações adversas caso a presença dessas endotoxinas em formulações vacinais não seja reduzida, o que pode exigir o emprego de etapas adicionais de purificação e contribuir para o aumento do custo do processo de produção da vacina. Em 2013, tornou-se disponível no mercado uma linhagem de *E. coli* BL21(DE3) conhecida como ClearColi<sup>®</sup>, a qual sintetiza LPS geneticamente modificado, isento de atividade endotóxica. Contudo, o impacto do uso de uma linhagem de *E. coli* detoxificada no processo de produção de PspA em biorreator, conduzido sob diferentes estratégias de cultivo, ainda não havia sido estudado, sobretudo em termos econômicos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o processo de produção de PspA4Pro, um fragmento da PspA com potencial imunogênico, usando como plataformas de expressão células de *E. coli* BL21(DE3) dos tipos convencional e ClearColi<sup>®</sup> transformadas com o plasmídeo pET37b(+)/pspA4Pro. As melhores condições de temperatura, indução e composição de meio complexo observadas em *shaker* foram avaliadas em biorreator, nos modos de operação batelada e batelada-alimentada, para buscar a intensificação da produção de PspA4Pro. Cultivos em biorreator utilizando meio definido também foram realizados para comparação. Já os estudos com *E. coli* BL21(DE3) convencional focaram principalmente na avaliação de um extrato elaborado a partir de suplemento de proteína de soja para consumo humano como fonte de nitrogênio alternativa e foram realizados em *shaker* e biorreator (31 °C, autoindução com lactose). Nos experimentos, o crescimento da biomassa foi acompanhado por medidas de densidade óptica a 600 nm e de massa seca (MS); a produção de PspA4Pro foi determinada pela mensuração de proteínas totais (Bradford) e pela realização de eletroforese seguida por densitometria de banda; o consumo de glicerol e a formação de produtos metabólicos foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência. A partir dos dados obtidos de cultivos em biorreator com *E. coli* convencional (nove cultivos), que exploraram diferentes estratégias de produção de PspA4Pro (meio complexo e definido, indução por lactose ou IPTG e diferentes temperaturas), e com ClearColi<sup>®</sup> (cinco cultivos), conduzidos sob diferentes meios, concentrações de IPTG e nos modos batelada e batelada-alimentada de produção, uma metodologia para a análise econômica do processo foi desenvolvida e aplicada, para avaliar o impacto de diferentes condições de processo nos gastos com componentes, energia elétrica e gases. Nas condições estudadas, os resultados da análise econômica dos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> demonstraram que a produção de PspA4Pro em batelada simples foi mais econômica que em batelada-alimentada, apesar destes cultivos terem produtividades e concentrações mais altas de proteína recombinante. Com células convencionais a análise mostrou que o uso de IPTG como indutor em maior escala foi economicamente o mais viável, enquanto que os cultivos conduzidos à temperatura de 32 °C e em meio definido levaram a menores custos; porém, verificou-se que o emprego de meio complexo para a produção de PspA torna-se economicamente mais favorável se o preço da peptona (ou de fontes de nitrogênio alternativas) for igual ou inferior a US\$ 30,00/kg. O rendimento de PspA por biomassa observado com ClearColi<sup>®</sup> (173±21 mgPspA/gMS) em cultivo em biorreator (32 °C, meio complexo e indução por IPTG 0,70 mM) é equiparável aos melhores valores com células convencionais. Contudo, sob estratégias similares de produção, os custos diretos de processo com PspA4Pro usando ClearColi<sup>®</sup> foram superiores. A utilização da linhagem de *E. coli* detoxificada como plataforma para a fabricação de produtos recombinantes se mostrou escalonável e promissora. A escolha da melhor plataforma de produção de PspA e de estratégias eficientes para sua produção depende da avaliação do impacto da possível simplificação do processo *downstream* sobre o custo da purificação, integrada à análise do desempenho da etapa de produção em termos operacionais e econômicos.

Palavras-chaves: batelada-alimentada, biorreator, intensificação de processo, PspA, ClearColi.

## ABSTRACT

*Streptococcus pneumoniae* diseases represent a widespread public health. Pneumococcal surface protein A (PspA), which is recognized as one of the main virulence factors of this bacterium, has gained relevance in coverage and protection when used as part of conjugated vaccines or antigenic subunits. To a large scale offer, PspA may be produced by Gram-negative bacteria genetically modified as *Escherichia coli*. Nevertheless, *E. coli* strains, which are commonly used as expression platforms of recombinant proteins, produce lipopolysaccharides (LPS), an endotoxin that can cause adverse reactions whether it is present in vaccine compositions. This fact may demand additional steps during protein purification and contribute to increase process cost of this vaccine production. In 2013, a new *E. coli* BL21(DE3) strain (ClearColi<sup>®</sup>) has been commercially available. This strain synthesizes a genetically modified LPS, which is endotoxin-free. However, PspA production in such organisms has not been assessed yet and the impact of different strategies of cultivation and economical process implications are not known. Then, the present work had as objective to evaluate PspA4Pro process production using ClearColi<sup>®</sup> and conventional *E. coli* BL21(DE3) cells harboring the plasmid pET37b(+)/*pspA4Pro* as expression platforms to PspA4Pro, an untagged fragment of PspA with immunogenic potential. The best conditions of temperature, induction and complex medium composition evidenced in shaker flasks were evaluated in bioreactor during batch and fed-batch modes in order to intensify PspA4Pro production. Bioreactor cultivations using defined medium were performed for comparisons. Studies involving conventional *E. coli* BL21(DE3) focused mainly on evaluating an ordinary extract from soy supplement for human consumption as alternative nitrogen source in shaker and bioreactor (31 °C, autoinduction with lactose) assays. During experiments, the biomass growth was followed by optic density measures (600 nm) and dry cell weight (DCW); PspA4Pro production was determined by measures of total proteins (Bradford) and by proceeding electrophoreses followed by band densitometry; glycerol consumption and metabolic products formation were evaluated by high performance liquid chromatography. In order to assess the impact of different process conditions on component, energy and gases expenses, it was developed and applied an economic analysis from 9 bioreactors cultivations using conventional *E. coli* (in which were compared defined and complex media, lactose and IPTG as inducers and temperatures from 27 to 37 °C) and cultivations using ClearColi<sup>®</sup> (five) in different media, IPTG concentrations and operation modes (batch and fed-batch). Into the studied conditions, the economic results demonstrated that PspA4Pro production in simple batches may be more cost-effective than fed-batches, despite the latter have presented higher recombinant protein titers and productivities. Economic results based on conventional cell experiments showed that using IPTG as inducer in a higher scale was more viable, while lower costs were obtained in cultivations at 32 °C using defined medium, even though peptone (or alternative nitrogen sources) prices below US\$ 30.00/kg turn the complex medium the best choice. Although PspA-biomass bioreactor yield using ClearColi<sup>®</sup> (173±21 mgPspA/gDCM at 32 °C with complex medium and induced by IPTG 0.70 mM) was the same order of the best values as conventional cultivations, the ClearColi<sup>®</sup> protein direct costs were the highest ones under similar production strategies. Endotoxin-free *E. coli* strain is scalable and promising as an expression platform of recombinant proteins. The choices of the best platform to produce PspA and the best strategy for it depend on evaluations of the impact of downstream process simplification in purification cost together with the operational and economic performance during production step.

Key-words: bioreactor, ClearColi, fed-batch, process intensification, PspA.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aparato experimental usado no cultivo em biorreator..... 38
- Figura 2.** Características dos extratos preparados a partir de suspensões com diferentes concentrações do suplemento de proteínas de soja. (a) quantificação de proteína solubilizada; (b) quantificação de peptídeos e aminoácidos. Preparo do extrato: incubação por 1h, 37 °C e 300 rpm seguida por centrifugação em 30 min, 37°C e 6300 rpm. .... 40
- Figura 3.** Perfis de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) em *shaker*. (a) Meios A e B (sem indução); (b) Meios C, D e E sob indução com IPTG 1mM. Momento da indução indicado pelas linhas verticais tracejadas. .... 42
- Figura 4.** Perfis de produção de PspA4Pro e proteínas contaminantes em *E. coli* BL21(DE3) à 37 °C. (a) Concentrações; (b) Valores específicos. .... 44
- Figura 5.** Crescimento, formação de ácidos orgânicos, consumo de substratos, produção de PspA e retenção plasmidial em cultivo em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) à 31 °C em meio de autoindução usando o extrato do suplemento de proteína de soja como fonte de nitrogênio alternativa: a) biomassa e fontes de carbono; b) rendimento PspA4Pro e Proteínas contaminantes.  $C_X$ : concentração de biomassa; PC: proteínas contaminantes..... 46
- Figura 6.** Purificação e análise da estrutura secundária da PspA4Pro obtida em cultivo de *E. coli* BL21(DE3) a 31 °C em meio de autoindução usando o extrato do suplemento de proteína de soja (PS) em biorreator. a) Imagem de gel de SDS PAGE contendo amostra da PspA4Pro obtida ao final da purificação (RP – pureza) e do padrão usado na análise DC; b) Espectro de dicroísmo circular (DC) da PspA4Pro purificada e do padrão para elipticidade molar entre 185 e 260 nm. Padrão DC: mistura sintética 5 kDa..... 48
- Fig. 7.** Direct cost ratios, using Experiment #3 as a reference (ref.), in terms of (a) PspA4Pro (ref. US\$ 96.5/kgPspA4Pro) and (b) biomass (ref. US\$ 11.9/kgDCW). The Tukey test was performed to evaluate statistical differences, considering standard deviations and a p value < 0.05 significant. ns: not significant..... 64
- Fig. 8.** Effect of inducers on energy costs (cooling, stirring, and compressor operations). Cost ratios\* in terms of (a) PspA4Pro (ref. US\$ 21.9/kgPspA4Pro) and (b) biomass (ref. US\$ 2.7/kgDCW). All experiments using defined medium. \*Reference: Experiment #3 (Table 6). 65
- Fig. 9.** Cost of complex medium with peptones: (a) core costs; (b) nitrogen and carbon sources in detail. Cost of complex medium with soy supplement: (c) core costs; (d) nitrogen and carbon sources in detail. MC: medium cost..... 67
- Figura 10.** Sensitivity analyses of peptone, glycerol, IPTG and lactose prices on PspA4Pro direct cost. Survey involving certified peptones from three large market suppliers. Reference: Experiment #3 (US\$ 96.5/kg PspA). .... 68

**Fig. 11.** Defined medium costs. Batch cultivations using (a) IPTG and (b) lactose. MC: medium cost..... 69

**Figura 12.** Organização do envelope celular de bactérias Gram-negativas. Ele é caracterizado pela presença de duas bicamadas lipídicas: a membrana externa (ME) e a membrana citoplasmática (MC), as quais são separadas pelo periplasma que é formado por enzimas hidrofílicas, proteínas ligantes, quimiorreceptores e a parede celular de peptidoglicano. A ME é uma bicamada lipídica assimétrica, contendo moléculas de LPS, que formam ligações com proteínas da membrana externa (PMEs). As camadas lipídicas internas da ME e da MC contém fosfolipídeos e proteínas da membrana. .... 76

**Figura 13.** Estrutura da membrana externa de *E. coli*. a) estrutura do lipolissacarídeo (LPS) em células convencionais. b) estrutura do lipídeo IV<sub>A</sub> em células ClearColi<sup>®</sup>. Gal: galactose; Glc: glicose; Hep: heptose; KDO: ácido 2-ceto-3-desoxi-D-manooctônico; NAc: N-acetilcisteína; Rha: ramosa; RC: região central. .... 77

**Figura 14.** Crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Crescimento (DO 600 nm):** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. **Produtividade de biomassa:** (c) ClearColi<sup>®</sup>; (d) células convencionais. **\*Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 92

**Figura 15.** Produção da proteína de superfície A do pneumococo (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de PspA no meio:** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. **Rendimento de PspA em relação a biomassa:** (c) ClearColi<sup>®</sup>; (d) células convencionais; **Produtividade de PspA:** (e) ClearColi<sup>®</sup>; (f) células convencionais. **\*Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0..... 95

**Figura 16.** Produção de proteínas contaminantes em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de proteína no meio:** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. **\*Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0..... 98

**Figura 17.** Crescimento das células ClearColi<sup>®</sup> em meio LBMS sem indução a 37 °C com diferentes concentrações de glicerol. LBMS: LB modificado com sais. .... 99

**Figura 18.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Crescimento (DO 600 nm); (b) Produtividade de biomassa. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 100

**Figura 19.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 102

**Figura 20.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 103

**Figura 21.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Crescimento (DO 600 nm); (b) Produtividade de biomassa. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 105

**Figura 22.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller Modificado (LBM); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 106

**Figura 23.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller Modificado (LBM); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0. .... 107

**Figura 24.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Crescimento (DO 600 nm):** (a) Primeiros ensaios (I); (b) Repetições (II).

**Produtividades em biomassa:** (c) I; (d) II. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0. .... 109

**Figura 25.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de PspA no meio:** (a) Primeiros ensaios (I) e (b) Réplicas (II); **Rendimentos de PspA em relação a biomassa:** (c) I e (d) II; **Produtividade de PspA:** (e) I e (f) II. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0..... 110

**Figura 26.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*: Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Primeiros ensaios (I); (b) Réplicas (II). **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0..... 111

**Figura 27.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meio complexo a 32 °C em *shaker*. Indução por pulsos de IPTG nos ensaios de 0 à 1,0 mM em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) DO 600 nm para os ensaios; (b) Produtividade de biomassa. **\*Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meio:** LB Modificado com sais (LBMS). Sem indução: 0,000 mM. .... 113

**Figura 28.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® meio complexo a 32 °C em *shaker*. Indução por pulsos de IPTG nos ensaios de 0 à 1,0 mM em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. **Meio:** LB Modificado com sais (LBMS). Sem indução: 0,000 mM. .... 114

**Figura 29.** Principais resultados do cultivo #1\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,0 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC: pulso de canamicina. .... 128

**Figura 30.** Principais variáveis com aquisição *online* do cultivo #1. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,0 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC: pulso de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido..... 129

**Figura 31.** Principais resultados do cultivo #2\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina..... 132

**Figura 32.** Principais variáveis com aquisição *online* do cultivo #2. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido..... 133

**Figura 33.** Principais resultados do cultivo #3\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina..... 134

**Figura 34.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #3. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. TOD: tensão de oxigênio dissolvido; PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator..... 135

**Figura 35.** Principais resultados do cultivo #4\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina..... 137

**Figura 36.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #4. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. F: vazão alimentação; PI: pulso do indutor; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido..... 138

**Figura 37.** Principais resultados do cultivo #5\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina..... 140

**Figura 38.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #5. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. F: vazão alimentação; PI: pulso do indutor; PCi: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido..... 141

**Figura 39.** Índices de desempenho para as diferentes estratégias de produção de PspA4Pro em biorreator usando células ClearColi<sup>®</sup>. (a) Produtividade\*; (b) Concentração PspA4Pro; Razão custo direto†: (c) em termos de proteína; (d) em termos de biomassa. \* Calculada a partir dos respectivos tempos de cultivos; † Custos dos cultivos #3 em 4 horas de indução como referências: em termos de proteína US\$ 168,00/kg e em termos de biomassa US\$ 22,00/kg..... 142

**Figura 40.** Evolução da composição dos custos nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator. Cultivos: (a) #1; (b) #2; (c) #3; (d) #4; (e) #5. .... 144

**Fig. 41.** Quality of PspA4Pro purified from biomass obtained in experiments #2, #3, #4 and #8. a) Circular dichroism (CD) spectra; b) Lactoferrin binding assay. Std: Standard. .... 165

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composições dos meios complexos usados nos cultivos com <i>E. coli</i> em <i>shaker</i> . ...	36
<b>Tabela 2.</b> Composição inicial do meio complexo de autoindução* com o extrato do suplemento de proteína de soja no cultivo em biorreator de <i>E. coli</i> BL21(DE3) convencional. ....	37
<b>Tabela 3.</b> Distribuição percentual por faixas de massa molecular dos componentes solúveis presentes no extrato do suplemento de proteína de soja e na solução de peptona de soja preparados para uma concentração de 10 g/L de proteínas solúveis totais. ....	41
<b>Tabela 4.</b> Absorbâncias finais dos componentes solubilizados a 37 °C no extrato do suplemento de soja sob diferentes tempos de agitação.....	42
<b>Tabela 5.</b> Velocidade específica máxima de crescimento celular $\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ ) de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em <i>shaker</i> .....	43
<b>Table 6.</b> Main <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b(+)/ <i>pspA4Pro</i> cultivation conditions for batch bioreactor experiments #1 to #8, cultivation time ( $t_f$ ) to reach the highest PspA4Pro production ( $P_P$ ), and the corresponding biomass concentration ( $C_X$ ). Data for Experiments #2, 5, 7 (a and b) and 8 available at Supplementary Material. ....	54
<b>Table 7.</b> Concentrations and costs of each medium component used in the bioreactor cultures. ....	58
<b>Tabela 8.</b> Estudos envolvendo ClearColi <sup>®</sup> BL21(DE3) .....	79
<b>Tabela 9.</b> Composição inicial dos diferentes meios complexos avaliados. ....	88
<b>Tabela 10.</b> Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 37 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.....	89
<b>Tabela 11.</b> Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 27 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.....	90
<b>Tabela 12.</b> Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 32 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.....	90
<b>Tabela 13.</b> Velocidades máximas de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi <sup>®</sup> e convencional em <i>shaker</i> a 37 °C em diferentes meios complexos.....	92
<b>Tabela 14.</b> Velocidades máximas de crescimento de células ( $\text{h}^{-1}$ ) ClearColi <sup>®</sup> em meio LBMS sem indução a 37 °C com diferentes concentrações de glicerol.....	99
<b>Tabela 15.</b> Velocidades máximas de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi <sup>®</sup> em <i>shaker</i> a 27 °C em diferentes meios complexos.....	101

<b>Tabela 16.</b> Velocidades máximas de crescimento ( $h^{-1}$ ) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi <sup>®</sup> em <i>shaker</i> a 32 °C em diferentes ensaios com meio complexo do item 4.7.1 .....	104
<b>Tabela 17.</b> Velocidades máximas de crescimento ( $h^{-1}$ ) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi <sup>®</sup> em <i>shaker</i> a 32 °C em diferentes meios complexos.....	108
<b>Tabela 18.</b> Comparação dos resultados dos cultivos com ClearColi <sup>®</sup> em <i>shaker</i> em meios complexo e definido. ....	116
<b>Tabela 19.</b> Comparação dos resultados dos cultivos com <i>E. coli</i> BL21(DE3) dos tipos ClearColi <sup>®</sup> e convencional em <i>shaker</i> em meio complexo. ....	117
<b>Tabela 20.</b> Composição inicial dos meios complexos e definidos usados no preparo e durante os ensaios com ClearColi <sup>®</sup> em biorreator.....	123
<b>Tabela 21.</b> Cultivos em biorreator com <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi <sup>®</sup> : características e objetivos .....	125
<b>Tabela 22.</b> Principais resultados de processos dos cultivos a 32 °C com <i>E. coli</i> BL21(DE3) dos tipos ClearColi <sup>®</sup> e convencional usando meio definido em biorreator de 5,0 L.....	145
<b>Tabela 23.</b> Custos diretos de processo estimados para os cultivos a 32 °C com <i>E. coli</i> BL21(DE3) dos tipos ClearColi <sup>®</sup> e convencional em biorreator de 5,0 L.....	145

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANS: *Animal nitrogen source* (Nitrogênio de fonte animal);

Auto: Meio complexo de autoindução com lactose;

B: Batelada;

BA: Batelada-alimentada;

BPF: Boas práticas de fabricação;

C: Complexo;

CC: Células *Escherichia coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>;

CD: Circular dichroism (Dicroísmo circular);

CM: *Complex medium* (Meio complexo);

CV: Células *Escherichia coli* BL21(DE3) convencionais;

D: Definido;

DC: Dicroísmo circular;

DCW: *Dry cell weight* (Massa seca de células);

DEQ: Departamento de Engenharia Química;

DM: *Defined medium* (Meio definido);

DOT: *Dissolved oxygen tension* (Tensão de oxigênio dissolvido);

EP: Estudo preliminar;

HCDC: *High cell density culture* (Cultivos de alta densidade celular);

HPLC: *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alto desempenho);

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo;

LAC: Lactose;

LB: Meio complexo Luria-Bertani;

LBM: Meio complexo LB modificado;

LBMS: Meio complexo LB Modificado com Sais;

LPS: Lipolissacarídeos;

MC: Membrana citoplasmática;

ME: Membrana externa;

MS: Massa seca de células;

OD: *Optical density* (Densidade óptica);

PC: Pulso de canamicina;

PE: Plataforma de expressão;

PG: Pulso de glicerol;

PI: Pulso de indutor;

PME: Proteínas da membrana externa;

PspA4Pro: Proteína A de superfície do pneumococo do clado 4 sem calda de histidina;

RCB: Razão de custo direto de biomassa;

RCP: Razão de custo direto de proteína;

STR: *Stirred tank reactor* (Reator de tanque agitado);

TLR4: *Toll-like 4*;

TOD: Tensão de oxigênio dissolvido;

UFSCar: Universidade Federal de São Carlos;

VNS: *Vegetal nitrogen source* (Nitrogênio de fonte vegetal).

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\$i$ : Custo de  $i$ , onde  $i$  é gases, resfriamento, agitação ou meio. US\$/( $g_{DCW}$  ou  $g_{PspA}$ );

$\$k^{Comp}$ : Custo do componente  $k$  no meio;

$\sum n_{AR}$ : Quantidade total de ar no experimento, mol;

$C_k^{Comp}$ : Concentração do componente  $k$  no meio;

$C_X$ : Concentração de biomassa,  $g_{MS}/L$ ;

$C_{IPTG}$ : Concentração de IPTG, mM;

$C_{PspA}$ : Concentração de PspA, mg/L;

$D_i$ : Diâmetro do impelidor, 0.078 m;

$D_R$ : Diâmetro do reator, 0.160 m;

$E_C$ : Consumo total de energia do compressor, kWh;

$E_M$ : Geração de energia metabólica, kWh;

$E_S$ : Consumo total de energia de agitação, kWh;

Exp #: Número do experimento;

$f_C$ : Fator de correção;

$g$ : Aceleração da gravidade,  $m/s^2$ ;

$H_i$ : Altura do impelidor, 0.267 m;

$H_R$ : Altura do reator, m;

$K$ : Constante de proporcionalidade, 50 kJ/mmol  $O_2$ ;

$MM$ : Massa molecular, g/mol;

$N$ : Velocidade de agitação, rpm or  $s^{-1}$ ;

$n_C^{\max}$ : Máxima quantidade de ar no compressor, mol;

$n_C^{\min}$ : Mínima quantidade de ar no compressor, mol;

$N_p$ : Número de potência, 5.2 (Impelidor de Rushton em regime turbulento);

OUR: Taxa de captação de oxigênio, mmol O<sub>2</sub>/h;

P: Potência de agitação sem gás, kW;

p: Pressão de entrada do gás, atm;

$p_1$ : Pressão absoluta de entrada do compressor, Pa;

$p_2$ : Pressão absoluta de saída do compressor, Pa;

$P_B$ : Potência do banho termostático, 0.710 kW;

$P_C$ : Potência do compressor, kW;

$P_P$ : Produção de PspA4Pro, g/L;

$P_P$ : Produção de PspA4Pro, g/L;

$P_X$ : Produtividade de biomassa, g/L;

$P_S$ : Potência de agitação, kW;

$Q_1$ : Vazão total do gás na entrada do reator, L/min;

$Q_{AIR}$ : Vazão volumétrica de ar;

$Q_G$ : Vazão total volumétrica, m<sup>3</sup>/s;

$Q_{Heat}$ : Calor metabólico liberado, kJ/h;

$Q_{O_2}$ : Vazão de oxigênio;

R: Constante dos gases ideais, 0.082 atm.L/mol.K;

S: Agitação do impelidor, rpm;

T: Temperatura do cultivo;

$T_1$ : Temperatura do gás na entrada do reator, °C;

$t_f$ : Tempo de cultivo;

$V_{O_2}$ : Volume total de oxigênio consumido,  $m^3$ ;

$V_R$ : Volume do biorreator, L;

$Y_{PspA/X}$ : Rendimento de PspA4Pro por biomassa, mgPspA/gMS.

### **Letras gregas**

$\rho_b$ : Densidade do meio de cultivo,  $kg/m^3$ ;

$\eta_B$ : Número de eficiência do banho termostático, 0.7.

$\eta_C$ : Número de eficiência do compressor, 0.70;

$\eta_S$ : Eficiência energética, 0.65;

$\gamma$ : Expoente isoentrópico, 1.4 para oxigênio.

### **Sobrescritos**

max: Relacionado ao valor máximo;

min: Relacionado ao valor mínimo;

‘^’: Indicador de que as geometrias são do reator usado nos experimentos.

### **Subscrito**

f: Relacionado aos valores de  $t_f$ .

# SUMÁRIO

<b>Capítulo 1: Introdução</b> .....	24
<b>1.1 Estrutura da Tese</b> .....	29
<b>Capítulo 2: Avaliação de fonte alternativa complexa de nitrogênio</b> .....	30
<b>2.1 Introdução e objetivo</b> .....	30
<b>2.2 Materiais e métodos</b> .....	32
2.2.1 Preparo do extrato do suplemento de soja e caracterização.....	32
2.2.2 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja em ensaios em <i>shaker</i> .....	33
2.2.2.1 Procedimento experimental.....	33
2.2.2.2 Velocidade específica máxima de crescimento celular.....	34
2.2.2.3 Meio de cultivo avaliados.....	34
2.2.2.4 Produção de PspA4Pro e avaliação da presença de proteínas contaminantes....	35
2.2.3 Ensaio em biorreator – Autoindução usando o extrato do suplemento de soja.....	36
2.2.4 Avaliação da qualidade da PspA4Pro produzida.....	39
<b>2.3 Resultados e discussão</b> .....	40
2.3.1 Características dos extratos de proteína de soja.....	40
2.3.2 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja como fonte de nitrogênio em ensaios em <i>shaker</i> para cultivos de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	42
2.3.3 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja em ensaio em biorreator.....	45
2.3.4 Avaliação da qualidade da PspA4Pro produzida usando o extrato de suplemento de proteína de soja como principal fonte de nitrogênio.....	47
<b>2.4 Conclusão</b> .....	49
<b>Capítulo 3: Análise de custos baseada nos parâmetros e variáveis de processo da produção de PspA4Pro em <i>E. coli</i> BL21(DE3)</b> .....	50
<b>3.1 Introduction</b> .....	50
<b>3.2 Materials and Methods</b> .....	52
3.2.1 Experimental data.....	52
3.2.1.1 Bioreactor cultivation.....	53
3.2.1.2. Analyses of culture samples.....	55
3.2.1.3. PspA4Pro secondary structure and lactoferrin binding assay.....	55
3.2.2. Direct cost estimation.....	56

3.2.2.1. <i>Medium costs</i> .....	57
3.2.2.2. <i>Cost of air and oxygen supplies (gases)</i> .....	58
3.2.2.3. <i>Cost of stirring</i> .....	60
3.2.2.4. <i>Cost of cooling</i> .....	61
<b>3.3 Results and Discussion</b> .....	63
3.3.1. PspA4Pro and biomass production costs: general aspects .....	63
3.3.2. PspA4Pro protein and biomass production costs: specific aspects .....	64
3.3.2.1 <i>Effect of temperature on direct cost</i> .....	64
3.3.2.2 <i>Effect of inducers on energy costs</i> .....	65
3.3.2.3 <i>Influence of component price on medium cost</i> .....	66
<b>3.4 Conclusions</b> .....	72
<b>Capítulo 4: Avaliação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi® em shaker</b> .....	74
<b>4.1 Introdução</b> .....	74
4.1.1 Produção de proteínas recombinantes terapêuticas em <i>E. coli</i> : o impacto da presença do LPS .....	75
4.1.2 ClearColi® como alternativa para a produção de proteínas recombinantes sem LPS .....	76
<b>4.2 Materiais e métodos</b> .....	78
4.2.1. Descrição de estratégia experimental – Estudos Preliminares .....	78
4.2.2. Procedimento experimental.....	87
4.2.3. Metodologia analítica.....	90
<b>4.3. Resultados e discussão</b> .....	91
4.3.1 Estudo Preliminar I – Composição Meio Complexo e Indutores.....	91
4.3.1.1 <i>Formação de Biomassa</i> .....	91
4.3.1.2 <i>Produção de PspA4Pro</i> .....	94
4.3.1.3 <i>Produção de proteínas contaminantes</i> .....	97
4.3.2 Estudo Preliminar II - Avaliação da concentração inicial de substrato no crescimento da cepa ClearColi® substrato .....	98
4.3.3 Estudo Preliminar III - Influência da temperatura no crescimento e produção de PspA4Pro.....	99
4.3.3.1 <i>Cultivos para produção de PspA4Pro em shaker a 27 °C</i> .....	100
4.3.3.1.1 Formação de Biomassa.....	100
4.3.3.1.2 Produção de PspA4Pro.....	101

4.3.3.1.3 Produção de proteínas contaminantes .....	102
4.3.3.2 Cultivos para produção de PspA4Pro em shaker a 32 °C.....	103
4.3.3.2.1 Formação de Biomassa.....	104
4.3.3.2.2 Produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes.....	105
4.3.3.3 Avaliação da reprodutibilidade do procedimento experimental .....	107
4.3.3.3.1 Formação de Biomassa .....	108
4.3.3.3.2 Produção de PspA4Pro e proteínas contaminantes.....	109
4.3.4 Estudo Preliminar IV - Influência da concentração de indutor.....	111
4.3.4.1 Formação de Biomassa.....	112
4.3.4.2 Produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes.....	113
4.3.5 Influência da composição do meio: comparação dos resultados de formação biomassa e produção de PspA4Pro dos cultivos em shaker com ClearColi® em meios complexo e definido .....	115
4.3.6 Influência da plataforma de expressão: comparação dos resultados de formação de biomassa e de produção de PspA4Pro dos cultivos em shaker em meio complexo com <i>E.</i> <i>coli</i> BL21(DE3) dos tipos ClearColi® e convencional.....	117
<b>4.4 Conclusão.....</b>	<b>118</b>
<b>Capítulo 5: Intensificação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi® .....</b>	<b>120</b>
<b>5.1 Introdução .....</b>	<b>120</b>
5.1.1 Biorreatores tipo tanque agitado: modos de operação .....	121
<b>5.2 Materiais e Métodos.....</b>	<b>122</b>
5.2.1 Procedimento experimental .....	122
5.2.1.1 Preparo do inóculo .....	122
5.2.1.2 Cultivos em biorreator.....	123
<b>5.3 Resultados e Discussão .....</b>	<b>127</b>
5.3.1 Cultivo #1: Batelada usando meio complexo e indução por pulso de IPTG 1,0 mM .....	127
5.3.2 Cultivo #2: Batelada usando meio complexo e indução por pulso de IPTG 0,7 mM .....	130
5.3.3 Cultivo #3: Batelada usando meio definido e indução por pulso de IPTG 0,7 mM .....	133
5.3.4 Cultivos semicontínuos: avaliação da produção da PspA4Pro em cultivos com ClearColi® de alta densidade celular.....	136
5.3.4.1 Cultivos em batelada-alimentada em meio complexo com indução por pulso de IPTG 1,1 mM.....	136

5.3.4.2 <i>Cultivo em batelada-alimentada em meio definido com indução por pulso de IPTG 1,1 mM</i> .....	139
5.3.5 Produtividades, concentrações máximas e custos da produção de PspA4Pro em cultivos ClearColi <sup>®</sup> em biorreator .....	141
<b>5.4 Comparação entre os resultados dos cultivos em biorreator com células <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e as células convencionais</b> .....	144
<b>5.5. Conclusão</b> .....	146
<b>Capítulo 6: Conclusão</b> .....	148
<b>Referências</b> .....	150
<b>APÊNDICE A – Material Suplementar do Capítulo 3</b> .....	165

## Capítulo 1: Introdução

Até o ano de 2014 cerca de 250 produtos biológicos recombinantes receberam licenças nos mercados norte-americano e europeu, atingindo um total acumulado de vendas no valor de US\$ 140 bilhões (WALSH, 2014). Estas proteínas recombinantes terapêuticas são usadas no desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de doenças (BAESHEN et al., 2015). Quase um terço destes produtos foi produzido em plataforma de expressão utilizando *Escherichia coli* (BERLEC; STRUKELJ, 2013; SANCHEZ-GARCIA et al., 2016), o que demonstra a elevada importância deste microrganismo como fábrica celular.

*E. coli* não somente tem seu genoma bem caracterizado como também é de fácil manipulação genética (BAESHEN et al., 2015). Além disso, em comparação a outras plataformas de expressão, *E. coli* geralmente apresenta crescimento rápido com alto rendimento aliado a custos mais baixos de produção (CHOE; NIAN; LAI, 2006), o que favorece a sua aplicação industrial em comparação com outras plataformas de expressão (HUANG, LIN; YANG, 2012). Há vários sistemas de expressão disponíveis para a produção de proteínas recombinantes em grandes quantidades e baixo custo por *E. coli*. Uma das razões para o emprego de linhagens de *E. coli* como hospedeiro é a disponibilidade de vários promotores fortes que podem ser ativados por indução. Os promotores mais comumente empregados para a produção de proteína heteróloga requerem a adição de uma molécula de indutor, o esgotamento ou suplementação de um nutriente ou uma mudança em um fator físico ou físico-químico, como pH ou temperatura (VALDEZ-CRUZ et al., 2010). Dentre os sistemas de expressão por indução, o sistema pET se destaca como o mais usado para a clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Devido à alta seletividade da RNA polimerase do bacteriófago T7 do sistema pET pelas sequências correspondentes do seu promotor, um elevado nível de atividade da polimerase e uma alta eficiência de tradução mediada pelo gene T7 e gene 10 são alcançados. No sistema pET, a sequência que codifica a proteína de interesse é clonada após as sequências do promotor T7 e gene 10, e então linhagens *E. coli* são transformadas com esse plasmídeo. Desta forma, expressão de proteína pode ser obtida tanto pela indução com isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) ou lactose (SORENSEN; MORTENSEN, 2005) de um cassete integrado ao cromossomo, no qual a RNA polimerase T7 é expressa a partir de promotor *lacUV* (caso do presente trabalho)

ou pela infecção com a polimerase que expressa o bacteriófago  $\lambda$ CE6 (AGILANT TECHNOLOGIES, 2019).

Células de *E. coli* recombinante vêm sendo empregadas no DEQ/UFSCar desde 2009 na produção do componente proteico de uma nova vacina conjugada antipneumocócica. Esses estudos foram iniciados no âmbito do projeto temático “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína A de superfície de pneumococo” (08/05207-4), coordenado pela pesquisadora Dra. Martha Massako Tanizaki, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

*Streptococcus pneumoniae* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia encapsulada, considerada um dos principais patógenos humanos, causadora de diversas doenças, tais como pneumonia, infecções do ouvido médio, sinusite e meningite (ALONSODEVELASCO et al., 1995). Atualmente, para a imunização humana contra esta bactéria estão disponíveis vacinas contendo polissacarídeos capsulares (PS) de diferentes sorotipos de pneumococo, tanto na forma conjugada com proteínas carregadoras como na forma não conjugada (PAREDES, 2018). Embora a vacina não conjugada contendo 23 sorotipos (23-valente) seja imunogênica e proteja a maioria dos adultos e crianças, ela falha em proteger crianças com menos de 2 anos (BOGAERT et al., 2004). A vacina conjugada heptavalente, que passou a ser comercializada nos anos 2000, proporcionou uma redução da incidência da pneumonia causada pelos sorotipos presentes na vacina, mas não coibiu o crescimento da doença causada pelos demais sorotipos. Vacinas conjugadas 10 e 13-valentes foram disponibilizadas, contudo ainda não serão capazes de coibir os demais sorotipos da bactéria (MIYAJI et al., 2015). Enquanto a diversidade de PS contribui para que haja mais de 91 sorotipos, as proteínas de superfície encontradas na superfície de *S. pneumoniae* se conservam e são menos variáveis, sendo pneumosilina, proteína de superfície adenosina de pneumococo A e proteína de superfície de pneumococo A, PspA, potenciais candidatas a antígenos (GONZALEZ-MIRO et al., 2017). Por ser virtualmente produzida em todos os pneumococos, facilitar a deposição da bactéria e impedir que esta seja fagocitada pela célula hospedeira (MIYAJI et al., 2015), a PspA tem sido avaliada em diferentes estudos. A formulação de vacinas conjugadas contendo o polissacarídeo capsular, principal fator de virulência da bactéria, ligado covalentemente a fragmentos de PspA tem demonstrado elevada proteção em ensaios de desafios realizados em camundongos posteriormente infectados com uma cepa virulenta (BARAZZONE et al., 2014; SANTAMARIA et al., 2011), contribuindo para a redução dos custos de produção. A PspA também pode ser empregada como vacina de

subunidade antigênica, o que tem sido bastante explorado por diversos grupos de pesquisa em todo mundo (BOGAERT et al., 2004; BRILES et al., 2000) e também pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan (MIYAJI et al., 2015; VADESILHO et al., 2012; GOULART et al., 2013; MORENO et al., 2010). Com base em diferentes sequências, a PspA pode ser classificada em 3 famílias e subdividida em 6 clados (SARGO, 2011). Recentemente, um fragmento da PspA do clado 4 que contém a porção N-terminal, a região definidora de clado e o primeiro trecho da região rica em prolinas, sem peptídeo sinal e sem domínio de ligação à colina, denominado PspA4Pro, tem sido alvo de publicações abrangendo a etapa de produção (CAMPANI et al., 2016; 2017; 2019) e de purificação (FIGUEIREDO et al., 2016).

Ao longo dos últimos 10 anos de sucessivos estudos pelo grupo DEQ (UFSCar)/Butantan com diferentes cepas de *rE. coli* produtoras de diversos fragmentos de proteínas antigênicas de *S. pneumoniae*, avanços significativos foram alcançados, destacando-se: i) desenvolvimento de meio de cultivo complexo, adequado para o emprego em processos industriais, contendo apenas lactose como indutor e fonte de nitrogênio de origem vegetal (peptona de soja), de alto rendimento em proteína (SANTOS, 2012); ii) estudos de diferentes estratégias de cultivo e estabelecimento de protocolos para realização de cultivos de autoindução (SANTOS, 2012); e de alta produtividade em biomassa (SARGO, 2011; HORTA et al., 2012), mais eficientes que os cultivos de alta densidade celular convencional (SHILOACH; FASS, 2005; SHOJAOSADATI et al., 2008; KORZ et al., 1995); iii) concepção e implantação do software SUPERSYS\_HCDC, sistema automático de monitoramento e supervisão de cultivos de alta densidade (HORTA et al., 2012, 2014); iv) cultivos em biorreator *airlift* pressurizado e desenvolvimento de modelos matemáticos para descrevê-los (CAMPANI et al., 2017; CAMPANI, 2014, 2018); v) estudo de *E. coli* detoxificada (ClearColi®) como plataforma alternativa para a produção de PspA em meio definido (PAREDES, 2018).

A partir da avaliação dos resultados obtidos nos estudos anteriores, foram identificados dois alvos principais para intensificação da produção da proteína de interesse. Um dos alvos é a melhoria da qualidade do material de partida (biomassa de *E. coli*) utilizado nos processos de purificação. O outro alvo é a redução do custo associado às estratégias de cultivo. O conjunto de atividades a ser desenvolvida neste doutorado pretende contribuir para o avanço do conhecimento em ambos os alvos selecionados.

Em relação à qualidade da matéria-prima, proteínas, lipopolissacarídeos – LPS, polissacarídeos e ácidos nucleicos são os principais contaminantes presentes no clarificado obtido após a ruptura das células de *rE. coli*. No caso da produção de produtos terapêuticos para uso humano, as endotoxinas (ou LPS) são particularmente críticas, devido à sua toxicidade, que pode causar choque séptico e até a morte (TAGUCHI et al., 2015). Segundo padrão estabelecido há uma década pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2009), e ainda válido, o conteúdo de endotoxinas e de atividade pirogênica presentes em vacinas conjugadas de pneumococo devem ser determinados pelo teste *Limulus amoebocyte lysate* (LAL) e demonstrar estar em níveis aceitáveis aos estabelecidos pelas autoridades reguladoras nacionais. Em experimentos *in vivo*, a quantidade de endotoxinas tipicamente recomendável está abaixo de 4 EU/mg proteína (MOON et al., 2018). Em aplicações clínicas, a quantidade de LPS presente na produção de proteínas deve ser inferior a 50 EU/mg proteína (QIAO et al., 2019).

Como os métodos de remoção de endotoxinas apresentam em geral baixas eficiência e seletividade, o uso de células de microrganismos detoxificados pode ser uma alternativa mais barata e rápida para a obtenção de proteínas recombinantes livres de endotoxinas (MAMAT et al., 2015). Recentemente foi disponibilizada comercialmente pela empresa Lucigen uma cepa de *E. coli* detoxificada denominada ClearColi<sup>®</sup>. Esta cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi geneticamente modificada e produz um precursor do LPS, não glicosilado, designado por IV<sub>A</sub>, que consiste em um lipídio que não estimula uma resposta endotóxica em células humanas (LUCIGEN, 2016). A inativação deste lipídeo foi crucial para a obtenção de cepas de *E. coli* BL21(DE3) isentas de atividade endotóxica (MAMAT et al., 2015). Watkins et al. (2017a) verificaram que vesículas recombinantes da membrana externa produzidas em ClearColi<sup>®</sup> tiveram uma grande redução (da ordem de 10<sup>5</sup> inferiores) na pirogenicidade em relação às células *E. coli* BL21(DE3) convencionais. Além disso, eles confirmaram que o lipídeo IV<sub>A</sub> sozinho não é pirogênico. Wilding et al. (2017) evidenciaram que a proteína recombinante terapêutica crisantaspatase de combate ao câncer foi produzida em concentração significativa e livre de endotoxinas a partir de células ClearColi<sup>®</sup>. Assim, em parte das atividades propostas neste doutorado, a ClearColi<sup>®</sup> foi estudada como plataforma alternativa para a produção da proteína PspA, empregando-se diferentes estratégias de cultivo.

Em outra frente de estudos, as atividades foram direcionadas à avaliação do impacto de diferentes estratégias de cultivo sobre o custo do produto de interesse para ambas

as plataformas de expressão. Tanto o modo de operação do biorreator (batelada ou batelada alimentada) como as condições de cultivo foram avaliadas. Dentre as condições de cultivo avaliadas, destacam-se o tipo de meio (definido ou complexo), o indutor (IPTG ou lactose) e a temperatura. O meio definido é indicado por vários autores como a melhor escolha para produzir proteínas recombinantes terapêuticas (ZHANG; GREASHAM, 1999) por apresentar composição completamente conhecida, que permite acompanhar as concentrações individuais dos componentes presentes ao longo do processo de produção, proporcionando um melhor controle de processo. Porém, o meio complexo costuma resultar em maiores rendimentos de proteína recombinante (LEE, 1996). Por isso, este meio é amplamente empregado na indústria (HUANG et al., 2012), inclusive na produção de terapêuticos, desde que os componentes deste meio estejam isentos de príons e devidamente certificados quando forem de origem animal. Quanto à indução, embora o IPTG seja muito utilizado na expressão de proteínas recombinantes, há críticas pela sua toxicidade e por ser um material caro (ZHOU et al., 2018). Além disso, a alta carga metabólica imposta pelo IPTG indica que a lactose é o indutor mais apropriado para a síntese de proteína heteróloga (KILIKILIAN et al., 2000). Em relação à temperatura de condução dos cultivos, a altas temperaturas em torno de 37 °C é maior a taxa crescimento de *E. coli* (ZHOU et al., 2018), enquanto que para a produção de proteínas recombinantes usualmente é apontado que temperaturas entre 15 e 30 °C seriam as mais indicadas para expressão dessas proteínas na forma ativa e solúvel (SONG et al., 2012; ROSANO; CECCARELI, 2014). Contudo, temperaturas mais baixas são mais difíceis de serem mantidas em cultivos de larga escala, além destes se tornarem mais lentos e longos, resultando em baixas produtividades.

Desta forma o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de produção de proteína recombinante com propriedades vacinais utilizando as plataformas de expressão *Escherichia coli* BL21(DE3) convencional e detoxificada. Como objetivos específicos, destacam-se:

- i) caracterizar a plataforma detoxificada em termos de síntese de PspA, crescimento celular, produção de metabólitos e presença de proteínas contaminantes utilizando meio complexo, para diferentes condições de indução;
- ii) a partir dos ensaios realizados em *shaker*, identificar as condições de cultivo que favoreçam a obtenção de PspA em *E. coli* detoxificada e avaliar estratégias de

- cultivo em batelada e batelada alimentada, em biorreator tipo tanque agitado, visando estabelecer as melhores condições para escalonamento;
- iii) estimar os custos de obtenção de biomassa e proteína recombinante nos diferentes processos de produção e plataformas de expressão investigados e identificar as condições de processamento que resultem em menor custo;
  - iv) cooperar com outros trabalhos em andamento, principalmente no fornecimento de dados experimentais e biomassa para os estudos de purificação.

## 1.1 Estrutura da Tese

A tese foi organizada em 6 capítulos, incluindo a presente introdução e os objetivos como capítulo 1. No capítulo 2 estão descritos o desenvolvimento de uma fonte de nitrogênio mais barata para produzir PspA4Pro em cultivos com *E. coli* BL21(DE3) convencional, que foi elaborada a partir do suplemento de soja para consumo humano e aplicada de forma bem sucedida como componente no meio de autoindução com lactose usado em cultivo em biorreator de 5 L. No capítulo 3 é apresentada uma análise econômica do processo de produção de PspA4Pro em cultivos com *E. coli* BL21(DE3) convencional envolvendo comparações de diferentes meios, temperaturas de cultivo e indutores. Os capítulos 4 e 5 apresentam os principais resultados de ensaios que utilizaram células *E. coli* BL21(DE3) detoxificadas (ClearColi<sup>®</sup>). No capítulo 4 é detalhada a busca em *shaker* pelas melhores condições de temperatura, meio complexo e indutor, para produzir PspA4Pro, enquanto que no capítulo 5 há o escalonamento desses resultados para biorreator, sendo avaliados os efeitos dos meios definido e complexo, das estratégias de batelada e batelada-alimentada, e da redução da concentração de IPTG na produção, no rendimento, na produtividade e nos custos de processo dessa proteína recombinante. Por fim, o capítulo 6 aponta as principais conclusões sobre o trabalho desenvolvido.

## Capítulo 2: Avaliação de fonte alternativa complexa de nitrogênio

Aproveitando uma ampla base de dados gerados e armazenados em cultivos com *E. coli* BL21(DE3) em biorreator feitos no DEQ/UFSCar desde 2009, foi realizada uma análise econômica do processo de produção de proteínas recombinantes A de superfície de pneumococo, com o intuito de avaliar o impacto de diferentes estratégias de cultivo e indução no desempenho econômico do processo, cujos resultados estão presentes no capítulo 3 desta Tese. Os resultados preliminares da análise econômica indicaram a forte influência do preço da peptona (fonte de nitrogênio complexa) sobre a escolha do meio de cultivo com menor custo. Como todos os experimentos anteriores haviam sido realizados com peptonas de alta qualidade (e preço elevado, da ordem de US\$ 150/kg), decidiu-se realizar estudos complementares com fonte complexa alternativa de nitrogênio e de baixo custo para concluir a análise do custo de produção de proteína em meio complexo. Os estudos realizados e os resultados obtidos são descritos no presente capítulo.

### 2.1 Introdução e objetivo

Peptonas são fontes ricas de nitrogênio na forma de aminoácidos e peptídeos, sendo recomendadas para uso em cultivos de microrganismos. São produtos derivados de proteínas hidrolisadas ou obtidos por meio da digestão de material que seja rico em compostos proteicos por enzimas proteolíticas, ácidos e bases fortes, para prover os nutrientes de uma forma facilmente utilizável pelas células (UTAMI et al., 2019). As fontes de proteínas podem ser de origem animal ou vegetal, incluindo: carne, gelatina, grãos de soja e caseína (leite), dentre outros. O mesmo ocorre com as enzimas utilizadas na obtenção de peptonas, sendo as mais comuns advindas de fontes animais (pancreatina e pepsina), mamão (papaína), abacaxi (bromelina) ou microrganismos (BD, 2015; CLELAND et al., 2007). Peptonas são amplamente usadas em cultivos para a produção de biomassa e em outras áreas da Biotecnologia (UTAMI et al., 2019). Nos cultivos de *E. coli* em meio complexo discutidos nesse trabalho, foram usadas tanto peptonas comerciais de origem animal (caseína de digestão enzimática ou triptona) como de origem vegetal (farinha de soja de digestão enzimática com papaína), aqui referida como peptona de soja.

Após a ocorrência de surtos confirmados de encefalopatia espongiforme bovina (ESB) na Europa nos anos 80 e 90, que causaram sérias implicações econômicas e de saúde global (REQUENA et al., 2016), deu-se início a uma tendência para que os produtos de fermentação sejam produzidos a partir de matérias-primas animais oriundas de países livres de ESB ou com meios isentos de componentes animais. Por isso, o uso de meios de cultivos isentos de componentes animais é incentivado e recomendado como uma das Boas Práticas de Fabricação (BPF) da indústria farmacêutica. Desta forma, o impacto de tais componentes no processo de produção é aspecto importante a ser considerado nos estudos de formulação de meios de cultivo (MICHIELS et al., 2011; CLELAND et al., 2007). Machado (2010) verificou em cultivos em *shaker* e biorreator que a substituição da peptona de origem animal (caseína de digestão enzimática) por peptona de soja (BD Bacto™ Soytone) permitiu o aumento da velocidade específica de crescimento das células de *Erysipelothrix rhusiopathiae* e maior produção da proteína antigênica SpaA (*Surface Protein Antigen A*). Similarmente, Santos (2012) constatou que o hidrolisado de soja (Phytone™ Peptone) substituiu eficientemente o hidrolisado de origem animal (Tryptone) em cultivos de *E. coli* em *shaker* e biorreator, para produzir PspA. Outros trabalhos têm provido observações análogas, atestando que o uso de peptonas de soja não compromete as produtividades dos processos analisados usando diferentes microrganismos (bactérias e fungos), nem compromete o controle de qualidade dos seus respectivos produtos (UTAMI et al., 2019; CLELAND et al., 2007).

Apesar dos resultados promissores obtidos na substituição das peptonas de origem animal por peptonas de soja, alguns aspectos importantes para a escolha do produto mais adequado ainda carecem de estudos mais aprofundados. De fato, há uma grande diversidade de peptonas de soja comercializadas por diferentes fornecedores, com preços variando entre US\$ 45 a 800 por kg. Por outro lado, não se encontra no mercado derivados de proteína de soja de baixo custo para utilização em meios de cultivo, os quais são necessários para a realização de estudos comparativos e o estabelecimento da relação custo/benefício para diferentes produtos.

Desta forma foram realizados estudos com suplemento de proteína de soja para consumo humano com o objetivo de caracterizar e viabilizar o uso dessa fonte alternativa de nitrogênio mais barata, para produzir a PspA4Pro em cultivos com *E. coli* BL21(DE3) convencional em escala de biorreator de 5 L, em substituição das peptonas amplamente usadas em meio complexo.

## 2.2 Materiais e métodos

O suplemento de proteína de soja para consumo humano (Growth Supplements Soy Protein) foi escolhido como matéria-prima para a preparação de uma fonte de nitrogênio alternativa para meios de cultivo por se tratar de um produto comercial, disponível no mercado por apenas US\$ 12/kg, sendo muito mais barato do que as peptonas comumente utilizadas no preparo de meios complexos em laboratório. Porém, a qualidade nutricional do derivado preparado a partir do suplemento poderia impactar o crescimento e a produção de PspA em cultivos de *E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro. Por isso, foram conduzidos experimentos de caracterização e cultivos preliminares em *shaker* com esse derivado, para avaliar a viabilidade de utilização do mesmo em cultivo em biorreator.

### 2.2.1 Preparo do extrato do suplemento de soja e caracterização

A caracterização consistiu na avaliação da umidade, da solubilidade e das quantidades das fontes de nitrogênio presente no suplemento, conforme descrito a seguir:

- **Umidade:** seguiu o método gravimétrico (BRASIL, 2013; RÜBNER; BALKÖSE; ROBENS, 2008) para a avaliação da umidade do suplemento de proteína de soja.
- **Testes de solubilidade e quantificação de nitrogênio:** como o suplemento de proteína de soja usado é um material que não passou por tratamentos químicos ou enzimáticos, ele é parcialmente solúvel em água. Assim, para caracterizar a composição da fração solúvel, 100 mL de suspensões em concentrações entre 10 e 100 g/L de suplemento de proteína de soja foram transferidas para frascos de 500 mL, os quais foram mantidos em incubadora por uma hora a 37 °C e 300 rpm para a extração dos componentes solúveis. Em seguida, o extrato obtido foi separado do material sólido por centrifugação (30 min; 37°C; 6300 rpm) e caracterizado em termos de concentrações de proteínas solúveis usando o método de Bradford (BRADFORD, 1976), e quanto à presença de peptídeos e aminoácidos por absorvância nos comprimentos de onda de 205 e 280 nm (CHUTIPONGTANATE et al., 2012), respectivamente.

Para avaliação da distribuição das fontes de nitrogênio presentes, o extrato contendo 10 g/L de proteínas solúveis totais foi analisado por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), usando a seguinte configuração: HPLC (sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996), coluna

SEC-2000 como fase estacionária e solução  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM e NaCl 0,15 M (pH 7,0) como fase móvel, vazão de 0,25 mL/min, a 25 °C. Seguindo o procedimento de Pretto (2012), foram injetados 25 µL de cada amostra, que foram analisadas no comprimento de onda 214 nm, por 210 minutos. Como não era possível analisar todos os peptídeos e proteínas presentes de forma individual, os resultados foram segmentados em pseudocomponentes presentes em diferentes faixas de massas moleculares a partir da injeção e análise de padrões conhecidos: anidrase carbônica, MM = 29000 Da, citocromo C, MM = 12400 Da, aprotinina, MM = 6500 Da, e angiotensina (1-7), MM = 899 Da. Pela integração numérica das áreas dos cromatogramas nas diferentes faixas de massa molecular, foi possível estabelecer a concentração de cada pseudocomponente. Para comparação, foi preparada uma solução da peptona A2SC (Organotechnie) também contendo 10 g/L de proteínas solúveis totais, a qual foi analisada em HPLC pela mesma metodologia.

A influência do tempo de extração sobre a composição do extrato obtido foi outro aspecto estudado. Suspensões contendo 40 g/L do suplemento de proteína de soja foram mantidas por 1 e 12 h, sob as condições de extração já descritas. Para comparação, dois experimentos adicionais, sendo uma suspensão contendo 10 g/L do suplemento de proteína de soja e uma solução da peptona de soja A2SC da Organotechnie também na concentração de 10 g/L (concentração de peptona usada nos meios de cultivo), foram realizados nas mesmas condições de extração, porém pelo período de 1 hora.

## 2.2.2 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja em ensaios em *shaker*

### 2.2.2.1 Procedimento experimental

Cultivos preliminares em *shaker* foram realizados para avaliar o desempenho do suplemento de soja em comparação à peptona. Estes ensaios foram conduzidos a 37 °C e 300 rpm, em frascos de 500 mL contendo 50 mL de meio, usando células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET37(+)/*pspA4Pro* (SILVA, 2015). Para o preparo do inóculo, a cultura estoque armazenada a – 80 °C foi estriada em placa de meio sólido LB-Miller e incubada a 37 °C por 24 h. O inóculo foi feito a partir de uma colônia obtida em placa foi transferida para 30 mL de meio LB-Miller em frasco de 500 mL sob incubação a 37 °C e 300 rpm, até alcançar a densidade óptica 600 nm (DO) em torno do valor

2,0. Em seguida os cultivos foram iniciados transferindo um volume do inóculo previamente calculado para alcançar uma DO inicial de 0,1. A quantificação do crescimento celular foi realizada sempre por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Alíquotas das amostras dos meios de cultivo foram diluídas com água de forma a obter uma leitura máxima no equipamento de 0,8.

#### 2.2.2.2 Velocidade específica máxima de crescimento celular

Em cultivos em regime transiente, a velocidade específica máxima de crescimento celular ( $\mu_{max}$ ) deve ser determinada para cada um dos meios de cultivos avaliados na fase exponencial de crescimento celular de acordo com a equação 2.1 (SHULER; KARGI, 2002), em termos de concentração celular (X) ou de DO. Nos ensaios com células *E. coli* BL21(DE3) em *shaker* a medição do valor máximo ocorre geralmente no intervalo de  $0 < DO < 2$ , enquanto que em biorreator isto costuma ser avaliado em  $0 < DO < 20$ .

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_{max} \cdot t, \quad X = X_0 \text{ em } t = 0 \quad (2.1)$$

X: concentração celular

#### 2.2.2.3 Meio de cultivo avaliados

A composição do meio LB-Miller, contendo triptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio (LUCIGEN, 2016), foi usada como base para formular os outros meios de cultivo (A e E) avaliados nos experimentos em *shaker*, nos quais a triptona foi substituída por peptona de soja A2SC (Organotechnie) ou pelo extrato do suplemento de proteína de soja. As composições de todos os meios de cultivo são apresentadas na Tabela 1. Os meios B e D foram formulados com o extrato de proteína de soja, o qual foi preparado a partir de uma suspensão contendo 50 g/L do suplemento de proteína de soja, mantida sob as condições de extração descritas em 2.2.1 por 1 hora. Esse extrato de componentes solúveis do suplemento, com concentração em proteínas solúveis totais equivalente a 10 g/L, foi denominado PS10. Já os meios A e C foram formulados com a peptona de soja A2SC. Para

comparar o efeito isolado da peptona A2SC e do PS10 sobre o crescimento das células, o componente extrato de levedura foi excluído dos meios A e B (Tabela 1). Para avaliar a influência da composição do meio sobre a produção de proteína recombinante, foram conduzidos experimentos com os meios C, D e E. O meio C apresentava a mesma composição do meio A, porém acrescida de extrato de levedura (5,0 g/L) e de glicerol (5 g/L) como fonte de carbono, por este composto levar a menor produção de metabólitos indesejáveis e ter sido adotado nos trabalhos do grupo de Bioquímica DEQ/UFSCar (SARGO, 2011; HORTA, 2008, 2011; SANTOS, 2012; CAMPANI, 2014, 2015; SILVA, 2015; PAREDES, 2018). Já os meios D e E tinham composições similares ao meio C, exceto pela substituição da peptona de soja pelo extrato do suplemento de proteína de soja, nas concentrações de 10 g/L e 20 g/L, respectivamente.

#### *2.2.2.4 Produção de PspA4Pro e avaliação da presença de proteínas contaminantes*

A produção de proteína recombinante foi induzida nos cultivos conduzidos com os meios C, D e E por meio da aplicação de um pulso de IPTG 1 mM quando DO próxima de 2,0 foi atingida em cada ensaio (CAMPANI, 2014), não havendo indução nos cultivos conduzidos com os meios A e B. O acompanhamento da produção de proteína recombinante foi realizado a partir da biomassa obtida em alíquotas de 2,0 mL do meio de cultivo centrifugadas (5.000g; 4 °C; 10 min). Após a ressuspensão destas em tampão (Tris 20 mM NaCl 250 mM e pH 8,0), foi promovida ruptura celular por sonicação (5 min; 30 s “on”; 30 s “off”), seguida por centrifugação (14.800g; 4 °C; 60 min). Seguindo o procedimento de Paredes 2018 os sobrenadantes obtidos foram submetidos ao procedimento proposto por Bradford (1976), para determinação da concentração de proteínas totais, e analisados por SDS-PAGE e densitometria de banda, para estabelecer a proporção da intensidade do pico de PspA4Pro no gel, estimando a sua concentração na fase solúvel e, conseqüentemente, encontrando a concentração das proteínas contaminantes, que, conforme a definição usada neste trabalho, englobou todas as proteínas solúveis presentes no gel de eletroforese com exceção da PspA4Pro. Para confirmar a ausência de PspA4Pro na forma insolúvel (corpos de inclusão), os debrís celulares da última centrifugação foram ressuspensos em tampão (tris 20 mM NaCl 250 mM e pH 8,0) e misturados ao tampão Laemmli na proporção 2:1. Após permanecer em ebulição por 15 minutos, as amostras com o tampão foram analisadas por SDS-PAGE (SILVA, 2015).

**Tabela 1.** Composições dos meios complexos usados nos cultivos com *E. coli* em *shaker*.

Componentes	Concentração	Meios					
		LB	A	B	C	D	E
Caseína hidrolisada	g/L	10					
Extrato de Levedura	g/L	5			5	5	5
Cloreto de Sódio	g/L	10	10	10	10	10	10
Peptona de soja A2SC	g/L		10		10		
Ext. Suplemento Soja	g/L			10		10	20
Glicerol	g/L				5	5	5
Canamicina	mg/L	50	50	50	50	50	50

### 2.2.3 Ensaio em biorreator – Autoindução usando o extrato do suplemento de soja

Realizou-se o experimento em biorreator nas mesmas condições avaliadas por Santos (2012), substituindo as 10 g/L da peptona comercial pelo extrato do suplemento de proteína de soja elaborado para ter 10 g/L de proteínas solúveis no preparo do meio de autoindução com lactose. A composição do meio de autoindução proposto por Santos (2012) e adaptada para o experimento com o extrato de proteína de soja é dada na Tabela 2.

Para a realização do cultivo em biorreator, o extrato de suplemento de soja foi preparado para que 10 g/L de proteínas solúveis totais estivessem presentes no meio de autoindução usado. Como outros reagentes em solução foram adicionados, optou-se por preparar uma solução do extrato duas vezes mais concentrada em proteínas solúveis (20 g/L) e adicioná-la proporcionalmente ao meio para atingir a concentração alvo. Assim, partiu-se de uma suspensão com concentração de 100 g/L do suplemento de proteína de soja, mantida nas mesmas condições de temperatura e agitação descritas em 2.2.1 por 1 h para extração dos componentes solúveis. O inóculo foi preparado seguindo o mesmo procedimento descrito em 2.2.2.1. O experimento foi realizado em biorreator de 5 L. O aparato experimental é mostrado na Figura 1. O biorreator foi controlado e monitorado usando o softwares SuperSys\_HCDC® (HORTA, 2011), com aquisição de dados em tempo real, intervalo de salvamento de 10 s, usando conversor analógico-digital (Modelo cFP2020, National Instruments). O pH foi automaticamente controlado em 6,7 na fase de crescimento ou 6,9 na fase de indução, pelo uso de soluções de NH<sub>4</sub>OH (15% v/v) e HCl (9% v/v). A tensão de oxigênio dissolvido (TOD) foi medida com um sensor amperométrico (Modelo InPro 6830, Mettler Toledo) e mantida a 30% da saturação pelo ajuste da velocidade de agitação (de 200 a 900 rpm) e de dois controladores de fluxo de mássicos (GFC, Aalborg) responsáveis por atuar nas vazões de

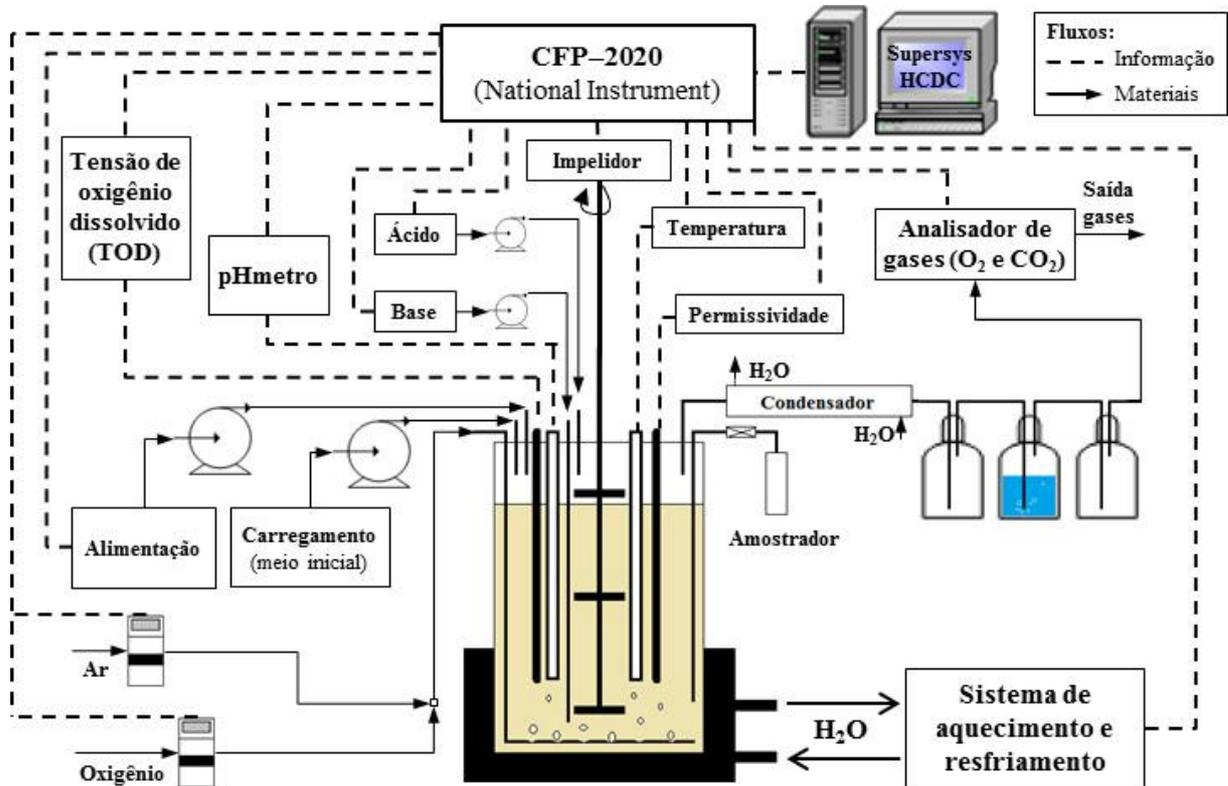
ar e oxigênio puro. O suprimento de ar e oxigênio puro para o biorreator foi realizado por compressor (Modelo MAW-60/425, GMEG) e cilindro comercial (White Martins), respectivamente, até o limite de vazão máxima de gás de 6 NL/min (21.1 °C e 1 atm). A temperatura do cultivo foi mensurada com termopar (Pt-100, Exacta) e mantida no valor alvo pela contínua transferência de calor indireta com água de resfriamento proveniente de banho termostático (0.7 kW, Solab) que passava pela camisa do biorreator.

**Tabela 2.** Composição inicial do meio complexo de autoindução\* com o extrato do suplemento de proteína de soja no cultivo em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) convencional.

Substância	Unidade	Meio complexo de autoindução (Batelada)
Glicerol	g/L	60,0
Glicose	g/L	10,0
Lactose	g/L	20,0
Extrato do suplemento de proteína de soja	g/L	10,0
Extrato de Levedura	g/L	5,0
MgSO <sub>4</sub>	g/L	2,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	3,4
NH <sub>4</sub> Cl	g/L	2,7
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	g/L	9,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L	0,7
Fe(III)citrato	mg/L	100,8
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	mg/L	2,5
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	mg/L	15,0
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	1,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/L	3,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	2,1
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	mg/L	33,8
EDTA	mg/L	14,1
Canamicina	mg/L	100,0
Tiamina	mg/L	45,0

\*Baseado no meio de autoindução com lactose ZYM-5052 de Studier (2005)

**Figura 1.** Aparato experimental usado no cultivo em biorreator



As mesmas metodologias analíticas para acompanhamento do crescimento e da produção de proteína, relatadas no item 2.2.2, foram empregadas. Utilizou-se ainda o método da massa seca (SONNLEITNER; LOCHER, FIECHTER, 1992; OLSSON; NIELSEN, 1997) para acompanhar o crescimento celular, que consistiu em filtrar a vácuo um volume conhecido do caldo em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , seca, com massa previamente aferida, e mensurar a massa da membrana após 48 h a 70 °C (SILVA, 2015). O consumo de glicerol, glicose e lactose assim como a formação de ácidos orgânicos foram determinados por cromatografia líquida de alto desempenho (sistema Waters Co; Bombas HPLC 510, Injetor W717) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min, a 50°C). Amostras de 20  $\mu\text{L}$  foram injetadas e analisadas, para ácidos orgânicos no comprimento de onda 210 nm pelo detector UV PDA W996 e para glicerol, glicose e lactose pelo detector de índice de refração modelo W410. A fim de identificar e estabelecer as concentrações das substâncias alvos, foram usadas curvas padrões para soluções com concentrações conhecidas de cada uma dessas substâncias. Para a análise de estabilidade do plasmídeo (ou retenção plasmidial), amostras de 100  $\mu\text{L}$  da suspensão celular retiradas da cultura de forma estéril foram diluídas

entre  $10^6$  e  $10^8$  vezes e semeadas em placas de LB-Ágar sem canamicina. Após 24 h de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) formadas nessas placas (VÉLEZ et al., 2014), e repicou-se 50 ou mais colônias para placas de LB-Ágar contendo 100 mg/L de canamicina. O mesmo procedimento foi aplicado para placas idênticas, mas sem o antibiótico (controle). As porcentagens de colônias que cresceram nas placas com o antibiótico em relação às placas controle foram calculadas a fim de se obter uma estimativa da estabilidade plasmidial. Essa estabilidade, que é essencial para a produção da proteína recombinante, foi determinada ao longo da fase de indução (CAMPANI, 2014).

#### 2.2.4 Avaliação da qualidade da PspA4Pro produzida

Ainda que seja obtida uma grande quantidade da proteína recombinante solúvel produzida em *E. coli*, é importante avaliar a influência da estratégia de cultivo sobre a qualidade do produto final obtido (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Segundo Figueiredo et al. (2016) a qualidade da PspA4Pro pode ser avaliada tanto em termos da preservação de sua função biológica pela sua capacidade de ligação com a lactoferrina humana, glicoproteína da família da ferritina que faz parte do sistema imune inato (SENKOVICH et al., 2007), assim como por meio de sua estrutura secundária e da estabilidade da mesma (por dicróismo circular - DC - da proteína purificada e comparação a um padrão). Desta forma, a biomassa contendo PspA4Pro produzida no cultivo em biorreator com o extrato de suplemento de soja como fonte principal de nitrogênio foi congelada e encaminhada ao Instituto Butantan para purificação e avaliação da estrutura secundária da proteína recombinante produzida por dicróismo celular. Tanto a purificação quanto a obtenção do espectro foram realizados sob supervisão da Dra. Viviane Maimoni Gonçalves, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, seguindo o procedimento descrito em Figueiredo et al. (2016), resumido a seguir.

Para a obtenção da proteína purificada, 100 g de biomassa congelada foi ressuspendida em tampão de lise e submetida ao rompimento em homogeneizador de alta pressão. O homogenato obtido foi clarificado por adição do detergente brometo de cetiltrimetilamônio e centrifugação. PspA4Pro pura foi recuperada a partir do sobrenadante da centrifugação por uma sequência de etapas envolvendo cromatografia de troca aniônica, crioprecipitação e cromatografia de troca catiônica (FIGUEIREDO et al., 2016).

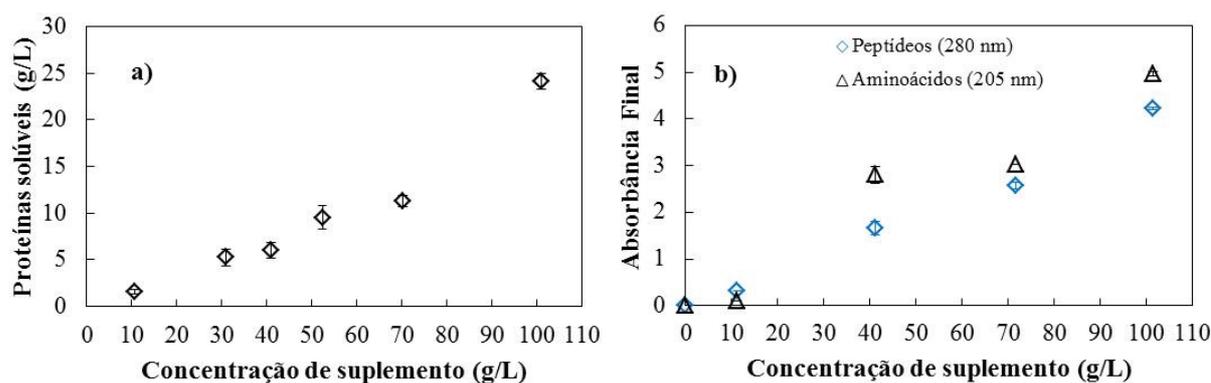
Amostras de PspA4Pro pura (0,1 mg/mL) foram preparadas em tampão de fosfato de sódio 10 mM ajustado para pH 7,0 e medidas de DC foram avaliadas de 185 a 260 nm (FIGUEIREDO et al., 2016). A deconvolução, para tratar possível interferência de sinal no DC, foi calculada com auxílio da base de dados Dichroweb disponível na internet (WHITMORE; WALLACE, 2004) com os algoritmos de CDSSTR e de Contin (SREERAMA; WOODY, 2000).

## 2.3 Resultados e discussão

### 2.3.1 Características dos extratos de proteína de soja

Após constatar que a umidade do suplemento de proteína de soja usado corresponde à descrição da embalagem (4,0%), os resultados das quantidades de proteínas, peptídeos e aminoácidos dos extratos preparados a partir das suspensões contendo diferentes concentrações de suplemento de proteína de soja são mostrados na Figura 2.

**Figura 2.** Características dos extratos preparados a partir de suspensões com diferentes concentrações do suplemento de proteínas de soja. (a) quantificação de proteína solubilizada; (b) quantificação de peptídeos e aminoácidos. Preparo do extrato: incubação por 1h, 37 °C e 300 rpm seguida por centrifugação em 30 min, 37°C e 6300 rpm.



Pela Tabela 3 pode ser observado que, em comparação com a solução de peptona, o extrato do suplemento de proteína de soja tem em sua composição um percentual maior de fontes de nitrogênio com estruturas moleculares maiores. Assumindo que as bactérias podem assimilar mais rapidamente moléculas menores e mais simples (BD, 2015), estes organismos poderiam encontrar maiores dificuldades na assimilação dos nutrientes

presentes no extrato da proteína de soja, enquanto que a assimilação dos nutrientes da peptona seria mais fácil. A menor disponibilidade de nutrientes facilmente assimiláveis poderia comprometer o crescimento da biomassa e a produção de proteína recombinante.

**Tabela 3.** Distribuição percentual por faixas de massa molecular dos componentes solúveis presentes no extrato do suplemento de proteína de soja e na solução de peptona de soja preparados para uma concentração de 10 g/L de proteínas solúveis totais.

<b>Massa Molecular (kDa)</b>	<b>Unidade</b>	<b>Extrato do suplemento de proteína de soja</b>	<b>Solução de Peptona</b>
< 0,9	%	14.6	35.5
0,9 - 6,5	%		64.5
6,5 - 12,4	%	69.4	
> 29,0	%	16.0	

A influência do tempo de extração sobre a composição do extrato obtido foi outro aspecto estudado. Suspensões contendo 40 g/L do suplemento de proteína de soja foram mantidas por 1 e 12 h, sob as condições de extração já descritas. Para comparação, dois experimentos adicionais, sendo uma suspensão contendo 10 g/L do suplemento de proteína de soja e uma solução da peptona de soja A2SC da Organotechnie também na concentração de 10 g/L (concentração de peptona usada nos meios de cultivo), foram realizados nas mesmas condições de extração, porém pelo período de 1 hora. Conforme mostram os resultados apresentados na Tabela 4, o tempo de duração da extração teve influência na solubilização das substâncias presentes no suplemento de proteína de soja, já que a concentração de todos os componentes aumentou com o prolongamento da extração. Desta forma, para um melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no suplemento de proteína de soja é recomendado um período mais prolongado de solubilização antes de proceder à separação do sobrenadante por centrifugação. Para comparação com o extrato do suplemento de soja, uma solução de peptona de soja A2SC da Organotechnie também teve os seus dados incluídos na Tabela 4. A peptona não apresentou proteínas quantificáveis por Bradford (1976), mas apresentou valores de aminoácidos e peptídeos semelhantes aos quantificados no extrato de proteína de soja formulado a partir da suspensão contendo 10 g/L do suplemento. Porém, com o aumento da concentração da suspensão para 40 g/L, independentemente do tempo de extração, a presença dos componentes aminoácidos e peptídeos no extrato foi significativamente maior que na peptona.

**Tabela 4.** Absorbâncias finais dos componentes solubilizados a 37 °C no extrato do suplemento de soja sob diferentes tempos de agitação.

Substância	Peptona de soja		Extrato do Suplemento de Proteína de Soja	
	10 g/L Agitação: 1 h	C <sub>B</sub> = 10 g/L Agitação: 1 h	C <sub>B</sub> = 40 g/L	
			Agitação: 1h	Agitação: 12 h
Proteínas solúveis <sup>(1)</sup>	-	1,8	6,8	18,8
Aminoácidos <sup>(2)</sup>	0,4	0,3	1,7	7,1
Peptídeos <sup>(3)</sup>	0,2	0,1	0,3	4,7

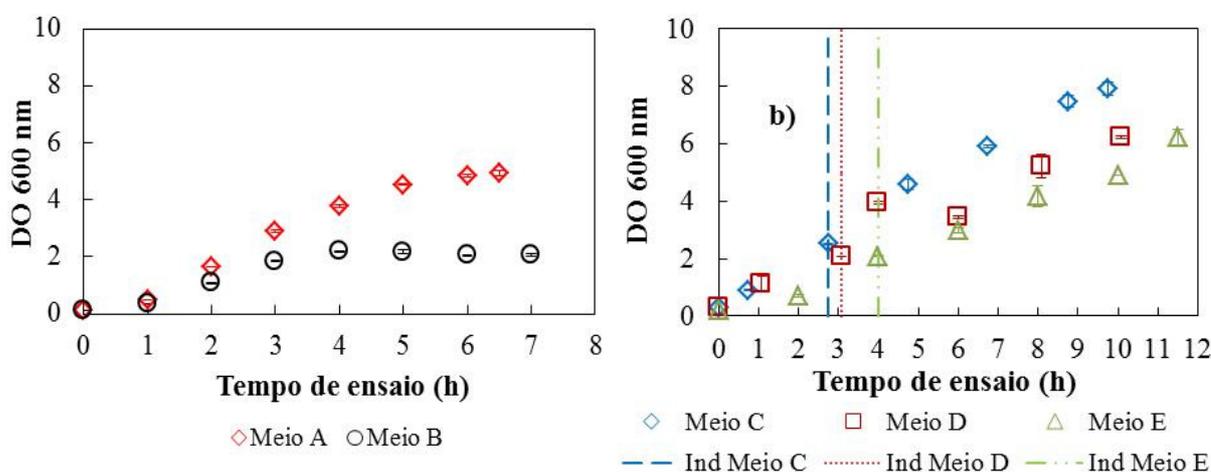
(1): [g/L]; (2): Absorbância 280 nm x Diluição; (3): Absorbância 205 nm x Diluição; C<sub>B</sub>: Concentração da suspensão do suplemento de proteína de soja.

De posse de todos os resultados apresentados acima para o suplemento de proteína de soja, foi possível propor uma metodologia para preparar uma fonte de nitrogênio obtida a partir de um material proteico de baixo custo para uso em meio de cultivo.

### 2.3.2 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja como fonte de nitrogênio em ensaios em *shaker* para cultivos de *E. coli* BL21(DE3)

Os perfis de crescimento dos cultivos com os meios A e B (sem indução) são apresentados na Figura 3.a, enquanto que na Figura 3.b são apresentados os resultados de ensaios com os meios C, D e E, nos quais houve indução com IPTG 1mM e produção de PspA

**Figura 3.** Perfis de crescimento da *E. coli* BL21(DE3) em *shaker*. (a) Meios A e B (sem indução); (b) Meios C, D e E sob indução com IPTG 1mM. Momento da indução indicado pelas linhas verticais tracejadas.



O cultivo em meio B contendo PS10 como fonte de nitrogênio atingiu um patamar de concentração celular inferior ao observado com a peptona de soja (Figura 3.a). Provavelmente carboidratos presentes na peptona levaram à maior formação de biomassa (MICHELS et al., 2011; CLELAND et al., 2007). Essa constatação é suportada pelos perfis das curvas de crescimento vistos na Figura 3.b, que retratam os patamares mais altos de concentração final de biomassa nos meios C, D e E, suplementados com glicerol como fonte de carbono. Na Tabela 5 estão presentes os valores das velocidades específicas máximas de crescimento celular de cada cultivo. As presenças do extrato de levedura e do glicerol parecem não causar alterações nessas velocidades, já que, considerando os desvios determinados para cada caso, os valores não diferiram significativamente.

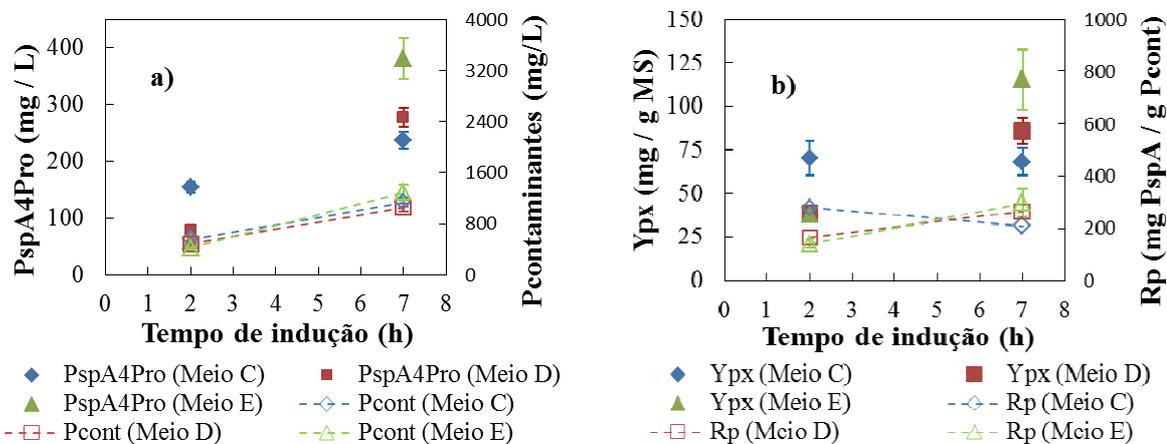
Pelos resultados apresentados na Figura 3.b e na Tabela 5 constata-se que os cultivos conduzidos em meios contendo o extrato de proteína de soja apresentaram desempenhos inferiores na produção de biomassa quando comparados aos meios com peptona. Essa diferença no desempenho pode ser atribuída à presença de nutrientes na peptona (BD, 2015), que é um produto obtido por hidrólise da proteína de soja, mais facilmente assimiláveis pelas células de *E. coli*, conforme já comentado na discussão da caracterização de ambas as fontes de nitrogênio (Tabela 3). Contudo, o emprego de um extrato com maior concentração de proteínas solubilizadas (meio E) levou a uma menor velocidade específica de crescimento. Isto pode ser reflexo da inibição por algum componente presente no meio E em concentração acima da crítica, já que o extrato de suplemento de proteína de soja estava duas vezes mais concentrado. Como Michels et al. (2011) mostraram, mesmo em peptonas de soja podem haver alguns componentes potencialmente inibidores do crescimento celular.

**Tabela 5.** Velocidade específica máxima de crescimento celular  $\mu_{\max}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) de *E. coli* BL21 (DE3) em *shaker*.

Fonte de nitrogênio	$\mu_{\max}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	
	S/ EL e glicerol	C/ EL e glicerol
Peptona	A: 0,837 +/- 0,112	C: 0,823 +/- 0,059
PS10	B: 0,765 +/- 0,092	D: 0,632 +/- 0,019
PS20		E: 0,585 +/- 0,024

EL: extrato de levedura; A, B, C, D e E: meios

**Figura 4.** Perfis de produção de PspA4Pro e proteínas contaminantes em *E. coli* BL21(DE3) a 37 °C. (a) Concentrações; (b) Valores específicos.



Em relação à produção de proteína, observou-se que houve a produção de PspA nos meios preparados com o extrato do suplemento de proteína de soja. Como pode ser visto na Figura 4.a, ao final de 7 horas de indução, esses ensaios apresentaram resultados de produção de PspA superiores àqueles obtidos com o meio C e similares aos vistos por Santos (2012) em condições semelhantes de produção usando Phytone™ Peptone, o que torna factível a realização dos ensaios em biorreator usando o material. Desta forma, pode-se afirmar que o extrato do suplemento de proteína de soja pode ser utilizado em cultivos de *E. coli* sem comprometer a produção de PspA4Pro. A produção de proteínas contaminantes também foi quantificada nos cultivos conduzidos nos meios C, D e E, e atingiu valores em torno de 900 mg/L (Figura 4.a), independentemente da composição do meio. Portanto, a utilização do extrato de suplemento de proteína de soja como fonte de nitrogênio tampouco influencia a produção de proteínas contaminantes.

A partir dos resultados observados durante os cultivos induzidos em termos de biomassa e de produção de proteína recombinante, verificou-se que o extrato de suplemento de soja (meios D e E) tem substâncias que suportam o crescimento da biomassa, mas que o uso do glicerol é crucial para se atingir uma maior concentração de biomassa. Contudo, extratos do suplemento mais concentrados em proteínas solúveis podem inibir o crescimento da biomassa. Ambos os meios (D e E) apresentaram rendimentos de PspA4Pro por biomassa superiores ao da peptona comercial (meio C) no final do cultivo. Por ser mais barato usar uma menor concentração do extrato do suplemento e por ter aliado um bom crescimento da biomassa com uma boa produção da proteína recombinante alvo por célula, o meio D (10 g/L de proteínas solúveis) foi o meio escolhido para ser avaliado em biorreator (5 L).

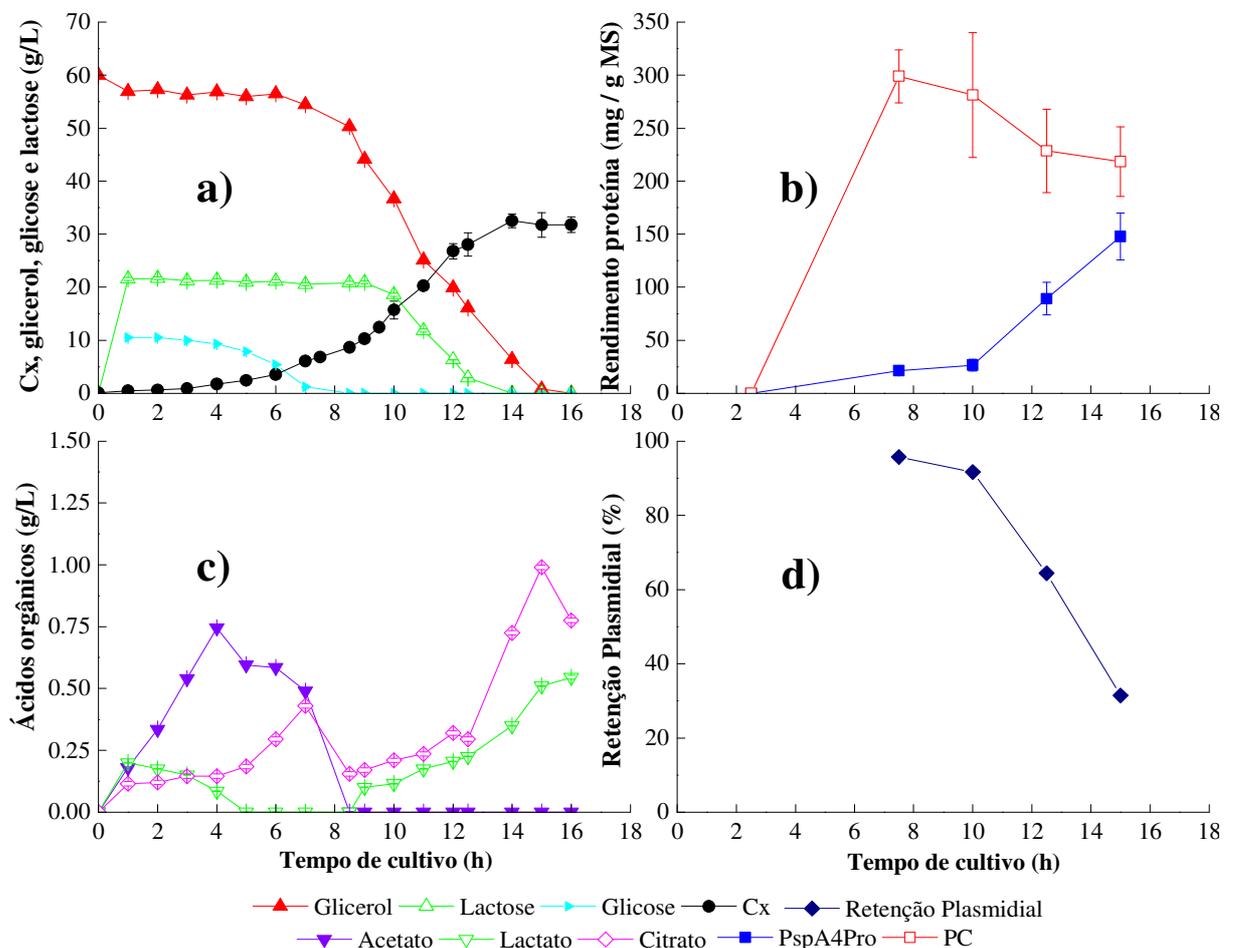
### 2.3.3 Avaliação do desempenho do extrato do suplemento de proteína de soja em ensaio em biorreator

O principal objetivo deste experimento foi verificar se uma fonte de nitrogênio mais barata e, conseqüentemente, menos elaborada, estaria apta a ser usada em cultivos com maiores densidades celulares, sem comprometer a produção da proteína recombinante de interesse. Além disso, os dados obtidos neste cultivo foram utilizados para complementar a análise econômica da produção da PspA4Pro em *E. coli* BL21(DE3) apresentada no capítulo 3.

Na Figura 5 são apresentados os dados de consumo de substratos, crescimento celular e formação de ácidos orgânicos durante o cultivo em biorreator no modo batelada. Os perfis observados ao longo do cultivo realizado com o extrato de proteína de soja foram muito similares aos obtidos nos cultivos 2 e 3 de Santos (2012), também conduzidos a 31 °C, com peptonas comerciais de soja (Phytone<sup>TM</sup> Peptone) e de caseína hidrolisada (Tryptone), respectivamente. A glicose foi a primeira fonte de carbono consumida, sendo esgotada cerca de 8 horas após o início do cultivo (Figura 5.a). A formação de ácido acético foi observada apenas durante a assimilação de glicose. A concentração máxima deste metabólito foi observada por volta de 4 horas do início do cultivo, sendo provavelmente reassimilado a partir deste momento. Após o esgotamento da glicose (~8 h de cultivo), o glicerol e a lactose passaram a ser consumidos, embora a assimilação da lactose tenha se iniciado apenas cerca de 2 horas depois do esgotamento da glicose. Este comportamento se deve ao tempo necessário para desreprimir o *operon lac* do genoma das células (SANTOS, 2012). Os ácidos orgânicos monitorados (ácidos cítrico e láctico) parecem ter sua formação e assimilação diretamente influenciadas pela disponibilidade das fontes de carbono (Figura 5.c). A concentração de ácido cítrico apresentou dois picos: um próximo ao término da glicose, sugerindo sua formação durante a assimilação da glicose. Em seguida, ele é reassimilado e volta a acumular quando o glicerol é metabolizado, atingindo novo máximo ao final do cultivo. Já a formação de ácido láctico parece estar associada ao consumo da glicose (incluindo a glicose formada a partir da lactose) e à síntese de proteína recombinante. Por isso, houve acúmulo desse ácido no início do cultivo, seguida pela reassimilação deste composto e a sua formação novamente com o consumo da lactose. Porém, a concentração de todos os ácidos orgânicos foi baixa (menor que 1 g/L), como é tipicamente observado nos cultivos tendo glicerol como principal fonte de carbono (SANTOS, 2012). Por fim, a concentração de biomassa ao final do cultivo atingiu 32,50±1,14 gMS/L, estando abaixo do valor alcançado em Santos (2012), em torno de

38,00 gMS/L. Apesar da concentração de biomassa ter alcançado um patamar inferior usando o suplemento de soja, a velocidade máxima de crescimento avaliada foi de  $0,67 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ , valor intermediário aos valores de Santos (2012) com peptonas comerciais de soja ( $0,62 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ ) e de caseína hidrolisada  $0,70 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ , sendo um pouco superior ao valor estimado em *shaker* (Tabela 5). As diferenças podem ser explicadas pela provável presença de outras fontes assimiláveis de carbono nas peptonas comerciais usadas, que permitiram que maiores concentrações finais de biomassa fossem alcançadas, já que, quando os meios de cultivo continham todos os componentes em abundância (início da fase exponencial de crescimento), o meio com o suplemento de soja proveu um crescimento comparável àqueles elaborados com peptonas comerciais.

**Figura 5.** Crescimento, formação de ácidos orgânicos, consumo de substratos, produção de PspA e retenção plasmidial em cultivo em biorreator de *E. coli* BL21(DE3) a 31 °C em meio de autoindução usando o extrato do suplemento de proteína de soja como fonte de nitrogênio alternativa: a) biomassa e fontes de carbono; b) rendimento PspA4Pro e Proteínas contaminantes. C<sub>X</sub>: concentração de biomassa (em massa seca); PC: proteínas contaminantes.



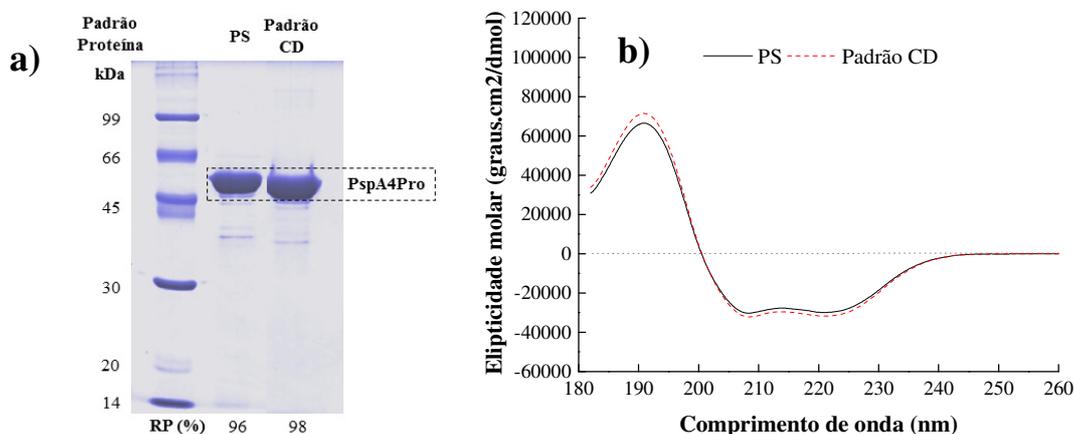
A retenção de plasmídeo pelas células decresceu abruptamente após 10 horas de cultivo (Figura 5.d), quando a lactose passou a ser consumida, alcançando 30% das células ao final do cultivo, menos que a metade dos valores relatados por Santos (2012). Apesar disso, a produção específica de PspA4Pro foi crescente a partir do momento no qual a lactose passou a ser consumida (~10 h), que claramente agiu como indutora na produção desta proteína recombinante (Figura 5.b). A produção específica máxima de aproximadamente 150 mg/gMS foi alcançada no último ponto coletado (15 h), valor inferior aos registrados nos cultivos de Santos (2012) usando peptonas comerciais de soja (239 mg/gMS) e de caseína hidrolisada (206 mg/gMS). Comparando o valor de produção específica da PspA em reator com o obtido em *shaker* (Figura 4), percebe-se que em biorreator a produção específica foi cerca do dobro do valor obtido em *shaker*, que pode ser consequência das melhores condições de transferência de oxigênio (30% de saturação no líquido) e de controle de pH oferecidas no cultivo em biorreator. Por outro lado, nos experimentos realizados em *shaker*, a produção específica de PspA utilizando o extrato de proteína de soja foi similar à obtida com a peptona de soja A2SC (Figura 4.b), que também foram semelhantes à alcançada por Santos (2012) com peptona de soja *Phytone*. Portanto, os resultados sugerem que a produção de proteína em biorreator pode ter sido comprometida pela insuficiência de nutrientes no extrato de proteína de soja para suprir a demanda das células presentes em maior concentração.

Quanto à produção específica de proteínas contaminantes, a partir das 10 h esta foi decrescente até praticamente se estabilizar em 250 mg/gMS devido à produção mais intensa da PspA.

#### 2.3.4 Avaliação da qualidade da PspA4Pro produzida usando o extrato de suplemento de proteína de soja como principal fonte de nitrogênio

A avaliação da estrutura secundária da PspA4Pro obtida no cultivo em biorreator usando o extrato do suplemento de proteína de soja (item 2.3.3) pode ser observada pelos resultados de difração circular apresentados na Figura 6.

**Figura 6.** Purificação e análise da estrutura secundária da PspA4Pro obtida em cultivo de *E. coli* BL21(DE3) a 31 °C em meio de autoindução usando o extrato do suplemento de proteína de soja (PS) em biorreator. a) Imagem de gel de SDS-PAGE contendo amostra da PspA4Pro obtida ao final da purificação (RP – pureza) e do padrão usado na análise DC; b) Espectro de dicroísmo circular (DC) da PspA4Pro purificada e do padrão para elipticidade molar entre 185 e 260 nm. Padrão DC: mistura sintética 5 kDa.



Na Figura 6.a, constata-se o elevado nível de pureza da PspA4Pro alcançado na etapa de purificação (RP) para a proteína recombinante obtida no cultivo conduzido com o extrato do suplemento de proteína de soja, utilizando-se o processo de purificação proposto por Figueiredo e colaboradores (2016). Desta forma, a utilização do extrato de suplemento de soja como fonte de nitrogênio não parece ter causado alterações no conjunto de proteínas contaminantes presentes no material de partida que poderiam interferir na obtenção da PspA4Pro com alta pureza.

Além de purificação ter sido bem-sucedida, o espectro de DC da amostra de PspA4Pro purificada coincidiu com espectro do padrão sintético (proteína purificada de cultivo com *E. coli* BL21(DE3) em alta densidade no modo batelada-alimentada crescendo em meio definido). Pela figura 6.b verifica-se que os perfis de picos e vales foram praticamente os mesmos para todos os comprimentos de ondas avaliados, indicando que a estrutura secundária da PspA4Pro se manteve estável em ambos os casos. Além disso, dois pontos de mínimo foram observados no espectro do DC, respectivamente, nos valores 208 e 222 nm. Isto está de acordo com os resultados de Figueiredo et al. (2016), que avaliou a PspA4Pro oriunda de cultivo com *E. coli* em meio complexo, mas com peptona de soja como fonte principal de nitrogênio, sendo outra indicação que a estrutura secundária na proteína recombinante não foi alterada com o uso do extrato do suplemento de soja. Portanto, a utilização do extrato produzido a partir do suplemento de proteína de soja, fonte de nitrogênio

barata, não comprometeu a qualidade da proteína recombinante produzida, o que reforça o seu potencial uso no barateamento dos custos de produção.

## 2.4 Conclusão

Os estudos realizados e os respectivos resultados obtidos permitiram avaliar o suplemento de proteína de soja para consumo humano como uma nova fonte alternativa complexa e barata de nitrogênio para a produção da proteína recombinante A de superfície do pneumococo em *E. coli* BL21(DE3). O suplemento de proteína de soja da *Growth Supplements*, apropriado para consumo humano, de preço reduzido e de pronta entrega, foi submetido a beneficiamento mínimo para a obtenção de um extrato contendo os nutrientes solubilizados, mais adequados para uso em nossos estudos, já que a presença de sólidos em suspensão comprometeria o acompanhamento do crescimento celular e, conseqüentemente, da produção específica de proteína. Foram desenvolvidas metodologias para preparo do extrato do suplemento de proteína de soja envolvendo etapas simples, práticas e rápidas e também para caracterização do mesmo em termos de proteínas, aminoácidos e peptídeos presentes, que podem ser úteis para a comparação de fontes de nitrogênio complexas em geral.

Os resultados obtidos nos cultivos em *shaker* e em biorreator atestaram que o extrato de suplemento de proteína de soja pode ser utilizado para a produção de PspA4Pro em células *E. coli* BL21(DE3). Juntamente com os resultados das análises de DC e do SDS-PAGE, que confirmaram a manutenção da integridade estrutural da proteína, pode-se concluir que o extrato do suplemento de proteína de soja tem potencial para substituir os derivados de proteína de soja mais elaborados (como as peptonas) em meios complexos para a produção de PspA4Pro por *E. coli* BL21(DE3). Os resultados aqui apresentados são preliminares, mas indicam a possibilidade de utilizar fontes de nitrogênio de menor custo em meios de cultivo, desde que a análise de custo do processo de produção usando este material seja favorável e o atendimento integral das Boas Práticas Fabricação esteja garantido.

## **Capítulo 3: Análise de custos baseada nos parâmetros e variáveis de processo da produção de PspA4Pro em *E. coli* BL21(DE3)**

O objetivo desta etapa do trabalho foi realizar uma análise econômica do processo de produção de proteínas recombinantes em cultivos de *E. coli* BL21(DE3) convencional em biorreatores para diferentes indutores, temperaturas e meios de crescimento. A partir de medidas *online* armazenadas no SUPERSYS foi possível estimar o consumo energético de equipamentos (banho de refrigeração, impelidor e compressor) e o consumo com gases (ar e oxigênio puro), o que permitiu a estimativa de custos em termos de proteína recombinante e biomassa. A partir do estudo realizado foi elaborado um artigo, o qual foi submetido a periódico e aguarda por aceite de publicação. O artigo é reproduzido no Capítulo 3 e o material suplementar do artigo está disponível como anexo no Apêndice A.

### **3.1 Introduction**

Up to 2014, around 250 recombinant biological products (biopharmaceuticals) received licenses in the American and European markets, reaching a total cumulative sales value of US\$ 140 billion (WALSH, 2014). These therapeutic recombinant proteins are used for treating diseases or for developing new drugs (BAESHEN et al., 2015). Almost one-third of these products were produced using *E. coli* (BERLEC; STRUKELJ, 2013; SANCHEZ-GARCIA et al., 2016) demonstrating the importance of this microorganism as an expression host. In addition to recombinant proteins, value-added biomolecules such as amino acids, organic acids, and advanced biofuels, corresponding to a global trade of US\$ 22 billion, can be synthesized by this bacterium (CHEN et al., 2013; TSUGE et al., 2016; WERPY; PETERSEN, 2004). Using System Biology tools, *E. coli* has strong potential to become the future microbial factory for sustainable production of bio-based chemicals, especially considering its ability to grow in inexpensive, abundant, and renewable feedstocks, including lignocellulosic biomass hydrolysates (LI et al., 2018) and crude glycerol generated from biodiesel production (YAZDANI; GONZALEZ, 2008). *E. coli* not only has a well-characterized genome, but is also easily genetically manipulated (BAESHEN et al., 2015), which has enabled the expression of several different recombinant proteins (FAYAZ et al., 2016; TAN et al., 2011) and metabolites (IMIELINSKI et al., 2005; PONTRELLI et al.,

2018). Furthermore, *E. coli* presents rapid growth and high biomass formation yield, as well as low production costs (CHOE; NIAN; LAI, 2006; JIA; JEON, 2016), favoring its industrial scale use, compared to other possible hosts (HUANG; LIN; YANG, 2012).

The production of recombinant proteins using *E. coli* has been widely reported. A huge number of studies have focused only on cloning and heterologous protein production at the shake flask scale (BESHAY et al., 2003; KHUSHOO; PAL; MUKHERJEE, 2005; KUNZE et al., 2012). At the bioreactor scale, most works have focused on cultivation strategies to achieve high cell and protein concentrations (LEE, 1996; SHILOACH; FASS, 2005). In contrast, there have been few studies addressing the impact of different cultivation techniques on process economics (CAMPANI et al., 2016; CHOI; LEE, 1997; DANQUAH; FORDE, 2007; FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018; FONG; WOOD, 2010; KNOLL et al., 2005; WALTHER et al., 2015; WEGEN; LING; MEMBER, 1998). Defined or complex media can be used during cultivations (SHILOACH; FASS, 2005). On one hand, a defined medium has been suggested as the best choice for production of therapeutic recombinant proteins (ZHANG; GREASHAM, 1999), since its known composition enables the concentration of individual components to be followed, resulting in better process control. On the other hand, complex media can boost product formation (LEE, 1996) and provides higher growth rates (KIM; KIM, 2017), compared to defined media. For these reasons, complex media are widely used in industry (HUANG; LIN; YANG, 2012), including for the production of therapeutics. However, in this case, complex medium formulations require prion-free certified animal-based nitrogen sources (such as tryptones), or certified nitrogen sources derived from plants and microbes (such as yeast extract and soybean peptones). Hence, the choice between complex and defined media is controversial and shedding light on the impact of medium formulation on process economics would help in deciding which medium to use for recombinant protein production in *E. coli*.

Since the aim of industrial fermentation is to obtain a high yield using inexpensive raw materials, with low capital costs (SANDERS et al., 2012), cost evaluation may provide a convenient guide for selection of a cultivation strategy (ZHANG; GREASHAM, 1999). Different approaches can be used for this purpose. It has been reported that the replacement of batch processes by continuous ones may be a natural option for decreasing costs and raising productivity (WALTHER et al., 2015). Other studies have focused on the simulation of new configurations of biopharmaceutical plants and estimates of

payoff times (CHOI; LEE, 1997; WEGEN; LING; MEMBER, 1998). Comparison has been made of alternative medium formulations for growth of *E. coli* as a host organism (DANQUAH; FORDE, 2007; FONG; WOOD, 2010). Although the latter studies considered the use of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and cheaper nitrogen and carbon sources, the cost impact of the inducer was only evaluated qualitatively. Ferreira *et al.* (FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018) estimated the quantitative economic impacts of these materials by simulation, although their influences on process dynamics were not demonstrated experimentally. The studies undertaken by Campani *et al.* (2016) and Knoll *et al.* (2005) focused on process utilities, with theoretical analyses of costs related to mixing, compression, and the supply of pure oxygen. Until now, the cost implications of different inducers and cultivation temperatures have been ignored.

Although different types of recombinant proteins may present particular process sets to achieve optimum economic production results (GELLISSEN ET AL, 2005; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018), efforts to assess how bioreactor operation conditions impact the overall performance of heterologous protein production processes are worthy to be made. The untagged fragment of pneumococcal surface protein A PspA4Pro poses as a potential candidate for a serotype-independent vaccine against *Streptococcus pneumoniae* (FIGUEIREDO et al., 2016) and its production in recombinant *E. coli* cultivations carried out under different strategies was studied (CAMPANI et al., 2016, 2017, 2019). Thus, this work presents an overall analysis of process performance, considering the effects of different media, temperatures, and inducers on the associated costs for biomass and PspA4Pro protein production during batch bioreactor cultures.

## 3.2 Materials and Methods

### 3.2.1 Experimental data

All experiments were carried out with *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) harboring the plasmid pET37b(+)/*pspA4Pro*, which carries the gene encoding an untagged fragment of the pneumococcal surface protein A (PspA) gene from family 2, clade 4, named PspA4Pro (MORENO et al., 2010). The expression of the PspA4Pro gene is controlled by the *lacUV5* and *T7lac* promoters, with the soluble recombinant protein being accumulated intracellularly after the inducer (IPTG or lactose) is added (CAMPANI et

al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2016). The recombinant *E. coli* strain was kindly provided by Dr. Eliane Miyaji from the Laboratory of Molecular Biology, Butantan Institute (São Paulo, Brazil). Experimental data for the cost analysis were obtained from nine bioreactor cultures carried out under different cultivation and induction conditions, using complex and defined media (Table 6).

Experiments #1 to #5 were batches performed with HDF medium (HORTA et al., 2015), at different temperatures (27-37 °C), using glycerol as sole carbon source and isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside or lactose as inducer. The data from these experiments enabled assessment of the influence of temperature and inducer on batch bioreactor cultivation cost, under moderate biomass concentration. Experiments #6 to #8 comprised a set of bioreactor batches carried out with modified ZYM-5052 auto-induction complex medium (STUDIER, 2005), at 31 °C, which differed from each other in terms of the animal or vegetal nitrogen sources used. Tryptone (enzymatic hydrolysate of casein) was used in Experiment #6, while soy peptone (enzymatic papain digest of soybean protein) was used in Experiments #7 (a and b as duplicates). Comparisons among Experiments #3, #6 and #7 provided useful information about the impact of the medium type on costs. Finally, Experiment #8 was performed using an extract of low-price soybean protein supplement, in order to determine the influence of feedstock quality on costs. Details of each experiment can be found in the references provided in Table 6, or in the Supplementary Material. The composition of all media employed in the experiments is presented in Table 7 (Section 3.2.2.1).

### 3.2.1.1 Bioreactor cultivation

The following experimental procedure was employed in all experiments. A pre-inoculum was prepared from a single bacterial colony transferred from a LB-Miller agar/kanamycin plate to 50 mL of the desired liquid medium plus kanamycin (30 mg/L), in a 0.5 L Erlenmeyer flask. The flask was kept overnight at 37 °C, with agitation at 250 rpm, in a controlled temperature incubator-shaker (New Brunswick), until reaching optical density (OD) of 2.0 (at 600 nm). Under the same conditions, an inoculum was prepared from a volume of the pre-inoculum necessary to reach OD of 0.1 in 300 mL of the fresh medium under investigation, distributed equally in three 0.5 L Erlenmeyer flasks. When OD of 2.0 was

reached, the inoculum was transferred to the bioreactor containing approximately 4 L of the medium under investigation. The 5 L stirred-tank reactor (STR), described in detail by (HORTA et al., 2014), was used for all the cultures listed in Table 6. The bioreactor was controlled and monitored using SuperSys\_HCDC software and the on-line data were logged using an analog-to-digital converter (Model cFP2020, National Instruments). The pH was automatically controlled at 6.7 (growth phase) or 6.9 (induction phase), using solutions of NH<sub>4</sub>OH (15% v/v) and HCl (9% v/v). Dissolved oxygen tension (DOT) was measured with an amperometric probe (Model InPro 6830, Mettler Toledo) and was maintained at 30% of saturation by adjusting the stirrer speed (from 200 to 900 rpm) and the two mass flow controllers (GFC, Aalborg) governing the air and oxygen flow rates. Air and oxygen were supplied to the bioreactor from a compressor (Model MAW-60/425, GMEG) and a commercial cylinder (White Martins), respectively, reaching a maximum total gas flow rate of 4-6 std L/min (at 21.1 °C and 1 atm). The culture temperature was measured with a thermocouple (Pt-100, Exacta) and maintained at the desired set-point by continual indirect heat transfer using water from a thermostatic bath (0.7 kW, Solab) passed through the bioreactor jacket.

**Table 6.** Main *E. coli* BL21(DE3) pET37b(+)/PspA4Pro cultivation conditions for batch bioreactor experiments #1 to #8, cultivation time ( $t_f$ ) to reach the highest PspA4Pro production ( $P_P$ ), and the corresponding biomass concentration ( $C_X$ ). Data for Experiments #2, 5, 7 (a and b) and 8 available at Supplementary Material.

Exp #	Medium/T/Inducer	$t_f$ h	$C_X$ g <sub>DCW</sub> /L	$P_P$ g <sub>PspA4Pro</sub> /L	Reference
1	DM/27°C/IPTG	25.5	32.8	3.1	(CAMPANI et al., 2017)
2	DM/27°C/LAC	27.5	34.5	2.6	This work
3	DM/32°C/IPTG	16.3	31.3	3.8	(CAMPANI et al., 2017)
4	DM/37°C/IPTG	14.6	27.0	3.4	(CAMPANI et al., 2017)
5	DM/37°C/LAC	19.5	20.4	1.3	This work
6	CM-ANS/31°C/LAC	16.4	38.0	5.4	This work
7.a	CM-VNS/31°C/LAC <sup>+</sup>	16.6	38.3	5.6	(FIGUEIREDO et al., 2016)
7.b	CM-VNS/31°C/LAC <sup>+</sup>	16.0	39.2	6.0	This work
8	CM-VNS/31°C/LAC*	15.0	31.8	4.7	This work

CM-ANS: Complex medium with animal nitrogen source; DCW: Dry cell weight; DM: Defined medium; Exp #: Experiment number; LAC: lactose; PspA4Pro: Pneumococcal surface Protein A from clade 4; T: Culture temperature; CM-VNS: Complex medium with vegetal nitrogen source. \*Cheaper vegetal nitrogen source. <sup>+</sup>Average of duplicates to establish parametrically by a 95% confidence interval.

### 3.2.1.2. Analyses of culture samples

The bioreactor culture biomass and PspA4Pro concentrations used in the cost estimation are also shown in Table 6. The biomass concentration ( $C_X$ ) was monitored by optical density (OD) measurements at 600 nm and by the dry cell weight method (OLSSON; NIELSEN, 1997; SONNLEITNER; LOCHER; FIECHTER, 1992). Plasmid loss during the cultivations was evaluated using diluted samples ( $1:10^6$  or  $1:10^7$ ) of culture broth spread onto LB agar plates (CAMPANI et al., 2016).

PspA4Pro production ( $P_P$ ) was assessed by band densitometry after cell disruption (by sonication) and clarification (CAMPANI et al., 2016). The total soluble protein concentration for the known cell concentration of the disrupted sample was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976). The proteins present in the clarified sample were identified by 12% SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). The soluble recombinant protein fraction in the clarified sample was estimated using ImageJ software, to analyze images of the gel stained with Coomassie Blue R (ABRÀMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004), together with the total soluble protein concentration, as described by Campani *et al.* (2016). To confirm the absence of insoluble PspA4Pro as inclusion bodies, pellets obtained after sonication were resuspended in 2-mL-buffer (TRIS 20 mM; NaCl 250 mM; pH 8.0), mixed with Laemmli buffer (1:2) (LAEMMLI, 1970), boiled at 100 °C for 15 minutes and applied to 12% SDS-PAGE.

### 3.2.1.3. PspA4Pro secondary structure and lactoferrin binding assay

Additional methods to characterize the quality of the protein obtained by different cultivation strategies were applied to samples from Experiments #2, #3, #4, #7 and #8. To this end, cell pellets harvested at the end of bioreactor cultures #2, #3, #4, #7 and #8 were frozen (- 80 °C) and then processed according to the purification procedure proposed by Figueiredo and co-workers (2016). The pure recombinant PspA4Pro obtained from soluble fraction of each biomass was analyzed by circular dichroism (CD) to verify PspA4Pro secondary structure according to the previously described method (FIGUEIREDO et al., 2016).

PspA4Pro biological activity was verified by a lactoferrin binding assay using 96-well flat-bottom plates (MaxiSorp, Nunc). The plates were coated with 2 µg/well human lactoferrin (L1294, Sigma), incubated overnight at 4 °C, washed 3 times with phosphate buffered saline + 0.05% Tween 20 (PBS-T) and blocked with 5% skimmed milk. Then the plates were washed with PBS-T and incubated at 37 °C for 2 h with serial dilutions in 5% skimmed milk of PspA4Pro purified from each experiment. Blank wells received only 5% skimmed milk and positive control, a standard PspA4Pro. After washing with PBS-T, anti-PspA4Pro rabbit serum (1:5,000 in 5% skimmed milk) was added and plates were incubated at 37 °C for 1 h, washed with PBS-T and incubated with anti-rabbit IgG conjugated to peroxidase (A0545, Sigma, 1:5,000 in 5% skimmed milk). The color was developed in presence of *o*-phenylenediamine and hydrogen peroxide at room temperature for 15 min and the reaction stopped with 4 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The absorbance was measured at 492 nm, plotted against PspA4Pro concentration, and the slope used as a parameter of the lactoferrin binding property of PspA4Pro. The anti-PspA4Pro antibody was obtained in rabbit immunized with 3 doses in two week intervals of 200 µg of previously purified PspA4Pro (FIGUEIREDO et al., 2016) absorbed in 5 mg aluminum hydroxide. The immunization and bleeding protocol follows the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB nº 7755300718).

### 3.2.2. Direct cost estimation

In order to assess the influence of different cultivation conditions on process economics, the direct costs related to cell and PspA4Pro production were estimated relative to Experiment #3. This experiment was chosen as a reference because it presented the lowest direct cost for protein production using defined medium, considering expenses related to the utilities (air and oxygen supply, cooling, and stirring) and the medium formulation. For each experiment, the direct cost was evaluated at the cultivation time corresponding to the maximum recombinant protein concentration (Table 6). Experimental replication was provided as Experiments #7.a and 7.b, and the reproducibility of the direct cost estimation results was assessed by Tukey test, with 95% confidence interval (TUKEY, 1949). Despite contributing to the total cost of a fermentation process, costs related to sterilization,

equipment, and employees were not considered in this work, because they remained almost the same, regardless of the cultivation conditions evaluated in the experiments.

### 3.2.2.1. Medium costs

The medium costs were estimated using Equation 3.1, considering the initial amounts of the components added to formulate the medium, together with their market prices (Table 7). Although all the experiments were performed with laboratory-grade products purchased in small quantities, the costs of most of the medium components were estimated using information obtained from business intelligence and e-commerce platforms (COST-DRIVERS, 2016; MOL-BASE, 2016), which provided a better representation of market prices. An exception was the soy protein supplement used in Experiment #8, for which the sale price was used directly. The prices of casein and soybean-based peptone, indicated in Table 7 as animal-based (ANS) and vegetal (VNS) nitrogen sources, respectively, were also retrieved from the platforms, where they were identified generically as “peptone”. The market price of peptone varied from 6 to 300 US\$/kg, depending on its nutritional value as a microbial culture supplement, solubility, and quality certification, as well as the amount purchased and the supplier. Oxoid LP0042 Tryptone was used in Experiments #6 and BD BBL Phytone in Experiments #7.a and #7.b, while Growth Supplements soy protein supplement was used in Experiment #8. This nitrogen source required additional preparation steps for its solubilization, before being added to the medium (details are provided in the Supplementary Material).

$$\$_{GASES} = \frac{1}{V_R(C_X \text{ or } P_P)} (0.52V_{O_2} + 0.126E_C) \quad (3.1)$$

$\$_{MEDIUM}$ : Cost of medium, US\$/(g<sub>DCW</sub> or g<sub>PspA4Pro</sub>);

$C_X$ : Biomass concentration, g<sub>DCW</sub>/L;

$C_k^{Comp}$ : Concentration of component k in the medium (Table 7);

$P_P$ : PspA4Pro production, g/L;

$\$_k^{Comp}$ : Purchase cost of component k in the medium (Table 7) converted according to  $C_k^{Comp}$ .

**Table 7.** Concentrations and costs of each medium component used in the bioreactor cultures.

Component	Purchase Cost (US\$/kg)	Concentrations for each experiment			
		Units	1, 3 and 4	2 and 5	6, 7, and 8
Glucose <sup>(1)</sup>	0.7	g/L			10.0
Glycerol <sup>(1)</sup>	1.0	g/L	60.0	60.0	60.0
Yeast extract <sup>(1)</sup>	1.7	g/L			5.0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	0.3	g/L	0.4	0.4	0.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>(1)</sup>	2.0	g/L			9.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>(2)</sup>	1.2	g/L	17.7	17.7	3.4
NH <sub>4</sub> Cl <sup>(1)</sup>	0.2	g/L			2.7
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>(1)</sup>	0.4	g/L	5.3	5.3	
Citric acid <sup>(1)</sup>	1.2	g/L	2.3	2.3	
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> <sup>(1)</sup>	0.1	g/L			0.7
Kanamycin <sup>(2)</sup>	1.0	mg/L	100.0	100.0	100.0
Ferric citrate <sup>(2)</sup>	6.0	mg/L	133.3	133.3	100.8
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O <sup>(2)</sup>	12.7	mg/L	3.3	3.3	2.5
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O <sup>(2)</sup>	1.7	mg/L	20.0	20.0	15.0
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	4.2	mg/L	2.0	2.0	1.5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> <sup>(1)</sup>	0.6	mg/L	4.0	4.0	3.0
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O <sup>(1)</sup>	9.9	mg/L	2.8	2.8	2.1
Zn(CH <sub>3</sub> COOH).H <sub>2</sub> O <sup>(2)</sup>	1.7	mg/L	33.8	33.8	33.8
EDTA <sup>(1)</sup>	1.9	mg/L	18.8	18.8	14.1
Thiamine <sup>(1)</sup>	36.1	mg/L	45.0	45.0	45.0
Polypropylene glycol <sup>(1)</sup>	3.6	g/L	0.3	0.3	0.3
Peptone <sup>(1)</sup>	6.1	g/L			10.0
Soy supplement <sup>(3)</sup>	12.2	g/L			10.0
Lactose <sup>(1)</sup>	2.0	g/L		20.0	20.0
IPTG <sup>(2)</sup>	601	mmol/L	1.0		
<b>Total medium expenses</b>		<b>US\$/L</b>	<b>0.24</b>	<b>0.15</b>	<b>0.21<sup>(P)</sup>/0.27<sup>(SS)</sup></b>

P: Peptone (Experiments #6 and #7); SS: Soy Supplement (Experiment #8); Sources of raw material costs: (1): COSTDRIVERS; (2): Molbase; (3): Soy supplement supplier.

### 3.2.2.2. Cost of air and oxygen supplies (gases)

In order to maintain DOT at 30% of saturation, a sequential control strategy was applied using the Supersys\_HCDC software, comprising stepwise increases in stirring speed and air volumetric flow rate ( $Q_{AIR}$ ), up to their upper limits, followed by the gradual

enrichment of air with pure oxygen. This enrichment was accomplished by manipulation of the oxygen ( $Q_{O_2}$ ) and air volumetric flow rates, so that the total inlet flow rate of the gas supplied to the bioreactor was kept at 4-6 std L/min (HORTA et al., 2014). The  $Q_{O_2}$  and  $Q_{AIR}$  values were recorded by Supersys\_HCDC, enabling determination of the total volume of oxygen supplied ( $V_{O_2} = \Sigma Q_{O_2} \cdot \Delta t$ ) and the total energy consumption of the compressor ( $E_C = \Sigma P_C \cdot \Delta t$ ), with these two values being used to determine the gases costs. The overall cost of supplying air and oxygen is given by Eq. 3.2, where the market prices for oxygen and electricity were US\$ 0.52/std  $m^3$  and US\$ 0.126/kWh, respectively (COST-DRIVERS, 2016). The compressor power consumption ( $P_C$ ) was estimated theoretically using Eq. 3.3. This approach was analogous to the procedure of Knoll *et al.* (2005), considering an ideal single-stage compressor, with electrical and mechanical compression losses taken into account using the efficiency number ( $\eta_C = 0.7$ ) (CAMPANI et al., 2016).

$$\$_{GASES} = \frac{1}{V_R(C_X \text{ OR } P_P)} (0.52V_{O_2} + 0.126E_C) \quad (3.2)$$

$\$_{GASES}$ : Cost of gases, US\$/( $g_{DCW}$  or  $g_{PspA4Pro}$ );

$V_R$ : Bioreactor culture volume, L;

$V_{O_2}$ : Total oxygen consumption volume,  $m^3$ ;

$E_C$ : Total energy consumption of compressor, kWh;

$$P_C = \frac{P_1 Q_{AIR}}{\eta_C} \frac{\gamma}{(\gamma - 1)} \left\{ \left( \frac{P_2}{P_1} \right)^{\frac{[\gamma - 1]}{\gamma}} - 1 \right\} \quad (3.3)$$

$P_C$ : Power consumption of compressor, kW;

$Q_{AIR}$ : Air volumetric flow rate, L/min;

$p_1$ : Inlet absolute pressure of compressor, Pa;

$p_2$ : Outlet absolute pressure of compressor, Pa;

$\eta_C$ : Efficiency number of compressor (CAMPANI et al, 2016);

$\gamma$ : Isoentropic exponent, 1.4 for oxygen (CAMPANI et al, 2016).

### 3.2.2.3. Cost of stirring

The stirring cost was determined using Eq. 3.4. The total energy consumed for stirring ( $E_S$ ) was calculated by integrating over time the theoretical values of gassed stirring power consumption,  $P_S$  ( $E_S = \Sigma P_S \cdot \Delta t$ ). These values were correlated to the power for ungassed stirring ( $P$ ), using Eqs. 3.5 or 3.6 (TREYBAL, 1980). The energy efficiency ( $\eta_S$ ) was assumed to be 0.65 (CAMPANI et al., 2016) and the impellers were considered to be operated at maximum velocity (900 rpm), since this condition would demand the highest energy consumption, in order to better represent an oversized engine. Considering three impellers immersed in the liquid, the  $P$  values were determined using Eqs. 3.7 and 3.8, according to the Rushton method combined with the Michel and Miller (MICHEL; MILLER, 1962) correlation and the correction factor ( $f_C$ ) used by Campani *et al.* (2016), assuming standard STR geometries of diameter ( $D_R/D_i$ ) and height ( $H_R/D_i$ ) equal to 3. For eqs. 3.5 and 3.6, the total volumetric gas flow rate values were retrieved from the dataset automatically acquired by the SuperSys\_HCDC software.

$$\$S = 0.126 \frac{1}{V_R (C_X \text{ or } P_P)} E_S \quad (3.4)$$

$\$S$ : Cost of stirring, US\$/( $g_{DCW}$  or  $g_{PspA4Pro}$ );

$E_S$ : Energy consumption of stirring, kWh.

$$P_S = \frac{P}{\eta_S} \left( 1 - 12.2 \frac{Q_G}{ND_i^3} \right), \text{ valid for } \frac{Q_G}{ND_i^3} < 0.037 \quad (3.5)$$

$$P_S = \frac{P}{\eta_S} \left( 0.62 - 1.85 \frac{Q_G}{ND_i^3} \right), \text{ valid for } \frac{Q_G}{ND_i^3} > 0.037 \quad (3.6)$$

P: Power consumption of ungasged stirring, kW;

$Q_G$ : Total gas volumetric flow rate,  $m^3/s$ ;

N: Stirring speed,  $s^{-1}$ ;

$D_i$ : Impeller diameter, 0.078 m;

$\eta_S$ : Efficiency number of stirring, 0.65 (CAMPANI et al, 2016).

$$P = 3f_C N_P \rho_b N^3 \frac{D_i^5}{g} \quad (3.7)$$

P: Power consumption of ungasged stirring, kW;

$N_P$ : Power number, 5.2 (Rushton impeller in turbulent regime, according to the Reynolds number);

$\rho_b$ : Broth density,  $kg/m^3$ ;

g: Gravitational acceleration,  $m/s^2$ .

$$f_C = \sqrt{\frac{(D_R/D_i)^\wedge (H_L/D_i)^\wedge}{(D_R/D_i) (H_L/D_i)}} \quad (3.8)$$

$D_R$ : Bioreactor diameter, 0.160 m;

$H_L$ : Height of the liquid, 0.267 m;

' $\wedge$ ' indicates the geometric characteristics of the STR used in the experiments.

#### 3.2.2.4. Cost of cooling

In order to maintain a constant bioreactor temperature, it is necessary to remove the heat released by cell metabolism ( $Q_{HEAT}$ ) and the heat transferred from the impellers ( $E_S$ ) to the culture broth. A theoretical approach to estimate the cost of cooling was used, considering that all the heat generated by the cells and impellers was totally transferred to the cooling water, assuming a negligible lag phase duration. Hence, cooling of the broth by

gas stripping and losses to the environment were neglected. The metabolic heat released during the bioreactor cultures was correlated to the oxygen uptake rate (OUR) using Eq. 3.9, proposed for aerobic microorganisms by Shuler and Kargi (2002), as a generalization of the expressions reported by Cooney, Wang and Mateles (1968) and Abbott and Clamen (1973). The OUR values were automatically calculated using Eq. 3.10, which was obtained from the nitrogen and oxygen molar balances in the gas phase, based on pressure (p), temperature (T), total volumetric gas flow (Q), and molar fractions of oxygen (O) and carbon dioxide (C) in the gas streams entering (1) and leaving (2) the bioreactor. The total metabolic energy generation ( $E_M$ ) was calculated by integration of  $Q_{HEAT}$  over time, up to the experimental point of maximum  $P_P$ , and was added to the total  $E_S$  value obtained as described in Section 3.2.2.3. Next, the theoretical cost of cooling was estimated using Eq. 3.11, assuming an efficiency number ( $\eta_B$ ) of 0.7 (KNOLL et al., 2005).

$$Q_{HEAT} = K \cdot OUR \cdot V_R \quad (3.9)$$

K: Proportionality constant, 0.50 kJ/mmol O<sub>2</sub>;

OUR: Oxygen uptake rate, mmol O<sub>2</sub>/(L.h);

$Q_{HEAT}$ : Metabolic heat release rate, kJ/h.

$$OUR = \frac{pQ_1}{RV_R} \left[ y_{O_1} - y_{O_2} \frac{(1 - y_{O_1})}{(1 - y_{O_2} - y_{C_2})} \right] \quad (3.10)$$

p = Pressure of entering gas, atm;

$Q_1$  = Entering gas volumetric flow rate, L/h;

$T_1$  = Temperature of entering gas, K;

R: Gas constant,  $8.2 \times 10^{-5}$  atm.L/(mmol.K).

$$\$_{COOLING} = 0.126 \frac{(E_M + E_S)}{\eta_B} \frac{1}{V_R(C_X \text{ or } P_P)} \quad (3.11)$$

$\$_{COOLING}$ : Cost of cooling, US\$/(g<sub>DCW</sub> or g<sub>PspA4Pro</sub>);

$E_M$ : Total metabolic energy generation, kWh;

$\eta_B$ : Efficiency number of thermostatic bath, 0.7 (KNOLL et al., 2005).

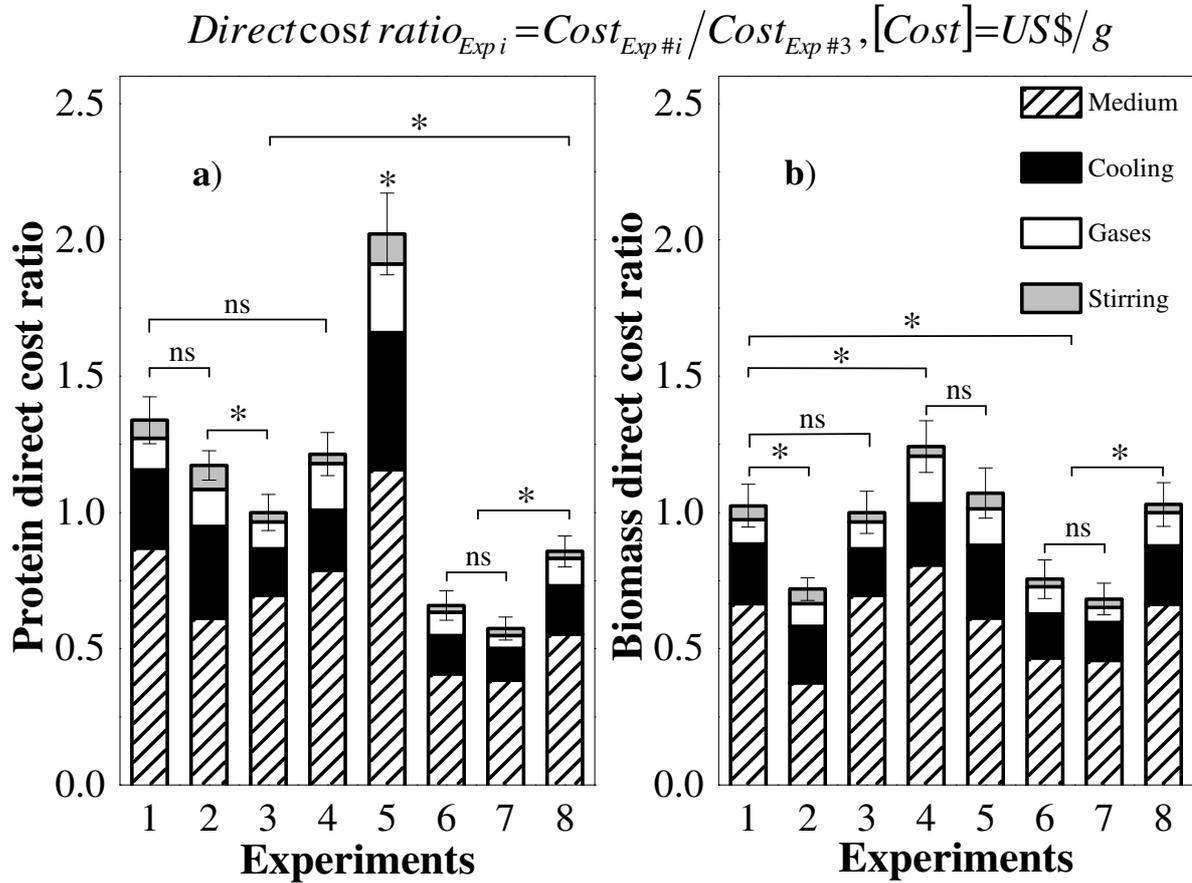
### 3.3 Results and Discussion

In this section, the effects of different process strategies on direct production costs of biomass and PspA4Pro will be detailed. Even though there are several other factors that can play a role in the recombinant protein production using *E. coli* bioreactor cultures (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014), temperature, type of inducer and medium were chosen to evaluate a cost-effective PspA4Pro production strategy.

#### 3.3.1. PspA4Pro and biomass production costs: general aspects

The medium and cooling, in that order, were the main components of the direct cost, regardless of the cultivation strategy used, representing more than 80% of the direct cost for any experiment evaluated (Fig. 7). High contributions of the medium to the costs have been evidenced in other studies with recombinant proteins (CHOI; LEE, 1997; WEGEN; LING; MEMBER, 1998). The complex media (Experiments #6, #7 and #8) provided the lowest direct PspA4Pro costs, in agreement with the findings of Zhang and Greasham (1999) for low-cost products. Experiments #6, #7, and #8, performed with complex media, presented approximately 70% of the costs of Experiment #3, for which the PspA4Pro cost was the best value obtained using defined medium (Fig. 7.a). Higher soluble recombinant protein production and a shorter cultivation time using complex media (Table 6) seemed to be the main reasons for these results obtained during bioreactor batches, since prolonged protein expression could increase costs (FONG; WOOD, 2010).

**Fig. 7.** Direct cost ratios, using Experiment #3 as a reference (ref.), in terms of (a) PspA4Pro (ref. US\$ 96.5/kgPspA4Pro) and (b) biomass (ref. US\$ 11.9/kgDCW). The Tukey test was performed to evaluate statistical differences, considering standard deviations and a p value < 0.05 significant. ns: not significant.



In the case of biomass production (Fig. 7.b), Experiments #2, #6, and #7, that resulted in the lowest overall cost ratios, because the higher biomass concentrations achieved contributed to mitigate the costs (Table 6). Yet, for the other investigated cultivation strategies, the differences in the overall cost ratio values were not statistically significant.

### 3.3.2. PspA4Pro protein and biomass production costs: specific aspects

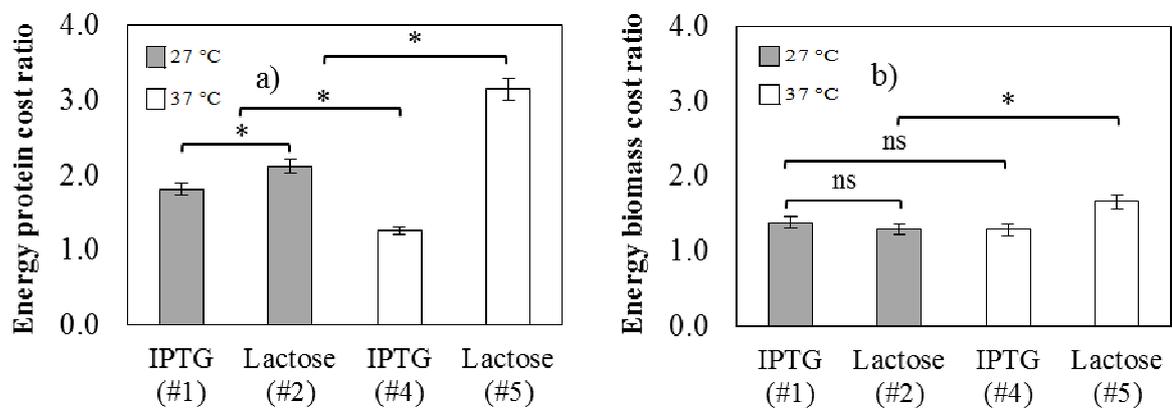
#### 3.3.2.1 Effect of temperature on direct cost

Operation at moderate temperature appeared to reduce the cost of PspA4Pro production. Comparison of the results for Experiments #1 (27 °C), #3 (32 °C), and #4 (37 °C)

(Fig. 7), which were all performed with defined medium and induction by IPTG (Table 6), showed that the lowest cost in terms of protein was obtained for Experiment #3. This condition was likely due to better balance between metabolic burden and biomass production (CAMPANI et al., 2017; DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996). This possibility was reinforced by the results of Experiments #2 and #5 (Table 6), since less protein was produced at 37 °C than at 27 °C possibly as consequence of a higher metabolic burden on the host cells in the former experiment (CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013; LI; ZHANG; TAN, 2006), which may be partially evidenced by high plasmid losses during experiment #5 at 37 °C (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014).

### 3.3.2.2 Effect of inducers on energy costs

**Fig. 8.** Effect of inducers on energy costs (cooling, stirring, and compressor operations). Cost ratios\* in terms of (a) PspA4Pro (ref. US\$ 21.9/kgPspA4Pro) and (b) biomass (ref. US\$ 2.7/kgDCW). All experiments using defined medium. \*Reference: Experiment #3 (Table 6).



The type of inducer can influence the PspA4Pro cost in terms of the energy required during bioreactor batches. The protein costs related to energy consumption (for cooling, stirring, and compressor operations) were lower when IPTG was used as the inducer, rather than lactose, at the same temperatures (Fig. 8). Compared to lactose, the use of IPTG as inducer leads to faster protein synthesis (FONG; WOOD, 2010; LI; ZHANG; TAN, 2006), with the higher PspA4Pro production resulting in shorter induction phases, hence reducing energy costs. Generally a faster recombinant protein synthesis has been associated with an increase in inclusion bodies or a recombinant protein of low quality, i.e., incorrectly folded or

with impaired function and properties (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014; ROSANO; CECCARELLI, 2014; VENTURA; VILLAVERDE, 2006).

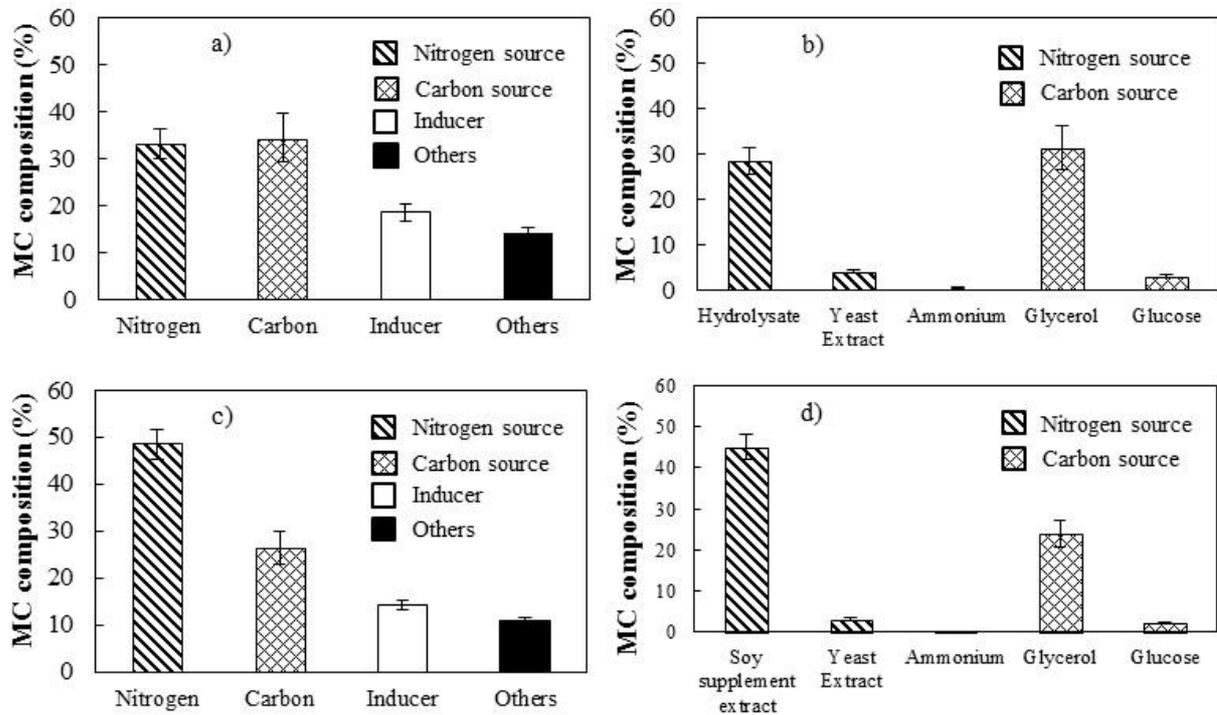
In fact, due to their coiled-coil  $\alpha$ -helix structure (JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001), N-terminal fragments of PspA are very soluble and thermostable. When PspA4Pro was heated from 15 °C to 95°C and cooled back to 15 °C, it recovered the original structure as measured by CD, and a relatively thermostable region was identified between 40 and 50 °C (FIGUEIREDO et al, 2016). In addition, the presence of PspA4Pro in inclusion bodies was never found in the culture samples analyzed (data not shown). For these reasons, fast induction strategies can be applied during *E. coli* cultures to produce PspA without affecting its secondary structure (Figure S1). Thus, the most suitable induction strategy depends on the protein characteristics and should be investigated on a case-by-case basis.

### 3.3.2.3 Influence of component price on medium cost

#### a) Complex medium (autoinduction)

The nitrogen and carbon sources were major contributors to the costs in Experiments #6, #7, and #8, performed according to the auto-induction strategy, with lactose as inducer. These components represented around 70% of the medium cost (Figs. 9.a and 9.c), while the inducer (lactose) and other medium components played less important roles. Considering all the nitrogen sources, the protein hydrolysates (ANS or VNS) had the greatest impact on the cost (Fig. 9.b), because their prices were approximately 3 times higher than the market value of yeast extract, which was also present in the medium with half the hydrolysate concentration (Table 7).

**Fig. 9.** Cost of complex medium with peptones: (a) core costs; (b) nitrogen and carbon sources in detail. Cost of complex medium with soy supplement: (c) core costs; (d) nitrogen and carbon sources in detail. MC: medium cost.

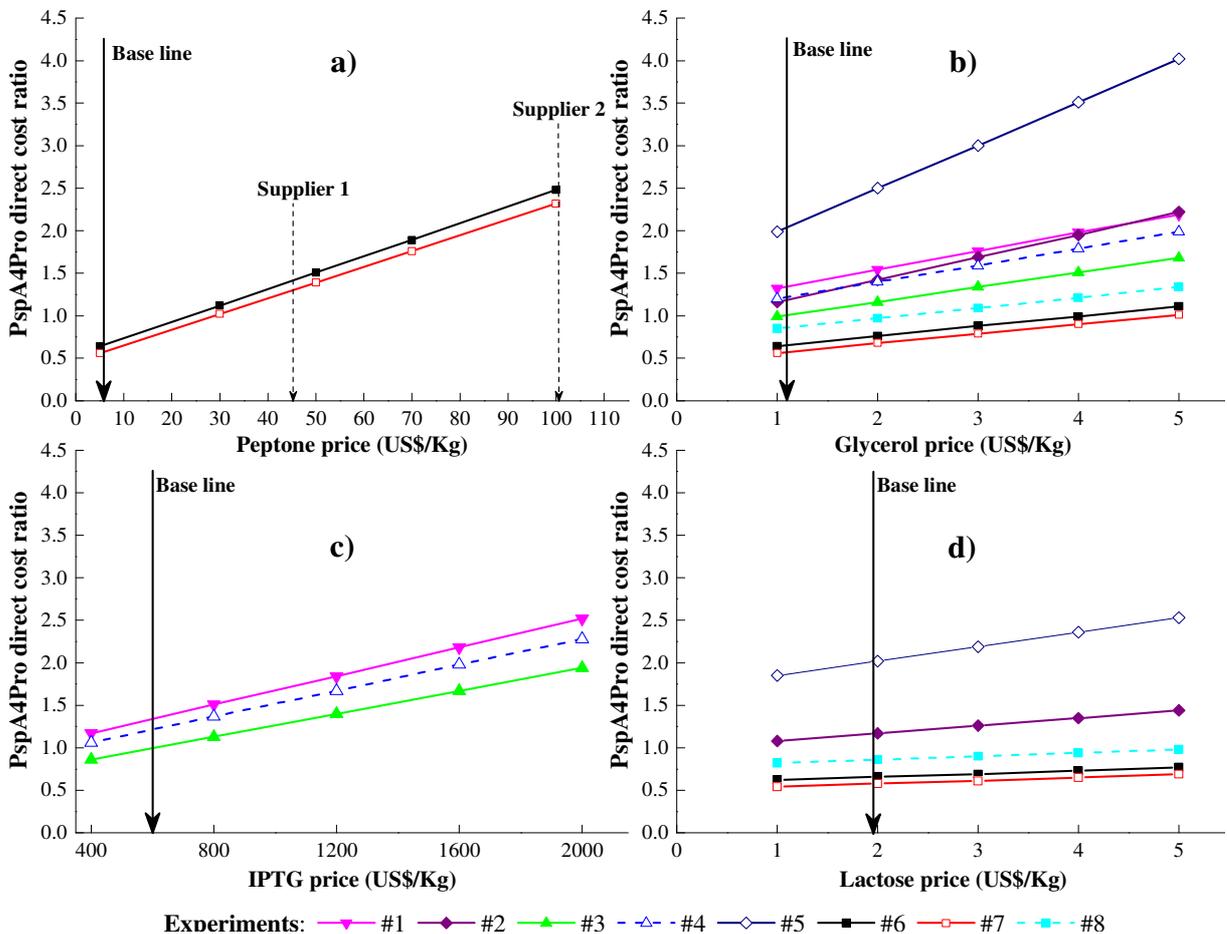


The impact of the nitrogen source prices on costs could be even greater, given that ANS and VNS prices can vary widely according to the supplier. For example, when peptone was replaced by of soybean protein supplement extract in Experiment #8, adopting its current sale price, there was an increase of 15% in the contribution of the nitrogen source to the cost of the medium (Fig. 9.d). According to sensitivity analysis of peptone prices (Figure 10.a), if the commercial certified peptone with the best price (US\$ 45/kg) found in our survey was considered in the calculations (Supplier 1), it would lead to an increase of 125% in PspA4Pro cost, in relation to the value estimated using the commercial platform prices. Similarly, if the second best supplier was considered, it would lead to an increase of around 400%. As shown in Fig. 10.a, the certified peptone prices of different market suppliers strongly impacted the direct cost. In the same way, glycerol price has some impact in PspA4Pro direct cost (Figure 10.b). However, this raw-material may not offer a great opportunity to decrease production cost, since as a commodity (ANITHA; KAMARUDIN; KOFLI, 2016; AYOUB; ABDULLAH, 2012) it is commonly offered by several suppliers in lower prices than nitrogen sources. Hence, these findings indicate that nitrogen sources are more relevant than carbon sources, in terms of the costs of cultivation using complex media,

and therefore represent a potential target for lowering the costs of protein and biomass production.

Comparison of Experiments #6, #7, and #8 (Fig. 7) showed that the use of nitrogen from animal or vegetal sources led to low costs for producing PspA4Pro. However, for biopharmaceutical production, peptones from vegetal sources seem to be more suitable, since they contain prion-free protein and are in compliance with good manufacturing practices (GMP). Tryptones with prion-free certification are also available and can be used for biopharmaceuticals production, but they are more expensive than ordinary enzymatic casein hydrolysates. As discussed below (Section 3.4), the prices of peptones may be crucial criteria in terms of medium selection.

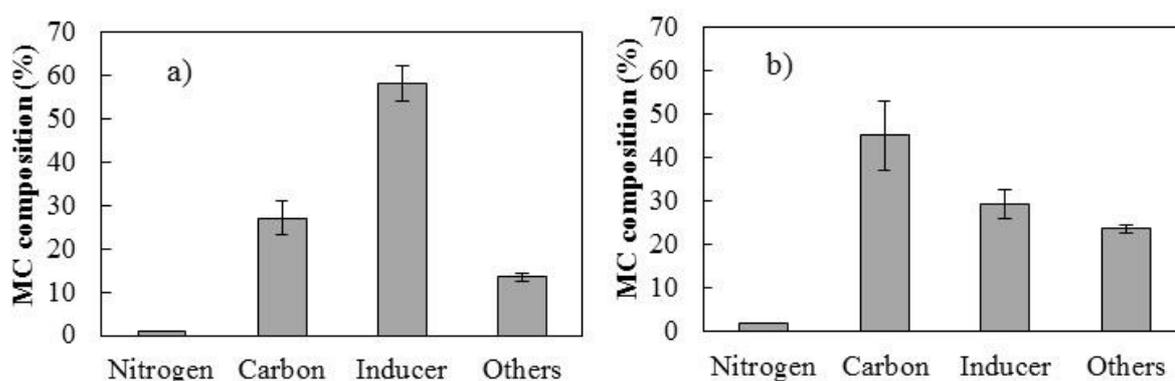
**Figure 10.** Sensitivity analyses of peptone, glycerol, IPTG and lactose prices on PspA4Pro direct cost. Survey involving certified peptones from three large market suppliers. Reference: Experiment #3 (US\$ 96.5/kg PspA).



### b) Defined medium

Concerning the cultivations carried out with defined medium (Experiments #1-5, Table 6), the choice of inducer plays an important role in determining costs (ZHANG; GREASHAM, 1999). When IPTG was used as the inducer in the cultivations, this compound presented the highest percentage of the medium cost, with a contribution 2-fold higher than that of glycerol, the sole carbon source used (Fig. 11.a). Although the amount of IPTG added to induce PspA4Pro expression was very small (1 mM), it was by far the most expensive component (Table 7). Since lactose is cheaper than IPTG, when it replaced IPTG as the inducer in the cultivations, glycerol became the most relevant medium component in terms of cost (46%), followed by lactose (30%) (Fig. 11.b). Thus, IPTG, glycerol and lactose prices may considerably affect PspA4Pro direct costs using defined medium (Figure 10.b, c and d). It is important to emphasize that defined medium formulations also comply with GMP guidelines (ZHANG; GREASHAM, 1999), even using IPTG as inducer, since the presence of this substance as a contaminant in the final product is very unlikely, due to the extensive purification steps used to obtain biopharmaceuticals (FIGUEIREDO et al., 2016).

**Fig. 11.** Defined medium costs. Batch cultivations using (a) IPTG and (b) lactose. MC: medium cost.



### 3.3. Influence of cultivation strategy on PspA4Pro quality

The quality of the protein produced is an outmost issue to be considered when choosing the cultivation strategy once the biological function of the recombinant protein could be affected by cultivation conditions (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014; ROSANO; CECCARELLI, 2014). The analysis of inclusion bodies formation (item 3.2.1.2)

showed that, independently of the cultivation strategy adopted, no PspA4Pro was aggregated and accumulated as insoluble inclusion bodies (data not shown), which indicated that in all cases PspA4Pro may be properly folded. However, PspA has no enzymatic activity and thus it is not possible to verify its biological function, i.e., lactoferrin binding capability, without previous protein purification. Similarly, the analysis of secondary structure by CD can be performed only with pure protein samples. Thus, four different cultivation conditions were selected for protein purification in order to check the influence of protein production strategy on PspA4Pro quality: Experiment #2 (defined medium and mild induction conditions), Experiment #3 (the most cost-effective cultivation strategy), Experiment #4 (defined medium and fast biomass growth), and Experiment #8, which was carried out with the cheap nitrogen source (Table 6).

The PspA4Pro purification from the biomass harvested at the selected experiments was performed following the procedures previously described (FIGUEIREDO et al., 2016) and 96-98% final purity was reached in all purification processes performed. The results of CD analysis and lactoferrin binding assay for experiments #2, #3, #4 and #8 are provided in Supplementary Material Section, while #7 is detailed in Figueiredo et al. (2016). The CD spectra demonstrated that PspA4Pro presented the expected secondary structure in all cases (different media, temperatures and protein syntheses), and they are comparable to our standard PspA4Pro as well as to literature data (HAUGHNEY et al., 2013; JEDRZEJAS et al., 2000; JEDRZEJAS; LAMANI; BECKER, 2001; LAMANI et al., 2000), with two typical valleys with minimum values at 208 and 222 nm.

PspA4Pro purified from all four experiments also showed equal ability to bind lactoferrin, with the same slope of binding dependent on PspA4Pro concentration, indicating the product of each experiment had the same quality (Figure S1). In addition, this lactoferrin binding assay also indicates that rabbit anti-PspA4Pro antibodies, which bind to the PspA4Pro attached to lactoferrin bound to the plate, recognized PspA4Pro from all experiments.

### **3.4. PspA4Pro protein and biomass production costs: points to highlight**

After performing the economic analysis of the production of PspA4Pro using *E. coli* BL21(DE3) in the bioreactor, according to the process factors analyzed in this work

the most important points to consider in selection of a cultivation strategy could be identified, as discussed below.

There is a limit value for the price of nitrogen sources that determines whether defined or auto-induction complex media should be selected for the production of the protein at low cost. In order to find this threshold value, the peptone price in Experiment #7 (Table 6) was varied so that the PspA4Pro direct cost ratio was equivalent to the best performance achieved with a defined medium (Experiment #3), considering all other raw material prices and process parameters to remain constant. The threshold price obtained was about US\$ 30/kg for ANS/VNS, which could be used to decide when to use complex or defined medium during a bioreactor batch. However, commercial peptone products with prion-free certifications are commonly sold for prices above this threshold value (Fig. 10), different from the e-commerce platform peptone prices used in the present cost estimates. Furthermore, the survey of different ANS and VNS suppliers showed that the prices can vary significantly according to the manufacturer, quality, and quantity purchased, with the minimum price of soy peptone being US\$ 45/kg (1.5-fold higher than the threshold price). Therefore, the results demonstrated that in this case, use of a defined medium was the most cost-effective option.

Efforts to provide low-cost raw materials with acceptable quality are required in order to broaden the usage of complex media in *rE. coli* cultures. The “homemade” extract of soy protein supplement for human consumption used in Experiment #8 is an example of a cheap nutrient that can lead to a competitive direct cost. It is also important to remember that for bio-based products such as industrial enzymes and chemicals, ordinary ANS/VNS can be employed in *rE. coli* cultures (FONG; WOOD, 2010), whereas certified nitrogen sources are a specific requirement for biopharmaceutical production, which can make protein production more expensive. Moreover, the quality of the nutrients used for medium formulation may differently impact a specific heterologous protein synthesis, affecting its molecular integrity and leading to inclusion body formation (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014; SILVA; QUEIROZ; DOMINGUES, 2012). As discussed at item 3.3 for the case of PspA4Pro production, quality assessment of the final product should be provided when non-conventional raw-material sources are used in order to guarantee protein function and property requirements (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

The definition of temperature to cultivate *E. coli* cells and to produce soluble recombinant proteins should be cautious. Although PspA4Pro presented the best production results at 32 °C, other heterologous proteins could probably not have the same behavior

(GELLISSEN ET AL, 2005; KAUR; KUMAR; KAUR, 2018). Metabolic burden, formation of inclusion bodies and protein quality impairment are some important factors to evaluate for each different recombinant product (ROSANO; CECCARELLI, 2014). To date, low temperature seems to favor these factors by avoiding or at least mitigating them during cultivations in *E. coli* (SONG et al., 2012; VASINA; BANEYX, 1997). However, these results did not considered cost impacts on processes. Indeed, studies with medium to large-scale bioreactor cultivations may be exhaustive and expensive not only to produce, purify and analyze recombinant products, but also they may lead to a trial-and-error activity due to several factors that may influence on this kind of production (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2014). In spite of this fact, efforts to establish a cost-effective recombinant protein production should be encouraged.

According to the findings of the present economic analysis, induction with IPTG seems to be the most cost-effective strategy for production of PspA4Pro. As discussed in Section 3.3.2.2, inducing with IPTG appears to intensify and accelerate recombinant protein production, resulting in lower process costs. It is clear that the choice of inducer (as well as the induction strategy) must be evaluated on a case by case basis, according to the characteristics of the target recombinant protein. Nonetheless, this contradicts the general opinion that induction with IPTG is not industrially viable due to its high price (DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996; FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018; GOMBERT; KILIKIAN, 1998; MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003). In fact, considering only the impact of the medium on the cost of recombinant protein or biomass production, IPTG would be the most expensive raw material. However, taking the overall approach of the present cost analysis for PspA4Pro production, IPTG would be the best choice. Furthermore, the IPTG concentration could be scaled down (EINSFELDT et al., 2011; FERREIRA; AZZONI; FREITAS, 2018; LECINA et al., 2013), hence providing further reduction of the cost of this recombinant protein production.

### **3.4 Conclusions**

The present economic analysis of PspA4Pro production in *E. coli* cultures contributes to the development of improved cultivation process strategies. The findings highlight several points important for process decision-making, exposing well-established paradigms that should be revised. Based on usual cost estimation equations for cultivation

supplies and energy consumption, combined with design correlations, the approach developed here was applied in the assessment of process economics using data from 8 different bioreactor process strategies. In the case study discussed here, the best strategy was characterized by a short induction phase, carried out at moderate temperature (32 °C) and with IPTG as inducer, in order to maintain high PspA4Pro production rates, together with lower cell metabolic stress and reduced energy consumption.

The prices of nitrogen sources used in complex media seem to be determinant for selection of the type of media, especially when it is necessary to ensure adherence to GMP standards for biopharmaceutical production as in PspA4Pro case. On the other hand, ordinary ANS/VNS, such as soy supplement, may face some constraints due to this regulatory issue, but it may be suitable for the production of bio-based enzymes and chemicals. In general, for certified commercial peptones with prices above US\$ 30/kg, use of defined medium is the most cost-effective choice. Nevertheless, the use of complex media is a promising approach for reducing the cost of PspA4Pro production. However, research efforts are required to address critical issues, such as the characterization of peptones from different sources and with different qualities and prices in terms of nutrient content and their impact on product and biomass yields. It is also necessary to ensure the commercial availability of certified peptones with more accessible prices.

Selection of the best cultivation strategy clearly depends on the target protein, host cell, and production scale, requiring analyses on a case-by-case basis. However, as long as basic information about process conditions, biomass concentration and product formation is available, the approach developed here to PspA4Pro can be easily extended to evaluation of the economics of any cultivation process to produce soluble recombinant protein, with identification of the most cost-effective strategy.

## Capítulo 4: Avaliação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi<sup>®</sup> em *shaker*

### 4.1 Introdução

Na produção de proteínas recombinantes terapêuticas em *Escherichia coli* há grande preocupação com a presença de endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS), que podem ocasionar desde leves alergias até septicemia e levar à morte de indivíduos (QIAO et al., 2019; DUEÑAS et al., 2004). Como a PspA é um componente promissor para a formulação de vacina antipneumocócica (MIYAJI et al., 2013; PERCIANI et al., 2013), é de suma importância que substâncias como os LPS não estejam presentes no produto terapêutico, o que demanda maiores esforços e cuidados na etapa de purificação da proteína recombinante produzida. Dos custos envolvidos entre produção e purificação de proteínas recombinantes, a etapa de Purificação pode responder em até cerca de 90% dos mesmos (SARASWAT, 2013). Desta forma, estudos têm sido desenvolvidos para mitigar os custos nessa etapa, focando tanto na otimização dos processos de purificação (WILDING et al., 2019; QIAO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2016) como na menor produção de tais endotoxinas (MAMAT et al., 2015; TAGUCHI et al., 2015). Neste contexto, a produção de proteínas recombinantes em organismos isentos ou com reduzida atividade endotóxica surge como uma alternativa atrativa para reduzir os custos da purificação. Alguns organismos Gram-positivos preenchem os requisitos em termos de baixa atividade endotóxica, mas ainda alcançam menores níveis de expressão de proteínas recombinantes do que com *E. coli* (TAGUCHI et al., 2015). Assim, a *E. coli* modificada geneticamente para produzir LPS isento de atividade endotóxica (ClearColi<sup>®</sup>) é uma plataforma alternativa de obtenção de proteínas recombinantes, particularmente aquelas destinadas à formulação de produtos terapêuticos, por combinar as vantagens da produção em *E. coli* (rápido crescimento, assimilação de diversos substratos, disponibilidade de vários sistemas de expressão etc.) e com a simplificação das etapas de purificação, diminuindo os custos do produto final. A ClearColi<sup>®</sup> foi lançada comercialmente em 2013 e vêm sendo empregada principalmente em estudos em *shaker* com meio complexo, conforme pode ser observado na Tabela 8. Esses estudos já mostraram que as modificações genéticas introduzidas para gerar as células ClearColi (LUCIGEN, 2016; MAMAT et al., 2015) não afetaram apenas a estrutura do LPS sintetizado, mas também sua velocidade específica de crescimento. Assim, a avaliação da produção de proteína recombinante usando

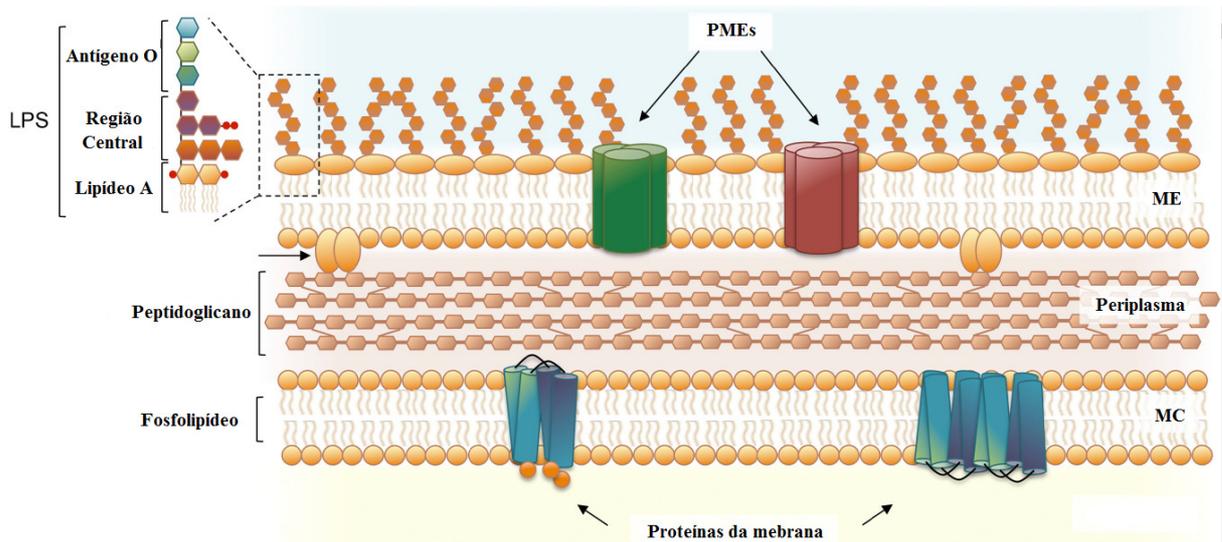
tal organismo sob diferentes estratégias de cultivo é fundamental para a identificação de seu potencial como plataforma de expressão. No presente capítulo, os efeitos da temperatura e de variações na composição do meio de cultivo complexo na produção da proteína recombinante PspA4Pro utilizando células ClearColi<sup>®</sup> foram avaliados em ensaios preliminares em *shaker*. Os resultados obtidos serão empregados para subsidiar a escolha de estratégias de cultivo de ClearColi<sup>®</sup> em biorreator, conforme será discutido no capítulo 5.

#### 4.1.1 Produção de proteínas recombinantes terapêuticas em *E. coli*: o impacto da presença do LPS

Como na maior parte das bactérias Gram-negativas, a membrana externa das células de *E. coli* contém lipolissacarídeos (LPS) (BEVERIDGE, 1999). Conforme pode ser visto na Figura 12, a estrutura da molécula de LPS é formada por três partes: o antígeno O, um polissacarídeo central e lipídeo A, que contém unidades de glicosamina com cadeias de hexa-acil e dois grupos fosfatos e é a unidade ativa responsável por causar uma resposta inflamatória em mamíferos (MALDONADO; SÁ-CORREIA; VALVANO, 2016; RAETZ; WHITFIELD, 2002). Por ser uma potente endotoxina estimuladora de resposta do sistema imunológico através da ativação dos receptores *Toll-like 4* (TLR4), pode induzir uma resposta pirogênica e até causar choque séptico (MAMAT et al, 2015), devendo ser removida de proteínas terapêuticas recombinantes produzidas em *E. coli* antes de serem administradas a pacientes humanos, para evitar graves problemas de saúde e até a morte.

A remoção de endotoxinas de produtos recombinantes gerados em organismos Gram-negativos tem sido um desafio contínuo da indústria biofarmacêutica. Como as endotoxinas são geralmente moléculas estáveis em uma ampla faixa de temperatura e pH, dificilmente elas podem ser neutralizadas sem comprometer as atividades das diferentes proteínas recombinantes que estão sendo purificadas (SARASWAT et al., 2013), tornando difícil estabelecer um método geral eficiente e econômico para a purificação dos diferentes produtos recombinantes existentes. Desta forma, o emprego de organismos que não produzam LPS endotóxicos aparece como uma promissora alternativa, para mitigar os custos com a purificação de proteínas recombinantes terapêuticas.

**Figura 12.** Organização do envelope celular de bactérias Gram-negativas. Ele é caracterizado pela presença de duas bicamadas lipídicas: a membrana externa (ME) e a membrana citoplasmática (MC), as quais são separadas pelo periplasma que é formado por enzimas hidrofílicas, proteínas ligantes, quimiorreceptores e a parede celular de peptidoglicano. A ME é uma bicamada lipídica assimétrica, contendo moléculas de LPS, que formam ligações com proteínas da membrana externa (PMEs). As camadas lipídicas internas da ME e da MC contêm fosfolipídios e proteínas da membrana.



**Fonte:** Adaptado de Maldonado, Sá-Correia e Valvano (2016)

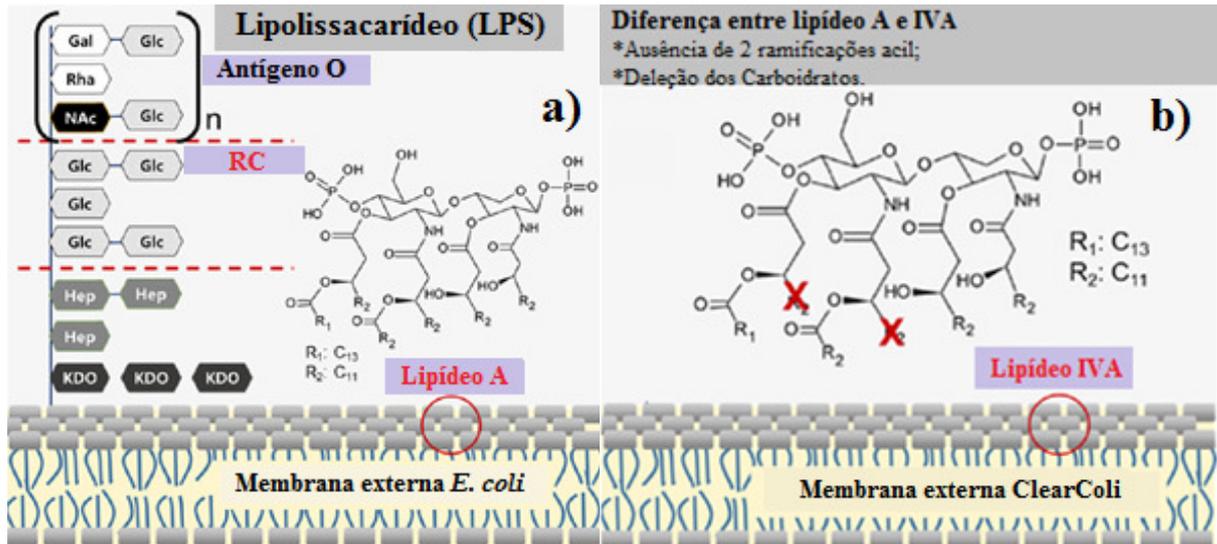
#### 4.1.2 ClearColi<sup>®</sup> como alternativa para a produção de proteínas recombinantes sem LPS

ClearColi BL21(DE3) são células de *Escherichia coli* BL21(DE3) com 7 deleções genéticas (*msbA148*,  $\Delta$ *gutQ*,  $\Delta$ *kdsD*,  $\Delta$ *lpxM*,  $\Delta$ *pagP*,  $\Delta$ *lpxP* e  $\Delta$ *eptA*) que resultaram em endotoxicidade reduzida, sendo as primeiras células competentes comercialmente disponíveis com o lipolissacarídeo IV<sub>A</sub>, um LPS modificado que não causa resposta endotóxica em células humanas (LUGIGEN, 2016). Conforme mostra a Figura 13, o IV<sub>A</sub> das células ClearColi<sup>®</sup> se diferencia pelas ausências de duas ramificações acil e de todos os carboidratos comumente ligados ao LPS das células Gram-negativas convencionais (BONG et al., 2019; PLANESSE et al., 2015).

A resposta endotóxica das células convencionais está intimamente relacionada às seis ramificações acil do LPS, que são reconhecidas pelo complexo formado entre os receptores *Toll-like 4* (TLR4) com o fator de diferenciação mioloideal (MD-2), o que causa a ativação de NF-KB e de citocinas pró-inflamatórias (LUCIGEN, 2016). Como os lipídeos IV<sub>A</sub> não induzem a formação do complexo TLR4/MD-2, após a purificação mínima das proteínas

e plasmídeos, estes poderão ser usados sem que haja resposta endotóxica, conforme foi confirmado em Planesse et al. (2015).

**Figura 13.** Estrutura da membrana externa de *E. coli*. a) estrutura do lipolissacarídeo (LPS) em células convencionais. b) estrutura do lipídeo IV<sub>A</sub> em células ClearColi<sup>®</sup>. Gal: galactose; Glc: glicose; Hep: heptose; KDO: ácido 2-ceto-3-desoxi-D-manooctônico; NAc: N-acetilcisteína; Rha: ramosse; RC: região central.



Fonte: Adaptado de Bong et al. (2019)

Em maio de 2013 a empresa Lucigen lançou comercialmente as células ClearColi<sup>®</sup>, a primeira linha de produto em que células *E. coli* foram modificadas geneticamente para serem isentas de atividade endotóxica (SCIENTIST, 2013). Desde então, há um crescimento gradual de estudos envolvendo células ClearColi<sup>®</sup>, sobretudo nos últimos dois anos (Tabela 8). Mamat et al (2015) detalharam a construção das células *E. coli* sem atividade endotóxica, mais tarde denominadas por ClearColi<sup>®</sup>. Desde então as células ClearColi<sup>®</sup> tem sido envolvidas em diferentes estudos que visam o desenvolvimento de produtos livres de endotoxinas (Tabela 8). Alguns desses estudos têm comparado cepas de *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional na produção de diferentes proteínas recombinantes, na quantificação de endotoxinas (LPS) e no desenvolvimento/otimização de métodos de purificação. Todos os trabalhos relacionados na Tabela 8 foram desenvolvidos por incubação em *shaker* de cultivos em meio líquido desenvolvidos em microtubos, tubos Falcon ou Erlenmeyers, sendo o volume de 2,0 L a maior escala de produção relatada (MAMAT et al, 2015), e quase sempre em meio complexo LB usando canamicina (30 – 50 µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL) como antibióticos. Até o momento, foi identificado que apenas em

Paredes (2018), que foi desenvolvido no DEQ/UFSCar, células ClearColi<sup>®</sup> foram cultivadas em biorreator, após a realização de estudos em *shaker*, além de ter sido o único trabalho a utilizar o meio definido e a indução por lactose junto com IPTG em cultivo com essas células na produção de proteína recombinante. Na maioria dos estudos o IPTG (1 mM) foi o indutor utilizado e adicionado quando os cultivos alcançavam um valor de DO ~ 0,6.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1. Descrição de estratégia experimental – Estudos Preliminares

Quatro Estudos Preliminares (EPs) foram realizados, todos em *shaker*, seguindo o procedimento descrito a seguir.

No Estudo Preliminar I (EP-I), um total de 10 experimentos foi realizado a 37 °C usando células de *E. coli* BL21(DE3) das linhagens ClearColi<sup>®</sup> e convencional. Além de comparar as duas cepas, esses ensaios tiveram por objetivo avaliar meios complexos de diferentes composições (Tabela 9) e indutores em termos de crescimento de biomassa e de produção de PspA4Pro.

No Estudo Preliminar II (EP-II) foi avaliada a influência da concentração inicial de glicerol no crescimento. Foram realizados cinco ensaios em *shaker*, em diferentes concentrações iniciais de glicerol (entre 0 e 60 g/L) utilizando o meio LBMS, a 37 °C. Esses experimentos foram realizados sem indução, já que o objetivo foi avaliar a influência da concentração inicial de substrato no crescimento. A faixa de concentrações do glicerol escolhidas incluiu aquelas normalmente praticadas em *shaker* e em biorreator (60 g/L) nos estudos conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa da Bioquímica no DEQ/UFSCar (CAMPANI, 2014 e 2018; HORTA, 2008 e 2011; PAREDES, 2018; SANTOS, 2012; SARGO, 2011; SILVA, 2015). Assim, enquanto no EP-I buscou-se identificar a melhor formulação de meio complexo e o melhor indutor para os futuros cultivos em biorreator, no EP-II procurou-se determinar a máxima concentração inicial de glicerol que pode ser utilizada sem causar inibição por substrato.

**Tabela 8.** Estudos envolvendo ClearColi<sup>®</sup> BL21(DE3)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
1	<i>Escherichia coli</i> detoxificada para a produção de proteínas recombinantes livres de endotoxinas.	Proteína apolipoproteína-A-1 (ApoA-1) e proteína de choque térmico 70 (Hsp70), após 3 h de indução.	2,00	LB + D-arabinose-5-fosfato (15 µM) + D-glicose-6-fosfato (10 µM) + ampicilina (100 µg/ml), carbenicilina (200 µg/ml), canamicina (30 µg/ml) ou cloranfenicol (30 µg/ml)	IPTG 0,40 mM (0,6<DO<0,7)	*Primeira metodologia de pós-expressão descrita que pode remover inteiramente a endotoxina; *O ensaio de lisado de amebócito <i>Limulus</i> (LAL) não é apropriado para discriminar entre o LPS hexacilado endotóxicamente ativo e o lipídeo IV <sub>A</sub> tetracilado inativo; *Amostras de ApoA-1 e Hsp70 derivadas das cepas livres de endotoxina não causaram uma resposta endotóxica em células <i>HEK-Blue hTLR4</i> .	A inativação do lipídeo regulado IV <sub>A</sub> foi crucial para obter cepas de <i>E. coli</i> K12 e BL21 livres da produção de endotoxina.	MAMAT et al (2015)
2	HSP60 humana recombinante produzida em ClearColi BL21(DE3) não ativa a via do NFκB.	Proteína de choque térmico 60 (HSP60), após 3 h de indução.	1,00	2-YT + ampicilina	IPTG 1,00 mM (0,6<DO<0,7)	*HSP60 necessita do lipolissacarídeos (LPS) para a tradução da via NFκB.	Sugere que o efeito inflamatório previamente creditado ao HSP60 é devido a outros contaminantes da bactéria como o LPS.	PLANESSE et al (2015)
3	Clonagem, expressão e caracterização de <i>pseudomonas vesicularis</i> MA103 β-1,3-xylanase em <i>Escherichia coli</i> ClearColi BL21(DE3).	β-1,3-xilanase, após 24 h de indução.	1,00	LB + canamicina (30 µg/ml)	IPTG 0,0125 mM (0,6<DO<0,7)	*Caracterização da produção de β-1,3-xilanase em ClearColi.	Os resultados experimentais sugerem uma maneira eficiente de obter β-1,3-xilanase com grande potencial de aplicação na indústria.	LIANG et al (2015)
4	Melhoramento da expressão e purificação do fator de células-tronco humanas recombinantes em <i>Escherichia coli</i> detoxificada pela movimentação do dissulfeto pelo persulfeto.	Fator de célula-tronco humana (rhSCF), após 4 h de indução.	0,01	LB + 2% glicose + ampicilina (100 µg/ml)	IPTG 1,00 mM (0,6<DO<0,7)	*O nível de expressão em ClearColi foi substancialmente inferior ao produzido em células BL21(DE3) convencionais em LB; *A adição do par persulfídico melhorou a solubilidade e o nível de expressão da proteína; *A remoção do endotoxina é crucial para atingir a purificação do rhSCF.	A nova estratégia de expressão e purificação proveu um método eficiente e rápido de produção de rhSCF livre de endotoxina com persulfetos e chaperonas, podendo ser aplicada para outros fatores de crescimento e citocinas contendo cadeias de dissulfetos, que são importantes na pesquisa médica e industrial.	UEDA et al (2016)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
5	Célula T protetora e respostas imunológicas dos anticorpos contra o vírus <i>Hepatitis C</i> alcançada pelo uso de um sistema de entrega de vacina baseado em esfera de biopoliéster.	Esferas de polihidroxitirato com o principal antígeno de superfície do vírus <i>Hepatitis C</i> (HCV)	-	-	-	*ClearColi usada para produzir biopoliéster em grau de alimento, para ser usado em vacina contra o vírus da hepatite.	As vacinas baseadas em biopoliésteres obtidos em cepas de ClearColi demonstraram uma resposta imune para HCV.	MARTÍNEZ-DONATO et al (2016)
6	Partículas similares às dos vírus <i>Physalis mottle</i> como nanocarreadores para reagentes e drogas.	Subunidade proteicas formadoras de partículas similares às do vírus <i>Physalis mottle</i> (VLP de PhMV), após indução <i>overnight</i>	0,50	LB + ampicilina (100 µg/ml)	IPTG 0,50 mM (0,6<DO<0,7)	*Produção de 45 mgVLP/L; *VLPs internamente rotuladas em resíduos de cisteína demonstraram alta eficiência para várias linhas de célula cancerígenas.	VLPs de PhMV provêm uma nova plataforma tecnológica para a entrega de reagentes e drogas com preferencial captação por células cancerígenas. Essas partículas poderiam ser desenvolvidas como ferramentas multifuncionais para diagnóstico e terapia de câncer.	MASARAPU et al (2017)
7	Exibição automática de proteínas La/SSB em <i>E. coli</i> livres de LPS para o diagnóstico da síndrome de Sjögren.	Proteína biomarcadora da síndrome de Sjögren (La/SSB), após indução (1, 4 e 16 h).	0,10	LB + canamicina (50 µg/ml)	IPTG 1,00 mM (0,1<DO<0,6)	*Os níveis de resposta ao ensaio do lisado de amebócito de <i>Límulus</i> das proteínas expressas em ClearColi foram reduzidas em mais de 95% àqueles vistos em células convencionais; *Anticorpos do soro do sangue humano causaram menos ligações não-específicas na membrana de células ClearColi do que em células convencionais; *A intensidade das bandas da proteína La/SSB para ClearColi gradualmente aumentou ao longo do período de indução, enquanto que, para <i>E. coli</i> convencional, a máxima intensidade foi observada após 1 h de indução.	Um biomarcador da síndrome de Sjögren (proteína La/SSB) foi autoexibido com sucesso em células de <i>E. coli</i> convencionais e ClearColi, para a detecção de anticorpos em amostras do soro sanguíneo de pacientes, sendo estatisticamente equivalentes aos imunoenaios clínicos para a detecção de anticorpos anti-La/SSB.	YOO et al (2017)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
8	A expressão dos antígenos do vírus Zika em ClearColi BL21(DE3) ilustra um método rápido de produção de antibióticos contra patógenos emergentes.	Antígeno do vírus da Zika (ZIKV), após 4 h de indução.	0,20	LB	IPTG 1,00 mM	*Antígenos ZIKV foram expressos como corpos de inclusão em células <i>E. coli</i> entre 12 e 20 kDa; *O lisado de células pode ser diretamente inoculado em animais. O ensaio <i>Raw-Blue cell</i> demonstrou segurança do uso do extrato da ClearColi da ordem de 100 vezes menor que com célula convencional.	A injeção de todo o extrato celular de ClearColi BL21(DE3) contendo os antígenos do vírus ZIKV tornou possível a produção de anticorpos específicos em animais imunizados.	VIRANAICKEN et al (2017)
9	Particulado automontado de adenosina A de superfície do pneumococo (PsaA) como uma vacina contra infecção por <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	Proteína de superfície antigênica A do pneumococo (PsaA) recombinante e a produção de esferas de polihidroxibutirato (PHB)	-	LB + 1% glicose + ampicilina (100 µg/ml) (para PsaA) ou cloranfenicol (50 µg/ml) (para PHB)	-	*PHB e a proteína recombinante solúvel PsaA foram produzidas em ClearColi;	PsaA administrada com esferas de PHB (insolúveis) promoveram uma maior concentração de IG2 em ratos, enquanto IG1 apresentou resultados semelhantes quando solúvel, sendo as esferas de PHB convenientes como carregadores de PsaA, para induzir uma resposta imune do Th tipo 2 significativa e específica .	GONZÁLEZ-MIRO et al (2017)
10	Falta atividade modulatória imune na proteína do choque térmico 70 do <i>Plasmodium falciparum</i> .	Proteína de choque térmico 70 do <i>Plasmodium falciparum</i>	0,50	MT	IPTG 1,00 mM	* <i>E. coli</i> ClearColi e <i>B. choshinensis</i> demonstraram ser sistemas de expressão apropriados para a produção de proteínas recombinantes isentas de lipolissacarídeos (LPS) e sem atividade imunomodulatória.	PfHsp70 não possui função imunomodulatória, estando a produção desta proteína recombinante isenta de LPS, quando produzidas em <i>E. coli</i> ClearColi e <i>B. choshinensis</i> .	POOE et al (2017)
11	Flagelina de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (ETEC) inibi a ativação do NF-κB induzido pelo TNF nas células epitéllicas do intestino.	Flagelina (Flic) de <i>E. coli</i> enterotoxigênica, após 5 h de indução.	0,20	LB	IPTG 1,00 mM	*Mapeamento do domínio do FliC; *ETEC H10407 secreta seu fator em meio mínimo M9; *FliC bloqueou a degradação do inibidor do fator nuclear de perturbação (NF-κB)	Os dados sugerem um potencial novo mecanismo pelo qual ETEC pode invadir a resposta imune inata do hospedeiro pela dependente baixa regulação do NF-κB.	WANG et al (2017)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
12	Caracterização biofísica e bioquímica da proteína 1 do tipo citocina (CYTL1).	Proteína 1 do tipo citocina (CYTL1), após 16 h de indução.	1,00	LB + canamicina (30 µg/ml)	IPTG 0,50 mM (DO~0,6)	*A proteína CYTL1 foi expressa em duas diferentes cepas de bactéria, com rendimentos maiores aos previamente descritos para sistemas de expressão de células de mamíferos; *Os rendimentos para 1 L de cultivo com células ClearColi foram ~ 0,4 mg CYTL1 após a cromatografia de afinidade His-tag e ~ 0,08 mg após a cromatografia de troca iônica; *CYTL1 tem uma estrutura secundária similar às das quimiocinas.	Os valores das propriedades avaliadas suportam que CYTL1 se sobrepõem com as quimiocinas.	TOMCZAK et al (2017)
13	Vesículas recombinantes seguras da membrana externa que exibem e elucidam proteção contra influenza heteróloga.	Citolisina A (ClyA) com antígeno do ectodomínio da proteína da matriz 2 (M2e4xHet) do vírus da gripe A, após 18 h de indução.	-	LB + canamicina (50 mg/mL)	L-arabinose 2,0% DO~0,55	*As vesículas recombinantes da membrana externa (rOMVs) derivada da cepa ClearColi substancialmente atenuou a pirogenicidade e ainda reteve altos níveis de imunogenicidade em comparação à cepa convencional; * rOMVs de ClearColi expressam o antígeno influenza A M2e4xHet em altas concentrações sem efeitos colaterais em ratos; *rOMVs de ClearColi M2e4xHet protegem ratos contra a infecção por influenza e reduziu a carga viral nos pulmões deles.	As vesículas recombinantes da membrana externa reportada neste trabalho representam ser simples e potencialmente plataformas seguras de entrega de subunidades vacinais.	WATKINS et al (2017a)
14	Vacina de dose única e longa duração contra influenza pela liberação controlada de heteroespécies da sequência da matriz 2 (M2) do vírus embebidas com vesículas da membrana externa bacteriana detoxificada.	Citolisina A (ClyA) com antígeno do ectodomínio da proteína da matriz 2 (M2e4xHet) do vírus da gripe A, após 18 h de indução.	-	TB + canamicina (50 mg/mL)	L-arabinose 0,2% DO~0,55	*As vesículas recombinantes da membrana externa (rOMVs) liberaram as micropartículas de poliácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) no decorrer de semanas e permitiram uma robusta resposta humoral e proteção de ratos por 6 meses.	Os dados suportam o potencial da liberação controlada de rOMVs como uma vacina de dose única rapidamente efetiva e de longa duração para proteção contra influenza.	WATKINS et al (2017b)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
15	Purificação livre de endotoxinas da proteína recombinante da membrana estrutural expressa em <i>Escherichia coli</i> .	Proteína estrutural de membrana (PEM), após 4 h de indução.	1,80	LB	IPTG 1,00 mM (0,5<DO<0,8)	*PEMs expressas em <i>E. coli</i> convencional e ClearColi mostraram quase as mesmas purezas ao seguir o mesmo procedimento de purificação; *Após Q-Sepharose um sétimo das endotoxinas originais com ClearColi foram mantidas. Um quinto para células convencionais; *A desnaturação da MSP com ureia 2 M enfraqueceu as interações das endotoxinas com PEM; passando em Q-sepharose houve a redução de 80 vezes no nível de endotoxinas específica usando <i>E. coli</i> convencional em relação à abordagem convencional. *O LPS modificado em ClearColi pode ainda agir como um ativador endotóxico em células hospedeiras de outros mamíferos, exceto humanas.	A metodologia de purificação do PEM desenvolvida é aplicável a animais.	MOON et al (2018)
16	<i>Escherichia coli</i> detoxificada como plataforma para produção de proteína recombinante A de superfície de pneumococo	Proteína de superfície do pneumococoA (PspA). Em <i>shaker</i> , após 4 h de indução com IPTG e após 8 h de indução com lactose (LAC). Em biorreator, após 6 horas de indução (lactose + IPTG)	0,07 ( <i>shaker</i> )  e  3,50 (reator)	Definido	Shaker IPTG 0,50-1,00 mM ou LAC 2,50-5,00 g/L (DO~2,0)  Reator IPTG 0,50 mM + LAC 10,0 g/L (DO~20,0)	*a velocidade específica máxima de crescimento da ClearColi foi cerca de 25 % menor do que a observada para a <i>E. coli</i> convencional; *A maior produção específica de PspA foi alcançada na temperatura de 32 °C com a mistura de IPTG e lactose, como indutores: 165 ± 3 (ClearColi) e 221 ± 13 mg/gMS (convencional); *A produção de proteínas contaminantes não foi influenciada por nenhuma das condições avaliadas para ClearColi, enquanto que para a cepa convencional, ela foi menor a 32 °C;	As produtividades alcançadas com a ClearColi são cerca de 64% inferiores às obtidas com as células de <i>E. coli</i> convencionais devido ao maior tempo requerido para o cultivo com ClearColi, mas a linhagem detoxificada apresentou como vantagem altos valores de produção específica de PspA e uma baixa produção de proteínas contaminantes. Além disso, foi demonstrado que a produção de PspA com a cepa detoxificada é possível em maior escalal, sendo uma alternativa para a produção de proteínas terapêuticas.	PAREDES (2018)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
17	Síntese de proteína livre de célula (SPLC) baseada em células <i>E. coli</i> não-endotóxica: abordagem da remoção de endotoxidade na pré-expressão para a produção de terapêutico sob demanda de combate ao câncer.	Terapêutico de combate ao câncer, Crisantapastase (CSTP), e produção de proteína fluorescente verde (PFV).	0,02	LB, TB ou 2-YT	IPTG 1,00 mM (0,4<DO<0,7)	*Tem valores comparáveis de crescimento ClearColi (DO600) e de produção de proteína: DO~2,0 em 4 h a 37°C (0,72±0,12 h <sup>-1</sup> ); Produção de PFV~0,9 g/L; Produção de CSTP ~1,1 g/L em 8 h de incubação a 30°C; Produção de CSTP ~0,7 g/L em 3 h de incubação a 37°C; *O extrato de ClearColi permitiu alto rendimento e uma inerente síntese de proteínas livre de endotoxina; *O meio TB levou a taxas de crescimento mais rápidas e a maior densidade celular, enquanto o aumento da concentração de NaCl de 5 g/L para 10 não as melhorou.	A presença de endotoxina é uma limitação do SPLC usando células <i>E. coli</i> BL21 padrão; ClearColi usando a abordagem SPLC promoveu um extrato ativo livre de endotoxinas e produziu a proteína terapêutica crisantapastase em concentração significativa, permitindo a rápida produção da proteína sob demanda sem uma complexa purificação.	WILDING et al (2018)
18	Caspase-4 desagrega as micelas do lipolissacarídeo via a interação LPS-CARD.	Caspase-4 monomérica e o seu domínio (CARD), após indução por 16 ou 18 h.	1,00	LB + canamicina (50 mg/mL)	IPTG 0,20 mM DO~0,6	*A expressão da caspase-4 em ClearColi foi muito maior que em <i>E. coli</i> C41DE3 nas mesmas condições; *O CARD foi bem expresso em ClearColi; *Tween 20 não permite a formação do complexo IVA-caspase-4.	O estudo fixou base para a interação de LPS com caspase-4 pelo estabelecimento de um método fácil de purificação para obter grandes quantidades da proteína e do domínio CARD purificados.	AN et al (2019)
19	Produção em etapa única de proteína-ligantes ao lipolissacarídeo (LPS) bioativa a partir do LPS eliminado por <i>E. coli</i> .	Proteína-ligantes aos Lipopolissacarídeos (LPB), após 16 h.	0,40	LB + canamicina (50 mg/mL)	IPTG 1,00 mM DO~0,8	*Produziram LPB com pureza 90% e rendimento de 4 mg/L em LB; *Atividade confirmada por espectroscopia de fluorescência e calorimetria de titulação isotérmica.	Foi desenvolvido um método válido para produzir LPB humana em <i>E. coli</i> a custo competitivo, existindo grande potencial de produzir outras proteínas livres de LPS em alta-escala e baixos custos.	QIAO et al (2019)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
20	Hemolisina A de estafilococo não induz danos celulares em células-tronco de camundongos, mas aumenta a desgranulação induzida pela reticulação FcεRI e ionomicina.	Hemolisina A do estafilococo (Hla)	-	-	IPTG 1,00 mM	*A ligação do Hla à superfície do mastócitos da medula óssea (MMOs) formou oligômeros estáveis com o SDS; *Sozinho o Hla não induz citotoxicidade nem libera enzima granular (b-hexosaminidase). *Hla mais que dobrou as liberações de b-hexosaminidase dos MMOs induzidos pela reticulação de FcεRI ou tratamento com ionomicina.	Foi demonstrado que Hla é capaz de realçar a desgranulação de mastócitos induzidas pela reticulação de FcεRI e ionomicina, embora sozinho o Hla não induza a desgranulação, enquanto que a formação de poros de Hla seguida pelo efluxo de potássio está envolvida nesse aumento.	HAYASHI et al (2019)
21	Imunoensaio de fluorescência de <i>E. coli</i> usando anticorpos anti-lipolissacarídeos (anti-LPS) isolados de soro sanguíneo humano.	Proteína verde fluorescente (PVF), após 16 h de indução.	0,01	LB + EDTA (10 μM) + cloranfenicol (15 μg/mL)	-	*A proteína dissociada a partir de <i>E. coli</i> BL21(DE3) convencional em duas etapas do protocolo de separação foram adicionadas para células ClearColi, onde naquelas proteínas com afinidade aos componentes da membrana externa de <i>E. coli</i> BL21(DE3) convencional se ligou à membrana externa de ClearColi.	Os anticorpos anti-LPS podem ser efetivamente usados para detecção de <i>E. coli</i> BL21(DE3) (e outras bactérias com LPS) após a imobilização em eletrodo de ouro.	BONG et al (2019)
22	Síntese de proteína livre de células (SPLC) realçada por lioprotetor termoestável sob demanda para produção de terapêuticos livres de endotoxinas.	Terapêutico de combate a câncer Crisantapastase (CSTP) e produção de proteína fluorescente verde (PFV).	-	Meio complexo (baseado em Wilding et al 2018)	IPTG 1,00 mM DO~0,1 or DO~0,4	*Antiplastificação melhorou a estabilidade e o armazenamento de extratos liofilizados a altas temperaturas; *Todo sistema SPLC liofilizado reteve maior atividade em condições ambientes de temperatura; *Amostras protegidas por Dextran superaram o padrão CFRxlyo sob armazenagem a 25 °C e a 37 °C; *Vários sistemas de síntese de proteína livres de células liofilizados são demonstrados, mostrando melhorias significativas sobre os sistemas convencionais.	Foi demonstrado pela primeira vez que a preservação e expressão de terapêuticos, especificamente da crisantapase aprovada pelo FDA, a partir de um sistema de síntese de proteína livre de células, de endotoxinas e liofilizado em um pote único, exemplificando o potencial para a síntese de proteína terapêutica no local.	WILDING et al (2019)

#	Título	Produção	Volume (L)	Meio de ensaio	Indutor	Principais Resultados	Conclusão	Referência
23	Uma vacina baseada em peptídeos para <i>Mycobacterium avium</i> subespécie de paratuberculose	Peptídeo da membrana de <i>Mycobacterium</i> (PMM), após 3 h de indução.	1,00	2-YT + ampicilina	IPTG 1,00 mM (0,6<DO<0,7)	*A PMM inteira foi expressa em ClearColi BL21(DE3) com a proteína de ligação à maltose; *Incorporação de MMP em nanopartícula vetora a eliminação de bactérias intracelulares.	Há uma indicação que a incorporação de PMM na nanopartícula vetora é uma das possíveis vias para desenvolver uma vacina para a doença de Johne.	ABDELLRAZEQ et al. (2019)
24	Superantígeno tipo 12 de estafilococo ativa células da medula óssea murina derivadas de mastócitos	Superantígeno de estafilococo (STE) tipo 12.	0,03	LB + canamicina (30 µg/ml)	IPTG 1,00 mM (0,6<DO<0,7)	*STE12 pode induzir a síntese de citocinas; *STE12 pode ser responsável por inflamações locais <i>in vivo</i> .	Há uma indicação de nova ativação dos mastócitos por STEs e o STE12 é provavelmente um importante fator tanto na fase de início como de efeito das respostas imune e alérgica.	KOBAYASHI et al. (2019)
25	Nanopartículas de polihidroxialcanoato funcionais como biocatalisadores estáveis para uma produção menos custosa do açúcar raro D-Alulose.	Esferas de polihidroxialcanoatos (PHA) e da proteína D-tagarose-3-epimerase (DTE), após 60 h de indução a 28 °C.	0,20	Mineral + 2% glicose + 1% NaCl + estreptomicina (100 µg/ml)	IPTG 1,00 mM (0,6<DO<0,8)	*A produção específica de PHA por massa celular em ClearColi foi praticamente a mesma do que em células <i>E. coli</i> BL21(DE3) convencionais; *O DTE imobilizado exibiu uma destacada atividade enzimática por esfera, juntamente com grande estabilidade em condições severas de trabalho (pH 7,0 – 8,0, 65 °C).	As nanoesferas de DTE-PHA são promissoras e robustos biocatalisadores que simplificam os procedimentos de produção de D-Alulose, contribuindo para uma produção menos custosa.	RAN et al. (2019)
26	Exibição superficial da sialiltransferase na membrana externa de <i>Escherichia coli</i> e ClearColi	$\alpha$ 2,3 - Sialiltransferase de <i>Pasteurella multocida</i> (PmST1), após 16 h de indução a 20 °C	0,30	LB + 1% glicose + $\beta$ -mercapto + cloranfenicol (100 µg/ml)	IPTG 0,10 mM (DO~0,6)	*Para indução inferior a 6 h de duração, o nível de expressão de PmST1 na membrana externa de ClearColi foi maior que em cepas convencionais <i>E. coli</i> (BL21). Após 6 h de indução, ambas as cepas apresentaram os mesmos resultados; *A atividade enzimática de PmST1 de ClearColi foi 3,4 vezes superior a da cepa convencional.	Diferenças nas atividades enzimáticas podem ser atribuídas à interferência do LPS no transporte mássico dos doadores e aceptores de PmST1 pelo grupo de transferência sialil.	SONG et al. (2019)

LB: Luria-Bertani-Miller; MT: Meat broth; TB: Terrific broth; YT: yeast extract-tryptone

O Estudo Preliminar III (EP-III) foi dedicado à avaliação da influência da temperatura no crescimento e na produção de PspA4Pro em cultivos em *shaker* utilizando a cepa ClearColi<sup>®</sup> e os mesmos meios complexos de diferentes composições do EP-I. Assim, enquanto o EP-I foi realizado a 37 °C, no EP-III os resultados foram complementados com cultivos às temperaturas de 27 e 32 °C. Experimentos em replicata foram ainda realizados a 32 °C para avaliar a reprodutibilidade dos estudos.

Finalmente, no Estudo Preliminar IV (EP-IV) foi investigada a influência da concentração de IPTG na produção de PspA4Pro. Esses estudos explorando a redução da concentração do IPTG (*scale-down*) visaram identificar o valor mínimo da razão (concentração IPTG/concentração celular) e minimizar o consumo de IPTG, o que pode contribuir para a redução de custos por se tratar de um insumo caro (EINSFELDT *et al.*, 2011).

#### 4.2.2. Procedimento experimental

Após a inserção do plasmídeo pET37b(+)/*pspA4Pro* nas células eletrocompetentes de ClearColi<sup>®</sup>, foi realizada a devida multiplicação e armazenamento das células em criotubos seguindo as orientações do fabricante (LUCIGEN, 2016). O procedimento de clonagem está detalhadamente descrito em Paredes (2018). Em todos os EPs, os ensaios foram iniciados a partir de uma colônia isolada cultivada em meio sólido LB-Miller-Ágar-Canamicina e transferida para um Erlenmeyer de 500 mL com 50 mL de meio LB-Miller líquido com 50 mg/L de canamicina com o acréscimo 5 g/L de glicerol e incubado *overnight* a 30 °C e 250 rpm. No decorrer da fase de crescimento exponencial em DO~2,0, foi transferida uma quantidade do inóculo suficiente para obter uma suspensão com DO inicial de 0,1. Cada ensaio foi realizado em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 50 mL de meio, 50 mg/L de canamicina e 45 mg/L de tiamina e incubado na temperatura desejada a 350 rpm.

No EP-I, foram avaliados os seguintes meios complexos: o LB-Miller (LB); uma primeira variação do LB-Miller chamada aqui de LB-Miller-Modificado (LBM), já que neste caso a triptona da formulação original foi substituída por uma peptona de soja HY-SOY<sup>®</sup> (KERRY); o meio de autoindução com lactose ZYM-5052 de Studier (2005) usando a peptona de soja como fonte de nitrogênio, identificado como “Auto”; e, por fim, uma variação do meio LBM, na qual foram adicionados os sais presentes no meio de autoindução já citado, identificando esse meio por LBMS. A composição dos meios utilizados está descrita na

Tabela 9. Como indutores da produção de PspA4Pro foram utilizados a lactose (LAC) e isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Com exceção do meio de autoindução que já contém o indutor desde o início (lactose), a indução foi feita por meio de pulso para obter concentração desejada de IPTG (1,0 mM) ou de lactose (5,0 g/L) nos cultivos. Na notação adotada neste trabalho, as siglas dos meios acompanhadas das siglas de um dado indutor representam a indução daquele meio de cultivo por um pulso do referido indutor na fase exponencial de crescimento do ensaio (DO~2,0), sendo a ausência do indutor destacada pela presença do zero após sigla do meio (LBMS-0). Com exceção dos ensaios em meio LB-IPTG e LBM-IPTG, em todos os meios foi adicionado 20 g/L de glicerol como fonte de carbono. Amostras de biomassa para verificar a produção da proteína PspA4Pro em cada ensaio foram coletadas de acordo com a programação apresentada na Tabela 10.

**Tabela 9.** Composição inicial dos diferentes meios complexos avaliados.

Substância	Unidade	AUTO	LBMS	LB	LBM
Glicerol	g/L	20,0	20,0	-	-
Glicose	g/L	0,5	-	-	-
Triptona	g/L	-	-	10,0	-
Peptona de Soja	g/L	10,0	10,0	-	10,0
Extrato de Levedura	g/L	5,0	5,0	5,0	5,0
NaCl	g/L	-	-	10,0	10,0
MgSO <sub>4</sub>	g/L	0,5	0,5	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	3,4	3,4	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	g/L	2,7	2,7	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	g/L	9,0	9,0	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L	0,7	0,7	-	-
Fe(III)citrato	mg/L	100,8	100,8	-	-
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	mg/L	2,5	2,5	-	-
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	mg/L	15,0	15,0	-	-
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	1,5	1,5	-	-
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/L	3,0	3,0	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	2,1	2,1	-	-
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	mg/L	33,8	33,8	-	-
EDTA	mg/L	14,1	14,1	-	-
Lactose	g/L	5,0	-	-	-
Canamicina	mg/L	50,0	50,0	50,0	50,0
Tiamina	mg/L	45,0	45,0	45,0	45,0

Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB-Miller Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS).

**Tabela 10.** Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 37 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.

Ensaio	Tempo de amostragem				
	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h
LB-IPTG	X	X	X		
LBM-IPTG	X	X	X		
LBMS-0	X		X	X	
LBMS-IPTG	X	X	X		
LBMS-LAC	X		X	X	
Auto			X	X	X

**Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG e lactose (LAC). **Sem indução:** 0.

Os experimentos do Estudo Preliminar II (EP-II) foram realizados com o meio LBMS na composição descrita na Tabela 9, exceto pela concentração de glicerol, que variou entre 0 e 60 g/L. O procedimento experimental e as demais condições de cultivo foram idênticas às descritas para o EP-I.

Todos os ensaios do Estudo Preliminar III (EP-III) foram realizados de acordo com o procedimento experimental já descrito para a temperatura mais alta. Os seguintes meios de cultivo foram avaliados: LB-IPTG, LBMS-0, LBMS-IPTG e LBMS-LAC. A programação da amostragem para quantificação da produção da proteína recombinante é apresentada na Tabela 11 para os experimentos conduzidos a 27 °C. Como pode ser observado nessa tabela, em comparação com a Tabela 10, as amostragens foram feitas em um intervalo mais longo, com o dobro de tempo de ensaio, devido às velocidades de crescimento das células e de produção de proteína serem mais lentas em temperaturas mais baixas (LEE, 1996). A indução também foi realizada com a adição de pulso de IPTG 1,0 mM e de lactose (LAC) 5,0 g/L para os experimentos a 27 °C e 32 °C. Para os experimentos em replicata, a 32 °C, foi utilizada metade das concentrações (IPTG 0,5 mM e lactose 2,5 g/L) e os meios LBMS, LBM e Auto foram avaliados. Para os experimentos a 32 °C, as amostragens para avaliar a produção de PspA4Pro foram feitas conforme o plano apresentado na Tabela 12. Nessa condição de temperatura, optou-se por coletar as amostras para análise de proteínas em 4, 8 e 12 horas depois que a DO~2,0 foi atingida em cada ensaio.

**Tabela 11.** Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 27 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.

Ensaio	Tempo de amostragem			
	0 h	4 h	8 h	16 h
LB-IPTG	X	X	X	
LBMS-0	X		X	X
LBMS-IPTG	X	X	X	
LBMS-LAC	X		X	X

**Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG e lactose (LAC). **Sem indução:** 0.

**Tabela 12.** Momento de coleta de amostras de biomassa para a análise de PspA4Pro a 32 °C após densidade óptica próxima de 2,0 (0 h) foi atingida nos ensaios.

Ensaio	Tempos de amostragem				
	3 h	4 h	6 h	8 h	12 h
LBM-IPTG		X		X	X
Auto		X		X	X
LBMS-0	X*	X	X*	X	X
LBMS-IPTG	X*	X	X*	X	X
LBMS-LAC		X		X	X

**Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG e lactose (LAC). **Sem indução:** 0. \*Ensaio EP-IV (item 4.3.5)

No Estudo Preliminar IV (EP-IV), os experimentos foram realizados usando o meio LBMS na temperatura intermediária de 32 °C usando IPTG em uma faixa de concentração entre zero e 1 mM. As amostragens foram em 3 e 6 horas da início da indução (Tabela 12). O procedimento experimental foi o mesmo descrito para os EPs anteriores. A escolha do meio e da temperatura para esse estudo teve como base a análise dos resultados obtidos nos EPs anteriores e também o fato constatado por Campani et al. (2017) e Paredes (2018) quanto ao uso da temperatura intermediária (32 °C) favorecer maior produtividade em proteína.

#### 4.2.3. Metodologia analítica

A quantificação da produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes foi feita pela método de densitometria de banda (PAREDES, 2018), conforme descrito em 2.2.2.4 Neste trabalho se entende por proteínas contaminantes todas as proteínas solúveis produzidas pelas células de *E. coli* BL21(DE3) identificadas no gel de eletroforese, com exceção da

PspA4Pro. Apesar de ser inevitável a formação desse material durante a produção da proteína recombinante alvo, é importante o acompanhamento da sua formação, uma vez que poderá acarretar impactos na etapa de purificação do material.

### 4.3. Resultados e discussão

#### 4.3.1 Estudo Preliminar I – Composição Meio Complexo e Indutores

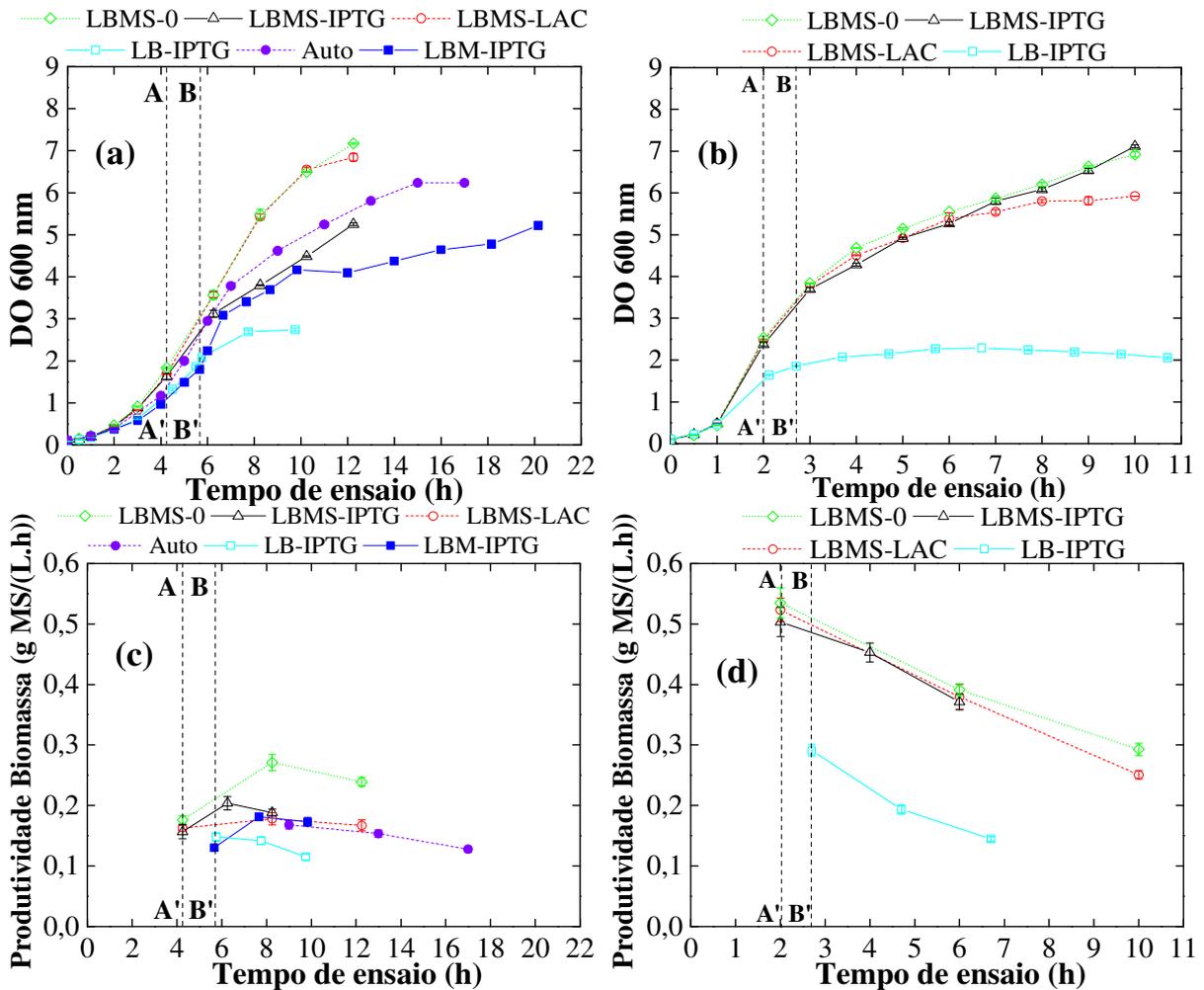
No Estudo Preliminar I, o crescimento das células ClearColi<sup>®</sup> e a produção de PspA foram avaliadas em diferentes formulações de meios complexos (meio de autoindução com lactose, presença de sais e substituição da triptona por peptona de soja no meio LB-Miller), com IPTG e lactose como indutores. Cultivos com *E. coli* BL21(DE3) convencional também em meio complexo foram realizados para comparação. Os principais resultados obtidos são apresentados a seguir.

##### 4.3.1.1 Formação de Biomassa

Os dados que representam o crescimento da biomassa e respectivas produtividades em ClearColi<sup>®</sup> e em células convencionais ao longo dos ensaios a 37 °C com diferentes meios complexos podem ser observados na Figura 14.

Devido à menor velocidade máxima de crescimento das células ClearColi<sup>®</sup> para uma mesma condição estudada (Tabela 13), todos os ensaios com estas células foram mais longos (Figura 14.a e b), de forma que a coleta de biomassa para análise de proteína fosse realizada conforme previsto (Tabela 10). Isto já era esperado, já que o próprio fabricante informa que a velocidade de crescimento dessas células é cerca de 50% menor que as células convencionais (LUCIGEN, 2016). A Tabela 13 mostra ainda que o meio LBMS, se destacou em relação aos demais por promover crescimento mais rápido para ambas cepas de células estudadas provavelmente pela presença do glicerol, que como fonte de carbono parece favorecer o crescimento celular por mitigar a formação de acetato nos cultivos com *E. coli* BL21(DE3) recombinante (SARGO, 2011).

**Figura 14.** Crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Crescimento (DO 600 nm):** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. **Produtividade de biomassa:** (c) ClearColi<sup>®</sup>; (d) células convencionais. \***Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



**Tabela 13.** Velocidades máximas de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em *shaker* a 37 °C em diferentes meios complexos.

Meio	ClearColi <sup>®</sup>	Convencional
LB	0,592 ± 0,023	1,278 ± 0,065
LBM	0,569 ± 0,038	- - -
LBMS	0,781 ± 0,007	1,554 ± 0,017
Auto	0,585 ± 0,013	0,819 ± 0,052

**Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS).

Nos ensaios LBMS-0 e LBMS-LAC as DOs atingidas foram próximas ou até superiores às observadas com as células convencionais, em torno de 7,0, sendo esses valores de DO os maiores observados com ClearColi<sup>®</sup> no Estudo Preliminar I. De forma menos pronunciada, as células ClearColi<sup>®</sup> também alcançaram uma DO um pouco superior que as células convencionais em meio LB. Esses resultados sugerem que, nos cultivos em *shaker*, as células ClearColi<sup>®</sup> e convencionais têm rendimentos em biomassa semelhantes.

Os indutores demonstraram ter efeitos distintos no crescimento dos organismos (Figura 14.a e b). No meio LBMS com a ClearColi<sup>®</sup>, a lactose não influenciou no crescimento da biomassa até o momento avaliado, enquanto que o IPTG provocou desaceleração do crescimento a partir de 6 horas de cultivo (aproximadamente 2 horas após a indução). Já nos ensaios com células convencionais, a lactose levou a um menor crescimento a partir de uma DO 5,5, enquanto o crescimento no experimento induzido com IPTG foi similar ao observado no cultivo sem indução. Provavelmente, a ClearColi<sup>®</sup> seja mais sensível à indução por IPTG devido a modificações genéticas de sua membrana (MAMAT *et al.*, 2015) e pela maior toxicidade deste composto (EINSFELDT *et al.*, 2011; MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003; DONOVAN; ROBINSON; GLICK, 1996; GOMBERT; KILIKIAN, 1998; KILIKIAN *et al.*, 2000). Contudo, são necessários estudos mais específicos para elucidar a influência das condições de cultivo no metabolismo de células ClearColi<sup>®</sup>.

A peptona de soja suprida nos meios dos ensaios LBM-IPTG e LBMS-IPTG possivelmente influenciou favoravelmente o crescimento, uma vez que até 10 horas de cultivo as concentrações de biomassa destes eram parelhas entre eles e superiores às do ensaio LB-IPTG usando triptona. A partir desse momento, o meio LBM apresentou uma desaceleração do crescimento em relação ao LBMS aparentemente mais relacionada à ausência de glicerol, que forneceria o carbono e a energia necessários para a manutenção do crescimento celular, do que à ausência dos sais, que também não foram acrescentados em sua composição.

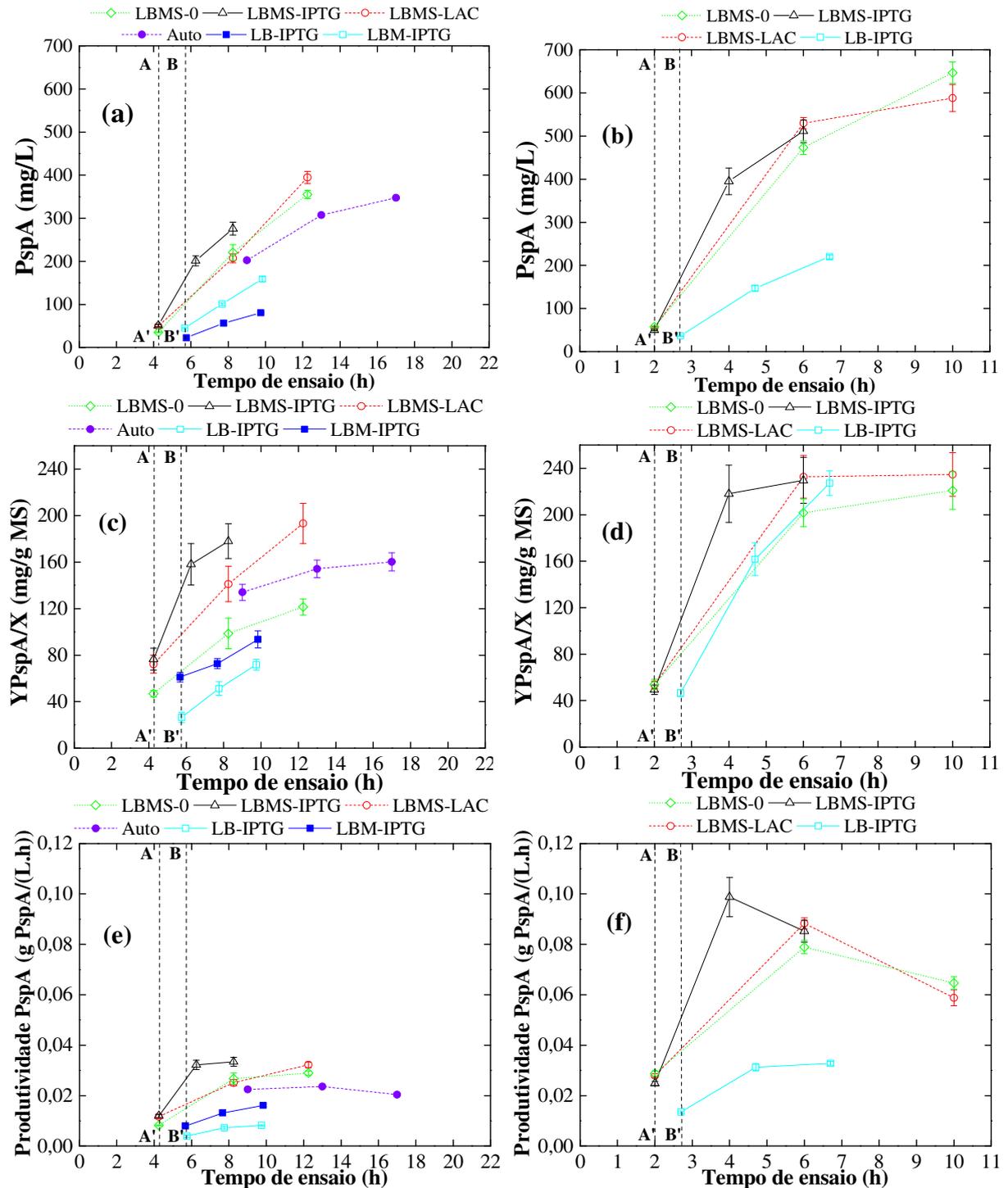
A condição usando o meio de Autoindução (Auto) foi avaliada apenas com a ClearColi<sup>®</sup>. Pelos resultados presentes na Figura 14.a e b é possível verificar que nesse ensaio o crescimento da biomassa foi praticamente parelho ao LBMS-LAC até 6 horas, quando passou a sofrer uma diminuição de seu crescimento. Como a autoindução por lactose se inicia com o término da glicose presente no meio AUTO (DO~0,55), redirecionando recursos da célula para a produção de PspA4Pro, era esperado que em tal condição as células apresentassem um crescimento menor da biomassa nesse meio de cultivo.

Na fase de indução os dados de produtividade de biomassa das células ClearColi<sup>®</sup> (Figura 14.c) e das células convencionais (Figura 14.d) evidenciaram diferenças importantes. No geral os meios que tiveram a adição da peptona de soja (LBMS e LBM) apresentaram os melhores resultados de produtividade de biomassa. Todos os ensaios em ClearColi<sup>®</sup> apresentaram valores menores nas mesmas condições avaliadas que em células convencionais, sendo todos inferiores a  $0,30 \text{ gMS.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  (MS – Massa seca de células). Os valores de produtividade de biomassa dos ensaios com células convencionais foram sempre decrescentes. Isto está de acordo com o esperado, já que, com o aumento da concentração celular no decorrer dos cultivos, parte dos componentes iniciais dos meios podem não estar disponíveis abundantemente, sobretudo quando as células passam a demandar mais energia e constituintes para a sua manutenção, comprometendo a sua replicação e crescimento. Além disso, após a indução, este efeito pode ser intensificado já que as células direcionam parte dos seus recursos para a produção da proteína recombinante (NEUBAUER; LIN; MATHISZIK, 2003). Diferentemente, os ensaios LBM e LBMS com ClearColi<sup>®</sup> apresentaram primeiramente um aumento e depois uma queda em seus valores de produtividade, mas ainda se mantendo acima do valor inicial. Este comportamento demonstra que as células ClearColi<sup>®</sup> continuam a se multiplicar e a crescer em um ritmo superior às células convencionais em uma mesma faixa de DO, inclusive para os ensaios em que houve indução. Com uma síntese menos intensa de proteína recombinante, a velocidade de formação de biomassa da ClearColi<sup>®</sup> na fase de indução é aparentemente menos afetada, em comparação com a das células convencionais, pelo estresse metabólico, levando a menor queda de produtividade em biomassa na fase de indução.

#### 4.3.1.2 Produção de PspA4Pro

A Figura 15 apresenta os dados relacionados à produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) das linhagens ClearColi<sup>®</sup> e convencional nos experimentos em *shaker* a 37 °C. As amostragens de cada cultivo estão de acordo com o plano apresentado na Tabela 10. No geral ambas as cepas de *E. coli* BL21(DE3) tiveram perfis semelhantes de produção da proteína em cada meio. Apesar disso, as células ClearColi<sup>®</sup> apresentaram produtividades da proteína (Figura 15.e e f) cerca de 2,5 vezes menores que as convencionais para uma mesma condição de meio, embora o rendimento por biomassa em PspA4Pro tenha sido semelhante (Figura 15.c e d). A menor velocidade de crescimento característica da

**Figura 15.** Produção da proteína de superfície A do pneumococo (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de PspA no meio:** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. **Rendimento de PspA em relação a biomassa:** (c) ClearColi<sup>®</sup>; (d) células convencionais; **Produtividade de PspA:** (e) ClearColi<sup>®</sup>; (f) células convencionais. \***Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



ClearColi<sup>®</sup> é a principal causa da queda de produtividade, a qual pode causar um encarecimento dos custos do processo de produção da proteína em relação à plataforma convencional. Já a concentração final do produto obtido em ClearColi<sup>®</sup> é cerca de 30% inferior à correspondente nas células convencionais (Figura 15.a e b), o que provavelmente está relacionado com as menores concentrações de biomassa (Figura 14.a) e rendimentos de proteína por biomassa (Figura 15.c) nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup>. Outra diferença importante entre as duas plataformas refere-se ao máximo em acúmulo de proteína. Para a plataforma convencional, o patamar de aproximadamente 230 mg PspA4Pro/gMS foi alcançado em todas as condições estudadas após um período variando entre 1 e 3 h de indução (Figura 15.d), Já para a plataforma detoxificada, os perfis de rendimento em proteína são crescentes, mesmo após 4 h de indução com IPTG ou 6 h de indução com lactose (Figura 15. c). Isso sugere que períodos de indução ainda maiores podem ser necessários para atingir o máximo acúmulo de proteína com ClearColi<sup>®</sup>.

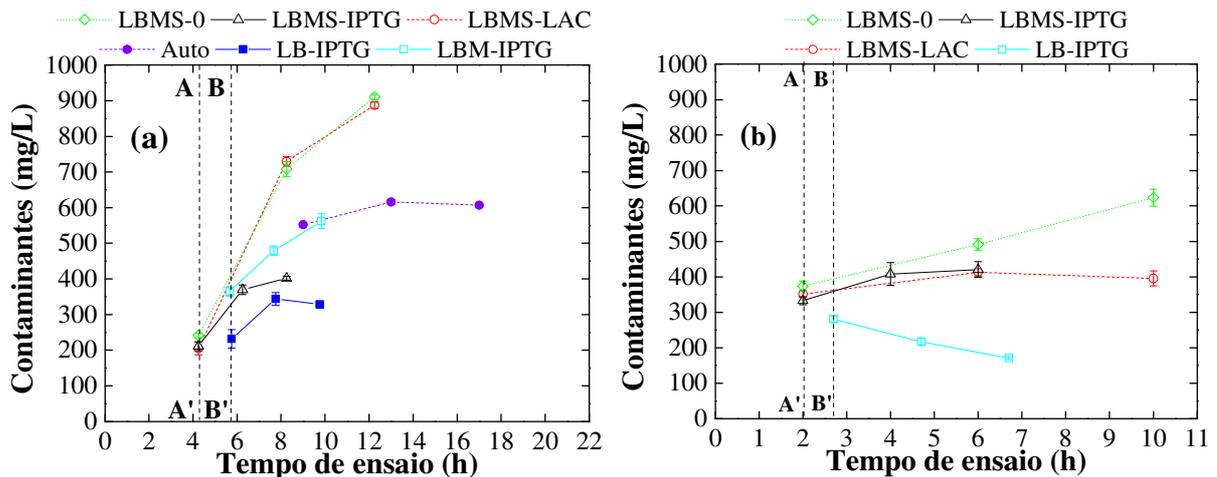
A produção de PspA4Pro foi constatada mesmo nos cultivos sem indução. A ocorrência de produção de proteína recombinante na ausência de indutor pode estar relacionada à ausência de um repressor do operon *lac* (SILVA, 2015), já que todos os ensaios realizados apresentaram quantidades desta proteína na amostra coletada imediatamente antes da indução. Além disso, o ensaio LBMS-0, que foi usado inicialmente como controle, produziu uma quantidade significativa dessa proteína recombinante, tendo um comportamento muito similar ao ensaio LBMS-LAC em termos de concentrações (Figura 15.a e b) e de produtividades (Figura 15.e e f) para as duas cepas, e diferindo apenas nos valores de rendimentos de produção específica da proteína por biomassa ( $Y_{PspA/X}$ ) observados (Figura 15.c e d), sendo possível que algum componente presente nas fontes complexas (peptonas e extrato de levedura) tenha agido como indutor de forma similar à lactose. Studier (2005) indicou que traços de lactose seriam responsáveis por esta indução não intencional em meios complexos, já que alguns componentes presentes neles podem ser resultantes da digestão da caseína ou formulados a partir de outros subprodutos do leite. Assim, os menores valores  $Y_{PspA/X}$  do ensaio LBMS-0 em relação ao LBMS-LAC parecem ter sido compensados pela maior produtividade de biomassa alcançada (Figura 14.c). Portanto, embora os indutores intensifiquem a produção específica de PspA4Pro nas células, a desaceleração da velocidade de crescimento celular pode comprometer a produção volumétrica final de PspA (que depende da produção específica e da concentração celular), sendo importante entender e definir, sobretudo em termos econômicos, qual condição de cultivo é mais favorável.

Com células ClearColi<sup>®</sup> os ensaios com indução por pulso apresentaram, em geral, melhores resultados de produção de PspA4Pro que os ensaios em autoindução (Figura 15), com destaque para os ensaios LBMS-IPTG e LBMS-LAC que alcançaram cerca de 180 mgPspA4pro/gMS. Comparando os ensaios LBMS com o AUTO, que apenas diferem na presença inicial da lactose e da glicose na autoindução, os valores de concentração, rendimento específico e produtividade de proteína em LBMS foram superiores. Em relação aos demais ensaios é interessante destacar que o LBMS-IPTG foi superior ao ensaio LBM-IPTG. Os sais adicionados ao primeiro aparecem como os principais responsáveis por este resultado, bem como a substituição da triptona do meio LB pela peptona de soja permitiu que o ensaio LBM-IPTG tivesse melhores números de produção de PspA4Pro que o ensaio LB-IPTG.

#### 4.3.1.3 Produção de proteínas contaminantes

As concentrações das proteínas contaminantes nas amostras (Tabela 10) dos ensaios em *shaker* com as cepas ClearColi<sup>®</sup> e convencional são apresentadas na Figura 16. De maneira geral, as concentrações das proteínas contaminantes acompanharam os perfis de concentrações da PspA4Pro (Figura 15.a e b). Em cultivos com ClearColi<sup>®</sup> quase todos os resultados tiveram valores superiores àqueles dos cultivos com células convencionais. A produção específica de PspA menos intensa (Figura 15.c e e), característica dos cultivos de ClearColi<sup>®</sup>, justifica em parte esses resultados devido a metodologia de cálculo utilizada (item 2.2.2.4). Contudo, a maior concentração de proteínas contaminantes não acarreta necessariamente maiores custos de purificação, devendo isto ser avaliado em termos práticos e econômicos na etapa de *downstream*. Contudo, sabe-se que a remoção de endotoxina bacteriana presente na produção de proteínas terapêuticas recombinantes é um processo caro e desafiador, sendo necessário para assegurar a segurança de uso do produto final (MAMAT et al, 2015), e, portanto, a utilização de células detoxificadas como a ClearColi<sup>®</sup> podem contribuir com isso e proporcionar simplificações da etapa de purificação. Os resultados obtidos nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> no meio LBMS usando IPTG como indutor parecem promissores, já que aliaram boa produção de proteína com concentrações menores de proteínas contaminantes, em comparação com os cultivos isento de indução e induzido com lactose, conforme evidenciam as Figuras 15.a e 16.a.

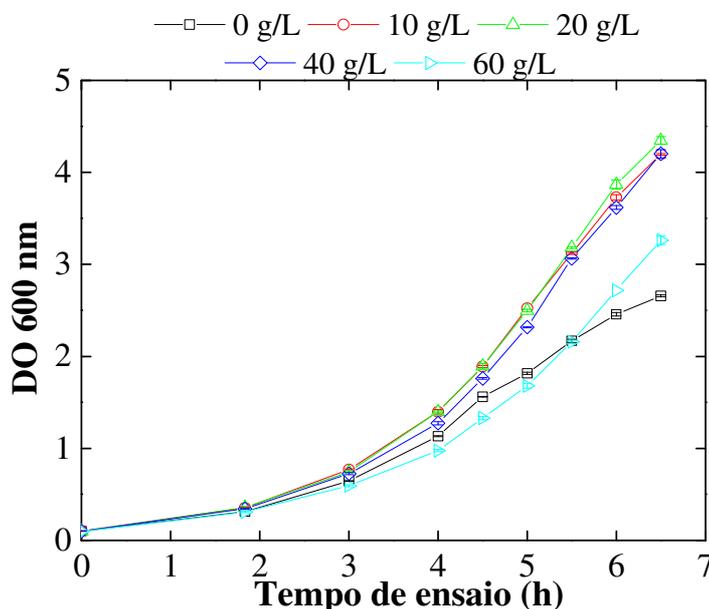
**Figura 16.** Produção de proteínas contaminantes em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e convencional em meios complexos a 37 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de proteína no meio:** (a) ClearColi<sup>®</sup>; (b) células convencionais. \***Momento de pulso do indutor (linhas verticais tracejadas):** AA' (LBMS-IPTG e LBMS-LAC); BB' (LB-IPTG e LBM-IPTG). **Meios:** Autoindução (Auto); LB-Miller (LB); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



#### 4.3.2 Estudo Preliminar II - Avaliação da concentração inicial de substrato no crescimento da cepa ClearColi<sup>®</sup> substrato

A Figura 17 apresenta a evolução do crescimento celular em termos de DO 600 nm ao longo do tempo para os experimentos realizados em diferentes concentrações iniciais de glicerol. Pode-se observar que os perfis de variação das concentrações celulares nos ensaios contendo 10, 20 e 40 g/L foram praticamente idênticos. Já nos ensaios sem glicerol e com 60 g/L de substrato, os perfis de concentração celular têm menor inclinação. A ausência de glicerol no meio provavelmente tornou a formação de biomassa limitada (menor concentração final de células) devido à falta de fonte de carbono, sem alteração da velocidade máxima específica de crescimento (Tabela 14). Por outro lado, na concentração de 60 g/L parece ter havido inibição do crescimento pelo substrato já que a velocidade máxima específica de crescimento foi afetada. Portanto, a fim de evitar a inibição dos cultivos com células ClearColi<sup>®</sup> com o meio LBMS, recomenda-se que deve ser adotada uma concentração de glicerol máxima de 40 g/L.

**Figura 17.** Crescimento das células ClearColi® em meio LBMS sem indução a 37 °C com diferentes concentrações de glicerol. LBMS: LB modificado com sais.



**Tabela 14.** Velocidades máximas de crescimento de células ( $\text{h}^{-1}$ ) ClearColi® em meio LBMS sem indução a 37 °C com diferentes concentrações de glicerol.

Glicerol g/L	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
0	0,61 ± 0,01
10	0,63 ± 0,01
20	0,63 ± 0,01
40	0,62 ± 0,01
60	0,56 ± 0,01

#### 4.3.3 Estudo Preliminar III - Influência da temperatura no crescimento e produção de PspA4Pro

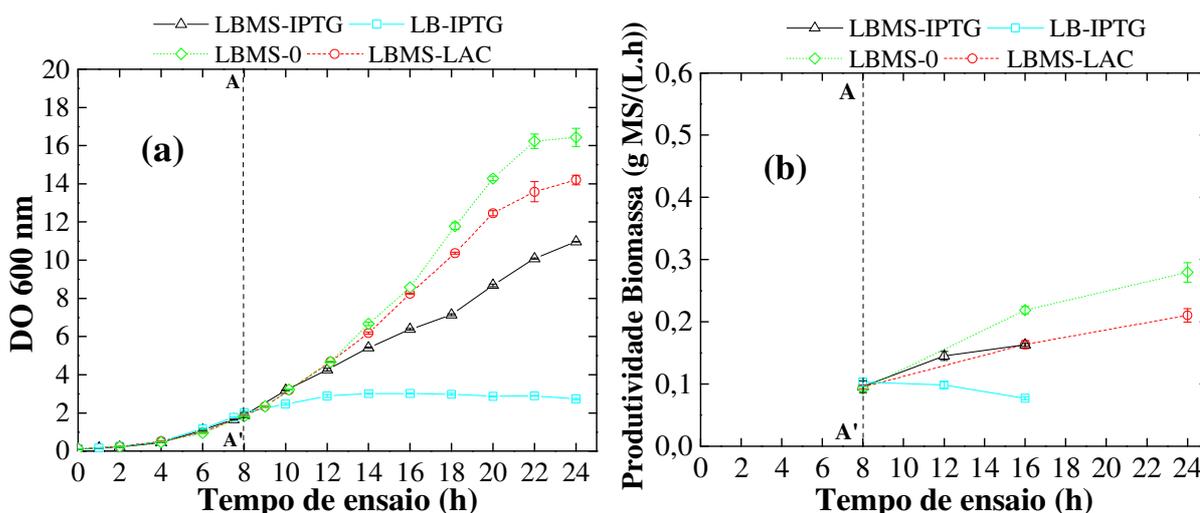
Foram conduzidos ensaios em *shaker* a 27 e 32 °C para comparar diferentes meios complexos usando células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® e avaliar a influência da temperatura no desempenho do cultivo em termos de crescimento e produção de proteína recombinante. Como o cultivo da cepa BL21(DE3) já foi estudado em meio complexo (SANTOS, 2012), optou-se por concentrar os esforços experimentais na plataforma de expressão ClearColi®.

### 4.3.3.1 Cultivos para produção de PspA4Pro em shaker a 27 °C

#### 4.3.3.1.1 Formação de Biomassa

Os dados que representam o crescimento da biomassa e respectivas produtividades, nos ensaios realizados a 27 °C em *shaker* usando ClearColi<sup>®</sup> são apresentados na Figura 18.

**Figura 18.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Crescimento (DO 600 nm); (b) Produtividade de biomassa. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



Os perfis de crescimento dos ensaios conduzidos a 27 °C (Figura 18.a) foram semelhantes aos perfis observados a 37 °C (Figura 14.a). Os ensaios com o meio LBMS apresentaram as maiores concentrações de biomassa, mantendo sequencialmente em ordem decrescente de DO o meio sem indução (0), lactose e IPTG. Todos os ensaios com o meio LBMS alcançaram valores finais superiores de concentrações celulares e mostraram produtividade de biomassa crescente (Figura 18.b). Em temperaturas menores o estresse metabólico é reduzido, o que permite que as células disponham de mais recursos que podem ser direcionados para o crescimento. Contudo, quando avaliados no mesmo tempo de cultivo, os valores da produtividade foram cerca da metade dos alcançados a 37 °C. Isto está relacionado à diminuição da velocidade de crescimento celular com a redução da temperatura

(Tabela 15), já que os valores estimados a 27 °C foram entre 35 e 50% inferiores aos apresentados na Tabela 13 para 37 °C.

**Tabela 15.** Velocidades máximas de crescimento ( $h^{-1}$ ) de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* a 27 °C em diferentes meios complexos.

Meio	$\mu_{max}$
LB	0,390 ± 0,009
LBMS	0,391 ± 0,014

**Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS).

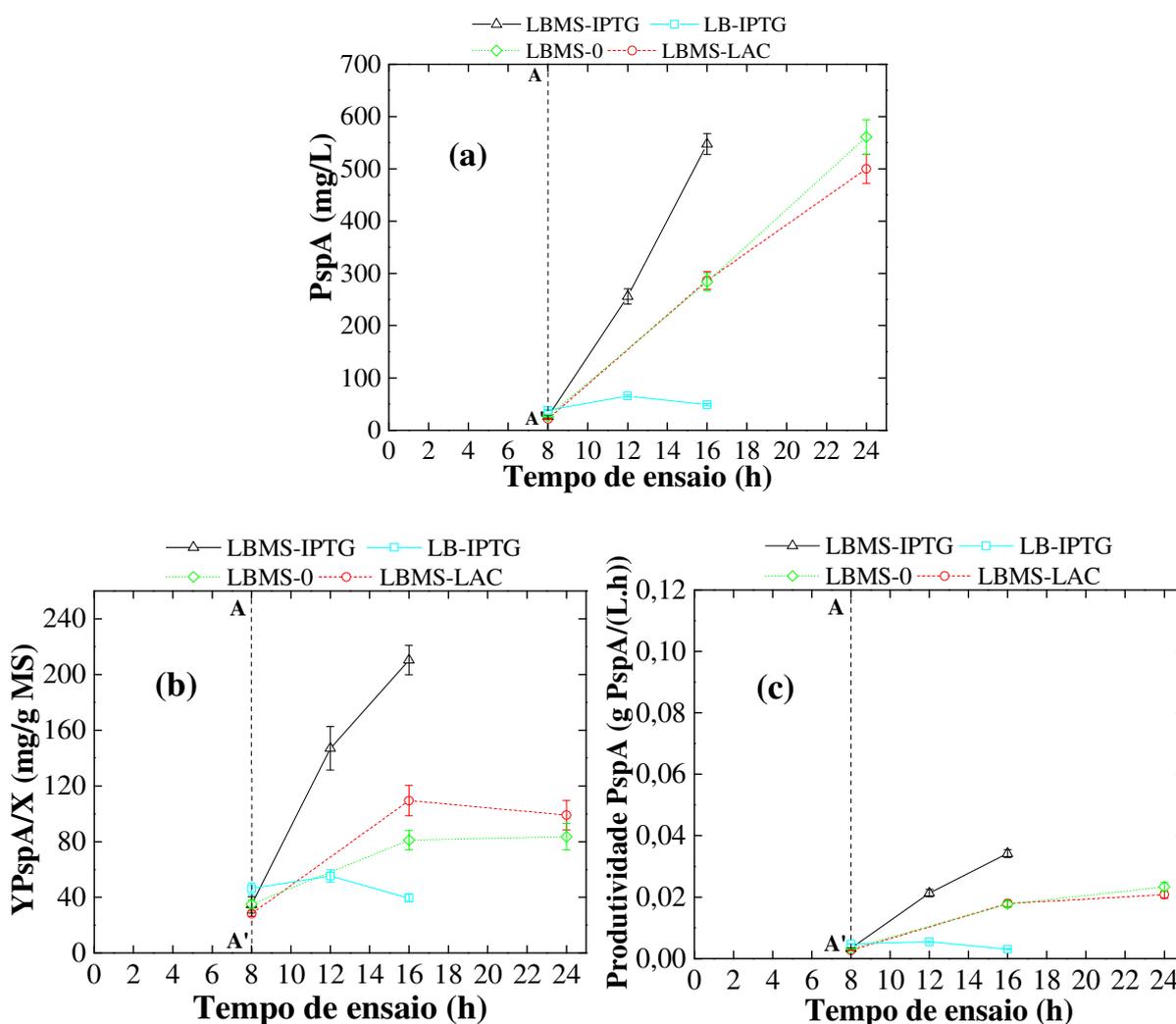
#### 4.3.3.1.2 Produção de PspA4Pro

A Figura 19 apresenta os dados relacionados à produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* a 27 °C. As amostras foram coletadas de acordo com o plano de amostragem apresentado na Tabela 11. Com exceção do ensaio LB-IPTG, que não apresentou boa produção da proteína recombinante, a ordenação dos ensaios em termos de concentrações, rendimentos e produtividades de PspA foi similar em relação aos ensaios a 37 °C (Figura 15). O ensaio LBMS-IPTG novamente apresentou números mais favoráveis, quando avaliado em um mesmo momento de cultivo, ficando o ensaio sem indução (LBMS-0) outra vez dependente de ter maior concentração celular (Figura 18.a) para produzir uma concentração de PspA4Pro semelhante à gerada no meio induzido com IPTG. Provavelmente por esta razão, os valores das concentrações dessa proteína a 27 °C apresentaram resultados mais elevados, alcançando os patamares vistos nos ensaios que utilizaram células convencionais a 37 °C.

Quanto aos valores de rendimentos e produtividades obtidos (Figura 19.b e c), no geral esses não sofreram grandes alterações em relação aos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> a 37 °C, o que pode reforçar a ideia que os maiores valores de concentrações de PspA4Pro foram obtidos proporcionalmente em um maior intervalo de tempo, no qual uma maior concentração celular foi alcançada. Interessante destacar que o ensaio LBMS-LAC teve valores de rendimentos específicos mais baixos que o ensaio LBMS-IPTG, que apresentou números similares e ainda maiores que o respectivo ensaio ClearColi<sup>®</sup> a 37 °C, atingindo um patamar próximo ao com células convencionais nesta condição. O tempo de indução de 8 h foi adequado para se obter o acúmulo máximo de proteína em 3 das condições estudadas, exceto

para LBMS-IPTG que apresentava um perfil crescente de rendimento (Figura 19.b) quando o experimento foi interrompido.

**Figura 19.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado co/m sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.

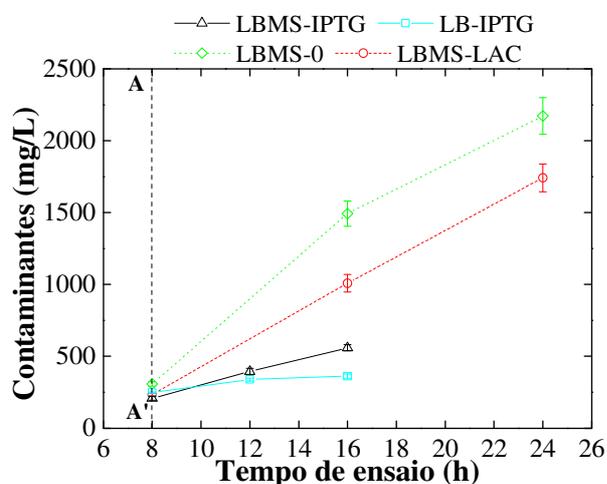


#### 4.3.3.1.3 Produção de proteínas contaminantes

As concentrações das proteínas contaminantes nas amostras (Tabela 11) dos ensaios em *shaker* com a cepa ClearColi<sup>®</sup> estão presentes na Figura 20. De maneira geral, as concentrações das proteínas contaminantes foram mais elevadas a 27 °C em comparação às

alcançadas a 37 °C (Figura 16). Conforme já discutido para a PspA4Pro (item 4.3.3.1.2), isto parece ser justificado pelas maiores concentrações de biomassa alcançadas ao longo dos cultivos. Os ensaios que produziram maiores quantidades específicas de PspA a 27 °C (Figura 19.b) são também aqueles que produziram menores concentrações de proteínas contaminantes, o que está relacionado ao método usada para a quantificação destas (seção 2.2.2.4). Além disso, possivelmente em função da priorização de recursos para a produção da proteína recombinante após a indução, as células tendem a diminuir a produção de outras proteínas. Por isso, em condições similares de cultivo, a indução por IPTG levou a menor produção de proteínas contaminantes, já que proporcionou condições mais intensas de produção de PspA4Pro, como pode ser visto comparando os resultados dos ensaios LBMS-IPTG, LBMS-LAC e LBMS-0 nas Figuras 19.b e 20.

**Figura 20.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 27 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



#### 4.3.3.2 Cultivos para produção de PspA4Pro em shaker a 32 °C

Finalizando a sequência de estudos voltados à análise da influência da temperatura no crescimento e formação de proteína, foram realizados os ensaios em *shaker*, utilizando diferentes meios complexos e *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® a 32 °C. Além disso, foram realizados ensaios adicionais, em replicata, apenas com o meio LBMS, para avaliação da reprodutibilidade dos procedimentos. Conforme pode ser observado na Tabela 12, a

avaliação dos cultivos para a produção de PspA4Pro a 32 °C foi feita para os ensaios Auto, LBM-IPTG e LBMS sem indução (0) e induzidos com IPTG e lactose. Os principais resultados da produção de biomassa e de PspA4Pro e proteínas contaminantes desses ensaios estão apresentados a seguir.

#### 4.3.3.2.1 Formação de Biomassa

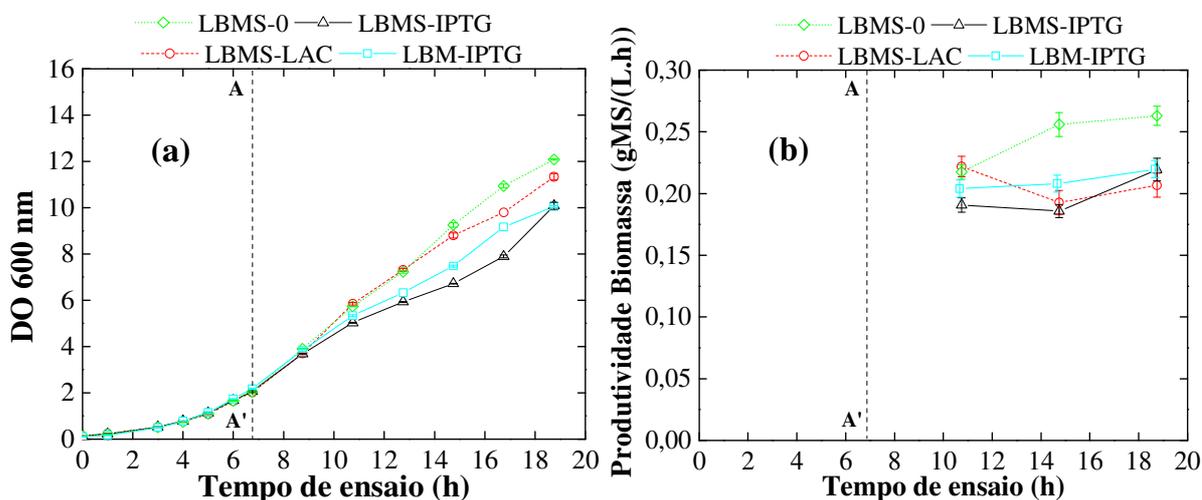
Os resultados da produção de biomassa dos ensaios estão apresentados na Figura 21. As concentrações das células apresentaram valores intermediários ao longo do tempo em relação àqueles obtidos a 27 e 37 °C, para os mesmos meios avaliados nestas condições. Para os ensaios com meio LBMS novamente o cultivo sem indução atingiu, em geral, as maiores concentrações e produtividades de biomassa. Todos os demais ensaios com indução na temperatura de 32 °C parecem tender a um valor de produtividade de aproximadamente 0,22 gMS/(L.h). Além disso, para o meio LBMS esse valor se situou em um patamar intermediário àqueles observados nas temperaturas de 27 e 37 °C. Esses resultados estão relacionados às velocidades máximas específicas de crescimento celular dos ensaios (Tabela 16), já que estes valores também foram intermediários àqueles observados a 27 e 37 °C em consequência da intensidade do metabolismo celular, que é modulado pela temperatura.

**Tabela 16.** Velocidades máximas de crescimento ( $h^{-1}$ ) de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* a 32 °C em diferentes ensaios com meio complexo do item 4.7.1

Meio	$\mu_{max}$
LBM	0,49 ± 0,03
LBMS	0,45 ± 0,03

**Meios:** LB-Miller Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS).

**Figura 21.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Crescimento (DO 600 nm); (b) Produtividade de biomassa. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller (LB); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



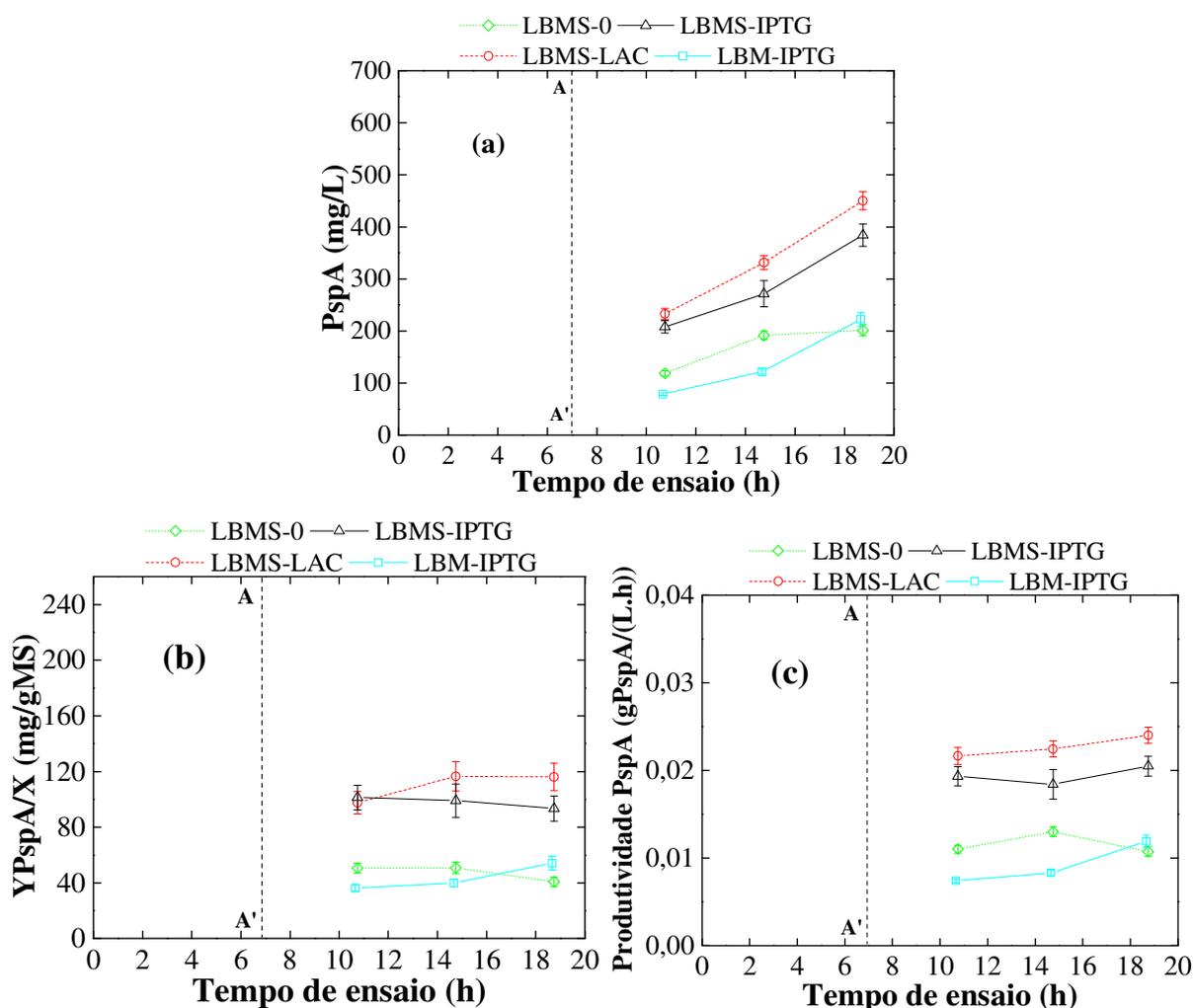
#### 4.3.3.2.2 Produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes

A produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes dos ensaios a 32 °C seguem representadas respectivamente nas Figuras 22 e 23.

As concentrações de PspA4Pro (Figura 22.a) e proteínas contaminantes (Figura 23) foram crescentes, acompanhando o crescimento celular (Figura 21.a). Em termos específicos (Figura 22.b), os ensaios com o meio LBMS usando indutores apresentaram os maiores valores de rendimento em proteína recombinante e ambos parecem tender ao valor de 110 mgPspA/gMS. Para os demais experimentos, a produção aparenta convergir para um valor cerca de 40% inferior, indicando que os ensaios LBM-IPTG e sem indução (LBMS-0) tiveram uma produção menos intensa de PspA por célula. Comportamento similar a este foi observado em relação à produtividade de proteína de cada ensaio. Os ensaios sob indução por pulso de lactose e IPTG atingem respectivamente os valores máximos de 0,024 e 0,021 mg/(L.h) e os demais ensaios para patamares inferiores a 0,015 mg/(L.h), o que reforça que os pulsos dos indutores tornaram os ensaios mais produtivos em PspA4Pro. Em paralelo, as produções de proteínas contaminantes foram inferiores nesses casos (Figura 23), sobretudo no ensaio LBMS-IPTG, o que demonstra que o meio LBMS proporciona condições mais favoráveis de produção de PspA4Pro, o que pode contribuir para um processo mais simples

de purificação. Provavelmente, os sais e o glicerol usados no meio LBMS sejam responsáveis por este comportamento, uma vez que a presença deles é a única diferença em relação ao ensaio LBM, similarmente ao que foi observado nos ensaios a 37 °C.

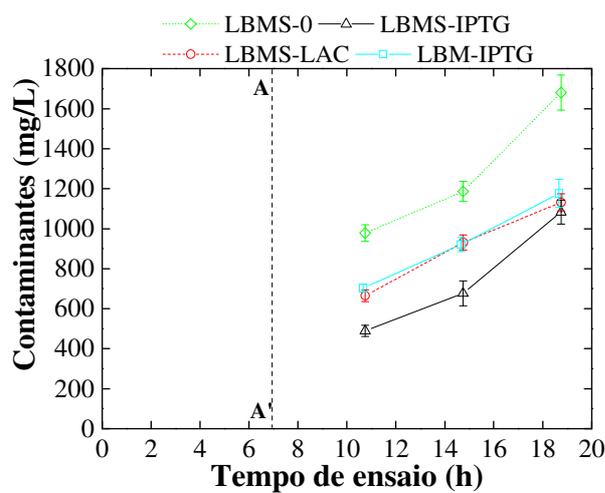
**Figura 22.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller Modificado (LBM); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



Comparando os resultados a 32 °C com as outras condições de temperatura testadas, as produções específicas de PspA4Pro tendem a crescer com o aumento da temperatura. Os ensaios LBMS-IPTG foram os únicos em que a temperatura pareceu ter uma menor influência, já que altos rendimentos foram alcançados inclusive na condição de menor

temperatura avaliada. Dessa forma, a adoção do meio LBMS usando a indução com pulso por IPTG parece ser uma estratégia eficiente para produzir PspA4Pro em maior escala, contanto que o indutor possa ser integralmente removido nas etapas de purificação.

**Figura 23.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** LB-Miller Modificado (LBM); LB Modificado com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 1,0 mM e lactose (LAC) 5,0 g/L. **Sem indução:** 0.



Quanto à definição da temperatura de cultivo, os custos relacionados a matérias-primas, remoção de calor, agitação e oxigenação de um cultivo, bem como a qualidade da proteína recombinante produzida, deverão ser determinantes nessa escolha. Baseado em estudos com células de *E. coli* BL21(DE3) convencionais na produção de PspA4Pro, como no estudos apresentados no capítulo 3, em Campani *et al* (2017) e Paredes (2018), a temperatura de 32 °C parece ser a mais recomendável para a mitigação dos custos de produção da PspA4Pro.

#### 4.3.3.3 Avaliação da reprodutibilidade do procedimento experimental

Com o objetivo de avaliar a reprodutibilidade do procedimento experimental, os ensaios LBMS, LBM e Auto foram realizados em duplicata, desde a ativação das células em meio sólido, passando pelo preparo de inóculo, até a realização dos cultivos.

#### 4.3.3.3.1 Formação de Biomassa

Os dados que representam o crescimento da biomassa a 32 °C ao longo do tempo para os cultivos de ClearColi<sup>®</sup> propostos estão presentes na Figura 24.

Os ensaios Auto demonstraram a maior variação dos perfis de crescimento nos ensaios de repetição, já que o primeiro ensaio teve uma redução em seu crescimento a partir das 10 horas de ensaios (aproximadamente 4 horas após a DO ~ 2,0 ser alcançada), enquanto que o ensaio de repetição (II) apresentou um crescimento muito próximo ao ensaio LBMS-LAC (II) até o fim.

Levando em consideração os seus respectivos erros, em média, os valores de velocidade máxima de crescimento apresentaram praticamente os mesmos valores (Tabela 17).

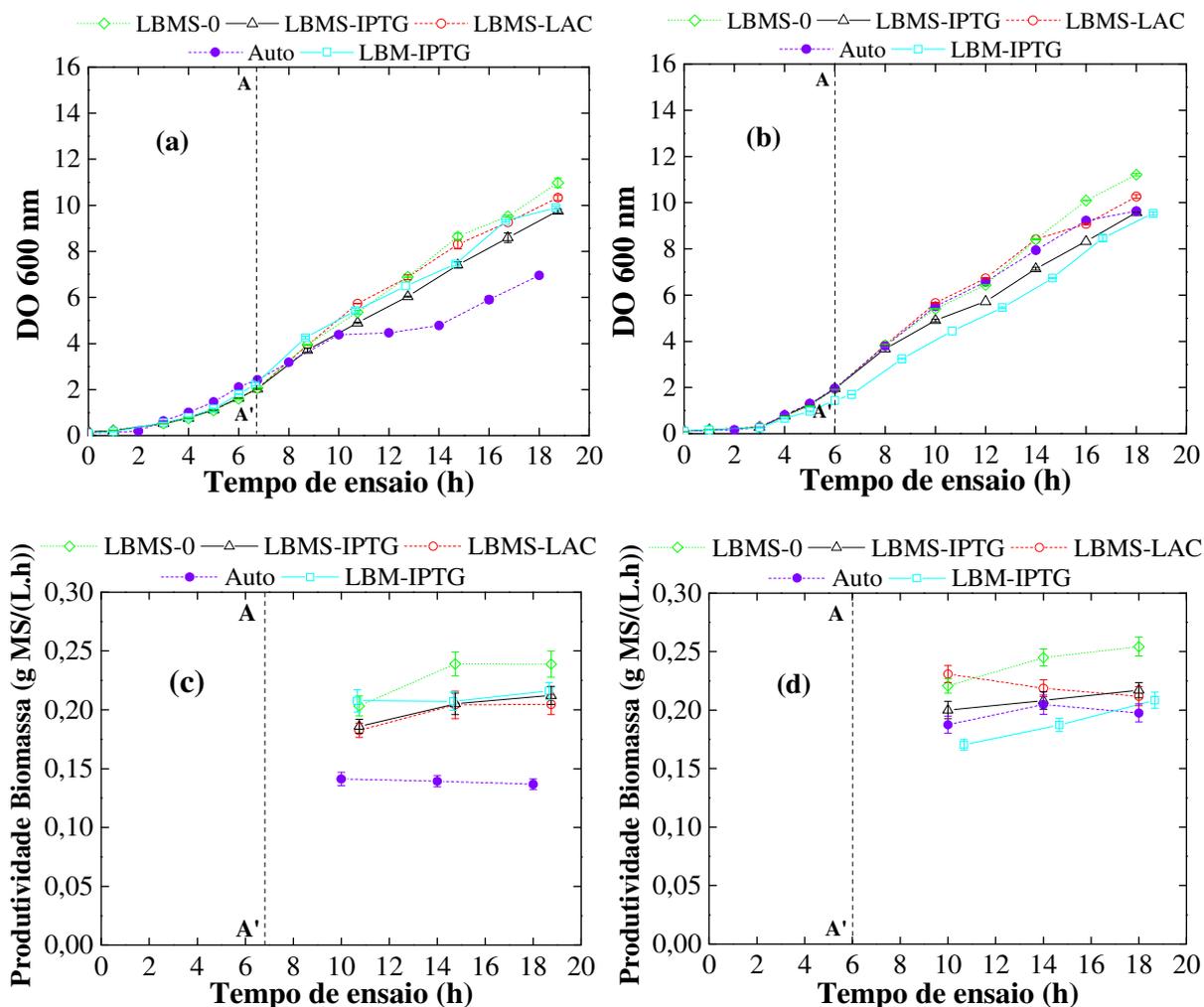
**Tabela 17.** Velocidades máximas de crescimento ( $\text{h}^{-1}$ ) de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* a 32 °C em diferentes meios complexos.

<b>Meio</b>	<b>(I)</b>	<b>(II)</b>	<b>MÉDIA</b>
LBM	0,494 ± 0,026	0,461 ± 0,006	0,478 ± 0,032
Auto	0,506 ± 0,027	0,505 ± 0,010	0,505 ± 0,037
LBMS	0,443 ± 0,026	0,495 ± 0,005	0,469 ± 0,031

**Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS).

De maneira geral, houve boa reprodutibilidade dos dados de concentração de biomassa nos cultivos realizados nos respectivos meios, principalmente ao levar-se em conta que a reprodução foi feita desde o cultivo da células em placas até a realização de cada cultivo.

**Figura 24.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Crescimento (DO 600 nm):** (a) Primeiros ensaios (I); (b) Repetições (II). **Produtividades em biomassa:** (c) I; (d) II. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0.

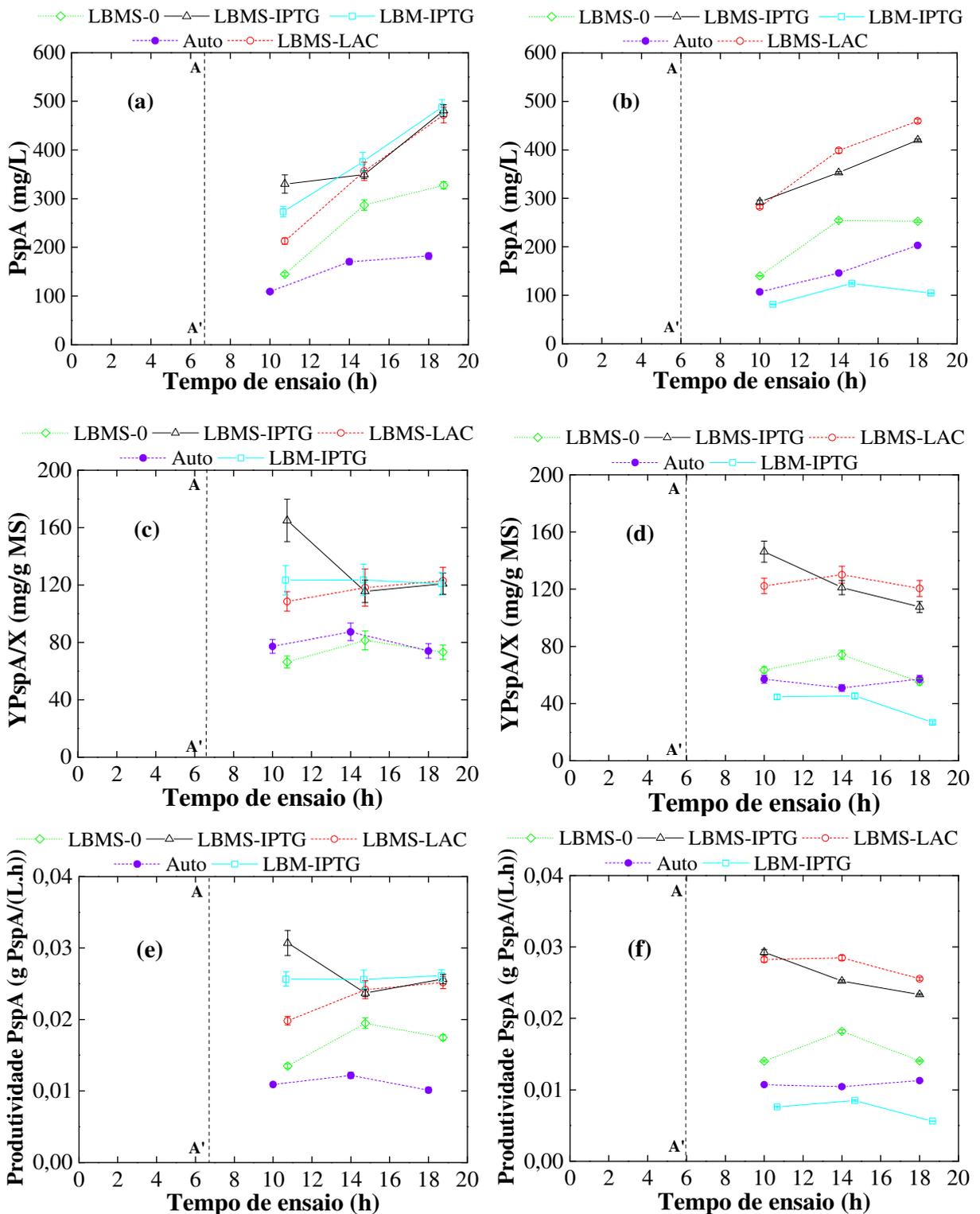


#### 4.3.3.3.2 Produção de PspA4Pro e proteínas contaminantes

As Figuras 25 e 26 apresentam respectivamente os dados relacionados à produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* a 32 °C.

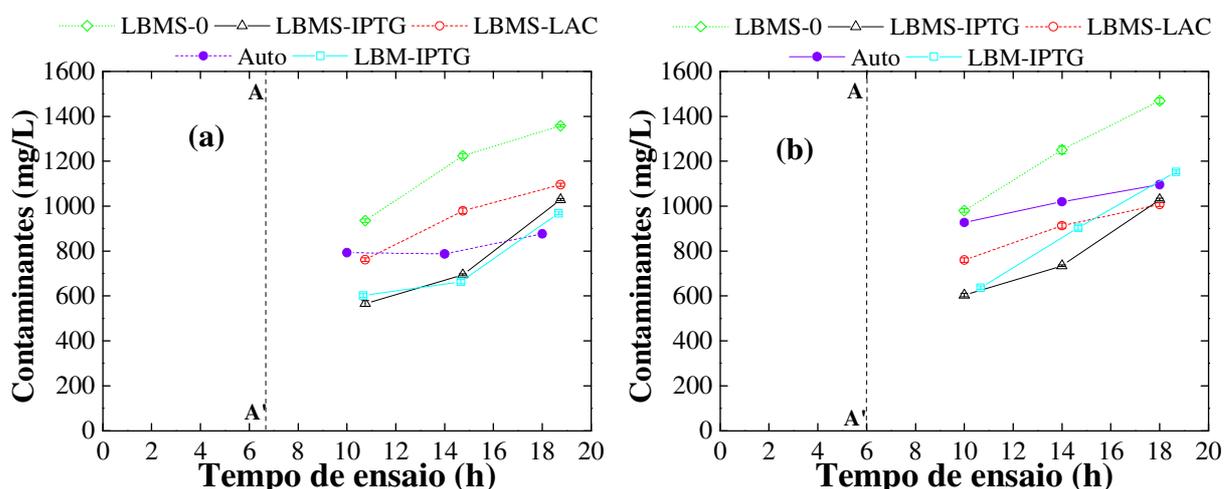
Com exceção do ensaio LBM-IPTG, os ensaios apresentaram boa reprodutibilidade em relação à produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes a 32 °C, sendo essas concentrações crescentes (Figuras 25.a e b e 26.a e b), acompanhando o crescimento celular (Figura 24.a e b). As produções da PspA e de proteínas contaminantes nos

**Figura 25.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*. Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). **Concentração de PspA no meio:** (a) Primeiros ensaios (I) e (b) Réplicas (II); **Rendimentos de PspA em relação a biomassa:** (c) I e (d) II; **Produtividade de PspA:** (e) I e (f) II. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0.



ensaios com o LBMS induzidos por pulsos de IPTG 0,5 mM ou lactose 2,5 g/L resultaram em rendimentos e produtividades da proteína recombinante muito semelhantes aos valores alcançados com maiores concentrações de indutor (IPTG 1,0 mM ou lactose 5,0 g/L). Portanto, as reduções promovidas das concentrações desses indutores pareceram não ter alterado a produção das proteínas em geral, o que permite aprofundar esta avaliação e buscar novas reduções nas concentrações dos indutores. Os ensaios Auto alcançaram valores inferiores na produção de PspA4Pro e superiores na produção de proteínas contaminantes, próximos aos vistos para os ensaios LBMS-0 e LBM-IPTG II (Repetição). Finalmente, em relação aos ensaios LBM-IPTG, estes não apresentaram resultados conclusivos sobre a produção de PspA4Pro a 32 °C com a redução da concentração do indutor, uma vez que houve uma grande variação dos valores de concentração ou produção específica da proteína recombinante entre as replicatas.

**Figura 26.** Produção de proteínas contaminantes durante a produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meios complexos a 32 °C em *shaker*: Indução por pulso em DO 600 nm próxima de 2,0 e por autoindução (DO em torno de 0,5). (a) Primeiros ensaios (I); (b) Réplicas (II). \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meios:** Autoindução (Auto); LB Modificado (LBM); LBM com sais (LBMS). **Indutores:** IPTG 0,5 mM e lactose (LAC) 2,5 g/L. Sem indução: 0.



#### 4.3.4 Estudo Preliminar IV - Influência da concentração de indutor

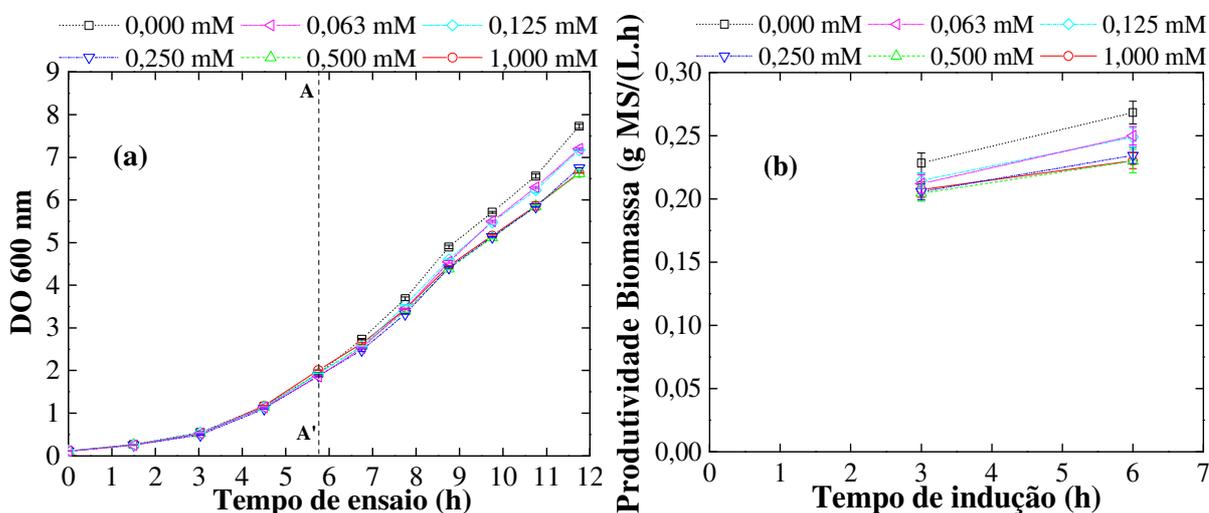
Os ensaios em *shaker* com ClearColi® neste capítulo 4 objetivaram avaliar o comportamento desse novo organismo cultivado em meios complexos, sob diferentes formas de indução e temperaturas, a fim de identificar e selecionar as melhores condições a serem

empregadas nos ensaios para a produção de PspA4Pro não somente em incubadora, mas também em biorreator por extrapolação das observações daqueles resultados. Os cultivos em biorreator são conduzidos em condições controladas e, por isso, podem ser mais adequados para a avaliação de processo de produção de PspA4Pro na plataforma ClearColi<sup>®</sup> em termos econômicos, que foi inclusa no capítulo 5 dessa Tese. Como foi identificado no capítulo 3 para células *E. coli* BL21(DE3) convencionais, ensaios em biorreator usando IPTG apresentaram custos competitivos na produção de PspA4Pro em meio definido, apesar do alto preço desse indutor, que acarreta alto impacto no custo do meio em que está presente. Assim, decidiu-se avaliar em *shaker* o desempenho dos cultivos ClearColi<sup>®</sup> sob diferentes concentrações de IPTG e verificar a oportunidade de redução deste caro componente nesta nova plataforma de expressão de proteínas recombinantes.

#### 4.3.4.1 Formação de Biomassa

Os dados que representam o crescimento da biomassa e suas respectivas produtividades nos cultivos a 32 °C em *shaker* usando ClearColi<sup>®</sup> com induções por pulsos sob diferentes concentrações de IPTG (0 - 1,0 mM) são apresentados na Figura 27. A comparação dos dados desta figura revela que as diferentes concentrações de indutores adotadas para um mesmo meio demonstram interferir no crescimento da biomassa de forma mais significativa a partir de 9 horas de ensaio (3 h da fase de indução), acentuando-se até o final do experimento. Antes disso, os perfis tiveram um comportamento praticamente idêntico, sobretudo antes da fase de indução, quando o valor médio das velocidades máximas de crescimento das células desses cultivos foi de  $0,507 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$ , similar aos valores avaliados anteriormente a 32 °C (Tabelas 16 e 17). Observa-se que quanto maior a concentração do IPTG no pulso na indução, menor foi o crescimento da biomassa durante a fase de indução. Em parte isto pode ser explicado pela intensificação da produção de proteína recombinante, como será exposto no item 4.3.4.2. Além disso, não pode ser descartado que isto também seja o efeito do aumento da toxicidade do IPTG às células (MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003; EINSFELDT et al., 2011; MENZELLA et al., 2003) advindo do aumento da sua concentração no meio. Contudo, de maneira similar ao que foi visto nos demais ensaios com ClearColi<sup>®</sup>, a produtividade de biomassa foi crescente em todos os ensaios.

**Figura 27.** Dados de crescimento de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® em meio complexo a 32 °C em *shaker*. Indução por pulsos de IPTG nos ensaios de 0 à 1,0 mM em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) DO 600 nm para os ensaios; (b) Produtividade de biomassa. \***Momento de pulso do indutor em todos ensaios:** linha vertical tracejada AA'. **Meio:** LB Modificado com sais (LBMS). Sem indução: 0,000 mM.

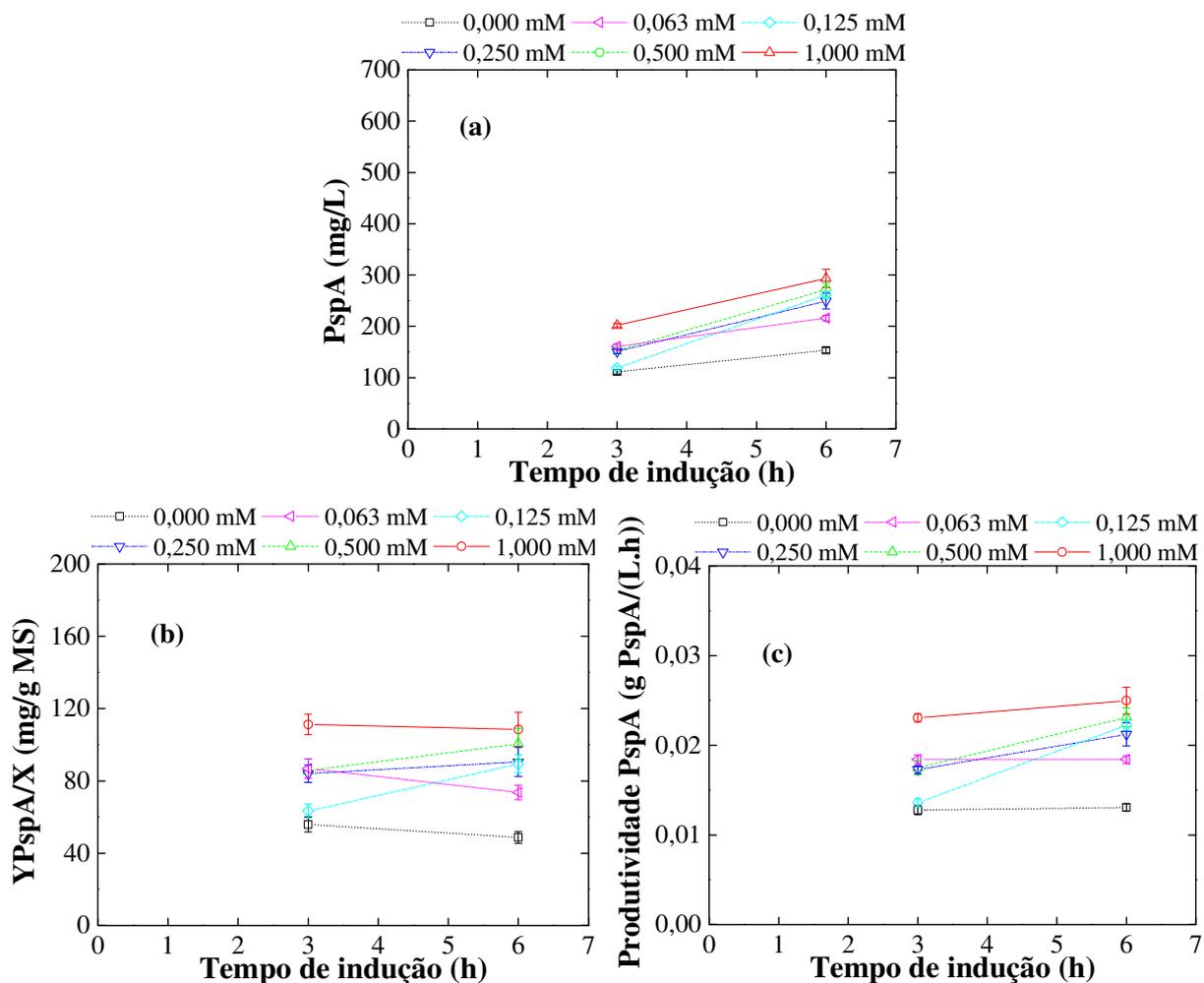


#### 4.3.4.2 Produção de PspA4Pro e de proteínas contaminantes

Os dados relacionados à produção de PspA4Pro em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® nos cultivos em *shaker* a 32 °C com induções por pulsos sob diferentes concentrações de IPTG (0 - 1,0 mM) estão apresentados na Figura 28.

Quanto maior a concentração do indutor no meio, mais intensa e rápida foi a síntese de proteína recombinante. A Figura 28.a mostra que apenas o ensaio contendo IPTG 1,0 mM atingiu um patamar acima de 200 mg PspA/L em 3 horas da fase de indução. Contudo, todos os valores de produção da proteína alvo cresceram ao longo da fase da indução e a maioria de forma mais acelerada do que o observado na concentração 1,0 mM. Nestes cultivos, houve aumento dos rendimentos e das produtividades de PspA4Pro entre 3 e 6 horas de indução superiores ao ensaio que utilizou IPTG 1,0 mM, praticamente alcançando os resultados deste ensaio no final de 6 horas. Desta forma, confirma-se que os menores crescimentos (Figura 27) foram decorrência de produções mais intensas da proteína recombinante, que pode ter comprometido o crescimento e a replicação celular nos ensaios conduzidos na presença de 0,25 à 1,00 mM IPTG (NEUBAUER; LIN; MATHISZIK, 2003). Além disso, percebe-se uma tendência que os ensaios com indução de IPTG em concentração igual ou superior a 0,125 mM, aumentassem as suas produções de PspA4Pro até atingirem o patamar constante de rendimento do ensaio com IPTG 1,0 mM de cerca de 120 mgPspA/gMS.

**Figura 28.** Produção da proteína de superfície do pneumococo A (PspA4Pro) em células de *E. coli* BL21(DE3) ClearColi® meio complexo a 32 °C em *shaker*. Indução por pulsos de IPTG nos ensaios de 0 à 1,0 mM em DO 600 nm próxima de 2,0. (a) Concentração de PspA no meio; (b) Rendimento de PspA em relação a biomassa; (c) Produtividade de PspA. **Meio:** LB Modificado com sais (LBMS). Sem indução: 0,000 mM.



Estes resultados sugerem que é possível reduzir as concentrações do IPTG em cultivos em *shaker* com ClearColi® praticadas em meios complexos a 32 °C sem comprometer a produção da proteína recombinante, reduzindo gastos com meio.

A partir dos resultados obtidos foi possível identificar o valor de 0,125 mM como concentração crítica de IPTG para uma DO de 7,0 ao final da fase de indução. A partir desta relação, é possível prever a concentração mínima de IPTG proporcional a ser adicionada em cultivo em batelada em biorreator a partir da estimativa da concentração final de biomassa a ser alcançada. Considerando os resultados do EP-II, o cultivo em biorreator em batelada deve ser iniciado com 40 g/L de glicerol, para evitar inibição pelo substrato. Para um valor de  $Y_{X/S}$  de aproximadamente 0,45 g/g (correspondendo a DO ~ 40), torna-se possível reduzir a

concentração de IPTG de 1,0 para 0,7 mM, uma redução de 30%, sendo uma alternativa para buscar a redução de custos do processo de produção da PspA4Pro em batelada, cujos resultados foram apresentados no capítulo 5.

#### 4.3.5 Influência da composição do meio: comparação dos resultados de formação biomassa e produção de PspA4Pro dos cultivos em *shaker* com ClearColi<sup>®</sup> em meios complexo e definido

No decorrer deste capítulo 4 a produção em *shaker* de PspA4Pro em células ClearColi<sup>®</sup> foi avaliada sob diferentes condições: temperatura, indução e meios complexos, sendo o meio LBMS o que apresentou os melhores resultados. Com intuito de comparar os resultados desses ensaios com outros obtidos em meio definido, os valores máximos de concentrações, produtividades e rendimento foram agrupados e apresentados na Tabela 18. No desenvolvimento dos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em meio definido (PAREDES, 2018) foram utilizados praticamente os mesmos procedimentos e condições adotados nos ensaios discutidos nesse capítulo 4 para a produção de PspA4Pro em meio complexo.

O meio complexo parece permitir um melhor desenvolvimento dos cultivos tanto na produção de biomassa como na produção da proteína recombinante a 27 e 37 °C. A partir da Tabela 18 pode-se observar que, os resultados de produtividade de biomassa e de PspA4Pro, e das produções específicas foram sempre superiores usando o meio complexo em condições similares de temperatura e de indução. Os meios complexos contêm aminoácidos e carboidratos (UTAMI et al., 2019), que são facilmente assimiláveis e suprem as demandas metabólicas das células, principalmente sob a produção de proteínas recombinantes que pode torná-las ainda mais severas (CARNEIRO; FERREIRA; ROCHA, 2013), permitindo que em um menor tempo de ensaio fosse produzida uma maior quantidade de PspA4Pro por célula. Porém, a 32 °C os meios complexo e definido proporcionaram produtividades semelhantes dessa proteína recombinante.

A redução da temperatura dos cultivos permitiu que maiores concentrações de PspA4Pro fossem alcançadas tanto em meio definido como em meio complexo. Esses valores acompanharam as maiores DOs obtidas nos ensaios com a diminuição das temperaturas dos cultivos, embora não tenha havido alterações significativas nas produtividades de biomassa e de proteína recombinante. Esse comportamento pode ser importante na definição da estratégia de produção da PspA4Pro, pois para que a etapa de purificação seja mais econômica,

possivelmente maiores concentrações de proteína recombinante devam estar presentes na biomassa gerada ao final do cultivo, que é o material de partida para a purificação.

**Tabela 18.** Comparação dos resultados dos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em *shaker* em meios complexo e definido.

T °C	Meio	Indutor	DO <sup>max</sup>	P <sub>X</sub> <sup>max</sup> g MS/(L.h)	PspA <sup>max</sup> mg/L	Y <sub>PspA/X</sub> <sup>max</sup> mg/g MS	P <sub>PspA</sub> <sup>max</sup> g/(L.h)	Referência
37	C	S/ indução	7,2	0,27	355	121	0,029	Item 4.3.1
	D	S/ indução	9,6	0,26	-	-	-	Paredes (2018)
	C	IPTG 1,0 mM	5,3	0,20	276	178	0,033	Item 4.3.1
	D	IPTG 1,0 mM	2,9	0,11	144	120	0,013	Paredes (2018)
	C	LAC 5,0 g/L	6,8	0,27	395	193	0,032	Item 4.3.1
	D	LAC 5,0 g/L	4,9	0,13	247	124	0,016	Paredes (2018)
32	C	S/ indução	11,0	0,24	328	81	0,019	Item 4.3.3.2
	D	S/ indução	6,1	0,14	-	-	-	Paredes (2018)
	C	IPTG 1,0 mM	10,1	0,22	384	101	0,020	Item 4.3.3.2
	C	LAC 5,0 g/L	11,3	0,25	450	117	0,024	Item 4.3.3.2
	D	IPTG 1,0 mM + LAC 5,0 g/L	6,4	0,14	429	165	0,024	Paredes (2018)
	C	IPTG 0,5 mM	9,8	0,21	481	121	0,031	Item 4.3.3.3
C	LAC 5,0 g/L	10,3	0,23	472	123	0,025	Item 4.3.3.3	
27	C	S/ indução	16,4	0,30	561	84	0,023	Item 4.3.3.1
	D	S/ indução	10,3	0,18	-	-	-	Paredes (2018)
	C	IPTG 1,0 mM	11,0	0,19	547	210	0,034	Item 4.3.3.1
	D	IPTG 1,0 mM	4,9	0,11	314	157	0,017	Paredes (2018)
	C	LAC 5,0 g/L	14,2	0,25	500	109	0,021	Item 4.3.3.1
	D	LAC 5,0 g/L	9,3	0,16	399	105	0,017	Paredes (2018)

C: meio complexo (LB Modificado com sais); D: meio definido HDF; DO: densidade óptica (600 nm); LAC: lactose; max: máximo; P<sub>X</sub>: produtividade de biomassa; P<sub>PspA</sub>: produtividade de PspA; T: temperatura durante todo o cultivo; Y<sub>PspA/X</sub>: produção específica de PspA por biomassa.

Por fim, o fenômeno de escape de proteína recombinante (SILVA, 2015) não foi observado nos ensaios com ClearColi<sup>®</sup> em meio definido. Segundo Paredes (2018) não foi identificada a produção de PspA4Pro no decorrer dos ensaios controle (sem indução) e no momento logo anterior as induções com IPTG e lactose nas diferentes temperaturas observadas. Conforme já foi apontado no decorrer desse capítulo 4, o escape observado nos experimentos em meio complexo pode estar relacionado a componentes presentes na composição das peptonas e extrato de levedura que possam assumir função análoga à lactose

(ou alolactose) e induzir a produção de PspA4Pro pelas células na ausência de repressores do operon *lac* (SANTOS, 2012).

#### 4.3.6 Influência da plataforma de expressão: comparação dos resultados de formação de biomassa e de produção de PspA4Pro dos cultivos em *shaker* em meio complexo com *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional

No EP-I células *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional foram avaliadas como plataforma de expressão a 37 °C usando meios complexos induzidos ou não por lactose ou IPTG, para a produção de PspA4Pro. Para temperaturas de 27 e 32 °C a cepa convencional não foi avaliada nesse estudo. Porém, dados dos ensaios de Santos (2012) permitem verificar o comportamento das células convencionais em condições similares de temperatura (25 e 31 °C) durante a fase de indução para a produção dessa proteína recombinante. Os principais dados desses cultivos estão presentes na Tabela 19.

**Tabela 19.** Comparação dos resultados dos cultivos com *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional em *shaker* em meio complexo.

T <sub>i</sub> °C	PE	Indutor	DO <sup>max</sup>	P <sub>X</sub> <sup>max</sup> g MS/(L.h)	PspA <sup>max</sup> mg/L	Y <sub>PspA/X</sub> <sup>max</sup> mg/g MS	P <sub>PspA</sub> <sup>max</sup> g/(L.h)	Referência
37	CC	S/ indução	7,2	0,27	355	121	0,029	Item 4.3.1
	CV	S/ indução	6,9	0,53	647	221	0,079	Item 4.3.1
	CC	IPTG 1,0 mM	5,3	0,20	276	178	0,033	Item 4.3.1
	CV	IPTG 1,0 mM	7,1	0,50	511	230	0,099	Item 4.3.1
	CC	LAC 5,0 g/L	6,8	0,27	395	193	0,032	Item 4.3.1
	CV	LAC 5,0 g/L	5,9	0,52	588	235	0,088	Item 4.3.1
	CV	LAC 5,0 g/L	8,5	0,39	574	209	0,048	Santos (2012)
32	CC	S/ indução	11,0	0,24	328	81	0,019	Item 4.3.3.2
	CC	IPTG 1,0 mM	10,1	0,22	384	101	0,020	Item 4.3.3.2
	CC	IPTG 0,5 mM	9,8	0,21	481	121	0,031	Item 4.3.3.3
	CC	LAC 5,0 g/L	10,3	0,23	472	123	0,025	Item 4.3.3.3
31	CV	LAC 5,0 g/L	9,8	0,38	665	165	0,055	Santos (2012)
27	CC	S/ indução	16,4	0,30	561	84	0,023	Item 4.3.3.1
	CC	IPTG 1,0 mM	11,0	0,19	547	210	0,034	Item 4.3.3.1
	CC	LAC 5,0 g/L	14,2	0,25	500	109	0,021	Item 4.3.3.1
25	CV	LAC 5,0 g/L	13,3	0,39	1397	248	0,093	Santos (2012)

CC: células *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>; CV: células *E. coli* BL21(DE3) convencionais; DO: densidade óptica (600 nm); LAC: lactose; max: máximo; P<sub>X</sub>: produtividade de biomassa; P<sub>PspA</sub>: produtividade de PspA; PE: plataforma de indução; T: temperatura de indução; Y<sub>PspA/X</sub>: produção específica de PspA por biomassa.

Os valores de produtividades de biomassa, bem como os valores de concentrações, produções específicas e produtividades de PspA4Pro foram sempre superiores na plataforma de expressão convencional. Isto também foi observado em outros estudos envolvendo a cepa convencional e detoxificada na produção de proteínas recombinantes: fator de células-tronco humanas (UEDA et al., 2016), PspA4Pro (PAREDES, 2018), crisantapastase e proteína fluorescente verde (WILDING et al., 2018). No entanto, há trabalhos em que não houve diferença dessas cepas na produção específica máxima das proteínas recombinantes alvo (RAN et al., 2019; YOO et al., 2019) ou que a produção em ClearColi<sup>®</sup> superou a produção em células convencionais (SONG et al., 2019; AN et al., 2019). Provavelmente as modificações genéticas nas células *E. coli* para a síntese do LPS modificado (MAMAT et al., 2015) sejam responsáveis não somente pelo menor crescimento celular em cultivos com ClearColi<sup>®</sup> (LUCIGEN, 2016), mas também por alterar a síntese de proteína recombinante. Tal comportamento precisa ser cuidadosamente considerado na definição da estratégia de produção da PspA4Pro, uma vez que pode comprometer possíveis benefícios na fase de purificação com a diminuição de gastos com a remoção de endotoxinas.

Os resultados de produtividades de biomassa e PspA4Pro de Santos (2012) com células *E. coli* BL21(DE3) convencionais diferiram daqueles observados no item 4.3.1. De acordo com os dados presentes na Tabela 19 usando o mesmo tipo de indução para as células convencionais, a 37 °C o resultados de Santos (2012) foram inferiores, enquanto que a 25 °C os resultados dele foram superiores aos obtidos no item 4.3.1 a 27 °C. Isto pode ser devido aos tipos de peptona adotados em cada ensaio. Peptonas podem conter em suas composições diferentes tipos e quantidades de carboidratos, aminoácidos e peptídeos (BD, 2015; CLELAND et al., 2007), que podem contribuir para as produções mais intensas de biomassa e proteínas.

#### **4.4 Conclusão**

Nesse capítulo 4, o processo de produção de PspA4Pro pelas linhagem *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> foi avaliado. Diferentes condições de cultivo e indução, incluindo temperatura, indutor e meios complexos de diferentes composições, foram investigadas. Foi evidenciado que as células ClearColi<sup>®</sup> produziram concentrações de PspA4Pro inferiores às células convencionais cultivadas nas mesmas condições. Contudo, enquanto as produtividades em termos de biomassa e proteína das células convencionais demonstraram ser decrescentes

com o tempo, as obtidas com as células de ClearColi<sup>®</sup> foram crescentes, podendo apresentar melhores resultados em cultivos em biorreator com maiores densidades celulares. Além disso, a produção de proteínas nas células ClearColi<sup>®</sup> parece estar diretamente relacionada às concentrações de biomassa e à intensificação de produção causada por pulso de indutor.

Constatou-se ainda que o meio LBMS apresentou os resultados mais favoráveis ao crescimento da biomassa e à produção da proteína recombinante, principalmente sob a indução por pulso de IPTG, que pode ter a sua concentração diminuída a 1/8 do comumente praticado (1 mM) nos experimentos em *shaker*, enquanto estima-se que esta concentração pode ser seguramente diminuída em 30% para biorreator em modo batelada. Destaca-se ainda que os ensaios utilizando o meio LBMS apresentaram resultados superiores em relação ao meio definido sob condições de processo similares de produção de PspA4Pro com ClearColi<sup>®</sup>.

Menores temperaturas proporcionaram maiores produções de biomassa e proteínas, mas em maiores tempos de cultivo. Como em cultivos mais longos, haverá aumento da contribuição dos custos com refrigeração, agitação e gases, a condição de 32 °C desponta como uma alternativa interessante para ser adotada nos cultivos em biorreator, seguindo observações de alguns estudos.

Por fim, a avaliação do processo de produção de PspA4Pro proposta cumpriu o seu objetivo, apresentando resultados que poderão pautar decisões na fase de produção dessa proteína para que, juntamente com estudos do processo de purificação, possam avaliar os possíveis ganhos com a adoção de organismos livres de endotoxinas como plataforma de expressão.

## Capítulo 5: Intensificação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi<sup>®</sup>

Após serem estudadas em *shaker* diferentes condições de processo para produzir a proteína recombinante PspA4Pro em *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> (capítulo 4), focou-se na busca da intensificação desse processo pelo aumento de escala de produção, pela redução dos gastos com meio de cultivo e pela avaliação de diferentes modos de operação (batelada e batelada alimentada) do biorreator.

### 5.1 Introdução

O surgimento de novos equipamentos, processos e métodos operacionais vêm ocasionando imensas melhorias nas plantas de processos químicos, reduzindo substancialmente o tamanho e aumentando de maneira marcante a eficiência das mesmas. Isto é o cerne da chamada intensificação de processos. Trata-se não somente de uma redução dos volumes dos equipamentos e da redução do número de equipamentos de operações unitárias utilizados nos processos, mas também envolve o aumento da capacidade produtiva para um mesmo volume de equipamento, a redução na razão energia consumida no processo por quantidade do produto fabricado e a minimização de emissão de poluentes e desperdícios nas plantas químicas (NIKAČEVIĆ et al., 2012; SANDERS et al., 2012; STANKIEWICZ; ANDRZEJ; MOULIJN, 2000).

A produção da proteína recombinante PspA4Pro em células BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> se insere neste contexto e pode ser avaliada sob esta óptica. A principal vantagem da produção dessa proteína com ClearColi<sup>®</sup> é a inexistência de substâncias endotóxicas no produto final, o que claramente pode resultar em menores custos na etapa de purificação, simplificando o processo de produção de terapêuticos recombinantes em *E. coli*. Contudo, como foi mostrado no capítulo 4, a produção da PspA4Pro em *shaker* foi inferior à observada usando células convencionais. Por esta razão, pode ser importante avaliar esse processo de produção em relação ao aumento de escala e sob o foco de sua intensificação. Os resultados da análise econômica do processo de produção de PspA4Pro por *E. coli* BL21(DE3) convencional apresentados no Capítulo 3 mostraram que a escolha do indutor tem impacto em diferentes componentes do custo do processo. No caso do IPTG, que apesar de ser um insumo

caro, seu uso como indutor favoreceu a redução do tempo de cultivo (em comparação com a lactose) e, conseqüentemente, o gasto com energia na produção de PspA4Pro. Portanto, a utilização de IPTG como indutor é um aspecto que pode ser explorado para a intensificação do processo de produção de PspA4Pro na plataforma ClearColi<sup>®</sup>.

No caso dessa nova plataforma de expressão, *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>, a escassez de informações na literatura sobre o cultivo da mesma em condições escalonáveis é o principal obstáculo para a intensificação do processo de produção da proteína recombinante. De fato, com exceção dos estudos realizados no âmbito do projeto de pesquisa “Intensificação e Integração de Processos de Produção e Purificação da Proteína A de Superfície de Pneumococo” (Processo FAPESP 2015/10.291-8) descritos aqui e em Paredes (2018), não foram encontrados outros trabalhos que abordem o cultivo da ClearColi<sup>®</sup> em biorreatores.

#### 5.1.1 Biorreatores tipo tanque agitado: modos de operação

A produção de proteínas recombinantes terapêuticas tem sido comumente realizada em biorreatores de tanque agitado, embora outros tipos já tenham sido avaliados (CAMPANI et al., 2016). A indústria da biotecnologia tem preferencialmente adotado a produção em batelada na manufatura de tais componentes. Uma evolução natural da batelada para o processo contínuo pode resultar em benefícios significantes para a intensificação do processo de produção (WALTHER et al., 2015). Contudo, dificuldades com contaminação e com flexibilidade de produção em processos contínuos ainda aparecem como limitações para uma maior adoção deste modo de produção na indústria de biotecnologia (MARSCHALL; SAGMEISTER; HERWIG, 2016). Além disso, no caso específico da produção de proteínas recombinantes por sistemas de indução *lac/uv*, a diminuição da retenção plasmidial é um fator adicional que desfavorece o emprego de cultivos contínuos. Assim, a produção semicontínua (batelada-alimentada) tem se apresentado como a alternativa mais viável para intensificar a produção de produtos recombinantes (SHILOACH; FASS, 2005). Neste modo de produção, a alimentação de substratos e outros nutrientes requeridos para o crescimento celular é realizada no decorrer do processo, após uma primeira fase em batelada, para que altas concentrações de biomassa, bem como de produtos, sejam atingidas e removidas no final.

A fim de verificar possíveis ganhos com a adoção do modo de operação batelada-alimentada, não somente variáveis de produção de PspA4Pro (rendimento, concentrações e produtividades), mas também os custos envolvidos foram avaliados e

comparados com os resultados em batelada em condições similares de cultivo (temperatura, meio e indução).

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Procedimento experimental

#### 5.2.1.1 Preparo do inóculo

Procedimento experimental similar ao descrito no capítulo 4 (item 4.2.2) foi realizado para o cultivo das células *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> desde o meio sólido (placas) com ágar até o meio líquido em *shaker*, obtendo-se a suspensão usada para inocular o biorreator. Antecedendo os ensaios em biorreator em meio complexo, partiu-se da incubação de placas LB-ágar estriadas com 10 µL de suspensão de células ClearColi<sup>®</sup> pET37b(+)/PspA4Pro armazenadas em criotubos a -80 °C. Após incubação, transferiu-se uma colônia isolada para 40 mL de meio líquido LBMS (pré-inóculo) em Erlenmeyer 500 mL a 32 °C e 250 rpm. Atingida a densidade óptica (DO) próxima do valor 2,0 (600 nm), foi transferida uma alíquota do caldo de cultivo a fim de iniciar três inóculos em DO igual a 0,1 usando Erlenmeyers 500 mL contendo 100 mL do meio LBMS em cada, os quais foram mantidos a 32 °C e 300 rpm até que uma DO~2,0 fosse novamente alcançada. Finalmente, os inóculos produzidos foram misturados e nova alíquota do caldo final resultante foi utilizada para inocular o experimento em biorreator em uma DO inicial de 0,1. Já para os ensaios em biorreator em meio definido, partiu-se da incubação de placas com ágar em meio definido, estriadas com 10 µL de suspensão de células ClearColi<sup>®</sup> pET37b(+)/*pspA4Pro*, armazenadas em criotubos a -80 °C, seguindo os mesmos procedimentos empregados para o meio complexo até o final do preparo do inóculo, mas sempre usando o meio definido, conforme Tabela 20.

**Tabela 20.** Composição inicial dos meios complexos e definidos usados no preparo e durante os ensaios com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator

Substância	Unid	Meio Complexo*			Meio Definido		
		Shaker	Batelada	AR	Shaker	Batelada	AR
Glicerol	g/L	20,0	40,0	800,0	20,0	40,0	800,0
Glicose	g/L	-	-	-	-	-	-
Triptona	g/L	-	-	-	-	-	-
Peptona de Soja	g/L	10,0	10,0	10,0	-	-	-
Extrato de Levedura	g/L	5,0	5,0	5,0	-	-	-
NaCl	g/L	-	-	-	-	-	-
MgSO <sub>4</sub>	g/L	0,5	0,5	0,5	1,6	20,0	20,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	g/L	3,4	3,4	3,4	17,7	17,7	21,8
NH <sub>4</sub> Cl	g/L	2,7	2,7	2,7	-	-	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	g/L	9,0	9,0	9,0	-	-	-
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	g/L	0,7	0,7	0,7	17,7	17,7	21,8
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	g/L	-	-	-	5,3	5,3	6,4
Ácido cítrico	g/L	-	-	-	2,3	2,3	2,3
Fe(III)citrato	mg/L	100,8	100,8	100,8	133,3	133,3	40,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	mg/L	2,5	2,5	2,5	3,3	3,3	4,0
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	mg/L	15,0	15,0	15,0	20,0	20,0	23,5
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0	2,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	mg/L	3,0	3,0	3,0	4,0	4,0	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	mg/L	2,1	2,1	2,1	2,8	2,8	4,0
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	mg/L	33,8	33,8	33,8	33,8	33,8	16,0
EDTA	mg/L	14,1	14,1	14,1	18,8	18,8	13,0
Canamicina**	mg/L	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Tiamina	mg/L	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0	45,0

\*LB-Miller Modificado com sais (LBMS); \*\*Concentração elevada por meio de pulso no decorrer dos cultivos; AR: alimentação do reator; Unid: unidade.

#### 5.2.1.2 Cultivos em biorreator

Os experimentos foram realizados todos em biorreator de 5 L a 32 °C, partindo de 3,5 L, usando o sistema de supervisão e controle baseado no software SuperSys\_HCDC<sup>®</sup>, desenvolvido pela equipe de pesquisadores do LADABio/DEQ-UFSCar (HORTA, 2011). O aparato experimental já foi mostrado no capítulo 2 na Figura 1 e detalhadamente descrito no item 2.2.3. As mesmas metodologias analíticas para acompanhamento do crescimento da biomassa e da produção de proteína, bem como as análises descritas no item 2.2.3 para avaliação de massa seca, glicerol, glicose, lactose, formação de ácidos orgânicos e de retenção plasmidial. Os custos envolvidos nos cultivos foram avaliados pela metodologia desenvolvida

e exposta no capítulo 3. Nos experimentos em batelada-alimentada houve a inclusão do frasco na montagem experimental, onde foi armazenada a alimentação do reator (AR) adicionada na fase semicontínua. O meio suplementar foi mantido sob agitação constante e transferido ao reator com o auxílio de uma bomba peristáltica (Ismatec). A composição dos meios utilizados na fase batelada e na alimentação é descrita na Tabela 20.

Nos ensaios em batelada, para evitar inibição pelo substrato, o meio foi formulado com concentração inicial de 40 g/L de glicerol. Pulsos de soluções de IPTG, cuja concentração adotada diferiu em cada cultivo, e glicerol (300 g/L) foram, respectivamente, feitos quando a concentração celular atingiu 10 g/L de massa seca celular (MS) e uma hora após a indução da produção de PspA4Pro. A suplementação com pulsos de glicerol é importante para evitar que a síntese de proteína seja limitada pelo esgotamento da fonte de carbono.

Já nos ensaios em batelada-alimentada, na concentração celular de 10 gMS/L era iniciada a fase de alimentação do reator (AR) até que a biomassa alcançasse a concentração de 60 gMS/L, condição estabelecida para a adição do pulso de IPTG. Tanto na fase de alimentação, como na fase de indução, a vazão de alimentação foi ajustada seguindo uma velocidade de crescimento celular fixa a partir dos resultados experimentais de DO na respectiva fase, conforme descrito em Horta (2011). Além disso, a quantidade de glicerol presente no meio de cultivo era estimada pela utilização de kit enzimático-colorimétrico (Triglicérides – PP, ANALISA), para avaliar se havia acúmulo dessa substância no meio e ajustar o fornecimento do meio suplementar, se necessário.

Um total de 5 experimentos em biorreator foi realizado para estudar a produção de PspA4Pro por ClearColi<sup>®</sup> em diferentes estratégias de indução e modos de operação. A Tabela 21 resume as principais características dos cultivos realizados e os respectivos objetivos.

**Tabela 21.** Cultivos em biorreator com *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>: características e objetivos

Cultivo ID	Indutor/ Concentração	Meio	Modo	Pulso canamicina	Objetivo
#1	IPTG/1 mM	C	B	Sim	Cultivo referência em meio complexo para avaliar o escalonamento e a estratégia de intensificação (pulso canamicina <sup>1</sup> )
#2	IPTG/0,7mM	C	B	Sim	Avaliar estratégia de intensificação (redução da concentração de IPTG; perfil gradativo de aumento de pH e pulso canamicina <sup>2</sup> )
#3	IPTG/0,7mM	D	B	Sim	Avaliar escalonamento meio definido e estratégia de intensificação (redução da concentração de IPTG; perfil gradativo de aumento de pH e pulso canamicina <sup>2</sup> )
#4	IPTG/1,1mM	C	BA	Sim	Avaliar modo de operação e produção de proteína recombinante em alta densidade celular
#5	IPTG/1,1mM	D	BA	Sim	Avaliar modo de operação e produção de proteína recombinante em alta densidade celular

<sup>1</sup>pulso extra de canamicina adicionado 3 h após a indução; <sup>2</sup>pulsos extra de canamicina adicionados no momento da indução e 3 h após a indução. B: batelada; BA: B: batelada-alimentada; C: complexo; D: Definido.

O Cultivo #1 consistiu em uma batelada em biorreator de 3,5 L nas melhores condições (meio, temperatura e tipo de indutor) identificadas pelos resultados expostos no capítulo 4: LBMS, 32 °C e IPTG. Neste cultivo, utilizou-se a concentração, de IPTG (1 mM) que vem sendo empregada rotineiramente nos cultivos de *rE. coli* realizados no grupo (SANTOS, 2012; CAMPANI, 2014 e 2018; SILVA, 2015) e, portanto, o cultivo #1 foi uma referência para comparação com outras estratégias de indução, que utilizaram menores concentrações de IPTG. Além disso, a comparação com os resultados obtidos em *shaker*, nas mesmas condições, permitiu avaliar a produção de PspA4Pro em escala de biorreator. Uma alteração implementada nesse cultivo envolveu a adição extra de canamicina, a fim de favorecer uma maior retenção plasmidial. Desta forma, a concentração de canamicina durante o cultivo foi aumentada de 50 para 100 mg/L, por meio da aplicação de um pulso 3 horas após o início da fase de indução, para aumentar a pressão seletiva.

O cultivo #2 foi realizado nas mesmas condições de meio e temperatura do cultivo #1, mas usando como indutor IPTG 0,7 mM. Esse valor foi estipulado levando em consideração o fator de redução de 8 vezes na concentração de IPTG (ensaios em *shaker*, item 4.3.4), mas também o aumento de concentração celular final esperado em aproximadamente 5 vezes para o biorreator em relação ao *shaker*. Além da nova concentração de IPTG, outras duas mudanças na estratégia de cultivo foram avaliadas no Cultivo #2: i) pulsos adicionais de canamicina no momento da indução e 3 h após a mesma, aumentando a concentração desse antibiótico no meio de 50 para 100 mg/L e, posteriormente, para 150 mg/L; ii) rampa de aumento gradativo do pH de 6,3 para 6,7 nas primeiras 6 h de cultivo. Conforme será detalhado a seguir, essas modificações foram introduzidas a partir da observação dos resultados do Cultivo #1 para tentar manter uma maior retenção plasmidial ao final da fase de indução e uma velocidade máxima específica de crescimento semelhante à obtida em *shaker*.

No cultivo #3 o desempenho da ClearColi em biorreator foi avaliado em meio definido (Tabela 20) adotando as mesmas estratégias do cultivo #2 de redução de concentração de IPTG, de aplicação de pulsos de canamicina e de rampa de aumento de pH.

Para investigar a influência do modo de operação na intensificação da produção de PspA4Pro em cultivo com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator, foram conduzidos os cultivos #4 e #5 em batelada-alimentada. Desta forma, foi possível avaliar os resultados em culturas de alta densidade celular e identificar o modo de operação mais eficiente e menos custoso. Os cultivos em batelada foram conduzidos em condições de operação similares às estabelecidas nos cultivos mais efetivos em batelada (cultivos #2 e #3), exceto pelo acréscimo

da fase de alimentação no cultivo, cuja composição pode ser vista na Tabela 20. A indução foi realizada com um pulso de IPTG 1,1 mM, uma redução em 30% do valor usualmente aplicado em tal modo de operação (1,5 mM) para produzir proteínas recombinantes em nosso grupo de pesquisa (HORTA et al., 2012), mantendo o mesmo procedimento de estimativa de concentração de indutor adotada nos cultivos #2 e #3, baseado nos experimentos de *scale-down* realizados em *shaker* e na estimativa na concentração final de biomassa almejada em biorreator. Em geral o cultivo #5 foi conduzido nas mesmas condições do cultivo #4, mas usando o meio definido (Tabela 20). Além disso, o segundo pulso de canamicina foi antecipado e adicionado duas horas depois do momento da indução com IPTG, para tentar melhorar o perfil de retenção plasmidial do cultivo #5 em relação ao do cultivo #3, no qual foi identificada uma baixa retenção plasmidial nas 5 horas finais do cultivo.

### 5.3 Resultados e Discussão

A partir da formação de biomassa e da produção de proteína recombinante em ClearColi<sup>®</sup> usando meio complexo (capítulo 4) e meio definido (PAREDES, 2018), focou-se em aprofundar o conhecimento sobre o desempenho das células ClearColi<sup>®</sup> em diferentes modos de produção em biorreator, meios e estratégias de indução. Em termos de estratégias de indução, foram avaliadas diferentes concentrações de IPTG assim como a adição de pulsos de canamicina, buscando a intensificação do processo e a produção menos custosa de PspA4Pro usando esse microrganismo detoxificado. Nos tópicos a seguir, os resultados obtidos em cada cultivo são discutidos.

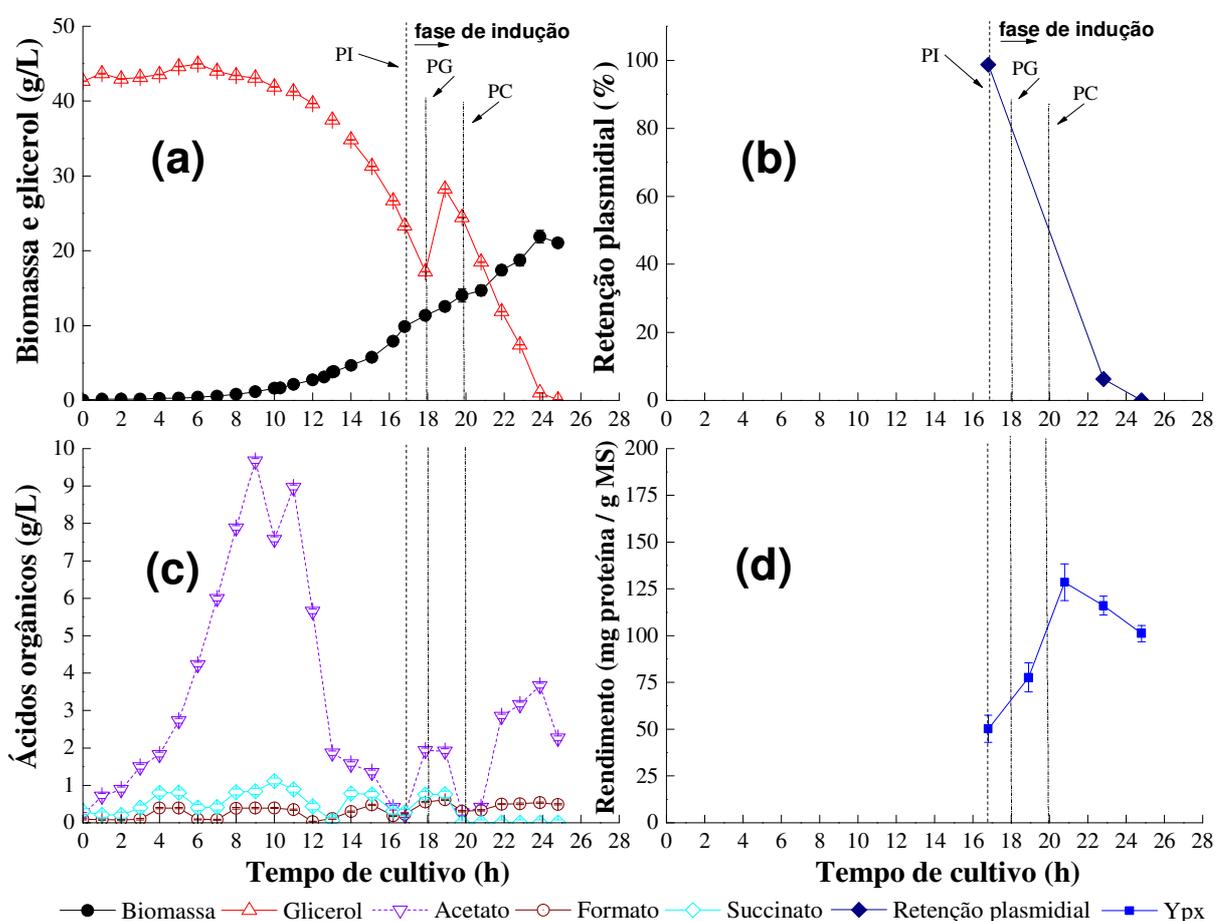
#### 5.3.1 Cultivo #1: Batelada usando meio complexo e indução por pulso de IPTG 1,0 mM

Os principais resultados do cultivo #1 estão apresentados na Figura 29, enquanto que na Figura 30 estão destacadas as principais variáveis com aquisição *online* acompanhadas durante o experimento.

Após 24 h de cultivo, a concentração celular alcançou 20 g/L, com rendimento em biomassa de 0,38 gMS/gglicerol. Esse valor é inferior ao observado por Santos (2012) em cultivos de *E. coli* convencional (0,45 gMS/gglicerol) também conduzido em meio complexo, mas utilizando a peptona de soja Phytone como fonte de nitrogênio. Da mesma forma, a velocidade específica máxima de crescimento alcançada no Cultivo #1 com ClearColi<sup>®</sup>

( $0.334 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ) foi significativamente menor que o valor de  $0,62 \text{ h}^{-1}$  observado no cultivo em biorreator conduzido por Santos (2012). Esse fato já era esperado, uma vez que o próprio manual do fornecedor da ClearColi<sup>®</sup> afirma que essas células crescem aproximadamente em uma velocidade 50% menor do que as células BL21(DE3) convencionais (LUCIGEN, 2016).

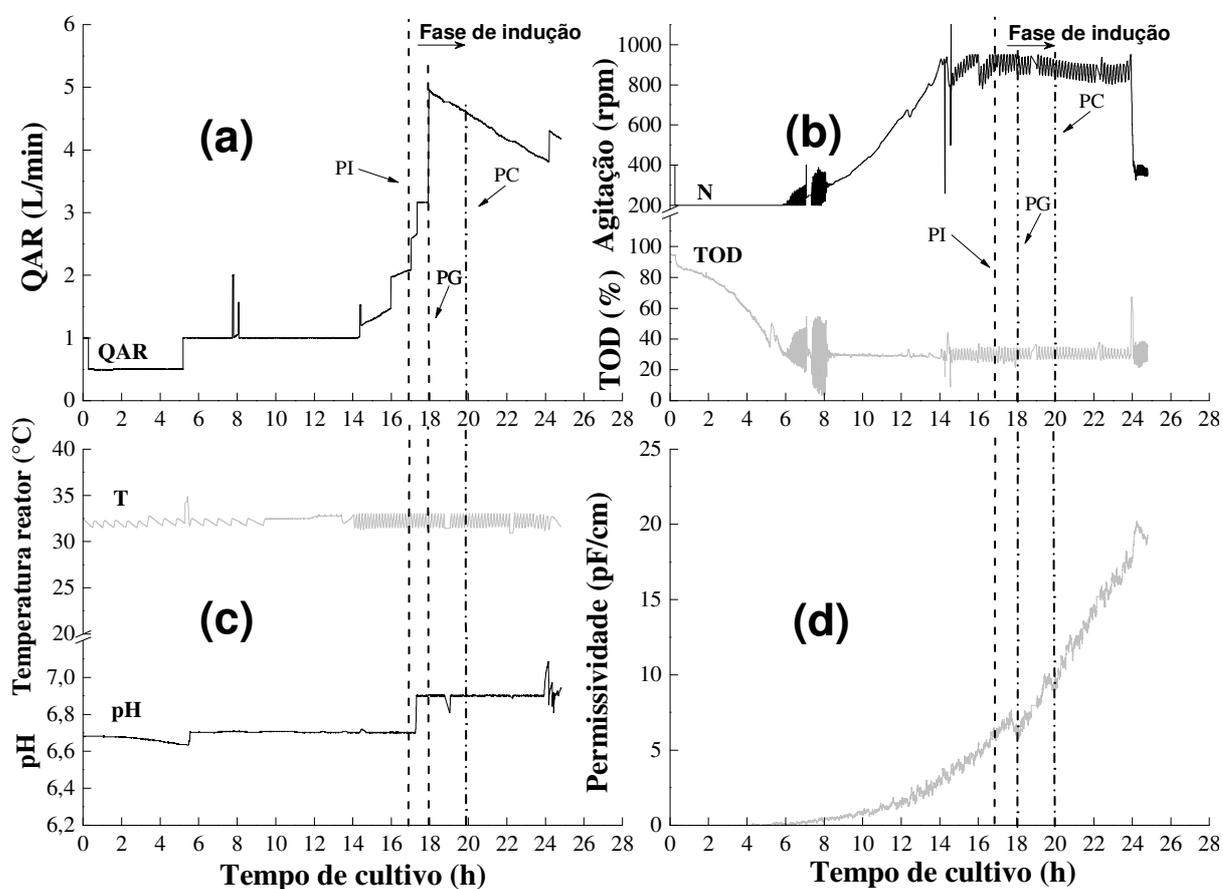
**Figura 29.** Principais resultados do cultivo #1\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a  $32 \text{ }^\circ\text{C}$  usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,0 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC: pulso de canamicina.



Altas quantidades de acetato acumuladas entre 4 e 13 horas do cultivo (Figura 29.c) podem estar relacionadas com a rápida assimilação de carboidratos presentes na fonte de nitrogênio utilizada no Cultivo #1. Formação de acetato nesta fase do cultivo também foi observada por Santos (2012), mas a concentração alcançada neste caso foi menor ( $0,9 \text{ g/L}$ ). Destaca-se que fontes de nitrogênio de diferentes fornecedores foram utilizadas no experimento de Santos (Phytone, BD) e no presente trabalho (HYSOY, KERRY), as quais

podem apresentar diferentes seqüências peptídicas e composições de carboidratos (MICHIELS et al., 2011). Conforme esperado, o ácido acético formado foi reassimilado. Outros ácidos orgânicos (fórmico, succínico) em concentrações de até 1 g/L foram detectados ao longo do Cultivo #1.

**Figura 30.** Principais variáveis com aquisição *online* do cultivo #1. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,0 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC: pulso de canamicina;  $Q_{AR}$ : vazão do ar; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido.



O crescimento de células ClearColi<sup>®</sup> em biorreator foi mais lento do que os experimentos em *shaker* conduzidos nas mesmas condições de temperatura e meio. A máxima velocidade de crescimento celular em biorreator ( $0.334 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ ) foi 30% menor que as estimadas nos experimentos em *shaker*. Este crescimento mais lento pode estar relacionado às maiores diferenças das condições experimentais que as células foram expostas quando elas foram transferidas do inóculo para a fase de cultivo em cada caso. Os experimentos em *shaker* foram operados praticamente nas mesmas condições de preparação do inóculo, mantendo

escala, volume e condições operacionais em *shaker*. No cultivo em biorreator, a agitação por impelidores e a aeração pelo borbulhamento de gás podem exigir certa adaptação das células. Uma vez que as células ClearColi<sup>®</sup> apresentam modificações em sua membrana (MAMAT et al., 2015), a tensão de cisalhamento pelo contato direto das células com os impelidores e as bolhas de gás podem ter influenciado no crescimento das células. Além disso, o início da fase experimental em biorreator com pH fixado no valor 6,7 pode ter dificultado a adaptação das células e interferido no crescimento da biomassa (Figura 30.c), uma vez que o pH inicial do cultivo do inóculo em *shaker* é ajustado para 6,3.

O rendimento de produção de proteína recombinante por biomassa foi crescente até 4 horas depois da indução por IPTG (Figura 29.d), decrescendo posteriormente até o final do experimento. Este comportamento final esteve provavelmente relacionado com o aumento do estresse metabólico (CARNEIRO, FERREIRA e ROCHA, 2013; LI, ZHANG e TAN, 2006), que pode ser evidenciado pela baixa retenção plasmidial nas quatro horas finais do cultivo (PAPANEOPHYTOU; KONTOPIDIS, 2016). Um perfil similar de rendimento de PspA4Pro por biomassa foi constatado nos experimentos em *shaker* nas mesmas condições de temperatura e indução.

A Figura 30 mostra a atuação eficiente dos sistemas de controle embarcados no SuperSys\_HCDC. Por meio da manipulação da vazão de ar (Figura 30.a) e da frequência de agitação (Figura 30.b), a concentração de O<sub>2</sub> dissolvido, que foi mensurada em termos de tensão de oxigênio dissolvido (TOD), foi mantida em 30% da saturação (Figura 30.b), conforme desejado. A Figura 30.c mostra a manutenção da temperatura em 32°C e o perfil de variação de pH durante o cultivo. Destaca-se que a elevação do pH foi necessária para que não ocorresse limitação do crescimento e da síntese de proteína por falta de fonte de nitrogênio, uma vez que a solução de NH<sub>4</sub>OH utilizada para controlar o pH é também fonte de nitrogênio. Finalmente na Figura 30.d observa-se o perfil dos dados de permissividade gerados pela sonda de biomassa, que acompanharam, como esperado, o aumento da concentração celular (Figura 29.a).

### 5.3.2 Cultivo #2: Batelada usando meio complexo e indução por pulso de IPTG 0,7 mM

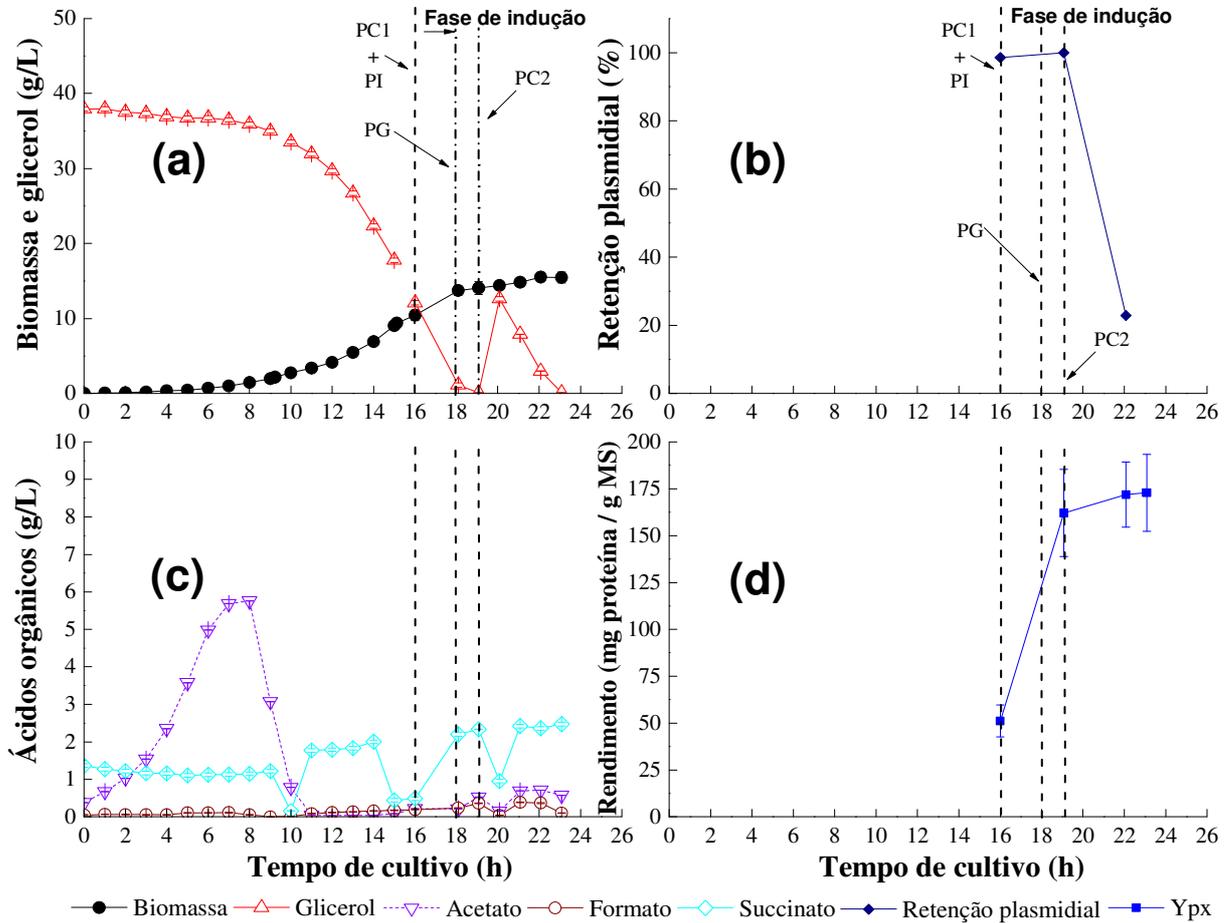
Os principais resultados obtidos no Cultivo #2 estão reproduzidos nas Figuras 31 e 32. Em termos de produção de biomassa e formação de ácidos orgânicos, os perfis apresentados nas Figuras 31.a e c são semelhantes aos já discutidos para o Cultivo #1 (Figura

29 a e c), assim como o rendimento em biomassa (0,40 gMS/gglicerol). Por outro lado, a indução com IPTG 0,7 mM e a estratégia diferenciada com a canamicina aumentaram a produção de proteína recombinante em biorreator com ClearColi<sup>®</sup> (Figura 31.d), possivelmente pela elevação dos valores de retenção plasmidial pós-indução no cultivo #2 (Figura 31.b) aos valores observados no cultivo #1 (Figura 29.b). Após a indução, todos os rendimentos de PspA4Pro por biomassa foram superiores a 150 mg/gMS e 25 % maiores que os valores máximos correspondentes aos alcançados no Cultivo #1 (Figura 29.d). Aumentando a concentração de canamicina no meio imediatamente antes da indução para 100 mg/L e depois de 3 horas para 150 mg/L, pela aplicação de pulsos extra de 50 mg/L de canamicina, permitiu uma maior retenção plasmidial e, conseqüentemente, uma maior produção de proteína recombinante (Figuras 31.b e d) pela imposição de uma maior pressão seletiva. O cultivo #2 demonstrou que a indução usando IPTG 0,7 mM em biorreator, combinado com uma estratégia de adição de antibiótico é uma alternativa para aumentar a produção de PspA4Pro em ClearColi<sup>®</sup> pelo aumento do rendimento de proteína recombinante por biomassa.

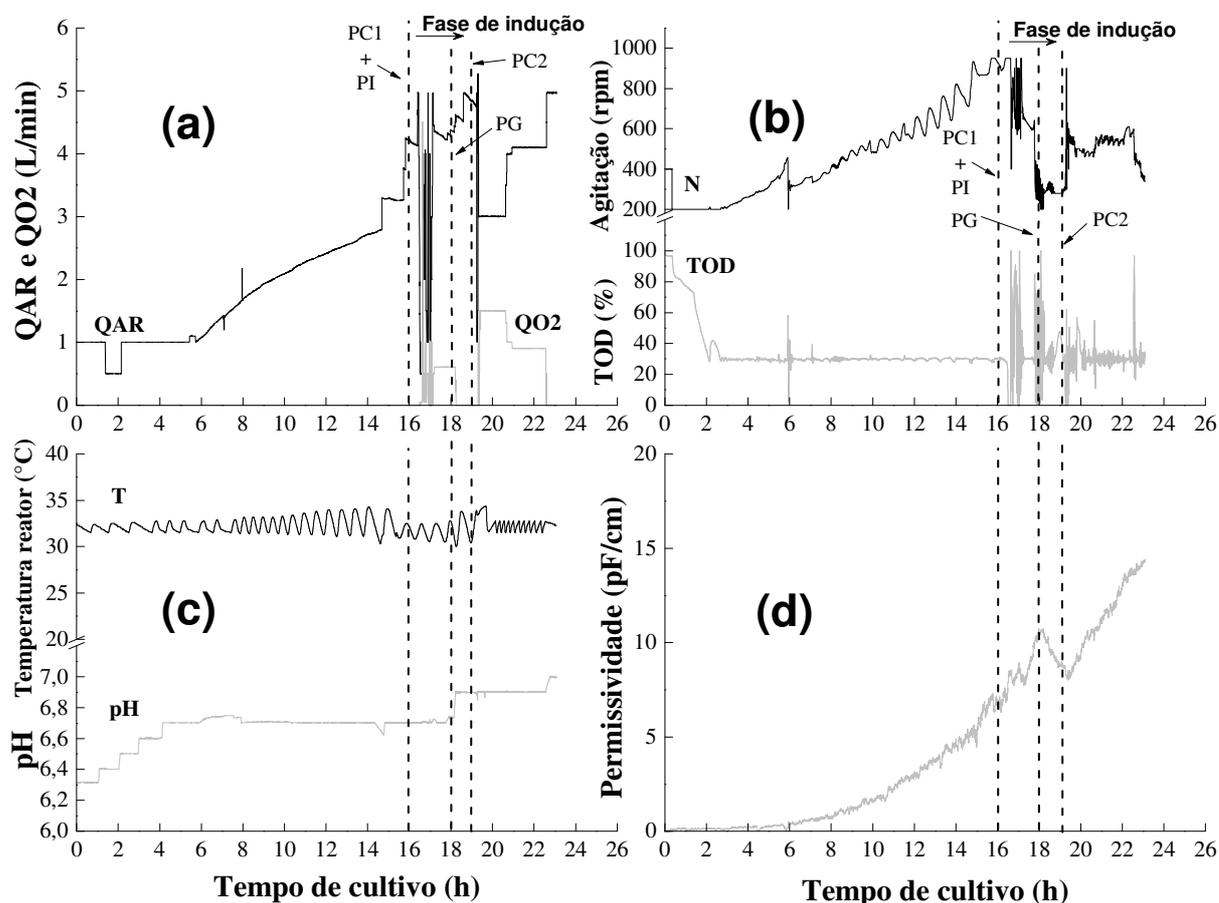
O aumento gradual do pH e a manutenção do valor de TOD em 30% por período maior do cultivo pode ter contribuído para uma menor formação de acetato. A Figura 31.c apresentou menores valores de concentração de acetato entre 4 e 13 h de experimento no Cultivo #2, quando comparado aos resultados do cultivo #1 (Figura 29.c). Diferentemente do cultivo #1, o valor do pH foi aumentado de 6,3 para 6,7 com degraus de 0,1 a cada hora, usando solução de NH<sub>4</sub>OH (Figura 32.c), o que pode ter causado a antecipação do valor alvo de TOD (30%) no cultivo #2 (Figura 32.b). Contudo, essa ação não parece ter influenciado a adaptação das células ClearColi<sup>®</sup> no início do ensaio em biorreator, uma vez que a velocidade máxima específica de crescimento do cultivo #2 (0,339 h<sup>-1</sup>) foi a mesma do cultivo #1.

Durante o cultivo #2 houve no geral uma atuação eficiente do SuperSys\_HCDC (Figura 32). Contudo, houve uma maior variação da concentração do oxigênio dissolvido após indução, cujo alvo permaneceu como 30% da saturação (Figura 32.b). A produção mais intensa de PspA4Pro por biomassa (Figura 31.d) demandou a inserção de oxigênio puro (Figura 32.a), que parece ter ocasionado uma maior dificuldade para a manutenção do oxigênio dissolvido no valor alvo pelo sistema.

**Figura 31.** Principais resultados do cultivo #2\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>1</sub>: pulsos de canamicina.



**Figura 32.** Principais variáveis com aquisição *online* do cultivo #2. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PCi: pulsos de canamicina;  $Q_{AR}$ : vazão do ar;  $Q_{O_2}$ : vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido.



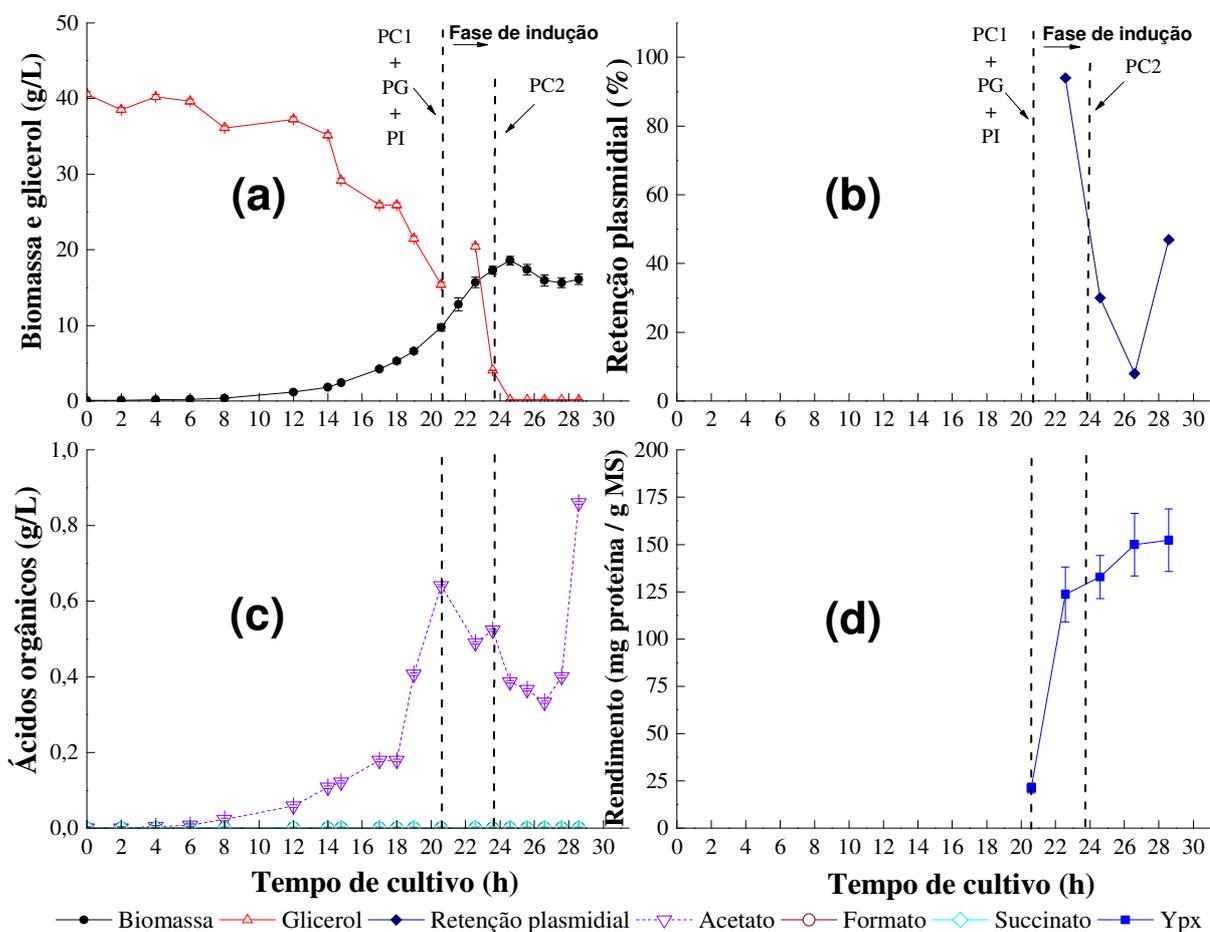
### 5.3.3 Cultivo #3: Batelada usando meio definido e indução por pulso de IPTG 0,7 mM

No cultivo #3 o desempenho da ClearColi<sup>®</sup> em biorreator foi avaliado em meio definido usando as mesmas estratégias do cultivo #2, que foi conduzido em meio complexo. Os principais resultados desta proposta de cultivo podem ser vistos nas Figuras 33 e 34.

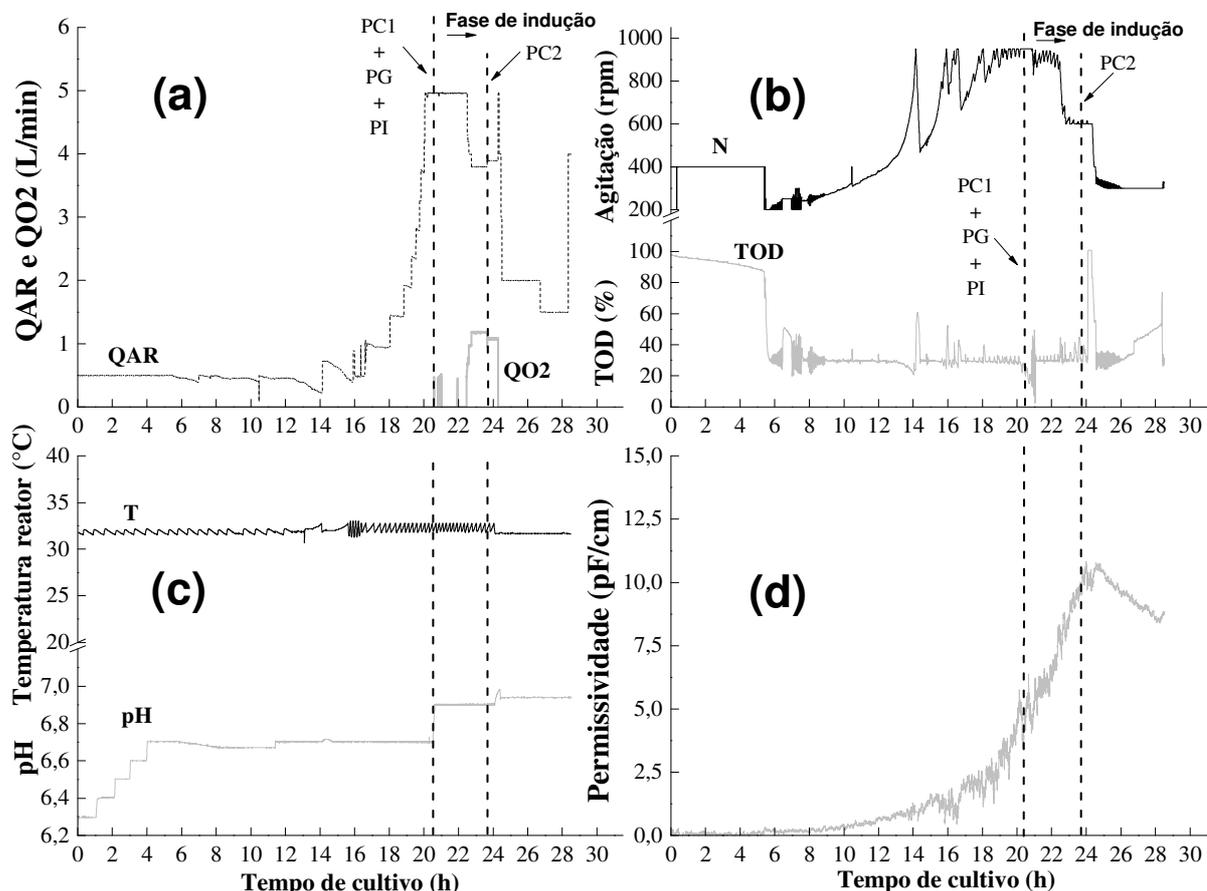
O crescimento de ClearColi<sup>®</sup> foi mais lento usando meio definido. A partir dos dados de concentração de biomassa mostrados na Figura 33.a, a velocidade máxima específica de crescimento celular foi estimada em  $0,260 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$ , valor 25% inferior ao calculado para o meio complexo ( $0,339 \text{ h}^{-1}$ ) no Cultivo #2. Por isso, o cultivo #3 levou aproximadamente 5 horas a mais para atingir as condições de biomassa para a indução (10 g/L) em relação ao cultivo #2 (Figura 31.a). Baixas concentrações de ácidos orgânicos foram

observadas no início do cultivo (Figura 33.b), em contraste com a elevada formação de ácidos orgânicos registrada nos cultivos #1 e #2, com meio complexo (Figuras 29.c e 31.c), o que reforça o papel dos nutrientes presentes na peptona na formação desses metabólitos. Além disso, a magnitude da velocidade específica máxima de crescimento celular em biorreator também foi menor que a determinada a partir dos experimentos em *shaker* (PAREDES et al, 2019), apesar da rampa de aumento gradativo do pH aplicada no cultivo #3 (Figura 34.c). De acordo com o discutido no item 5.3.1, este fato pode estar relacionado aos efeitos sobre as células das diferentes condições operacionais impostas durante o ensaio em biorreator (tensão de cisalhamento pela agitação por impelidor e pela oxigenação por borbulhamento de gases).

**Figura 33.** Principais resultados do cultivo #3\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina.



**Figura 34.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #3. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 0,7 mM para produzir a proteína recombinante. TOD: tensão de oxigênio dissolvido; PI: pulso do indutor; PG: pulso de glicerol; PCi: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator.



O cultivo com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator usando meio definido no modo batelada apresentou rendimento em biomassa de  $0,48 \pm 0,02$  gMS/g glicerol, significativamente superior aos valores observados com meio complexo e também ao observado com a *E. coli* convencional  $0,44 \pm 0,01$  gMS/g glicerol em meio definido (CAMPANI, 2018). Em termos de rendimento de PspA4Pro por célula, o valor foi similar ao do cultivo #2, com meio complexo (Figuras 33.d e 31.d), sendo  $152 \pm 16$  e  $173 \pm 21$  mg PspA4Pro/gMS, respectivamente. Portanto, a presença de nutrientes do meio complexo não favoreceu a produção de PspA4Pro nem a formação de biomassa, impactando apenas a velocidade específica de crescimento. Interessante notar que no cultivo #3 os rendimentos de PspA4Pro por biomassa poderiam ter sido superiores, uma vez que houve uma dramática redução da retenção plasmidial pelas células (Figura 33.b) e de células viáveis (Figura 34.d)

na segunda metade da fase de indução, o que poderia ter sido evitado pela antecipação do segundo pulso de canamicina.

#### 5.3.4 Cultivos semicontínuos: avaliação da produção da PspA4Pro em cultivos com ClearColi<sup>®</sup> de alta densidade celular

Para investigar a possibilidade de intensificação da produção de PspA4Pro em cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator em cultivos em alta densidade celular, foram conduzidos os cultivos #4 e #5 em batelada-alimentada em condições similares de temperatura e meio as dos cultivos #2 e #3, exceto pelo acréscimo da fase de alimentação no cultivo e pela maior concentração do pulso de IPTG 1,1 mM, devido à maior concentração celular durante a indução.

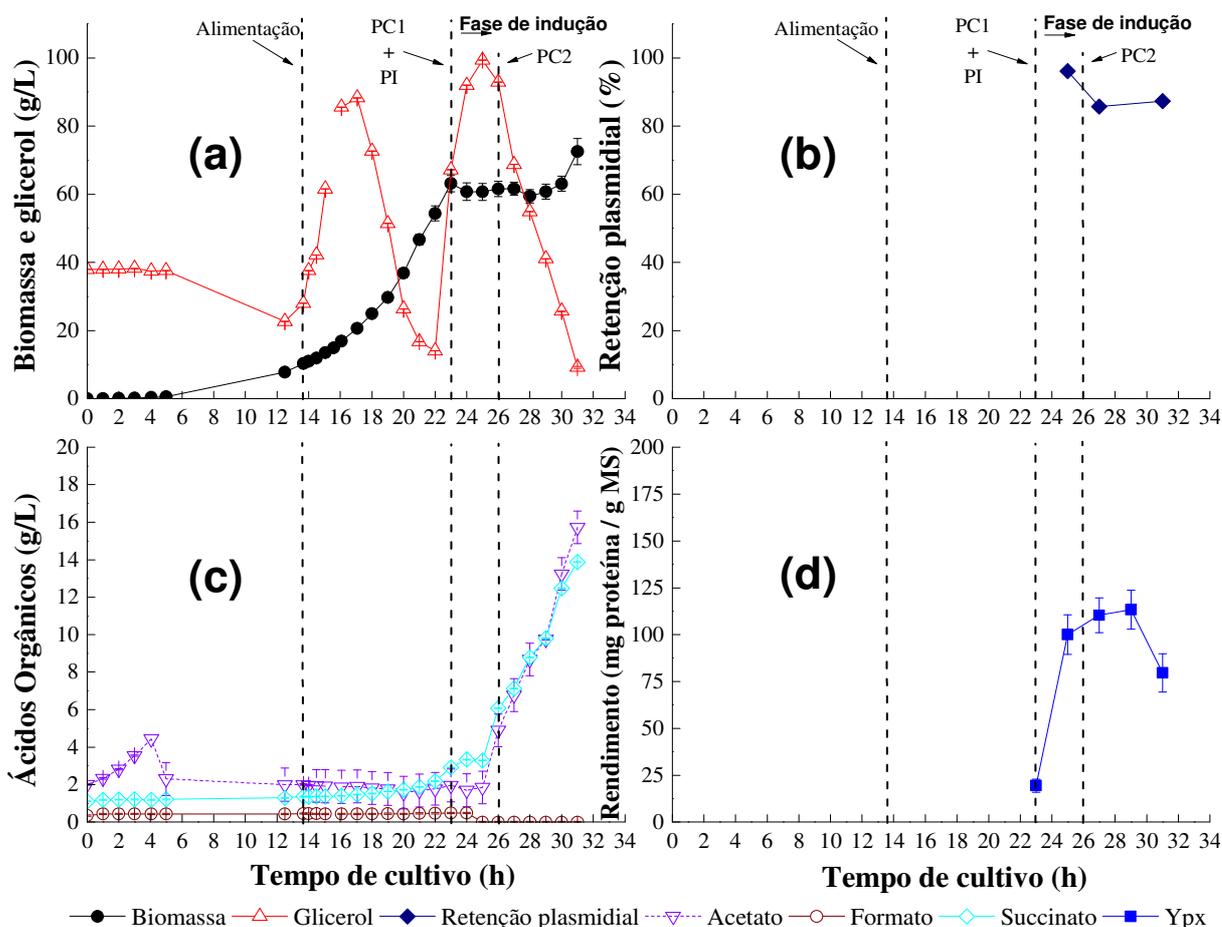
##### 5.3.4.1 Cultivos em batelada-alimentada em meio complexo com indução por pulso de IPTG 1,1 mM

Os principais resultados e as variáveis com aquisição *online* do Supersys\_HCDC durante a batelada-alimentada em meio complexo podem ser observados nas Figuras 35 e 36.

No reator operado em modo batelada-alimentada houve uma maior produção de PspA4Pro em relação ao cultivo em batelada em meio complexo. Apesar de o cultivo com ClearColi<sup>®</sup> em alta densidade celular ter apresentado um menor rendimento de proteína por biomassa que o visto no cultivo #2 (Figuras 35.d e 33.d, respectivamente), em batelada-alimentada foi possível alcançar uma concentração de biomassa três vezes maior que na batelada e, conseqüentemente, foi produzida quase três vezes mais proteína recombinante ( $5.5 \pm 0.8$  g) que o cultivo #2 ( $2.1 \pm 0.3$  g). Contudo, de maneira semelhante ao procedimento adotado nos ensaios batelada, a produção de PspA4Pro por biomassa poderia ser aumentada pelo ajuste da concentração de IPTG, uma vez que a estratégia com canamicina escolhida para o cultivo garantiu uma alta retenção plasmidial (Figura 35.b), ou seja, mantendo o aumento da concentração de canamicina imediatamente antes da indução de 50 para 100  $\mu\text{g/L}$  e 3 horas após de 100 para 150  $\mu\text{g/L}$ . De fato, conforme pode ser visto na Figura 31.d, o rendimento em proteína no cultivo #2 foi maior, o que sugere que a concentração de IPTG empregada (1,1 mM) talvez tenha sido insuficiente para induzir eficientemente a síntese de proteína por todas as células presentes. O elevado acúmulo de ácidos orgânicos como resultado do estresse

metabólico das células é outro fator que pode ter afetado a síntese de proteína recombinante (SINGHA et al, 2017; BERNAL; CASTAÑO-CEREZO; CÁNOVAS, 2016; SILVA, 2015), justificando o menor rendimento apresentado.

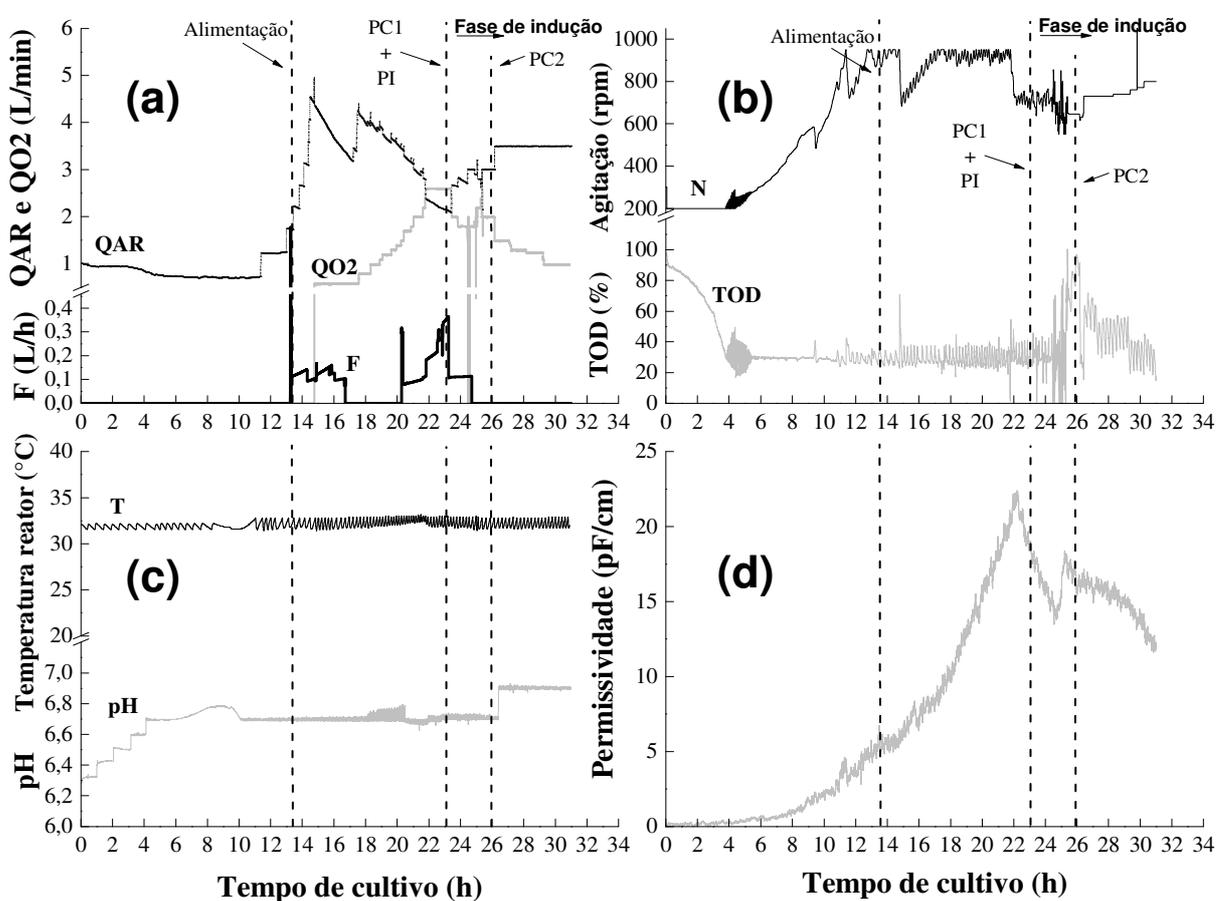
**Figura 35.** Principais resultados do cultivo #4\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PC<sub>1</sub>: pulsos de canamicina.



A formação de ácidos orgânicos foi observada ao longo de todo o cultivo #4 (Figura 35.c). Durante a fase de indução, houve aumento contínuo da concentração de ácidos orgânicos no meio de cultivo com ClearColi<sup>®</sup>. Conforme já discutido anteriormente, a formação de ácidos orgânicos pode estar relacionada com a assimilação de nutrientes, provavelmente carboidratos, presentes na peptona HYSOY. Como o meio de alimentação do cultivo #4 também continha peptona, a formação dos metabólitos se intensificou durante a fase semicontínua devido ao aumento da concentração celular e ao acúmulo de glicerol. De

acordo com as Figuras 35.c, 36.a e 36.d este fato pode ter prejudicado a replicação de células viáveis, uma vez que a permissividade e a vazão de oxigênio puro diminuíram principalmente durante as cinco horas finais do cultivo, quando o nível da concentração de ácidos orgânicos no meio esteve acima de 15 g/L.

**Figura 36.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #4. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio complexo induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. F: vazão alimentação; PI: pulso do indutor; PCi: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido.



Após a indução o valor do oxigênio dissolvido apresentou uma maior variação (Figura 36.b). Com a produção mais intensa de PspA4Pro em alta densidade celular (Figura 35.d), houve reduções abruptas do crescimento celular e da demanda por oxigênio pelas células. Devido à alta vazão de oxigênio puro fornecida pelo sistema de controle até esse momento (Figura 36.a), instantaneamente foi identificado um alto acúmulo de oxigênio dissolvido no meio de cultivo. Em resposta a esta nova condição, ocorreu o contínuo reajuste

das variáveis manipuladas (frequência de agitação e vazões de oxigênio e ar) pelo sistema de controle do SUPERSYS\_HCDC, o que trouxe certa instabilidade para a manutenção do oxigênio dissolvido no valor alvo. Contudo, parte desta instabilidade pode estar ligada à rápida diminuição da quantidade de células viáveis (Figura 36.d), que causou mudanças no comportamento do cultivo #4.

#### *5.3.4.2 Cultivo em batelada-alimentada em meio definido com indução por pulso de IPTG 1,1 mM*

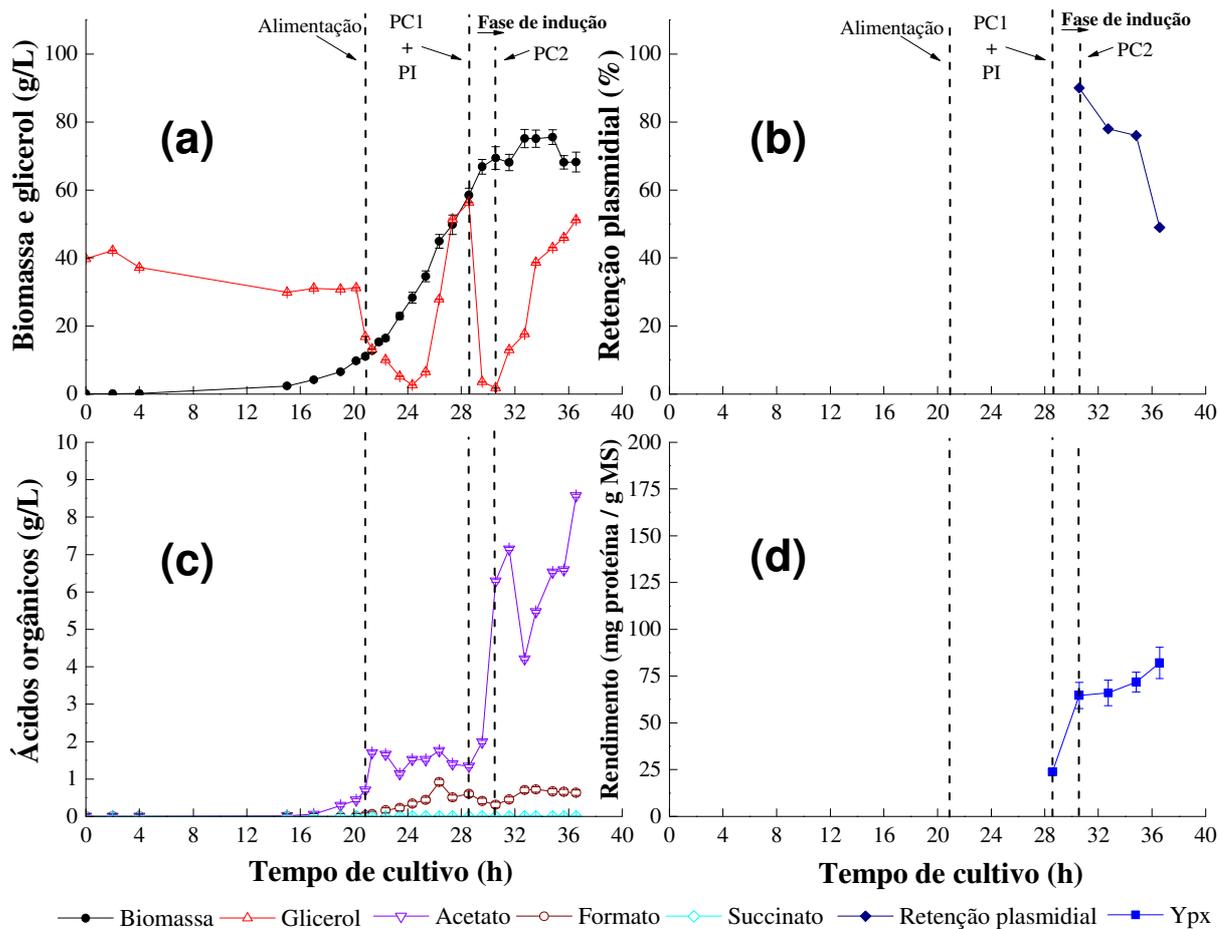
No cultivo #5, a produção de PspA4Pro em ClearColi foi conduzida no biorreator em modo batelada-alimentada em meio definido. A estratégia de indução foi idêntica à do cultivo #4 (IPTG 1,1 mM), mas o segundo pulso de canamicina foi antecipado em uma hora na fase de indução. As figuras 37 e 38 resumem os principais resultados obtidos do cultivo #5.

O cultivo com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator em batelada-alimentada usando meio definido produziu a mesma quantidade de PspA4Pro por biomassa quanto o cultivo #4 usando meio complexo. Os resultados das Figuras 35.d e 37.d suportam esta afirmação ao levar em conta as variações de cada medida realizada. A adição do segundo pulso de canamicina duas horas depois da indução parece ter contribuído positivamente para este resultado, desde que esta ação levou a uma maior retenção plasmidial no cultivo #5 que no cultivo #3. Porém, em comparação com os resultados do Cultivo #3 (Figura 33.d), o rendimento em proteína do Cultivo 5 foi inferior, o que sugere novamente que a concentração de IPTG empregada foi subdimensionada. Pelos resultados dos modos batelada e batelada-alimentada, os cultivos usando meio definido a 32 °C foram 5 horas mais longos que os cultivos que usaram meio complexo em cada um dos modos de operação do biorreator. Portanto, a escolha entre os meios complexo e definido para produzir PspA4Pro parece depender do impacto de cada um deles nos custos de produção e de purificação desse produto.

Observou-se formação de ácidos orgânicos na fase de indução do Cultivo #5 e a concentração de acetato alcançou cerca de 9 g/L ao final do cultivo (Figura 37.c), sendo estes valores mais elevados do que os vistos durante o Cultivo #3 (Figura 35.c), que também foi conduzido em meio definido, mas no modo de operação batelada. A formação de acetato durante a fase de indução em cultivos em meio definido já foi relatada por Silva (2015) e está associada ao estresse metabólico causado pela produção de proteína recombinante. No caso

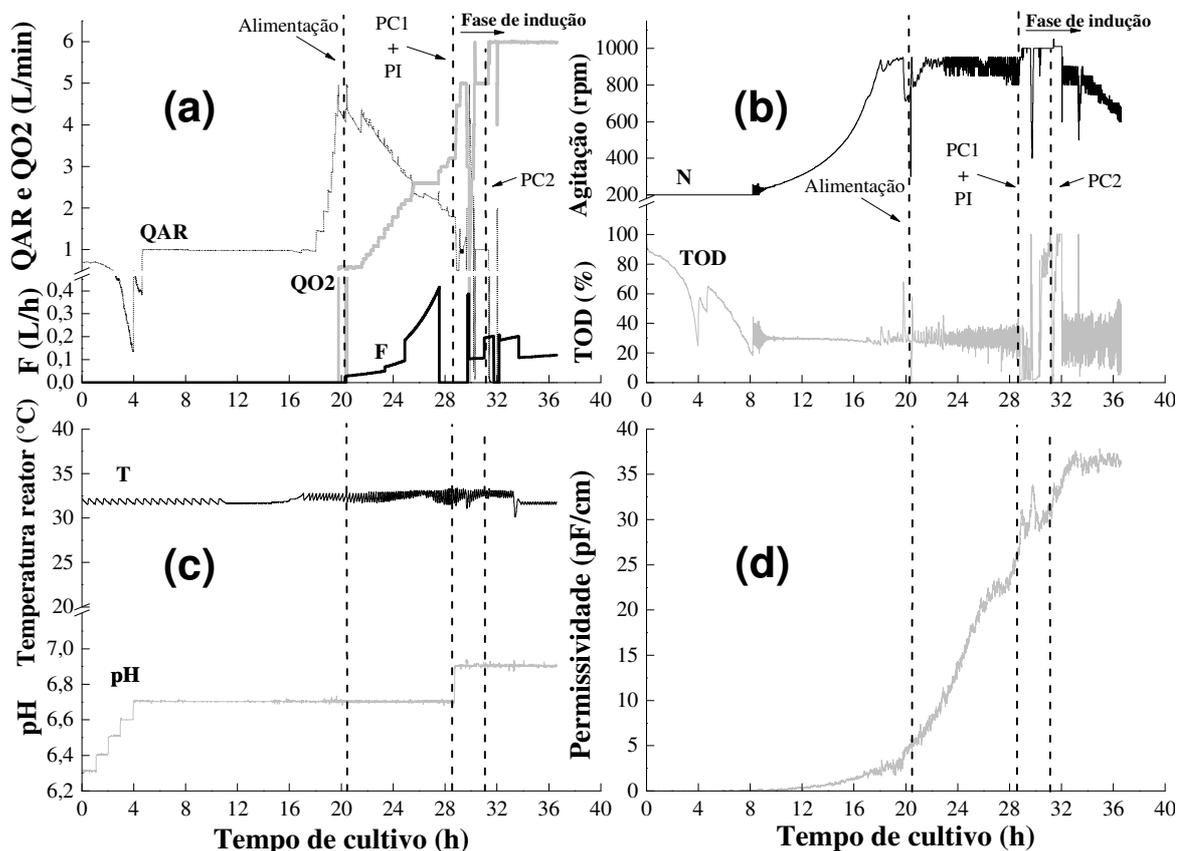
do Cultivo #5, essa formação mais acelerada coincide com as fases de acúmulo de glicerol (Figura 37.a e c).

**Figura 37.** Principais resultados do cultivo #5\*. (a) substratos e biomassa; (b) retenção plasmidial; (c) ácidos orgânicos; (d) Rendimento de PspA4Pro e proteínas contaminantes. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. PI: pulso do indutor; PC<sub>i</sub>: pulsos de canamicina.



De maneira similar ao que ocorreu no cultivo #4, no cultivo #5 houve uma maior variação do valor do oxigênio dissolvido após a indução (Figura 38.b). Novamente a alteração abrupta do comportamento metabólico das células após indução, aparece como principal causa da readequação contínua das variáveis manipuladas, que levou a instabilidade observada em relação ao valor alvo.

**Figura 38.** Principais variáveis de aquisição *online* do cultivo #5. (a) Vazões dos gases; (b) Agitação e TOD; (c) Temperatura do reator e pH; (d) Permissividade. \*Cultivo em biorreator em modo batelada-alimentada a 32 °C usando meio definido induzido por pulso de IPTG 1,1 mM para produzir a proteína recombinante. F: vazão alimentação; PI: pulso do indutor; PCi: pulsos de canamicina; Q<sub>AR</sub>: vazão do ar; Q<sub>O<sub>2</sub></sub>: vazão de gás oxigênio puro; N: Agitação; T: Temperatura do reator; TOD: tensão de oxigênio dissolvido.

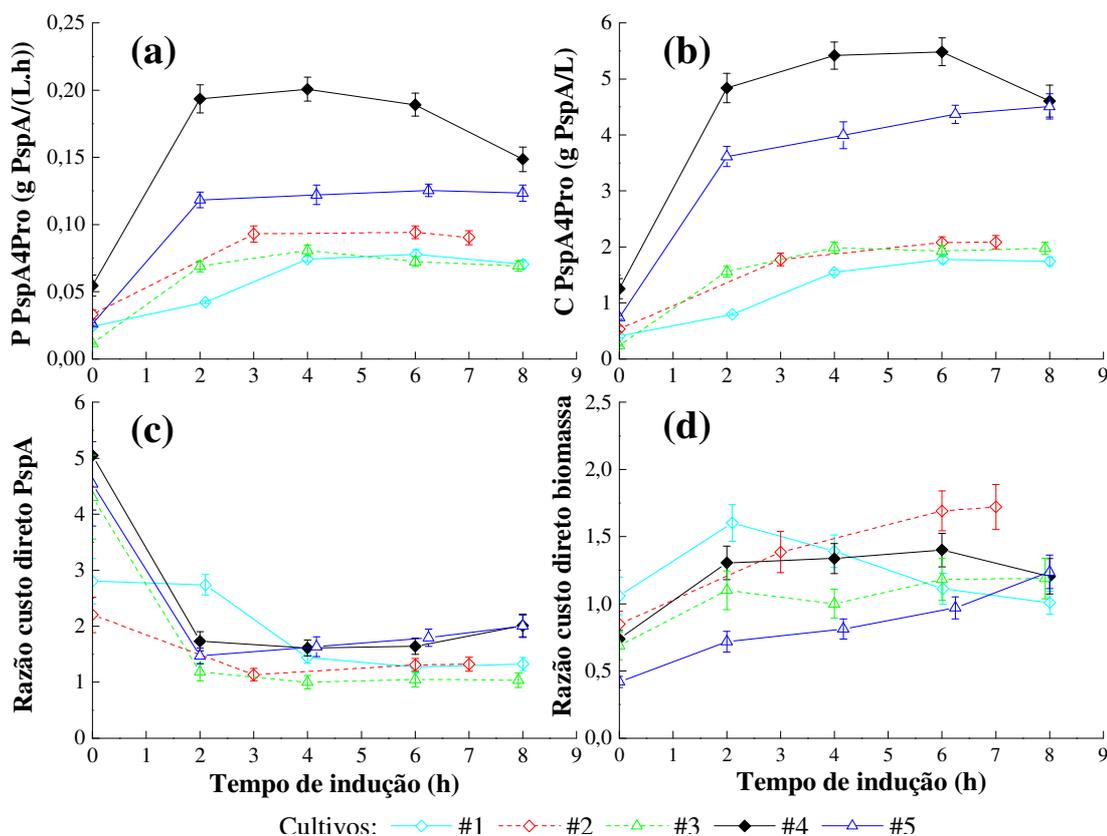


### 5.3.5 Produtividades, concentrações máximas e custos da produção de PspA4Pro em cultivos ClearColi<sup>®</sup> em biorreator

A decisão de qual estratégia de produção escolher em bioprocessos é de suma importância e envolve diversas variáveis e requisitos, principalmente, quando o foco está na produção de produtos terapêuticos. Fabricar um produto final com baixo custo de produção depende da estratégia de processo adotada durante as etapas de Produção e de Purificação. A etapa de Produção deve gerar um produto que atenda todas as principais especificações requeridas para a etapa seguinte, de Purificação. A concentração de proteína recombinante é um dos fatores a considerar e, junto com os valores de produtividade, é um importante indicador do desempenho do processo de produção. De acordo com os resultados do Capítulo 3, não apenas as despesas com utilidades e matérias-primas, mas também as condições de

processo (temperatura, indutor e tipo de meio) que os afetam devem ser considerados para atingir um cultivo com alta efetividade de custo. Desta forma, indicadores de produção e de custos de processo são essenciais como ferramentas para suportar a definição de estratégias de produção. Na Figura 39, todos esses fatores são apresentados para os cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator para a produção de PspA4Pro descritos nesse capítulo, aplicando a metodologia de estimativa de custos apresentada no capítulo 3 usando como referência das razões de custo direto de proteína (RCP) e biomassa (RCB) os custos do cultivo #3 em 4 horas de indução, que foi o menor resultado de custo em termos de proteína dentre os cultivos realizados com ClearColi<sup>®</sup>.

**Figura 39.** Índices de desempenho para as diferentes estratégias de produção de PspA4Pro em biorreator usando células ClearColi<sup>®</sup>. (a) Produtividade\*; (b) Concentração PspA4Pro; Razão custo direto†: (c) em termos de proteína; (d) em termos de biomassa. \* Calculada a partir dos respectivos tempos de cultivos; † Custos dos cultivos #3 em 4 horas de indução como referências: em termos de proteína US\$ 168,00/kg e em termos de biomassa US\$ 22,00/kg.

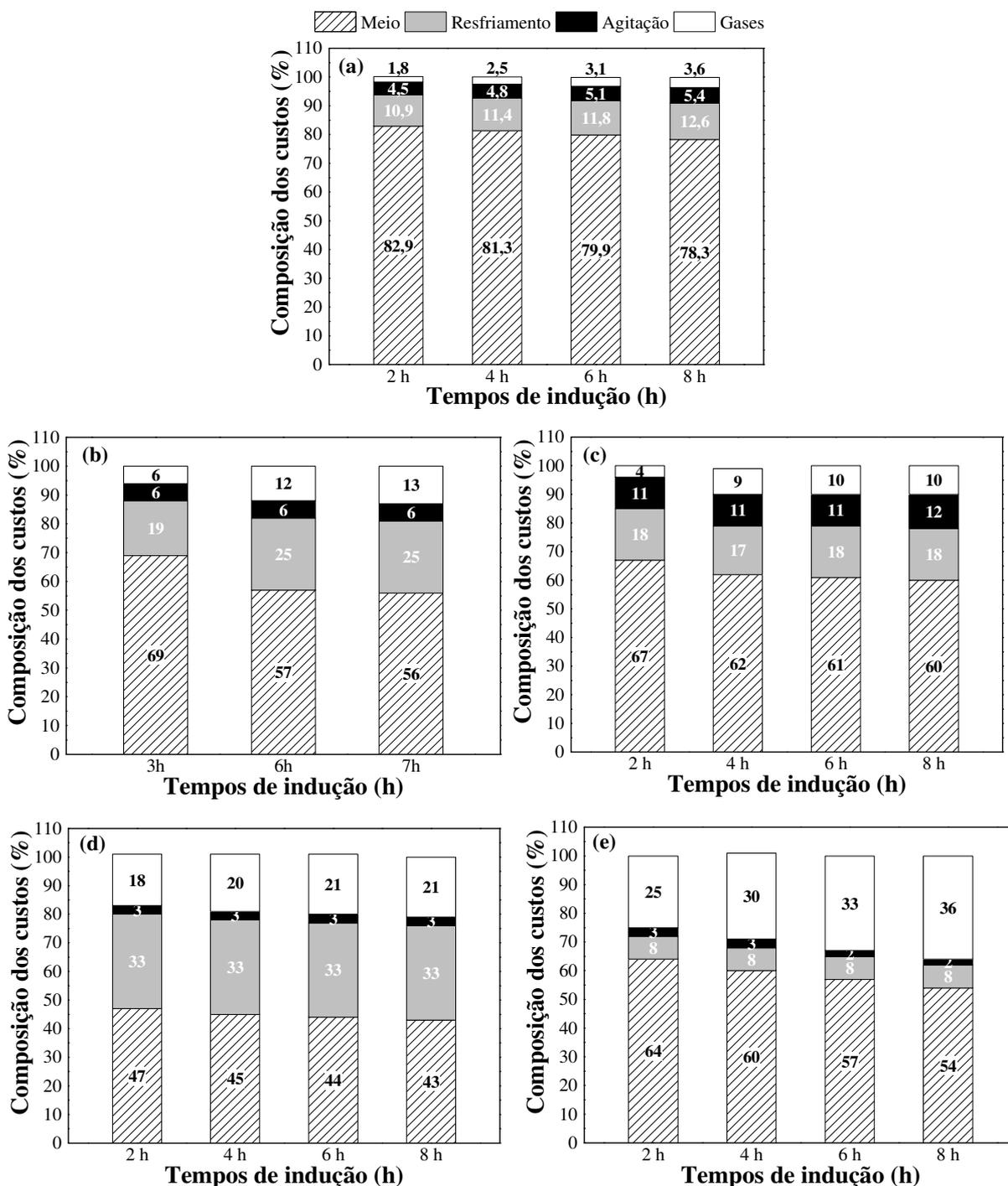


As produtividades e concentrações mais altas de proteína recombinante não garantiram as menores razões de custo direto de proteína (RCP). Pelos perfis observados nas

Figuras 39.a, b e c, as produtividades e concentrações de PspA4Pro tiveram um comportamento oposto à variação das razões de custos diretos de proteína. Apesar de haver uma redução dos valores de RCP com o aumento da produção da proteína recombinante, os gastos suplementares com meio, gases e energia elétrica contribuem de forma oposta (Figura 40). Por esta razão, os ensaios em batelada apresentaram melhores resultados econômicos que os conduzidos em batelada-alimentada, contrariando o paradigma que recomenda os cultivos em alta densidade celular, os bem conhecidos cultivos HCDC (*high cell density cultures*), como a melhor estratégia para produção de proteína recombinante (SHILOACH; FASS, 2005; LEE, 1996). Portanto, para a determinação de uma estratégia de produção de proteína recombinante mais eficiente e econômica, valores de concentrações e de produtividades devem ser sempre confrontados com os custos de processo envolvidos nas respectivas etapas de avaliação. Contudo, não deve ser ignorado que os requisitos de processo e gastos envolvidos na etapa de Purificação acrescentam elementos importantes nessa avaliação. Destaca-se ainda que a qualidade do produto obtido na etapa de produção, independentemente da estratégia empregada, deve ser garantida.

Para as condições avaliadas, a produção de PspA4Pro em cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator em meio definido parecem levar a melhores resultados econômicos tanto em termos de proteína como em termos de biomassa. Embora os valores de RCP e das razões de custo direto de biomassa (RCB) dos cultivos em meio complexo em um mesmo modo de operação do reator tenha resultado em valores próximos ao em meio definido (Figura 39.c), esses valores em meio complexo tendem a ser maiores. Como foi destacado no capítulo 3, as fontes de nitrogênio complexas têm grande relevância na definição dos custos dos cultivos em meio complexo e normalmente são comercializadas em valores superiores aos cotados pela plataforma Cost-Drivers e usadas nas simulações de custos neste trabalho.

**Figura 40.** Evolução da composição dos custos nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> em biorreator. Cultivos: (a) #1; (b) #2; (c) #3; (d) #4; (e) #5.



#### 5.4 Comparação entre os resultados dos cultivos em biorreator com células *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup> e as células convencionais

A fim de avaliar os resultados da produção de PspA4Pro em biorreator com células ClearColi<sup>®</sup>, os valores máximos de importantes variáveis de processo foram

agrupados e comparados com resultados da produção desta proteína recombinante em cultivos com células de *E. coli* BL21(DE3) convencionais presentes na literatura. A Tabela 22 resume esses dados para cultivos a 32 °C em biorreator de 5,0 L em meio definido com indução de produção de PspA4Pro realizado por pulso de IPTG.

**Tabela 22.** Principais resultados de processos dos cultivos a 32 °C com *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional usando meio definido em biorreator de 5,0 L

PE	Modo	C <sub>IPTG</sub> mM	C <sub>X max</sub> g MS/L	P <sub>X max</sub> g MS/(L.h)	C <sub>PspA max</sub> g/L	Y <sub>PspA/X max</sub> mg/g MS	P <sub>PspA max</sub> g/(L.h)	Referência
CC	B	0,70	19	0,6	2,0	152	0,08	Item 5.3.3
	BA	1,10	37	2,1	4,5	82	0,13	Item 5.3.4.2
CV	B	1,00	31	2,0	3,8	123	0,23	Campani et al. (2018)
	BA	1,50	155	9,1	19,0	153	0,95	Horta et al. (2012)

CC: células *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>; C<sub>PspA</sub>: concentração de PspA; CV: células *E. coli* BL21(DE3) convencionais; C<sub>X</sub>: concentração de biomassa; MAX: máximo; P<sub>X</sub>: produtividade de biomassa; P<sub>PspA</sub>: produtividade de PspA; PE: plataforma de indução; Y<sub>PspA/X</sub>: produção específica de PspA por biomassa.

Em termos de rendimento da produção de PspA4Pro por biomassa, as duas plataformas de expressão (PE) apresentaram valores com as mesmas ordens de grandezas. Na Tabela 22 pode ser observado que a ClearColi<sup>®</sup> ofereceu em batelada valor de Y<sub>PspA/X max</sub> superior, mas foi inferior em batelada-alimentada. Certamente as células ClearColi<sup>®</sup> estão aptas a produzir PspA4Pro em maior escala, embora suas produtividades tanto na produção da proteína como na produção de biomassa sejam inferiores aos vistos com células convencionais, devido diretamente ao seu crescimento ser cerca de 50% mais lento em conformidade ao previsto pelo fabricante (LUCIGEN, 2016).

**Tabela 23.** Custos diretos de processo estimados para os cultivos a 32 °C com *E. coli* BL21(DE3) dos tipos ClearColi<sup>®</sup> e convencional em biorreator de 5,0 L

PE	Meio	C <sub>IPTG</sub> mM	C <sub>LACTOSE</sub> g/L	\$ <sub>PspA</sub> US\$/kgPspA	\$ <sub>X</sub> US\$/kgMS	Referência
CC	MC	1,00	-	214 ± 19	23 ± 2	Item 5.3.1
CC	MC	0,70	-	191 ± 19	19 ± 2	Item 5.3.2
CC	MD	0,70	168	168 ± 20	15 ± 2	Item 5.3.3
CV	MD	1,00	97	97 ± 7	12 ± 1	Campani et al. (2018)

CC: células *E. coli* BL21(DE3) ClearColi<sup>®</sup>; CV: células *E. coli* BL21(DE3) convencionais; MC: meio complexo; MD: meio definido; PE: plataforma de expressão; \$<sub>PspA</sub>: custo direto de processo em termos de PspA; \$<sub>X</sub>: custo direto de processo em termos de biomassa; Δ\$<sub>i</sub>: desvio estimado.

Os números presentes na Tabela 22 servem para demonstrar a magnitude dos valores oferecidos em cultivos já realizados para a produção de PspA4Pro nas plataformas de expressão *E. coli* BL21(DE3) convencional e ClearColi<sup>®</sup> e evidenciam que os cultivos com células convencionais são mais produtivos, principalmente, em termos de biomassa. Pelos valores de custos diretos de processo estimados para os cultivos em batelada (Tabela 23), verifica-se que a plataforma de expressão ClearColi<sup>®</sup> acarretou um custo aproximadamente 75% superior à plataforma convencional para produzir a PspA4Pro em meio definido, enquanto que em termos de biomassa ambas ofereceram resultados similares. Em meio complexo os custos de processo nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> foram superiores, sendo cerca do dobro do cultivo convencional para produzir PspA4Pro. A menor concentração de IPTG utilizada nos cultivos com ClearColi<sup>®</sup> foi determinante para que a discrepância nos custos diretos obtidos não fossem ainda maiores. Isto demonstra que há margem para diminuir os custos na produção de proteínas recombinantes e que novas estratégias de produção devem ser incentivadas, incluindo melhoramento genético, sobretudo para viabilizar a produção de proteínas recombinantes em plataformas com reduzida velocidades específicas de crescimento. No entanto, para definir qual plataforma de expressão é a melhor para produzir PspA4Pro, a avaliação operacional da etapa de Purificação é necessária, levando em conta o atendimento às normas de qualidade vigentes e os custos envolvidos. Inclusive a principal promessa de ganhos com a produção em células ClearColi<sup>®</sup> são indicados que ocorram nesta etapa (MAMAT et al, 2015).

## 5.5. Conclusão

No capítulo 5 foram apresentados e discutidos os resultados da produção de PspA4Pro em cultivos com células *E. coli* BL21(DE3) detoxificadas (ClearColi<sup>®</sup>). Diferentes meio, modos de operação e concentrações do indutor IPTG foram estudadas com o propósito de identificar melhores condições de produção envolvendo a intensificação do processo de produção de PspA4Pro na plataforma ClearColi<sup>®</sup>. Embora cultivos em alta densidade celular possam intensificar a produção dessa proteína recombinante em termos de concentração final alcançada, eles não foram os menos custosos. Este fato reforça a necessidade do conhecimento e acompanhamento dos custos de processo envolvidos na produção, para fornecer o suporte necessário para a definição da estratégia de produção de terapêuticos.

A fabricação de produtos recombinantes em plataformas detoxificadas é promissora, mas sempre acarretará menores produtividades em biomassa e produto, devido à menor velocidade específica de crescimento inerente à mesma. Desta forma, se tanto as células convencionais como as detoxificadas são capazes de atender as normas estabelecidas de qualidade do produto, os prováveis ganhos na etapa de purificação com a adoção dos organismos detoxificados precisam ser contabilizados e integrados com os dados da etapa de produção para que a comparação entre essas diferentes plataformas de expressão possa ser efetivamente realizada e as estratégias mais adequada de produção possam ser definidas.

## Capítulo 6: Conclusão

Nessa Tese a produção da proteína recombinante de superfície A do pneumococo (PspA4Pro) em cultivos de *Escherichia coli* BL21(DE3) nas plataformas de expressão convencional e detoxificada foi avaliada, associando condições de produção a medidas econômicas dos gastos envolvidos no processo de obtenção dessa promissora proteína recombinante com o foco em identificar e estabelecer estratégias mais eficientes na etapa de produção.

A abordagem econômica do processo de produção demonstra ser fundamental para conhecer melhor o processo e estabelecer uma estratégia mais eficiente de produção. Além disso, essa abordagem se mostra complementar aos critérios usuais baseados em produtividades, concentrações e rendimentos de produção. Com isso, a validade de alguns paradigmas foi questionada, contribuindo para a busca de uma futura otimização do processo de produção não somente da já referida proteína recombinante, mas também de outras que sejam consideradas solúveis em uma ampla faixa de temperatura. Dentre os paradigmas refutados, está o uso proibitivo do IPTG em maior escala de produção e a visão de que a batelada simples em biorreator é sempre um modo de operação menos eficiente do que a batelada-alimentada, já que foram apresentados resultados e argumentos em que ambos os casos tiveram comportamentos contrários a essas afirmações.

Novos alvos para reduções nos custos de produção foram identificados graças à metodologia empregada, integrando análise econômica e índices de desempenho do processo. Assim, identificou-se o elevado impacto no custo das fontes de nitrogênio em cultivos em meio complexo e do IPTG, quando usado como indutor na produção de proteína recombinante. A partir disso foram implementadas e comprovadas alternativas viáveis para redução de gastos dos cultivos envolvendo tais componentes. A substituição da peptona comercial por um extrato minimamente beneficiado e a redução da concentração do IPTG na indução são exemplos claros da abordagem assertiva para identificação de oportunidades e desenvolvimento de soluções.

Gastos com energia elétrica e gases também se mostraram relevantes e devem ser considerados na escolha entre estratégias de produção de produtos recombinantes. A avaliação econômica realizada demonstrou que esses valores podem ser decisivos para determinar a duração do cultivo que deverá ser usada na produção, pois, uma vez que um

valor mínimo de custo foi alcançado durante o cultivo, há uma tendência de aumento devido ao maior peso desses componentes no valor final dos custos.

As células ClearColi<sup>®</sup> são aptas para produzir PspA4Pro usando diferentes meios, modos de operação, condições de indução e uma ampla faixa de temperatura. De fato os resultados das investigações no decorrer dos ensaios em *shaker* confirmaram a produção dessa proteína recombinante de forma solúvel em temperatura entre 27 e 37 °C em diferentes meios complexos sob indução com lactose e IPTG. Em biorreator de 5,0 L, as células ClearColi<sup>®</sup> foram avaliadas em condições de aumento de escala da produção de PspA4Pro, utilizando tanto meio definido como meio complexo, nas condições mais intensas de produção (32 °C, indução por IPTG), identificadas a partir dos resultados dos experimentos em *shaker*.

Em termos de produção de PspA4Pro as células ClearColi<sup>®</sup> são menos produtivas do que as células *E. coli* BL21(DE3) convencionais. Esse fato era previsto previamente segundo informações do próprio fabricante da ClearColi<sup>®</sup> e foi confirmado pela comparação direta dos resultados destas células com os das células convencionais em cultivos desenvolvidos em condições similares de operação. Devido a uma velocidade de crescimento celular inferior, os cultivos com células ClearColi<sup>®</sup> apresentaram menor produtividade em biomassa e, conseqüentemente, menores produtividades e concentrações de PspA4Pro, quando confrontados com cultivos usando células convencionais. Contudo, além de ser possível desenvolver formas mais eficientes de produção de produtos recombinantes usando as células detoxificadas, os ganhos mais promissores com elas estão associados à simplificação da etapa de Purificação, já que diferentes trabalhos confirmaram que o lipídeo IV<sub>A</sub> presente nessas células não causa endotoxicidade em humanos. Portanto, a definição entre se adotar uma plataforma ou outra de expressão depende claramente da realização de estudos na etapa de purificação da proteína recombinante, integrando esses resultados aos da etapa de produção e garantindo que modificações da estratégia de processo nesta etapa não comprometam a estrutura da proteína alvo resultante, mantendo a sua função biológica esperada.

## Referências

- ABBOTT, B. J.; CLAMEN, A. The Relationship. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 1, p. 117–127, 1973.
- ABDELLRAZEQ, G. S. et al. A peptide-based vaccine for *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis*. **Vaccine**, v. 37, n. 21, p. 2783–2790, 2019.
- ABRÀMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image Processing with ImageJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36–42, 2004.
- AGILENT TECHNOLOGIES. **Instruction Manual: pET System Vectors and Hosts**. Disponível em: <<http://agilent.com/en/product/protein-expression/protein-expression-vectors-kits/bacterial-expression-vectors/pet-expression-systemm-232967#productdetails>>. Acesso em: 15 de agosto 2018.
- ALONSODEVELASCO, E. et al. *Streptococcus pneumoniae* – virulence factors, pathogenesis, and vaccines. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 591-603, 1995.
- AN, J. et al. Caspase-4 disaggregates lipopolysaccharide micelles via LPS-CARD interaction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- ANITHA, M.; KAMARUDIN, S. K.; KOFLI, N. T. The potential of glycerol as a value-added commodity. **Chemical Engineering Journal**, v. 295, p. 119–130, 2016.
- AYOUB, M.; ABDULLAH, A. Z. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 5, p. 2671–2686, 2012.
- BAESHEN, M. et al. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 953–962, 2015.
- BARAZZONE, G. C. et al. Identification of glycosylated regions in pneumococcal PspA conjugated to serotype 6B capsular polysaccharide. **Glycoconjugate Journal**, v. 31, n. 3, p. 259–269, 2014.
- BD. **BD Bionutrients technical manual**. Sparks, 2015. 75 p. Disponível em:

<[https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients\\_tech\\_manual.pdf](https://www.bdbiosciences.com/documents/bionutrients_tech_manual.pdf)>. Acesso em: 22 de novembro 2016.

BERLEC, A.; STRUKELJ, B. Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 257–274, 2013.

BESHAY, U. et al. b-Glucanase production from genetically modified recombinant *Escherichia coli*: Effect of growth substrates and development of a culture medium in shake flasks and stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 307–313, 2003.

BEVERIDGE, T. J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 1999.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal vaccines: An update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, p. 2209–2220, 2004.

BONG, J. H. et al. Fluorescence immunoassay of *E. coli* using anti-lipopolysaccharide antibodies isolated from human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, n. October 2018, p. 518–528, 2019.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (LANAGRO). **Determinação de Umidade e Voláteis em Leite em Pó por Método Gravimétrico**. Rio Grande do Sul, 22/04/2013, p. 4.

BRILES, D. E. et al. The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection. **Vaccine**, v. 18, n. 16, p. 1707–1711, 2000.

CAMPANI, G. **Reator *airlift* operado em sobrepressão**: construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2014.

CAMPANI, G. et al. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a

pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 63–69, 2016.

CAMPANI, G. et al. Recombinant *Escherichia coli* cultivation in a pressurized airlift bioreactor: assessment of the influence of temperature on oxygen transfer and uptake rates. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1621–1633, 2017.

CAMPANI, G. **Otimização do controle do oxigênio dissolvido em biorreator airlift pressurizado**: aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante. 2018. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2018.

CAMPANI, G. et al. A hierarchical state estimation and control framework for monitoring and dissolved oxygen regulation in bioprocesses. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2019.

CARNEIRO, S.; FERREIRA, E. C.; ROCHA, I. Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 396–408, 2013.

CHEN, X. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: A sustainable industrial platform for bio-based chemical production. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1200–1223, 2013.

CHOE, W.; NIAN, R.; LAI, W. Recent advances in biomolecular process intensification. **Chemical Engineering Science**, v. 61, n. 3, p. 886–906, 2006.

CHOI, J.; LEE, S. Y. Process analysis and economic evaluation for Poly (3-hydroxybutyrate) production by fermentation. **Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 6, p. 335–342, 1997.

CHUTIPONGTANATE, S. et al. Systematic comparisons of various spectrophotometric and colorimetric methods to measure concentrations of protein, peptide and amino acid: Detectable limits, linear dynamic ranges, interferences, practicality and unit costs. **Talanta**, v. 98, p. 123–129, 2012.

CLELAND, D. et al. Growth characteristics of microorganisms on commercially available animal-free alternatives to tryptic soy medium. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 2, p. 345–352, 2007.

COONEY, C. L.; WANG, D. I. C.; MATELES, R. I. Measurement of Heat Evolution and Correlation with Oxygen Consumption during Microbial Growth \*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, n. 3, p. 269–281, 1968.

COST-DRIVERS. **Price trends and forecasts**. São Paulo: 2016. Disponível em: <<https://www.costdrivers.com/>>.

DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M. Growth Medium Selection and Its Economic Impact on Plasmid DNA Production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 490–497, 2007.

DONOVAN, R. S.; ROBINSON, C. W.; GLICK, B. R. Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 145–154, 1996.

DUEÑAS, A. I. et al. Interaction of endotoxins with toll-like receptor 4 correlates with their endotoxic potential and may explain the proinflammatory effect of *Brucella* spp. LPS. **International Immunology**, v. 16, n. 10, p. 1467–1475, 2004.

EINSFELDT, K. et al. Cloning and expression of protease ClpP from *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*: Study of the influence of kanamycin and IPTG concentration on cell growth, recombinant protein production and plasmid stability. **Vaccine**, v. 29, n. 41, p. 7136–7143, 2011.

FAYAZ, S. et al. Expression, purification and biological activity assessment of romiplostim biosimilar peptide. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 24, p. 1–5, 2016.

FERREIRA, G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Biotechnology for Biofuels Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant  $\beta$ -glucosidase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, p. 1–13, 2018.

FIGUEIREDO, D. B. et al. Production and purification of an untagged recombinant pneumococcal surface protein A (PspA4Pro) with high-purity and low endotoxin content. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 6, p. 2305–2317, 2016.

FONG, B. A.; WOOD, D. W. Expression and purification of ELP-intein-tagged target proteins in high cell density *E. coli* fermentation. **Microbial Cell Factories**, v. 77, n. 9, p. 1–

12, 2010.

GELLISSEN, G. et. al. Key and criteria to the selection of an expression platform. In: GELLISSEN, P. D. G. **Production of recombinant proteins** - Novel microbial and eukaryotic expression systems. Weinheim: WILEY-VCH Verlag-GmbH & Co KGaA, 2005. p. 1–6.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal of Biotechnology**, v. 60, p. 47–54, 1998.

GONZÁLEZ-MIRO, M. et al. Self-assembled particulate PsaA as vaccine against *Streptococcus pneumoniae* infection. **Heliyon**, v. 3, n. 4, p. e00291, 2017.

GOULART, C. ET AL. Characterization of Protective Immune Responses Induced by Pneumococcal Surface Protein A in Fusion with Pneumolysin Derivatives. **Plos One**, v. 8, n. 3, 2013.

HAUGHNEY, S. L. et al. Retention of structure, antigenicity, and biological function of pneumococcal surface protein A (PspA) released from polyanhydride nanoparticles. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 9, p. 8262–8271, 2013.

HAYASHI, K. et al. Staphylococcal  $\alpha$ -hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by Fc $\epsilon$ RI cross-linking and ionomycin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 508, n. 1, p. 263–269, 2019.

HORTA, A. C. L. **Técnicas computacionais inteligentes para a inferência de estado e a otimização de cultivos de *Streptococcus pneumoniae***. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2008.

HORTA, A. C. L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante**. 2011. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2012.

HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of *rE. coli* for production of *S. pneumoniae* antigenic surface protein , PspA3 , using model-based adaptive control. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 35, n. 8, p. 1269–1280, 2012.

HORTA, A. C. L. et al. A Supervision and control tool based on artificial intelligence for high

cell density cultivations. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 02, p. 457–468, 2014.

HORTA, A. C. L. et al. On-line monitoring of biomass concentration based on a capacitance sensor: assessing the methodology for different bacteria and yeast high cell density fed-batch cultures. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 04, p. 821–829, 2015.

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

IMIELINSKI, M. et al. Systems biology Investigating metabolite essentiality through genome-scale analysis of *Escherichia coli* production capabilities. **Bioinformatics**, v. 21, n. 9, p. 2008–2016, 2005.

JEDRZEJAS, M. J. et al. Production and characterization of the functional fragment of pneumococcal surface protein A. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 116–125, 2000.

JEDRZEJAS, M. J.; LAMANI, E.; BECKER, R. S. Characterization of Selected Strains of Pneumococcal Surface Protein A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33121–33128, 2001.

JIA, B.; JEON, C. O. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. **Open Biology**, v. 6, n. 8, p. 1–17, 2016.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.

KHUSHOO, A.; PAL, Y.; MUKHERJEE, K. J. Optimization of extracellular production of recombinant asparaginase in *Escherichia coli* in shake-flask and bioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 189–197, 2005.

KILIKIAN, B. V. et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1019–1025, 2000.

KIM, J.; KIM, K. H. Effects of minimal media vs. complex media on the metabolite profiles of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 57, p. 64–71, 2017.

KNOLL, A. et al. The Oxygen Mass Transfer , Carbon Dioxide Inhibition , Heat Removal , and the Energy and Cost Efficiencies of High Pressure Fermentation. **Adv Biochem Engin/Biotechnol**, v. 92, p. 77–99, 2005.

KOBAYASHI, M. et al. Staphylococcal superantigen-like 12 activates murine bone marrow derived mast cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 511, n. 2, p. 350–355, 2019.

KORZ, D. J. et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 59–65, 1995.

KUNZE, M. et al. Predictive Tool for Recombinant Protein Production in *Escherichia coli* Shake-Flask Cultures Using an On-Line Monitoring System. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 1, p. 103–113, 2012.

LAEMMLI, U. K. © 1970 Nature Publishing Group. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970.

LAMANI, E. et al. Production, characterization, and crystallization of truncated forms of pneumococcal surface protein A from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 20, n. 3, p. 379–388, 2000.

LECINA, M. et al. Regular article IPTG limitation avoids metabolic burden and acetic acid accumulation in induced fed-batch cultures of *Escherichia coli* M15 under glucose limiting conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 70, p. 78–83, 2013.

LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, 1996.

LI, Z. et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of L-malate from xylose. **Metabolic Engineering**, v. 48, n. 15, p. 25–32, 2018.

LI, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. Lactose-induced production of human soluble B lymphocyte stimulator ( hsBLyS ) in *E. coli* with different culture strategies. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 7, p. 477–483, 2006.

LIANG, W. S. et al. Cloning, expression, and characterization of *Pseudomonas vesicularis* MA103  $\beta$ -1,3-xylanase in *Escherichia coli* ClearColi BL21(DE3). **Fisheries Science**, v. 81, n. 6, p. 1135–1143, 2015.

LUCIGEN. **ClearColi<sup>®</sup> BL21(DE3) Electrocompetent Cells**. TUCSON, 2016. 12 p.

MACHADO, M. M. P. **Inovação das condições de cultivo visando o melhoramento da produção de vacina contra erisipela suína**. 2010. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2010.

MALDONADO, R. F.; SÁ-CORREIA, I.; VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. **FEMS microbiology reviews**, v. 40, n. 4, p. 480–93, 2016.

MAMAT, U. et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2015.

MARSCHALL, L.; SAGMEISTER, P.; HERWIG, C. Tunable recombinant protein expression in *E. coli*: enabler for continuous processing?. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 100, p. 5719–5728, 2016.

MARÉ, L. et al. A cultivation technique for *E. coli* fed-batch cultivations operating close to the maximum oxygen transfer capacity of the reactor. **Biotechnology Letters**, v. 27, n. 14, p. 983–990, 2005.

MARTÍNEZ-DONATO, G. et al. Protective T Cell and Antibody Immune Responses against *Hepatitis C* Virus Achieved Using a Biopolyester-Bead-Based Vaccine Delivery System. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, n. 4, p. 370–378, 2016.

MASARAPU, H. et al. Physalis Mottle Virus-Like Particles as Nanocarriers for Imaging Reagents and Drugs. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 12, p. 4141–4153, 2017.

MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* Strain Allows Efficient Recombinant Protein Production Using Lactose as Inducer. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 8, 2003.

MICHEL, B. J.; MILLER, S. A. Power Requirements of Gas-Liquid Agitated Systems. **Aiche Journal**, v. 8, n. 2, p. 262–266, 1962.

MICHIELS, J. F. et al. Characterisation of beneficial and detrimental effects of a soy peptone, as an additive for CHO cell cultivation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 671–681, 2011.

MIYAJI, E. N. et al. Serotype-independent pneumococcal vaccines. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, p. 3303–3326, 2013.

MIYAJI, E. N. et al. Evaluation of a vaccine formulation against *streptococcus pneumoniae* based on choline-binding proteins. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 2, p. 213–220, 2015.

MOL-BASE. **Chemical Search Engine**. Disponível em: <<http://molbase.com>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

MOON, S. et al. Endotoxin-free purification of recombinant membrane scaffold protein expressed in *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 66, p. 230–236, 2018.

MORENO, A. T. et al. Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies capable of mediating complement deposition on different pneumococcal strains and cross-protection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 3, p. 439–446, 2010.

NEUBAUER, P.; LIN, H. Y.; MATHISZIK, B. Metabolic load of recombinant protein production: Inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 1, p. 53–64, 2003.

NIKAČEVIĆ, N. M. et al. Opportunities and challenges for process control in process intensification. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 52, p. 1–15, 2012.

OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517–522, 1997.

PAPANEOPHYTOU, C. P.; KONTOPIDIS, G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 22–32, 2014.

PAREDES, S. A. H. ***Escherichia coli* detoxificada como plataforma para produção de proteína recombinante A de superfície de pneumococo**. 94 f. Dissertação (Mestrado em

Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2018.

PERCIANI, C. T. et al. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with pneumococcal surface protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 6, p. 818–826, 2013.

PLANESSE, C. et al. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 190–195, 2015.

PONTRELLI, S. et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 50, p. 16-46, 2018.

PRETTO, C. **Inovações na produção de hidrolisados de soja: modelagem e análise econômica de processo**. 2012. 137 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2012.

RAN, G. et al. Functionalized polyhydroxyalkanoate nano-beads as a stable biocatalyst for cost-effective production of the rare sugar D-allulose. **Bioresource Technology**, v. 289, n. April, p. 121673, 2019.

POOE, O. J. et al. *Plasmodium falciparum* Heat Shock Protein 70 Lacks Immune Modulatory Activity. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 6, p. 503–510, 2017.

QIAO, J. et al. One-step production of bioactive human lipopolysaccharide binding protein from LPS-eliminated *E. coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 15, p. 17–20, 2019.

REQUENA, J. R. et al. The Priority position paper: Protecting Europe's food chain from prions. **Prion**, v. 10, n. 3, p. 165–181, 2016.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Caso do Pão, 2005.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. v. 5, n. 172, p. 1–17, 2014.

RÜBNER, K.; BALKÖSE, D.; ROBENS, E. Methods of humidity determination Part II: Determination of material humidity. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 94, n. 3, p. 675–682, 2008.

SANCHEZ-GARCIA, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. **Microbial Cell Factories**, v. 33, n. 15, p. 1–7, 2016.

SANDERS, J. P. M. et al. Chemical Engineering and Processing : Process Intensification Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering & Processing: Process Intensification**, v. 51, p. 117–136, 2012.

SANTAMARIA, R. et al. Humoral immune response of a pneumococcal conjugate vaccine: Capsular polysaccharide serotype 14-Lysine modified PspA. **Vaccine**, v. 29, n. 47, p. 8689–8695, 2011.

SANTOS, M. P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2012.

SARASWAT. Preparative Purification of Recombinant Proteins: Current Status and Future Trends. **BioMed Research International**, p. 18, 2013.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de rE. coli utilizando glicerol como fonte de carbono**. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2011.

SENKOVICH, O. et al. Structure of a complex of human lactoferrin N-lobe with pneumococcal surface protein A provides insight into microbial defense mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 370, p. 301–313, 2007.

SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density — A historical perspective on method development. v. 23, n. 5, p. 345–357, 2005.

SHOJAOSADATI, S. A. et al. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 63–84, 2008.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Bioengineering: basic concepts**. 2. Ed. ed. New Jersey: Prentice Hall, 2002.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*. **Biotechnology Advances**, v. 30, n.

3, p. 691–708, 2012.

SILVA, G. G. **Aspectos morfológicos, reológicos e fisiológicos dos cultivos de *Escherichia coli* recombinante**. 2015. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2015.

SONG, J. M. et al. Cultivation at 6-10°C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 82, n. 2, p. 297–301, 2012.

SONNLEITNER, B.; LOCHER, G.; FIECHTER, A. Biomass determination. **Journal of Biotechnology**, v. 25, p. 5–22, 1992.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial Cell Factories**, v. 4, n. Figure 1, p. 1–8, 2005.

SREERAMA, N.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 2, p. 252–260, 2000.

STANKIEWICZ, ANDRZEJ I.; MOULIJN, J. A. Process Intensification Strategy: Transforming Chemical Engineering. **Chemical Engineering Progress**, n. January, p. 22–34, 2000.

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression & Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, 2005.

TAGUCHI, S. et al. Advances and needs for endotoxin-free production strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 22, p. 9349–9360, 2015.

TAN, J. S. et al. Enhanced production of periplasmic interferon alpha-2b by *Escherichia coli* using ion-exchange resin for in situ removal of acetate in the culture. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 124–132, 2011.

THE SCIENTIST. **Top 10 Innovation 2013**. Disponível em: <<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/38394/title/Top-10-Innovations-2013>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

TOMCZAK, A. et al. Biochemical and biophysical characterization of cytokine-like protein 1 (CYTL1). **Cytokine**, v. 96, n. December 2016, p. 238–246, 2017.

TREYBAL, R. E. **Mass-Transfer Operations**. 3. Ed. ed. New York: McGraw-Hill, 1980.

TUKEY, J. W. Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. **Biometrics**, v. 5, p. 99–114, 1949.

TSUGE, Y. et al. Engineering cell factories for producing building block chemicals for bio - polymer synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 19, p. 1–12, 2016.

UEDA, T. et al. Improving the soluble expression and purification of recombinant human stem cell factor (SCF) in endotoxin-free *Escherichia coli* by disulfide shuffling with persulfide. **Protein Expression and Purification**, v. 120, p. 99–105, 2016.

UTAMI, T. et al. Hydrolyses of meat and soybean proteins using crude bromelain to produce halal peptone as a complex nitrogen source for the growth of lactic acid bacteria. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 1, p. 117–122, 2019.

VADESILHO, C. F. M. et al. Characterization of the antibody response elicited by immunization with pneumococcal surface protein A (PspA) as recombinant protein or DNA vaccine and analysis of protection against an intranasal lethal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 53, p. 243–249, 2012.

VALDEZ-CRUZ, N. A. et al. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. **Microbial Cell Factories**, v. 9 (18), 2010.

VASINA, J. A.; BANEYX, F. Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the. **Protein expression and purification**, v. 9, p. 211–218, 1997.

VÉLEZ, A. M. et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnology**, v. 14, n.6, p. 13, 2014.

VENTURA, S.; VILLAVERDE, A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. v. 24, n. 4, 2006.

VIRANAICKEN, W. et al. ClearColi BL21(DE3)-based expression of Zika virus antigens illustrates a rapid method of antibody production against emerging pathogens. **Biochimie**, v. 142, p. 179–182, 2017.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2014. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 992–1000, 2014.

WALTHER, J. et al. The business impact of an integrated continuous biomanufacturing platform for recombinant protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 213, p. 3–12, 2015.

WANG, G. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Flagellin Inhibits TNF-Induced NF- $\kappa$ B Activation in Intestinal Epithelial Cells. **Pathogens**, v. 6, n. 2, p. 18, 2017.

WATKINS, H. C. et al. A single dose and long lasting vaccine against pandemic influenza through the controlled release of a heterospecies tandem M2 sequence embedded within detoxified bacterial outer membrane vesicles. **Vaccine**, v. 35, n. 40, p. 5373–5380, 2017a.

WATKINS, H. C. et al. Safe Recombinant Outer Membrane Vesicles that Display M2e Elicit Heterologous Influenza Protection. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 4, p. 989–1002, 2017b.

WEGEN, R. J. V. A. N.; LING, Y.; MEMBER, A. P. J. M. Polyhydroxyalkanoates using *Escherichia coli*: an economic analysis. **Chemical Engineering Research & Design**, v. 76, p. 417–426, 1998.

WERPY, T.; PETERSEN, G. **Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I — Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. Washington: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>>.

WHITMORE, L.; WALLACE, B. A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. WEB SERVER ISS., p. 668–673, 2004.

WILDING, K. M. et al. Endotoxin-Free *E. coli*-Based Cell-Free Protein Synthesis: Pre-Expression Endotoxin Removal Approaches for on-Demand Cancer Therapeutic Production. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 3, p. 1–6, 2019.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. Engineering *Escherichia coli* for the efficient conversion

of glycerol to ethanol and co-products. **Metabolic Engineering**, v. 10, n. 6, p. 340–351, 2008.

YOO, G. et al. Autodisplay of the La/SSB protein on LPS-free *E. coli* for the diagnosis of Sjögren's syndrome. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 100, p. 1–10, 2017.

ZHANG, J.; GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 407–421, 1999.

ZHOU, Y. et al. Genetic engineering modification and fermentation optimization for extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 1545–1556, 2018.

## APÊNDICE A – Material Suplementar do Capítulo 3

### Evaluation of PspA structure and biological activity

**Fig. 41.** Quality of PspA4Pro purified from biomass obtained in experiments #2, #3, #4 and #8. a) Circular dichroism (CD) spectra; b) Lactoferrin binding assay. Std: Standard.

