

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

**"INOVAÇÃO NAS CONDIÇÕES DE CULTIVO VISANDO O
MELHORAMENTO DA PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA
ERISPELA SUÍNA"**

Maria Manuela Pereira Machado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA, área de concentração: ENGENHARIA BIOQUÍMICA.

Orientadora: Profª. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos – SP

Março de 2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M149ic

Machado, Maria Manuela Pereira.

Inovação nas condições de cultivo visando o
melhoramento da produção de vacina contra erisipela suína
/ Maria Manuela Pereira Machado. -- São Carlos : UFSCar,
2010.

113 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2010.

1. Engenharia bioquímica. 2. Vacinas bacterianas. 3.
Erisipela. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MARIA MANUELA PEREIRA MACHADO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 19 DE MARÇO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar


Mickie Takagi
Butantan


Rosineide Gomes da Silva
UFSCar

“A ostra, para fazer uma pérola, precisa ter dentro de si um grão de areia que a faça sofrer. Sofrendo, a ostra diz para si mesma: “Preciso envolver essa areia pontuda que me machuca com uma esfera lisa que lhe tire pontas...”. Ostras felizes não fazem pérolas... Pessoas felizes não sentem a necessidade de criar. O ato criador seja na ciência ou na arte, surge sempre de uma dor. Não é preciso que seja uma dor dóida... Por vezes a dor aparece como aquela coisa que tem o nome de curiosidade. Este trabalho está cheio de areias pontudas que me machucaram. Para me livrar da dor, escrevi.”

Rubem Alves em *Ostra Feliz Não faz Pérola*, 2008

Aos meus pais,

RUI E NORMA.

As maiores expressões, que conheço, de dedicação e amor aos filhos.

AGRADECIMENTOS

Desenvolver este trabalho foi uma experiência muito agradável, mas ao mesmo tempo bastante trabalhosa e até estafante. Só foi possível concluir essa tarefa com ajuda de muitas pessoas. Gostaria de registrar aqui os meus agradecimentos a algumas delas.

Agradeço especialmente à Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami pela paciência, destreza e dedicação com que sempre me orientou, durante o mestrado.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), assim como ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ-UFSCar) pelo apoio econômico, institucional e acadêmico na realização desta dissertação.

Agradeço à Luciana e à Alcione, secretárias da Pós-Graduação do DEQ-UFSCar, pelo carinho e atenção com que me trataram ao se dedicarem a questões que poderiam ser simplesmente fria e burocraticamente realizadas.

Aos que participaram intensamente da parte experimental deste trabalho. Sempre atenciosas, disponíveis e principalmente amigas. Adilson, KK e Gabriela, muito obrigada por tudo!!!

Aos técnicos Tiago, pela ajuda e orientação na chegada ao Laboratório de Controle de Processos e Amadeus pela ajuda em todas as análises em HPLC e DNS contidas nesse trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, do Departamento de Química da UFSCar, por ter-me iniciado na vida acadêmica, despertando em mim o interesse pela leitura crítica; ensinando-me a refletir sobre as nossas certezas e a descobrir, ao investigá-las, que elas não são tão certas assim. Agradeço também aos demais professores, funcionários e colegas do Departamento de Química da UFSCar.

Ao grande amigo Luiz Fernando Gorup, que esteve sempre presente na realização deste trabalho. Pelos almoços oferecidos, companhia nas horas de estudo e presença constante nos momentos de descontração.

Às novas amigadas que fiz durante o mestrado, por tornarem meus dias menos cansativos e mais alegres: Adilson, KK, Gabi, Edson, Dasciana, Carlos e Inti, Juliana, Cris,

Diogo, Mirella, Ana Maria, Jéssica, Lígia, Guilherme (Tuti), Juliana Rabelo, Claudinha, Mônica Iemma e Mônica Santana.

Às amigas Vanessa, Larissa e Fernanda, por terem me recebido tão bem no novo apartamento, na reta final do mestrado. A todos amigos da graduação, que sempre estiveram por perto e sempre serão necessários, especialmente: Patrícia, Boniek, Vinicius Carvalho, Marco Antonio, Camila, Emerson, Gilmar, Daiane Piva.

E principalmente, à minha família (Rui, Norma, José António, Ana Maria e Norma Maria), que sempre me ensinaram qual caminho seguir e ser uma pessoa leal. Muito obrigada por tudo, principalmente por todas as horas em que pensei em desistir e vocês estavam aí para me apoiar. O apoio de vocês às minhas decisões foi fundamental, sempre.

RESUMO

A carne suína é a mais consumida no mundo e a suinocultura é uma atividade econômica em franca expansão no Brasil e no mundo. Diversos esforços vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes para as principais doenças que afetam os rebanhos, como a erisipela suína, causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*. As vacinas disponíveis atualmente para a prevenção da erisipela são produzidas com o caldo de cultivo deste microrganismo inativado ou atenuado. O principal agente antigênico identificado é uma fração protéica de 64-69 kDa, presente tanto na parede celular da bactéria quanto no sobrenadante do cultivo. Diante do conhecimento acumulado ao longo dos estudos conduzidos por Silva (2007), o presente trabalho teve como objetivos: i) estudar as condições empregadas na preparação das suspensões celulares para armazenamento na forma de cultura estoque em criotubos assim como a etapa de ativação dos mesmos; ii) estudar o crescimento de *E. rhusiopathiae*, a formação de ácido lático e a expressão do antígeno SpaA em meios de cultivo contendo fontes de carbono alternativas à glicose e fontes de nitrogênio de origem vegetal; iii) estudar o comportamento do microrganismo no meio de cultura novo, livre de substratos de origem animal, em biorreator. Os experimentos foram conduzidos em câmara incubadora, em cultivos estáticos ou com agitação de 50 ou de 200 rpm. A temperatura utilizada foi de 37°C e o pH inicial foi de 8,0 em todos os ensaios realizados. Os estudos em biorreator foram realizados em biorreator de 5,0 L, com agitação entre 100 a 700 rpm e vazão de ar de 1,0 a 2 L/min. Amostras retiradas durante os cultivos foram empregadas para análise da densidade ótica (a 420 nm) e das concentrações de glicose, biomassa e metabólitos. A expressão do antígeno foi avaliada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) a partir de extratos das células preparados com solução de cloreto de colina. Os estudos envolvendo a ativação dos criotubos contendo as suspensões celulares congeladas levaram à padronização desta etapa, com alta reprodutibilidade, e à diminuição do tempo de ativação em 50 %. Os cultivos realizados com diferentes fontes de carbono, mostraram que *E. rhusiopathiae* é capaz de assimilar galactose e lactose, além de glicose. No entanto, não foi verificada assimilação de glicerol. A substituição da proteose peptona, fonte de nitrogênio de origem animal amplamente utilizada nos cultivos de *E. rhusiopathiae* para produção de bacterinas, pela peptona de soja hidrolisada Soytone, de origem vegetal, mostrou-se um alternativa promissora para a produção da vacina de células inativadas, contribuindo para aumento da velocidade específica de crescimento e da conversão de substrato em células em relação aos valores obtidos no meio convencional. Em cultivo descontínuo realizado em biorreator de bancada com o meio contendo glicose e Soytone, foi alcançada uma concentração de biomassa de 10 g/L em 5 horas de cultivo. Para o meio convencional, contendo proteose peptona, a máxima concentração celular relatada para ensaio em batelada em biorreator de bancada foi aproximadamente 2 g/L, a qual foi atingida após 7 horas de cultivo. Destaca-se ainda que um nível superior de expressão da proteína antigênica em relação aos observados com a peptona de origem animal foi alcançado nos cultivos realizados com o meio contendo soytone. Esse resultado mostra ser possível incorporar as boas práticas de manufatura recomendadas para produtos farmacêuticos e veterinários, sem prejuízo à produtividade do processo e com significativa redução do custo do meio.

Palavras-chave: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, erisipela suína, fontes de nitrogênio, soytone, peptona de soja, vacinas, SpaA

ABSTRACT

Pork is one of the most widely eaten meats in the world and pig farming is an economic activity booming in Brazil and the world. Several efforts have been made to develop more effective vaccines for major diseases that are affecting livestock such as swine erysipelas, caused by the bacterium *Erysipelothrix rhusiopathiae*. The currently available vaccines for the prevention of erysipelas are produced with culture broth of this microorganism inactivated or attenuated. The main antigenic agent identified is an protein fraction of 64-69 kDa, present in cell wall of bacteria and the supernatant of the culture. Given the accumulated knowledge of the studies conducted by Silva (2007), this study aimed to: i) study the conditions employed in the preparation of cell suspension for freezing and formation of culture stocks in cryotubes and the stage of their activation; ii) studying the growth of *E. rhusiopathiae*, the formation of lactic acid and expression of antigen in culture media containing carbon sources alternative to glucose and in culture media containing nitrogen sources of plant origin; iii) to study the behavior of the microorganism in the new culture medium, animal-free, in a bioreactor. The studies for the improvement of the medium formulation were carried out in flasks incubated at static condition or under agitation of 200 rpm. The temperature was set at 37°C and the initial pH at 8,0 in all experiments. The studies in bioreactor were made using a 4.0 L stirred-tank bioreactor, with an agitation frequency kept between 100 and 700 rpm and air flow rate of 1.0 L/min. Samples of cell extracts made with choline chloride were analyzed by electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) to evaluate the antigen expression. Studies of activation of the criotubes containing frozen cell suspensions led to the standardization of this step, with high reproducibility, and reduced activation time by 50%. The studies were grew with different carbon sources, showing that *E. rhusiopathiae* is able to assimilate galactose, lactose, and glucose. However, there was no assimilation of glycerol. The replacement of proteose peptone, a nitrogen source animal widely used in the cultivation of *E. rhusiopathiae* to produce bacterins, by Soytone, a soy peptone, animal-free, was a promising alternative for the production of the inactivated vaccine, helping to increase the specific growth rate and substrate conversion of cells in relation to values obtained in conventional medium. In batch cultivation performed in a bioreactor with medium containing glucose and Soytone, it was reached a biomass concentration of 10 g / L at 5 hours of cultivation. For the conventional medium, containing proteose peptone, the maximum cell concentration reported for the test batch in a bioreactor was approximately 2 g / L, which was reached after 7 hours of culture. Note also that a higher level of expression of antigenic protein in relation to those observed with peptone of animal origin was achieved in cultures performed with medium containing soytone. This result shows that could be incorporate the best practices of manufacturing practices for pharmaceutical and veterinary products, subject to the productivity of the process and with significant cost reduction.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, swine erysipelas, nitrogen sources, vaccines, SpaA.

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Esquema representativo das 3 fases presentes no preparo de uma bacterina. Entre parênteses: tempo de cada etapa.	2
Figura 2.1 - Fotografia de cultura de <i>E. rhusiopathiae</i> em placa de ágar-sangue e fotografia obtida em microscópio, bactérias coloridas com o reagente de Gram. (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62 , último acesso: 28/02/2010).....	8
Figura 2.2 - Glicólise: os principais passos na oxidação da glicose até a formação do ácido pirúvico (passos A até G descritos no texto).	12
Figura 2.3 - Catabolismo em bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação mista (C). P = fosfato, BP = bifosfato, LDH = desidrogenase láctica, PFL = formato piruvatase, e PDH = piruvato desidrogenase (Hofvendahl, 2000).	14
Figura 2.4 - O ácido láctico apresenta isomeria ótica. Isômeros óticos do ácido láctico, a forma destrógira (D-ácido láctico) e levógira (L-ácido láctico).....	15
Figura 2.5 - Esquema de reator tanque agitado	1
Figura 3.1 - Procedimento de cultivo em frascos utilizando criotubos	44
Figura 3.2 - Etapas do procedimento para os ensaios em biorreator.....	46
Figura 3.3 - Etapas do Ensaio S4 com diferentes condições de aeração no cultivo das duas cepas.	51
Figura 3.4 - Etapas do Ensaio S5 com diferentes fontes de carbono.	52
Figura 3.5 - Etapas do Ensaio S7 com diferentes fontes de nitrogênio. Além das fontes de nitrogênio apontadas, foi utilizado extrato de levedura em todos os cultivos.....	53
Figura 3.6 - Etapas do conjunto de ensaios S6.....	55
Figura 3.7 - Etapas do conjunto de ensaios S7.....	56
Figura 4.1 - Variação do tempo de ativação em função do tempo de armazenamento da suspensão de células congeladas para diversos lotes de criotubos preparados por Silva e colaboradores no período de março de 2005 a março de 2007 (comunicação pessoal).....	60
Figura 4.2 - Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração das células com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostra Experimento S1.	62
Figura 4.3 - Variação dos valores de DO nas ativações S2-A, e S2-C, em condições microaerófilas (50 rpm) com o tempo de cultivo, etapa de ativação. S2-A: Meio preparado com peptona antiga na mesma concentração e origem que foi utilizada por Silva (2007). S2-	

C: Meio preparado com peptona adquirida recentemente, na mesma concentração que foi utilizada por Silva (2007). Ambos esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm 64

Figura 4.4 - Variação dos valores de DO nos cultivos S2-C e S2-D, em condições microaerófilas (50 rpm) com o tempo de cultivo, etapa de ativação. **S2-D:** Meio preparado com peptona adquirida recentemente na mesma concentração e origem que foi utilizada por Silva (2007) e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm . **S2-C:** Meio preparado com peptona adquirida recentemente, na mesma concentração que foi utilizada por Silva (2007) e esterilizado por autoclavagem. 65

Figura 4.5 - Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração das células com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostras S2-C (peptona “nova”, meio filtrado) e S2-D (peptona “nova”, meio autoclavado). 66

Figura 4.6 - Crescimento celular em função do tempo, para ativações realizadas em condições microaerófila (estática e sob agitação de 50 rpm), para os dois lotes de criotubos com diferentes tempos de armazenamento no Conjunto de Ensaios S3. 67

Figura 4.7 - Crescimento celular em função do tempo, para cultivos realizados em condições estática e aeróbia (200 rpm), para os dois lotes de criotubos no Conjunto de Ensaios S3. 68

Figura 4.8- Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração do antígeno com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostras 1: S3-A, 2: S3-B – microaerófilo, 3: S3-C e 4: S3-D 69

Figura 4.9 - Crescimento celular em cultivos realizados com diferentes fontes de carbono no meio no Conjunto de Ensaios S4. 71

Figura 4.10 - Consumo de substrato ao longo dos respectivos cultivos. 72

Figura 4.11 - Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com diferentes fontes de carbono. 73

Figura 4.12 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 4 condições estudadas (glicose, glicerol, lactose e galactose) Na imagem: **Padrão:** padrão de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen); **Amostras:** 1: cultivo com glicose (DO = 1,1), 2: cultivo com glicerol (DO = 0,8), 3: cultivo com lactose (DO = 0,9), 4: cultivo com galactose (DO = 0,9), 5: rSpaA padrão (pura) 47 kD, 6: Vazio, 7: Extrato de célula (obtido a partir das células fervidas a 100°C). Todas as amostras foram concentradas em 100 vezes. ... 74

Figura 4.13 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S4 75

Figura 4.14 - Crescimento celular dos cultivos realizados com diferentes fontes de nitrogênio no meio no Conjunto de Ensaios S5. 77

Figura 4.15- Consumo de glicose ao longo dos cultivos para as diferentes fontes de nitrogênio estudadas no Conjunto de Ensaios S5. 79

Figura 4.16 - Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com diferentes fontes de nitrogênio no Conjunto de Ensaios S5.....	79
Figura 4.17 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 4 condições estudadas (peptona N2, soytone, água de maceração de milho e peptona de soja Acumedia) Na imagem: 1: cultivo com peptona N2 Difco (DO = 1,0), 2: cultivo com água de maceração de milho (DO = 1,0), 3: cultivo com Soytone Difco (DO = 1,3), 4: cultivo com Farinha de Soja Acumedia (DO = 1,0), 5: rSpaA padrão (pura) 47 kDa. Todas as amostras foram concentradas em 100 vezes.....	80
Figura 4.18 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S5	81
Figura 4.19 - Crescimento celular dos cultivos realizados no Conjunto S6: Soytone + Glicerol, Peptona N2 + Glicerol e Peptona N2 + Glicose. Em detalhe o gráfico de ln(DO) por Tempo(h), na fase exponencial do crescimento.	82
Figura 4.20 - Consumo de substrato ao longo dos cultivos do Conjunto de Ensaios S6.	83
Figura 4.21 - Comparação do perfil de produção de metabólitos no Conjunto de Ensaios S6	84
Figura 4.22 - Crescimento celular dos cultivos realizados no conjunto de ensaios S7	87
Figura 4.23 - Consumo de substrato ao longo do conjunto de ensaios S7	88
Figura 4.24 - Comparação do perfil de produção de metabólitos no conjunto de ensaios S7.	89
Figura 4.25 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 5 condições estudadas. Padrão (1): padrão de massa molecular (<i>BenchMark Protein Ladder</i> – Invitrogen); Amostras: 2: Peptona N3 + Glicose (DO = 1,23), 20 µL, 3: Peptona N3 + Glicerol (DO = 1,22) , 20 µL, 4: Soytone + Glicerol (DO = 0,98), 20 µL, 5: Soytone + Água de Maceração de Milho + Glicerol (DO = 1,08), 20 µL, 6: Soytone (x2) + Extrato de levedura (x2) + Arginina (x2) + Glicerol (DO = 1,02), 20 µL, 7: rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 µL.	90
Figura 4.26 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S7	91
Figura 4.27 - Formação de células, consumo de glicose e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de O ₂) em biorreator com meio Peptona N3 + Glicose, durante a batelada simples (Ensaio B1).....	93
Figura 4.28 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, nos tempos 11,8 e 15,5 horas.. Padrão: rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 µL.	94
Figura 4.29 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o cultivo em biorreator B1	94

Figura 4.30 - Formação de células, consumo de glicose e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de concentração de O ₂ dissolvido) em biorreator com meio Soytone + Glicose, durante batelada simples (Ensaio B2)	95
Figura 4.31 - Velocidade de produção de dióxido de carbono em termos da fração molar de CO ₂ com o tempo de cultivo (mmol/h), consumo de glicose, produção de biomassa em termos de DO e produção de ácido lático no ensaio B2).	97
Figura 4.32 - Acompanhamento de pH com o tempo de cultivo (Ensaio B2).	98
Figura 4.33 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, nos tempos 3,7 e 4,7 horas do ensaio B2. Padrão: rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 µL.	99
Figura 4.34 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o cultivo em biorreator B2.....	99
Figura 4.35 - Formação de células (DO), consumo de glicerol e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de concentração O ₂ dissolvido) em biorreator com meio Soytone + Glicerol, durante a batelada simples (Ensaio B3).....	100
Figura 4.36 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, no tempo 4,1 horas para o Ensaio B3. Padrão: padrão de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen).....	101
Figura 4.37 - Comparação entre os custos estimados por litro de meio de cultivo para os diferentes substratos testados. Cotações obtidas em Novembro de 2009.....	103

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Meios de cultura utilizados para isolamento de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> (Wang, 2010).....	9
Tabela 2.2 - Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo de microrganismos em bioreatores	18
Tabela 2.3 - Características de alguns dos principais componentes complexos usados como ingredientes dos meios de cultura:	24
Tabela 2.4 - Condições iniciais e principais resultados dos experimentos relatados na literatura sobre o cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i>	30
Tabela 3.1 - Composição do meio ágar-sangue (Silva, 2007).....	34
Tabela 3.2 - Composição do Tryptic Soy Agar (Silva, 2007)	34
Tabela 3.3 - Composição do meio ágar-TPA	34
Tabela 3.4 - Composição da Triptose Fosfato	34
Tabela 3.5 - Meios líquidos de cultura utilizados nos experimentos.....	35
Tabela 3.6 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S4 para estudos de diferentes fontes de carbono.....	35
Tabela 3.7 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S5 para estudo de diferentes fontes de nitrogênio.	36
Tabela 3.8 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S6 e S7, para consolidação dos resultados obtidos nos ensaios S4 e S5.....	36
Tabela 3.9 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios em biorreator.....	37
Tabela 3.10 - Lista dos experimentos, em ordem cronológica, com suas respectivas descrições e objetivos	47
Tabela 4.1 - Valores de DO _{420nm} obtidos na etapa de ativação de criotubos para o experimento S1.....	61
Tabela 4.2 - Descrição das condições experimentais do Conjunto de experimentos S2.....	63
Tabela 4.3 - Condições estudadas nos quatro ensaios realizados no Experimento S4.....	67
Tabela 4.4 - Velocidade máxima específica de crescimento e densidade ótica máxima para os ensaios do Experimento S3.	69

Tabela 4.5 - Comparação entre os resultados dos cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> com diferentes fontes de carbono (Experimento S5)	74
Tabela 4.6 - Comparação entre os resultados dos cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> obtidos no ensaio S5.....	78
Tabela 4.7 - Comparação entre os resultados dos cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> obtidos no ensaio S6.....	84
Tabela 4.8 - Composição química aproximada para as fontes de nitrogênio fornecidas pela Difco	86
Tabela 4.9 - Comparação entre os resultados dos cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> obtidos no Conjunto de Ensaio S7.....	90
Tabela 4.10 - Valor estimado do litro do meio de cultivo para o ensaio utilizando a peptona N2 como fonte de nitrogênio. Cotações obtidas em Novembro de 2009.....	102
Tabela 4.11 - Resultados obtidos nos ensaios em biorreator.....	104
Tabela 4.12 - Quantificação da produção de proteínas para todos os ensaios realizados nesse trabalho	104

Lista de abreviaturas e siglas

BHI: Brain Heart Infusion

BHIS: Brain Heart Infusion suplementado com soro animal

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO: densidade ótica

E. coli: *Escherichia coli*

E. rhusiopathiae: *Erysipelothrix rhusiopathiae*

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

kDa: kiloDalton

M: molar (mol/L)

mM: milimolar

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecilsulfato de sódio

SpaA: surface protective antigen A

TPA: tryptose phosphate

Y_{xs} : coeficiente de rendimento de substrato a células [$\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato}}$]

Letras gregas

μ : velocidade específica de crescimento celular

μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento celular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Vacinas	5
2.2. Aspectos fisiológicos e metabólicos de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	8
2.2.1. Aspectos Fisiológicos	8
2.2.2. Metabolismo de <i>E. rhusiopathiae</i> : formação do ácido lático e inibição pelo mesmo	10
2.3. Estratégias de cultivo	17
2.4. Meios de cultivo utilizados em cultura de bactérias	21
2.4.1. Fontes de Carbono	21
2.4.2. Fontes de Nitrogênio	22
2.5. Cultivos de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	27
2.5.1. Cultivos em frascos agitados	27
2.5.2. Cultivos em biorreator	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. Meios de cultivo	33
3.1.1. Meios sólidos	33
3.1.2. Meios líquidos	34
3.2. Métodos analíticos	38
3.2.1. Determinação da concentração celular	38
3.2.2. Determinação da concentração de etanol, glicerol e de ácidos lático, acético e fórmico	39
3.2.3. Determinação da concentração de glicose, lactose e galactose	39
3.2.4. Tratamento das amostras para análise da produção do antígeno (SpaA)	39
3.2.5. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) – SDS-PAGE	40
3.3. Determinação de parâmetros cinéticos	41
3.3.1. Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono	41
3.3.2. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular	42
3.3.3. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células	43
3.4. Metodologia Experimental	43
3.4.1. Ativação de criotubos e preparo de inóculo para cultivos em frascos	43
3.4.2. Ativação da cultura liofilizada armazenada em ampolas	44
3.4.3. Preparação de cultura estoque em criotubos	44
3.4.4. Cultivos em câmara incubadora	45
3.4.5. Cultivos em Biorreator	45
3.5. Descrição dos Experimentos	47
3.5.1. Ensaio S1 – Implementação da metodologia de cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i> em meio Feist modificado por Silva <i>et al.</i> (2008)	48
3.5.2. Conjunto S2 – Estudo comparativo entre peptonas de diferentes lotes; influência da forma de esterilização do meio de cultivo; Otimização da etapa de ativação	49
3.5.3. Conjunto S3 - Influência da forma de preservação e do tempo de conservação na ativação dos criotubos; otimização da etapa de ativação	50

3.5.4.	Conjunto S4 – Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de carbono na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína	52
3.5.5.	Conjunto S5 - Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína	53
3.5.6.	Conjunto S6 - Combinação dos conjuntos S4 e S5: Utilização do Soytone como fonte de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono.....	54
3.5.7.	Conjunto S7 - Combinação dos conjuntos S4 e S5 e verificação dos resultados obtidos no conjunto S6	55
3.5.8.	Experimentos em Biorreator.....	56
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1.	Otimização da etapa de ativação dos criotubos.....	59
4.1.1.	Ensaio S1 – Implementação da metodologia de cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i> em meio Feist modificado por Silva <i>et al.</i> (2008).....	61
4.1.2.	Conjunto S2 – Estudo comparativo entre peptonas de diferentes lotes; influência da forma de esterilização do meio de cultivo	63
4.2.	Cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> em meios contendo diferentes fontes de carbono e de nitrogênio.....	70
4.2.1.	Conjunto S4 – Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de carbono na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína	71
4.2.2.	Conjunto S5 - Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína	76
4.2.3.	Conjunto S6 - Combinação dos conjuntos S4 e S5: Utilização do Soytone como fonte de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono.....	81
4.2.4.	Conjunto S7 - Combinação dos conjuntos S4 e S5 e verificação dos resultados obtidos no conjunto S6	85
4.3.	Ensaio em biorreator	92
4.3.1.	Ensaio B1 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicose como fonte de carbono e peptona N2 como fonte de nitrogênio, sem controle de pH	92
4.3.2.	Ensaio B2 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicose como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH	95
4.3.3.	Ensaio B3 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicerol como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH	100
4.4.	Comparação e análise global dos resultados obtidos nos ensaios realizados em frascos agitados e em biorreator	102
4.4.1.	Viabilidade econômica da nova formulação para o meio de cultivo.....	102
4.4.2.	Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator	103
5.	CONCLUSÕES.....	106
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1. INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade econômica em franca expansão no Brasil, sendo a carne suína a mais consumida no mundo. Diversos esforços vêm sendo realizados para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes para as principais doenças que afetam os rebanhos, como a erisipela suína, causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*. A erisipela pode ocorrer como uma septicemia aguda ou uma doença crônica, com desenvolvimento de lesões de arteriose e endocardites, que causa grande perda econômica e continua sendo o principal problema na produção de carne suína no mundo (Makino, 2000).

Diante da escassez de informações na literatura científica sobre estudos a respeito do crescimento deste patógeno e da inexistência de tecnologia nacional de produção da referida vacina, a empresa Vallée S.A., indústria brasileira de produtos farmacêuticos de uso veterinário, firmou uma parceria com pesquisadores do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, para o desenvolvimento de tecnologia para produção de vacinas de células inativadas contra erisipela suína (ProEx/UFSCar Proc. 23112.000371/2005-74 e Proc. 23112.000193/2006-80). Na dissertação de Mestrado de Adilson José da Silva (Silva, 2007), junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) da UFSCar, foram estudadas e definidas as condições de cultivo de *E. rhusiopathiae* para obtenção da suspensão de células a serem utilizadas na formulação das vacinas.

A partir do conhecimento acumulado ao longo dos estudos conduzidos por Silva (2007), o processo de produção da vacina de células inativadas contra erisipela suína pode ser descrito pela seqüência de atividades esquematizadas na Figura 1.1.

A etapa de produção inicia-se com a ativação em meio líquido da suspensão de células (cultura-estoque) armazenada em criotubos, seguida por etapas sucessivas de propagação para produção de inoculo até obtenção de volume de suspensão em concentração adequada para a transferência para o biorreator, no qual as condições de cultivo são controladas para favorecer o crescimento celular e a expressão do antígeno. Finalmente, para a formulação da vacina inativada (bacterina), realiza-se a inativação química das células presentes no meio de cultivo, utilizando solução de formaldeído 33%, seguida pela neutralização do mesmo e conclui-se o processo com a etapa de adsorção das células inativadas no adjuvante hidróxido de alumínio.

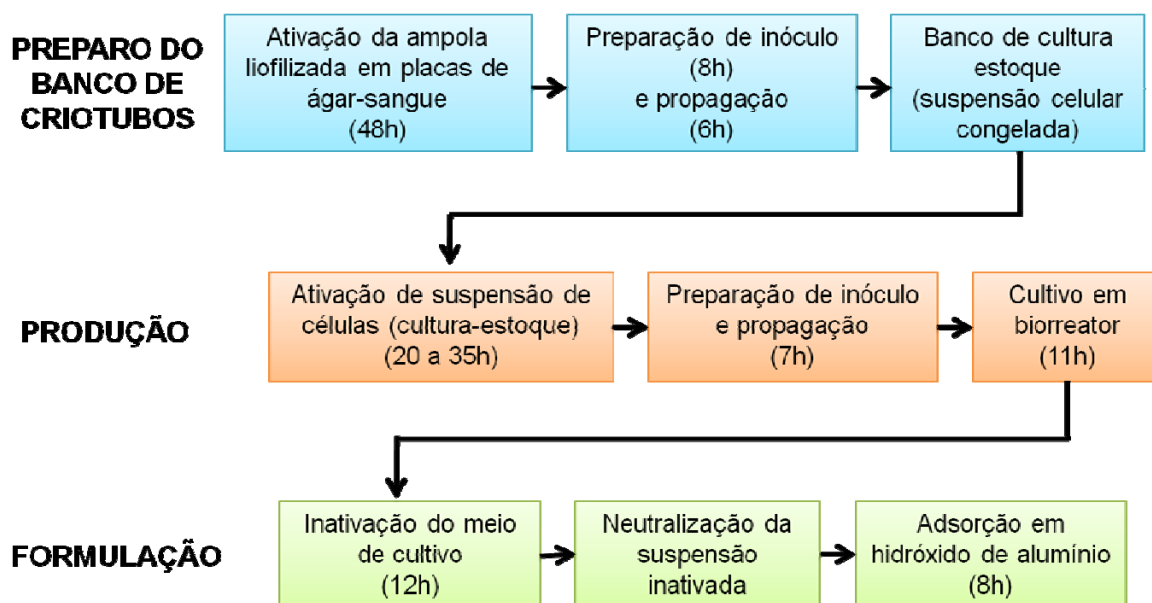


Figura 1.1 - Esquema representativo das 3 fases presentes no preparo de uma bacterina. Entre parênteses: tempo de cada etapa.

A visão global do conjunto de atividades envolvidas na obtenção da bacterina é fundamental, já que as características do produto final, a produtividade do processo e o custo do mesmo são determinados não pelas etapas isoladas, mas pelo conjunto. Da mesma forma, a otimização do processo depende da identificação das etapas críticas, ou seja, daquelas que apresentam maior impacto na produtividade e no custo. No caso da produção da vacina de células inativadas, a produtividade do mesmo é basicamente determinada pela concentração de células na suspensão obtida ao final do cultivo e pelo tempo total consumido para obtenção da bacterina. Assim, em termos de produtividade, há duas etapas críticas dentre as representadas na Figura 1.1: a etapa de ativação da suspensão celular armazenada em criotubos e a etapa de cultivo em biorreator. A etapa de ativação é crítica por representar até quase 50 % do tempo total requerido para a produção da bacterina, de acordo com os valores de tempo correspondentes a cada etapa representados na Figura 1.1. Já a presença de altas concentrações celulares na suspensão a ser utilizada para a preparação da vacina depende essencialmente da estratégia de cultivo adotada. Além disso, devido ao alto custo de alguns componentes do meio de cultura, o cultivo em biorreator é também a etapa de maior impacto no custo de produção da bacterina.

Cultivos em biorreator de *E. rhusiopathiae* foram estudados em batelada simples e alimentada por Silva e colaboradores (2008). O meio utilizado continha glicose como fonte de carbono e peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Os

melhores resultados em termos de produção de biomassa e expressão de antígenos foram alcançados no cultivo em batelada alimentada, chegando a uma concentração celular de quase 10 g/L. Os autores constataram que, nas condições de cultivo empregadas, o crescimento foi inibido pelo acúmulo de ácido láctico. Mesmo na fase de alimentação, quando a velocidade específica de crescimento do microrganismo foi mantida em $0,1 \text{ h}^{-1}$, a velocidade de formação de ácido láctico não foi alterada. Portanto, a obtenção de maiores concentrações de biomassa ao final do bioprocessamento depende fundamentalmente de estudar estratégias de cultivo que levem à menor produção de ácido láctico. O problema do acúmulo de metabólitos que inibem o crescimento é comum em cultivo de bactérias e vem sendo extensivamente estudado em cultivos de alta densidade de *E. coli* visando à produção de proteínas recombinantes. Uma das estratégias mais bem sucedidas é a substituição da glicose por outras fontes de carbono, como glicerol e frutose. Como as células das bactérias assimilam mais lentamente esses açúcares devido à ausência de um sistema de transporte tão eficiente quanto o da glicose, evita-se a saturação da via glicolítica, responsável pelo catabolismo do excedente de carbono pelas vias fermentativas (Rocha, 2003).

Conforme comentado anteriormente, além da importância evidente para a obtenção do produto (células inativadas) em grande concentração, a etapa de cultivo também impacta no custo do processo assim como na qualidade do produto. A presença de peptona certificada, de altíssima qualidade e de preço elevado (aproximadamente 5000 reais por kg) no meio de cultivo é a principal razão para o aumento do custo do meio. Além disso, por ser de origem animal, a presença de peptona causa problemas que vão além do custo, tendo em vista as recomendações da FDA e ANVISA em relação à minimização da presença de suplementos de origem animal em meios de cultivo.

Diante das considerações expostas anteriormente, estabeleceu-se como objetivos do presente trabalho:

- a) estudar as condições empregadas na preparação das suspensões celulares para congelamento e formação de cultura estoque em criotubos, assim como a etapa de ativação dos mesmos;
- b) estudar o crescimento de *E. rhusiopathiae*, a formação de ácido láctico e a expressão de antígeno em meios de cultivo contendo fontes de carbono alternativas à glicose;

c) estudar o crescimento de *E. rhusiopathiae*, a formação de ácido láctico e a expressão de antígeno em meios de cultivo contendo fontes de nitrogênio de origem vegetal;

d) estudar o comportamento do microrganismo no novo meio de cultivo, isento de substratos de origem animal, em biorreator.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Erysipelothrix rhusiopathiae é reconhecida como patógeno causador da erisipela suína, doença responsável por grandes prejuízos na suinocultura mundial, sendo que o método mais eficaz no combate à doença é por meio da vacinação dos rebanhos. A maioria das vacinas disponíveis no mercado nacional é produzida a partir de células inativadas e sua produção é realizada mediante o cultivo do microrganismo em condições adequadas.

Nos tópicos a seguir, serão apresentadas e discutidas informações sobre as vacinas, as características metabólicas e fisiológicas de *E. rhusiopathiae*, as estratégias de cultivo mais empregadas e a assimilação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio por bactérias.

2.1. Vacinas

O termo vacina advém de *vaccinia*, o agente infeccioso da varíola bovina, que quando foi injetado no organismo humano, proporcionou imunidade à varíola no ser humano. Vacinas são formulações que contêm agentes infecciosos ou seus produtos, como proteínas, toxinas, partes de bactérias ou vírus, ou mesmo vírus e bactérias inteiros, atenuados ou mortos. Uma vez introduzidas no organismo de um animal, suscitam uma reação do sistema imunológico semelhante à que ocorreria no caso de uma infecção por um determinado agente patogênico, desencadeando a produção de anticorpos que acabam por tornar o organismo imune. Além disso, desenvolvem a chamada memória imunológica, tornando mais fácil o reconhecimento do agente patogênico em futuras infecções e aumentando a eficiência do sistema imune em combatê-lo (Stern, 2005; Silva, 2007).

A escolha do tipo de vacina a ser produzida depende, dentre uma série de fatores, do nível de conhecimento do mecanismo de interação existente entre o agente patogênico e o hospedeiro e também do volume do investimento a ser feito no desenvolvimento do processo. Os tipos de vacinas mais comuns podem ser divididas em duas grandes classes: as vacinas celulares, que são produzidas a partir de organismos inteiros atenuados ou organismos inteiros inativados, e as vacinas acelulares, produzidas a partir de subunidades antigênicas purificadas, peptídeos sintéticos, vetores vivos recombinantes ou DNA em plasmídeos. (Abbas *et al.*, 1994; Silva, 2007).

Vacinas produzidas a partir de organismos inteiros atenuados utilizam formas não-patogênicas do microrganismo desejado. A atenuação é feita de forma que a virulência (ou patogenicidade) do microrganismo patogênico seja reduzida para um nível "seguro" (avirulento) sem destruir sua capacidade de estimular uma resposta imune. A principal vantagem das vacinas atenuadas é que o microrganismo atenuado simula uma infecção sem provocar a doença, e por estar vivo possibilita uma estimulação na produção de anticorpos contínua, dando tempo suficiente para produção de células de memória pelo sistema imunológico do organismo infectado. Como desvantagem, existe a possibilidade do patógeno se converter em sua forma virulenta, principalmente quando este encontra sistemas imunológicos debilitados que permitem seu crescimento. Vacinas produzidas a partir de organismos inteiros inativados utilizam o microrganismo morto por aquecimento ou meios químicos, de forma que não sejam mais capazes de se multiplicar ou produzir efeitos prejudiciais às células ou tecidos do hospedeiro vacinado. Apesar desse tratamento, os antígenos de superfície permanecem intactos. (Silva, 2007).

As vacinas acelulares, que utilizam subunidades antigênicas purificadas são constituídas por apenas partes do agente patogênico (proteínas, polissacarídeos e outros componentes celulares) necessárias na indução de uma resposta imune. Apesar de oferecerem menos risco, essas vacinas possuem um custo mais elevado. Além disso, o nível de proteção nem sempre é o mesmo das vacinas celulares. Também podem ser utilizados peptídeos sintéticos, que representam as regiões do antígeno (que precisa ser protéico) que são identificadas pelas células do sistema imunológico. Nesse caso, a principal desvantagem é a necessidade do uso de adjuvantes e de proteínas carregadoras para apresentação adequada desses peptídeos, além do elevado custo e da dificuldade da síntese desses compostos. Vacinas acelulares podem ser produzidas a partir de vetores recombinantes vivos, utilizando-se um microrganismo atenuado como vetor (viral ou bacteriano) para transportar os antígenos ou os genes codificadores dos antígenos no organismo vacinado. A principal vantagem desse tipo de vacina é a possibilidade de imunização oral ou nasal, além de dispensar o uso de adjuvantes (Silva, 2007). Por último, podem ser citadas as vacinas acelulares produzidas a partir da injeção de DNA na forma de plasmídeos em células receptoras, geralmente musculares, ocasionando uma forte resposta imune. A técnica acaba induzindo a expressão de proteínas codificadas por este DNA, que então ativam linfócitos T citotóxicos e auxiliares, e a produção de anticorpos (Liu, 1995; Silva, 2007).

Em relação à erisipela suína, a maioria das vacinas utilizadas na prevenção contra essa enfermidade é do tipo que contém o microrganismo inteiro atenuado ou inativado

(bacterinas). Acredita-se que as vacinas com microrganismos vivos atenuados são mais eficientes na indução da imunidade mediada por células que as vacinas inativadas e que, portanto seriam mais efetivas contra bactérias intracelulares facultativas, que é caso da *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Porém, têm sido visto que as vacinas inativadas também são capazes de induzir a imunidade mediada por células, dependendo do adjuvante usado na formulação da vacina (Silva, 2007; Wang, 2010). Além disso, Imada *et al.* (2004) relataram que 37% dos casos de erisipela suína crônica detectada nos últimos 11 anos no Japão ocorreram como resultado de falha da vacina atenuada.

Embora as vacinas atenuadas e inativadas sejam as encontradas no mercado para imunização contra erisipela suína, outros antígenos de superfície presentes nas células de *E. rhusiopathiae*, como as proteínas de 64-66 kDa denominadas SpaA (*Surface protein antigen A*) e RspA, RspB (*rhusiopathiae surface protein A e rhusiopathiae surface protein B*, com massas moleculares de 219 e 85 kDa, respectivamente), têm sido estudados como potenciais candidatos ao desenvolvimento de vacinas alternativas (Devi *et al.*, 2010).

A proteína SpaA é um antígeno comum de proteção, sendo considerada a melhor alternativa para desenvolvimento da vacina de subunidade antigênica e de DNA.

Utilizando mutagênese transposon, vacinas produzidas a partir de microrganismos vivos recombinantes têm sido propostas (Shimoji *et al.*, 1998b). Mutagênese transposon, ou transposição mutagênese é um processo que permite que genes sejam transferidos para o cromossomo de um organismo hospedeiro, interrompendo ou modificando a função de um gene existente, causando mutação. No caso das bactérias, mutagênese transposon é normalmente realizada utilizando um plasmídeo a partir do qual um transposon (a seqüência que será inserida) é extraído e inserido no cromossomo hospedeiro (Lorenzo *et al.*, 1990).

Uma vacina utilizando um veículo vivo para expressão da proteína heteróloga, foi desenvolvida utilizando uma cepa atenuada de *E. rhusiopathiae* (Shimoji *et al.*, 2002b). Um plasmídeo portador do gene do antígeno de *E. rhusiopathiae* foi construído e o antígeno SpaA foi produzido em *Lactococcus lactis* com antigenicidade estável sem degradação com o crescimento. Isto foi desenvolvido como forma de se tornar um veículo seguro e apropriado para uma vacina polivalente (Cheun *et al.*, 2004). Uma enterotoxina de *E. coli* recombinante, produzida utilizando o sistema de expressão de *Bacillus brevis* aliado a uma vacina de subunidade recombinante de *E. rhusiopathiae*, resultou em um aumento substancial dos níveis de anticorpos nas mucosas e no plasma contra o *E. rhusiopathiae* altamente virulento em

porcos imunizados. Isto representa um promissor imunoadjuvante de potencial aplicação de vacinas intranasais contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Wang, 2010).

2.2. Aspectos fisiológicos e metabólicos de *Erysipelothrix rhusiopathiae*

2.2.1. Aspectos Fisiológicos

A erisipela ou ruiva dos suínos é uma doença de distribuição mundial, de caráter hemorrágico e que usualmente causa lesões cutâneas, articulares, cardíacas ou septicemias em suínos. É causada pela bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não-móvel, não-esporulado, que pode ser filamentoso e que é classificado no gênero *Erysipelothrix* juntamente com outras duas espécies, *E. tonsillarum* e *E. inopinata*. A maioria das cepas cresce lentamente em ágar sangue, produzindo uma zona de hemólise parcial (Neumann, 2009). Sulfeto de hidrogênio (H₂S) é produzido por 95% das amostras de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. A temperatura ótima de crescimento para esse microrganismo está entre 30°C e 37°C e o pH ótimo situa-se na faixa de 7,2 a 7,6. A morfologia das colônias é descrita como clara, circular e muito pequena, com um diâmetro de 0.1-0.5mm após 24 horas de incubação a 37 8°C, ou 0.5-1.5mm após 48 horas de incubação (Wang, 2010, Pescador *et al.*, 2007).

A Figura 2.1 mostra uma fotografia de uma placa de ágar-sangue com colônias de *E. rhusiopathiae* e imagem obtida com microscópio, com os microrganismos coloridos com corante de Gram.

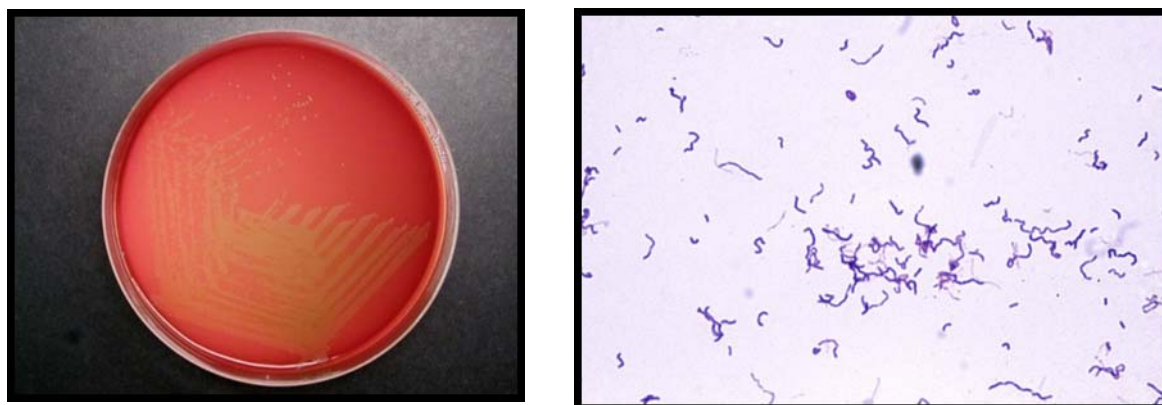


Figura 2.1- Fotografia de cultura de *E. rhusiopathiae* em placa de ágar-sangue e fotografia obtida em microscópio, bactérias coloridas com o reagente de Gram. (<http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62>, último acesso: 28/02/2010)

Tradicionalmente, a metodologia para isolamento de *E. rhusiopathiae* envolvem o uso de meios de cultura seletivos. Meios de cultura em sangue, comercialmente disponíveis são satisfatórios para o isolamento primário de *E. rhusiopathiae*.

Um grande número de meios seletivos para isolamento de *Erysipelothrix* já foi descrito. Na Tabela 2.1 são descritas simplificadaamente as composições de alguns deles (Wang, 2010):

Tabela 2.1 - Meios de cultura utilizados para isolamento de *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Wang, 2010)

Autor	Meio	Composição
Wood (1965)	Erysipelothrix Selective Broth - ESB (Meio Seletivo Erysipelothrix)	soro, triptose, canamicina, neomicina e vancomicina
Harrington and Hulse (1971).	Modified blood azide - MBA (Meio modificado de sangue com azida)	meio ágar seletivo contendo azida de sódio e sangue de cavalo ou soro
Packer (1943)	Meio Packer	azida de sódio e cristal violeta
Ewald (1981)	Meio Bohm	azida de sódio, canamicina, fenol e água azul (blue water)
Shimoji e colaboradores (1998)	Meio de Shimoji	tryptic soy broth, Tween 80, Tris-aminometano, cristal violeta e azida de sódio

Todos estes meios de cultivo, descritos na Tabela 2.1, fazem uso da resistência do organismo aos antibióticos e tolerância de produtos químicos. Cada um tem aspectos positivos, mas nenhum é o ideal. O meio ESB é considerado como o melhor meio seletivo, MBA e meio Parker exigem menos tempo de incubação, mas não são tão seletivos. O meio de Shimoji combinado com PCR tem sido utilizado para o diagnóstico rápido de erisipela em suínos (Wang, 2010).

O principal hospedeiro de *E. rhusiopathiae* é o suíno doméstico. Entretanto, mamíferos selvagens e pássaros também podem ser fonte de infecção. É estimado que 30 - 50% dos suínos sadios alojem o *E. rhusiopathiae* nas tonsilas e outros tecidos linfóides. Como podem eliminar a bactéria nas fezes e secreções oronasais, criam uma importante fonte de infecção, já que as bactérias contaminam o solo, a água, a cama e os alimentos. A penetração do agente ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados, bem como através de ferimentos na pele. Em humanos, *E. rhusiopathiae* causa o erisipelóide, uma lesão eritematosa e edematosa de pele, localizada, ocorrendo geralmente nas mãos e dedos, podendo haver inflamação nas articulações da região. É caracterizada como uma doença ocupacional, infectando pessoas que trabalham com manipulação ou processamento de carne,

agricultores, veterinários, trabalhadores de curtumes e laboratoristas. A bactéria foi ocasionalmente isolada em casos de endocardite, mas raramente causa doença septicêmica aguda em humanos. A infecção ocorre através de ferimentos na pele, sendo muito resistente a outras vias de penetração (Pescador *et al.*, 2007).

De acordo com Pescador *et al.* (2007), existem pelo menos 22 sorotipos de *Erysipelothrix sp.*, os quais apresentam virulência variável. Entretanto, poucos estão associados com doença clínica. Os suínos são suscetíveis a 15 sorotipos, sendo que o sorotipo 1 (subdividido em 1a e 1b) e o sorotipo 2 (subdividido em 2a e 2b) são os mais importantes na suinocultura. Cerca de 80% das linhagens de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos pertencem aos sorotipos 1a, 1b e 2b (Neumann, 2009; Silva, 2007).

A patogenicidade desse microrganismo está relacionada com a presença da cápsula, que é responsável pela resistência da bactéria à fagocitose e identificada como um antígeno não protéico com massa molecular de 14 a 22 kDa. Outro fator de virulência identificado é a enzima neuraminidase que tem importante papel na adesão da bactéria e subsequente invasão das células hospedeiras. Estas observações sugerem que a patogenicidade de *E. rhusiopathiae* está principalmente relacionada à sua habilidade de sobrevivência no interior das células dos organismos infectados, mas as bases moleculares dessa interação assim como do mecanismo de aquisição de imunidade não estão claramente elucidadas (Silva, 2007).

Além da forma aguda, contra a qual a vacinação é dirigida, a erisipela também pode ocorrer na forma subaguda ou crônica. O agente também pode infectar outras espécies, causando poliartrite em ovinos e morte em perus. Foi isolado de órgãos de mamíferos domésticos e selvagens, pássaro, répteis, anfíbios e na superfície corporal de peixes (Wood, 1992).

2.2.2. Metabolismo de *E. rhusiopathiae*: formação do ácido láctico e inibição pelo mesmo

Estudos realizados por Robertson e McCullough (1968) mostraram que o catabolismo da glicose para a *E. rhusiopathiae* segue majoritariamente (96%) a via Embden-Meyerhof-Parnas, e uma pequena parcela, apenas 4%, é metabolizada pela via da hexose monofosfato. O principal metabólito produzido em condição anaeróbia é o ácido láctico, mas também há produção de ácido acético, ácido fórmico e etanol em menores quantidades.

A glicose é o principal nutriente da maioria dos microrganismos, pois é bastante rica em energia. Assim como ocorre na maioria das células, o catabolismo da glicose por *E. rhusiopathiae*, em condições aeróbias, se dá pela via EMP até a formação de piruvato. A oxidação do piruvato até a formação de água e gás carbônico é um processo com alto rendimento energético, denominado fosforilação oxidativa, constituída de três mecanismos distintos, que são intimamente relacionados: produção de acetil coenzima A, ciclo de Krebs e a cadeia transportadora de elétrons. Já o metabolismo anaeróbico da glicose inclui a glicólise e a fermentação. Durante os últimos estágios desse processo, o NADH (gerado na glicólise) é convertido a NAD⁺ pela perda de um hidrogênio. Esse hidrogênio é adicionado ao piruvato que é oxidado, com perda do seu grupo carboxila na forma de CO₂, formando o grupo acetil da acetil coenzima A, e dependendo da espécie, é produzida uma variedade de produtos metabólicos finais.

A seguir, serão descritas de maneira mais específica as etapas de degradação da glicose a piruvato por meio da via glicolítica. Os pontos de importância, nessa seqüência, estão indicados abaixo e as reações estão esquematizadas na Figura 2.2 (Lehninger, 1990; Rocha, 2003).

- A. Transporte de glicose para a célula pelo sistema fosfoenolpiruvato-fosfotransferase. A membrana celular não é permeável à glicose. Porém, existe um sistema de transporte que capta a glicose do meio. A primeira fase da glicólise resulta em quebra da cadeia da hexose em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, cada uma com 3 átomos de carbono. No primeiro passo da glicólise, a molécula de glicose é preparada para as reações subseqüentes através da fosforilação na posição 6 e formação da glicose 6-fosfato às custas do ATP, catalisada pela enzima hexoquinase.
- B. Isomerização reversível da glicose-6-fosfato em frutose 6-fosfato, envolvendo o deslocamento do oxigênio carbonílico 1 para o carbono 2, esta reação é catalisada pela enzima fosfoglicoisomerase.
- C. A fosfofrutoquinase catalisa a transferência irreversível de um grupo fosfato do ATP para a posição 1 da D-frutose 6-fosfato formando a frutose 1,6-difosfato. A clivagem da frutose 1,6-difosfato em duas trioses fosfato diferentes, gliceraldeído 3-fosfato e diidroxiacetona é catalisada pela enzima frutose difosfato aldolase, geralmente chamada de aldolase. Apenas uma das trioses fosfato formadas pela aldolase, o gliceraldeído 3-fosfato, pode ser degradada pelos passos seguintes da glicólise. Entretanto,

a diidroxiacetona fosfato pode ser convertida em gliceraldeído 3-fosfato pela enzima triose fosfatoisomerase.

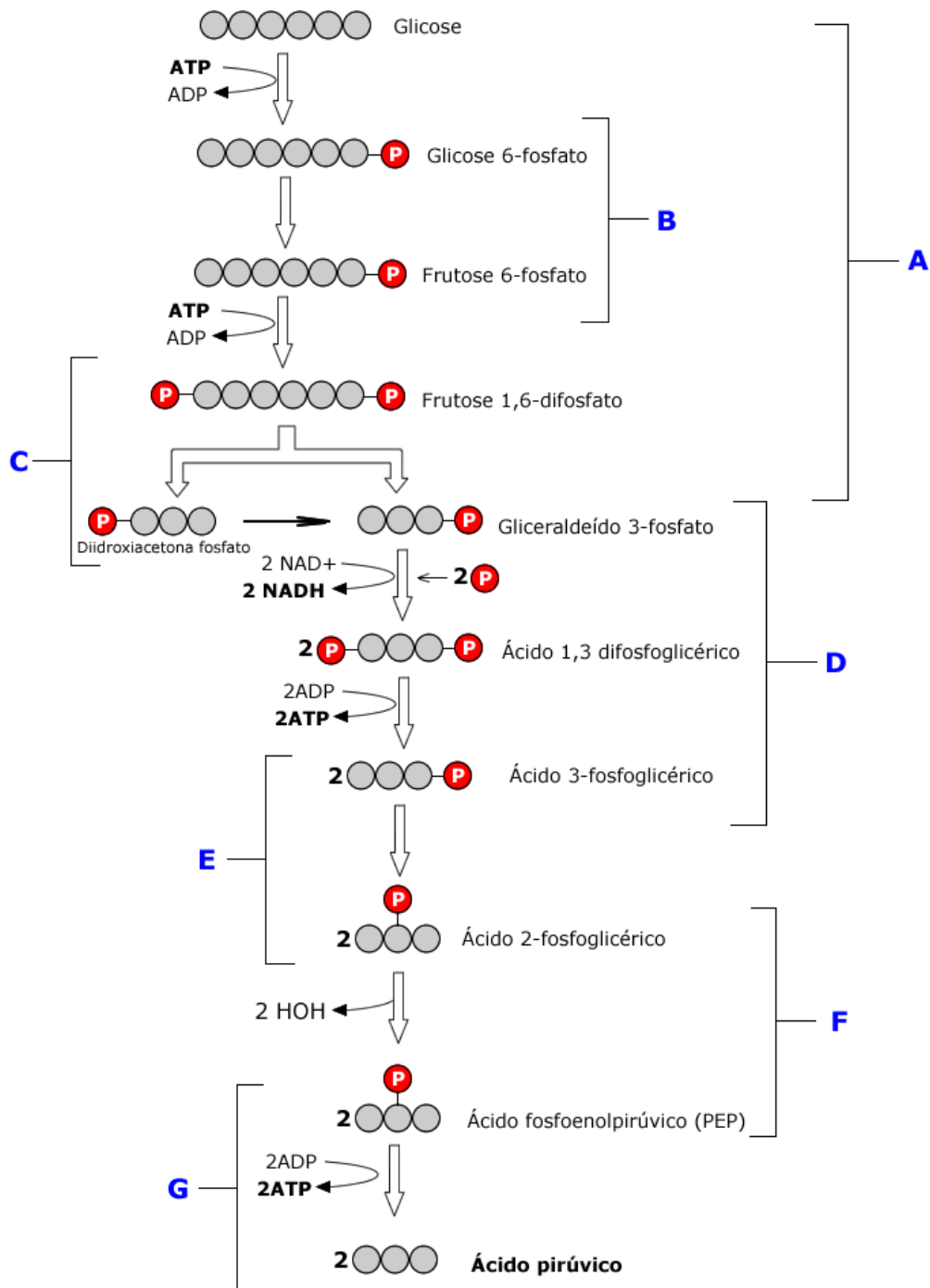


Figura 2.2 - Glicólise: os principais passos na oxidação da glicose até a formação do ácido pirúvico (passos A até G descritos no texto).

D. A segunda fase da glicólise começa pela oxidação do gliceraldeído 3-fosfato a 3-fosfogliceril fosfato, catalisada pela gliceraldeído fosfato desidrogenase.

O receptor de hidrogênio na reação é o NAD^+ . A reação com o NAD^+ ocorre pela transferência enzimática de um hidreto (H^-) do grupo aldeído do gliceraldeído 3-fosfato para o NAD^+ , produzindo a coenzima reduzida NADH . O outro átomo de hidrogênio da molécula do substrato aparece no meio como H^+ .

O NADH formado nesta reação precisa ser reoxidado a NAD^+ , pois só assim poderá participar da degradação a piruvato de muitas moléculas de glicose. Como o NAD^+ ocorre em quantidades limitadas no interior da célula, a glicólise logo cessaria por falta de NAD^+ caso o mesmo não possa ser reoxidado. A enzima fosfogliceratoquinase transfere o grupo fosfato do grupo carboxílico do 3-fosfogliceril fosfato para o ADP , formando ATP .

E. Na conversão do 3-fosfogliceril fosfato em 2-fosfoglicerato ocorre um deslocamento reversível do grupo fosfato da posição 3 do glicerato para a posição 2. Esta reação é catalisada pela enzima fosfogliceromutase.

F. A desidratação do 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato é catalisada pela enolase e consiste da remoção reversível de uma molécula de água do 2-fosfoglicerato com a produção de fosfoenolpiruvato.

G. A transferência do grupo fosfato do fosfoenolpiruvato é catalisada pela piruvatoquinase. Nela o produto aparece na forma enólica, que sofre um rearranjo rápido, não enzimático, e transforma-se na forma cetônica do piruvato. (Lehninger, 1990; Marzocco, 2007).

Sob condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a lactato pela enzima desidrogenase láctica e libera energia que é armazenada em duas moléculas de ATP . O NADH gerado pela glicólise não pode ser reoxidado pelo oxigênio e precisa ser reoxidado pelo piruvato. Em condições aeróbicas o produto final da glicólise não é o lactato, mas o piruvato, e o NADH formado pela desidrogenação do gliceraldeído 3-fosfato é reoxidado a NAD^+ pelo O_2 .

A formação de ácido láctico é observada no metabolismo da glicose por várias bactérias. As bactérias homofermentativas convertem glicose quase que exclusivamente em

ácido láctico (geralmente através da glicólise), enquanto que as heterofermentativas convertem glicose em etanol e CO₂, além de produzir ácido láctico e outros ácidos orgânicos. Apesar do tipo de fermentação que ocorre depender da bactéria, uma fermentação homofermentativa, em alguns casos, pode ser convertida em heterofermentativa, mudando as condições da fermentação. As diferentes rotas da glicose no metabolismo de bactérias lácticas estão esquematizadas na Figura 2.3 (Hofvendahl e Hargedal, 2000).

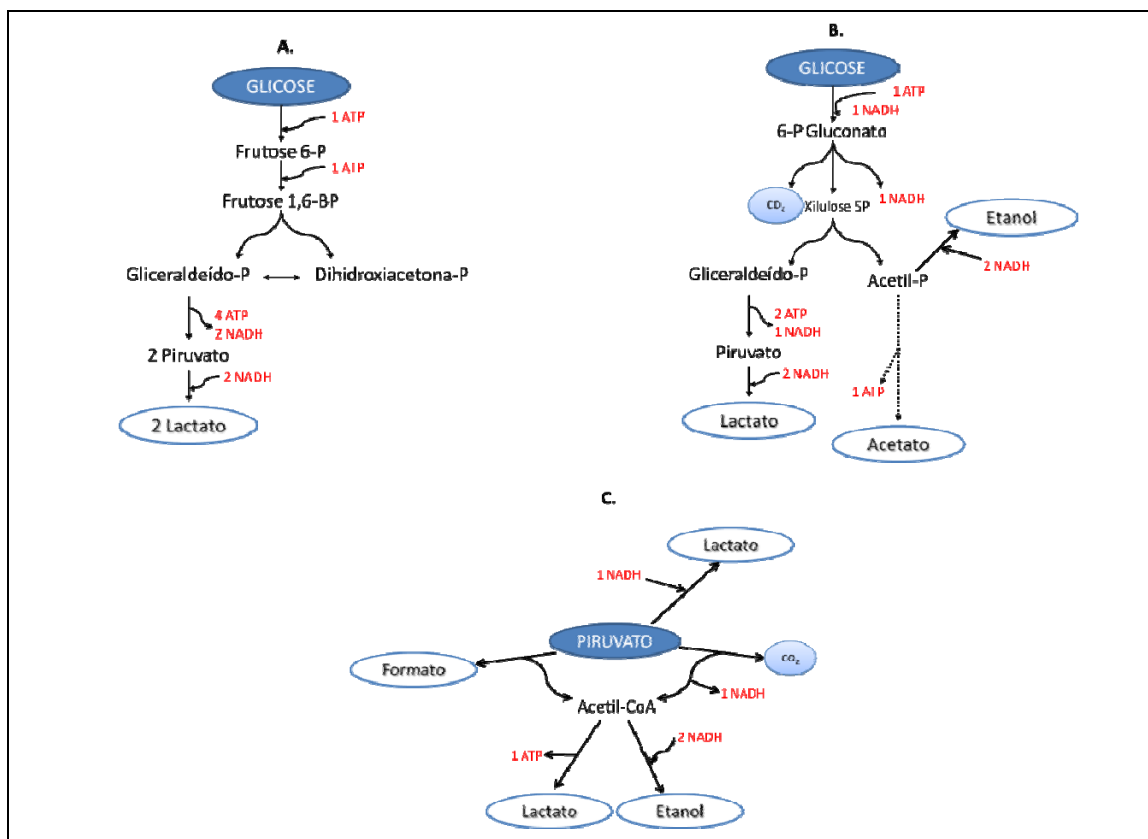


Figura 2.3 - Catabolismo em bactérias lácticas. Homofermentação (A), heterofermentação (B) e fermentação mista (C). P = fosfato, BP = bifosfato, LDH = desidrogenase láctica, PFL = formato piruvatase, e PDH = piruvato desidrogenase (Hofvendahl, 2000).

A fermentação homoláctica (homofermentação) pode ser representada pela seguinte equação:



No entanto, 100% de conversão nessa reação nunca é obtido. Existem diversos subprodutos, como etanol, ácido acético, ácido fórmico, dióxido de carbono, e outras substâncias que podem ser formadas.

Fermentações com um rendimento maior que 80% do valor teórico do ácido láctico são consideradas homolácticas (ou homofermentativas). No caso das

heterofermentativas, o ácido láctico e os subprodutos são produzidos em quantidades equimolares.

O ácido láctico ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) é um ácido orgânico fraco, um dos metabólitos da respiração anaeróbia em bactérias (Figura 2.4). O ácido láctico ocorre amplamente na natureza, sendo encontrado no homem, animais, plantas e microrganismos. Foi descoberto por Scheele, em 1780, no leite azedo. Já Blondeau (1847) reconheceu o ácido láctico como produto final do processo de fermentação (Buchta, 1983).

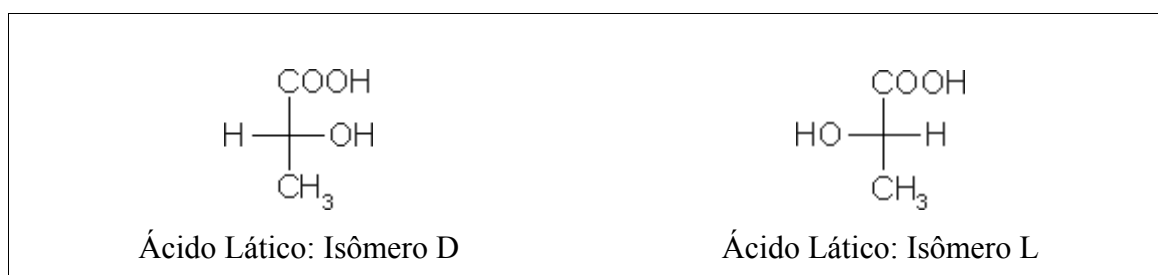


Figura 2.4 - O ácido láctico apresenta isomeria ótica. Isômeros óticos do ácido láctico, a forma destrógira (D-ácido láctico) e levógira (L-ácido láctico)

Assim que é formado, o ácido láctico permanece no meio de fermentação em pH aproximadamente neutro, tanto no estado ionizado ($\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$) quanto no estado protonado ($\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$). A forma protonada pode passar através da membrana lipídica para interior da célula, onde se dissocia no pH superior interno para $\text{CH}_3\text{CHOHCOO}^-$ e H^+ , diminuindo o pH intracelular. O mecanismo de inibição pelo ácido láctico está relacionado com a solubilidade do ácido láctico não dissociado dentro da membrana citoplasmática e com a insolubilidade do lactato dissociado, causando acidificação do citoplasma e falha na força próton-motriz. Isso acaba influenciando o gradiente de pH entre as membranas e diminuindo a quantidade de energia disponível para o crescimento celular. Portanto, para atenuar o efeito inibitório do ácido láctico durante cultivos microbianos, sua formação precisa ser reduzida ou então ele deve ser removido seletivamente do meio de cultivo (Xu *et al.*, 1999).

A atividade antimicrobiana ocorre através da difusão de moléculas de ácido láctico nas células dos microrganismos até atingir um equilíbrio, de acordo com o gradiente de pH, causando perturbações na membrana celular e inibição de reações essenciais ao metabolismo, causando a morte da célula.

Embora a formação de ácidos orgânicos seja característica do metabolismo anaeróbio, ela também pode ser observada em condições aeróbias em um processo denominado metabolismo *overflow* de glicose. A ocorrência do metabolismo *overflow* tem

sido amplamente estudada para *E. coli* e, para esse microrganismo, tem sido associada ao estabelecimento das seguintes condições: velocidade específica de crescimento alta, velocidade específica de assimilação de glicose elevada, alta concentração de dióxido de carbono dissolvido e concentração de glicose no meio superior a 1-2 g.L⁻¹. Embora esta última condição possa ser facilmente encontrada na literatura, é mais provável que uma alta vazão de glicose para o interior das células ou uma velocidade de crescimento específico alta sejam os principais fatores que induzam à produção de ácido acético em cultivos de *E. coli*. O valor limite para a velocidade de crescimento específico ou para a velocidade de captação de glicose, conhecida como velocidade de crescimento específico crítico (μ_{crit}), depende do microrganismo, das condições de cultura e da composição dos meios de cultivo (Han *et al.*, 2002; Rocha, 2003).

A origem desse fenômeno pode estar relacionada a uma falha na regulação da velocidade máxima de captação de glicose pelo sistema fosfotransferase (descrito na etapa A, Figura 2.2). de *E. coli*, em altas concentrações de glicose. Conseqüentemente, o fluxo de glicose para dentro das vias metabólicas centrais produz mais acetil-CoA que a quantidade que pode ser usada para a biossíntese oxidativa e geração de energia.

Uma possível explicação sugere que a cadeia respiratória, onde o NADH é re-oxidado, tenha uma capacidade limitada. Como o fluxo do Ciclo de Krebs resulta numa produção significativa de NADH e o fluxo para produção de ácido acético não, o redirecionamento do fluxo de acetil-CoA para ácido acético seria necessário para evitar acúmulo de NADH, quando a cadeia respiratória está saturada (Rocha, 2003). Outra possível explicação é que o Ciclo de Krebs tem uma capacidade limitada e que esse limite é atingido antes mesmo da respiração. Quando o Ciclo de Krebs está saturado, o aumento da captação de glicose resulta novamente no desvio do fluxo de acetil-CoA a ácido acético. Nesse caso, a produção de NADH e a respiração podem aumentar ainda mais até que sejam atingidos o limite da capacidade respiratória ou a captação de glicose máxima (Xu *et al.*, 1999).

Portanto, embora a *E. coli* seja um dos microrganismos mais estudados, ainda não há uma explicação comprovada para um dos mais importantes fenômenos observados durante o seu crescimento. No entanto, evidências sugerem que a limitação do Ciclo de Krebs é a justificativa mais provável para a formação de ácido acético em meio aeróbio e é evidente que a produção de ácido acético na fermentação aeróbia de *E. coli*, constitui um dos principais problemas enfrentados durante a realização de cultivos (Rocha, 2003).

Cultivos com *E. coli* e *Bacillus subtilis* realizados por Fuhrer *et al.* (2005) e estudados pela metodologia de análise dos fluxos metabólicos utilizando C13, mostraram que,

em comparação com outros microrganismos, *E. coli* e *Bacillus subtilis* apresentaram metabolismo *overflow* de glicose, ocorrendo metabolismo anaeróbio mesmo em condições aeróbias. Fuhrer *et al.* (2005) chegaram à conclusão que esse tipo de metabolismo não é uma característica típica do microrganismo estudado, mas sim uma adaptação às condições de cultivo empregadas.

Estudos realizados por Silva *et al.* (2008) mostraram que, sob condições aeróbias e anaeróbias, *E. rhusiopathiae* oxida a glicose a ácidos orgânicos, como ácido acético, láctico, fórmico e etanol. O acúmulo de uma quantidade considerável de ácido láctico como principal subproduto foi observado em cultivos realizados tanto em condições aeróbias como anaeróbias, indicando que as vias fermentativas são ativadas mesmo quando há disponibilidade de oxigênio. Conforme descrito por Silva *et al.* (2008), o acúmulo de ácido láctico no meio de cultura afeta negativamente o crescimento celular. Além do ácido láctico, há formação de outros metabólitos, como ácido acético e ácido fórmico.

2.3. Estratégias de cultivo

As condições de cultivo influenciam o metabolismo do microrganismo e conseqüentemente o crescimento celular, a formação de metabólitos e a expressão de proteínas. Assim, uma das primeiras decisões a ser tomada é a escolha entre o método de cultivo contínuo ou descontínuo (Shuler e Kargi, 2006). O reator descontínuo, também conhecido como reator batelada, é simplesmente um tanque com agitação que contém em um momento inicial todos os reagentes, dos quais são feitas medidas de tempos em tempos para se aferir a extensão da reação. É o reator mais utilizado em laboratórios experimentais, pela simplicidade e adequação (Levenspiel, 1974).

A Tabela 2.2 faz uma comparação entre as principais características das formas de cultivo mais comuns (Nielsen *et al.*, 2003).

Em função das vantagens em termos de risco de contaminação, risco de mutação e flexibilidade à demanda apresentadas na Tabela 2.2, a maioria dos bioprocessos é realizada em processos descontínuos (batelada ou batelada alimentada), utilizando biorreatores tipo tanque agitado.

Tabela 2.2 - Comparação entre as diferentes estratégias de cultivo de microrganismos em bioreatores

Características	Batelada	Batelada Alimentada	Contínuo
Volume	Constante	Variável	Constante
Regime	Transiente	Transiente/"Estacionário"	Estacionário
Composição	Varia com o tempo	Varia com o tempo no início, mas pode ser manipulada durante a fase de alimentação.	Constante
Presença em bioprocessos industriais	Muito comum	Comum	Raro
Flexibilidade à demanda	Alta	Alta	Baixa
Requerimento de mão de obra	Alto	Alto	Baixo
Operação	Simples	Mais complexa	Complexa
Possibilidade de intervenção no processo	Baixa	Razoável	Alta
Características do produto	Pode variar de um lote para outro	Pode variar de um lote para outro	Constante
Risco de contaminação	Baixo	Baixo	Alto
Risco de mutação	Baixo	Baixo	Alto
Necessidade de instrumentação, monitoramento e controle do processo	Recomendável, mas não necessária.	Necessária.	Imprescindível
Indicado para:	Formação de produto associada ao crescimento	Qualquer bioprocessos	Qualquer bioprocessos

Biorreatores do tipo tanque agitado são tipicamente cilíndricos, com fundo liso ou ligeiramente curvo. A razão entre a altura e o diâmetro do tanque pode variar, mas geralmente obedece a escala de 1:1, 2:1 ou 3:1. Em tanques pequenos, a temperatura é controlada por meio de uma camisa na qual circulam fluidos de aquecimento e refrigeração. Já para tanques grandes são necessários trocadores de calor internos e externos. Em cultivos aeróbios, o gás (ar, oxigênio ou uma mistura de ambos) é normalmente suprido por um tubo posicionado no fundo do tanque próximo ao último impelidor. A saída do gás geralmente tem um formato de anel perfurado. Muitos tanques agitados são equipados com defletores para impedir a formação de vórtice devido às forças de rotação introduzidas pela ação dos impelidores.

O cultivo em batelada (ou cultivo descontínuo) consiste na preparação dos nutrientes adequados ao desenvolvimento do microrganismo e a adição desses nutrientes ao biorreator. Após o tempo necessário, retira-se o caldo do biorreator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação e purificação do produto. A Figura 2.5 representa esquematicamente um reator tipo tanque agitado, que pode ser operado de diferentes formas. F corresponde à vazão de alimentação de meio suplementar, F' à vazão de

retirada de meio de cultivo e V ao volume. Quando $F=F'=0$, a operação é em batelada, e não entram nutrientes nem saem produtos durante o cultivo. Quando altas concentrações de substrato inibem o crescimento celular, é vantajoso iniciar o experimento com concentrações de substrato moderadas e acrescentar meio nutriente no decorrer do cultivo, o que caracteriza uma batelada alimentada ($F \neq 0$ e $F' = 0$) (Horta, 2008).

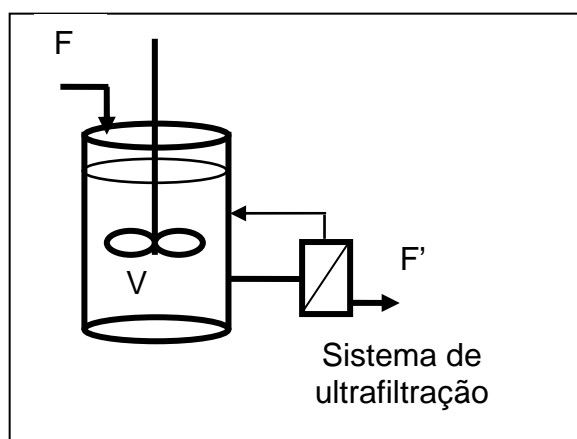


Figura 2.5- Esquema de reator tanque agitado

Estudos desenvolvidos por Silva (2007) sobre o cultivo de *E. rhusiopathiae* mostraram que a batelada alimentada apresentou um aumento de quase cinco vezes no valor máximo de DO (densidade ótica) atingido em um período apenas duas vezes maior que nos ensaios de batelada simples. Foi também observado que o efeito inibidor causado pelo aumento da concentração dos metabólitos pode ser diminuído por meio da aplicação do cultivo em batelada alimentada.

Dentre as técnicas utilizadas em cultivos em altas concentrações celulares, batelada alimentada é a forma de cultivo mais comumente utilizada comercialmente.

Sistemas de perfusão, aplicados juntamente com bateladas, bateladas repetidas ou sistemas contínuos, permitem a obtenção de uma maior concentração celular e aumento da produtividade do processo (Chang *et al.*, 1994).

Cultivos em altas concentrações celulares, tradicionalmente são afetados pela inibição do crescimento celular causada pelo aumento da concentração de ácidos orgânicos ou outros metabólitos no meio de cultivo. Para que não haja diminuição da velocidade de crescimento, é interessante retirar o meio de cultivo saturado com estes metabólitos inibitórios. Este modo de operação com F e F' não nulos caracteriza o modo contínuo. No “quimiostato”, $F=F' \neq 0$ e o efluente do reator é o próprio meio de cultivo, incluindo as células.

Alternativamente, conectando-se uma membrana de microfiltração ao biorreator e operando-se o conjunto com $F' \neq F \neq 0$ ou $F' = F \neq 0$, promove-se a retirada do meio de cultivo saturado, isento de células, que são recirculadas para o biorreator. Este modo de operação pode ser considerado uma variação da operação batelada. Devido à associação com a membrana de microfiltração, recebe a denominação de operação batelada alimentada em perfusão ou operação contínua com reciclo ($F' \neq F \neq 0$) (Horta, 2008).

Nos últimos anos, o modo de operação em batelada alimentada têm sido introduzido com frequência cada vez maior em bioprocessos para minimizar o acúmulo de subprodutos durante cultivos de altas densidades celulares em curtos períodos de tempo. Adicionalmente, essa técnica permite fácil manutenção da esterilidade do meio, comparada aos cultivos contínuos.

A inibição por nutrientes e pela formação de subprodutos pode ser evitada na batelada alimentada devido à possibilidade de reduzir a velocidade de crescimento, evitando assim limitações na transferência de oxigênio e na transferência de calor assim como a ocorrência do metabolismo overflow (Strandberg e Enfors, 1991).

A batelada alimentada acoplada à membrana de ultrafiltração também vêm sendo bastante empregada com o objetivo de reduzir a concentração de ácidos orgânicos no meio de cultivo. Chen e Jonhs (1996) empregaram um sistema de perfusão com membrana de fibra-oça com poro de 0,2 μm no cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* para evitar a inibição causada pelo acúmulo de sódio. Sem o sistema de reciclo, empregou-se uma alimentação contendo acetato a uma concentração de 1,7g/L, com taxa de diluição de 0,1h⁻¹. Contudo, o crescimento celular nessas condições foi baixo. Usando a mesma diluição e a mesma concentração de acetato na alimentação, uma maior produtividade celular foi obtida (0,083g/Lh) a uma vazão de drenagem de 0,5 L/h. A concentração de acetato dentro do reator foi menor que 50 mg/L.

Na operação em perfusão, o entupimento da membrana deve ser evitado ao máximo para assegurar a estabilidade do sistema. O modo de fluxo transversal para a filtração é um método conhecido para evitar o entupimento dos poros. No entanto, esse modo de operação é limitado pela resistência do material da membrana utilizada. A exigência de grande número de membranas, o alto custo das mesmas e a complexidade do processo limitam o emprego desse tipo de sistema em processos industriais (Chang *et al.*, 1994).

2.4. Meios de cultivo utilizados em cultura de bactérias

Para renovação da matéria viva, os elementos quantitativamente mais importantes são o carbono e o nitrogênio. Além do carbono e do nitrogênio, os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgânicos, também chamados fontes inorgânicas essenciais. Dentre eles temos o hidrogênio e o oxigênio, que são os principais constituintes de compostos orgânicos e água celular; o fósforo, sob a forma de fosfatos, importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos; o enxofre, necessário para a biossíntese dos aminoácidos cisteína, cistina, e metionina e diversas coenzimas. Também são listados o potássio, ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica (Borzani *et al.*, 2001).

Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultura: os meios sintéticos e os meios complexos. Chamam-se sintéticos aqueles cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida. Meios enriquecidos com outros componentes capazes de oferecer uma variedade grande de aminoácidos e vitaminas, como o extrato de levedura, passam a ser complexos, pois contém um produto cuja composição química não é perfeitamente definida. Na prática, a maioria dos meios utilizados é do tipo complexo e as mais variadas substâncias podem ser utilizadas na sua composição: peptonas, extrato de carne, extratos de órgãos de animais como fígado, coração, extratos vegetais como soja, arroz, ou ainda outras, como sangue, soro etc (Borzani *et al.*, 2001).

Os componentes mais comuns na composição de um meio farão parte de uma destas categorias: nutrientes nitrogênio-amínico (aminoácidos, fontes inorgânicas de nitrogênio, peptonas, infusões, extratos) ou fonte de energia (carboidratos, glicerol, etc.).

2.4.1. Fontes de Carbono

As bactérias são microrganismos heterotróficos, exigindo fontes orgânicas de carbonos; destas as mais comuns são os carboidratos, particularmente D-glicose, aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídeos, alcoóis e polímeros como o amido. O carbono forma o esqueleto das três maiores classes de nutrientes orgânicos: carboidratos, lipídeos e proteínas. Estes fornecem energia para a célula e servem como unidade básica do material celular (Borzani *et al.*, 2001).

Para *E. rhusiopathiae* ocorre fermentação (produção de ácido) a partir de glicose, frutose, galactose e lactose, mas não de maltose, xilose e manitol. A sacarose é

fermentada pela maioria das cepas de *E. tonsillarum*, mas não por *E. rhusiopathiae* (Wang, 2010).

Deem e Wiliams (1936) testaram para 5 diferentes cepas de *E. rhusiopathiae* diversas fontes de carbono, dentre elas: glicose, frutose, galactose, manose, arabinose, xilose, lactose, maltose, sacarose, rafinose, dextrina, inulina, dulcitol, glicerol e manitol. O crescimento do microrganismo foi verificado a partir de variações na acidez do caldo de cultivo, ou seja, a diminuição do pH era usada como indicação do crescimento do microrganismo e de adaptação à nova fonte de carbono. Os resultados foram positivos para glicose, frutose, galactose e lactose e parcialmente positivos para manose, arabinose e xilose. Não foi detectada relação entre a origem das cepas e as suas reações fermentativas.

White e Shuman (1961) testaram diferentes fontes de carbono no cultivo de *E. rhusiopathiae* além de testar novas metodologias para indicação da variação de pH no meio durante o crescimento do microrganismo. Foram testadas 22 cepas diferentes, em 4 meios de cultivo cada uma e as metodologias adotadas na verificação de mudanças no pH foram: utilização de um indicador químico, mudança de pH utilizando um eletrodo e titulação. As fontes de carbono testadas foram: arabinose, trealose, dextrina, maltose, sacarose, lactose, manose, xilose, frutose, galactose e glicose. Inulina, rafinose e raminose foram testados e não mostraram nenhuma variação no pH do meio. Arabionose e trealose foram oxidadas produzindo acidez mensurável em apenas duas condições empregadas no meio de base de vermelho de fenol com soro. Dextrina, maltose e sacarose foram fermentadas apenas na presença de soro de cavalo. Glicose, frutose e galactose foram fermentadas em todas as condições testadas.

2.4.2. Fontes de Nitrogênio

Todos os microrganismos necessitam nitrogênio em alguma forma, pois é a parte essencial dos aminoácidos, que formam as proteínas, nucleotídeos e coenzimas. Algumas bactérias podem utilizar o N₂ (nitrogênio atmosférico) e outras podem utilizar compostos nitrogenados como nitratos, nitritos e sais de amônia. A adição de aminoácidos ou hidrolisados de proteínas favorece o crescimento da maioria dos microrganismos heterotróficos (Borzani, 2001).

Alguns exemplos fontes de nitrogênio estão relacionados na Tabela 2.3 (Souza, 2003).

Chama a atenção o número de fontes de nitrogênio animal disponíveis (extrato de carne, sais biliares, caseína, infusões, peptonas animais e proteose peptona) frente ao pequeno número de fontes de nitrogênio de origem vegetal.

Com o surgimento contínuo de novos casos de encefalopatia espongiforme bovina, vulgarmente conhecida como doença da vaca louca ou BSE (do acrônimo inglês *bovine spongiform encephalopathy*), tornou-se ainda mais premente a busca por novas formulações de meios de cultura livres de componentes de origem animal. Muitos microrganismos que antes eram cultivados em meios com substratos de origem animal estão sendo estudados e as formulações desses meios estão sendo reformuladas. Por exemplo, testes comparativos para o cultivo de *E. coli*, mostraram que esse microrganismo cresce melhor em Soytone que no meio baseado em TSA (Tryptic Soy Media), que contém em sua formulação triptona, obtida a partir da digestão da caseína, de origem animal. O mesmo resultado foi observado no cultivo de *E. faecalis*, onde a concentração celular obtida em meio livre de nutrientes de origem animal foi o dobro da concentração obtida em outros meios. (BD Bionutrients, 2007).

A peptona de soja é produzida a partir da digestão enzimática da proteína de soja utilizando papaína. É comumente utilizada no cultivo de uma grande variedade de microrganismos por ser uma fonte de nitrogênio rica em aminoácidos e também em carboidratos (aproximadamente 20%).

Cerca de 225,6 milhões de toneladas de soja são produzidas anualmente no mundo todo. Grey *et al.* (2008) estudaram o crescimento de diversos microrganismos e relataram os efeitos de diferentes peptonas obtidas partir de diferentes fontes biológicas e distintos fornecedores. *S. enterica ssp. enterica Typhimurium* (ATCC 14028), *S. enterica ssp.* (NCTC 4840) e *Escherichia coli* (NCTC 10418) cresceram bem nos meios com as diversas peptonas de soja utilizadas, embora tenham sido observadas diferenças entre as provenientes de diferentes fornecedores, ainda que não tão acentuadas como para peptonas de origem animal (carne e caseína). Os resultados obtidos mostraram que as diferenças no processo de produção da peptona de soja adotado pelos fabricantes pode influenciar no crescimento do microrganismo. Uma possível explicação para a variação dos resultados obtidos com as diferentes peptonas é o estado da planta no momento da colheita: se o tecido estava danificado, as respostas de defesa das plantas poderiam estar levando à produção de agentes antimicrobianos. Nesse caso, o aumento da concentração de peptona no meio de cultura, resultaria em uma diminuição do crescimento do microrganismo, por conta do aumento da concentração de inibidores no meio. Outras variáveis do processo que deveriam ser

padronizadas incluem a temperatura, duração da digestão, etapas de filtração, centrifugação e secagem, durante o processamento da peptona, além de procedimentos de limpeza entre as bateladas. De fato, os processos de fabricação não são padronizados entre as empresas e contribuem para as diferenças entre peptonas de diferentes fabricantes e também variações entre os lotes dos produtos, influenciando diretamente no desempenho da peptona (Gray *et al.*, 2008).

Tabela 2.3 - Características de alguns dos principais componentes complexos usados como ingredientes dos meios de cultura:

Ingredientes	Características
Agar	É uma mistura de 2 polissacarídeos obtidos de algas marinhas, usado para solidificar o meio. É insolúvel em água fria. Não serve como nutriente para a maioria dos microrganismos e não é metabolizado durante seu crescimento.
Extrato de Carne	É um extrato aquoso de tecido muscular, concentrado sob a forma de pasta. Contém carboidratos, compostos orgânicos de nitrogênio, vitaminas hidrossolúveis e sais.
Sais Biliares	Preparado a partir de bilis de boi fresca e usado como agente inibidor seletivo em bacteriologia.
Caseína	É obtido a partir da digestão pancreática da caseína. É uma fonte importante de nitrogênio-amínico.
Infusões	Podem ser utilizadas infusões de coração de boi ou de bezerro, além de infusão de cérebro.
Peptona	É um produto da digestão enzimática de fontes animais, como a carne, ou a peptona vegetal, que é preparada a partir do digerido de farinha de soja com papaína. É solúvel em água e formada por polipeptídeos, água e oligossacarídeos.
Proteose Peptona	É uma peptona especializada, preparada por digestivos de carne fresca selecionada com papaína.
Soytona	É um hidrolisado enzimático de farinha de sementes de soja.
Tiotona	É preparado por digestivo péptico de tecido animal. Tem alta concentração de enxofre.
Extrato de Levedura	É o extrato aquoso de células de leveduras lisadas e fonte excelente de substâncias estimulantes do crescimento como vitamina B e compostos orgânicos de nitrogênio e carbono.
Água de maceração de milho	<i>Corn steep liquor</i> . É um subproduto da fase inicial do processamento do milho para produção do amido. Rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato, muito utilizada para reduzir o custo do meio de cultura utilizado para a produção de enzimas por microrganismos. (Nascimento <i>et al.</i> , 2007)

O desempenho das peptonas não é influenciado apenas do processo de fabricação. Outro fator importante no desempenho do meio de cultivo é o processo de esterilização utilizado. O processo de autoclavagem é conhecido por causar auto-oxidação dos

açúcares em meios com tampão fosfato devido à reação de Maillard, produzindo espécies tóxicas no meio, o que não acontece no processo de esterilização por filtração (Gray *et al.*, 2008).

Procedimentos empregados em laboratório durante a preparação de meios de cultivo também influenciam o desempenho das peptonas. Estes incluem o sobreaquecimento durante a autoclavagem dos meios de cultivo, resultando na produção de espécies tóxicas, que têm concentrações diferentes, dependendo da origem da peptona. Também vale ressaltar que medidas imprecisas afetam a composição do meio, as condições de armazenagem e a validade dos componentes e tempo de estoque do meio preparado afetam diretamente o desempenho do meio de cultivo. Estudos mostraram que as diferentes técnicas de esterilização afetaram a performance das peptonas no crescimento de *S. typhimurium*: as velocidades de crescimento em meio filtrado foram significativamente mais altas do que as observadas com o meio preparado por autoclavagem. Isto pode ser indicativo da degradação de algum componente do meio de cultivo, como algum aminoácido (triptofano, por exemplo) ou vitamina (biotina ou tiamina, por exemplo). Outra hipótese é que a reidratação da peptona com água, reativou enzimas presentes na digestão original da matéria prima, permitindo a continuação da digestão das peptonas em solução. Isso resultaria em um aumento do número de peptídeos de menor peso molecular ou substratos utilizáveis no meio autoclavado, levando a rápida absorção de nutrientes e, conseqüentemente, menores velocidades de crescimento. Em contraste, as enzimas presentes no meio autoclavado seriam desnaturadas pelo calor durante o processo de autoclavagem, e assim proteínas de maior peso molecular (que são mais difíceis de serem absorvidas pelos microrganismos) permaneceriam. A presença de componentes tóxicos em meios autoclavados também poderia estar prejudicando a velocidade de crescimento de *Salmonella* em meio autoclavado. No entanto, o rendimento no cultivo de *Salmonella* não foi afetado, indicando que a disponibilidade de fontes de carbono do meio não foi significativamente alterada durante os diferentes procedimentos de esterilização (Gray *et al.*, 2008).

Ainda de acordo com os estudos de Gray e colaboradores, peptonas de soja são ricas em uma grande variedade de nutrientes e o aumento da sua concentração dessas peptonas no meio, resultou no aumento da taxa de crescimento para todos os microrganismos estudados. O crescimento do microrganismo está diretamente ligado à sua capacidade de absorção de nutrientes. Assim, não importando tanto a composição do meio, esse crescimento será favorecido ou desfavorecido dependendo da capacidade do microrganismo de secretar enzimas para o meio para que haja a degradação de macromoléculas nas suas formas

utilizáveis, difusão ou absorção desses nutrientes através de permeases ou sistemas de transporte destes substratos para dentro da célula. Estes processos celulares que estariam limitando o crescimento, e não a composição do meio (Grey *et al.*, 2008).

Já nas pesquisas de Fang e colaboradores (2006) foi desenvolvido um meio de cultura para *Clostridium tetani* isento de insumos de origem animal, os quais foram substituídos por peptona de soja. Os Insumos de origem animal tradicionalmente empregados como fonte de nitrogênio para produção de toxina tetânica fornecem as proteínas, os peptídeos e os aminoácidos necessários para o crescimento do *Clostridium tetani*. Quando o toxóide é produzido, no entanto, ele acaba sendo contaminado com resíduos de formalina de proteínas animais ou seus subprodutos de degradação parcial. Essas proteínas residuais podem conter contaminantes indesejáveis como príons que causam o BSE - Encefalopatia Espongiforme Bovina ou peptídeos antigênicos que estimulam reações anafiláticas e outras reações indesejáveis. O meio tendo como fonte de nitrogênio a peptona de soja manteve o mesmo rendimento na produção da toxina tetânica, em comparação aos meios BHI e caseína, que antes eram utilizados.

Estudos realizados por Liu *et al.* (1995), nos quais foi realizada a otimização do meio de cultivo de *Bacillus natto* para produção da enzima nattoquinase, mostraram que o meio que contendo peptona de soja (Soytone) como fonte de nitrogênio foi o mais promissor. Dentre os outros meios estudados, baseados em caseína, amônia, carne de soja, o meio que continha peptona de soja, foi o que apresentou maior atividade da enzima.

A água de maceração de milho (*corn steep liquor*) ou milhocina é um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais vitaminas e fosfato e já foi utilizada por vários autores para reduzir o custo do meio de cultura utilizado para a produção de enzimas por microrganismos. A água de maceração de milho contém quantidades consideráveis de vitaminas do complexo B, exceto tiamina, provavelmente porque esta é destruída durante o processo de maceração no tratamento com SO₂ (Koffler e Liggett, 1948).

Koffler e Liggett (1948) apontaram que a principal desvantagem do uso da água de maceração de milho em microbiologia é a sua composição variável. Esta variabilidade depende do tipo e da condição do milho, e ainda mais do grande número de variáveis envolvidas no processamento de amido. Por outro lado, a água de maceração de milho é uma alternativa barata a substratos mais caros, como o extrato de levedura e a peptona, além de ser uma alternativa vegetal. O seu uso em laboratório, no cultivo de microrganismos, pode servir tanto como complemento, substituindo os extratos, ou como

principal fonte de nitrogênio e carbono para qualquer microrganismo. Em geral, qualquer organismo capaz de crescer em meios bem simples contendo extrato de carne e peptona pode crescer em meios contendo apenas a água de maceração de milho.

Nascimento *et al.* (2007) otimizaram o meio de cultura de *Bacillus sp. thermophilic*, com o intuito de aumentar a produção de proteases para fins industriais. Substituindo o citrato trissódico pela água de maceração de milho (0,5%), os autores obtiveram um aumento surpreendente na atividade das enzimas proteases.

De longe, a aplicação mais importante da água de maceração de milho em microbiologia foi feita por Moyer e Coghill, que observaram que a adição desse substrato ao meio de cultura fez com que a produção de penicilina aumentasse consideravelmente, demonstrando que a mesma apresenta propriedades capazes de estimular a biossíntese de penicilina por microrganismos dos grupos *P. notatum* e *P. chrysogenum* (Koffler e Liggett, 1948).

Até o momento, não foram relatados meios de cultivo isentos de fontes de nitrogênio de origem animal para *E. rhusiopathiae*. As fontes de nitrogênio mais utilizadas são BHI (Brain Heart Infusion), BHIS (Brain Heart Infusion suplementado com soro animal) e peptonas de origem animal. Ao contrário de muitos outros microrganismos gram-positivos, *E. rhusiopathiae* cresce pouco em meios líquidos como caldo BHI, a menos que o caldo seja suplementado com 10% de soro (BHIS). No entanto, *E. rhusiopathiae* não utiliza a fração principal da proteína do soro (Groshup, 1990). Mais detalhes sobre os meios de cultivo já descritos para *E. rhusiopathiae* serão abordados a seguir.

2.5. Cultivos de *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Os estudos sobre o cultivo de *E. rhusiopathiae* relatados na literatura enfocam inicialmente as questões de otimização do meio de cultivo e posteriormente se concentram na identificação de antígenos deste microrganismo, no intuito de se poder produzir uma vacina de subunidade antigênica contra a erisipela suína (Silva, 2007).

2.5.1. Cultivos em frascos agitados

Deem e Williams (1936) testaram, para 5 cepas diferentes *E. rhusiopathiae*, diversas fontes de carbono. O crescimento de *E. rhusiopathiae* nas diferentes fontes de

carbono foi inferido apenas por variações no pH do meio de cultivo. O meio utilizado nos ensaios em câmara incubadora continha glóbulos vermelhos de sangue suíno e água, peptona (1%) e cloreto de sódio.

White e Shuman (1961) também testaram diversas fontes de carbono no cultivo desse patógeno. Foram utilizados quatro meios de cultivo diferentes: (i) meio base de vermelho fenol (BBL da Difco); (ii) meio base de vermelho fenol (BBL da Difco) com soro de cavalo, 10%; (iii) meio composto de extrato de carne, peptona da Difco, cloreto de sódio e ácido fucsínico e (iv) meio composto de extrato de carne, peptona da Difco, cloreto de sódio e ácido fucsínico suplementado com soro de sangue de cavalo. O meio base utilizado em (i) e (ii) era composto por digerido pancreático de caseína (10 g/L), cloreto de sódio (5 g/L) e vermelho de fenol (18 mg/L). Os resultados mostraram que a maior produção de ácido foi observada nos meios (i) e (iv). A partir dos dados obtidos, os autores chegaram à conclusão que o meio mais estável, com a menor variação nos resultados, foi o meio suplementado com soro de cavalo.

Kludas e Meese (1967), acreditando que o antígeno seria um produto do metabolismo e que, assim, sua produção aumentaria significativamente dependendo da composição do meio de cultura, testaram adicionar ao meio utilizado, usualmente à base de fluidos animais (Brain Heart Infusion – BHI), soro de vários grupos de animais e verificaram que o soro de cavalo favorecia o crescimento celular.

Feist *et al.* (1976) realizaram um estudo sobre as necessidades nutricionais de *E. rhusiopathiae* e foi observado que a maior parte das proteínas do soro de cavalo não era consumida pelo microrganismo. Assim, foi formulado um meio de cultivo livre de soro, contendo glicose, Tween 80, extrato de levedura, peptona nº 2, arginina e tampão fosfato, desde então chamado de meio Feist, com o qual foram obtidos ótimos resultados para o crescimento do bacilo em estudo (Silva, 2007).

Groschup e Timoney (1990) obtiveram excelente crescimento em meio Feist modificado, utilizando um tampão duas vezes mais concentrado e esterilizando o meio através de microfiltração. Atingiram a fase exponencial de crescimento em apenas 2 h e obtiveram o dobro em concentração celular comparada ao meio BHIS (Brain Heart Infusion suplementado com soro animal), ao final do cultivo. Os autores enfatizaram a importância de esterilizar o meio por filtração, já que uma leve caramelização da glicose reduz o crescimento bacteriano drasticamente. Da mesma forma, os autores alertaram ainda para a importância da escolha da peptona, pois algumas peptonas podem afetar o crescimento de *E. rhusiopathiae*.

Zarkasie *et al.* (1996) estudaram o crescimento de *E. rhusiopathiae* em meio Feist modificado e também em meio triptose fosfato. Os resultados mostraram que o crescimento foi mais intenso no meio Feist, porém a fase de declínio iniciou-se rapidamente após a concentração celular máxima ser atingida. O rápido declínio na concentração celular é consequência da liberação de proteases que causam intensa lise de células e podem degradar o antígeno produzido. No meio triptose fosfato, menores concentrações celulares máximas foram atingidas, porém o cultivo permaneceu no estado estacionário até 23 horas após a inoculação (Silva, 2007).

Sobre as exigências nutricionais e o metabolismo de *E. rhusiopathiae*, sabe-se que, aparentemente, arginina não é sintetizada pelo microrganismo, mas é consumida em grandes quantidades e metabolizada em citrulina e ornitina. Tween 80, assim como a glicose, é considerado promotor do crescimento e segundo Ewald (1981), o triptofano também desempenha este papel (Silva, 2007).

Todos os experimentos relatados foram conduzidos em frascos agitados, mantidos em câmara incubadora, sob condições estáticas ou sob agitação, sem o controle do pH e das condições de aeração. Os principais dados sobre estes cultivos estão resumidos na Tabela 2.4, adaptada da dissertação de mestrado de Silva (2007).

Observa-se na Tabela 2.4 que, como uma parte significativa dos estudos se concentra nas décadas de 30 a 60, pouca informação quantitativa sobre o crescimento pode ser extraída. Já nos estudos conduzidos posteriormente, onde mais dados dos cultivos realizados podiam ser extraídos, observa-se que a DO máxima alcançada foi em torno de 3, o que corresponde a uma concentração celular de aproximadamente 1,5 g/L.

Silva (2007) obteve grandes avanços em relação ao cultivo do bacilo *E. rhusiopathiae* em comparação com o que já havia sido descrito na literatura. Entre os aspectos do cultivo do microrganismo que foram sucessivamente estudados com impacto direto na produção de biomassa, no perfil de crescimento celular e na produção de antígeno, destacam-se a preservação das células em criotubos congelados a -70°C , a formulação do meio, o cultivo do microrganismo em biorreator sob condições controladas de manutenção do pH e da concentração de oxigênio dissolvido, a identificação e quantificação dos metabólitos formados, dentre outros. Assim, os principais resultados obtidos indicaram uma grande diminuição na fase *lag* de crescimento, um aumento significativo na velocidade de crescimento do microrganismo e a obtenção de altas concentrações celulares.

Tabela 2.4 - Condições iniciais e principais resultados dos experimentos relatados na literatura sobre o cultivo de *E. rhusiopathiae*

Fonte	Deem e Williams (1936)	White e Shuman (1961)	Kludas e Meese (1967)	Groschup e Timoney (1990)	Zarkasie <i>et al.</i> (1996)	Silva <i>et al.</i> (2008)
Linhagem do microrganismo	4 linhagens diferentes	185-204; E1-6; S-192; HC-585; 422-1; NF-4; 378; 254; 228-H; M3LP3; Marienfeld	10-T	EI-6P; Me-7; T 28; SE-9; Frankfurt XI; Doggerschabe	Shizuoka-63, 82-510; 82-527; 44; Tama 96; Kg-2; SE-9	NCTC 11004 e 11002
Meio de cultivo	Glóbulos vermelhos de sangue suíno	base de vermelho fenol, base de Andrade e soro de cavalo	BHIS	Feist modificado; BHIS	Feist modificado; Triptose fosfato com 0,1% de Tween 80	Feist modificado
pH inicial	7,2	6,8-7,2	NC	8,0	8,0	8,0
Temperatura (°C)	NC	37	NC	37	37	37
Fração de inóculo (v/v)	NC	NC	10%	1%	1%	10%
Tempo de cultivo (h)	NC	NC	6	20	23	12
Conc. Celular (final da fase exponencial)	NC	NC	0,59 g/L	1,0 g/L ^{*1}	0,9 ^{*1} (DO a 420 nm)	3,29 (DO a 420 nm)
μ_{max} (h⁻¹)	NC	NC	NC	0,45 ^{*2}	0,42 ^{*2}	0,25 ^{*2}

NC – não consta.

*¹ – Média de DO ou de concentração celular em g/L para as cepas de crescimento mais rápido e mais lento.

*² – Valor médio de μ_{max} estimado a partir da variação dos valores de DO em função do tempo para as cepas de crescimento mais rápido e mais lento.

Silva (2007) realizou uma série de experimentos em câmara incubadora visando estudar a influência da fração de inóculo, da composição do meio de cultivo e das condições de disponibilidade de oxigênio sobre o crescimento, o consumo de glicose e a formação de metabólitos. Foram testadas diferentes formulações com variações nas concentrações de glicose, peptona, arginina e Tween 80 para avaliar a influência da concentração de cada um destes nutrientes no crescimento do microrganismo separadamente, observando-se que o meio Feist modificado (Groschup, 1990) apresentava um déficit nutricional. Os meios suplementados com mais 50% dos nutrientes selecionados apresentaram valores de DO maiores que o do meio Feist modificado. Observou-se que nos cultivos com uma maior fração de inóculo (20%), houve um menor tempo de fase *lag*.

Silva (2007) também estudou a influência do aumento da concentração de glicose e de extrato de levedura no crescimento do microrganismo a fim de propor uma nova formulação para o meio de cultivo que levasse a uma maior formação de biomassa. Com a

utilização de meio mais rico, foram produzidas altas concentrações de ácido lático, que ultrapassaram 8,5 g/L ao final do cultivo, em condição microaerófila.

2.5.2. Cultivos em biorreator

Excelentes resultados foram alcançados nos ensaios em biorreator realizados por Silva (2007) em decorrência principalmente dos resultados de aprimoramento do meio de cultivo e também pela implementação do controle automático de pH no biorreator. Nestas novas condições foram alcançadas as concentrações celulares necessárias para a produção de vacinas. A maior velocidade específica máxima de crescimento foi registrada em condição de anaerobiose, porém neste experimento a concentração celular máxima atingida foi a menor entre as três condições estudadas. Tal fato é explicado pelo efeito de inibição provocado pelo acúmulo de ácido lático, que se mostrou mais tóxico na ausência de oxigênio, já que no ensaio microaerófilo foi atingida uma maior concentração celular apesar da alta concentração deste metabólito.

O esclarecimento do fator determinante no processo de interrupção do crescimento celular, identificado como as baixas concentrações de glicose, juntamente com a verificação do papel inibitório de altas concentrações desse substrato no crescimento do microrganismo apontaram a batelada alimentada como um modo de operação altamente promissor para atingir-se maior formação de biomassa nesse processo. Assim, um cultivo em batelada alimentada com vazão constante implementada em dois valores diferentes foi realizado e a massa celular atingida foi de aproximadamente 10,0 g/L, correspondendo a uma leitura de densidade ótica de 18,0 e contagem de $1,7 \times 10^{10}$ UFC/mL. Como esperado, as vias fermentativas do microrganismo foram ativadas mesmo em condições plenamente aeróbias. Foi registrado um grande acúmulo de ácido lático e a concentração limite deste metabólito que provoca inibição efetiva do crescimento celular foi alcançada. Após atingir-se 10 g/L de lactato, ocorreu uma interrupção no aumento da produção de biomassa e atingiu-se uma fase onde a concentração celular permaneceu praticamente constante apesar do aumento contínuo da quantidade de metabólitos presente no meio. A batelada alimentada apresentou um aumento de quase cinco vezes no valor máximo de DO atingido em um tempo apenas duas vezes maior que nos ensaios de batelada simples (Silva, 2007).

De acordo com a revisão bibliográfica realizada, observa-se que os estudos referentes a esse microrganismo até a década de 80 eram focados na otimização do meio de

cultivo para *E. rhusiopathiae*, sendo o último estudo de otimização do meio de cultivo publicado por Zarkasie *et al.* em 1996. Durante o mestrado de Silva (2007) foi realizado um estudo de otimização das concentrações de glicose, extrato de levedura, arginina e da aeração do meio durante os cultivos.

A maioria dos estudos realizados foi feita em frascos agitados e encontra-se pouca informação a respeito de cultivos de *E. rhusiopathiae* em biorreator. As maiores contribuições em cultivos em biorreator foram realizadas por Silva *et al.* (2008). Ainda não existem dados na literatura correspondentes à ocorrência do fenômeno *overflow* para *E. rhusiopathiae*.

O último estudo realizado a respeito da utilização de diferentes fontes de carbono para *E. rhusiopathiae* ocorreu em 1961, onde o crescimento do microrganismo era aferido por indicadores de pH. Resultados mais detalhados sobre a produção de metabólitos e o consumo dos substratos não foram publicados até o momento.

Ultimamente, têm-se focado no desenvolvimento de vacinas inativadas contra erisipela suína e na produção de vacinas acelulares, formuladas a partir de antígenos presentes na superfície da célula. A grande vantagem dessa alternativa é a possibilidade de, utilizando técnica de biologia molecular, super expressar esses antígenos em microrganismos mais seguros, evitando-se o inconveniente de cultivar microrganismos patogênicos ou oportunistas em grandes biorreatores.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização dos experimentos foi utilizada a cepa de *Erysipelothrix rhusiopathiae* NCTC 11004. Esta cepa foi conservada em criotubos com meio Feist modificado (Silva, 2007) contendo 10% (v/v) de glicerol, mantidos em ultrafreezer a -80°C , em ampolas liofilizadas.

3.1. Meios de cultivo

3.1.1. Meios sólidos

Para o crescimento do microrganismo, dois diferentes meios sólidos foram utilizados com finalidades específicas.

3.1.1.1. Meio ágar-sangue

Este meio foi utilizado para verificação da morfologia e pureza das colônias durante os cultivos do microrganismo. Nesse meio, as células de *E. rhusiopathiae* provocam α -hemólise do sangue presente na formulação, o que juntamente com a forma, tamanho e ausência de coloração das colônias permite a caracterização da espécie em estudo. A Tabela 3.1 mostra a composição do meio ágar-sangue utilizado.

Para a preparação das placas de ágar-sangue com 1,0L de solução, segue-se o seguinte protocolo (Silva, 2007):

- a) Preparar 950 mL de solução contendo ágar e cloreto de sódio e autoclavar;
- b) Esfriar até 50°C e adicionar 50 mL de sangue de carneiro desfibrinado.
Importante: não colocar o sangue se a temperatura estiver acima de 50°C ;
- c) Distribuir o meio nas placas estéreis;
- d) Quando o ágar estiver solidificado, colocar as placas na estufa a 37°C por uma noite, para verificar se não há contaminação.

Tabela 3.1 - Composição do meio ágar-sangue (Silva, 2007)

Componente	Concentração
Tryptic Soy Agar*	40 g/L
NaCl	7 g/L
Sangue desfibrinado	50 mL/L

*composição descrita na Tabela 3.2

Tabela 3.2 - Composição do Tryptic Soy Agar (Silva, 2007)

Componente	Concentração (g/L)
Hidrolisado enzimático de caseína	15
Hidrolisado enzimático de soja	5
NaCl	5
Ágar	15
pH 7,3 ± 0,2	

3.1.1.2. Meio ágar-TPA

Este meio foi utilizado para verificar a eficácia da etapa de inativação. Sua composição é dada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Composição do meio ágar-TPA

Componente	Concentração (g/L)
Triptose Fosfato	29,5
Ágar	20
pH 7,5	

A composição da Triptose Fosfato é dada pela Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Composição da Triptose Fosfato

Componente	Concentração (g/L)
Tritose	20
Glicose	2
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2,5

3.1.2. Meios líquidos

Os meios utilizados no cultivo e preparo de inóculo em frascos agitados foram os mesmos utilizados na ativação do microrganismo.

Os meios de cultura foram preparados de acordo com a Tabela 3.5 com volume adequado para cada ensaio em câmara incubadora rotativa. No decorrer do trabalho foram realizados dezesseis experimentos para estudar diferentes fontes de carbono e de nitrogênio (ensaio S4, S5, S6 e S7), cujas composições dos meios estão descritas nas Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8. O experimento S1 foi realizado com meio Feist modificado proposto por Silva (2007) (meio 1), a partir do qual foram feitas as novas formulações denominadas de meio 2, meio 3 e meio 4 descritas na Tabela 3.5. O **meio 1** foi adotado como a composição de meio padrão, sendo utilizado nos ensaios S1 a S7, na ativação dos criotubos e nos cultivos utilizados para a renovação do estoque de criotubos. O **meio 2**, com concentração de fosfato diminuída em 10 vezes foi utilizado, junto com glicerol, como agente criogênico, para conservação do microrganismo no banco de criotubos.

Tabela 3.5 - Meios líquidos de cultura utilizados nos experimentos

Componente	Meio 1*	Meio 2 *
	(padrão)	
	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)
Glicose	9,0	9,0
Peptona N2 (Difco)	7,5	7,5
Extrato de levedura	7,5	7,5
Arginina	0,75	0,75
Tween 80	0,75**	0,75**
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	-----
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	-----	6,805
KH ₂ PO ₄	-----	0,136

pH=8,00

*Formulações obtidas por Silva *et al.* (2008)

**No caso do Tween 80 a concentração está expressa em mL/L.

Tabela 3.6 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S4 para estudos de diferentes fontes de carbono.

Componente	Meio 1*	Meio Glicerol	Meio Lactose	Meio Galactose
	(padrão)			
	Concentração (g/L)			
Glicose	9,0	-----	-----	-----
Glicerol	-----	9,0	-----	-----
Lactose	-----	-----	9,0	-----
Galactose	-----	-----	-----	9,0
Peptona N2 (Difco)	7,5	7,5	7,5	7,5
Extrato de levedura	7,5	7,5	7,5	7,5
Arginina	0,75	0,75	0,75	0,75
Tween 80	0,75**	0,75**	0,75**	0,75**
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	76,02	76,02	76,02

pH=8,00

*Formulação obtida por Silva *et al.* (2008)

**No caso do Tween 80 a concentração está expressa em mL/L.

Tabela 3.7 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S5 para estudo de diferentes fontes de nitrogênio.

	Meio 1* (padrão)	Meio Água de Maceração de Milho	Meio Soytone	Meio Peptona de Soja
Componente	Concentração (g/L)			
Glicose	9,0	9,0	9,0	9,0
Peptona N2 (Difco)	7,5	-----	-----	-----
Água de Maceração de Milho	-----	7,5	-----	-----
Soytone	-----	-----	7,5	-----
Peptona de Soja	-----	-----	-----	7,5
Extrato de levedura	7,5	7,5	7,5	7,5
Arginina	0,75	0,75	0,75	0,75
Tween 80	0,75**	0,75**	0,75**	0,75**
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	76,02	76,02	76,02

pH=8,00

*Formulações obtidas por Silva *et al.* (2008)

**No caso do Tween 80 a concentração está expressa em mL/L.

Tabela 3.8 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios S6 e S7, para consolidação dos resultados obtidos nos ensaios S4 e S5

	Meio 1 (padrão)	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5
Componente	Concentração (g/L)				
Glicose	9,0	-----	-----	-----	-----
Glicerol	-----	9,0	9,0	9,0	9,0
Peptona N2 (Difco)	7,5	-----	-----	7,5	-----
Água de Maceração de Milho	-----	-----	7,5	-----	-----
Soytone	-----	7,5	7,5	-----	15
Extrato de levedura	7,5	7,5	7,5	7,5	15
Arginina	0,75	0,75	0,75	0,75	1,5
Tween 80	0,75**	0,75**	0,75**	0,75**	0,75**
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02

pH=8,00

*Formulações obtidas por Silva *et al.* (2008)

**No caso do Tween 80 a concentração está expressa em mL/L.

Os meios líquidos empregados nos ensaios em biorreator realizados estão descritos na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 - Meios líquidos de cultura utilizados nos ensaios em biorreator.

	Meio B1	Meio B2	Meio B3
Componente	Concentração (g/L)		
Glicose	9,0	9,0	-----
Glicerol	-----	-----	9,0
Peptona N3 (Difco)	7,5	-----	-----
Soytone	-----	7,5	7,5
Extrato de levedura	7,5	7,5	7,5
Arginina	0,75	0,75	0,75
Tween 80	0,75*	0,75*	0,75*
KH₂PO₄	0,136	0,136	0,136
Na₂HPO₄.12H₂O	6,805	6,805	6,805

pH=8,00

*No caso do Tween 80 a concentração está expressa em mL/L.

Para o preparo do **meio 1** descrito na Tabela 3.5, inicialmente foi preparada a solução de Na₃PO₄.12H₂O (fosfato de sódio tribásico dodecahidratado), na qual foram dissolvidos os demais componentes do meio, sendo o Tween 80 adicionado por último, seguido do ajuste do pH em 8,0 utilizando H₃PO₄ P.A.

No preparo do **meio 2**, a solução de KH₂PO₄ 20 mM (0,136 g KH₂PO₄ em 50 mL de água) foi adicionada a uma solução de Na₂HPO₄.12H₂O 20 mM (6,805 g de Na₂HPO₄.12H₂O em 950 mL de água). Em seguida, foram dissolvidos os demais componentes do meio, sendo o Tween 80 adicionado por último, seguido do ajuste do pH em 8,0 utilizando H₃PO₄ P.A. (Silva, 2007).

Os meios líquidos dos ensaios S2, S3, S5, S6, S7, B1 e B3 foram esterilizados através de filtração em membrana estéril de 0,22 µm de diâmetro de poro. Para o ensaios B2 o meio do biorreator foi esterilizado em autoclave a 121 C por 20 minutos, sendo a glicose esterilizada em frascos separados do restante dos componentes do meio. Para os ensaios S1 e S4 foram estudadas as duas metodologias de esterilização dos meios líquidos.

3.2. Métodos analíticos

3.2.1. Determinação da concentração celular

3.2.1.1. Turbidimetria

O aumento da biomassa total de uma cultura bacteriana em crescimento em meio líquido pode ser monitorado por medidas da densidade ótica da cultura. Alíquotas da cultura em crescimento são retiradas em determinados intervalos de tempo, adequadamente diluídas e a absorvância da cultura (densidade ótica -DO) foi determinada através de leitura em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 420 nm. O zero da medida da densidade ótica, ou o “branco”, era obtido a partir da leitura da densidade ótica do meio de cultura isento de células. As amostras foram diluídas de três a dez vezes de modo que a leitura da absorvância não ultrapassasse o valor de 1,0, para garantir com segurança que a medida fosse realizada dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade ótica e concentração. Assim, cada medida obtida corresponde à densidade ótica (DO) da cultura em um dado momento do crescimento. A absorvância aumenta proporcionalmente ao aumento do número de células (biomassa) na população. Desta forma foram construídos gráficos representativos do progresso do crescimento, relacionando-se a DO com o tempo de cultivo.

3.2.1.2. Método Gravimétrico (massa-seca)

A concentração celular foi ainda determinada pelo método gravimétrico. Nesse procedimento, inicialmente filtrou-se um volume conhecido de amostra em uma membrana com diâmetro de poro de 0,22 μm previamente pesada. A amostra foi então lavada com água destilada, submetida à secagem por 24 horas em estufa a 80°C e pesada.

3.2.2. Determinação da concentração de etanol, glicerol e de ácidos láctico, acético e fórmico

As concentrações dos ácidos orgânicos e de etanol foram determinadas por HPLC (sistema Waters Co acoplado com Bombas HPLC 510, Injetor W717) utilizando a coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad como fase estacionária e solução de ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min como fase móvel. A temperatura utilizada para a separação dos componentes foi de 50°C. A detecção dos ácidos foi realizada com detector de UV (leitor de UV PDA W996) a um comprimento de onda de 210 nm e a do etanol com detector de índice de refração modelo 410 da Waters.

3.2.3. Determinação da concentração de glicose, lactose e galactose

A concentração desses carboidratos no ensaio S6 foi determinada através do método de DNS, descrito em literatura (Miller, 1959) e por HPLC nos experimentos S1 a S7 e B1 a B3, utilizando-se uma coluna Shodex KS-801 e água Milli-Q como eluente. O equipamento foi operado a 80°C a uma vazão de 1 mL.min⁻¹, com injeção de 20µL do padrão de análise e também da amostra. O detector utilizado foi um índice de refração modelo 410 da Waters. A curva de calibração foi obtida a partir de uma solução padrão do composto a ser analisado. As amostras analisadas foram diluídas em água Milli-Q para ficarem na faixa de concentração da curva padrão. As amostras foram filtradas em membranas de éster de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro.

Durante os ensaios realizados, as concentrações de glicose e glicerol eram aferidas através do procedimento enzimático colorimétrico com leituras a 520 nm (*kits* comerciais da empresa Laborlab).

3.2.4. Tratamento das amostras para análise da produção do antígeno (SpaA)

Para analisar a produção do antígeno, inicialmente as amostras retiradas, com um volume de 150 a 200 mL, foram inativadas. Nesse procedimento, os cultivos são interrompidos e uma alíquota que variou de 150 a 200 mL foi retirada do frasco ou do biorreator e transferida para tubos de centrífuga para separação entre as células e o

sobrenadante por centrifugação a 4°C, 20 minutos e 11000 rpm. Em seguida, o sobrenadante era descartado e as células eram re-suspendidas em solução de NaCl 0,9% (m/v) com volume 3x menor que o volume original de amostra e então era feita a adição de 0,3% (v/v) de formalina, como descrito em Zarkasie *et al.* (1996), para dar prosseguimento à inativação, sob incubação por 24 horas a 4°C e agitação de 100 rpm.

Após a inativação, o processamento da amostra prosseguia com a separação entre as células e o sobrenadante por mais uma centrifugação a 4°C, 20 minutos e 11000 rpm. Em seguida, o sobrenadante era descartado e as células eram re-suspendidas em solução de NaCl 0,9% (m/v) e colina 4% (m/v), com volume 10x menor que o volume original de amostra, e deixadas sob leve agitação *overnight* a 4°C. No dia seguinte a solução era filtrada numa membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro, o filtrado era concentrado 10x por ultrafiltração (sistema Amicon Ultra da Millipore, NMWL de 30 kDa) e congelado. Para o conjunto de ensaios S4, S5 e para o ensaio em biorreator B3, as amostras foram liofilizadas. Para isso os microtubos contendo as amostras foram congelados a -80°C por pelo menos 8 horas, que depois foram submetidas a liofilização.

Após esse tratamento, as amostras eram aplicadas num sistema de eletroforese como descrito no item a seguir.

3.2.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

Após o tratamento descrito no item 3.2.4, as amostras eram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) em um sistema Hoefer mini VE da Amershan Pharmacia Biotech.

Para isso, as amostras eram aplicadas em um gel de empilhamento de 4% de poliacrilamida e um gel de resolução de 15%, sendo então submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15 mA para o gel de empilhamento e de 20 mA para o gel de resolução. Em seguida, os géis eram então incubados em uma solução corante de Coomassie Brilliant Blue 0,1% (PhastGel Blue R - Amershan Pharmacia Biotech) e logo após em uma solução descorante de metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v), ou então as bandas protéicas eram reveladas com nitrato de prata através do uso do kit PlusOne Silver Staining Kit, Protein (Amershan Pharmacia Biotech).

O tampão de amostra utilizado era composto por uma solução tampão de Tris-HCl (0,125 M, pH 6,8), solução de SDS (4%), azul de bromofenol (0,025%), glicerol (20%) e o agente redutor β – mercaptoetanol (concentração final de 0,1 M).

A massa molecular da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 15 a 220 kDa (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen®). O software de digitalização de imagens Doc It LS – UVP foi utilizado para a fotodocumentação das análises realizadas.

Para semi-quantificação da produção de antígeno nos géis de eletroforese, foi utilizado o software *ImageJ* – Image Processing and Analysis in Java. Trata-se de um programa de código aberto e de graça, disponível na Internet. O *ImageJ* faz a densitometria das bandas obtidas, contando cada microponto de tonalidade escura na foto. Deste modo, traça-se uma relação entre a densidade óptica da banda da seqüência-alvo e a densidade óptica da banda controle. O programa gera uma curva, cujos picos representam as regiões de maior densidade óptica e, portanto as regiões que apresentam bandas. Então, deve-se isolar este pico com as ferramentas adequadas oferecidas pelo programa, e obter o valor numérico de cada pico (o programa utiliza equações integrais simples para transformar os picos em valores). A partir deste ponto, o que se tem a fazer é dividir o valor de cada banda da(s) seqüências-alvo pelo valor da concentração “padrão” das outras amostras, estipulando-se os valores para comparação entre a produção de antígeno nos diferentes ensaios (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>, último acesso: 10/03/2009).

Para o cálculo da produção de proteínas nos cultivos realizados, foi adotado como padrão um fator de concentração de 100, pois se partia de um volume de 20 mL de solução de colina (metodologia de extração de antígeno descrita no item 3.3.4) que era concentrado até o volume final de 20 μ L. Quando o volume obtido ao final do procedimento de concentração era superior a 20 μ L, os resultados obtidos pela quantificação do programa foram corrigidos pelo fator “volume final dividido por 20 μ L”.

3.3. Determinação de parâmetros cinéticos

3.3.1. Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono

A velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) foi determinada através do método do balanço gasoso (equação 1).

$$CER = \frac{Q}{22,4} \cdot \frac{Y_{CO_2}}{100} \cdot 60 \quad (\text{Eq. 1})$$

onde: Q é a vazão de ar ou nitrogênio em L/min.

Y_{CO_2} é a fração molar de dióxido de carbono (%)

V é o volume de caldo de cultivo (em L)

CER é a velocidade de produção de dióxido de carbono (mol.h^{-1}) nas CNTP

3.3.2. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

Os cálculos dos parâmetros cinéticos foram realizados com os pontos não tendenciosos. Desta forma, o primeiro passo adotado foi o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$). A velocidade específica de crescimento celular é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Eq. 2, conforme descrito em Bailey e Ollis (1986).

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: μ é a velocidade específica de crescimento celular

Cx é a concentração celular

Considerando a fase exponencial de crescimento celular, quando $\mu = \mu_{\text{máx}}$, determina-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento integrando-se e rearranjando-se a equação 2, utilizando-se valores de $DO_{420\text{nm}}$ na fase exponencial, ao invés de valores de Cx, para obter a equação 3.

$$\ln\left(\frac{DO}{DO_0}\right) = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (\text{Eq. 3})$$

onde: DO_0 é a concentração celular de microrganismo no tempo “zero”, e t é o tempo de cultivo.

A equação 3 é linear, e o valor de $\mu_{\text{máx}}$ pode ser obtido através do método dos mínimos quadrados.

Todos os valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram calculados a partir das medidas de densidade ótica.

3.3.3. Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células

Para o cálculo do rendimento de substrato a células ($Y_{x/s}$) foi utilizada a equação 4 (Bailey e Ollis, 1986).

$$C_x - C_{x_0} = Y_{x/s} \cdot (C_{s_0} - C_s) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde:

C_s é a concentração de substrato

C_{s_0} é a concentração inicial de substrato.

Com os valores de concentração celular e de glicose obtêm-se os valores de $Y_{x/s}$ através da regressão linear.

Os valores de C_x para os ensaios em frascos agitados foram estimados a partir dos dados de densidade ótica. Durante a fase exponencial de crescimento, uma amostra de maior volume foi retirada do frasco e a concentração celular correspondente foi determinada pelo método da massa seca. A partir dessa medida, determinou-se a relação C_x vs. DO utilizada para estimar os demais valores da curva de C_x a partir dos dados de densidade ótica para esses ensaios.

Para o cultivo em biorreator B2, todos os valores de C_x foram obtidos através de medidas de massa seca de amostras retiradas do biorreator.

3.4. Metodologia Experimental

3.4.1. Ativação de criotubos e preparo de inóculo para cultivos em frascos

Para a preparação do primeiro banco de criotubos, o crescimento do microrganismo foi realizado em duas etapas em meio líquido, ativação (preparação do inóculo) seguida do cultivo, como pode ser visto na Figura 3.1.

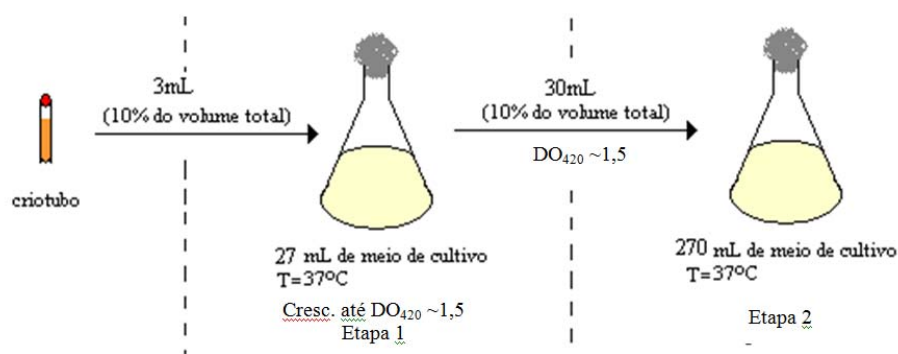


Figura 3.1 - Procedimento de cultivo em frascos utilizando criotubos

Neste experimento, inicialmente um criotubo contendo 3 mL de suspensão de células foi utilizado para inocular 27 mL de meio 1 em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, sob agitação de 50 rpm. Quando a densidade ótica foi superior a 1,5, os 30 mL de caldo de cultivo foram utilizados para inocular 270 mL de meio em um frasco Erlenmeyer de 1,0 L, com agitação de 200 rpm.

3.4.2. Ativação da cultura liofilizada armazenada em ampolas

Para ativação da ampola liofilizada o material contido na ampola foi re-suspendido em gotas de solução NaCl 0,9% e a seguir, alíquotas dessa suspensão de células foram depositadas em placas de ágar-sangue, dando início a primeira fase da ativação. Após 48h, as colônias foram transferidas para tubos Falcon contendo 10 mL de meio 1, descrito na tabela 3.5. Quando a densidade ótica atingiu o valor de aproximadamente 1,0, essa suspensão celular foi utilizada para inocular 100 mL de meio em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, sob agitação de 50 rpm.

Para a preparação do banco de criotubos a partir da ampola liofilizada o procedimento foi o mesmo descrito no item 3.5.1.

3.4.3. Preparação de cultura estoque em criotubos

Para a preparação dos bancos de criotubos o crescimento do microrganismo foi feito em duas etapas em meio líquido (10 e 100 mL), tal como descrito no item 3.4.1.

Após o crescimento do microrganismo, foi adicionado ao caldo de cultivo (volume de 100 mL) 20 mL de solução de glicerol 60% de modo que a concentração final de glicerol fosse de 10%. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para os criotubos em alíquotas de 3 mL, e estes foram congelados a -80°C .

Apenas na preparação do segundo banco de criotubos, para o ensaio S5 e subseqüentes, o crescimento do microrganismo foi feito em uma etapa em meio sólido (placa de ágar-sangue), partindo de cultura liofilizada, seguido de duas etapas em meio líquido, tal como descrito no item 3.5.1.

Após o término do cultivo em meio líquido, o caldo foi centrifugado a 11000 rpm por 20 minutos a 4°C , as células foram ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,9%), e centrifugadas novamente nas mesmas condições nesta etapa de lavagem.

Logo após, os pellets foram ressuspendidos em meio fresco (metade do volume do cultivo) e a solução de glicerol foi adicionada em volume e concentração adequados de modo a obter-se uma solução final com 10% de glicerol.

Em seguida a suspensão, sob homogeneização contínua, foi transferida para os criotubos em alíquotas de 3 mL e por fim os criotubos foram congelados e armazenados a -80°C .

3.4.4. Cultivos em câmara incubadora

Estes ensaios foram realizados com os meios de cultivo descritos nas Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7, a 37°C , com agitação de 50 rpm na primeira etapa, seguida por agitação de 150 rpm na segunda etapa para os estudos em condições aeróbias, ou estático no ensaio microaerófilo. O procedimento utilizado nestes experimentos está esquematizado na Figura 3.1. O ensaio S4 foi realizado utilizando o meio de cultivo 1, descrito na Tabela 3.5. No caso dos cultivos dos conjuntos S5 e S6, a primeira etapa foi realizada utilizando o meio 1 e somente na etapa seguinte que houve variação na formulação do meio (modificação na fonte de carbono ou de nitrogênio escolhida), conforme descrito nas Tabelas 3.6 e 3.7. Ao final de todos os cultivos, era realizada a inativação da suspensão celular para posterior descarte ou era feita esterilização dos caldos em autoclave.

3.4.5. Cultivos em Biorreator

Foram realizados um cultivo aeróbio (30% O_2 dissolvido) em biorreator (Ensaio B1, B2 e B3). O procedimento utilizado nos experimentos em reator é visualizado na Figura 3.2.

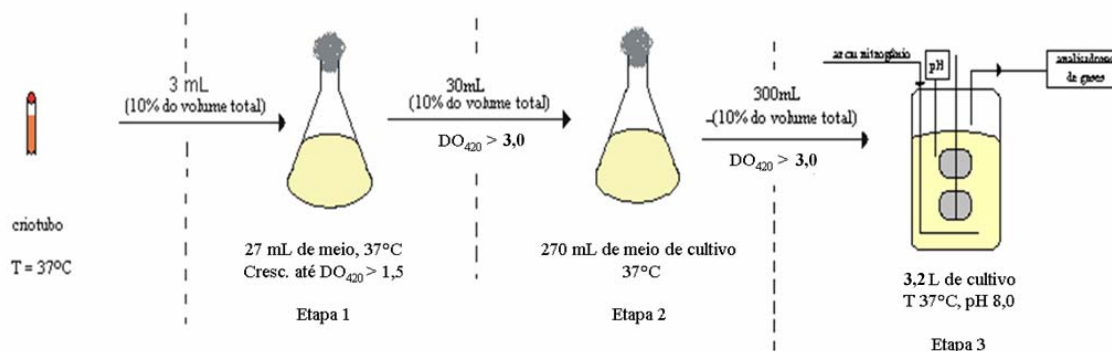


Figura 3.2 - Etapas do procedimento para os ensaios em biorreator

Inicialmente, um criotubo contendo 3 mL de células em suspensão foi utilizado para inocular 27 mL de meio em um frasco Erlenmeyer de 250 mL mantido a 50 rpm. Quando a densidade ótica atingiu aproximadamente 1,5, os 30 mL de caldo de cultivo foram utilizados para inocular 270 mL de meio de cultura em frasco Erlenmeyer de 1,0 L, o qual foi mantido a 150 rpm. Esperou-se o microrganismo crescer até densidade ótica igual a 1,5 e o caldo resultante foi utilizado para inocular um volume que variou entre 3,2 e 4,2 L de meio de cultivo no biorreator, dependendo do cultivo. Para todos os ensaios em biorreator, as etapas de ativação e preparo do inóculo foram feitas utilizando-se o meio 1 descrito na Tabela 3.5. Os meios utilizados na etapa em biorreator para os ensaios B1, B2 e B3 estão descritos na Tabela 3.9. Os volumes iniciais de meio de cultivo no biorreator após a inoculação (inóculo + meio de cultivo) foram 3,5, 4,5 e 3,5 L, respectivamente.

Para a realização do cultivo foi utilizado o biorreator modelo Bioflo III (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA) conectado a analisador de gases (Sick/Maihak S.710). Ar foi suprido em vazão entre 1 e 2 VVM e a concentração de O_2 dissolvido foi mantida em 30% da saturação (eletrodo Metler Toledo, modelo CE, O2 4050), variando-se a agitação entre 100 e 700 rpm. O controle de pH foi realizado pela adição de NaOH 4,0M e HCl 5,0M.

Todos os equipamentos foram controlados por compact field point 2020 (cFP-2020, National Instruments) e pelo programa Labview 8.0 (National Instruments), que foi utilizado para supervisionar o sistema.

Ao final dos cultivos em biorreator, o caldo foi inativado conforme metodologia descrita em 3.5.4.

3.5. Descrição dos Experimentos

A Tabela 3.10 lista os experimentos realizados nesse trabalho que apresentaram os resultados mais relevantes e que serão aqui discutidos. Os experimentos foram realizados em câmara incubadora (Ensaio S1 a S7) ou em biorreator de bancada (Experimentos B1 a B3).

Tabela 3.10 - Lista dos experimentos, em ordem cronológica, com suas respectivas descrições e objetivos

Ensaio	Descrição/objetivos
Ensaio S1	- Implementação da metodologia de cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i> em meio Feist modificado por Silva <i>et al.</i> (2008) - Otimização da etapa de ativação
Conjunto S2	- Estudo comparativo entre peptonas de diferentes lotes - Influência da forma de esterilização do meio de cultivo (filtração com membrana de 0,22 µm e autoclavagem) - Otimização da etapa de ativação
Conjunto S3	- Influência da forma de preservação e do tempo de conservação na ativação dos criotubos - Otimização da etapa de ativação
Conjunto S4	- Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de carbono na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína
Conjunto S5	- Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína
Conjunto S6	- Combinação dos conjuntos S4 e S5 - Utilização do Soytone (Difco) como fonte de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono - Cultivos utilizando Peptona N2 + Glicerol e Peptona N2 + Glicose para comparação
Conjunto S7	- Combinação dos conjuntos S4 e S5 e verificação dos resultados obtidos no conjunto S6 - Utilização do Soytone (Difco) combinado com outras fontes de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono

	- Cultivos utilizando peptona N2+ glicerol e Peptona N2 + Glicose para comparação
Ensaio B1	- Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicose como fonte de carbono e peptona N2 como fonte de nitrogênio, sem controle de pH - Determinação da concentração dos metabólitos produzidos durante o cultivo - coleta de amostra para posterior avaliação da produção de antígeno (SpaA)
Ensaio B2	- Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicose como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH - Determinação da produção de gás carbônico e da concentração de metabólitos produzidos durante o cultivo - coleta de amostras para posterior avaliação da produção de antígeno (SpaA)
Ensaio B3	- Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) utilizando glicerol como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH - Determinação da produção de gás carbônico e da concentração dos metabólitos produzidos durante o cultivo

S = "Shaker"; B = Biorreator

3.5.1. Ensaio S1 – Implementação da metodologia de cultivo de *E. rhusiopathiae* em meio Feist modificado por Silva *et al.* (2008)

Esse experimento foi realizado com o objetivo de verificar a viabilidade dos criotubos armazenados e renovar o banco de criotubos. Durante os experimentos do Mestrado, Silva (2007) ativou criotubos empregando cultivos estáticos e meios esterilizados por filtração. Neste primeiro ensaio, adotou-se o procedimento de cultivo descrito no item 3.5.3. O meio utilizado para o cultivo foi o meio 1 (descrito na Tabela 3.5), esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 minutos. O experimento S1 foi realizado em condições microaerófilas, em mesa incubadora rotativa a uma temperatura de 37°C com agitação de 50 rpm para o inóculo (ativação) e o cultivo mantido sob agitação de 50 rpm. Todas as fases dos cultivos tiveram sua pureza verificada através de plaqueamento em ágar-sangue, em duplicata, de alíquotas retiradas ao final de cada etapa.

Nesse ensaio foram retiradas amostras para a determinação da densidade ótica, apenas.

3.5.2. Conjunto S2 – Estudo comparativo entre peptonas de diferentes lotes; influência da forma de esterilização do meio de cultivo; Otimização da etapa de ativação

Esse experimento foi realizado com o objeto de comparar as condições de cultivo de *E. rhusiopathiae* utilizadas por Silva (2007) com as modificações introduzidas (lote da peptona, esterilização por autoclavagem). O procedimento de cultivo adotado foi o descrito no item 3.5.3 e o meio utilizado para o cultivo foi o meio 1 (descrito na Tabela 3.5). O volume do inóculo foi de 30 mL para cada frasco que continha 270 mL de meio fresco, na segunda etapa.

Nesse ensaio foram testadas 4 diferentes condições:

- **S2-A:** Meio preparado com **peptona antiga** na mesma concentração e de mesma procedência da utilizada por Silva (2007), **esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm**.
- **S2-B:** Meio preparado com **peptona antiga** na mesma concentração e de mesma procedência da utilizada por Silva (2007), **esterilizado por autoclavagem**.
- **S2-C:** Meio preparado com **peptona nova**, na mesma concentração utilizada por Silva (2007), **esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm**.
- **S2-D:** Meio preparado com **peptona nova**, na mesma concentração que foi utilizada por Silva (2007), **esterilizado por autoclavagem**.

O experimento S2 foi realizado em condições de aeração microaerófila, em mesa incubadora rotativa a uma temperatura de 37°C com agitação de 50 rpm para o inóculo assim como para o cultivo.

Todas as fases dos cultivos (criotubo, ativação e fim do cultivo) tiveram sua pureza verificada através de plaqueamento em ágar-sangue, em duplicata, de alíquotas retiradas ao final de cada etapa.

Nesse ensaio foram retiradas amostras para a determinação da densidade ótica, apenas. A etapa de preparo do inóculo (ativação) também foi acompanhada pela medida da DO.

3.5.3. Conjunto S3 - Influência da forma de preservação e do tempo de conservação na ativação dos criotubos; otimização da etapa de ativação

Esse experimento teve como objeto o estudo da estabilidade das células de *Erysipelothrix rhusiopathiae* NCTC 11004 sob diferentes condições de preservação. O cultivo foi realizado em duas etapas em meio líquido, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm, como descrito no item 3.5.3. Foram comparadas a cultura estoque armazenada em criotubos, cuja suspensão celular foi obtida nos ensaios em batelada realizados por Silva (2007), já estocada por 21 meses, e uma nova cultura estoque armazenada em criotubos preparados a partir de culturas liofilizadas armazenadas em ampolas, conforme o procedimento experimental descrito no item 3.5.4.

Neste experimento, as células provenientes de diferentes culturas estoque foram cultivadas em condição aeróbia e microaerófila para avaliação da produção do antígeno em diferentes condições de aeração. As etapas deste ensaio estão esquematizadas na Figura 3.3.

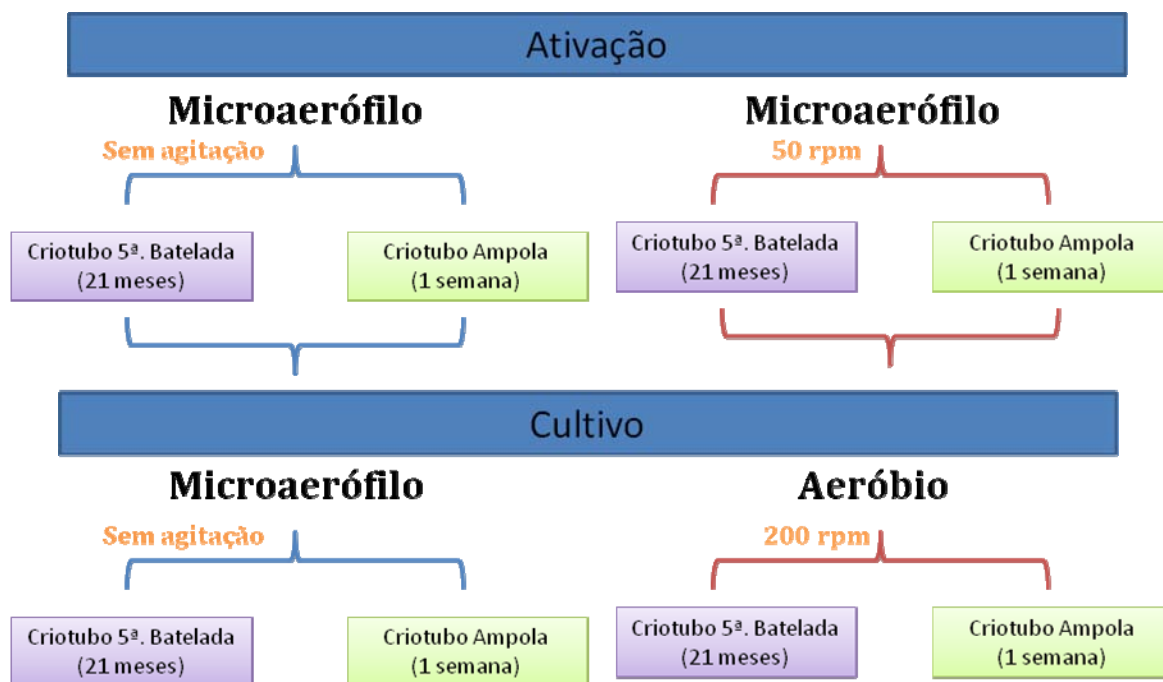


Figura 3.3- Etapas do Ensaio S4 com diferentes condições de aeração no cultivo das duas cepas.

Para o cultivo microaerófilo, a etapa de ativação foi realizada em um frasco erlenmeyer com rodilhão de algodão contendo 27 mL de meio, sem agitação. Após atingir-se DO próxima a 1,5, foi iniciada a etapa de preparação do inóculo. Nesta etapa o microrganismo foi cultivado em condição microaerófila em Erlenmeyer de 500 mL contendo 270 mL de meio, sem agitação.

Para o cultivo aeróbio, a etapa de ativação foi realizada em um frasco erlenmeyer com rodilhão de algodão contendo 27 mL de meio, com agitação de 50 rpm. Após atingir-se DO próxima a 1,5, foi iniciada a etapa de preparação do inóculo. Nesta etapa o microrganismo foi cultivado em condição aeróbica em Erlenmeyer de 1 L contendo 270 mL de meio, com agitação de 200 rpm.

Todas as fases dos cultivos tiveram sua pureza verificada através de plaqueamento em ágar-sangue, em duplicata, de alíquotas retiradas ao final de cada etapa.

Nesse ensaio foram retiradas amostras de hora em hora para a determinação da densidade ótica do caldo e a última amostra de cada cultivo foi filtrada para realização de análises da concentração final de glicose e dos metabólitos.

No final do ensaio, uma amostra de cada cultivo foi retirada e inativada para posterior identificação e purificação do antígeno.

Até esse ensaio, não foram utilizadas fontes de carbono e nitrogênio diferentes das descritas no Meio 1 (padrão), Tabela 3.5.

3.5.4. Conjunto S4 – Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de carbono na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína

Esse conjunto de experimentos foi realizado com o objetivo de testar diferentes fontes de carbono e verificar a influência das mesmas no crescimento celular, na produção de metabólitos e na expressão da proteína. Foram testados quatro diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol, lactose e galactose, descritas na Tabela 3.7, na condição aeróbia.

O cultivo foi realizado em duas etapas em meio líquido, a primeira utilizando o meio 1 (Tabela 3.5) e a segunda etapa utilizando um dos meios descritos na Tabela 3.6, como esquematizado na Figura 3.4.

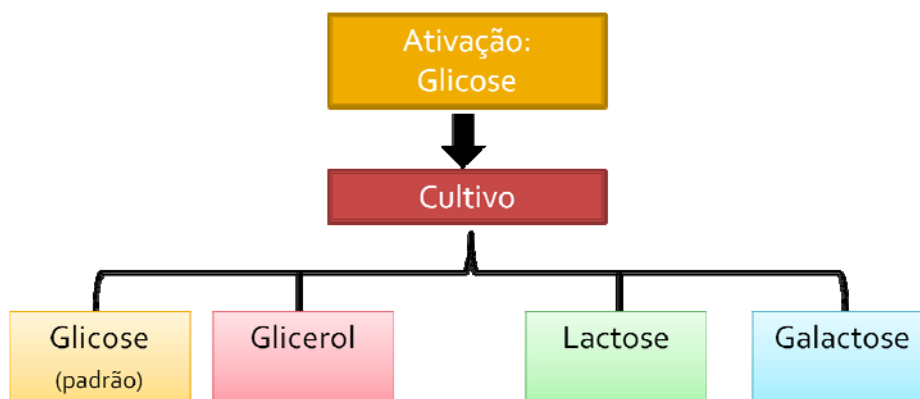


Figura 3.4 - Etapas do Ensaio S5 com diferentes fontes de carbono.

Todos os meios foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm .

Todas as fases dos cultivos tiveram sua pureza verificada através de plaqueamento em ágar-sangue, em duplicata, de alíquotas retiradas ao final de cada etapa.

Todos os cultivos foram realizados na condição aeróbia (ativação a 50 rpm e cultivo a 200 rpm).

Foram realizadas análises das concentrações de glicose, glicerol, lactose e galactose e dos metabólitos com amostras retiradas de hora em hora ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo. No final do

cultivo uma amostra foi retirada e inativada para posterior identificação e purificação do antígeno.

3.5.5. Conjunto S5 - Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína

Esse conjunto de experimentos foi realizado com o objetivo de testar diferentes fontes de nitrogênio, de origem vegetal, e verificar a influência das mesmas no crescimento celular, na produção de metabólitos e na expressão da proteína. Foram testados quatro diferentes fontes de nitrogênio: Peptona N°2 da Difco, Soytone da Difco, Peptona de Soja da Acumedia, e Água de Maceração de Milho da Corn Products, sendo a primeira de origem animal e as outras três de origem vegetal. As formulações desses meios estão descritas na Tabela 3.7.

O cultivo foi realizado em duas etapas em meio líquido, a primeira utilizando o meio 1 (Tabela 3.5) e a segunda etapa utilizando um dos meios descritos na Tabela 3.7, como esquematizado na Figura 3.5.

Todos os cultivos foram realizados na condição aeróbia (ativação a 50 rpm e cultivo a 200 rpm).

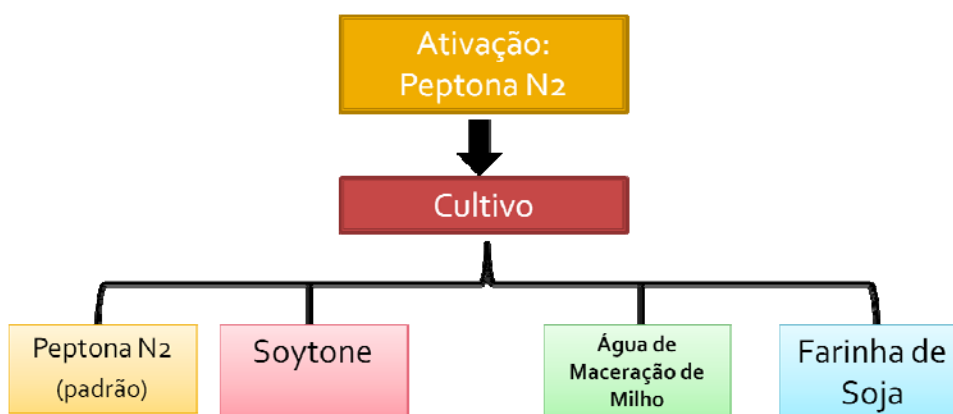


Figura 3.5 - Etapas do Ensaio S7 com diferentes fontes de nitrogênio. Além das fontes de nitrogênio apontadas, foi utilizado extrato de levedura em todos os cultivos.

Todos os meios foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm. Para preparar o meio contendo água de maceração de milho, foi adotado o seguinte

procedimento: Primeiramente a água de maceração de milho foi centrifugada, à temperatura ambiente por 20 minutos a 11000 rpm e só depois pesada (peso úmido) e acrescentada ao meio que iria ser filtrado.

Todas as fases dos cultivos tiveram sua pureza verificada através de plaqueamento em ágar-sangue, em duplicata, de alíquotas retiradas ao final de cada etapa.

Foram realizadas análises da concentração de glicose e dos metabólitos com amostras retiradas de hora em hora ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo. No final do cultivo uma amostra foi retirada e inativada para posterior identificação e purificação do antígeno.

3.5.6. Conjunto S6 - Combinação dos conjuntos S4 e S5: Utilização do Soytone como fonte de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono

Esse conjunto de experimentos foi realizado com o objetivo de testar o soytone como nova fonte de nitrogênio, de origem vegetal, e verificar a influência da mesma no crescimento celular, na produção de metabólitos e na manutenção da fase estacionária. O crescimento em meio com soytone e glicerol (Meio 2, Tabela 3.8) foi comparado com o do meio contendo Peptona N2+ glicose (Meio 1, Tabela 3.8) e Peptona N2 + Glicerol (Meio 4, Tabela 3.8), a fim de verificar a influência da nova fonte de carbono e da nova fonte de nitrogênio simultaneamente.

O cultivo foi realizado em duas etapas em meio líquido, a primeira utilizando o meio 1 (Tabela 3.8), sendo que a peptona utilizada no preparo do inóculo (etapa de ativação) foi uma variedade da peptona N2 da Difco, a Peptona N3. A segunda etapa (cultivo) foi feita utilizando-se os meios descritos na Tabela 3.8, como esquematizado na Figura 3.6.

Todos os cultivos foram realizados na condição aeróbia (ativação a 50 rpm e cultivo a 200 rpm).

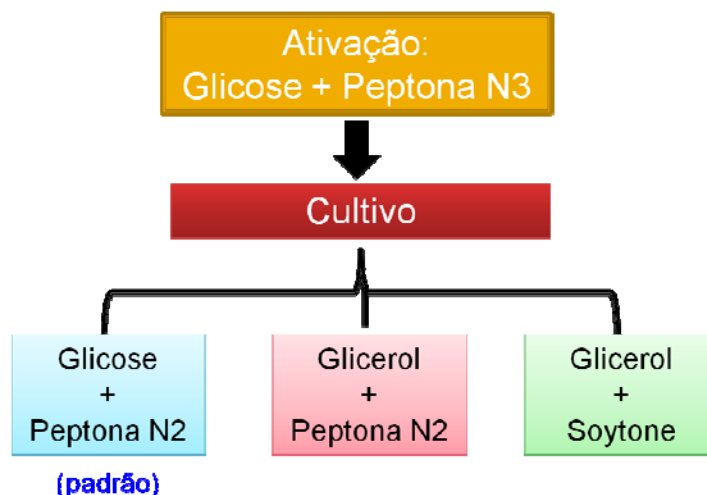


Figura 3.6 - Etapas do conjunto de ensaios S6

Todos os meios foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm .

Foram realizadas análises da concentração de glicose e glicerol e dos metabólitos utilizando amostras retiradas de hora em hora, tanto para o inóculo quanto ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo.

3.5.7. Conjunto S7 - Combinação dos conjuntos S4 e S5 e verificação dos resultados obtidos no conjunto S6

Esse experimento foi realizado com o objetivo de testar o soytone combinado a outras fontes de nitrogênio, de origem vegetal, e verificar a influência do mesmo no crescimento celular, na produção de metabólitos, consumo da nova fonte de carbono (glicerol), na manutenção da fase estacionária e na expressão da proteína.

Foram testados cinco diferentes composições de meio: Peptona N^o3 da Difco + Glicose (Meio 1, Tabela 3.8), Peptona N^o3 da Difco + Glicerol (Meio 4, Tabela 3.8), Soytone da Difco + Glicerol (Meio 3, Tabela 3.8), Soytone da Difco + AMM + Glicerol (Meio 3, Tabela 3.8) e meio contendo soytone, extrato de levedura e arginina em quantidades dobradas (Meio 5, Tabela 3.8).

Para preparar o meio contendo água de maceração de milho, foi adotado o seguinte procedimento: primeiramente a água de maceração de milho foi centrifugada, à temperatura ambiente por 20 minutos a 11000 rpm e só depois pesada e acrescentada ao meio que iria ser filtrado.

O cultivo foi realizado em duas etapas em meio líquido, a primeira utilizando o meio 1 (Tabela 3.8), empregando peptona N3 da Difco no preparo do inóculo (etapa de ativação). A segunda etapa (cultivo) foi feita utilizando-se os meios descritos na Tabela 3.8, como esquematizado na Figura 3.7.

Todos os cultivos foram realizados na condição aeróbia (ativação a 50 rpm e cultivo a 200 rpm).

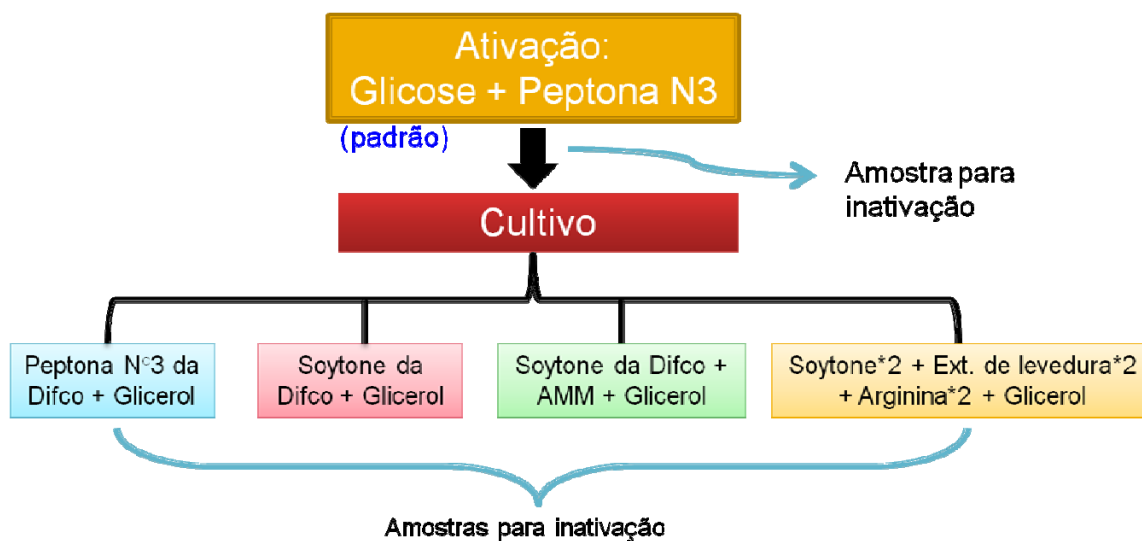


Figura 3.7 - Etapas do conjunto de ensaios S7

Todos os meios foram esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm.

Foram realizadas análises da concentração de glicose e glicerol e dos metabólitos por meio de amostras retiradas de hora em hora, tanto para o inóculo quanto ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo.

No final de cada cultivo uma amostra foi retirada e inativada para posterior identificação e purificação do antígeno.

3.5.8. Experimentos em Biorreator

3.5.8.1. Ensaio B1 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O₂) utilizando glicose como fonte de carbono e peptona N2 como fonte de nitrogênio, sem controle automático de pH

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo B1 (Tabela 3.9) sob condição plenamente aeróbia. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a frequência de agitação foi mantida entre 100 e 400 rpm de forma a permitir a homogeneização do sistema e manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 30% de seu valor de saturação. Foram retiradas amostras a cada hora para a determinação da densidade ótica, glicose e dos metabólitos.

Neste ensaio, foram retiradas duas amostras durante o cultivo para comparação da produção do antígeno. Essas amostras foram inativadas para posterior análise da produção de antígeno.

A partir dos dados experimentais foram determinados os valores de $\mu_{\text{máx}}$, e $Y_{x/s}$.

3.5.8.2. Ensaio B2 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O_2) utilizando glicose como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio, com controle automático de pH

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo B2 (Tabela 3.9) sob condição plenamente aeróbia. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 a 2,0 L/min e a frequência de agitação foi mantida entre 100 e 700 rpm de forma a permitir a homogeneização do sistema e manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 30% de seu valor de saturação. Foram retiradas amostras a cada hora determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gases.

Neste ensaio, foram retiradas duas amostras durante o cultivo para comparação da produção do antígeno com o ensaio B1. Essas amostras foram inativadas e liofilizadas.

A partir dos dados experimentais foram determinados os valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$.

3.5.8.3. Ensaio B3 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O_2) utilizando glicerol como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio, com controle automático de pH

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo B3 (Tabela 3.9) sob condição plenamente aeróbia. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a

freqüência de agitação foi mantida entre 100 e 400 rpm de forma a permitir a homogeneização do sistema e manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 30% de seu valor de saturação. Foram retiradas amostras a cada hora nas cinco primeiras horas do cultivo para a determinação da densidade ótica, de glicerol e dos metabólitos. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gases.

A partir dos dados experimentais foram determinados os valores de $\mu_{\text{máx}}$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 2005 a 2007, uma série de estudos sobre o cultivo de *E. rhusiopathiae* foram desenvolvidos durante o Mestrado de Adilson José da Silva (Silva, 2007), levando ao aprimoramento do meio de cultura e ao estabelecimento das condições de cultivo em biorreator, operado em batelada e batelada alimentada. Porém, ao longo do desenvolvimento do referido trabalho, outras questões relevantes para a melhoria do processo de produção de vacinas contra *E. rhusiopathiae* foram detectadas. Dentre estas questões, destacam-se:

- i) Rápida perda de viabilidade da cultura estoque armazenada em criotubos e longas fases *lag* observadas na etapa de ativação dos criotubos;
- ii) alta produção de ácido láctico observada em meios contendo glicose como fonte de carbono, mesmo em cultivos conduzidos sob condições aeróbicas e mantidos em baixas velocidades de crescimento (Silva *et al.*, 2008);
- iii) presença de fontes de nitrogênio de origem animal (peptona de carne) no meio de cultivo, não recomendadas pelas boas práticas de manufatura da indústria farmacêutica devido aos riscos de ocorrência de príons.

Os resultados apresentados a seguir buscam encontrar respostas para os problemas observados e explorar possíveis soluções que levem ao aumento de produtividade, ou seja, obtenção de maior biomassa no menor tempo possível, em cultivos de *E. rhusiopathiae* assim como da qualidade do produto obtido.

4.1. Otimização da etapa de ativação dos criotubos

A Figura 4.1 ilustra o perfil da variação do tempo de ativação em função do tempo de armazenamento da suspensão de células congeladas no ultrafreezer à -80°C. Os dados representados foram obtidos por Silva e colaboradores, no período de março de 2005 a março de 2007 (Comunicação pessoal).

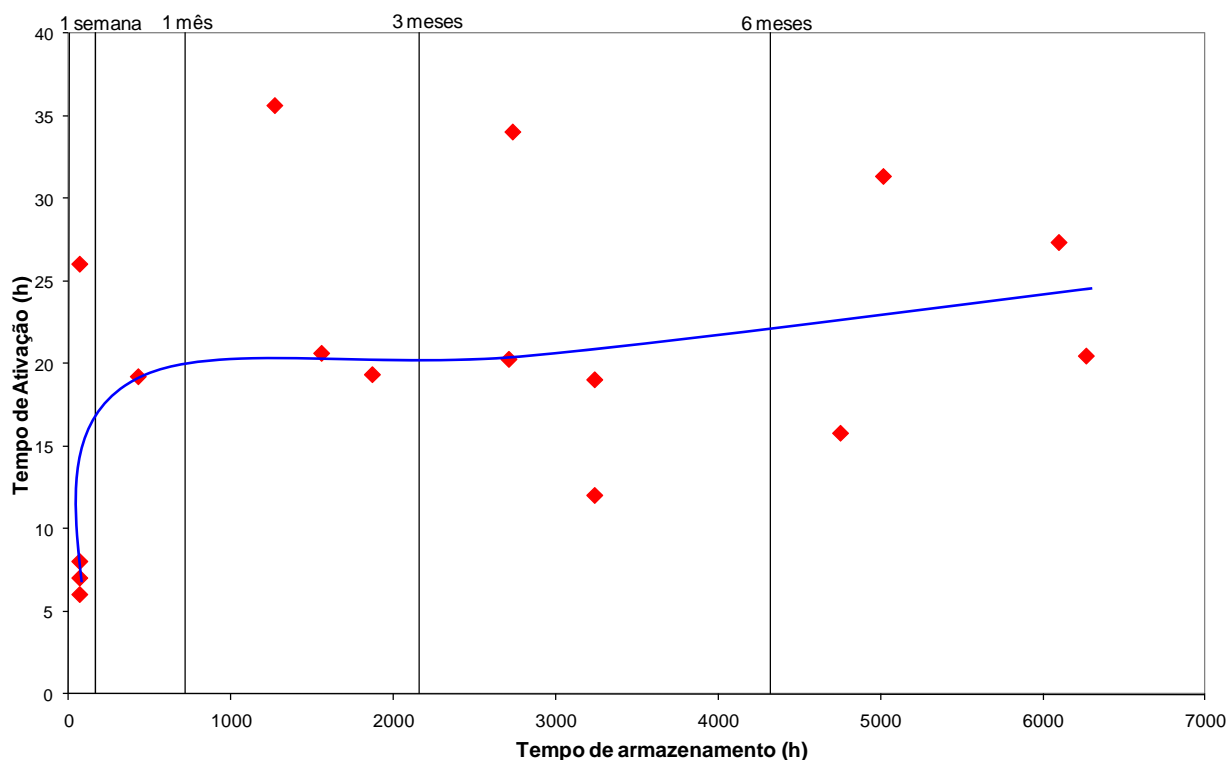


Figura 4.1 - Variação do tempo de ativação em função do tempo de armazenamento da suspensão de células congeladas para diversos lotes de criotubos preparados por Silva e colaboradores no período de março de 2005 a março de 2007 (comunicação pessoal).

Nota-se significativa dispersão nos resultados apresentados na Figura 4.1, principalmente quando o tempo de armazenamento ultrapassa 3 meses. Apesar da dispersão, é possível acompanhar a tendência da influência do tempo de armazenamento dos criotubos sobre o tempo de ativação. Para lotes de criotubos armazenados por mais de uma semana, o tempo de ativação aumenta para quase 20 horas, permanecendo neste patamar até 6 meses de armazenamento e aumentando para tempos de ativação ainda maiores quando armazenados por períodos superiores a 6 meses. É importante ressaltar que a duração do tempo de ativação pode ser interpretada como uma medida de viabilidade da suspensão celular após o armazenamento, já que todos os criotubos foram preparados a partir de suspensões com a mesma concentração de células, seguindo o mesmo procedimento e com o mesmo agente crioprotetor.

A Figura 4.1 mostra que o tempo de ativação dos criotubos podia variar entre 12 a 35 horas. A imprevisibilidade na duração da etapa de ativação dos criotubos comprometia a programação da seqüência de etapas do processo de produção da bacterina em

escala de bancada, provocando o atraso no início do cultivo e das etapas subseqüentes (inativação do cultivo e formulação da bacterina).

As principais condições de cultivo adotadas para a preparação dos criotubos assim como para a ativação dos mesmos, no período de março de 2005 a 2007, eram: meio esterilizado por microfiltração em membrana de 0,22 μm , pH 7,8; cultivo estático (microaerófilo) a 37 °C. Para a preparação dos criotubos, o crescimento celular era interrompido quando a densidade ótica atingir aproximadamente 2,0, o meio era centrifugado e as células ressuspendidas em meio fresco.

Os resultados apresentados a seguir mostram a estratégia adotada para otimizar as etapas de ativação e de preparação das suspensões celulares para armazenamento em criotubos. Todos os experimentos descritos no presente item foram realizados em frascos, utilizando-se câmara incubadora rotativa.

4.1.1. Ensaio S1 – Implementação da metodologia de cultivo de *E. rhusiopathiae* em meio Feist modificado por Silva *et al.* (2008)

No experimento S1 foram empregadas condições distintas das utilizadas por Silva (2007) na etapa de ativação dos criotubos: o meio foi esterilizado por autoclavagem; a peptona utilizada na preparação do meio de cultivo pertencia a um novo lote e a etapa de ativação foi conduzida em condição microaerófila, sob agitação de 50 rpm.

Os valores da densidade ótica obtidos no ensaio S1 são mostrados na Tabela 4.1. Foram comparados dois lotes de criotubos, de número 4 e 5, ambos preparados em 2006 por Silva e colaboradores. Os ensaios foram realizados em frascos de 1 L, contendo 300 mL de meio de cultivo e foram iniciados com inóculo a 10% (v/v).

Tabela 4.1 - Valores de $\text{DO}_{420\text{nm}}$ obtidos na etapa de ativação de criotubos para o experimento S1.

Linhagem do microorganismo: NCTC 11004, criotubo do lote nº 4 preparado por Silva em 2006 (21 meses).	
Tempo de cultivo	DO(420 nm)
0h	0,2
8h	2,1
Linhagem do microorganismo: NCTC 11004, criotubo lote nº 5 (19 meses).	
Tempo de cultivo	DO(420 nm)
0h	0,5
9h	2,8

Nota-se que a densidade óptica após 8 horas de ativação já atingia valores superiores a 2,5. Nas ativações anteriores, realizadas por Silva (2007), o máximo de DO atingido em cultivos em câmara incubadora, nas mesmas condições estudadas era aproximadamente 1,8. Além disso, o tempo de ativação de apenas 9h contrasta com a previsão mostrada na Figura 4.1 para culturas estoque armazenadas por aproximadamente 20 meses.

Nesse mesmo experimento, foi verificada a produção do antígeno, conforme mostra a Figura 4.2.

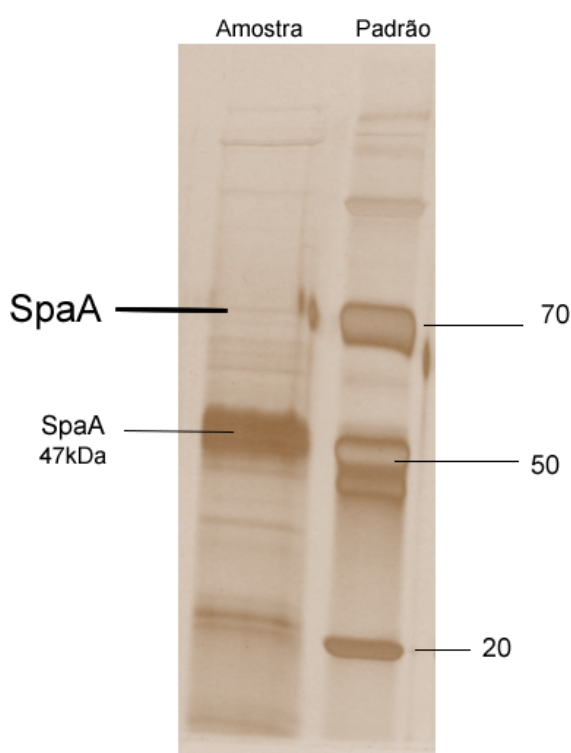


Figura 4.2- Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração das células com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostra Experimento S1.

O elevado crescimento observado no Experimento S1 assim como o menor tempo de ativação pode estar relacionado com as condições empregadas, de acordo com as seguintes hipóteses:

- i) A autoclavagem pode ter degradado as proteínas presentes no extrato de levedura e na peptona, produzindo peptídeos e aminoácidos de mais fácil assimilação pelo microrganismo, o que poderia explicar o crescimento rápido e intenso. Além disso, com a maior disponibilidade de fontes de nitrogênio,

menos glicose seria consumida (para produção de biomassa e para produção de energia), levando a menor produção de ácido láctico. Essa condição é necessária visto que o acúmulo de ácido láctico no meio provoca a inibição do crescimento e inviabilizaria a obtenção de densidades óticas tão altas.

- ii) A peptona utilizada nos ensaios do Experimento S1 pertence a um novo lote, diferente daquele utilizado por Silva (2007). A composição das peptonas pode variar de um lote para o outro.

Para verificar as hipóteses mencionadas acima, foi executado o Experimento S2, cujos resultados são discutidos a seguir.

4.1.2. Conjunto S2 – Estudo comparativo entre peptonas de diferentes lotes; influência da forma de esterilização do meio de cultivo

O conjunto de experimentos S2 foi composto por 4 ensaios, cujas características estão resumidas na Tabela 4.2. Foram testadas diferentes formulações, contendo peptonas de diferentes lotes e esterilização do meio de cultivo foi realizada por microfiltração em membrana de 0,22 μm ou por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Todas as ativações foram realizadas em condição microaerófila, em câmara incubadora, sob agitação de 50 rpm.

Tabela 4.2- Descrição das condições experimentais do Conjunto de experimentos S2

Ensaio	Peptona	Esterilização
S2-A	Antiga	Microfiltração
S2-C	Nova	Microfiltração
S2-D	Nova	Autoclave

A Figura 4.3 mostra os valores de densidade óptica observados nos experimentos **S2-A** e **S2-C** (ambos esterilizados por filtração).

Observa-se que a origem da peptona adotada na composição dos meios não influenciou significativamente o crescimento do microrganismo na etapa de ativação.

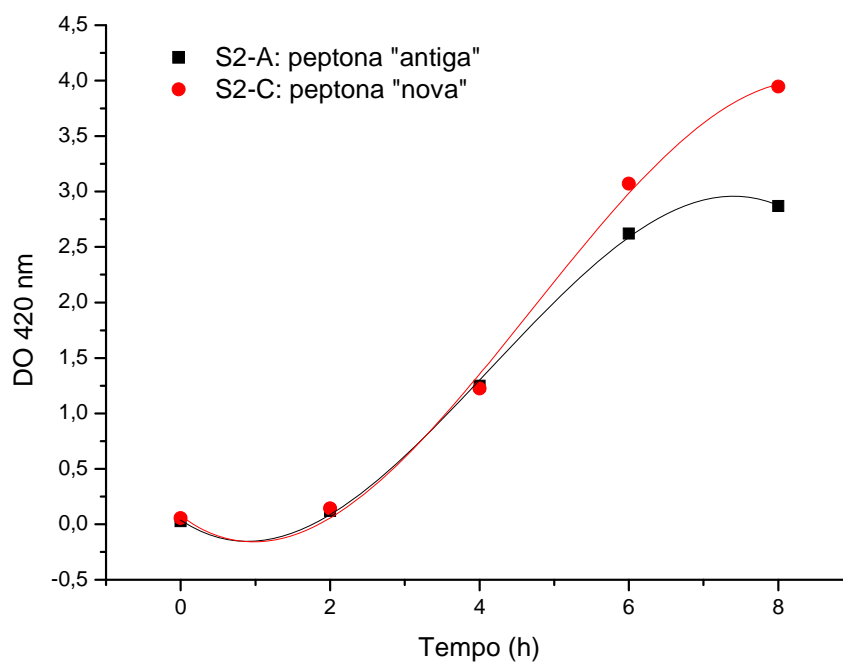


Figura 4.3 - Variação dos valores de DO nas ativações S2-A, e S2-C, em condições microaerófilas (50 rpm) com o tempo de cultivo, etapa de ativação. **S2-A:** Meio preparado com peptona antiga na mesma concentração e origem que foi utilizada por Silva (2007). **S2-C:** Meio preparado com peptona adquirida recentemente, na mesma concentração que foi utilizada por Silva (2007). Ambos esterilizados por filtração em membrana de 0,22 μm .

Nos experimentos S2-C e S2-D foi investigada a influência da forma de esterilização na etapa de ativação. Em função dos resultados obtidos na comparação das peptonas, apenas a peptona nova foi utilizada. Na Figura 4.4 podem ser observados os valores de densidade óptica obtidos nos cultivos S2-C e S2-D (ambos utilizando a peptona “lote novo”).

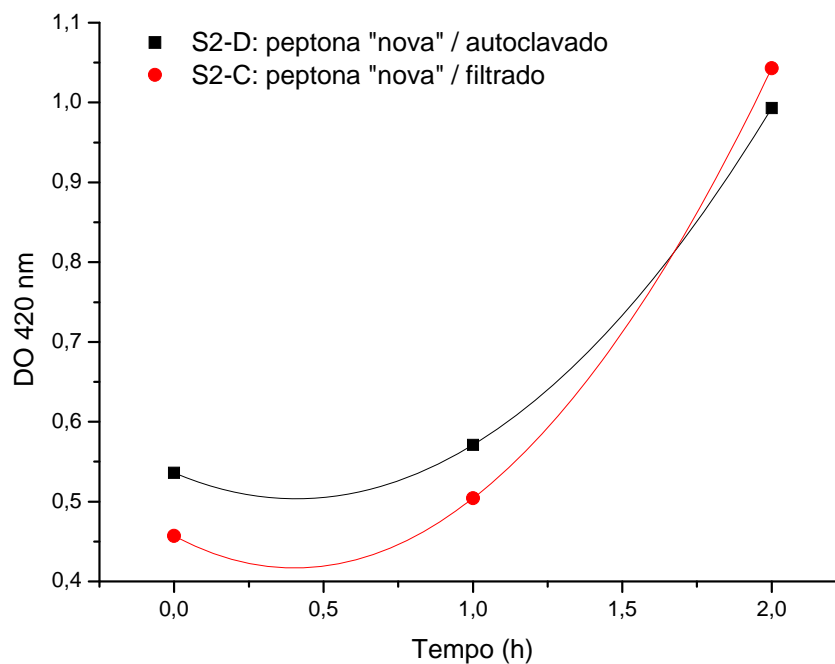


Figura 4.4 - Variação dos valores de DO nos cultivos S2-C e S2-D, em condições microaerófilas (50 rpm) com o tempo de cultivo, etapa de ativação. **S2-D**: Meio preparado com peptona adquirida recentemente na mesma concentração e origem que foi utilizada por Silva (2007) e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm . **S2-C**: Meio preparado com peptona adquirida recentemente, na mesma concentração que foi utilizada por Silva (2007) e esterilizado por autoclavagem.

Não foram observadas diferenças significativas no crescimento do microrganismo na etapa de ativação para as diferentes formas de esterilização empregadas.

Na Figura 4.5 está ilustrada a imagem da eletroforese em nitrato de prata do experimento **S2-C** e **S2-D**, onde é mostrado que a produção de antígeno foi similar em todas as condições estudadas. Nos cultivos seguintes a Peptona N2 da Difco, ou seja, a peptona “nova” será adotada como padrão.

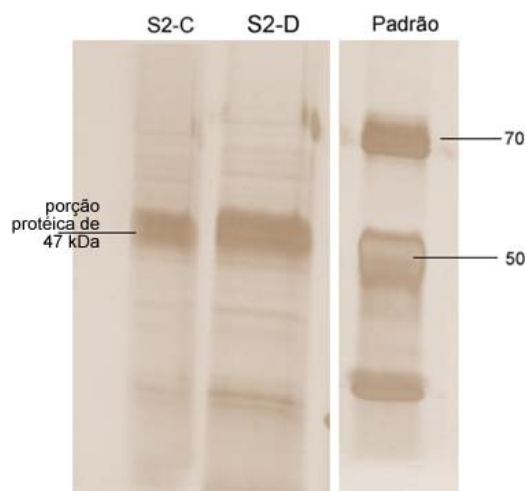


Figura 4.5 - Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração das células com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostras S2-C (peptona “nova”, meio filtrado) e S2-D (peptona “nova”, meio autoclavado).

Na Figura 4.6 observam-se os perfis de crescimento durante a ativação dos criotubos provenientes de culturas estoque armazenadas por diferentes períodos. Fica clara a diferença no perfil de ativação dos criotubos procedentes de estoques diferentes, sendo que os criotubos com menor tempo de armazenamento possuem fase lag de cerca de 4 horas, o que não é observado no lote de criotubos com 21 meses de armazenamento. A DO máxima atingida para todos os lotes da ativação dos criotubos foi aproximadamente 1,0, pois nessa etapa o conteúdo dos frascos foi transferido para frascos maiores, onde os cultivos foram realizados.

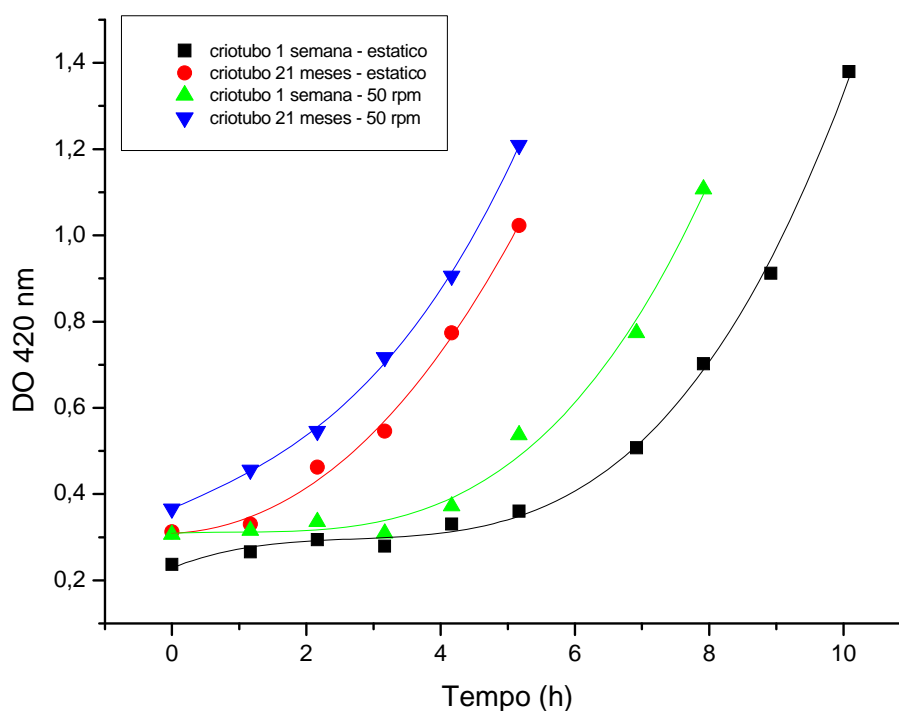


Figura 4.6 - Crescimento celular em função do tempo, para ativações realizadas em condições microaerófila (estática e sob agitação de 50 rpm), para os dois lotes de criotubos com diferentes tempos de armazenamento no Conjunto de Ensaio S3.

No mesmo experimento, ambos os lotes de cultura estoque foram cultivados em condição aeróbia e microaerófila (sob agitação de 200 rpm e cultura estática, respectivamente) na etapa de cultivo, visando avaliar a produção do antígeno em diferentes condições de aeração e definir as condições para continuidade dos estudos. As condições estudadas nos 4 ensaios realizados no Experimento S3 estão resumidas na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Condições estudadas nos quatro ensaios realizados no Experimento S4.

Ensaio	Velocidade de agitação	Tempo de armazenamento da suspensão celular em criotubos
S3-A	Estático	21 meses
S3-B	Estático	1 semana
S3-C	Aeróbio (200 rpm)	21 meses
S3-D	Aeróbio (200 rpm)	1 semana

O crescimento celular observado para todas as condições estudadas está representado na Figura 4.7.

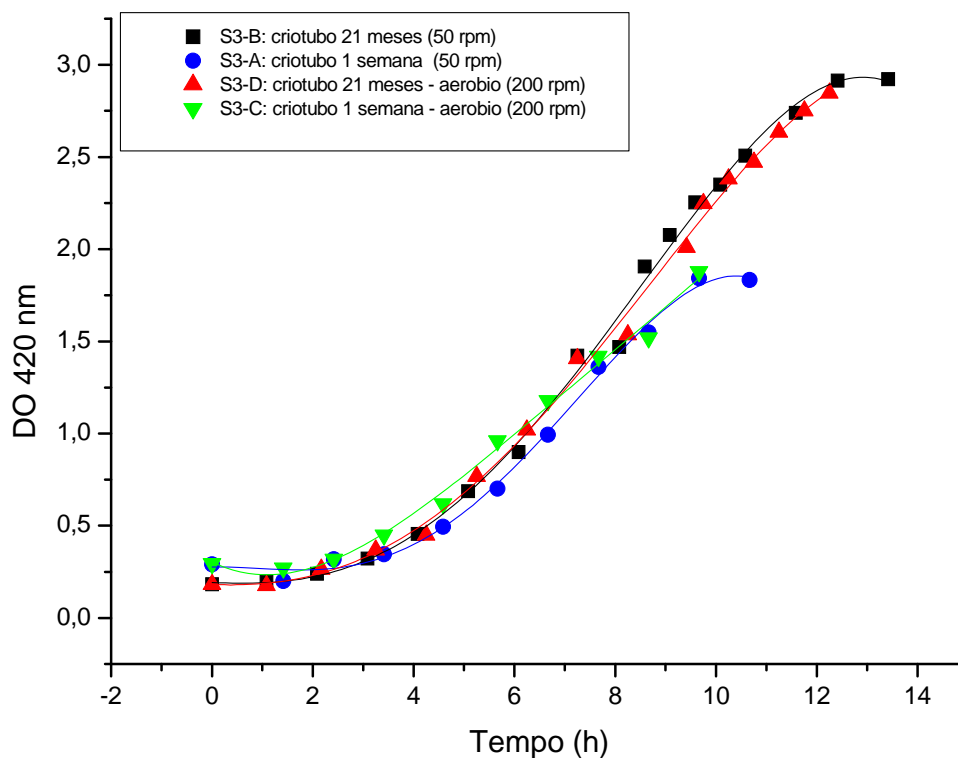


Figura 4.7 - Crescimento celular em função do tempo, para cultivos realizados em condições estática e aeróbia (200 rpm), para os dois lotes de criotubos no Conjunto de Ensaio S3.

Observa-se que as curvas do crescimento celular (DO) na Figura 4.7 apresentam a mesma tendência. A DO máxima atingida foi diferente para as dois lotes de criotubos. O quarto lote de criotubos (21 meses) obteve valores maiores de DO máxima, como pode ser visto na Tabela 4.4. Os valores da velocidade máxima específica de crescimento para os ensaios realizados estão representados na Tabela 4.4. Os dados confirmam que as células provenientes dos criotubos armazenados por 21 meses tiveram uma velocidade de crescimento ligeiramente superior a dos criotubos armazenados por menor período.

Tabela 4.4 - Velocidade máxima específica de crescimento e densidade ótica máxima para os ensaios do Experimento S3.

ENSAIOS	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	DO final (420 nm)	Tempo de cultivo (h)
Criotubos 21 meses – microaerófilo (S3-A)	0,31 \pm 0,01	2,9	13,42
Criotubos 1 semana – microaerófilo (S3-B)	0,28 \pm 0,01	1,8	10,66
Criotubos 21 meses – aeróbio (S3-C)	0,33 \pm 0,01	3,0	12,75
Criotubos 1 semana – aeróbio (S3-D)	0,29 \pm 0,01	1,9	9,66

A Figura 4.8 mostra a eletroforese em nitrato de prata para os Ensaios S3-A, B, C e D, verificando-se que a produção de antígeno nas quatro condições estudadas é equivalente. Os ensaios seguintes partiram dos criotubos do lote N° 7 (21 meses de armazenamento), cultivados em condições aeróbias.

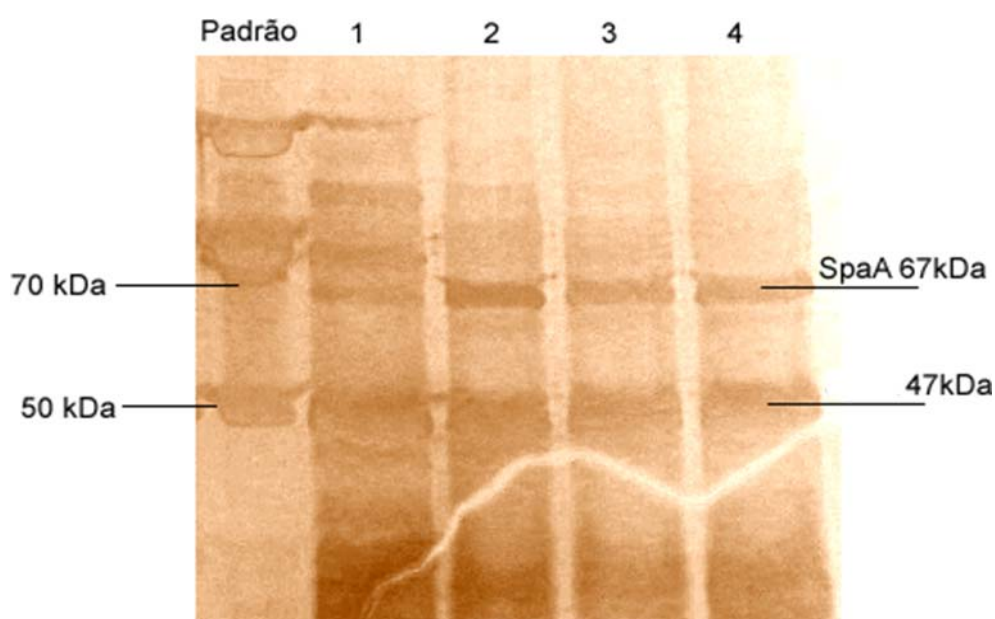


Figura 4.8- Eletroforese em nitrato de prata das amostras de extração do antígeno com colina. Na imagem: Padrões de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen); Amostras 1: S3-A, 2: S3-B – microaerófilo, 3: S3-C e 4: S3-D

A partir dos resultados obtidos nos Experimentos S1, S2 e S3 pode-se concluir que o único fator que exerceu influência na etapa de ativação e na etapa de cultivo foi o tempo de armazenamento da cultura congelada. No entanto, o efeito foi o contrário do observado na Figura 4.1, nas ativações realizadas por Silva e colaboradores. O crescimento mais rápido e mais intenso observado nos experimentos S1, S2 e S3 pode estar relacionado com uma

possível seleção das células mais adaptadas ao congelamento. Como todos os lotes de criotubos foram preparados a partir do lote anterior, foram criadas condições para que as células que melhor resistiram ao congelamento e que apresentaram maior viabilidade se propagassem na etapa de ativação e fossem utilizadas para a preparação de novos criotubos. Além disso, é importante ressaltar que outras modificações foram introduzidas no preparo dos criotubos, tais como: uso de suspensões celulares mais concentradas; melhor controle da temperatura durante o cultivo para obtenção das suspensões a serem congeladas e principalmente, realização dos cultivos para obtenção das suspensões em condições microaerófilas, porém com maior disponibilidade de oxigênio dissolvido e melhor homogeneização do meio devido à agitação de 50 rpm adotada. Destaca-se esta última modificação, pois no período de 2005 a 2007, a maioria dos lotes de criotubos foi preparado a partir de cultivos estáticos, o que levava a uma maior produção de metabólitos, expondo as células a uma condição de stress, que pode ter contribuído para torná-las mais suscetíveis à perda de viabilidade durante o congelamento.

De qualquer forma, pode-se afirmar que o objetivo de padronizar as etapas de ativação dos criotubos e de produção do inóculo, reduzindo o tempo de crescimento na etapa de ativação foi plenamente atingido.

4.2. Cultivos de *E. rhusiopathiae* em meios contendo diferentes fontes de carbono e de nitrogênio

Conforme comentado anteriormente, um dos principais problemas enfrentados para atingir altas concentrações celulares em cultivos de *E. rhusiopathiae* está relacionado ao acúmulo de ácido láctico, o qual é formado inclusive em cultivos conduzidos em aerobiose. Além disso, as proteose peptonas N2 e N3, tradicionalmente empregadas nos cultivos de *E. rhusiopathiae* relatados na literatura, são de origem animal. Assim, por essas razões, decidiu-se conduzir um conjunto de ensaios em câmara incubadora, nos quais foram testadas diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Os resultados obtidos nesses experimentos são apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1. Conjunto S4 – Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de carbono na produção de ácido lático, no crescimento e na expressão da proteína

Conforme já vem sendo amplamente estudado para outras bactérias, como a *E. coli*, o uso de fontes de carbono mais lentamente assimiladas pela célula contribui para minimizar o *overflow* na glicólise, levando a uma menor produção de ácidos orgânicos (Rocha, 2003). Há pouca informação na literatura sobre a assimilação de diferentes fontes de carbono por *E. rhusiopathiae*. Por isso, o Experimento S5 foi realizado com o objetivo de testar novas fontes de carbono no meio de cultivo e verificar a influência dessas fontes de carbono no crescimento celular, na expressão da proteína antigênica e na produção de metabólitos. Foram testadas quatro diferentes fontes de carbono: glicose, glicerol, lactose e galactose. A Figura 4.9 mostra os perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos.

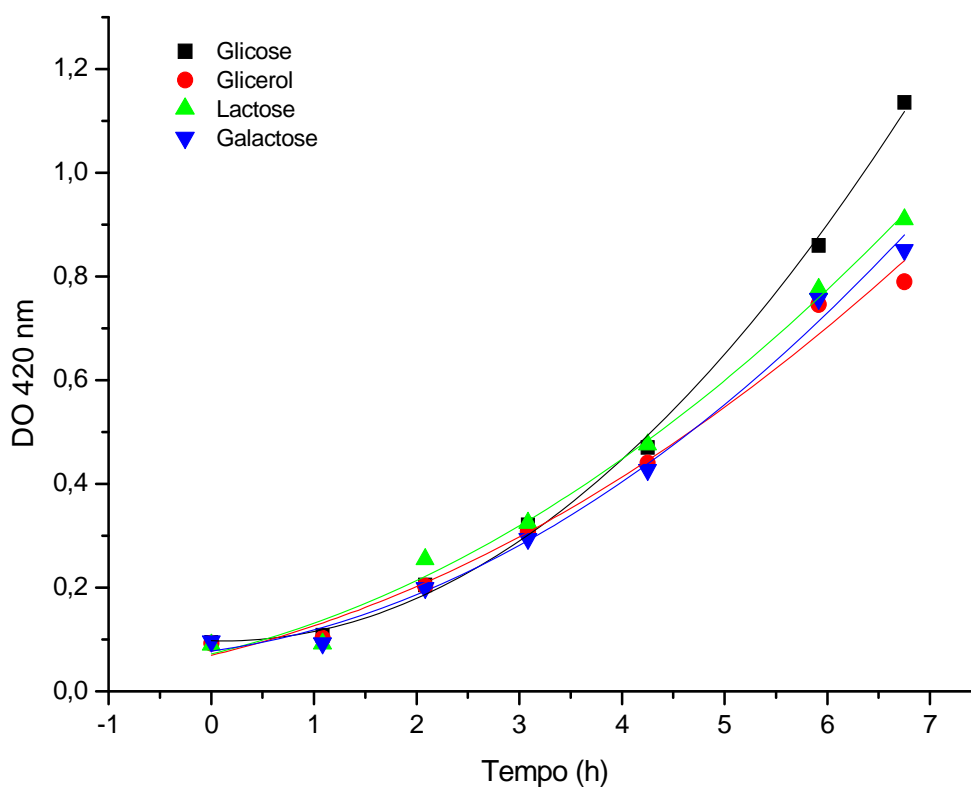


Figura 4.9 - Crescimento celular em cultivos realizados com diferentes fontes de carbono no meio no Conjunto de Ensaio S4.

Observou-se que o microrganismo cresceu bem em todas as fontes de carbono testadas, com velocidades máximas de crescimento específico bastante semelhantes. No ensaio com a glicose a velocidade foi um pouco maior (aproximadamente $0,36 \text{ h}^{-1}$, Tabela 4.5) e como pode ser visto no gráfico da Figura 4.9, esse seria o cultivo com a maior densidade óptica final obtida. O cultivo realizado com glicerol a velocidade de crescimento foi de $0,33 \text{ h}^{-1}$ (Tabela 4.5), valor próximo ao obtido nas demais condições estudadas.

Os perfis de consumo das fontes de carbono e da produção de metabólitos podem ser vistos nas Figuras 4.10 e 4.11.

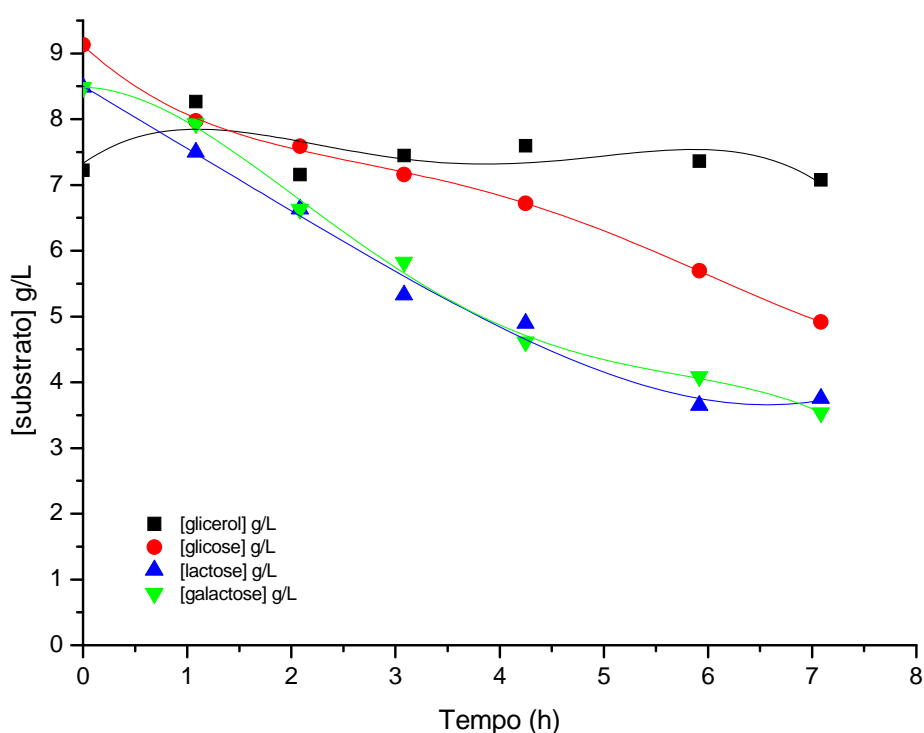


Figura 4.10 - Consumo de substrato ao longo dos respectivos cultivos.

A Figura 4.10 mostra que a glicose, a lactose e a galactose foram consumidas durante os cultivos. Observa-se ainda que o consumo de lactose e galactose foi mais intenso do que o da glicose. Porém, não houve consumo do glicerol, apesar do crescimento observado com essa fonte de carbono (Figura 4.9). Uma possível explicação para haver crescimento sem aparente consumo da fonte de carbono é a utilização de carboidratos presentes nas fontes de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) para suportar o crescimento.

A Figura 4.11 mostra a produção de metabólitos para as diferentes fontes de carbono estudadas. Nota-se que o principal metabólito acumulado foi o ácido láctico, seguido

pelo ácido acético em menores proporções. A formação de ácido láctico foi observada com a mesma intensidade nos cultivos contendo glicose, lactose e galactose como fontes de carbono. Já no meio contendo glicerol como fonte de carbono foram produzidas concentrações muito baixas de metabólitos, não ultrapassando 0,1 g/L ao final do cultivo. Isso é explicado pela não assimilação desse substrato.

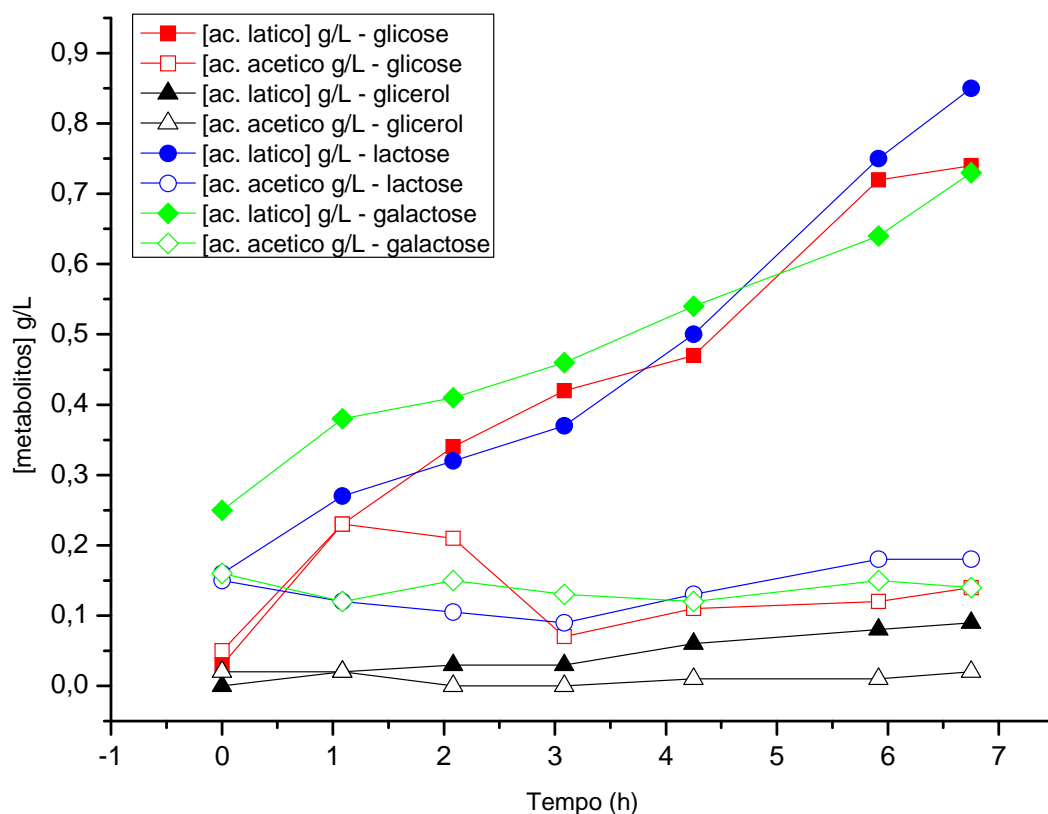


Figura 4.11 - Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com diferentes fontes de carbono

As concentrações finais dos metabólitos para todos os ensaios, assim como as velocidades máximas específicas de crescimento, podem ser visualizadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Comparação entre os resultados dos cultivos de *E. rhusiopathiae* com diferentes fontes de carbono (Experimento S5)

	Glicose	Glicerol	Galactose	Lactose
μ_{\max} (h ⁻¹)*	0,36±0,02	0,33±0,01	0,34±0,01	0,30±0,01
Y _{X/S} **	0,34±0,01	ND	ND	ND
[ác. láctico] final (g/L)	0,74	0,09	0,73	0,85
[ác. acético] final (g/L)	0,14	0,02	0,14	0,18
[ác. fórmico] final (g/L)	0,19	0,03	0,23	0,29

*calculada a partir da DO 420 nm

** calculado a partir de dados de DO e fator de conversão de DO em massa seca obtidos no Ensaio S6.

ND – Não determinado

Na avaliação da produção de antígeno realizada por eletroforese (Figura 4.12), verificou-se presença da banda de SpaA (67 kDa) em todos os ensaios.

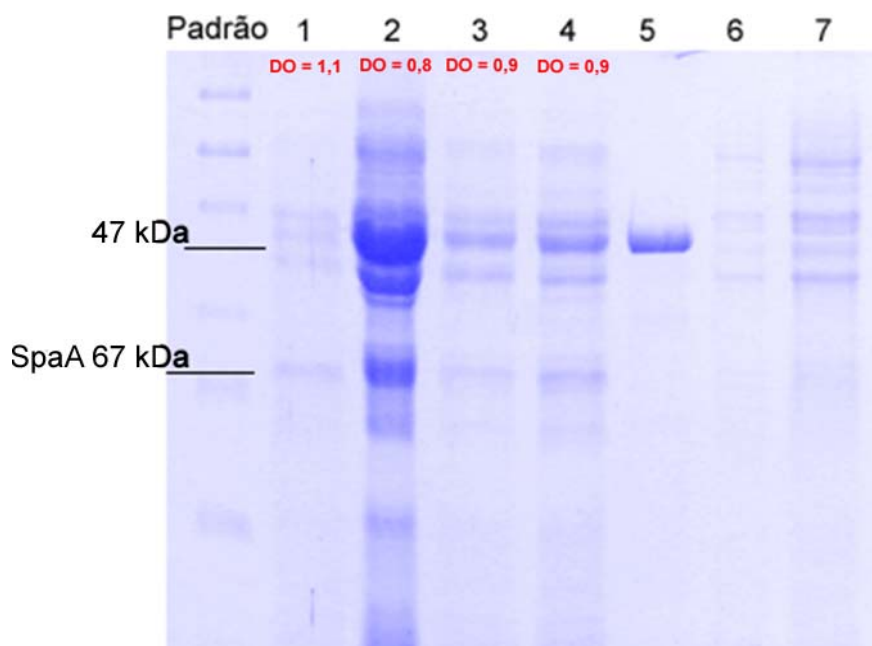


Figura 4.12 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 4 condições estudadas (glicose, glicerol, lactose e galactose) Na imagem: **Padrão:** padrão de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen); **Amostras:** 1: cultivo com glicose (DO = 1,1), 2: cultivo com glicerol (DO = 0,8), 3: cultivo com lactose (DO = 0,9), 4: cultivo com galactose (DO = 0,9), 5: rSpaA padrão (pura) 47 kD, 6: Vazio, 7: Extrato de célula (obtido a partir das células fervidas a 100°C). Todas as amostras foram concentradas em 100 vezes.

Chama a atenção na Figura 4.12 a expressiva produção de antígeno no cultivo realizado com glicerol como fonte alternativa de carbono.

Utilizando o programa *ImageJ*, foi feita a quantificação das proteínas identificadas no gel de eletroforese em unidades arbitrárias, para fins de comparação mais precisa da expressão de proteínas nos diferentes meios testados. Os resultados obtidos são visualizados na Figura 4.13.

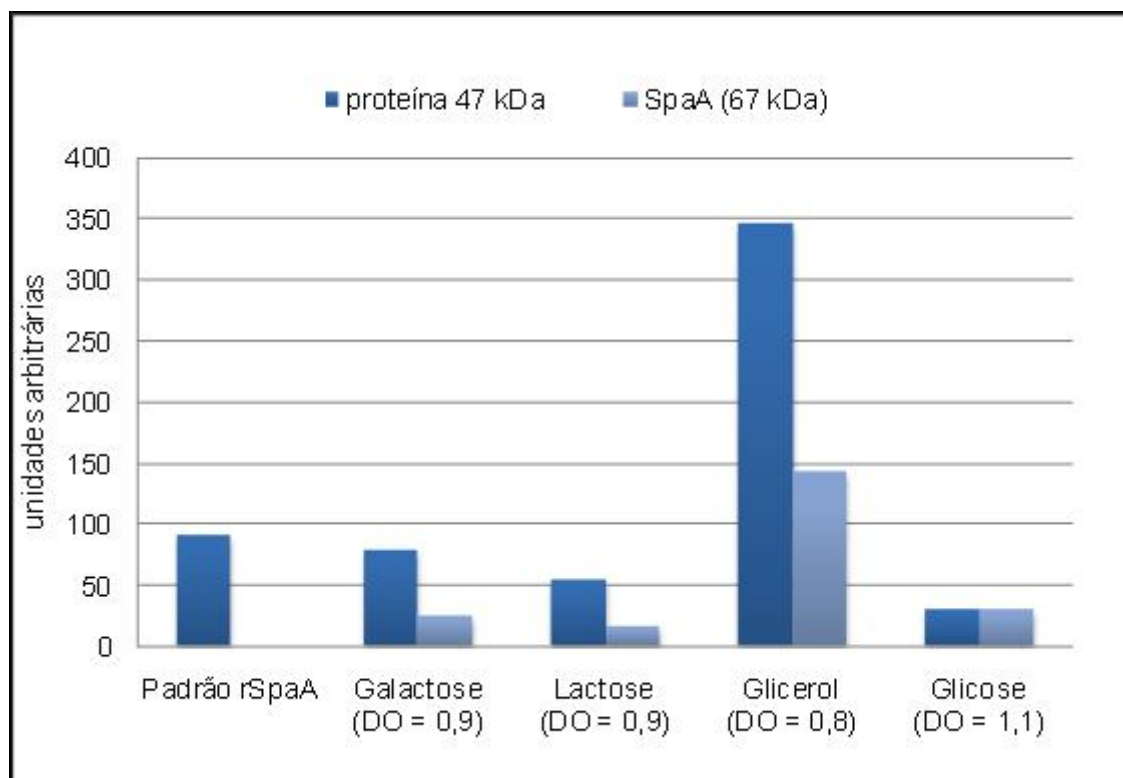


Figura 4.13 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S4

Observa-se na Figura 4.13 que o cultivo utilizando o glicerol como fonte de carbono foi o que obteve a maior concentração de proteína ao fim do cultivo. As densidades óticas dos cultivos no momento de interrupção estão indicadas na Figura 4.12, sendo 1,1; 0,9; 0,9 e 0,8, respectivamente para a glicose, a lactose, a galactose e o glicerol. O cultivo com glicose como fonte de carbono (padrão) foi o que obteve a menor expressão de proteína, provavelmente porque o processo de extração do antígeno foi iniciado já na fase de morte do cultivo, quando uma grande concentração de proteases já está presente no meio. Quantidades ligeiramente superiores de proteína foram obtidas nos cultivos realizados com galactose e lactose como fontes de carbono. Já a alta expressão de antígeno observada com o glicerol é intrigante, uma vez que o mesmo não foi consumido. Esse fato pode estar relacionado à baixa

produção de ácidos orgânicos observada nesse ensaio, a qual permitiu uma maior estabilidade do pH e talvez isso tenha influenciado positivamente a expressão da proteína.

4.2.2. Conjunto S5 - Novas formulações para o meio de cultivo: influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de ácido láctico, no crescimento e na expressão da proteína

As recomendações GMP (Good Manufacturing Practices), tanto da Anvisa como da FDA ressaltam a importância da substituição de fontes de nitrogênio de origem animal por similares de origem vegetal ou microbiana (como é o caso do extrato de levedura). A preocupação de se evitar a presença de nutrientes de origem animal em meios de cultivo ganhou ênfase com o surgimento dos casos de BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) no final da década de 80 (ANVISA: Resolução RDC nº 315, de 26 de outubro de 2005).

No caso específico dos meios de cultivo para *E. rhusiopathiae* é inegável a evolução da sua composição ao longo dos anos. Nos estudos iniciais, nutrientes como BHIS (Brain and Heart Infusion suplementado com soro) eram frequentemente encontrados na composição dos meios de cultivo (Groschup *et al.*, 1990). Graças aos trabalhos de Feist (Groschup *et al.*, 1990), tornou-se possível substituir o BHIS pela peptona de carne, sem prejuízos ao crescimento da bactéria ou à capacidade imunogênica da bacterina. Porém, desde o surgimento do meio proposto por Feist, nenhum novo estudo foi conduzido visando à análise da incorporação de outras fontes complexas de nitrogênio ao meio de cultivo de *E. rhusiopathiae*. Além dos aspectos mencionados anteriormente, é importante ressaltar também o aspecto econômico. Como mostra a Tabela 4.10, as peptonas de origem animal certificadas (ou seja, com garantia de ausência de príons) são extremamente caras, levando a um aumento no custo de produção e conseqüentemente no produto final.

Assim, para minimizar custos, respeitar as recomendações dos órgãos de fiscalização sanitária e garantir a qualidade do produto final, estudos visando à substituição das fontes de nitrogênio de origem animal por similares de origem vegetal são necessários. O Experimento S5 foi realizado com o objetivo de estudar o crescimento de *E. rhusiopathiae*, assim como a expressão do antígeno e a formação de metabólitos, em meios de cultivo contendo como fontes de nitrogênio: peptona N°2 da Difco, soytone da Difco, peptona de Soja da Acumedia ou água de Maceração de Milho (Milhocina) da Corn Products, sendo a primeira de origem animal e as outras três de origem vegetal.

A Figura 4.14 mostra os perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos para os diferentes nutrientes testados. Em todos os cultivos, glicose foi empregada como fonte de carbono.

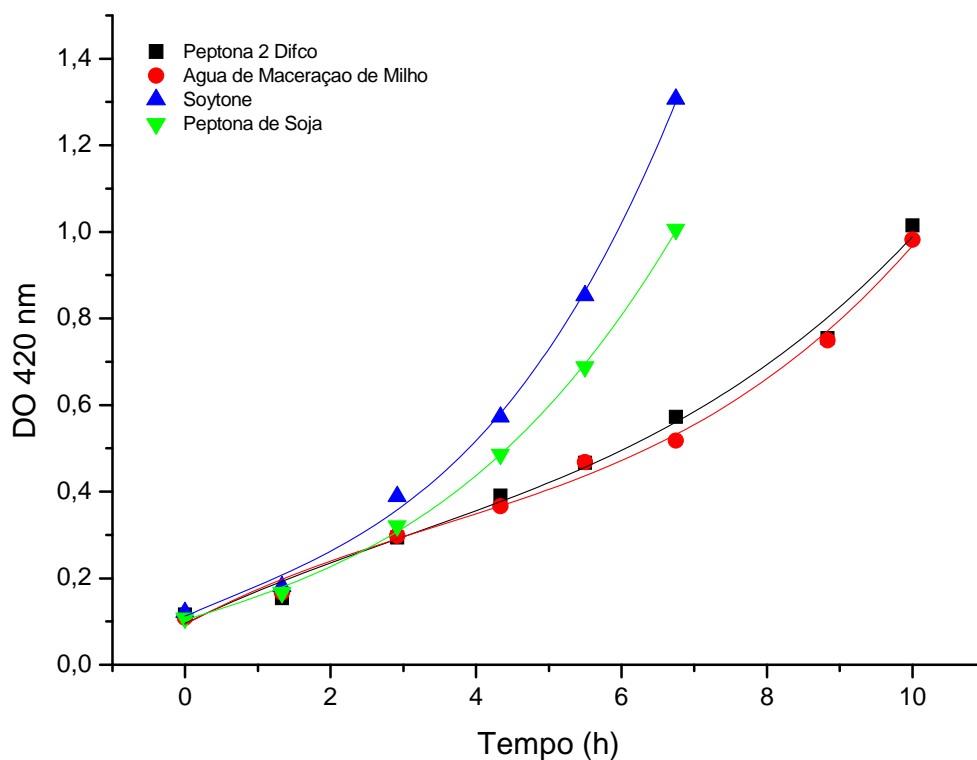


Figura 4.14 - Crescimento celular dos cultivos realizados com diferentes fontes de nitrogênio no meio no Conjunto de Ensaio S5.

Observa-se que o microrganismo cresceu bem em todos os meios testados, com velocidades máximas de crescimento específicas diferentes. Os dados referentes às velocidades específicas de crescimento, densidade óptica máxima final e concentração final de metabólitos encontram-se na Tabela 4.6.

Tabela 4.6- Comparação entre os resultados dos cultivos de *E. rhusiopathiae* obtidos no ensaio S5

	Peptona N2 Difco	Água de Maceração de Milho	Soytone Difco	Peptona de Soja
μ_{max} (h ⁻¹)	0,29±0,01	0,26±0,01	0,35±0,04	0,34±0,02
DO final	1,1	1,0	1,3	1,0
Y _{X/S} **	0,24±0,01	---	---	---
[ác. láctico] _{final} (g/L)	0,83	0,89	0,97	0,91
[ác. acético] _{final} (g/L)	0,15	0,33	0,36	0,33
[ác. fórmico] _{final} (g/L)	0,36	0,19	0,26	0,31

*obtido a partir da DO_{420nm}

** calculado a partir de dados de DO e fator de conversão de DO em massa seca obtidos no Ensaio S6.

O cultivo com água de maceração de milho como fonte de nitrogênio foi o que teve a menor velocidade de crescimento e também o que terminou com a menor concentração celular em termos de densidade ótica. As velocidades de crescimento foram semelhantes para os cultivos contendo soytone e peptona de soja, que apresentaram crescimento mais rápido que a Peptona N2, usualmente empregada. A densidade ótica obtida com o Soytone no momento de interrupção do cultivo foi a maior dentre os quatro ensaios realizados.

Os perfis de consumo de glicose e de produção de metabólitos podem ser vistos nas Figuras 4.15 e 4.16. Os resultados mostram que a glicose foi mais consumida nos meios contendo água de maceração de milho e Peptona N2 do que nos meios contendo peptona de soja. Isso pode ser explicado pela alta fração de carboidratos presentes nas peptonas de soja, que podem ser assimilados e contribuir para o crescimento, levando a um menor consumo de glicose. Em termos de formação de metabólitos, os resultados são muito parecidos, notando-se o acúmulo de ácido láctico até o mesmo patamar de concentração para as quatro fontes de nitrogênio testadas. Porém, devido a maior velocidade de crescimento, a velocidade de formação de ácido láctico foi maior nos cultivos conduzidos com o Soytone e a peptona de farelo de soja como fontes de nitrogênio. O ácido acético foi outro metabólito formado, porém sua concentração permaneceu relativamente estável em todos os cultivos, oscilando entre 0,1 e 0,3 g/L.

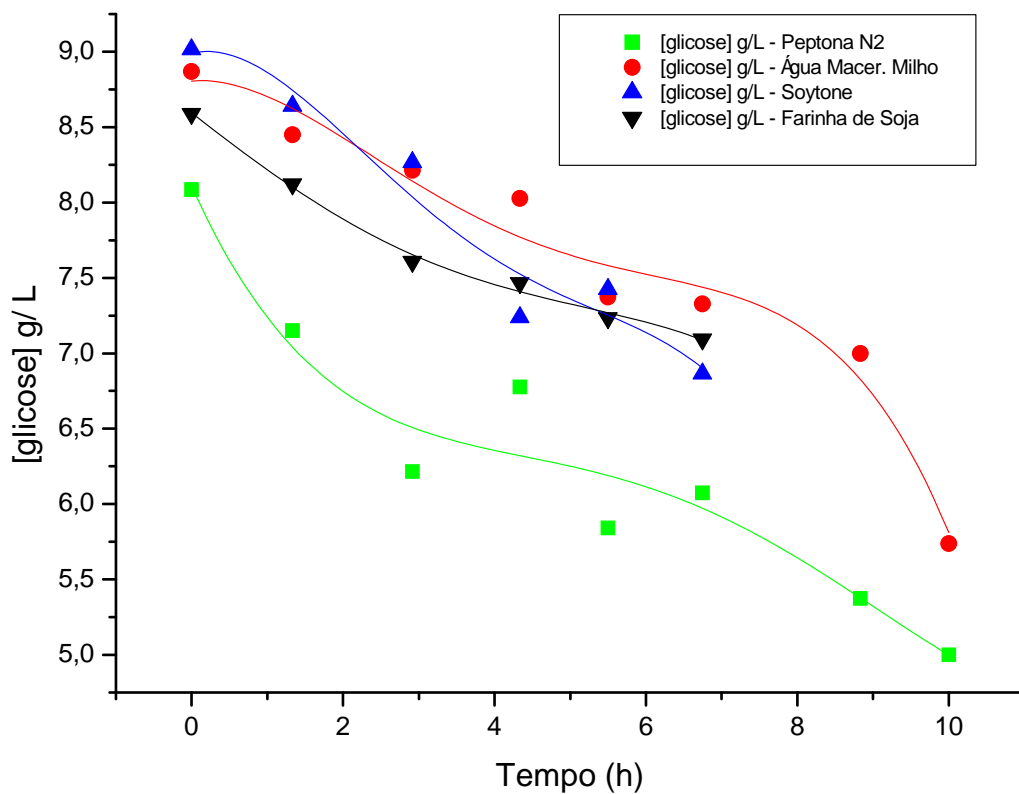


Figura 4.15- Consumo de glicose ao longo dos cultivos para as diferentes fontes de nitrogênio estudadas no Conjunto de Ensaio S5.

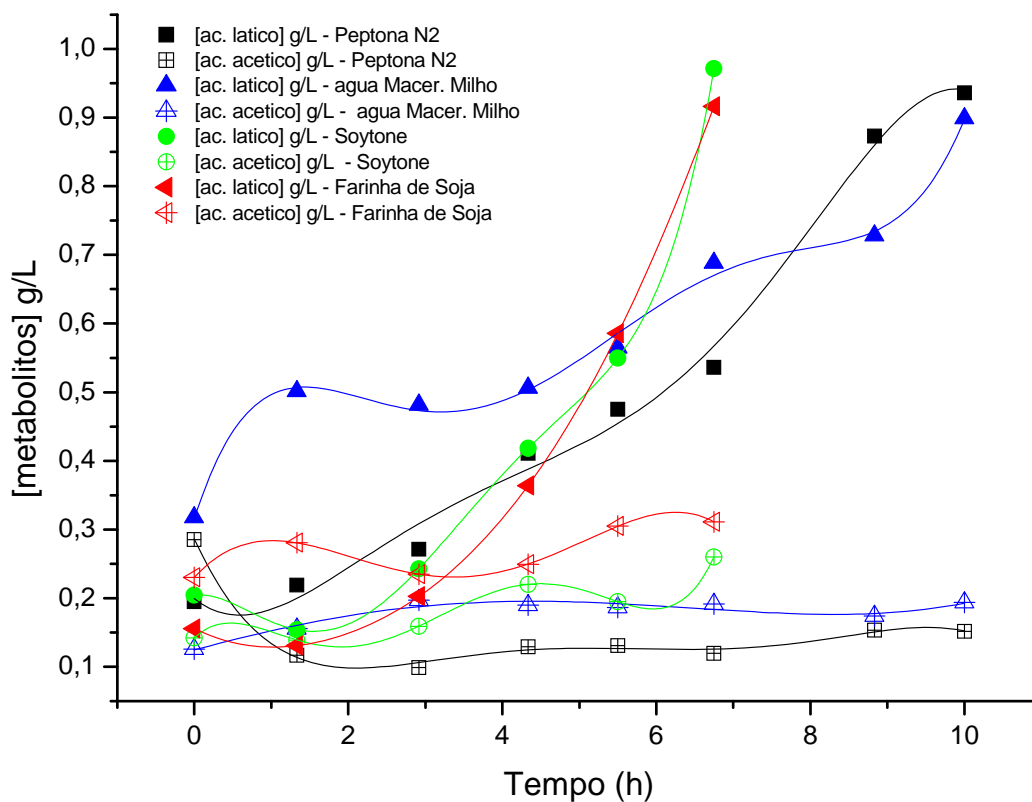


Figura 4.16 - Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com diferentes fontes de nitrogênio no Conjunto de Ensaio S5.

Na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese (Figura 4.17), verificou-se presença da banda de SpaA em todos os ensaios.

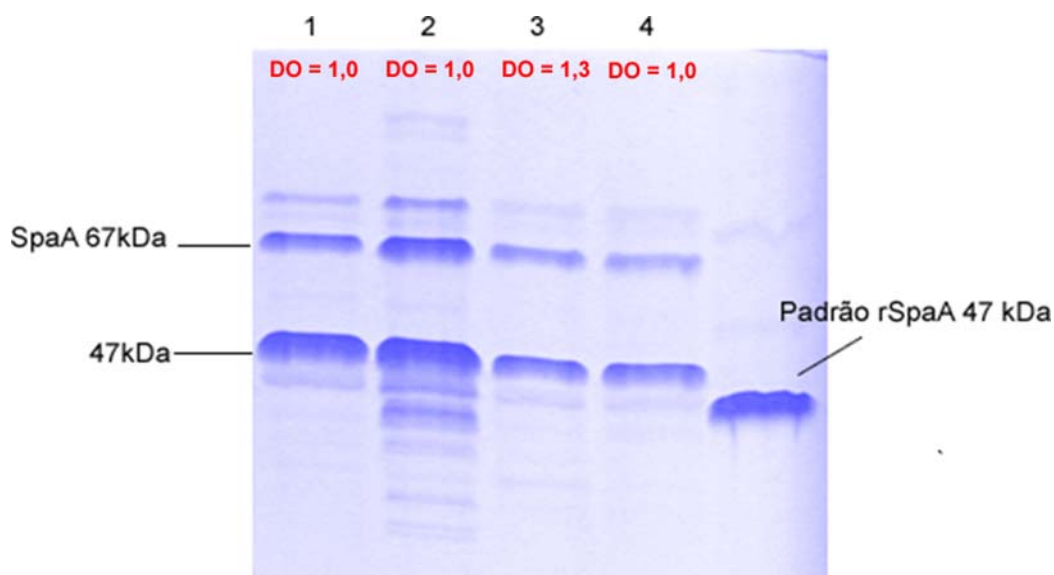


Figura 4.17 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 4 condições estudadas (peptona N2, soytone, água de maceração de milho e peptona de soja Acumedia) Na imagem: 1: cultivo com peptona N2 Difco (DO = 1,0), 2: cultivo com água de maceração de milho (DO = 1,0), 3: cultivo com Soytone Difco (DO = 1,3), 4: cultivo com Farinha de Soja Acumedia (DO = 1,0), 5: rSpaA padrão (pura) 47 kDa. Todas as amostras foram concentradas em 100 vezes.

Utilizando o programa *ImageJ*, foi feita a quantificação das proteínas identificadas no gel de eletroforese em unidades arbitrárias, para fins de comparação mais precisa da expressão de proteínas nos diferentes meios testados. Os resultados obtidos são visualizados na Figura 4.18.

Observa-se na Figura 4.18 que o cultivo utilizando o Soytone e a Peptona de Soja Acumedia como fonte de nitrogênio, foram os que obtiveram a maior concentração de proteína no momento de interrupção do cultivo. Conforme mostram os valores de densidade óptica e de velocidade máxima específica de crescimento apresentados na Tabela 4.6, a expressão da proteína está coerente com a maior produção de biomassa e a maior velocidade de crescimento observadas para esses nutrientes.

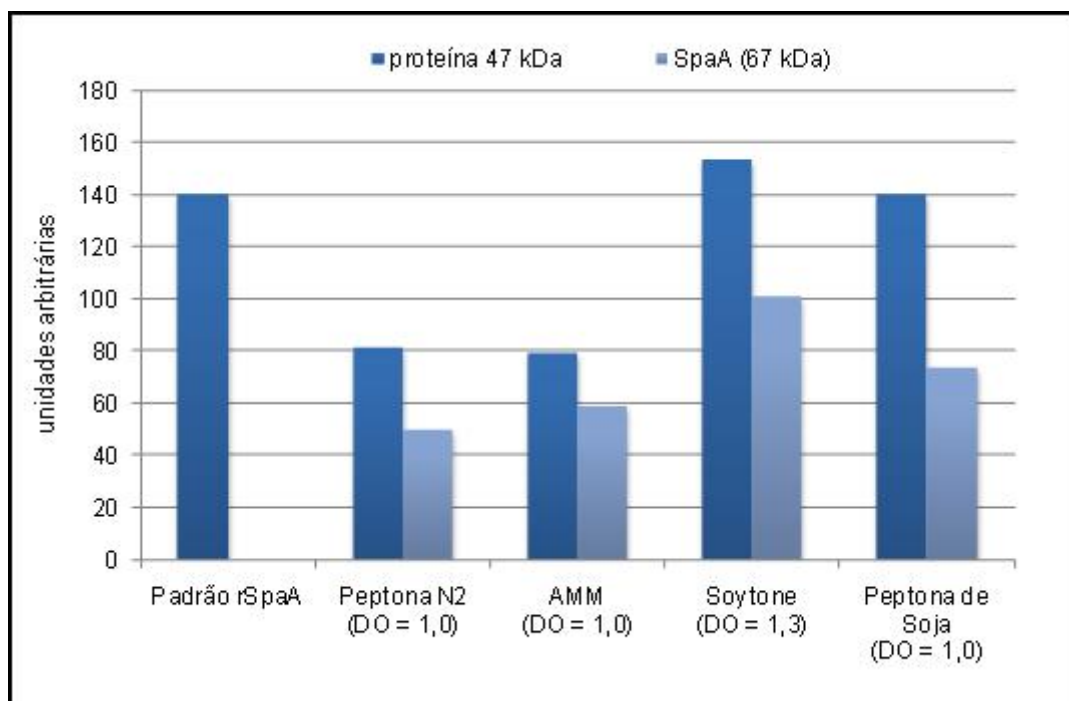


Figura 4.18 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S5

4.2.3. Conjunto S6 - Combinação dos conjuntos S4 e S5: Utilização do Soytone como fonte de nitrogênio vegetal e glicerol como nova fonte de carbono

Diante dos resultados obtidos no item 4.2.1 os quais indicaram que a melhor expressão da proteína ocorria com o glicerol, apesar da aparente não assimilação do mesmo, decidiu-se realizar um novo conjunto de experimentos visando à verificação e confirmação desses resultados, incluindo um prolongamento dos cultivos até atingirem a fase estacionária. Além disso, levando-se em consideração os resultados obtidos no item 4.2.2, os quais indicaram que as duas peptonas de soja utilizadas (Peptona de Soja Acumedia e Soytone (Difco)) poderiam substituir com sucesso a peptona de origem animal (Peptona N2) que vinha sendo utilizada nos cultivos, optou-se por realizar estudos com meios contendo glicerol como fonte de carbono e diferentes fontes de nitrogênio, para também verificar a possibilidade de assimilação desse substrato em meios contendo outros nutrientes.

Assim, o Soytone foi escolhido como fonte de nitrogênio desse ensaio, pois além dos bons resultados obtidos no conjunto de ensaios S5, tem preço similar ao da Peptona

de Soja da Acumedia e sendo a Difco uma marca com maior garantia de reprodutibilidade em seus produtos.

O conjunto de experimentos S6 consistiu, portanto, na realização de cultivos com o glicerol (fonte de carbono escolhida) e com o nutriente Soytone (Difco) como fonte de nitrogênio a fim de investigar o crescimento de *E. rhusiopathiae*, assim como a expressão do antígeno e a formação de metabólitos nessas condições. Para efeito de comparação, foram realizados simultaneamente, cultivos utilizando meios contendo glicose e Peptona N2 e glicerol e Peptona N2.

A Figura 4.19 mostra os perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos para os diferentes nutrientes testados. As fontes de carbono utilizadas foram glicose e glicerol.

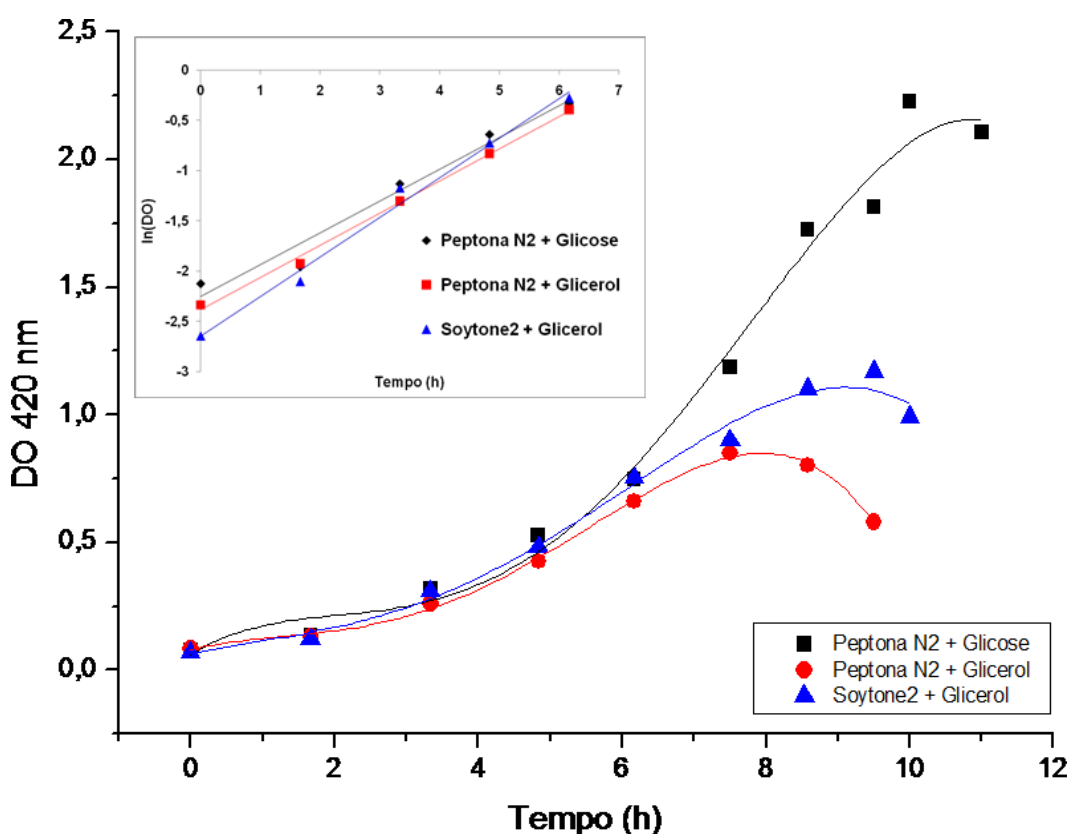


Figura 4.19 - Crescimento celular dos cultivos realizados no Conjunto S6: Soytone + Glicerol, Peptona N2 + Glicerol e Peptona N2 + Glicose. Em detalhe o gráfico de $\ln(\text{DO})$ por Tempo(h), na fase exponencial do crescimento.

Foram observados diferentes perfis de crescimento nos meios testados, com velocidades máximas de crescimento específico diferentes (Figura 4.19 e Tabela 4.7). Todos os cultivos foram acompanhados até alcançarem a fase estacionária de crescimento, sendo

inclusive observada o início da fase de morte, que ocorreu por volta das 9 horas para os cultivos em meio contendo glicerol. Confirmando os resultados obtidos no conjunto de experimentos S4, a maior formação de biomassa foi alcançada no meio contendo glicose, a qual foi praticamente o dobro da obtida nos meios contendo glicerol. De acordo com os perfis de consumo de substrato (Figura 4.20), houve consumo da ordem de 3 g/L de glicerol nos experimentos tanto com Peptona N2 como com Soytone como fontes de nitrogênio, o que contrasta com o comportamento observado no conjunto de ensaios S4. Porém, os dados da concentração de glicerol estão bastante ruidosos, o que pode estar relacionado com problemas na metodologia analítica utilizada na determinação da concentração dos substratos, realizada por HPLC para esse experimento, a qual mostrou ser menos precisa.

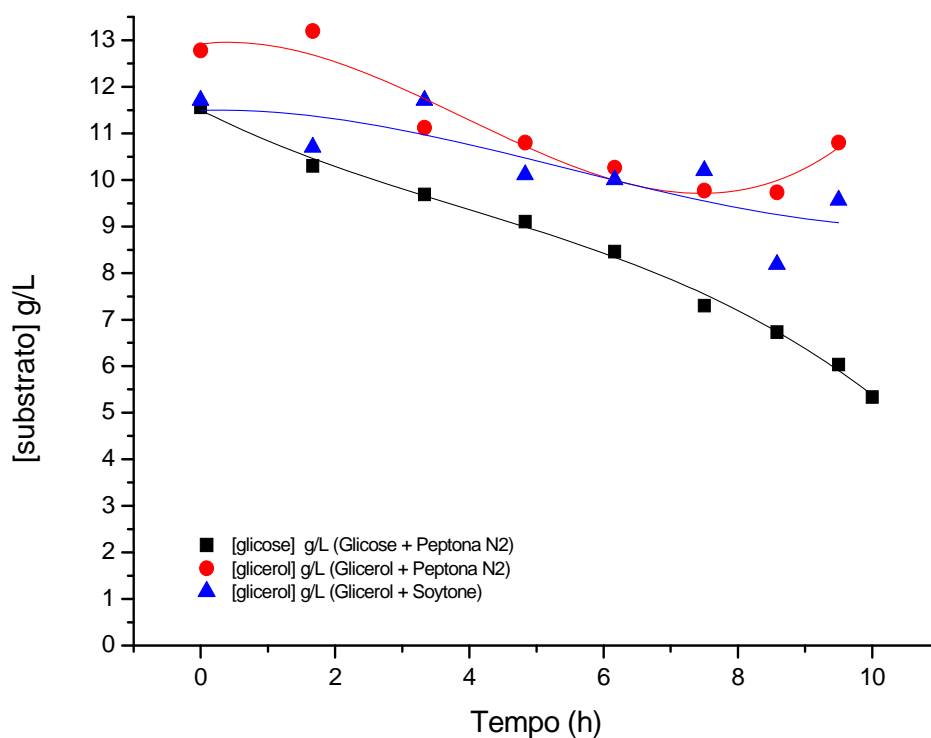


Figura 4.20 - Consumo de substrato ao longo dos cultivos do Conjunto de Ensaios S6.

Também de acordo com os resultados dos experimentos S4, uma produção mais significativa de ácido lático só foi observada no experimento realizado em meio contendo glicose (Figura 4.21).

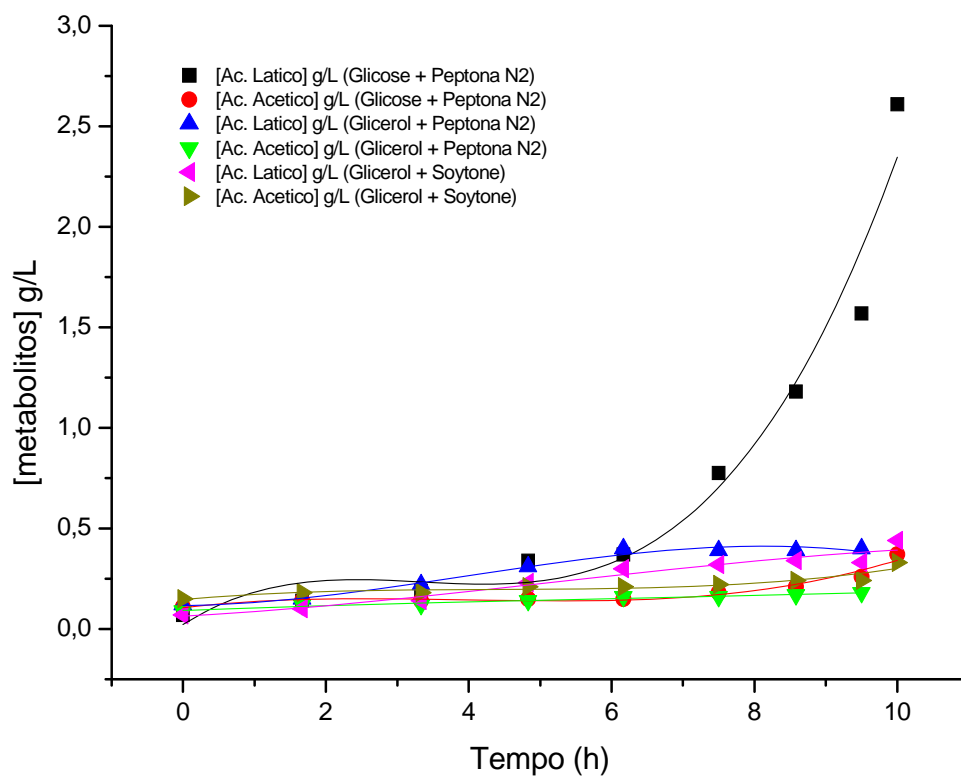


Figura 4.21 - Comparação do perfil de produção de metabólitos no Conjunto de Ensaios S6

As concentrações finais dos metabólitos para todos os ensaios, assim como as velocidades máximas específicas de crescimento, podem ser visualizadas na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Comparação entre os resultados dos cultivos de *E. rhusiopathiae* obtidos no ensaio S6.

	Soytone + Glicerol	Peptona N2 + Glicerol	Peptona N2 + Glicose
μ_{max} (h^{-1})	0,39±0,03	0,32±0,01	0,31±0,02
DO Max	1,2	0,9	2,2
$Y_{X/S}$	ND	ND	0,22±0,02
[ác. láctico] _{final} (g/L)	0,44	0,40	2,61
[ác. acético] _{final} (g/L)	0,36	0,30	0,49
[ác. fórmico] _{final} (g/L)	0,33	0,18	0,37

*obtido a partir da DO_{420nm}

** calculado a partir de dados de DO e fator de conversão de DO em massa seca obtidos nesse mesmo ensaio.

ND – Não determinado

O cultivo em meio contendo Soytone e glicerol apresentou a maior velocidade de crescimento, apesar do glicerol não ter sido utilizado como substrato pelo microrganismo. Já o cultivo utilizando Peptona N2 e glicerol apresentou velocidade específica de crescimento semelhante ao experimento controle, porém menor formação de biomassa, justamente por não assimilar o glicerol e por não haver uma fração de carboidratos tão expressiva na proteose peptona.

As velocidades de crescimento foram semelhantes para os cultivos contendo Peptona N2 que é usualmente empregada.

A densidade óptica final obtida no cultivo com glicose como fonte de carbono foi a maior dentre os três ensaios realizados. Em termos de formação de metabólitos, os resultados também são muito parecidos com os ensaios anteriores, destacando-se a menor formação de ácido lático e acético para os cultivos com glicerol.

Conforme já comentado anteriormente, a maior densidade óptica máxima observada para o cultivo com soytone e glicerol para o cultivo utilizando a peptona N2 e glicerol pode ser devido ao fato da soytone possuir uma grande concentração de carboidratos em sua composição, que contribuem como fontes suplementares de carbono e são assimiladas pelo microrganismo.

4.2.4. Conjunto S7 - Combinação dos conjuntos S4 e S5 e verificação dos resultados obtidos no conjunto S6

Diante dos resultados conflitantes observados entre os cultivos S4 e S6, principalmente em relação à assimilação de glicerol, o novo conjunto de experimentos S7 foi executado. Novamente, o objetivo foi investigar o crescimento celular, a produção de metabólitos, o consumo da fonte de carbono e a expressão da proteína na presença de soytone, como único nutriente ou em combinação com outras fontes de nitrogênio, de origem vegetal.

Assim, no conjunto de experimentos S7 foram testados cinco diferentes composições de meio: Peptona N^o3 da Difco + Glicose, Peptona N^o3 da Difco + Glicerol, Soytone da Difco + Glicerol, Soytone da Difco + AMM + Glicerol e meio contendo soytone, extrato de levedura e arginina em concentrações dobradas. A mudança de peptona, da N2 para a N3, foi necessária, pois o estoque de Peptona N2 estava próximo do fim e não havia tempo para a aquisição de um novo lote. A Peptona N3 é uma variação da Peptona N2, sendo fornecida pelo mesmo fabricante.

A composição química aproximada para as fontes de nitrogênio da Difco, selecionadas, são apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Composição química aproximada para as fontes de nitrogênio fornecidas pela Difco

Produto	Nitrogênio total (%) Ammo	Nitrogênio (%)	Carboidratos totais (mg/g)	NaCl (%)	Cálcio ($\mu\text{g/g}$)	Ferro ($\mu\text{g/g}$)	Magnésio ($\mu\text{g/g}$)	Potássio ($\mu\text{g/g}$)	Sódio ($\mu\text{g/g}$)	Cloreto (%)	Sulfato (%)	Fosfato (%)
Soytone	9,4	3,1	292,5	0,2	550	68,2	1610	22200	34040	0,17	2,33	0,82
Proteose Peptone N2	12,9	5	18,07	7,1	151	10,2	212	13313	47610	3,86	0,38	1,88
Proteose Peptone N3	13,4	3,7	17,94	6,6	132	23,7	103	13160	38113	2,54	0,37	1,51

Quanto às outras condições investigadas, a suplementação com água de maceração de milho e o aumento das concentrações dos nutrientes: Soytone, extrato de levedura e arginina, têm o mesmo objetivo, de verificar se a não assimilação de glicerol é resultado da limitação por algum nutriente. Ainda no caso da água de maceração de milho, uma maior expressão de proteína foi obtida no ensaio realizado com esse nutriente no meio de cultivo (Conjunto de Experimentos S5) e é importante confirmar essa possibilidade. Finalmente, os experimentos com glicose + Peptona N3 e glicerol + Peptona N3 constituem experimentos controle, reproduzindo as condições padrão de cultivo.

A Figura 4.22 mostra os perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos para os diferentes nutrientes testados.

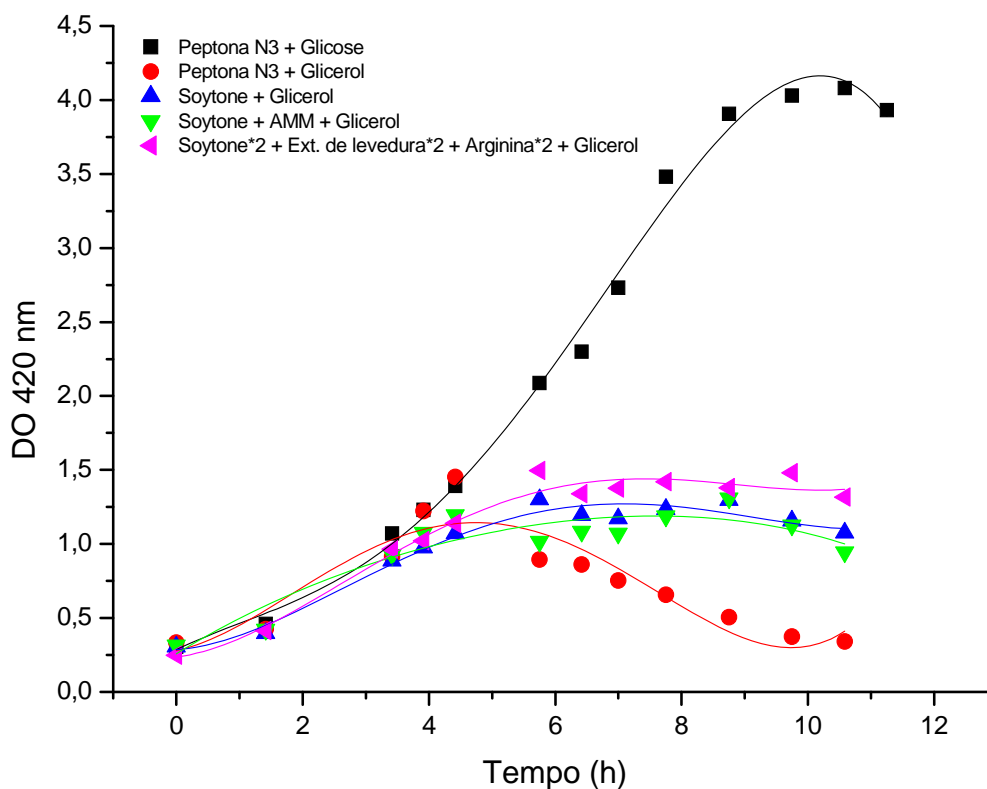


Figura 4.22 - Crescimento celular dos cultivos realizados no conjunto de ensaios S7

As fontes de carbono utilizadas foram glicose e glicerol. Nota-se claramente que o crescimento é favorecido na presença de glicose, chegando a uma densidade ótica (DO) superior a 4 após, aproximadamente, 10 horas de cultivo. Todos os experimentos realizados em meio contendo glicerol não ultrapassaram DO em torno de 1,5. A explicação para a baixa formação de biomassa é fornecida na Figura 4.23, onde são apresentados os perfis de consumo de glicose e glicerol nos diferentes ensaios.

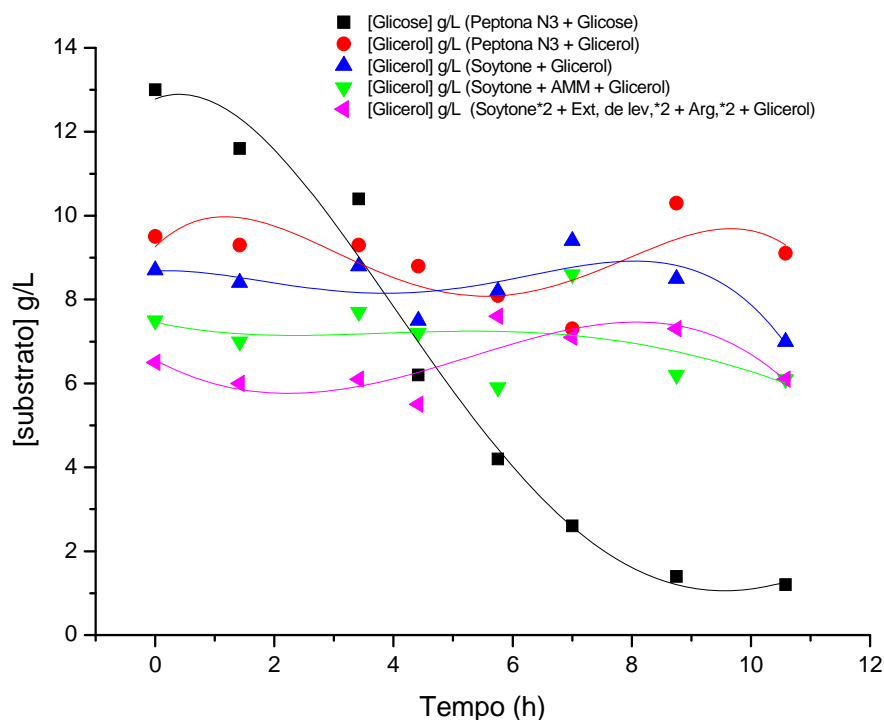


Figura 4.23 - Consumo de substrato ao longo do conjunto de ensaios S7

Confirmando os resultados preliminares obtidos no conjunto de experimentos S4, o glicerol não é consumido em nenhuma das condições investigadas, enquanto a glicose é praticamente consumida integralmente ao longo do cultivo. Ressalta-se ainda que a formação de biomassa nos cultivos com glicerol é provavelmente consequência da assimilação de carboidratos presentes nos nutrientes complexos como extrato de levedura, peptona e Soytone.

Sabe-se que o Soytone é uma fonte de nitrogênio complexa que acaba funcionando também como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo, por ser rico em carboidratos de fácil assimilação, enquanto que a Peptona N3 é uma fonte de nutrientes mais pobre em carboidratos (BD Bionutrients, 2007).

Apesar da não assimilação de glicerol, é interessante observar na Figura 4.22 que na presença de Soytone como fonte de nitrogênio, uma prolongada fase estacionária foi observada, enquanto que no meio contendo glicerol e Peptona N3 a fase de morte iniciou-se logo após o fim da fase exponencial de crescimento. Isso indica a provável presença de componentes no Soytone que atuam nessa fase do cultivo, contribuindo para a manutenção da viabilidade das células. Desta forma, verificou-se que o microrganismo adaptou-se muito bem à Soytone, que é uma fonte de nitrogênio de origem vegetal, conseguindo inclusive prolongar

a sua fase estacionária, que antes, em cultivos realizados por Silva (2007), não passava de 3 horas.

Em concordância com o intenso crescimento, há expressiva formação de ácido láctico no cultivo com glicose, enquanto que nos outros meios estudados em S7, não há formação significativa de metabólitos, como pode ser observado na Figura 4.24.

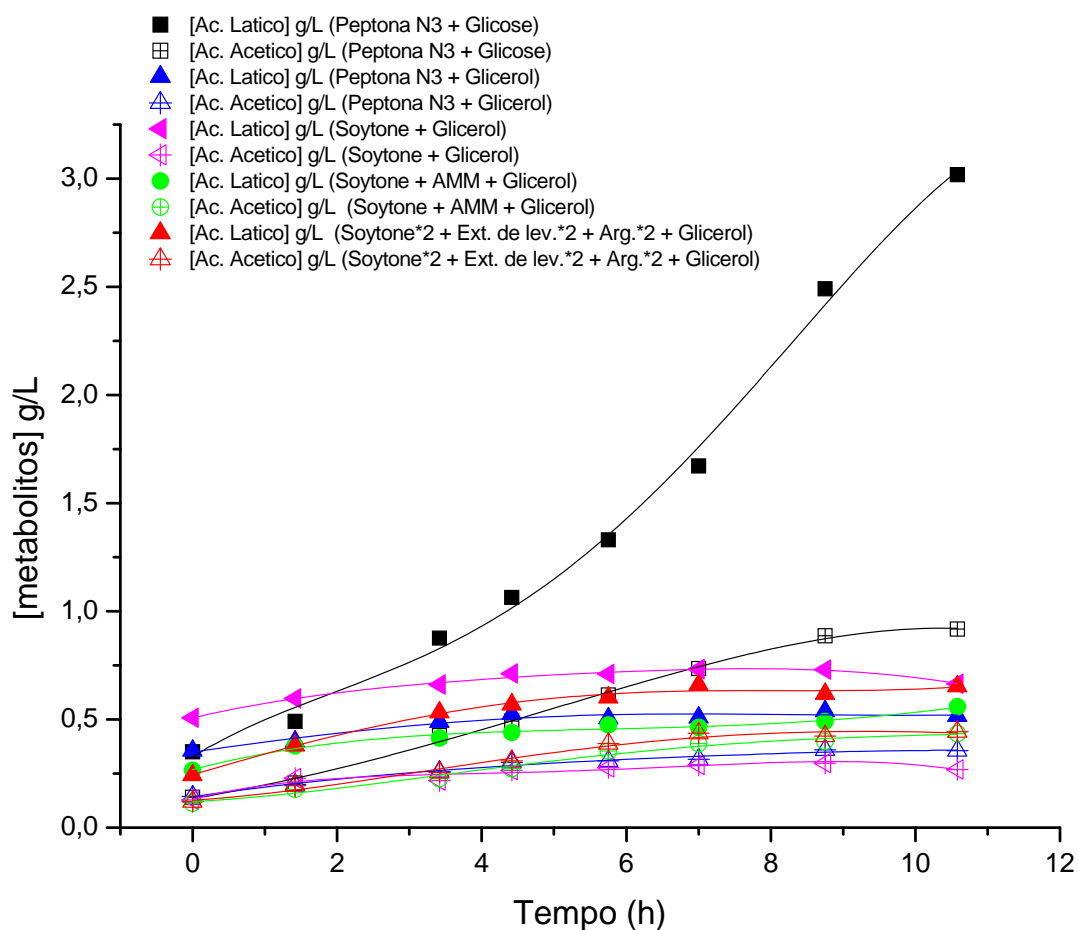


Figura 4.24 - Comparação do perfil de produção de metabólitos no conjunto de ensaios S7

As concentrações finais dos metabólitos para todos os ensaios, assim como as velocidades máximas específicas de crescimento, podem ser visualizadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Comparação entre os resultados dos cultivos de *E. rhusiopathiae* obtidos no Conjunto de Ensaio S7

	Peptona N3 + Glicose	Peptona N3 + Glicerol	Soytone + Glicerol	Soytone + AMM + Glicerol	Soytone*2 + Ext. de Levedura*2 + Arginina*2 + Glicerol
μ_{max} (h^{-1})	0,31±0,01	0,33±0,02	0,31±0,02	0,35±0,02	0,38±0,02
DO máx	4,1	1,5	1,3	1,3	1,5
[ác. láctico] _{final} (g/L)	3,0	0,52	0,66	0,56	0,65
[ác. acético] _{final} (g/L)	0,92	0,35	0,27	0,43	0,44

*obtido a partir da DO_{420nm}

O cultivo foi o com a menor velocidade de crescimento. A densidade óptica final obtida no cultivo com Peptona N3 e glicose como fonte de carbono foi a maior dentre os cinco ensaios realizados.

As velocidades de crescimento foram semelhantes para todos os cultivos, sendo a velocidade específica de crescimento para os cultivos em meios mais ricos em nutrientes apresentaram velocidades de crescimento levemente superiores. Na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese (Figura 4.25), verificou-se presença da banda de SpaA em todos os ensaios, com destaque nos meios contendo Peptona N3 e meio com quantidades maiores de soytone, extrato de levedura arginina.

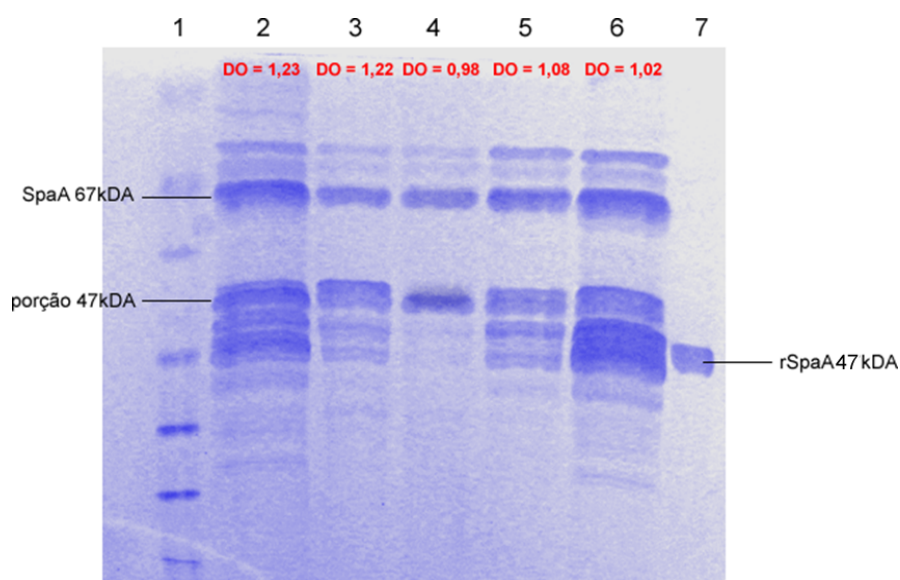


Figura 4.25 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina, nas 5 condições estudadas. **Padrão (1):** padrão de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen); **Amostras: 2:** Peptona N3 + Glicose (DO = 1,23), 20 µL, **3:** Peptona N3 + Glicerol (DO = 1,22), 20 µL, **4:** Soytone + Glicerol (DO = 0,98), 20 µL, **5:** Soytone + Água de Maceração de Milho + Glicerol (DO = 1,08), 20 µL, **6:** Soytone (x2) + Extrato de levedura (x2) + Arginina (x2) + Glicerol (DO = 1,02), 20 µL, **7:** rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 µL.

Utilizando o programa *ImageJ*, foi feita a quantificação das proteínas identificadas no gel de eletroforese em unidades arbitrárias de DO por μL de concentrado de proteína, para fins de comparação mais precisa da expressão de proteínas nos diferentes meios testados. Os resultados obtidos são visualizados na Figura 4.26.

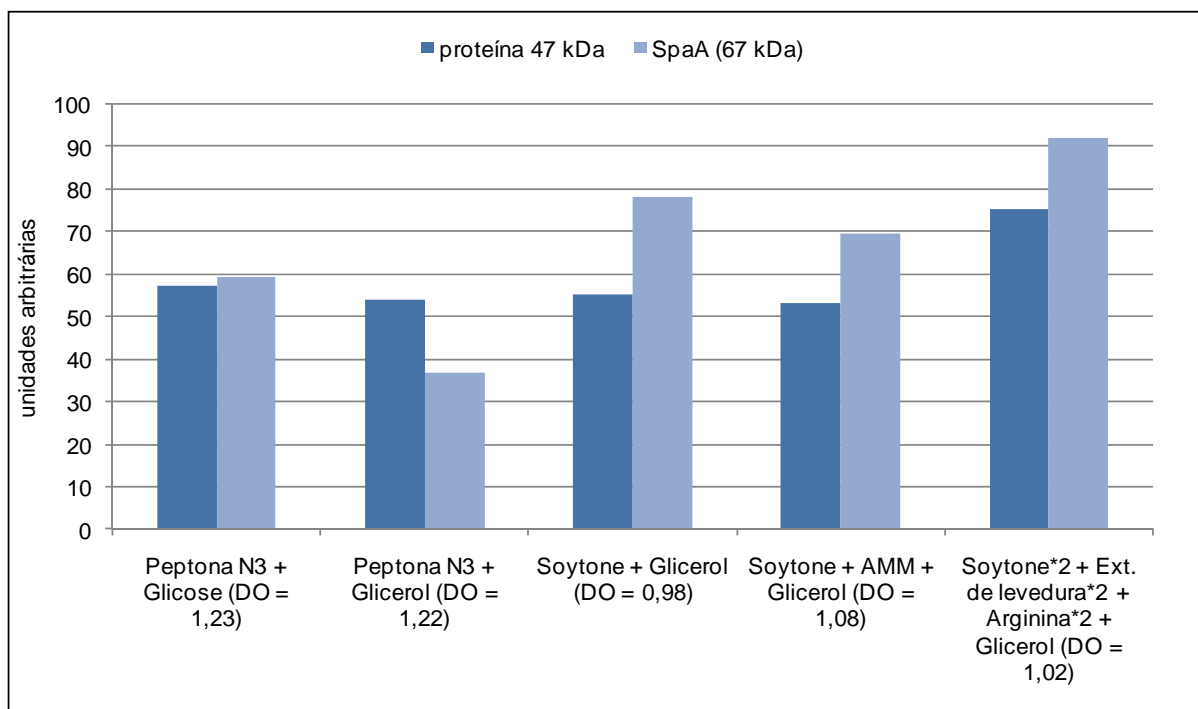


Figura 4.26 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o conjunto de ensaios S7

Observa-se na Figura 4.26 que a expressão de proteínas foi similar para todos os cultivos, com destaque para os cultivos contendo glicerol e Soytone. Nota-se ainda que o aumento da concentração de soytone (e de outros nutrientes) no meio favoreceu a produção da proteína de interesse.

Diferente do que se tinha pensando, a água de maceração de milho não influencia a expressão do antígeno pelo microorganismo, tendo sido irrelevante a suplementação do meio com a mesma.

Com certeza, o conjunto de experimentos S7 permitiu consolidar os estudos sobre a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no crescimento, formação de metabólitos e expressão de proteínas. A partir dos resultados obtidos conclui-se que o glicerol não foi assimilado nos cultivos em frascos agitados e que o Soytone é um nutriente de origem vegetal com grande potencial para substituir a peptona de origem animal. A partir dessas

constatações, foram definidas as condições a serem estudadas em cultivos em biorreator, cujos resultados são apresentados e discutidos a seguir.

4.3. Ensaio em biorreator

A partir dos resultados obtidos no item 4.2., foram propostos e executados 3 cultivos em batelada em biorreator de bancada (Ensaio B1, B2 e B3), que se diferenciaram pelo meio de cultivo empregado. O cultivo B1, o ensaio controle, foi realizado com o meio normalmente empregado, contendo glicose como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio. Para o cultivo B2 foi escolhido o meio contendo glicose como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio. E, finalmente, no cultivo B3, a fonte de carbono foi o glicerol e a de nitrogênio foi o soytone, sendo que o objetivo desse ensaio foi verificar o consumo de glicerol em condições melhor controladas de cultivo.

4.3.1. Ensaio B1 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O₂) utilizando glicose como fonte de carbono e peptona N2 como fonte de nitrogênio, sem controle de pH

Este experimento foi realizado com o intuito de servir como base para a comparação do comportamento de *E. rhusiopathiae* em novas formulações de meio de cultura investigadas nos ensaios B2 e B3.

Durante o cultivo ocorreram problemas com o sistema de controle de pH, não havendo assim um controle preciso do pH do meio de cultivo. A variação do pH interferiu com a solubilidade do CO₂ no meio e por isso os dados da fração molar de CO₂ no gás de saída também não puderam ser aproveitados.

A Figura 4.27 mostra a variação na concentração de células (DO_{420nm}), produção de ácido lático, ácido acético e consumo de glicose obtidos no ensaio em biorreator em meio com Peptona N2 como fonte de nitrogênio e glicose como fonte de carbono.

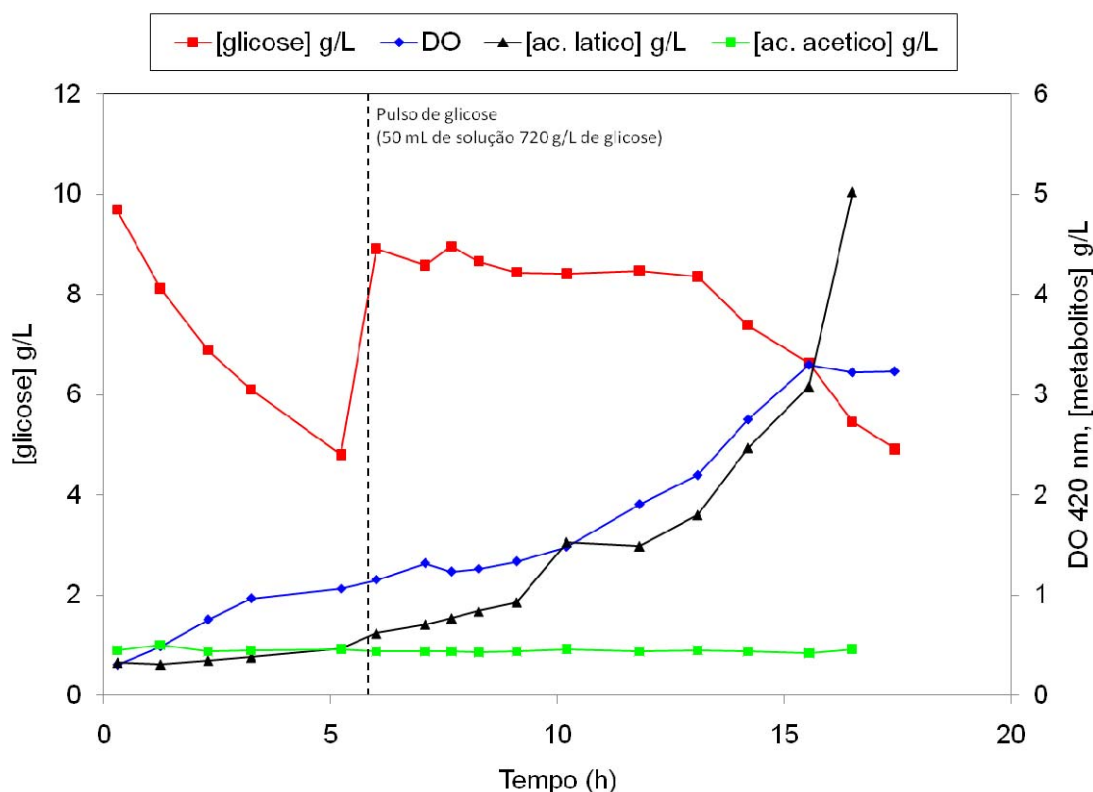


Figura 4.27 - Formação de células, consumo de glicose e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de O₂) em biorreator com meio Peptona N3 + Glicose, durante a batelada simples (Ensaio B1)

No início do cultivo, observa-se curta fase exponencial de crescimento seguida de fase estacionária, indicando que algo poderia estar comprometendo o crescimento do microrganismo. Na sexta hora de cultivo, foi feito um pulso de glicose em $t=6h$, pois se supôs que a diminuição do crescimento do microrganismo ocorria por falta de substrato. Logo foi visto que o crescimento do microrganismo estava sendo afetado por causa do aumento do pH do meio (problemas com o sistema de controle de pH).

Devido a todas essas perturbações, as células entraram em uma longa fase de lento crescimento, entre 6 e 13 horas de cultivo. Após a adoção de correções manuais periódicas do pH realizadas durante essa fase de crescimento quase-estagnado, o microrganismo voltou a crescer e a glicose foi consumida até aproximadamente 4 g/L, quando o crescimento da *E. rhusiopathiae* cessa, provavelmente por inibição por acúmulo de ácido láctico no meio, que atinge cerca de 5 g/L ao final do cultivo.

O valor de $\mu_{m\acute{a}x}$, determinado por regressão linear utilizando os dados de densidade ótica do início do cultivo (até $t = 5 h$) foi de $0,45 h^{-1}$. Na segunda fase de crescimento observado após 13 horas de cultivo, quando o pH do meio passou a ser corrigido

manualmente, o microrganismo voltou a crescer com $\mu_{\text{máx}}$ de $0,15 \text{ h}^{-1}$. Este valor é significativamente menor que o calculado no início do cultivo e é provavelmente consequência da inibição pelo ácido lático acumulado no meio de cultivo.

Na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese (Figura 4.28), verificou-se presença da banda de SpaA nas amostras que foram retiradas durante o cultivo.

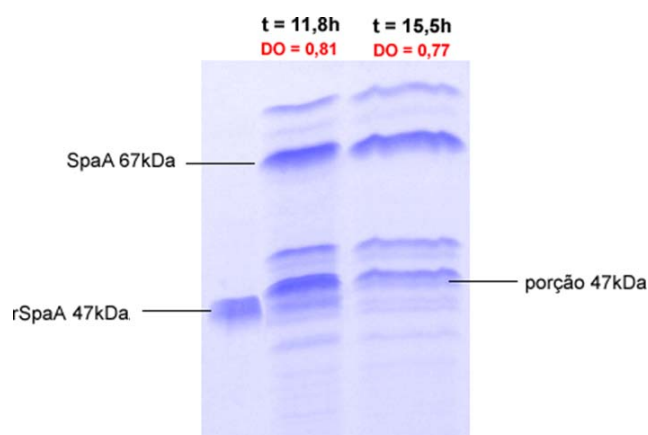


Figura 4.28 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, nos tempos 11,8 e 15,5 horas..

Padrão: rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 μL .

Utilizando o programa *ImageJ*, foi feita a quantificação das proteínas identificadas no gel de eletroforese em unidades arbitrárias de DO por μL de concentrado de proteína, para fins de comparação mais precisa da expressão de proteínas nos diferentes tempos. Os resultados obtidos são visualizados na Figura 4.29.

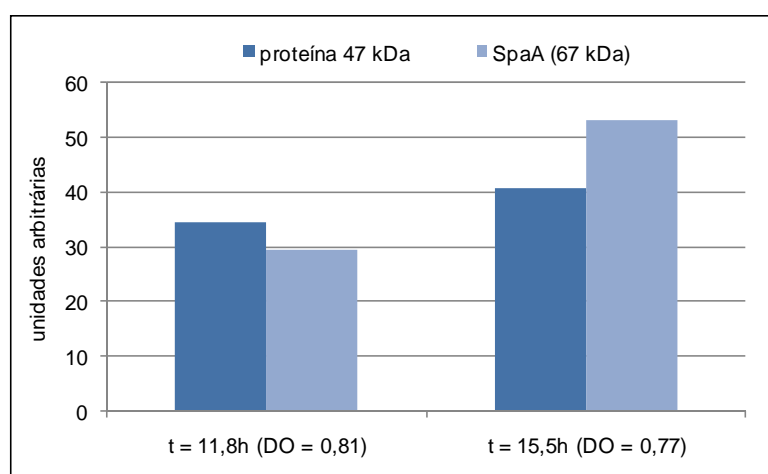


Figura 4.29 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o cultivo em biorreator B1

Observa-se na Figura 4.28 que a expressão de proteínas foi levemente menor no tempo 15,5 horas, provavelmente devido ao aumento de proteases e aumento da concentração de metabólitos do meio de cultivo.

4.3.2. Ensaio B2 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O₂) utilizando glicose como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH

A Figura 4.30 mostra a variação na densidade ótica e nas concentrações de glicose, de biomassa, e de metabólitos durante o ensaio.

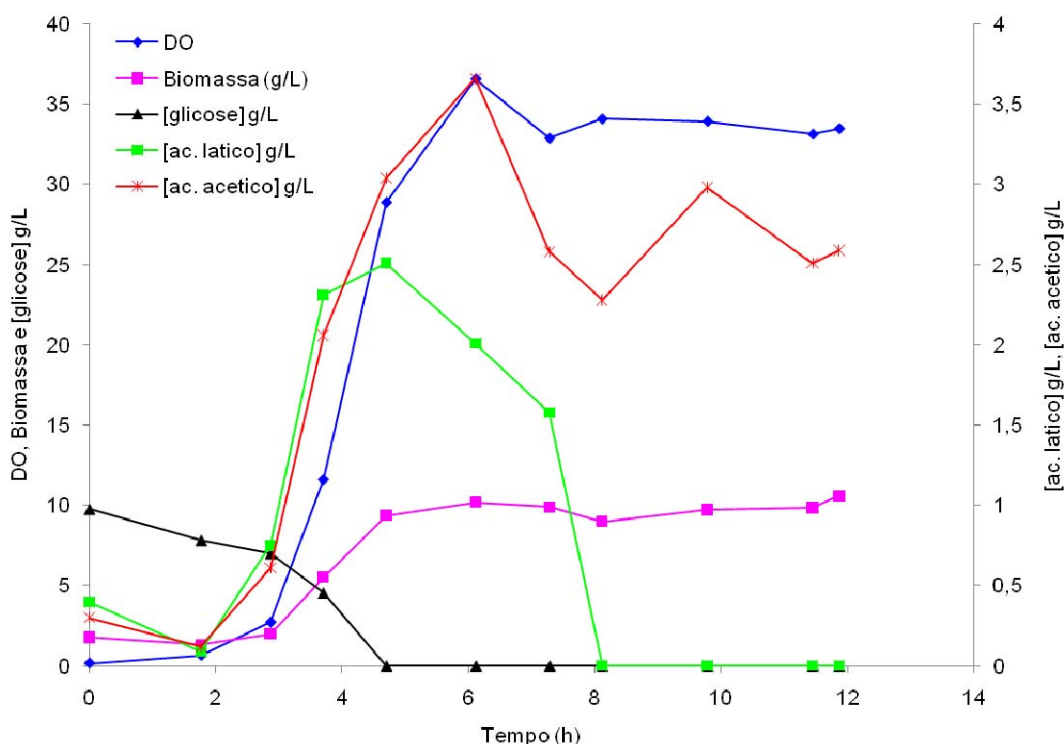


Figura 4.30 - Formação de células, consumo de glicose e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de concentração de O₂ dissolvido) em biorreator com meio Soytone + Glicose, durante batelada simples (Ensaio B2)

A Figura 4.30 mostra que as curvas de acompanhamento do crescimento celular (Biomassa e DO) apresentam a mesma tendência durante o crescimento exponencial e na fase estacionária. Observa-se também a presença de longa fase estacionária, maior que a observada durante os cultivos em batelada realizados por Silva (2007). O microrganismo entra

na fase estacionária quando toda a glicose é consumida após 4 horas de cultivo. A manutenção do crescimento ocorre provavelmente pela alta concentração de carboidratos no meio com Soytone, que o microorganismo assimila facilmente. Além disso, parte da energia para a manutenção da concentração celular na fase estacionária vem da re-assimilação dos ácidos lático e acético acumulados, a qual pode ser observada logo após a exaustão da glicose. Ao contrário do observado nos experimentos realizados por Silva (2007), o principal metabólito acumulado não foi ácido lático, mas sim o acético. Essa mudança no metabolismo pode estar relacionada com a nova fonte de carbono utilizada. A concentração celular atingiu 10,6 g/L ao final do cultivo, um resultado excelente para um cultivo em batelada.

Os valores obtidos para a formação de biomassa e consumo de glicose neste ensaio levaram ao cálculo de um fator de conversão de glicose em células de 0,95 g células/g glicose. Como nas primeiras três horas de cultivo não houve consumo de glicose, o cálculo de $Y_{X/S}$ foi realizado usando os valores de concentração de biomassa e de glicose no período compreendido entre a terceira e a sexta hora de cultivo, correspondente ao período em que houve consumo de glicose. O valor de $Y_{X/S}$ para esse cultivo é significativamente alto e reflete a formação de biomassa tanto pelo consumo de glicose como pelo consumo de carboidratos presentes no Soytone, uma fonte complexa rica em carboidratos que também estão sendo assimilados pelas células. Essa assimilação com certeza ocorre no início do cultivo, quando não foi observado consumo de glicose, mas houve crescimento. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ determinado por regressão linear utilizando dados de densidade ótica foi $1,14 \text{ h}^{-1}$. Chama novamente a atenção, o alto valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtido, reforçando a qualidade do Soytone como fonte de nitrogênio alternativa à peptona. Com a adição desse nutriente ao meio, o microorganismo não só cresceu mais rapidamente como também houve uma maior formação de biomassa devido à assimilação dos carboidratos presentes no mesmo. O valor de $\mu_{\text{máx}}$ para esse meio de cultivo no ensaio em biorreator, contendo Soytone e glicerol, foi muito maior do que o observado no ensaio em frascos agitados (Tabela 4.6), o que demonstra a importância da realização dos ensaios em condições de cultivo adequadamente controladas, como acontece em biorreatores, para a efetiva avaliação dos impactos de mudanças de meio de cultivo no crescimento.

Em termos de formação de metabólitos, o perfil está muito diferente do observado nos cultivos realizados por Silva (2007), utilizando o meio convencional. Nesses experimentos, para uma concentração celular semelhante (9,9 g/L) obtida no ensaio em batelada alimentada, foi relatada uma concentração de ácido lático acumulado de 12 g/L após 20 horas de cultivo. No presente trabalho, para uma concentração celular em torno de 10 g/L

(DO = 30, $t = 4,7$ h), observa-se o acúmulo de 3,2 g/L de ácido acético e 2,5 g/L de ácido lático. Portanto, a formação de metabólitos por quantidade de biomassa presente (Y_{PX}) foi mais alta no ensaio em batelada alimentada, em meio contendo peptona de carne. No entanto, a velocidade de formação de metabólitos foi maior no presente ensaio, acompanhando o crescimento mais rápido. Pode-se afirmar que a mudança no perfil de formação de metabólitos está relacionada à substituição do nutriente proteose peptona pelo Soytone. A diminuição na formação de metabólitos por massa de células explica a alta concentração celular rapidamente obtida. Provavelmente, os nutrientes presentes no Soytone favorecem o fluxo da glicose pela rota via glicolítica, ciclo de Krebs e cadeia respiratória, direcionando menos glicose pelas vias fermentativas. O fato do ácido lático e do ácido acético serem re-assimilados após a exaustão da glicose reforça a hipótese levantada. Esse fenômeno é freqüentemente observado em cultivos aeróbicos de *E. coli* (Rocha, 2003), porém não havia sido relatado para *E. rhusiopathiae* cultivado em meio convencional.

A Figura 4.31 mostra os valores da vazão molar de dióxido de carbono calculada a partir dos valores da fração molar de CO_2 medida pelo analisador de gases e da vazão de ar fornecido ao biorreator, de acordo com a equação 1, descrita no item 3.3.1. A partir da estimativa da área sob a curva representada na Figura 4.31 foi possível calcular do número total de moles de CO_2 produzido nesse ensaio, o qual alcançou 49,5 mmol em 7,5 horas de cultivo.

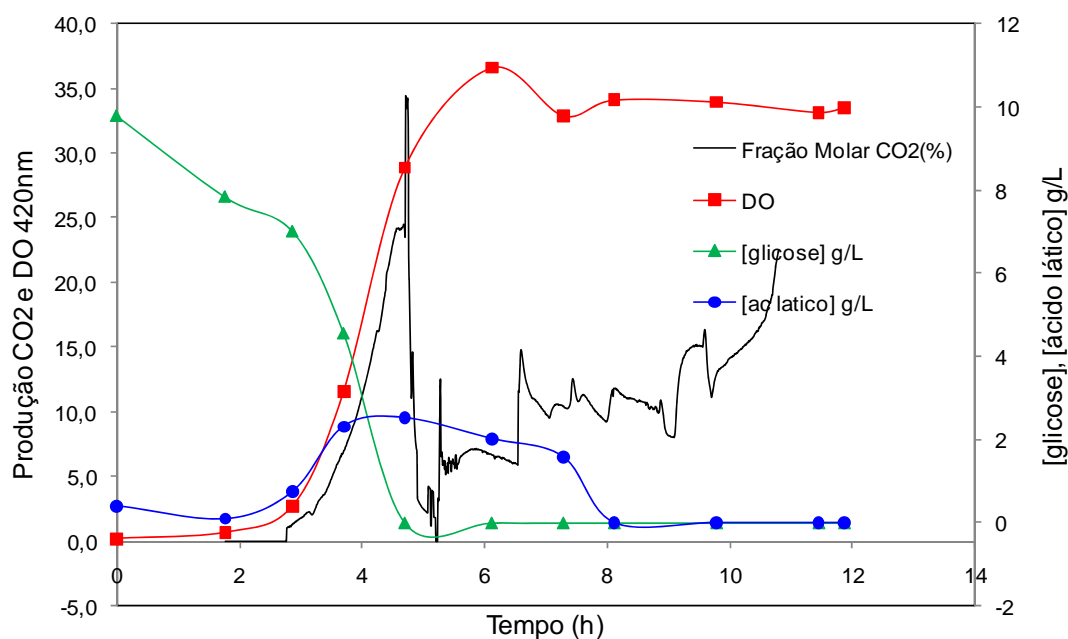


Figura 4.31 - Velocidade de produção de dióxido de carbono em termos da fração molar de CO_2 com o tempo de cultivo (mmol/h), consumo de glicose, produção de biomassa em termos de DO e produção de ácido lático no ensaio B2).

Infelizmente, devido à importante contribuição dos carboidratos presentes no Soytone para a formação de biomassa, não foi possível realizar o balanço de carbono para o cultivo. Observa-se que a formação de CO_2 acompanhou a produção de biomassa, tendo diminuído por volta de cinco horas de cultivo, quando entrou em fase estacionária, assim que a glicose foi totalmente consumida.

A Figura 4.32 mostra os valores de pH durante o cultivo, que manteve-se em torno de 8 durante todo o ensaio. Após 4 horas de cultivo, quando a glicose acaba, observa-se uma tendência de aumento de pH. Isso está provavelmente relacionado com a assimilação de proteínas presentes no meio, que leva à liberação de amônia e ao aumento do pH. O problema foi contornado por meio de adição manual de ácido, a partir da 6ª hora do cultivo. Essa adição manual de ácido, provocou oscilações nos valores de pH, que conseqüentemente levaram a oscilações na vazão molar de gás carbônico (Figura 4.31).

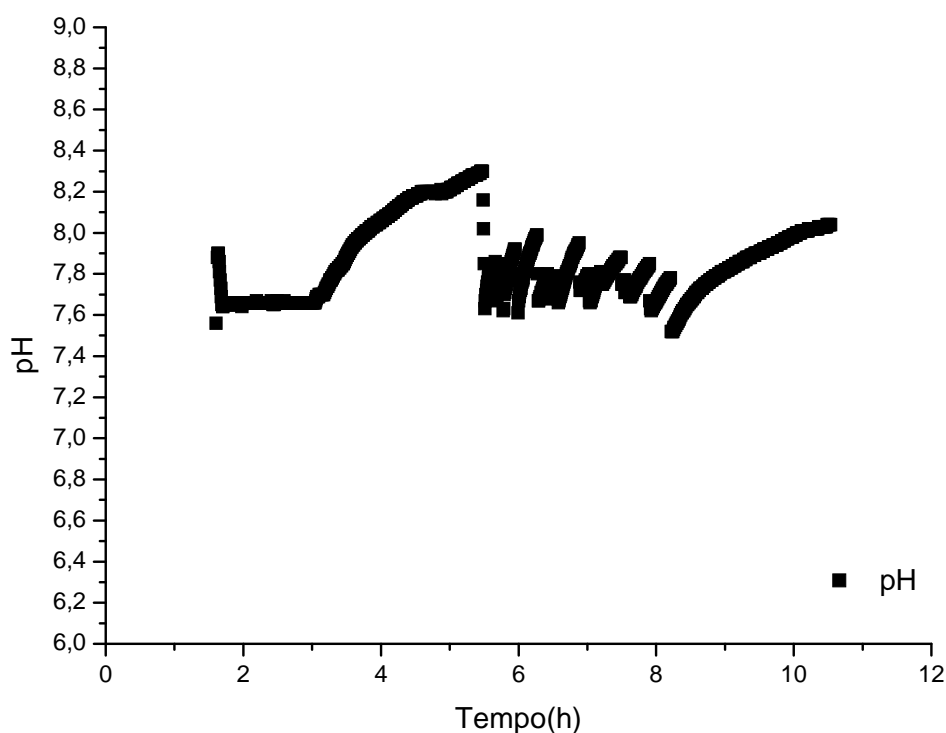


Figura 4.32 - Acompanhamento de pH com o tempo de cultivo (Ensaio B2).

Na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese (Figura 4.33), verificou-se presença da banda de SpaA nas amostras que foram retiradas durante o cultivo.

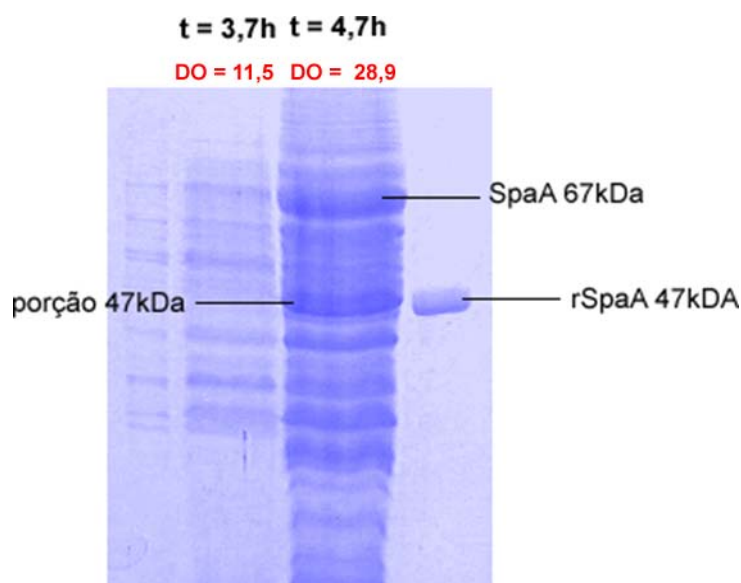


Figura 4.33 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, nos tempos 3,7 e 4,7 horas do ensaio B2. Padrão: rSpaA padrão (pura) 47 kDa, 5 μ L.

Utilizando o programa *ImageJ*, foi feita a quantificação das proteínas identificadas no gel de eletroforese em unidades arbitrárias de DO por μ L de concentrado de proteína, para fins de comparação mais precisa da expressão de proteínas nos diferentes tempos de cultivo. Os resultados obtidos são visualizados na Figura 4.34.

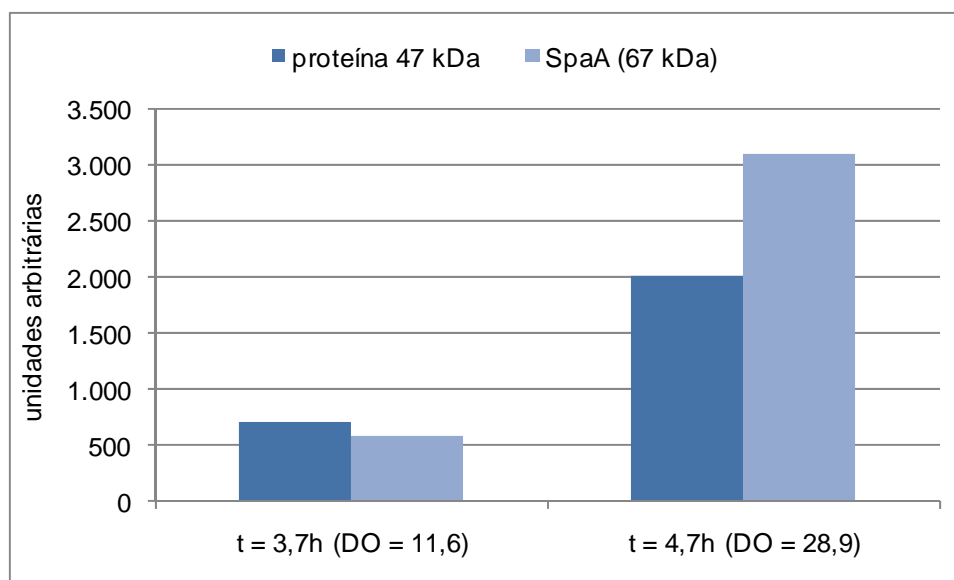


Figura 4.34 - Quantificação de proteínas em unidades arbitrárias no gel de eletroforese para o cultivo em biorreator B2

Observa-se na Figura 4.33 que a expressão de proteínas foi muito alta, atingindo um valor de 3000 unidades, mais de 20 vezes superior aos observados nos ensaios em *shaker* (Figura 4.17). O intenso crescimento celular que ocorreu neste ensaio é o principal motivo para o aumento da expressão da proteína. Nota-se ainda que a expressão de proteína aumentou do tempo 3,7 para 4,7 horas, acompanhando o crescimento celular.

4.3.3. Ensaio B3 - Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O₂) utilizando glicerol como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio e com controle de pH

A Figura 4.35 mostra a variação nas concentrações de glicerol, biomassa, densidade ótica (DO_{420nm}) e metabólitos durante o ensaio utilizando glicerol como fonte de carbono e soytone como fonte de nitrogênio

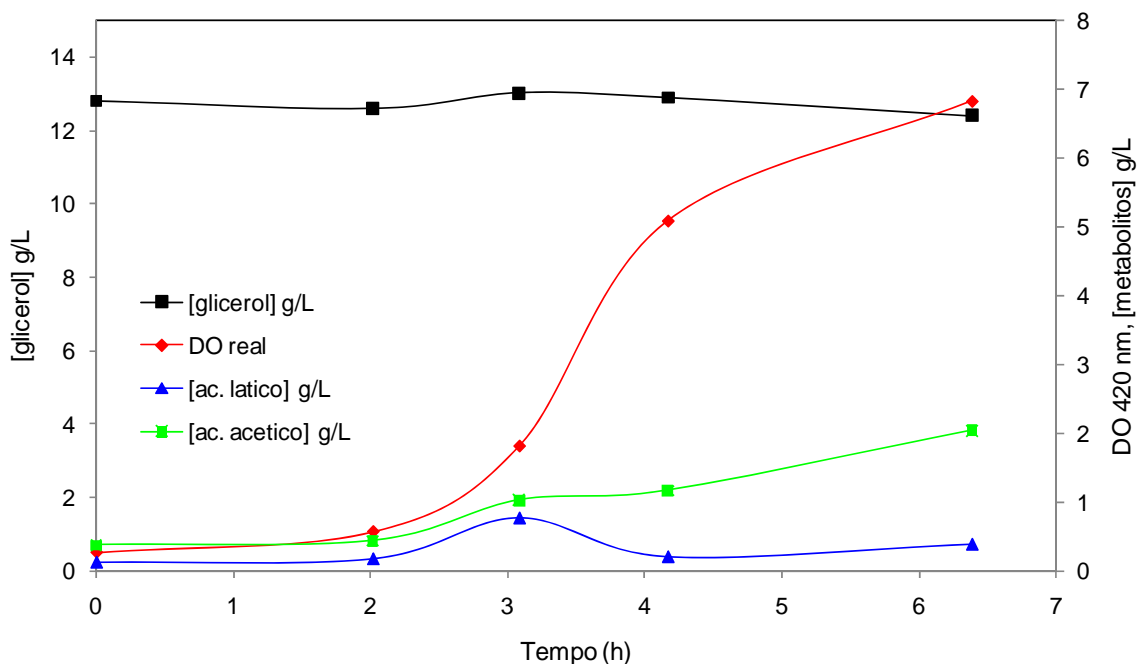


Figura 4.35 - Formação de células (DO), consumo de glicerol e produção de metabólitos no cultivo aeróbio (30% de concentração O₂ dissolvido) em biorreator com meio Soytone + Glicerol, durante a batelada simples (Ensaio B3)

A Figura 4.35 mostra que o glicerol não foi consumido no período de 6,5 horas de cultivo, mantendo sua concentração em torno de 13 g/L. Conforme já observado nos

ensaios em frascos agitados, o microrganismo cresceu mesmo sem consumo do substrato e esse crescimento foi provavelmente sustentado pela alta concentração de carboidratos presentes no Soytone.

No início do cultivo, observa-se curta fase exponencial de crescimento de 4 horas e a partir desse ponto o crescimento já tende para a fase estacionária, provavelmente devido ao esgotamento de fontes de carbono para manutenção do metabolismo do microrganismo, que não assimila o glicerol.

O valor de $\mu_{\text{máx}}$, determinado por regressão linear utilizando os dados de densidade ótica da fase exponencial do cultivo foi de $0,70 \text{ h}^{-1}$. Esse resultado mostra que mesmo na ausência de uma fonte de carbono que seja assimilada pela *E. rhusiopathiae*, os carboidratos presentes no Soytone são suficientes para sustentar uma alta velocidade de crescimento. Esse valor de $\mu_{\text{máx}}$ explica o valor tão alto encontrado de $\mu_{\text{máx}}$ obtido no ensaio em biorreator B2, com glicose e Soytone no meio de cultivo.

Na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese (Figura 4.36), verificou-se presença da banda de SpaA na amostra que foi retirada durante o cultivo no tempo 4,1 horas.

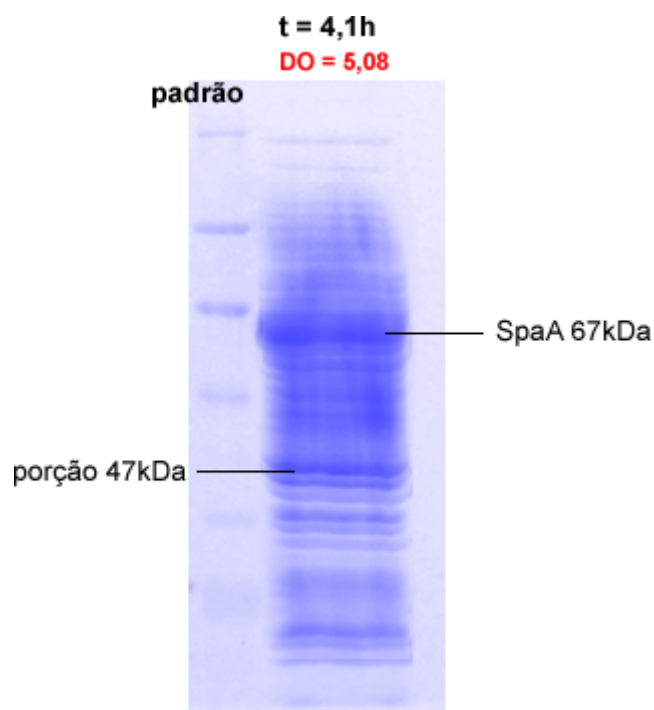


Figura 4.36 - Eletroforese das amostras de extração das células com colina 4%, no tempo 4,1 horas para o Ensaio B3. Padrão: padrão de massa molecular (BenchMark Protein Ladder – Invitrogen)

Não foi possível fazer a quantificação utilizando o programa *ImageJ* por causa da interferência das bandas próximas à banda de interesse.

4.4. Comparação e análise global dos resultados obtidos nos ensaios realizados em frascos agitados e em biorreator

Os resultados dos cultivos em biorreator indicaram que *E. rhusiopathiae* cresce e expressa o antígeno em meio contendo o nutriente soytone, de origem vegetal. Nos tópicos a seguir serão discutidos os aspectos econômicos dessa mudança assim como serão realizadas comparações mais quantitativas entre os cultivos aqui realizados e os realizados por Silva (2007) de modo a se chegar a uma definição quanto à viabilidade técnica da nova formulação de meio.

4.4.1. Viabilidade econômica da nova formulação para o meio de cultivo

Na Tabela 4.10 encontram-se os preços dos nutrientes utilizados nesses cultivos de acordo com os fornecedores, a fim de se comparar o impacto na redução do custo pela substituição da peptona N2 pelas alternativas avaliadas.

Tabela 4.10- Valor estimado do litro do meio de cultivo para o ensaio utilizando a peptona N2 como fonte de nitrogênio. Cotações obtidas em Novembro de 2009.

Componente	Quantidade	Unidade	Preço unitário (R\$)	Preço total (R\$)
Peptona N2 Difco	7,5	g	2.871,00 (500 g)	43,07
Extrato de levedura	7,5	g	154,90 (500 g)	2,32
Glicose	9	g	10,59 (500 g)	0,19
Arginina	0,75	g	29,00 (25 g)	0,87
Tween 80	0,75	mL	65,76 (1 L)	0,05
Na₃PO₄.12H₂O	76,02	g	18,35 (500 g)	2,79
Total				49,29

Na Figura 4.37 é mostrado o custo total por litro de meio de cultivo para os quatro substratos testados no ensaio S6, a fim de se comparar o impacto na redução do custo pela substituição da peptona N2 pelas alternativas avaliadas. A substituição da peptona pelo soytone levaria a uma redução do custo do meio de mais de 6 vezes. Portanto, do ponto de

vista econômico, a modificação é extremamente positiva, desde que a capacidade imunogênica da bacterina e sua concentração celular sejam preservadas.

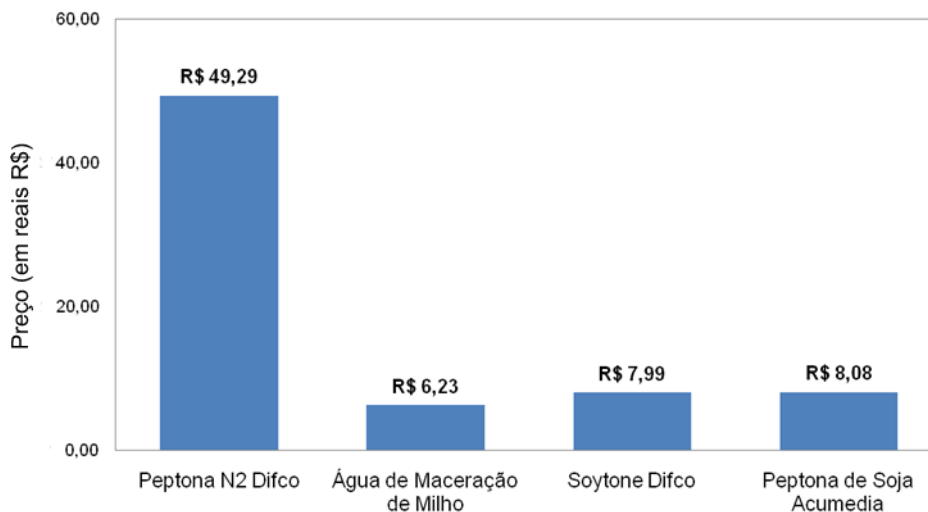


Figura 4.37- Comparação entre os custos estimados por litro de meio de cultivo para os diferentes substratos testados. Cotações obtidas em Novembro de 2009.

4.4.2. Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator

Na Tabela 4.11 encontram-se reunidos todos os resultados obtidos em biorreator. Observa-se que o cultivo em batelada simples, com Soytone e glicose produziu, indiscutivelmente, excelentes resultados quando comparado aos outros cultivos. A concentração celular final de 10,6 g/L, alcançada em 8 h de cultivo, foi a maior dentre todos os experimentos realizados em biorreator, sendo inclusive superior à concentração celular obtida após 20 h de cultivo em batelada alimentada realizado por Silva (2007). Destacam-se ainda os altos valores de velocidade específica de crescimento, de vazão molar de CO₂ produzido e do coeficiente de conversão de glicose em biomassa. .

É interessante observar que as maiores velocidades de crescimento ocorrem para os cultivos que utilizaram o Soytone como fonte de nitrogênio principal, mesmo quando o glicerol está presente como substrato. Nota-se ainda que a produção de CO₂ foi bastante significativa no ensaio B3. Nesse experimento, a concentração celular obtida após 6,5 horas de cultivo é cerca de 30 % superior à alcançada no cultivo em batelada de Silva (2007). Porém, a vazão molar de CO₂ é aproximadamente 80 % maior. Desta forma, a análise comparativa da produção de CO₂ em dois meios de cultivo diferentes, reforça novamente a

hipótese de um funcionamento mais eficiente da cadeia respiratória na presença de Soytone, necessário para produzir mais ATP e sustentar o crescimento mais acentuado.

Tabela 4.11 - Resultados obtidos nos ensaios em biorreator

	Ensaio B2	Ensaio B3	Silva (2007)	Silva (2007)
μ_{\max} (h^{-1})*	1,14	0,7	0,51	0,5
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,95	ND	0,23	0,25
DO _{420nm} máxima	33,5	6,82	3,8	18
Cx (gMS/L)	10,6	2,3	1,8	9,9
nCO ₂ (mmoles)	49,5	38,2	21,7	135,5
[Ác. Láctico] _{final} (g/L)	0**	0,4	3,11	12,5
[Ác. Acético] _{final} (g/L)	2,59	2,04	0,7	3
Tempo de cultivo (h)	7,5	6,5	7,5	20
Fonte de Carbono	Glicose	Glicerol	Glicose	Glicose
Fonte de Nitrogênio	Soytone	Soytone	Peptona	Peptona
Volume biorreator (L)	3,5	4	3	4,22
Modo de operação	Batelada	Batelada	Batelada	Batelada Alimentada

ND – valor não determinado

*calculado a partir dos dados de Densidade Ótica

** é consumido durante a fase estacionária

Na Tabela 4.12 estão listados os resultados das quantificações de produção da proteína SpaA nos ensaios em frascos agitados com diferentes composições de meio assim como para os ensaios em biorreator.

Tabela 4.12 - Quantificação da produção de proteínas para todos os ensaios realizados nesse trabalho

Ensaio	Meio	Total de proteína produzida	Cx (g/L)	Produção de Proteína / Cx (g/L)
Frascos agitados	Glicose + Peptona	116	1,2*	94
	Glicose + Soytone	254	1,3*	196
	Glicerol + Soytone	133	1,0*	133
Biorreator	Glicose + Soytone	3087	10,6	291
	Glicose + Peptona (Silva, 2007)	430	9,9	43
	Glicerol + Soytone	ND	2,3	ND

ND – valor não determinado

* calculados a partir dos valores de densidades óticas no momento da extração do antígeno

Os resultados das quantificações das proteínas nos géis de eletroforese mostraram que o soytone favoreceu a expressão do antígeno nesses cultivos, tanto em

biorreator como em frascos agitados. Em termos de produção específica (última coluna da Tabela 4.11), os valores obtidos com Soytone oscilam entre 133 e 196, enquanto que os obtidos com proteose peptona oscilam entre 24 e 94. No entanto, é importante ressaltar que o baixo valor estimado para o cultivo em biorreator de Silva (2007) pode estar relacionado à qualidade inferior da imagem empregada. A maior expressão de proteína nos cultivos com Soytone pode ser explicada tanto pelo maior crescimento obtido na presença desse nutriente assim como por uma possível utilização mais eficiente das vias respiratórias, já que, de acordo com Silva *et al.* (2008), as bacterinas produzidas em condição aeróbica se mostraram mais eficientes na imunização nos testes de imunização em camundongos do que as produzidas em condições anaeróbicas ou microaerófilas.

5. CONCLUSÕES

Pode-se afirmar que os objetivos propostos inicialmente foram plenamente atingidos.

- a) As modificações introduzidas na obtenção da suspensão de células para posterior preparo dos criotubos assim como na etapa de ativação dos mesmos apresentaram resultados bastante satisfatórios, melhorando a reprodutibilidade no preparo do inóculo e reduzindo o tempo médio de ativação de 20 para aproximadamente 8 horas.
- b) A aplicação da metodologia de quantificação das bandas obtidas por eletroforese através de um processador de imagens mostrou-se eficaz para quantificação da produção de antígeno e permitiu estabelecer comparações mais objetivas entre as diferentes condições estudadas.
- c) No que se refere aos resultados obtidos até o momento em termos de composição do meio de cultivo, pode-se concluir que o Soytone mostrou-se uma fonte de nitrogênio altamente promissora no cultivo desse microrganismo, pois além de contribuir para o aumento na velocidade específica de crescimento do microrganismo e na formação de biomassa, levou a uma maior produção de antígeno, em comparação com os cultivos realizados com a formulação de meio convencional, contendo proteose peptona.
- d) Além dos fatores mencionados acima, a utilização de Soytone contribuiria ainda para diminuir o custo de preparação do meio e favoreceria a adequação do bioprocessamento às recomendações da FDA e ANVISA quanto à preferência por nutrientes de origem vegetal na formulação de meios de cultivo empregados na produção de produtos farmacêuticos e veterinários.
- e) Os estudos referentes às novas fontes de carbono mostraram que o glicerol não é assimilado pelo microrganismo, que cresce às custas dos carboidratos provenientes dos substratos complexos presentes no meio de cultivo.
- f) Os resultados dos cultivos em biorreator mostraram que a nova formulação para o meio de cultivo, isenta de componentes de origem animal, desenvolvida durante os ensaios, garantiram a obtenção de concentrações celulares superiores a 10 g/L, em cultivo em batelada simples.

- g) A perspectiva de mudança da fonte de nitrogênio depende ainda, no entanto, dos resultados de testes de imunização *in vivo*, utilizando uma bacterina preparada a partir da nova formulação de meio.

Estudos adicionais seriam importantes para elucidar as seguintes questões:

- A atual formulação de meio de cultivo foi elaborada tendo como base a proteose peptona como principal fonte de nitrogênio. Assim, a otimização da composição de um novo meio de cultivo, tendo a peptona de soja como fonte de nitrogênio principal, envolve a realização de estudos adicionais pela metodologia de planejamento experimental, que contemple diferentes combinações de soytone, glicose e demais componentes do meio, e que estava fora dos objetivos do presente trabalho.

- Estudo do crescimento de *E. rhusiopathiae* utilizando a galactose como fonte de carbono. Os resultados de quantificação de proteína nos géis de eletroforese mostraram que esse substrato pode contribuir a expressão do antígeno pelo microrganismo.

- Realização de cultivo em batelada alimentada em meio contendo Soytone. O modo de operação em batelada alimentada em condição aeróbia mostrou como um recurso viável para a obtenção de quantidades ainda maiores de biomassa nos cultivos realizados por Silva (2007), e com essa nova composição de meio, pode contribuir para um aumento de produtividade no processo de produção desta vacina a custos bem menores.

- Realização de dois cultivos em biorreator, em batelada, sendo um com o meio convencional e outro com a nova formulação contendo Soytone para posterior utilização na preparação de bacterinas. Essas bacterinas seriam utilizadas em testes de imunização de cobaias, fornecendo assim uma informação essencial para a escolha do melhor meio de cultivo visando à produção de vacina contra *E. rhusiopathiae*.

- Devido aos bons resultados obtidos nos cultivos realizados, a etapa de ativação desse microrganismo pode ser feita a partir de agora utilizando o Soytone como fonte de nitrogênio.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LITCHMAN, A.H.; PROBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**, 2ª edição. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. New York, McGraw-Hill, 1986.
- BD BIONUTRIENTS technical manual. Estados Unidos: Interlab, 2007. 66p.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E. **Biotecnología Industrial: Fundamentos**. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, 2001. vol. 1. 251p.
- BUCHTA, K. Lactic acid. A comprehensive treatise, vol 3. **Biomass, microorganisms for special applications**. Microbial products, Part I: Energy for renewable resources, Verlag Chemie, Weinheim, p. 410-417, 1983.
- CHANG, H. N., YOO, I., KIM, B. S. High density cell culture by membrane-based cell recycle. **Biotech. Adv.**, v.12, p. 467-487, 1994.
- CHEN, F., JOHNS, M. R. High cell density culture of *C. reinhardtii* on acetate using fed-batch and HFCR systems, **Bioresource Technology**, v. 55, p. 103-110, 1996.
- CHEUN, H. I., KAWAMOTO, K., HIRAMATSU, M., TAMAOKI, H., SHIRAHATA, T., IGIMI, S., MAKINO, S.-I. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.1347-1353, 2004.
- DEEM, A. W.; WILLIAMS, C. L. The Fermentation Reactions of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **J Bacteriol.**, v. 32, n. 3, p. 303-306, 1936.

- DEVI, A. S.; OGAWA, Y.; SHIMOJI, Y.; PONNURAJ, K. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the collagen-binding region of RspB from *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. F66, 156-159, 2010.
- DURNIN, G.; CLOMBURG, J.; YEATES, Z.; ALVAREZ, P. J. J.; ZYGOURAKIS, K.; CAMPBELL, P.; GONZALEZ, R. Understanding and Harnessing the Microaerobic Metabolism of Glycerol in *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, 2009.
- FANG, A.; GERSON, D. F.; DEMAIN, A. L. Menstrum for culture preservation and medium for seed preparation in a tetanus toxin production process containing no animal or dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 360-363, 2006.
- FEIST, H., FLOSSMAN, K. D., ERLER, W. Einige untersuchungen zum nährstoffbedarf der rotlauf bakterien. **Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin**, v.30, p.49-57, 1976.
- FUHRER, T.; FISCHER, E.; SAUER, U. Experimental Identification and Quantification of Glucose Metabolism in Seven Bacterial Species. **Journal of Bacteriology**, v. 187 (5), p. 1581-1590, 2005.
- GRAY, V. L.; MULLER, C. T.; WATKINS, I. D.; LLOYD, D. Peptones from diverse sources: pivotal determinants of bacterial growth dynamics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 554–565, 2008.
- GROSCUP, M. H., TIMONEY, J. F. Modified Feist broth as a serum-free alternative for enhanced production of protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.2573-2575, 1990.
- HAN, L.; ENFORS, O. S.; HAGGSTROM, L. Changes in intracellular metabolite pools, and acetate formation in *Escherichia coli* are associated with a cell-density-dependent metabolic Switch. **Biotechnology Letters**, v. 24, p. 483–488, 2002.

- HICKEY, M. W.; HILLER, A. J.; JAGO, G. R. Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative lactobacilli. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 52, p. 825-831, 1986.
- HOFVENDAHL, K., HAHN-HÄGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources, **Enzyme Microb. Technol.**, v.26, p.87-107, 2000.
- HORTA, A. C. L. Técnicas Computacionais Inteligentes para a Inferência de Estado e a Otimização de Cultivos de *Streptococcus pneumoniae*. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- IMADA, Y., GOJI, N., ISHIKAWA, H., KISHIMA, M., SEKIZAKI, T. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. **Infection and Immunity**, v.67, p.4376-4382, 1999.
- KLUDAS, K. H.; MEESE, M. The significance of various supplements in nutrient media for the appearance of immunizing antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Folia Microbiol.** v. 13, p. 515-517, 1967.
- LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn Steep Liquor in Microbiology. **Bacteriol Rev.** v. 12 (4), p. 297-311, 1948.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Traduzido por Lodi, W.R.; Simões, A.A. São Paulo: Ed. Savier, 1990.
- LEVENSPIEL O. **Engenharia das reações químicas**. Brasil, Editora Edgar Blucher, 1974.
- LIGGETT, R. W.; KOFFLER, H. Corn Steep Liquor in Microbiology. **Bacteriol Rev.**, v. 12, p. 297-311, 1948.

- LIU, M.A. Overview of DNA vaccines. **Annals New York Academy of Science**, 772, p.15-20, 1995.
- LORENZO, V.; HERRERO, M.; JAKUBZIK, U.; TIMMIS, K. N. Mini-TnS Transposon Derivatives for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 172(11), p. 6568-6572, 1990.
- MAKINO, S. I.; YAMAMOTO, K.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T. Surface antigen SpaA of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. **FEMS Microbiology Letters**, v.186, p.313-317, 2000.
- MARZOCCO, A.; TORRES, B. B.; **Bioquímica Básica**, 2ªed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
- MC BRIEN, D.C.H.; MOSES, V. Compartmentation of the metabolism of lactose, galactose e glucose in *E. coli*. **J. Gen. Microbiol.** v. 51, p. 159-172, 1968.
- NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Optimization of a culture medium for protease production by *Bacillus* sp. Thermophilic. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27 (2), p.21-27, 2007.
- NEUMANN, E. J.; GRINBERG, A.; BONISTALLI, K. N.; MACK, H. J.; LEHRBACH, P. R.; GIBSON, N. Safety of a live attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine for swine. **Veterinary Microbiology**, v. 135, p. 297–303, 2009.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. Nova Iorque, E.U.A., Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003.
- PESCADOR, C. A.; OLIVEIRA, E. C.; GOMES, M. J. P.; BANDARRA, P. M.; LEAL, J. S.; PEDROSO, P. M. O.; CORBELLINI, L. G.; DRIEMEIER, D. Skin lesions caused by *Erysipelothrix rhusiopathiae* in an aborted swine-fetus. **Cienc. Rural**, v. 37, n. 5, 2007.

- ROBERTSON, D. C.; McCULLOUGH, M. G. Glucose Catabolism of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 95, n. 6, p. 2112-2116, 1968.
- ROCHA, I. C. A. P. **Model based strategies for computer-aided operation of recombinant E. coli fermentation**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Escola de Engenharia Universidade do Minho, Portugal, 2003.
- SHIMOJI, Y., MORI, Y., FISCHETTI, V.A. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, v.67, p.1646-1651, 1999.
- SHIMOJI, Y. Review: Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. **Microbes and Infection**, v.2, p.965-972, 2000.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Prentice Hall, EUA, 2006.
- SILVA, A. J. **Otimização das condições de cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para produção de vacina contra erisipela suína**. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.
- SILVA, A. J.; BAPTISTA-NETO, A.; CILENTO, M. C., GIORDANO; R. C, ZANGIROLAMI, T. C. Bioreactor aeration conditions modulate growth and antigen expression during *E. rhusiopathiae* cultivation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, p. 23-31, 2008.
- SOUZA, V. R. S. **Requerimentos Nutricionais para a Produção de Penicilina G Acilase por *B. megaterium***. 2003. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

- STERN, A. M.; MARKEL, H. The history of vaccines and immunization: familiar patterns, new challenges. **Health Aff** , v. 24, n. 3, p. 611–21, 2005.
- STRANDBERG, L.; ENFORS, S. O. Batch and fed batch cultivations for the temperature induced production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v.13, p. 609-614, 1991.
- WANG, Q.; CHANG, B. J.; RILEY, T. V. Review: *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Veterinary Microbiology**, v. 140, p. 405-417, 2010.
- WHITE, T.G., SHUMAN, R.D., Fermentation reactions of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Bacteriology**, v.82, p.595-599, 1961.
- WOOD, R. L.; HARRINGTON Jr, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swines pens in the United States. **American Journal of Veterinary Research**, v.39, p.1833-1840, 1978.
- WOOD, R. L. Erysipelas. In a A. D. Leman et al. (ed.), Disease of swine. Iowa State University Press, USA. p.475-486, 1992.
- XU, B.; JAHIC, M.; ENFORS, S. O. Modelling of overflow metabolism in batch and fed-batch cultures of *Escherichia coli*. **Biotechnol. Progress**, v. 15, p. 81-90, 1999.
- ZARKASIE, K., SAWADA, T., YOSHIDA, T., TAKAHASHI, I., TAKAHASHI, T. Growth ability and immunological properties of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.58, n. 1, p.87-90, 1996.