

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[®], 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[®] 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[®] (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[®] 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[®] (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[®] 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[®]) 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[®] 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[®] (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[®] (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[®] 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_A em células ClearColi[®]. 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[®] 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[®]; (b) células convencionais. **Produtividade de biomassa:** (c) ClearColi[®]; (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[®] 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[®]; (b) células convencionais. **Rendimento de PspA em relação a biomassa:** (c) ClearColi[®]; (d) células convencionais; **Produtividade de PspA:** (e) ClearColi[®]; (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[®] 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[®]; (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[®] 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[®] 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[®] 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[®] 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[®] 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[®] 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[®] 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[®] 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_{AR}: 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_i: 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_i: pulsos de canamicina; Q_{AR}: vazão do ar; Q_{O₂}: 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_i: 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_i: pulsos de canamicina; Q_{AR}: vazão do ar; Q_{O₂}: 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_i: 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_i: pulsos de canamicina; Q_{AR}: vazão do ar; Q_{O₂}: 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_i: 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_{AR}: vazão do ar; Q_{O₂}: 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[®]. (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[®] 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

Tabela 1. Composições dos meios complexos usados nos cultivos com <i>E. coli</i> em <i>shaker</i>	36
Tabela 2. 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
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.	41
Tabela 4. Absorbâncias finais dos componentes solubilizados a 37 °C no extrato do suplemento de soja sob diferentes tempos de agitação.....	42
Tabela 5. Velocidade específica máxima de crescimento celular μ_{\max} (h^{-1}) de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) em <i>shaker</i>	43
Table 6. 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
Table 7. Concentrations and costs of each medium component used in the bioreactor cultures.	58
Tabela 8. Estudos envolvendo ClearColi [®] BL21(DE3)	79
Tabela 9. Composição inicial dos diferentes meios complexos avaliados.	88
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.....	89
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.....	90
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.....	90
Tabela 13. Velocidades máximas de crescimento (h^{-1}) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi [®] e convencional em <i>shaker</i> a 37 °C em diferentes meios complexos.....	92
Tabela 14. Velocidades máximas de crescimento de células (h^{-1}) ClearColi [®] em meio LBMS sem indução a 37 °C com diferentes concentrações de glicerol.....	99
Tabela 15. Velocidades máximas de crescimento (h^{-1}) de <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi [®] em <i>shaker</i> a 27 °C em diferentes meios complexos.....	101

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

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- β -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 O₂/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, m³/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

ρ_b : Densidade do meio de cultivo, kg/m^3 ;

η_B : Número de eficiência do banho termostático, 0.7.

η_C : Número de eficiência do compressor, 0.70;

η_S : Eficiência energética, 0.65;

γ : 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

Capítulo 1: Introdução	24
1.1 Estrutura da Tese	29
Capítulo 2: Avaliação de fonte alternativa complexa de nitrogênio	30
2.1 Introdução e objetivo	30
2.2 Materiais e métodos	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
2.3 Resultados e discussão	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
2.4 Conclusão	49
Capítulo 3: Análise de custos baseada nos parâmetros e variáveis de processo da produção de PspA4Pro em <i>E. coli</i> BL21(DE3)	50
3.1 Introduction	50
3.2 Materials and Methods	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
3.3 Results and Discussion	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
3.4 Conclusions	72
Capítulo 4: Avaliação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi® em shaker	74
4.1 Introdução	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
4.2 Materiais e métodos	78
4.2.1. Descrição de estratégia experimental – Estudos Preliminares	78
4.2.2. Procedimento experimental.....	87
4.2.3. Metodologia analítica.....	90
4.3. Resultados e discussão	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
4.4 Conclusão.....	118
Capítulo 5: Intensificação do processo de produção da PspA4Pro em ClearColi®	120
5.1 Introdução	120
5.1.1 Biorreatores tipo tanque agitado: modos de operação	121
5.2 Materiais e Métodos.....	122
5.2.1 Procedimento experimental	122
5.2.1.1 Preparo do inóculo	122
5.2.1.2 Cultivos em biorreator.....	123
5.3 Resultados e Discussão	127
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 [®] em biorreator	141
5.4 Comparação entre os resultados dos cultivos em biorreator com células <i>E. coli</i> BL21(DE3) ClearColi[®] e as células convencionais	144
5.5. Conclusão	146
Capítulo 6: Conclusão	148
Referências	150
APÊNDICE A – Material Suplementar do Capítulo 3	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- β -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 λ 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[®]. Esta cepa de *E. coli* BL21(DE3) foi geneticamente modificada e produz um precursor do LPS, não glicosilado, designado por IV_A, 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[®] tiveram uma grande redução (da ordem de 10⁵ inferiores) na pirogenicidade em relação às células *E. coli* BL21(DE3) convencionais. Além disso, eles confirmaram que o lipídeo IV_A 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[®]. Assim, em parte das atividades propostas neste doutorado, a ClearColi[®] 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[®]). 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.

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>. 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 β -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 α -hemolysin does not induce cell damage in murine mast cells but it augments the degranulation induced by Fc ϵ 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 β -1,3-xylanase in *Escherichia coli* ClearColi BL21(DE3). **Fisheries Science**, v. 81, n. 6, p. 1135–1143, 2015.

LUCIGEN. **ClearColi[®] 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- κ 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.