



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

MAURICIO POSSEDENTE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE INDUÇÃO E DE FONTES DE
NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE
Streptococcus pneumoniae EM *Escherichia coli* RECOMBINANTE**

SÃO CARLOS - SP

2012



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

MAURICIO POSSEDENTE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA TEMPERATURA DE INDUÇÃO E DE FONTES DE
NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE PROTEÍNA DE SUPERFÍCIE DE
Streptococcus pneumoniae EM *Escherichia coli* RECOMBINANTE**

**Dissertação apresentada como exigência parcial para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Química
ao Centro de Ciências Exatas e Tecnologia,
Departamento de Pós-Graduação de Engenharia
Química da Universidade Federal de São Carlos, sob
orientação da Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Zangirolami
(DEQ-UFSCar) e Co-Orientação da Dr^a. Viviane
Maimoni Gonçalves (Instituto Butantan).**

SÃO CARLOS – SP

2012

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

S237at

Santos, Mauricio Possedente dos.

Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante / Mauricio Possedente dos Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

106 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.


1. Engenharia química. 2. Cultivo em batelada. 3. Meio complexo. 4. Meio de autoindução. 5. *Escherichia coli* recombinante. 6. Produção de PspA. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
MAURICIO POSSELENTE DOS SANTOS APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO CARLOS, EM 27 DE AGOSTO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar


Viviane Maimoni Gonçalves
Co-orientadora, Instituto Butantan


Álvaro de Baptista Neto
VERDARTIS


Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar


Alberto Colli Badino Júnior
UFSCar

*Dedico este trabalho aos meus pais
Armando e Christina, às minhas irmãs
Patrícia (in memoriam) e Simone.*

*Ninguém cresce sozinho, sempre é
preciso um olhar de apoio, uma palavra
de incentivo, um gesto de compreensão,
uma atitude de amor. A vocês, que
estão ao meu lado sempre.*

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar.

Aos meus pais Armando e Christina, à minha irmã Simone, por todo apoio e ajuda que vocês me deram.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Teresa Cristina Zangirolami e Co-orientadora Prof^ª. Dr^ª Viviane Maimoni Gonçalves, pelas muitas e muitas horas de dedicação, pelos momentos de reflexão e discussões sobre este trabalho.

Aos colegas de laboratório, Gabriel, Gilson, Paula, Ana Maria, Ana Isabel, KK, Adilson, Claudinha, Cíntia e todos que me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao técnico Amadeus por realizar todas as amostras de HPLC e por estar sempre disposto a me ajudar.

Ao grupo de pesquisa do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan por me dar todo suporte necessário para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto pelas sugestões valiosas.

Ao Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior pelas contribuições para este trabalho e por sempre ser atencioso e paciente nas explicações da disciplina de Fundamentos de Processos Químicos.

Ao Prof. Dr. Antonio José Gonçalves da Cruz que ao ministrar a disciplina de Fundamentos de Processos Químicos sempre esteve disposto a me ajudar, esclarecendo as dúvidas pacientemente.

À Paula Caldas, Aline Rosanova, May, Lina, Ilton Baraldi, Gabriel Torresam e Diogo Santos pelo apoio, esclarecendo minhas duvidas nas disciplinas, que foram muitas. Sem ajuda de vocês não conseguiria ir tão bem.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: CAPES e FAPESP.

RESUMO

Doenças causadas por *Streptococcus pneumoniae* constituem um dos principais problemas de saúde pública mundial. A proteína A de superfície de pneumococo (PspA) é candidata em potencial a ser carreadora em vacina conjugada contra essa bactéria. Considerando as altas perdas inerentes às etapas de purificação e conjugação da proteína, é fundamental adotar uma estratégia de cultivo e expressão que permita obter grandes quantidades de proteína. Nesse sentido, o emprego da bactéria *Escherichia coli* como sistema de expressão e o cultivo da mesma em meio complexo se apresentam como alternativas promissoras para redução do custo e aumento da produtividade do processo. O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência da temperatura e da composição do meio de cultivo sobre a produção do fragmento da proteína PspA do clado 4 (PspA4Pro) em cultivos de *rE. coli*, visando avaliar a viabilidade de utilização de fontes de nitrogênio de origem vegetal (hidrolisados protéicos de soja) em substituição à Triptona, de origem animal. Os experimentos foram realizados em câmara incubadora e em biorreatores de bancada, utilizando meio complexo contendo glicose e glicerol e lactose como fontes de carbono, lactose como indutor e Soytone, Phytone ou Triptona como fontes de nitrogênio, além de extrato de levedura. Amostras foram coletadas ao longo dos experimentos para acompanhamento do crescimento celular (medida de absorbância, massa seca e permissividade por sensor de biomassa), do consumo das fontes de carbono e da produção de ácidos orgânicos por análises em cromatografia líquida de alto desempenho. A estabilidade do plasmídeo (plaqueamento em meio contendo ou não canamicina) e a produção de proteína recombinante (Bradford e eletroforese SDS-PAGE seguida por densitometria) também foram avaliadas. Experimentos preliminares foram realizados em frascos agitados e incubados a 300rpm e 37°C, empregando tanto o meio complexo como o definido. A maior produtividade foi obtida em meio complexo, a qual foi 42% superior a alcançada com meio definido. Em seguida, nove experimentos complementares foram conduzidos em frascos agitados em meio complexo sob agitação de 300rpm e à temperatura de 37°C (fase de crescimento) e de 25, 31 ou 37°C (fase de indução). Verificou-se que a temperatura de 25°C proporcionou a maior produção específica de PspA4Pro solúvel, alcançando-se, respectivamente, 209±6, 192±5mg/g massa seca para o Phytone e para a Triptona, com absorbâncias finais (após 12h de indução) de 9,0±0,4 e 8,5±0,4. Já para o Soytone, a melhor produção de proteína (124±4mg/g massa seca) foi observada à temperatura de 31°C, obtendo-se uma absorbância de final de 8,0±0,4. A partir dos resultados obtidos nos ensaios preliminares, a fonte de nitrogênio de origem vegetal Phytone foi selecionada para experimentos em biorreator. Quatro cultivos em batelada foram conduzidos em biorreator de bancada (5L), contendo meio complexo de autoindução modificado (10g/L glicose, 60g/L glicerol e 20g/L lactose), sendo 3 com Phytone e um com Triptona, para comparação. Os melhores resultados em termos de produção de proteína (245±7mg de PspA4Pro solúvel/g massa seca) foram obtidos na presença de Phytone, correspondendo a um aumento de 16% em relação ao valor máximo alcançado no cultivo com Triptona. Esses resultados comprovam o potencial dos nutrientes de origem vegetal como alternativa às fontes de nitrogênio de origem animal em meios complexos, contribuindo para adequar as formulações desses meios às atuais diretrizes de boas práticas de fabricação.

Palavras-chave: Cultivo em batelada, meio complexo, meio de autoindução, *E. coli* recombinante, produção de PspA, hidrolisados protéicos de soja e peptonas de origem vegetal.

ABSTRACT

Diseases caused by *Streptococcus pneumoniae* are one of the main problems of public health in the world. The pneumococcal surface protein A (PspA) is a potential candidate as carrier in a conjugate vaccine against this bacteria. Considering the inherent high losses of the purification and conjugation steps, it is fundamental to adopt a strategy of cultivation and expression that allows the obtainance of large quantities of protein. Thus, the use of *Escherichia coli* as expression system as well as its cultivation in complex medium constitutes promising alternatives for reducing the cost and increasing the productivity of the process. The goal of this work was to study the influence of the temperature and cultivation medium composition over the production of a PspA belonging to clade 4 protein fragment (PspA4Pro) during *rE coli* cultivations, aiming at to evaluate the possibility of employing vegetable-based nitrogen sources (soybean protein hydrolysates) instead of the Triptona, an animal-derived nitrogen source. The experiments were carried out in both shakers and bench-scale bioreactor, using a complex medium which contained glucose and glycerol as carbon sources, lactose as inducer and Soytone, Phytone or Triptone as nitrogen sources, besides yeast extract. Samples were collected during the experiments to follow the cell growth (measurements of absorbance, dry cell weight and permittivity signal from biomass sensors), the carbon sources consumption and the production of organic acids by HPLC analysis. The stability of the plasmid (agar plates with or without kanamycin) and the production of recombinant protein (Bradford and SDS-PAGE electrophoresis followed by densitometry) were also evaluated. Preliminary experiments were performed in shake flasks, incubated at 300rpm and 37°C, employing both complex and defined media. The highest productivity was achieved in complex medium, with a 42% superior protein production. Subsequently, nine complementary experiments were conducted in shake flasks with complex medium, under the agitation of 300rpm and temperatures of 37°C (growth phase) and 25, 31 or 37°C (induction phase). The largest specific production of soluble PspA4Pro was verified at 25°C, reaching, respectively, 209±6, 192±5mg/g dry cell mass for Phytone and Triptone, with final absorbance values (after 12h of induction) of 9.0±0.4 and 8.5±0.4. The best protein production for Soytone (124±4mg/g dry cell weight) was observed at 31°C, yielding a final absorbance 8.0±0.4. From the results obtained in the preliminary tests, the nitrogen source Phytone was selected for experiments in bioreactor. Four batch cultures were conducted in bench-scale bioreactor (5L), containing a modified auto-induction complex medium (10g/L glucose, 60g/L glycerol and 20g/L lactose), being three of them with Phytone and one with Triptone, for comparison. The best results in terms of protein production (245±7mg of PspA4Pro soluble/g dry mass) were obtained in the presence of Phytone, corresponding to an increase of 16% towards the maximum value achieved in the cultivation with Triptone. These results demonstrate the potential of vegetable-based nutrients as alternatives to animal-derived nitrogen sources in complex media, contributing to adequate these media formulations to the current guidelines of good manufacturing practices.

Keywords: batch culture. complex medium. auto-induction medium, recombinant *E. coli*, PspA production, soybean protein hydrolysates and vegetable-based peptones .

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 2.1.** Sistema de controle do operon *lac* (BIOCHEM & SCIENCE NOTAS, 2011).
.....23
- FIGURA 3.1.** Sequência dos seguintes aminoácidos: ácido glutâmico (E), alanina (A), lisina (K), leucina (L), ácido aspártico (D), asparagina (N), glutamina (Q), valina (V), prolina (P), treonina (T), serina (S), isoleucina (I), tirosina (Y), arginina (R), glicina (G), fenilalanina (F), metionina (M), histidina (H), triptofano (W) e cisteína (C) do fragmento da PspA4Pro (MORENO *et al.*, 2010). 35
- FIGURA 3.2.** Cálculo da porcentagem relativa da PspA4Pro solúvel (A_{PspA}) em relação as proteínas totais solúveis, obtidas no gel de eletroforese (A_{S1}). Quantificação da área através da curva obtida pelo *software* Image J (I_{MJ}).45
- FIGURA 3.3.** Esquema do biorreator com o sistema de aquisição e controle das variáveis do processo (*Fonte: Sargo, 2011*).49
- FIGURA 4.1.** Curvas de crescimento da *rE. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro em meio complexo(Tabela 3.4) e em meio definido(Tabela 3.5) para produção de PspA4pro induzida pela adição de lactose 5g/L (momento de indução e mudança de temperatura de cultivo indicados pela linha vertical). As barras de erro referem-se ao desvio padrão (experimento em triplicata – meio complexo) e ao desvio padrão das análises (leitura da absorbância em duplicata – meio definido). 57
- FIGURA 4.2.** Curvas de crescimento celular (Abs_{600nm}) nas diferentes fontes de nitrogênio (Tryptona – desvio padrão triplicata, Soytone e Phytone - desvio padrão das análises) nas temperaturas 25, 31 e 37°C. A linha vertical indica o momento de adição do pulso de lactose (concentração final de 5g/L) e mudança de temperatura (com exceção da temperatura 37°C).58
- FIGURA 4.3.** Perfis de produção específica e produtividade da proteína PspA4Pro durante os cultivos com diferentes fontes de nitrogênio para as diferentes temperaturas de indução. Ensaio com Tryptona realizados em duplicata. Para os demais ensaios, o desvio padrão refere-se às duplicatas das análises.59
- FIGURA 4.4.** Células resistentes das diferentes fontes de nitrogênio nas diferentes temperaturas. 61
- FIGURA 4.5.** Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C (Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4). A linha pontilhada indica a mudança de temperatura (31 para 25°C). 66

- FIGURA 4.6.** Produção específica, células resistentes, produtividade e a razão PspA4Pro solúvel/ proteína total solúvel ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C). 67
- FIGURA 4.7.** Temperatura e pH ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose. 68
- FIGURA 4.8.** Agitação, vazões de ar e de oxigênio puro ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C).. 69
- FIGURA 4.9.** Permissividade, concentração de oxigênio dissolvido e vazão molar de dióxido de carbono ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C). 69
- FIGURA 4.10.** Biomassa, permissividade e nCO_2 (obtido a partir da integração dos valores de vazão molar de dióxido de carbono) ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C)..... 70
- FIGURA 4.11.** Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. 72
- FIGURA 4.12.** Produção específica, células resistentes, produtividade e a relação entre PspA4Pro solúvel/ g de proteína total ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3)..... 73
- FIGURA 4.13.** Permissividade, nCO_2 e o Cx ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3). 74
- FIGURA 4.14.** Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerados a partir das análises do cultivo. 76

- FIGURA 4.15.** Produção específica, células resistentes, produtividade e a razão PspA4Pro solúvel/ (g de proteína total solúvel) ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C Desvio padrão gerados a partir das análises do cultivo. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3). 77
- FIGURA 4.16.** Permissividade, nCO₂ e o biomassa ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C Desvio padrão gerados a partir das análises. do cultivo. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3)...... 78
- FIGURA 4.17.** Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose (indicado pela linha vertical) Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. 79
- FIGURA 4.18.** Produção específica, células resistentes, produtividade e a relação entre PspA4Pro solúvel/ g de proteína total ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose. 80
- FIGURA 4.19.** Permissividade, nCO₂ e o biomassa ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose. 81
- FIGURA 4.20.** Produção específica de PspA4Pro nos Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4. 82
- FIGURA 4.21.** Produtividade em proteína PspA4Pro nos Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4. 83
- FIGURA 4.22.** Razão PspA4Pro solúvel/ (g de proteína total solúvel) para os Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4. 84

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1. Comparação das vantagens e desvantagens de Cultivos de Alta Densidade Celular. Fonte: SHOJAOSADATI, <i>et al.</i> , 2008.	30
TABELA 3.1. Composição de aminoácidos do fragmento da PspA4Pro (EXPASY, 2012)..	36
TABELA 3.2. Características gerais da PspA4Pro (EXPASY, 2012)	36
TABELA 3.3. Composição do meio LB-Ágar (SPIEGELEER <i>et al.</i> , 2004).	37
TABELA 3.4. Composição do meio de cultura complexo empregados nos experimentos em frascos agitados (formulação do presente trabalho a partir dos meios propostos por Silva, 2011).	38
TABELA 3.5. Composição do meio definido utilizado nos experimentos em frascos agitados (formulação do presente trabalho a partir do meio proposto por Sargo, 2011).	39
TABELA 3.6. Composição do meio de cultura de autoindução empregada nos experimentos em biorreator (formulação do presente trabalho a partir do meio proposto por Silva, 2011).	40
TABELA 3.7. Diferentes fontes de nitrogênio e composição em nitrogênio total, carboidrato total e minerais.	41
TABELA 3.8. Fontes de aminoácidos totais nos meios de cultivo em câmara incubadora e em biorreator.	42
TABELA 3.9. Resumo dos ensaios realizados em câmara incubadora e as condições empregadas em cada um. Cultivos 2 a 11 também continham extrato de levedura como fonte de nitrogênio.	47
TABELA 3.10. Resumo dos cultivos realizados em biorreator, com seus objetivos e suas principais características. Todos os cultivos também continham extrato de levedura como fonte de nitrogênio.	48
TABELA 4.1. Concentrações máximas de ácido acético nos cultivos realizados com as diferentes fontes de nitrogênio em diferentes temperaturas. (os ensaios com Triptona foram realizados em duplicata, os demais possuem o desvio padrão das duplicas do tempo 0 de indução).	60
TABELA 4.2. Velocidade de consumo dos aminoácidos selecionados para as diferentes fontes de nitrogênio. Dados referentes às primeiras 3 horas de cultivo (fase de crescimento).	63
TABELA 4.3. Produção específica, produtividade e concentração celular máximas para as diferentes fontes de nitrogênio.	64

TABELA 4.4. Temperatura de cultivo, concentração de biomassa máxima, tempo de cultivo, concentração máxima de ácido acético, fator de conversão de substrato em célula, velocidade específica máxima de crescimento, produção específica máxima de PspA4Pro solúvel, produtividade máxima de PspA4Pro solúvel e máxima relação entre mg PspAPro solúvel por g de proteína total.	86
TABELA 4.5. Velocidade de consumo dos aminoácidos dos cultivos em biorreator.....	87
TABELA 4.6. Velocidade de consumo de glicose, glicerol e lactose nos cultivos em biorreator.	88
TABELA 4.7. Comparação de estudos realizados com <i>rE. coli</i> BL 21 (DE3) realizados em biorreator.	90

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	15
1.1 Objetivos	17
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>S. pneumoniae</i>: características principais e estratégias de prevenção	18
2.2 Potencial de uma vacina de cápsula polissacarídica conjugada com uma proteína de superfície do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	21
2.3 Produção de proteínas heterólogas em <i>E. coli</i> recombinante empregando sistema de expressão baseado no operon <i>lac</i>	22
2.3.1 Indutores	24
2.4 Fase de indução e estabilidade do plasmídeo	25
2.5 Cultivos de <i>E. coli</i> para produção de proteínas recombinantes	26
2.5.1 Meios de cultivo	27
2.5.2 Cultivos de alta densidade celular	28
2.5.3 Estratégias de cultivo alternativas para estudos envolvendo produção de proteínas em <i>rE. coli</i>	30
2.6 Comentários finais sobre a revisão bibliográfica	33
3.MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Microrganismo	35
3.2 Proteína PspA4Pro	35
3.3 Meios de cultura	36
3.3.1 Meios complexos e fontes de nitrogênios estudadas	40
3.4 Métodos analíticos	42
3.4.1 Determinação da concentração celular	42
3.4.2 Determinação da concentração de fontes de carbono e de metabólitos	43
3.4.3 Determinação da concentração de aminoácidos	43
3.4.4 Determinação da estabilidade do plasmídeo	43
3.4.5 Estimativa da concentração de PspA4Pro solúvel	44
3.5 Procedimento experimental	46
3.5.1 Preparação da cultura de estoque em criotubos	46
3.5.2 Semeadura de <i>Escherichia coli</i> em meio semi-sólido	46
3.5.3 Preparação do inóculo	46
3.5.4 Cultivos em câmara incubadora	47
3.5.5 Ensaio em biorreator	48

3.6 Estimativa de parâmetros cinéticos, rendimentos, velocidades de consumo e produtividade em proteína.....	50
3.6.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular	50
3.6.2 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células.....	51
3.6.3 Determinação da produção específica e da produtividade volumétrica	52
3.6.5 Velocidade de consumo de substratos.....	54
3.6.6 Vazão molar de CO₂ produzido e número de moles de CO₂ acumulado.....	55
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4.1 Ensaio preliminares em frascos agitados.....	56
4.1.1 Ensaio 1 e 2. Influência do meio de cultivo sobre o crescimento celular e a expressão da PspA4Pro	56
4.1.2 Ensaio 3 a 11. Influência da temperatura e das fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a expressão da PspA4Pro	57
4.2 Cultivos em Biorreator.....	64
4.2.1 Cultivo 1. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 25 °C.....	64
4.2.2 Cultivo 2. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 31°C.....	71
4.2.3 Cultivo 3. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Triptona e indução a 31°C	75
4.2.4 Cultivo 4. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 31°C, suplementado com glicerol e lactose	78
4.2.5 Análise comparativa dos cultivos em biorreator.....	81
5.CONCLUSÕES.....	91
6.SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	94
7.REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	95

1. INTRODUÇÃO

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria Gram-positiva encapsulada anaeróbia, considerada um dos principais patógenos humanos (PRESCOTT, 1996), causadora de diversas doenças, tais como pneumonia, infecções do ouvido médio, sinusite e meningite (ALONSODEVELASCO *et al.*, 1995).

Nas últimas décadas a resistência do pneumococo à penicilina e a outros antimicrobianos tem aumentado em vários países (BUTLER *et al.*, 1998). Assim sendo, a estratégia de prevenção mais indicada é a vacinação para diminuir as taxas de incidência da doença (VIEIRA *et al.*, 2007).

A formulação de vacinas conjugadas contendo o polissacarídeo capsular (PS), principal fator de virulência da bactéria, ligado covalentemente a fragmentos de proteínas antigênicas presentes na superfície do pneumococo, permitiria reduzir o número de PS necessário para uma boa cobertura da vacina, com isso, diminuir os custos de produção. Dentre os fragmentos protéicos antigênicos testados, a proteína A de superfície do pneumococo, PspA, tem demonstrado elevada proteção em ensaios de desafios realizados em camundongos posteriormente infectados com uma cepa virulenta (BOGAERT *et al.*, 2003; BRILES *et al.*, 2000).

Neste contexto, a PspA foi selecionada, devido às suas características antigênicas únicas, como proteína carregadora alternativa para a produção de uma nova vacina conjugada pneumocócica no projeto temático em desenvolvimento “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína A de superfície de pneumococo” (08/05207-4), coordenado pela pesquisadora Dra. Martha Massako Tanizaki, do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. No âmbito do referido projeto temático está inserido o subprojeto “Automação e Otimização de Bioprocessos em Cultivos de *rE. coli* para produção de PspA”, para o qual os estudos relatados no presente texto têm por objetivo contribuir.

Diante das altas perdas inerentes às etapas de purificação e conjugação da proteína, é fundamental adotar estratégias de cultivo e expressão que permitam obter grandes quantidades de proteína. Nesse sentido, o emprego da bactéria *Escherichia coli* como sistema de expressão se apresenta como uma excelente alternativa. Esse microrganismo é um procaríoto Gram-negativo muito utilizado para produzir proteínas heterólogas por possuir um

sistema bem caracterizado (LEE *et al.*, 2001) e apresentar alta produtividade em comparação aos outros microrganismos.

A produção de proteínas heterólogas em *E. coli* é influenciada pelas condições de cultivo, destacando-se a temperatura, a composição do meio de cultivo, o modo de operação, as condições de aeração e o indutor empregado como os principais fatores para estudos conduzidos em câmara incubadora ou em biorreator. Em relação à composição de meios de cultivo, há uma grande variedade de opções para formular meios quimicamente definidos e complexos disponíveis na literatura, tanto para cultivos em frascos agitados como para cultivos de alta densidade de *rE. coli* em biorreator (STUDIER, 2005; KORZ *et al.*, 1995). Protocolos bem estabelecidos estão disponíveis para a condução de cultivos de alta densidade celular em meio definido, tendo IPTG como indutor, os quais requerem elevado grau de automação do biorreator e operadores qualificados para que alcancem o resultado esperado. Os meios complexos constituem uma alternativa ao meio definido. Eles são largamente utilizados industrialmente por apresentarem maior produtividade e maior conversão em biomassa devido à presença de peptonas e extrato de levedura, ricos em nutrientes essenciais ao metabolismo celular (BROWN, 2003). Além disso, a presença de aminoácidos ou proteínas no meio de cultivo contribui para a obtenção de maiores rendimentos em proteína recombinante (LIMA, 2004; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008; GOYAL *et al.*, 2009, SILVA, 2011).

Da mesma forma, a estratégia de autoindução é uma alternativa à estratégia convencional de indução, baseada na adição do indutor após a obtenção da concentração celular desejada. Os meios de autoindução são variações do meio complexo e contêm, além de peptonas e extrato de levedura, glicose e glicerol como fontes de carbono e lactose como indutor (STUDIER, 2005). Devido à sua praticidade, os meios de autoindução são muito empregados em estudos em frascos agitados para a produção de proteínas em *E. coli* recombinantes. No entanto, o escalonamento dessa estratégia para biorreatores exige a adequação da formulação do meio, principalmente em relação à concentração das fontes de carbono. Além disso, um dos principais problemas dos meios complexos reside no uso de fontes de nitrogênio de origem animal, como hidrolisados de caseína. O uso desses componentes não é recomendado por órgãos regulamentadores/fiscalizadores como ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), FDA (Administração de alimento e medicamento - USA), Avaliação de Produtos Medicinais (EMEA - EUROPA) e OMS (Organização Mundial da Saúde) devido ao risco de conterem príons, agentes causadores de encefalopatia espongiforme bovina. Desta forma, torna-se premente a busca por novas

formulações de meios de cultura livres de componentes de origem animal e adequados às atuais diretrizes de boas práticas de fabricação.

1.1 Objetivos

Tendo em vista as considerações feitas anteriormente, este trabalho teve como objetivo principal contribuir para a melhoria do processo de produção de um fragmento da proteína PspA do clado 4 (PspA4Pro), em cultivos de *Escherichia coli* recombinante em meio complexo, abordando diferentes aspectos do processo.

Como objetivos específicos destacam-se:

- a) avaliar a viabilidade de substituição da Triptona (caseína hidrolisada por enzimas pancreáticas – origem animal) por outras fontes de nitrogênio como o Soytone e Phytone (hidrolisados protéicos de soja) em função do crescimento e da produção de proteína;
- b) averiguar a influência da temperatura no crescimento celular e na produção de PspA4Pro para as diferentes fontes de nitrogênio em estudo;
- c) avaliar a influência das diferentes fontes de nitrogênio e das temperaturas estudadas sobre a estabilidade do plasmídeo, a formação de subprodutos inibidores de crescimento, consumo de aminoácidos e de carboidratos
- d) desenvolver e avaliar uma formulação de meio de autoindução para cultivo batelada de *rE. coli* em biorreator contendo fonte de nitrogênio de origem vegetal (Phytone);
- e) avaliar a influência das condições de cultura empregadas sobre a produtividade e produção específica de proteína recombinante nos cultivos com meio de autoindução.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *S. pneumoniae*: características principais e estratégias de prevenção

A história do *Streptococcus pneumoniae* iniciou-se em 1881, quando dois microbiologistas, um independente do outro, descreveram pela primeira vez uma bactéria com forma lanceolada e com um par de cocos (WATSON *et al.*, 1993). Segundo um dos microbiologistas, Louis Pasteur, o organismo foi classificado como “*Microbe septicémique du salive*” e George M. Sternberg nos Estados Unidos da América, como “*Micrococcus pasteurii*” (KAIJALAINEN, 2006).

S. pneumoniae recebeu esta denominação em 1974 em virtude de pertencer ao gênero *Streptococcus*, família Streptococcacea (DEIBEL & SEELEY, 1974). Este organismo possui como características principais ser Gram-positivo, encapsulado, anaeróbio, podendo apresentar-se sob a forma de cocos, diplococos lanceolados ou em cadeias (ATKINSON *et al.*, 2009). *S. pneumoniae*, conhecido também como pneumococo, possui três principais camadas na sua superfície: a membrana plasmática, a parede celular e a cápsula polissacarídica (SALYERS & WHITT, 1994).

A parede celular consiste de uma camada tripla de peptidoglicanas, que ancora o polissacarídeo capsular (PS) (SILVA, 2005), o ácido teicóico e diversas proteínas em sua superfície (DAWSON, 2004). O ácido teicóico, conhecido como polissacarídeo C, contém resíduos de colina, responsável pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo, com ativação do sistema complemento e produção de citocinas (DAWSON, 2004).

A cápsula polissacarídica é o principal fator de virulência da bactéria, protegendo-a da fagocitose pelo sistema imune do hospedeiro (YOTHER, 2004). Esta cápsula é responsável pela diferenciação da espécie em tipos sorológicos, ou sorotipos, com base nas diferenças químicas e imunogênicas do polissacarídeo (PS) capsular (HENRICHSEN, 1995). Cada linhagem de pneumococo produz apenas um tipo de PS capsular e atualmente mais de 90 sorotipos foram identificados com base na estrutura química desses PS (BENTLEY *et al.*, 2006), constituindo 48 grupos sem reatividade cruzada entre si (YOTHER, 2004). Porém, cerca de 23 sorotipos predominam como causa de doenças no homem (TEELE, 2003; WILLETT, 1992; HENRICHSEN, 1995; HAUSDORFF *et al.*, 2000) e estima-se que apenas 11 sorotipos sejam responsáveis por 75% das infecções graves em todo o mundo (KAMERLING, 2000).

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Segundo AlonsoDeVelasco *et al.* (1995) ocorrem diferenças de prevalência de sorotipos, sendo os sorotipos pediátricos mais importantes nos EUA e na Europa 6A, 14, 19F e 23F, responsáveis por quase 60% de todas as infecções, enquanto que, para adultos, os sorotipos 3, 19F e 6A são responsáveis por 31% das infecções.

Há uma série de publicações sobre a prevalência dos diferentes sorotipos de pneumococos no Brasil. Constatou-se que cerca de 86% dos isolados mencionados são constituídos por treze tipos de cápsulas: 14, 6A/B, 5, 1, 23F, 18C, 19A, 7F, 9V, 3, 9N e 4 (DI FABIO *et al.*, 2001). No período de 2000 a 2006 a porcentagem de doenças causadas pelos sorotipos 14, 6A/B e 18C foram, respectivamente, 37%, 11% e 6%, representando um total de 54% dos sorotipos prevalentes no Brasil (MIGOWSKI, *et al.* 2008).

Doenças causadas por *S. pneumoniae* constituem um sério problema de saúde pública mesmo nos dias atuais. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou em um milhão o número de mortes por infecções pneumocócicas em crianças menores de cinco anos de idade. A maioria dessas mortes ocorreu em países pobres e em crianças com idades inferiores há dois anos, devido à dificuldade de acesso ao tratamento (OMS, 2006). As principais doenças causadas pela bactéria são pneumonia, infecções do ouvido médio (otite média) e meningites bacterianas (ALONSODEVELASCO *et al.*, 1995). É um dos principais patógenos humanos, transmitido de pessoa a pessoa por aerossol, colonizando inicialmente a nasofaringe, de onde ganha acesso aos pulmões ou tubo eustaquiano (PRESCOTT, 1996).

No Brasil, estima-se que gastos anuais com internação por pneumonia na infância vêm crescendo substancialmente desde 1999, ultrapassando sessenta e quatro milhões de dólares, em 2003 (FUCHS, 2005).

Segundo Brandileone (1999), no Brasil em 1996, a mortalidade por pneumonia foi de 21 óbitos por 100.000 pessoas, correspondendo em números absolutos a 33.882 óbitos. Nas faixas etárias nas quais as doenças pneumocócicas são mais incidentes, os coeficientes de mortalidade foram de 153 óbitos por 100.000 pessoas em menores de um ano, 42 em maiores de cinco anos e de 200 em maiores de 60 anos.

Os principais grupos de riscos são: crianças com idades inferiores a 5 anos; idosos com idades superiores a 65 anos; pessoas que apresentam comprometimento da resposta imune por doenças congênitas ou adquiridas; alguns grupos étnicos (índios, raça negra, nativos do Alasca e Austrália); pessoas que frequentam ambientes aglomerados (creches, escolas, transporte público); pessoas expostas à fumaça de cigarro (CARMO, 2010).

Nas últimas décadas a resistência do pneumococo à penicilina e a outros antimicrobianos tem aumentado em vários países (BUTLER *et al.*, 1998). Assim sendo, a

estratégia de prevenção mais indicada é a vacinação para diminuir as taxas de incidência da doença (VIEIRA *et al.*, 2007).

As vacinas antipneumocócicas hoje existentes são compostas de PS capsulares livres ou conjugadas a uma proteína carreadora. A primeira vacina a ser introduzida no sistema de imunização contra pneumonia, produzida em 1977, era composta apenas por 14 sorotipos de PS prevalentes na Europa e EUA. Ela foi substituída em 1983 por uma formulação 23-valente, comercializada sob as denominações Pneumovax 23 (Merck Research Laboratories, EUA), Pneumo 23 (Sanofi-Pasteur, França) e Pneumo-Imuni 23 (Wyeth, EUA), as quais contêm os PS dos sorotipos 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F e 33F, apresentando cobertura de até 90% contra pneumonia em adultos (MANGTANI *et al.*, 2003) nos EUA e na Europa, porém menos 70% na Ásia (ALONSODEVELASCO *et al.*, 1995). Pelo fato de o PS ser um antígeno timo-independente (T-independente), esta formulação apresenta como desvantagens o fato de não ativar as células de memória e de induzir níveis variáveis de anticorpos, sendo estes, predominantemente imunoglobulina M. Além disso, produz baixa resposta imune em crianças, principalmente com idades inferiores a dois anos por não estimular a maturação clonal e induzir produção de anticorpos com baixa avidéz (BRANDILEONE *et al.*, 2003).

A conjugação do PS a uma proteína carreadora transforma a natureza deste antígeno de T-independente em T-dependente. As primeiras vacinas conjugadas foram introduzidas no mercado em 1987 contra a *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib) (BUTLER *et al.*, 1993), resultando em drástica diminuição da incidência de meningites nos países desenvolvidos (WENGER *et al.*, 1997). Nessas vacinas, o PS se apresentava conjugado a três diferentes proteínas, dependendo do fabricante: toxoide tetânico (TT), toxina diftérica mutada (CRM₁₉₇) e vesículas de membrana externa da *Neisseria meningitidis* (KLEIN & ELLIS, 1997). A vacina conjugada utilizada atualmente contra pneumococo foi licenciada no ano de 2000 sob o nome comercial de Prevnar (Wyeth) e contém PS de 7 sorotipos – 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F – cada um deles conjugado à toxina diftérica mutada, CRM₁₉₇. Contudo, o número reduzido de PS incluídos nesta formulação, uma limitação imposta pelo processo de conjugação, aliado à ausência de reatividade cruzada entre os sorotipos, torna sua cobertura reduzida por não incluir sorotipos prevalentes em diversas partes do mundo. Outras vacinas conjugadas foram então desenvolvidas e já estão em uso: a 10-valente (PS conjugados com uma proteína conservada de hemófilus, da GSK) e a 13-valente (conjugada com CRM₁₉₇, da Wyeth, que atualmente faz parte da Pfizer).

Embora existam vacinas antipneumocócicas, seu elevado custo e/ou cobertura limitada tornam pouco viável sua utilização em larga escala em campanhas de vacinação nos países em desenvolvimento. Assim, a busca por estratégias vacinais com ampla cobertura e custo reduzido é uma prioridade no mundo todo (SAMPAIO, 2007).

A utilização de antígenos protéicos tem sido considerada como uma alternativa para aumentar a cobertura vacinal a um menor custo. Algumas proteínas de pneumococo, como por exemplo, Pneumolisina (Ply), autolisina, Proteína A de superfície de pneumococo (PspA) e o Antígeno A de superfície de pneumococo (PsaA), estão sendo investigadas como possíveis componentes de vacinas (TAM & SAIER, 1993).

2.2 Potencial de uma vacina de cápsula polissacarídica conjugada com uma proteína de superfície do *Streptococcus pneumoniae*

A estratégia adotada pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para o desenvolvimento de uma nova vacina pneumocócica envolve a conjugação de alguns PS de sorotipos prevalentes no Brasil com proteínas recombinantes do próprio pneumococo.

Dentre as mencionadas, a PspA tem demonstrado elevada proteção em ensaios de desafio realizados em camundongos imunizados com esta proteína e, posteriormente, infectados com uma cepa virulenta (BOGAERT *et al.*, 2003), principalmente pelo fato de a PspA ser uma proteína exposta externamente à cápsula de polissacarídeo.

A PspA é encontrada com alguma variabilidade nos isolados clínicos de pneumococos, principalmente na sequência conhecida como “região definidora de clado” (CDR), o que tornou possível a divisão da PspA em 3 famílias e uma subdivisão em 6 clados (família 1, com clados 1 e 2, família 2, clados 3 a 5, e família 3, clado 6). As PspA de famílias 1 e 2 (especialmente os clados 1 a 4) são predominantes em todo o mundo (BEALL *et al.*, 2000) e no Brasil, estão presentes em 99% dos isolados clínicos (PIMENTA *et al.*, 2006). As diferenças sorológicas relacionadas à variabilidade genética sugerem a inclusão de PspA dessas duas famílias predominantes, a fim de se obter um amplo espectro de proteção (BRILES *et al.*, 1998).

Devido às suas características antigênicas únicas, a PspA foi escolhida como proteína carregadora alternativa para produzir uma vacina pneumocócica conjugada.

No entanto, a viabilidade técnica e econômica para o processo de produção de uma vacina conjugada PS-PspA, depende essencialmente da obtenção de quantidades significativas de proteína com alto grau de pureza. Por isso, optou-se pela produção da PspA

em células de *E. coli*, pois esta bactéria é bem caracterizada geneticamente, sendo seu metabolismo amplamente conhecido (LIRIA, 1995), apresentando rápido crescimento celular, o que permite a obtenção de altas densidade celulares e, conseqüentemente, produção de proteína recombinante com baixo custo (TRIPATHI *et al.* 2009; FRANÇOIS, 1999).

2.3 Produção de proteínas heterólogas em *E. coli* recombinante empregando sistema de expressão baseado no operon *lac*

O desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante iniciou-se na década de 1970, quando os bioquímicos Berg, Boyer e Cohen mostraram que os genes podiam ser transferidos de um organismo para outro. Diante da capacidade de transferência de genes foi verificado que a sequência de DNA heteróloga inserida podia recombinar-se com o DNA do microrganismo hospedeiro, tendo sido criados os primeiros organismos geneticamente modificados, os quais se tornaram um veículo muito importante para obtenção de proteínas de interesse em diversas áreas (ALBERTS, 2005).

A origem do termo clonagem vem da genética bacteriana, que considera uma colônia de bactérias como um clone, porque os indivíduos são geneticamente idênticos a uma bactéria inicial (SAMBROCK *et al.*, 1989). A capacidade de clonar genes implica que, um gene que codifica uma proteína de interesse, pode agora ser retirado de seu hospedeiro normal, inserido em um vetor de clonagem e introduzido em outro organismo (BROWN, 2003). Os microrganismos estudados com maior frequência pela Engenharia Genética como hospedeiros de vetores são as bactérias, principalmente *Escherichia coli*, pelas razões já expostas no item 2.2.

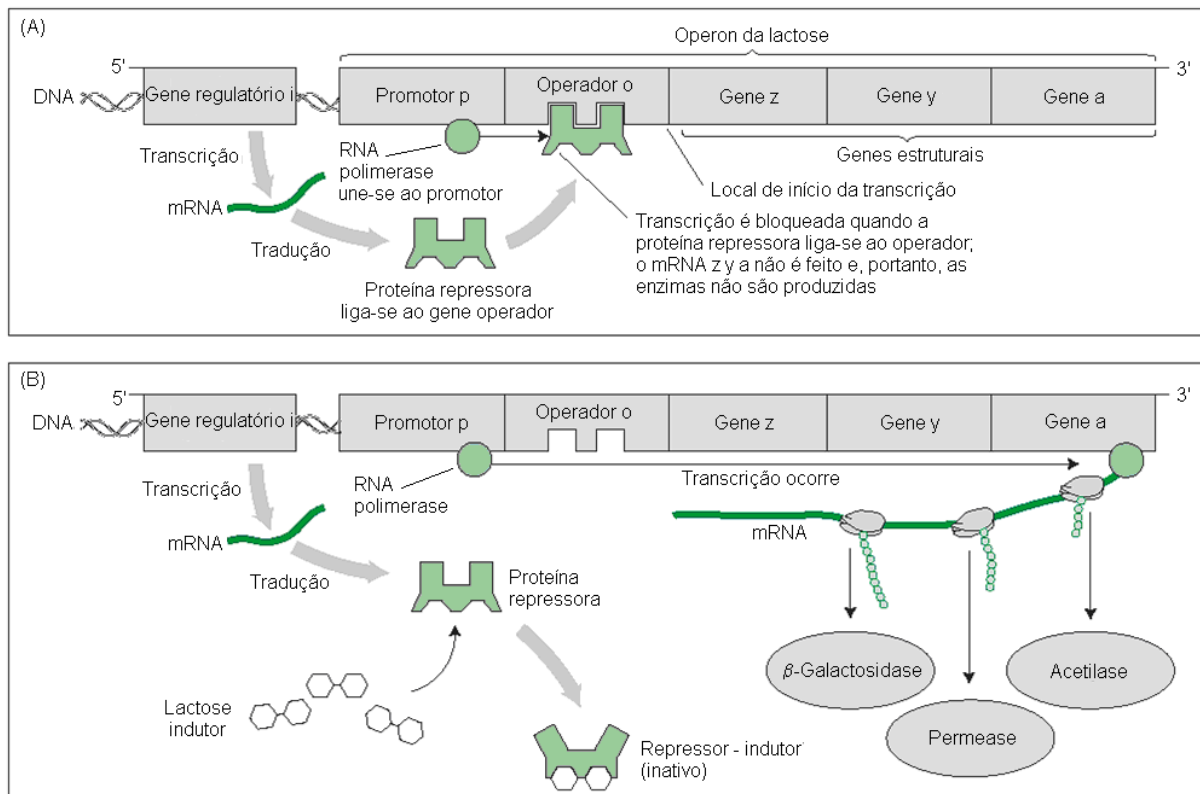
A síntese da proteína recombinante em *E. coli* pode ser considerada um processo estranho à célula, ou seja, não faz parte de seu conjunto metabólico natural e geralmente acaba causando problemas à célula hospedeira que reage às condições adversas de várias formas, comprometendo a obtenção da proteína de interesse. Portanto, a escolha cuidadosa dos vetores, normalmente plasmídeos, dos hospedeiros e das condições de crescimento são fatores essenciais para obtenção de altos níveis de expressão em *E. coli* (THE QIAEXPRESSIONIST, 2003).

Os primeiros estudos de expressão gênica em procariotos foram definidos através do metabolismo da lactose em *E. coli* realizados por dois pesquisadores, François Jacob e Jacques Monod, que em 1960 publicaram um trabalho no *Proceeding* da Academia Francesa de Ciências. Hoje se sabe que o metabolismo da lactose depende de genes adjacentes

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

regulados coordenadamente: o gene *lacZ* que codifica a β -galactosidase, enzima que hidrolisa a lactose em galactose e glicose, o gene *lacY* da galactosídeo permease, que transporta a lactose para dentro da célula (LEHNINGER, 2006) e o gene *lacA* que codifica a tiogalactosídeo transacetilase, enzima cuja função fisiológica exata ainda é desconhecida (CHAMPE, *et al.*, 2009), porém supõe-se que ela modifique os galactosídeos tóxicos para facilitar sua remoção da célula (LEHNINGER, 2006). Essas três enzimas que compõem o operon *lac* são produzidas quando a lactose está disponível para a célula e na ausência de glicose (Figura 2.1). Quando a glicose está presente, ela desencadeia um processo chamado de repressão catabólica, ou seja, a utilização de lactose fica reprimida (CHAMPE *et al.*, 2009). Quando a concentração de glicose é baixa, a lactose liga-se então à molécula do repressor *LacI*, que por sua vez muda de conformação e desliga-se do operador *lacO* permitindo que a RNA polimerase faça a transcrição dos três genes necessários para a utilização da lactose: *lacY*, *lacZ* e *lacA* (Figura 2.1).

FIGURA 2.1. Sistema de controle do operon *lac* (BIOCHEM & SCIENCE NOTAS, 2011).



2.3.1 Indutores

A expressão do gene da proteína de interesse em sistemas baseados no operon *lac* depende da presença de um indutor, pois o gene heterólogo é inserido no plasmídeo sob controle de um derivado do operon *lac* no lugar dos genes estruturais *lacZ*, *lacY* e *lacA*, enquanto que no genoma da bactéria o operon *lac* permanece intacto. Em laboratório, normalmente utiliza-se o isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), um análogo da lactose, como indutor para as construções derivadas do operon da lactose. Porém, se por um lado ele apresenta efetividade na indução e não sendo consumido durante o processo (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008), por outro lado o IPTG apresenta duas desvantagens para um processo industrial: é caro e tóxico (ZHANG *et al.*, 2009; MENZELLA *et al.*, 2002). Por ser tóxico, o uso de IPTG não é recomendado pelas normas de boas práticas de produção (BPP) para a produção de proteínas com finalidades terapêuticas em saúde humana ou animal (MERTEN *et al.*, 2001). Se utilizado nesses casos, procedimentos para sua remoção deverão ser incorporados ao processo e será necessário comprovar que está ausente no produto final. Humberto & Silva (2006) afirmam que a toxicidade do IPTG para a célula da bactéria é tão forte que afeta o crescimento, diminuindo-o drasticamente 4-5 h após a indução. Isso também constitui uma restrição para a sua utilização em processos de produção em larga escala, cuja viabilidade econômica depende da obtenção de altas concentrações celulares. Por todas essas razões, o emprego de indutores menos tóxicos e com a mesma eficiência do IPTG, é portanto aspecto fundamental para o escalonamento dos processos de produção de proteínas recombinantes pelo sistema de expressão baseado no operon *lac* (HUMBERTO & SILVA, 2006).

A alternativa ao IPTG é a própria lactose, já que ela apresenta baixo custo, não é tóxica às células (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008) e funciona como fonte de carbono (LEE *et al.*, 2001). Por sua vez, apresenta a desvantagem de depender da presença da permease na superfície das bactérias (LEE *et al.*, 2001), de ser pouco solúvel em água (devido as grandes quantidades necessárias para a indução - aproximadamente 200mg/mL) e de ser consumida durante o cultivo (ZHANG *et al.*, 2009; MENZELLA *et al.*, 2002).

Resultados obtidos por Kilikian *et al.* (2000) mostraram que a produção da proteína Troponina C (TnC) com IPTG foi de 12% maior em comparação com a obtida com lactose, porém com a lactose produziu poucos metabólicos, resultando em uma maior estabilidade do plasmídeo. Já resultados de Silva (2005) e Menzella *et al.* (2002) mostraram expressão semelhante com os dois indutores, produzindo a proteína PspA1 e Proquimosina,

respectivamente. Mas, no trabalho de Silva (2005), o cultivo com lactose ocorreu em um tempo de 2 a 3 horas maior quando comparado com o IPTG. Analogamente, Tomazetto (2006) concluiu que a lactose pode ser utilizada eficientemente como indutora da expressão de jaburetox-2Ec em *E. coli* BL 21 (pET101/jaburetox-2Ec) em substituição ao IPTG.

Em relação à produção de proteínas antigênicas em *rE. coli*, utilizando o sistema de expressão baseado no operon *lac*, estudos em câmara incubadora indicaram que a produção de um fragmento da proteína antigênica A de superfície (SpaA) de *E. rhusiopathie* foi superior na presença de lactose como indutor (SILVA *et al.*, 2012). Por outro lado, no caso da proteína PspA245, também uma proteína A de superfície do pneumococo, da família 1, clado 1, Sargo (2011) relatou que a maior produção (176mg/g massa seca) foi alcançada após 7h de indução a 25°C com IPTG. Já para a lactose, como indutor, a máxima produção foi de 159mg/g massa seca após 12h de indução a 30°C.

Portanto, a literatura mostra que a lactose pode efetivamente substituir o IPTG como indutor com vantagens (menor custo, ausência de toxicidade), tendo como principal desvantagem o tempo mais prolongado de indução. É importante destacar ainda que a lactose, apesar de ser de origem animal, é recomendada pelas normas de boas práticas de manufatura por não apresentar risco de conter príons (OMS, 2006). Assim, diante do exposto, observa-se que a lactose reúne várias características adequadas à produção de proteínas recombinantes pelo sistema de expressão baseado no operon *lac* em larga escala, justificando os esforços para o desenvolvimento de estratégias de indução tendo a lactose como indutor.

2.4 Fase de indução e estabilidade do plasmídeo

A produção da proteína heteróloga durante a fase de indução causa um elevado estresse metabólico na célula (GOMBERT & KILIKIAN, 1998; KILIKIAN *et al.*, 2000), que é forçada a direcionar parte significativa da energia e dos aminoácidos gerados para atender a demanda de síntese. Isso acarreta aumento na manutenção celular e desaceleração do crescimento. Outro problema relacionado ao estresse metabólico e comumente encontrado em cultivos prolongados é a instabilidade do plasmídeo (NAYAK & VYAS, 1999).

A não retenção do plasmídeo decorre da desigual distribuição dos mesmos para as células filhas durante a divisão celular. Isso é comumente contornado por meio da inserção no plasmídeo de genes de resistência a um antibiótico e com a concomitante adição deste antibiótico ao meio de cultivo. Cria-se, assim, uma pressão seletiva para que as células retenham o plasmídeo (HÄGG *et al.*, 2004).

Segundo a literatura, muitos fatores influenciam a estabilidade do plasmídeo, tais como os padrões de replicação, o número de cópias do plasmídeo, o tipo de inserção, o substrato, a composição do meio (SUMMERS, 1991; ZHAO *et al.*, 2001), as condições de cultura (CRAYNEST *et al.*, 1996), a velocidade de crescimento, o nível de expressão (PARKER & DiBIASIO, 1987), a temperatura de cultivo e a toxicidade da proteína codificada (CORCHERO & VILLAVERDE, 1998).

Estudos recentes com a proteína PspA4Pro demonstraram que a estabilidade do plasmídeo pode ser favorecida por meio da suplementação do cultivo com aminoácidos ou bionutrientes específicos durante a fase de indução (CAMPANI JR. *et al.*, 2012). Ainda, de acordo com Ramírez e Bentley (1993), o estresse causado pela síntese do produto recombinante foi minimizado adicionando-se um aminoácido abundante na composição da proteína cloranfenicol-acetil-transferase (CAT).

O número de cópias do plasmídeo determina a quantidade de genes disponíveis para a expressão. Portanto, alto número de cópias do plasmídeo aparentemente proporcionaria maior produtividade (JANA & DEB, 2005). Entretanto, o elevado número de cópias impõe uma carga metabólica à célula devido à demanda de replicação, transcrição e tradução do genoma do plasmídeo, levando à instabilidade do mesmo (SUMMERS, 1991; JANA & DEB, 2005). Limitação de fósforo e magnésio pode ocasionar redução do número de cópias do plasmídeo, enquanto que a limitação de glicose e amônia leva ao aumento no número de cópias do plasmídeo (LIMA, 1993).

2.5 Cultivos de *E. coli* para produção de proteínas recombinantes

O principal requisito de um cultivo de *E. coli* recombinante é garantir condições adequadas para a obtenção de alta concentração de células e para a produção da proteína heteróloga durante a fase de indução, especialmente porque na maioria das construções a proteína acumula-se no citoplasma. Fatores como o meio de cultivo, a fonte de carbono, a temperatura e o suprimento de oxigênio, dentre outros, desempenham papel importante para alcançar os objetivos desejados.

A manutenção de condições plenamente aeróbicas durante os cultivos de *rE. coli* é fundamental para evitar a formação de metabólitos indesejados, como ácido acético e ácido lático, dentre outros, que inibem tanto a formação de biomassa como a síntese da proteína de interesse (RIESENBERG & GUTHKE 1999). Em condições anaeróbicas, o piruvato é

convertido em ácido fórmico, acetil-CoA e lactato, que é em parte metabolizado a outros produtos da fermentação ácida mista (formiato, succinato e etanol).

Além da ativação das vias fermentativas causada pela limitação por oxigênio, a formação de acetato também pode ocorrer pelo chamado metabolismo *overflow* quando uma grande quantidade de glicose é catabolisada até piruvato, que é oxidado a acetil-CoA em condições de aerobiose. O excesso de acetil-CoA formado, que não consegue ser metabolizado pelo ciclo de Krebs e/ou cadeia transportadora de elétrons, é transformado em acetato (ROCHA, 2003). O metabolismo *overflow* é particularmente crítico quando a glicose é usada como fonte de carbono e mais fácil de ser evitado utilizando-se glicerol como fonte de carbono, meio de cultivo balanceado e suplementado com fosfato (SARGO, 2011).

Os aspectos principais relacionados aos meios e estratégias de cultivo são discutidos nos tópicos a seguir.

2.5.1 Meios de cultivo

De uma forma simplificada, os meios de culturas são classificados quando ao estado físico, sendo sólidos ou semi-sólidos, dependendo da porcentagem de agentes solidificantes, como por exemplo, ágar, e como líquidos, quando não possuem agentes solidificantes na sua composição. Os meios de culturas podem, ainda, ser classificados com base na sua composição, sendo denominados meios complexos quando apresentam extratos de leveduras e peptonas; meios quimicamente definidos quando contêm apenas constituintes de baixa massa molar (SHULER & KARGI, 2002).

A literatura apresenta diversas formulações de meios quimicamente definidos para cultivo de *E. coli*, como por exemplo, o de Korz *et al.* (1995) e Seeger *et al.* (1995). Esses meios são basicamente compostos por uma fonte de carbono (glicose ou glicerol), por uma fonte de nitrogênio (geralmente sais de amônio) e por diversos elementos imprescindíveis para a célula (Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Mn, Mg, etc), geralmente incorporados na forma de sais de fosfato, sulfato, sódio ou cloreto. As formulações ainda são suplementadas frequentemente com tiamina e citratos. A tiamina é uma vitamina de grande importância para as células, já que a tiamina pirofosfato (TPP) atua como coenzima em duas etapas controladoras da via glicolítica. Já o citrato é um precursor essencial para a síntese de vários aminoácidos (LEHNINGER, 2006).

O meio definido é particularmente adequado para estabelecer as relações estequiométricas de conversão do substrato em subprodutos, CO₂ e biomassa, para análise de

fluxos metabólicos e para avaliar a influência de componentes do meio sobre o metabolismo (ROCHA, 2003). Ainda, a literatura descreve que o meio definido apresenta a vantagem maior no controle do biorreator em relação ao meio complexo (SHULER & KARGI, 2002; VAN HOEK *et al.*, 2000).

Formulações para meios complexos destinados a cultivo de *E. coli* também são abundantes na literatura, sendo o meio LB - Luria Bertani (LIN & SWARTZ, 1992) e o meio TB - *Terrific broth* e suas variações (JIA *et al.*, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2009; MADURAWA *et al.*, 2000) os mais citados. Ambos contêm extrato de levedura e triptona (caseína hidrolisada por preparado enzimático de origem pancreática) na sua composição, sendo suplementados por NaCl (LB) ou K₂HPO₄ e KH₂PO₄ (TB). As variações incluem a complementação da formulação original com fontes de carbono (glicose ou glicerol) e com outros sais.

O meio complexo é rico em aminoácidos e nutrientes de fácil assimilação, proporciona velocidade máxima específica de crescimento e rendimento em biomassa maiores, o que resulta em maior produtividade (SILVA, 2011; GOYAL *et al.*, 2009; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008; LIMA, 2004 e BROWN, 2003) e diminuir o estresse causado pela síntese do produto recombinante (RAMÍREZ & BENTLEY, 1994).

De fato, uma grande desvantagem dos meios complexos mais utilizados como, por exemplo, o LB e o TB, é a presença de Triptona, um hidrolisado protéico produzido a partir de caseína, que apresenta risco de contaminação por príons e, portanto, não atende às recomendações dos órgãos regulamentadores/fiscalizadores e as atuais diretrizes de boas práticas de fabricação (OMS 2006, OMS, 2005; OMS 2003; ZHANG & GREASHAM, 1999; SOGAL & TOFE, 1999). Porém, como será discutido posteriormente, existem hidrolisados protéicos de origem vegetal disponíveis comercialmente que poderiam substituir a Triptona.

2.5.2 Cultivos de alta densidade celular

O cultivo de alta densidade celular (CADC) é uma técnica muito estudada para a produção de proteínas recombinantes (WAEGEMAN & SOETAERT, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2009; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008; SHILOACH & FASS, 2005; WANG & LEE, 1998; SEEGER, 1995). A estratégia do CADC consiste na realização processo em batelada alimentada (LIMA, 2004), porém dividido 3 fases: 1) fase de batelada; 2) alimentação da fonte de carbono de forma controlada para evitar seu acúmulo; e 3) fase de indução na qual ocorre a síntese da proteína recombinante por meio da adição do indutor.

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

Várias estratégias de alimentação podem ser utilizadas para manter o crescimento limitado e na velocidade desejada. A manutenção da velocidade de crescimento abaixo do valor crítico (μ_{crit}) é fundamental para evitar o desvio de carbono via metabolismo *overflow* descrito anteriormente (ROCHA, 2003). Com esse objetivo, vários perfis de alimentação vêm sendo empregados: 1) alimentação constante; 2) alimentação linear; 3) alimentação exponencial e 4) alimentação através do controle da concentração de oxigênio dissolvido (DO-stat) ou do pH (pH-stat) (SHILOACH & FASS, 2005). Deve-se, no entanto, destacar que a manutenção de velocidades de crescimento baixas, próximas dos requerimentos de manutenção das células, pode afetar a produção da proteína de interesse na fase de indução.

Embora os protocolos para cultivos em alta densidade em meio definido estejam bem estabelecidos (WAEGEMAN & SOETAERT, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2009; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008; LIMA, 2004; YAZDANI *et al.*, 2004; SHILOACH & FASS, 2005; KILIKIAN *et al.*, 2000; GOMBERT & KILIKIAN, 1998; WANG & LEE, 1998; KLEIN & ELLIS, 1997; LEE, 1996; MARKIDES, 1996; SEEGER, 1995; KORZ *et al.*, 1995; KLEMANN & STROHL, 1994; MÄRKL, *et al.*, 1993; RIESENBERG, 1991), o sucesso do processo depende da superação de uma série de dificuldades, as quais estão relacionadas na Tabela 2.1.

A elevada velocidade de liberação de calor exige alta eficiência do sistema de controle de temperatura do biorreator para que o cultivo seja mantido na temperatura desejada. Da mesma forma, as altas velocidades de crescimento impostas, assim como o elevado acúmulo de biomassa, levam ao limite a capacidade do biorreator em transferir oxigênio ao cultivo. O aumento da velocidade de agitação, o enriquecimento do ar com oxigênio puro e o aumento da vazão total de gases fornecidos ao biorreator até valores de 2,0 VVM (vazão de gás por volume de meio por minuto) são recursos normalmente utilizados para manter os níveis de oxigênio dissolvido em 30% da saturação. Em situações extremas, quando a demanda por oxigênio da cultura ultrapassa a capacidade máxima de transferência de oxigênio do biorreator, recursos adicionais para reduzir a velocidade de crescimento por meio da diminuição da vazão de alimentação ou da temperatura são implementados para manter a concentração de oxigênio dissolvido no nível desejado (HORTA, 2011).

TABELA 2.1. Comparação das vantagens e desvantagens de Cultivos de Alta Densidade Celular. Fonte: SHOJAOSADATI, *et al.*, 2008.

Vantagens	Desvantagens
Aumento da rentabilidade	Altas velocidades de produção de CO ₂ e geração de calor
Redução do volume de cultura	Limite de transferência e alta demanda de oxigênio
Redução dos custos de produção e dos investimentos em equipamentos	Lise celular e proteólise
	Formação de subprodutos inibidores do crescimento
Facilidade no processo de purificação	Instabilidade do plasmídeo

Devido às vantagens mencionadas na Tabela 2.1, o cultivo em alta densidade é o procedimento mais recomendado para obtenção de altas concentrações de biomassa e de proteína recombinante. No entanto, um CADC não é o ambiente mais recomendado para estudos específicos a respeito da influência de temperatura, indutores, fontes de carbono ou fontes de nitrogênio, dentre outros, sobre a produção da proteína de interesse. A execução de um CADC não é trivial, requerendo biorreatores equipados com sistema de supervisão e controle sofisticados e operadores capacitados e experientes (HORTA, 2011). Além disso, devido à alta concentração de biomassa presente, problemas como falta de oxigênio ou de nutrientes podem facilmente ocorrer, interferindo com o estudo específico em andamento.

Por outro lado, a realização de estudos em biorreator é essencial para avaliar tanto a estabilidade do hospedeiro como o nível de produção da proteína de interesse em condições de cultivo semelhantes às empregadas industrialmente. Assim, o uso de meios de cultivo complexos e da estratégia de autoindução em biorreatores operados em batelada torna-se uma alternativa interessante para a realização dos estudos em condições adequadamente controladas.

2.5.3 Estratégia de cultivo alternativa para estudos envolvendo produção de proteínas em *rE. coli*

Embora os protocolos para cultivo *rE. coli* em alta densidade estejam bem estabelecidos, eles são válidos exclusivamente para meio definido e IPTG como indutor, caracterizando a estratégia convencional de CADC para obtenção de proteína recombinante. Assim, neste tópico, são apresentadas estratégias alternativas empregadas em cultivos de *rE.*

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

coli, contemplando aspectos como o uso de lactose como indutor e de meio complexo e suas variações.

Alguns cultivos em batelada alimentada utilizando meio complexo são relatados na literatura, mas, a maioria foi realizada utilizando IPTG como indutor (HU *et al.*, 2004; GOYAL *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009). Assim, apenas os trabalhos de Li *et al.*, (2006) e Silva (2011) exploraram tanto o uso de meio complexo como o de lactose na indução em cultivos em biorreator. Li e colaboradores (2006) alcançaram uma produção específica de 0,12g proteína hsBLYS/g massa seca e uma produtividade em biomassa de 0,92g massa seca/L.h, utilizando uma estratégia de alimentação de lactose. Já Silva (2011) comparou várias estratégias de indução alternativas (incluindo a de autoindução), com a indução por pulso de IPTG. A maior produção específica de proteína (~ 0,16g SpaA/g MS) foi obtida nos cultivos tendo lactose como indutor (inclusive o de autoindução), a qual foi 16 % superior à observada com IPTG. Em termos de produtividade em biomassa, o melhor resultado também foi obtido com lactose como indutor, alcançando 4,1g MS/L.h, o dobro da observada com IPTG.

A autoindução é definida como a indução automática da síntese de proteína recombinante por compostos indutores, como a lactose, que já estão presentes no meio complexo ou no meio definido no início do cultivo, quando o nutriente preferencial, geralmente a glicose, esgota-se durante o crescimento (XU *et al.*, 2012).

Após a publicação dos estudos realizados por Studier (2005) em frascos agitados com o meio de autoindução contendo lactose, tornou-se possível produzir a proteína de interesse automaticamente, sem a necessidade de controlar o crescimento e adicionar o indutor no momento adequado (STUDIER, 2005). Devido à praticidade dessa estratégia, a formulação proposta por Studier vem sendo empregada em grande número de estudos visando a produção de proteínas heterólogas em *rE. coli* (BLOMMEL *et al.*, 2007; TYLER *et al.*, 2005).

Tyler *et al.* (2005) comentam que o método de autoindução de síntese de proteína recombinante desenvolvido por Studier (2005) é uma abordagem promissora. Esta abordagem é baseada na preferência seletiva da bactéria para utilizar diferentes fontes de carbono durante o crescimento (TYLER *et al.*, 2005; STUDIER, 2005).

Com o esgotamento da glicose no meio, a bactéria utilizaria alternativamente como fonte de carbono, glicerol ou lactose. A lactose pode suportar o crescimento celular, assim como a indução da expressão do gene heterólogo (NEUBAUER *et al.*, 1991).

Para aplicações de alto rendimento, a abordagem de autoindução (STUDIER, 2004) possui muitas vantagens sobre os tradicionais métodos de indução: não inclusão de indutores químicos tóxicos como o IPTG (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008; HOFFMAN *et al.*, 1995); possibilidade de formular composições do meio para obter o nível desejado de crescimento antes da expressão (XU *et al.*, 2012; STUDIER, 2005); facilidade de controle do cultivo associado com o crescimento e indução (TYLER *et al.*, 2005), sendo que o controle do cultivo é um dos problemas de grande importância na fabricação em larga escala (TRIPATHI *et al.*, 2009).

Apesar de bem sucedidas nos cultivos em frascos agitados, as formulações de autoindução propostas por Studier (2005) contêm baixa concentração de fontes de carbono. Por isso, o escalonamento da estratégia de autoindução para cultivos em biorreator depende da adequação da composição do meio.

Outro aspecto do emprego de meios complexos pouco questionado na literatura é a presença de fontes de nitrogênio de origem animal, como a Triptona, na maioria das formulações. A utilização de derivados de origem animal, como a Triptona, na fabricação de produtos injetáveis para uso humano e veterinário, incluindo medicamentos e vacinas, leva ao risco de transmissão da encefalopatia bovina e naturalmente, de outras encefalopatias espongiiformes transmissíveis (TSE).

As agências reguladoras/fiscalizadoras como a ANVISA, FDA, OMS e EMEA recomendam que os fabricantes tomem medidas para minimizar os riscos de transmissão de TSE através de seus processos (OMS 2006, OMS, 2005; OMS, 2003; ZHANG & GREASHAM, 1999; SOGAL & TOFE, 1999). O uso de meios contendo derivados de origem animal provenientes de rebanhos nascidos e criados em países historicamente livres de registro de transmissão da doença permite minimizar os riscos. Porém as peptonas rastreadas podem custar 2,5 vezes mais do que as de origem vegetal. Além disso, a possibilidade de surgimento de casos de TSE também nessas regiões continua a ser uma preocupação. Portanto, de acordo com as recomendações das boas práticas de fabricação, insumos protéicos de origem animal devem ser evitados na produção de produtos farmacêuticos devido ao risco de conterem príons que podem causar encefalopatia espongiiforme bovina (MACHADO, 2010).

Peptonas derivadas de plantas e meios completamente livres de origem animal são potenciais soluções em longo prazo para substituição de peptonas de origem animal (CLELAND *et al.*, 2007). Por isso, apesar de largamente empregados industrialmente, observa-se a necessidade de desenvolvimento de novas formulações de meios complexos

substituindo as fontes de nitrogênio de origem animal por equivalentes de origem vegetal, normalmente à base de hidrolisados protéicos de soja.

Poucos estudos foram realizados nesse sentido Cleland *et al.*, (2007) caracterizam o crescimento de diversos microrganismos disponíveis em um meio livre de derivados de origem animal. Utilizando câmara incubadora, diversos microrganismos foram avaliados como, por exemplo, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Burkholderia cepacia*, *Candida albicans*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*; Marthos *et al.*, (2011) e Zhang *et al.*, (2012) também realizaram estudos para desenvolvimento de meio livre de compostos de origem animal para cultivos de *Streptococcus pneumoniae*.

2.6 Comentários finais sobre a revisão bibliográfica

O panorama apresentado na revisão bibliográfica em relação à produção de proteínas heterólogas em *E. coli* recombinante empregando sistema de expressão baseado no operon *lac* mostra que, em geral, o estabelecimento das condições de indução (temperatura, tempo, concentração de indutor, meio de cultivo etc) vem sendo realizado em estudos em frascos agitados. Por outro lado, os estudos conduzidos em biorreator focam principalmente na estratégia de cultivo para obtenção de alta densidade celular e, muitas vezes, adotam as condições de cultivo definidas nos estudos em câmara incubadora durante a fase de indução. Constata-se, portanto, a necessidade de incorporação de uma etapa intermediária no escalonamento desse processo visando à realização de estudos específicos da fase de indução em condições mais adequadas de controle do ambiente de cultivo do que as alcançadas nos culturas em câmara incubadora.

Essa etapa intermediária se insere justamente entre os experimentos preliminares em câmara incubadora e os cultivos de alta densidade em biorreator. Nela seria realizado o mapeamento das diversas variáveis relevantes (temperatura, concentração de indutor, concentração de fontes de nitrogênio, pressão seletiva do antibiótico etc) e a seleção das melhores condições para intensificar a produção da proteína recombinante na forma solúvel durante a fase de indução.

Desta forma, o presente trabalho se propõe a contribuir para o desenvolvimento de estratégia de cultivo em biorreator caracterizada pelo uso do meio de autoindução, pelo baixo custo, pela baixa complexidade operacional (operação em batelada) e pela adequação às

normas *GMP*, destinada à identificação das melhores condições de cultivo para a produção da proteína de interesse.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

A linhagem de *Escherichia coli* utilizada foi a BL21(DE3)pET37b+PspA4Pro, que expressa o fragmento da proteína PspA da família 2 e clado 4, contendo a porção N-terminal, a região definidora de clado e a região rica em prolina da molécula. Esta construção foi obtida no Laboratório de Biotecnologia Molecular do Instituto Butantan pela pesquisadora Dra. Eliane N. Miyaji. O vetor pET37b+ contém o promotor T7/lac (induzido por IPTG ou lactose), gene do repressor LacI, sítio de ligação ao ribossomo (RBS), códon ATG de início de tradução, sinal de terminação de transcrição “T7 terminal” e gene de resistência à canamicina.

3.2 Proteína PspA4Pro

A sequência e a composição de aminoácidos do fragmento da PspA4Pro utilizados neste trabalho são apresentados na Figura 3.1 e Tabela 3.1 respectivamente.

FIGURA 3.1. Sequência dos seguintes aminoácidos: ácido glutâmico (E), alanina (A), lisina (K), leucina (L), ácido aspártico (D), asparagina (N), glutamina (Q), valina (V), prolina (P), treonina (T), serina (S), isoleucina (I), tirosina (Y), arginina (R), glicina (G), fenilalanina (F), metionina (M), histidina (H), triptofano (W) e cisteína (C) do fragmento da PspA4Pro (MORENO *et al.*, 2010).

```

      10      20      30      40      50      60
MEEAPVASQS KAEKDYDAAM KKSEAAKKAY EEAKKKAEDA QKKYDEGQKK TEEKARKAEE

      70      80      90      100     110     120
ASKEIAKATS EVQNAYVKYQ RVQRNSRLNE KERKKQLAEI DEEINKAKQI LNEKNEDEFKK

     130     140     150     160     170     180
VREEVIPEPT ELAKDQRKAĒ EAKAEKVAK RKYDYATLKV ALAKSKVEAE EAELDNKAEN

     190     200     210     220     230     240
LQNKVADLEK EIANAECTVĀ DLEKEVAKLĒ KDVEDFKNSĪ GEQAEQYLĀĀ AEKDLVAKKĀ

     250     260     270     280     290     300
ELAEAKIKĀĀ TKKAELEKĀĒ AELENLLSTL̄ DPEGKTQDEL̄ DKEAAEAELN̄ KKVEALQNQV̄

     310     320     330     340     350     360
AELEEEELSKL̄ EDNLKDAETN̄ NVEDYIKEGL̄ EEAIATKKAĒ LEKTQKELDĀ ALNELGPDGD̄

     370     380
EEETPAPAPQ̄ PEKPAPAPAP̄ KP
    
```

TABELA 3.1. Composição de aminoácidos do fragmento da PspA4Pro (EXPASY, 2012).

Aminoácido	Sigla	Quantidade	Porcentagem
Ácido glutâmico	Glu/E	75	19,6
Alanina	Ala/A	64	16,8
Lisina	Lis/K	64	16,8
Leucina	Leu/L	31	8,1
Ácido aspártico	Asp/D	23	6,0
Asparagina	Asn/N	19	5,0
Glutamina	Gln/Q	17	4,5
Valina	Val/V	17	4,5
Prolina	Pro/P	14	3,7
Treonina	Thr/T	12	3,1
Serina	Ser/S	10	2,6
Isoleucina	Ile/I	9	2,4
Tirosina	Tyr/Y	9	2,4
Arginina	Arg/R	8	2,1
Glicina	Gly/G	6	1,6
Fenilalanina	Phe/F	2	0,5
Metionina	Met/M	2	0,5
Histidina	His/H	0	0,0
Triptofano	Trp/W	0	0,0
Cisteína	Cys/C	0	0,0
Totalizando		382	100

As características gerais da PspA4Pro estão apresentadas na Tabela 3.2.

TABELA 3.2. Características gerais da PspA4Pro (EXPASY, 2012)

Massa Molecular (kDa)	42,719
Fórmula	$C_{1846}H_{3036}N_{506}O_{646}S_2$
Número total de átomos	6036

3.3 Meios de cultura

Foram empregados diferentes meios de cultura nas diferentes etapas deste estudo. O meio de cultivo semi-sólido Luria Bertani – Ágar (LB-Ágar) descrito na Tabela 3.3 foi empregado para a ativação das culturas estoque e para a avaliação da estabilidade do plasmídeo. Os experimentos em frascos agitados foram realizados em meio complexo e em meio definido.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

A formulação de meio complexo utilizado tem como base o meio ZYM-5052 desenvolvido por Studier (2005) e modificado por Silva (2011) é apresentada na Tabela 3.4. Além dos componentes originalmente presentes no meio ZYM-5052, foi incorporada tiamina devido ao importante papel desse nutriente, conforme relatado em estudos com o meio definido (SARGO, 2011). A composição para o meio definido é apresentada na Tabela 3.5 e foi proposta por Sargo (2011) a partir das formulações descritas em Korz *et al.* (1995) e Seeger *et al.* (1995).

Os cultivos em câmara incubadora foram realizados com indução através de pulso de lactose (5g/L), para que a fase de indução fosse iniciada com as mesmas concentrações de biomassa para todos os ensaios realizados.

Para a preparação do meio LB-Ágar, os nutrientes descritos na Tabela 3.3 foram dissolvidos em água Milli-Q, misturados por 10min em um agitador e posteriormente autoclavados a 120°C por 30min.

TABELA 3.3. Composição do meio LB-Ágar (SPIEGELEER *et al.*, 2004).

Nutrientes	Concentração (g/L)
Triptona	5
Extrato de Levedura	10
NaCl	10
Ágar	20

Nas preparações dos meios descritos nas Tabelas 3.4 e 3.6, os seguintes reagentes foram autoclavados a 120°C por 30min, separadamente: i) glicose; ii) glicerol; iii) Triptona ou Phytone ou Soytone com extrato de levedura; iv) MgSO₄.7H₂O; v) solução Mx50 (KH₂PO₄, NH₄Cl, Na₂HPO₄, Na₂SO₄); vi) solução de metais (Fe(III)citrato, CoCl₂.6H₂O, MnCl₂.4H₂O, CuCl₂.2H₂O, H₃BO₃, Na₂MoO₄.2H₂O, Zn(CH₃COO)₂.H₂O e EDTA), vii) antiespumante e viii) lactose. A canamicina e a tiamina foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22µm. A solução de canamicina foi adicionada asepticamente ao meio em temperatura ambiente, evitando sua inativação.

TABELA 3.4. Composição do meio de cultura complexo empregados nos experimentos em frascos agitados (formulação do presente trabalho a partir dos meios propostos por Silva, 2011).

Nutrientes	Concentração
Glicose	0,5g/L
Glicerol	5g/L
Lactose (Pulso)	5g/L
Triptona/Phytone/Soytone	10g/L
Extrato de levedura	5g/L
Na ₂ HPO ₄	9g/L
KH ₂ PO ₄	3,4g/L
NH ₄ Cl	2,7g/L
Na ₂ SO ₄	0,7g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (1,0M)	2g/L
Fe(III)citrato	100,8mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	15mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	1,5mg/L
H ₃ BO ₃	3mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,1mg/L
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	33,8mg/L
EDTA	14,1mg/L
Canamicina (30mg/mL)	50mg/mL
Tiamina (45mg/mL)	45mg/mL

No ensaio em frasco agitado utilizando o meio definido, preparou-se uma solução contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido cítrico, ácido bórico e todos os sais descritos na Tabela 3.5, com exceção do sulfato de magnésio e glicerol. Ajustou-se o pH para 6,3 e esterilizou-se esta solução a 120°C por 30min (glicerol e o sulfato de magnésio foram esterilizados separadamente). As soluções de canamicina, tiamina e lactose foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22µm.

TABELA 3.5. Composição do meio definido utilizado nos experimentos em frascos agitados (formulação do presente trabalho a partir do meio proposto por Sargo, 2011).

Nutriente	Concentração
Glicerol	20g/L
Lactose (Pulso)	5g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	4,0g/L
KH ₂ PO ₄	13,3g/L
Ácido Cítrico	1,7g/L
Fe(III) Citrato	100,8mg/L
CoCl ₂ . 6H ₂ O	2,5mg/L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	15,0mg/L
CuCl ₂ . 2H ₂ O	1,5mg/L
H ₃ BO ₃	3,0mg/L
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	2,1mg/L
Zn(CH ₃ COOH) ₂ . 2H ₂ O	33,8mg/L
EDTA	14,1mg/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,2g/L
Tiamina (45mg/mL)	45mg/L
Canamicina (30mg/mL)	50mg/L

Os experimentos em biorreator foram realizados em meio complexo de autoindução, cuja formulação foi proposta no presente trabalho (Tabela 3.6) a partir da composição desenvolvida por Studier (2005), modificada por Silva (2011) e ainda incorporando a tiamina (SARGO, 2011). Em um dos experimentos (Cultivo 4) foi também adicionado um pulso de nutrientes cuja composição está detalhada na Tabela 3.6.

TABELA 3.6. Composição do meio de cultura de autoindução empregada nos experimentos em biorreator (formulação do presente trabalho a partir do meio proposto por Silva, 2011).

Nutrientes	Batelada/Reator (autoindução)	Pulso/Reator (500mL) (Abs _{600nm} \cong 55)
Glicose	10g/L	-
Glicerol	60g/L	28,7g/L
Lactose	20g/L	14,45g/L
Triptona/Phytone/Soytone	10g/L	-
Extrato de levedura	5g/L	-
Na ₂ HPO ₄	9g/L	9g/L
KH ₂ PO ₄	3,4g/L	3,4g/L
NH ₄ Cl	2,7g/L	2,7g/L
Na ₂ SO ₄	0,7g/L	0,7g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O (1,0M)	2g/L	2g/L
Fe(III)citrato	100,8mg/L	100,8mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	2,5mg/L	2,5mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	15mg/L	15mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	1,5mg/L	1,5mg/L
H ₃ BO ₃	3mg/L	3mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,1mg/L	2,1mg/L
Zn(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O	33,8mg/L	33,8mg/L
EDTA	14,1mg/L	14,1mg/L
Canamicina (30mg/mL)	100µg/mL	100mg/L
Tiamina (45mg/mL)	45mg/mL	45mg/L
Antiespumante (30%)	1ml/L	1ml/L

3.3.1 Meios complexos e fontes de nitrogênios estudadas

O meio complexo ZYM-5052, desenvolvido por Studier (2005), assim como o empregado por Silva (2011), contém Triptona na sua formulação original. Em todos os experimentos foi utilizada Triptona LP0042 da marca Oxoid. Segundo o fabricante, este nutriente é uma caseína enzimática hidrolisada através da digestão pancreática da proteína do leite. No presente trabalho, formulações alternativas foram investigadas substituindo-se a Triptona pelos hidrolisados protéicos de soja comerciais PhytoneTM, Peptone, BBLTM e Soytone, Bacto do fabricante BD. De acordo com o fabricante, o produto Phytone é obtido

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

pela digestão do farelo de soja utilizando a enzima papaína de origem vegetal. Já o produto Soytone é resultado da digestão do farelo de soja utilizando uma enzima de origem animal.

As principais características das três fontes de nitrogênio investigadas (Phytone, Soytone e Triptona) são resumidas na Tabela 3.7, juntamente com as do extrato de levedura, também presente no meio complexo. Em termos de nitrogênio total, a Triptona se destaca, apresentando um valor cerca de 30% superior ao apresentado pelos outros nutrientes. Nota-se que o Phytone apresenta teor em carboidratos 34% maior do que o Soytone, enquanto a Triptona não contém carboidratos. O Triptona apresenta teor de cálcio praticamente 2,4 vezes superior ao Soytone e 1,3 vez maior do que a Phytone. Já o teor de magnésio no Phytone é 50% maior do que no Soytone e 12 vezes maior que a Triptona. Em relação ao fosfato, o extrato de levedura é o nutriente que apresenta o maior teor em sua composição, seguido pelo Phytone e pelo Soytone, que também contêm quantidades expressivas deste nutriente. A Triptona não apresenta sódio, cloreto, sulfato e fosfato.

TABELA 3.7. Diferentes fontes de nitrogênio e composição em nitrogênio total, carboidrato total e minerais.

	Extrato de Levedura, Difco	Phytone™ Peptone, BBL™	Soytone, Bacto	Triptona, Oxoid LP0042
Nitrogênio Total (%)	10,7	9	9,4	13,3
Carboidrato Total (mg/g)	108,2	392,9	292,5	-
NaCl (%)	0	4	0,2	0,3
pH	7	7,1	7,2	7,3
Cálcio (µg/g)	191	1001	550	1350
Ferro (µg/g)	57,9	89,8	68,2	54
Magnésio (µg/g)	558	2435	1610	200
Potássio (µg/g)	59240	31547	22200	2000
Sódio (µg/g)	1244	34037	34040	-
Cloreto (%)	0,13	0,76	0,17	-
Sulfato (%)	1,02	0,67	2,33	-
Fosfato (%)	2,7	0,64	0,82	-

Na Tabela 3.8 é apresentada a composição em aminoácidos livres estimada para os meios descritos nas Tabelas 3.4 e 3.6, de acordo com as diferentes combinações de fontes de nitrogênio empregadas, tanto para os cultivos em câmara incubadora com em biorreator. Os valores apresentados na Tabela 3.8 foram estimados a partir das concentrações dos nutrientes e do teor em aminoácidos presente em cada um fornecida pelo Manual do fabricante BD (BD, 2006) inclusive o da Triptona, pois o fabricante Oxoid não possuía uma análise dos aminoácidos livres. Os cultivos realizados com a Triptona apresentaram uma suplementação de todos os aminoácidos com valores maiores ou no mínimo iguais aos realizados com

Phytone e Soytone. Em relação aos hidrolisados protéicos de soja, os meios preparados com Soytone apresentam quantidades de aminoácidos livres maiores ou similares ao Phytone.

TABELA 3.8. Quantidade de aminoácidos totais nos meios de cultivo em câmara incubadora e em biorreator.

Aminoácido (mg)	Extrato de Levedura, Difco + Phytone™		Extrato de Levedura, Difco + Soytone, Bacto		Extrato de Levedura, Difco + Triptona, Bacto	
	Shaker	Biorreator	Shaker	Biorreator	Shaker	Biorreator
Alanina	15	1296	16	1344	22	1632
Arginina	9,75	648	24,75	1368	25,75	1416
Asparagina	4	336	6	432	9	576
Ácido Aspártico	7,25	552	6,25	504	8,25	600
Ácido Glutâmico	20	1776	21	1824	31	2304
Glicina	2,5	144	2,5	144	2,5	144
Histidina	20	1776	19	1728	22	1872
Isoleucina	6,5	528	10,5	720	17,5	1056
Leucina	15	1056	24	1488	55	2976
Lisina	17,5	1104	24,5	1440	60,5	3168
Metionina	3,75	264	4,75	312	11,75	648
Fenilalanina	7,25	600	17,25	1080	35,25	1944
Proline	3,25	264	4,25	312	4,25	312
Serina	6	480	7	528	11	720
Treonina	4,25	360	5,25	408	10,25	648
Tirosina	3,25	216	14,25	744	32,25	1608
Valina	7	624	10	768	23	1392

3.4 Métodos analíticos

3.4.1 Determinação da concentração celular

O crescimento celular foi mensurado através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600nm (Abs_{600nm}), utilizando-se uma pequena alíquota da cultura adequadamente diluída, a fim de se obter uma absorbância máxima por volta de 0,8.

Para os ensaios em biorreator, foi utilizado também o método da massa seca, para estimar a concentração celular (C_x), no qual as amostras foram filtradas a vácuo em membranas a 0,22 μ m (previamente pesadas) posteriormente secas em estufa a 80°C por 24h e pesadas (VAZ, 2008). A formação de biomassa nos ensaios em biorreator ainda foi acompanhada por medidas on-line de permissividade em picofarad/centímetro (pF/cm) utilizando sensor de capacitância (Fogale-Nanotech) (HORTA, 2011).

A partir das medidas de Abs_{600nm} e C_x obteve-se a correlação de $C_x=0,5 * Abs_{600nm}$.

3.4.2 Determinação da concentração de fontes de carbono e de metabólitos

As análises das concentrações de glicerol, glicose, lactose e ácido acético foram realizados em cromatografia líquida de alto desempenho (sistema Waters Co; Bombas 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996) utilizando a coluna Aminex (HPX-87H Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de H₂SO₄ 5mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6L/min, a 50°C.

3.4.3 Determinação da concentração de aminoácidos

As concentrações dos aminoácidos presentes no meio de cultura foram determinadas por cromatografia líquida de alto desempenho (sistema Waters Co; Bombas 510, Injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996) utilizando a coluna Pico Tag (3,9 x 300mm) como fase estacionária e um gradiente variável da solução A (57g de acetato de sódio trihidratado, 3L de água Milli-Q, 1,5mL de trietilamina e 600µL de solução estoque de EDTA em 1000ppm) para a solução B (900mL de acetonitrila, 600mL de água Milli-Q e 300µL de solução estoque de EDTA em 1000ppm) como fase móvel, a uma vazão de 1 - 1,5mL/min, a 36°C.

3.4.4 Determinação da estabilidade do plasmídeo

A estabilidade do plasmídeo, que é essencial para a produção da proteína recombinante, foi determinada antes da indução e periodicamente ao longo da fase de indução.

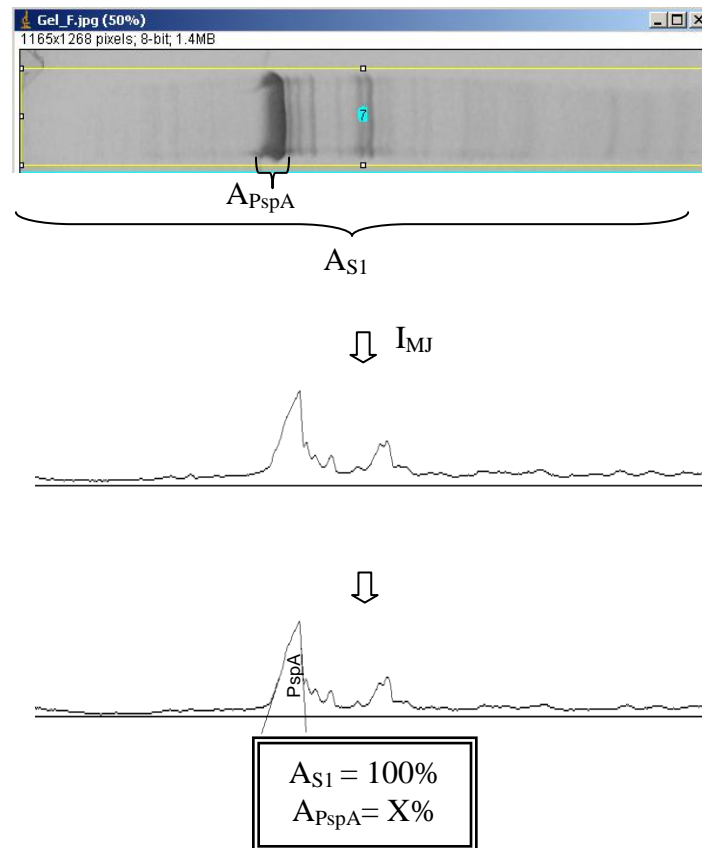
Uma amostra de 100µL da suspensão celular retirada da cultura de forma estéril foi diluída entre 10⁶ e 10⁸ e semeada em uma placa de LB-Ágar sem canamicina. Após 24 horas de incubação a 37°C, 50 ou mais colônias foram repicadas para uma placa de LB-Ágar contendo 25mg/L de canamicina. O mesmo procedimento também foi realizado para outra placa idêntica, mas sem o antibiótico (controle). A porcentagem de colônias que cresceu na placa com o antibiótico em relação às que cresceram na placa controle foi calculada a fim de se obter uma estimativa da estabilidade do plasmídeo.

3.4.5. Estimativa da concentração de PspA4Pro solúvel

Amostras de biomassa retiradas ao longo do cultivo, antes e durante a fase de indução, foram utilizadas para avaliação da expressão da PspA. Durante todo o procedimento em bancada as amostras ficaram no gelo. Essas alíquotas (2mL para cada amostra) foram centrifugadas por 5min em 12000rpm a 4°C, a fim de se separar as células do meio. O sobrenadante foi descartado e o corpo de fundo ressuscitado em 3mL de tampão Tris (Tris 20mM, NaCl 250mM, pH 8,0). Em seguida, a suspensão foi misturada, com o auxílio de um agitador de vórtice, até ficar homogênea e sonicada durante 5min com pulsos de 30s com intervalos de 30s, utilizando uma amplitude de 20%. Depois disso, a suspensão resultante foi centrifugada por 70min em 4000rpm a 4°C, gerando as frações do sobrenadante S1 e precipitado P1. O sobrenadante S1 foi adequadamente diluído e ressuscitado em 3mL de tampão Tris para a quantificação da concentração total de proteína solúvel presente pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Outra alíquota de S1 foi adicionada ao tampão de Laemmli (LAEMMLI *et al.*, 1970), na proporção de 20 partes de amostra para 10 partes de tampão. O precipitado P1 foi ressuscitado em 3mL de tampão Tris e foi adicionado o tampão de Laemmli, aquecido em banho-maria por 20min e posteriormente centrifugado por 5min a 12000rpm a 4°C, gerando as frações sobrenadante S2 e precipitado P2. Um volume de 20 μ L das soluções S1 e S2 foram então aplicados em gel de poliacrilamida a 12%. Ao final do processo de deslocamento da proteína pelo gel, o mesmo foi corado com Coomassie Blue R-250.

Finalmente, para a quantificação da concentração da proteína PspA4Pro solúvel, a imagem do gel resultante da aplicação da amostra do sobrenadante S1 foi digitalizada e analisada pelo *software* ImageJ (ABRAMOFF *et al.*, 2004). Neste software, a imagem digital do gel é processada gerando curvas cujos picos são proporcionais à largura e a intensidade de coloração das bandas correspondentes às proteínas presentes na amostra sob análise (I_{MJ}). O programa utiliza integrações simples para transformar as áreas sob as curvas em valores numéricos. Somando-se as áreas de todos os picos obtidos é possível estabelecer o valor numérico que corresponde à concentração de proteínas totais observadas no gel (A_{S1}). Quantificando, apenas a área sob a curva correspondente à proteína recombinante de interesse, obtém-se o valor representativo desta proteína (A_{PspA}). A partir destes dois valores calcula-se a fração relativa da proteína recombinante, como mostra a Figura 3.2.

FIGURA 3.2. Cálculo da porcentagem relativa da PspA4Pro solúvel (A_{PspA}) em relação as proteínas totais solúveis, obtidas no gel de eletroforese (A_{S1}). Quantificação da área através da curva obtida pelo *software* Image J (I_{MJ}).



Com esta relação (%PspA4Pro) foi possível estimar a concentração de proteína solúvel de PspA4Pro ($C_{PspA4Pro}$) em cada amostra, multiplicando-se pela concentração de proteína solúvel total (S1) correspondente (quantificada pelo método de Bradford) e dividindo por 100, conforme mostra a Equação 1.

$$C_{PspA4Pro} = \frac{(S1 \cdot \% PspA4Pro)}{100} \quad (1)$$

Sendo:

$C_{PspA4Pro}$ = Concentração de PspA4Pro solúvel Total (g/L).

S1 = Concentração de Proteínas totais solúveis, quantificadas pelo método de Bradford (g/L).

%PspA4Pro = Fração relativa de PspA4Pro da amostra (%).

Os géis produzidos com as amostras do sobrenadante S2, resultante da desnaturação completa das proteínas insolúveis presentes em P1, foram analisados qualitativamente.

3.5 Procedimento experimental

3.5.1 Preparação da cultura de estoque em criotubos

As suspensões foram obtidas por meio de cultivos em Erlenmeyers de 500mL com 50mL de meio definido (Tabela 3.5). Com uma alça de platina, uma colônia foi isolada da placa de LB-Ágar (com canamicina) e semeada em meio líquido estéril. Os frascos foram deixados em câmara incubadora rotativa a 300rpm e 30°C. Quando se atingiu uma Abs_{600nm} de aproximadamente 1, interrompeu-se o cultivo e um volume de 20mL de meio foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 10mL de meio fresco. Como crioprotetor foi adicionado glicerol em volume e concentração adequados para se obter uma solução final com 10% v/v de glicerol. Em seguida as soluções foram transferidas para o criotubos e estocadas a -80°C.

3.5.2 Semeadura de *Escherichia coli* em meio semi-sólido

A suspensão de células armazenada sob congelamento a -80°C com 10% v/v de glicerol foi estriada em uma placa de Petri com LB-Ágar e 25 mg/L canamicina (LB-Ágar/can) e, em seguida, incubada por 24horas a 37°C.

3.5.3 Preparação do inóculo

Um total de 2 Erlenmeyers estéreis de 500mL foram preenchidos com 50mL de meio complexo, contendo a mesma fonte de nitrogênio a ser utilizada no cultivo. Com uma alça de platina, uma colônia da placa LB-Ágar/can, preparada no dia anterior (item 3.5.2), foi semeada em cada frasco. Os frascos foram deixados em uma câmara incubadora rotativa a 300rpm e 37°C por cerca de 6h, com acompanhamento periódico do crescimento por meio de medida de absorbância (não ultrapassando uma absorbância máxima de 2,5) e foram transferidos para a câmara incubadora ou para o biorreator.

3.5.4 Cultivos em câmara incubadora

Um total de 11 ensaios em câmara incubadora foram realizados com o objetivo de estudar a influência do meio, da temperatura e das diferentes fontes de nitrogênio na produção de proteína PspA4Pro. A Tabela 3.9 resume os ensaios realizados e as condições empregadas em cada um.

TABELA 3.9. Resumo dos ensaios realizados em câmara incubadora e as condições empregadas em cada um. Cultivos 2 a 11 também continham extrato de levedura como fonte de nitrogênio

Ensaio	Meio de cultivo	Fonte de Nitrogênio	T°C de Indução
1	Definido	(NH ₄) ₂ HPO ₄	31
2	Complexo	Triptona	31
3	Complexo	Phytone	25
4	Complexo	Phytone	31
5	Complexo	Phytone	37
6	Complexo	Triptona	25
7	Complexo	Triptona	31
8	Complexo	Triptona	37
9	Complexo	Soytone	25
10	Complexo	Soytone	31
11	Complexo	Soytone	37

Todos os ensaios em câmara incubadora foram realizados de acordo com o procedimento descrito a seguir. Foi retirado um volume previamente determinado do inóculo com absorbância entre 2 e 2,5 (fase exponencial do crescimento) e adicionado em um Erlenmeyer estéril de 500mL, contendo 50mL de meio batelada (Tabelas 3.4 ou 3.5), de acordo com o estudo conduzido. O volume retirado foi calculado em função da absorbância medida no inóculo de forma a resultar em absorbância inicial 0,1 no frasco de cultivo. Os experimentos foram realizados a 300rpm e à temperatura de 37°C, até um valor de absorbância entre 2,0 e 2,5 quando foi realizada a adição de 5g/L de lactose por pulso, dando início à fase de indução. Neste momento, a temperatura foi reduzida para 25, 31 ou 37°C, mantendo-se a agitação. Acompanhou-se a Abs_{600nm} em intervalos de 1h (item 3.4.1) e a produção de proteína (item 3.4.5) antes da indução e depois da adição de lactose a cada 2h. Também foram coletadas amostras para determinação aminoácidos no meio puro (sem *E. coli*) antes da indução e após a mesma, em intervalos de 6h, pela metodologia descrita no item

3.4.3. A estabilidade do plasmídeo (item 3.4.4) foi avaliada em amostra coletada imediatamente antes da indução e depois da mesma, a cada 4h. A concentração de fontes de carbono e de ácidos orgânicos (item 3.4.2) foi determinada antes da indução e após a adição do pulso de lactose a cada 6h.

3.5.5 Ensaio em biorreator

Quatro experimentos em batelada com o meio de autoindução foram realizados em biorreator de bancada de 5L. Os experimentos foram conduzidos com meios de cultivo descrito na Tabela 3.6 contendo Triptona ou Phytone como fontes de nitrogênio. Os objetivos de cada ensaio e suas principais características são descritas na Tabela 3.10.

TABELA 3.10. Resumo dos cultivos realizados em biorreator, com seus objetivos e suas principais características. Todos os cultivos também continham extrato de levedura como fonte de nitrogênio.

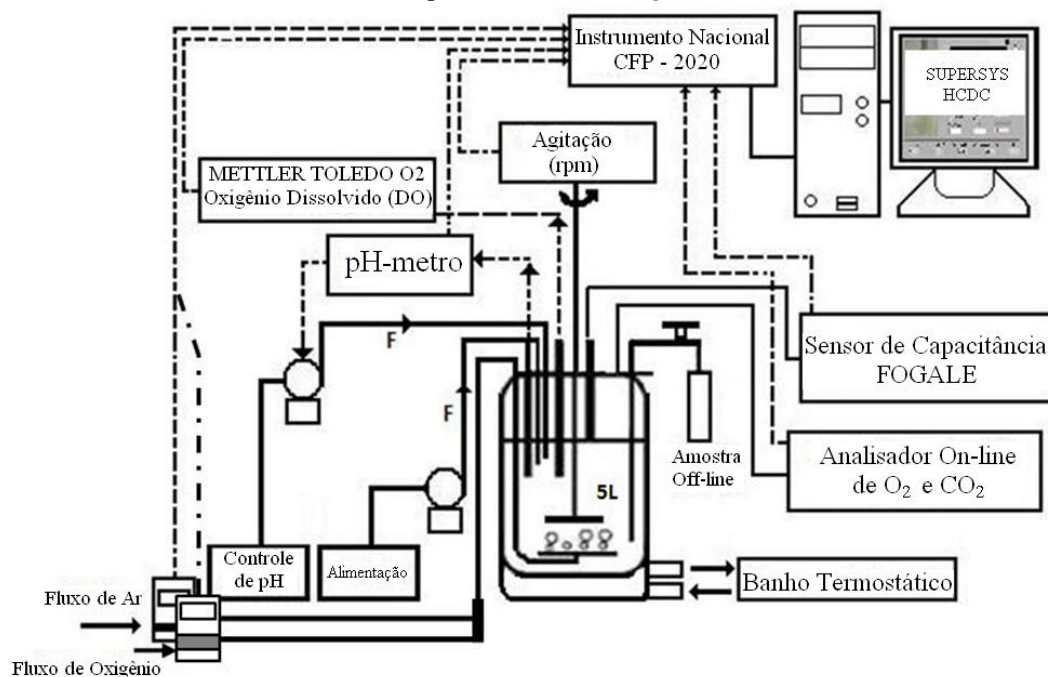
Cultivo	Objetivo	Fonte de Nitrogênio	T°C de Cultivo	T°C de Indução
1	Avaliar produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator conduzido com fonte de nitrogênio de origem vegetal	Phytone	31	25
2	Avaliar produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator conduzido com fonte de nitrogênio de origem vegetal	Phytone	31	31
3	Avaliar produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator conduzido com fonte de nitrogênio de origem animal	Triptona	31	31
4	Avaliar ocorrência de limitação por glicerol e lactose na síntese de proteína recombinante.	Phytone	31	31

Todos os cultivos em biorreator foram realizados utilizando o aparato experimental ilustrado na Figura 3.3, de montagem própria no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LADABio - do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos). O sistema para aquisição, monitoramento e controle do reator é formado pelos seguintes acessórios: computador e *software* SUPERSYS HCDC desenvolvido em Labview pela equipe de pesquisadores do LADABio (HORTA, 2011); compact Field Point (cFP), da National Instrument, para a

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

comunicação entre os instrumentos e o computador; inversor de frequência para o controle da velocidade de agitação via computador/cFP; bomba de alimentação ISMATEC controlada via computador/cFP; pHmetro GLI com aquisição via cFP; transmissor da concentração de oxigênio dissolvido (modelo CE, O₂ 4050) com aquisição via cFP; analisador de gases (Sick/MAIHAK S710) com aquisição digital direta via RS232 e também analógica via cFP; banho térmico; termopar com aquisição via cFP; bombas de ácido e base (Masterflex) com controle on/off via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa (GFC AALBORG) empregados para suprir ar e oxigênio controlados remotamente via cFP; um sensor de biomassa baseado em capacitância (FOGALE nanotech) com aquisição analógica via cFP e digital via RS232. Todos os instrumentos listados apresentaram a aquisição de dados em tempo real, com intervalo de salvamento escolhido de 10 segundos.

FIGURA 3.3. Esquema do biorreator com o sistema de aquisição e controle das variáveis do processo (Fonte: Sargo, 2011).



Para dar início aos cultivos, o volume inicial de 4,5L do meio de batelada descrito na Tabela 3.6, presente no biorreator, foi inoculado com $\cong 300\text{mL}$ de inóculo cultivado conforme descritos nos itens 3.5.2 e 3.5.3, o qual foi transferido quando alcançou $\text{Abs}_{600\text{nm}} \cong 2,0$. O volume transferido foi calculado para resultar em Abs inicial no reator de 0,1. Em todos os experimentos foram adotadas as seguintes condições de cultivo: temperatura de cultivo (até a indução) igual a 31°C e temperatura durante a indução de 25 ou 31°C (Tabela

3.10); pH de 6,8 (antes da indução) e 6,9 (depois da indução); concentração de oxigênio dissolvido controlada em 30% da saturação; vazão total de gás (ar + oxigênio puro) máxima igual a 4,5L/min. O controle de pH foi realizado automaticamente por meio de adição de solução de hidróxido de amônia. O controle da concentração de oxigênio dissolvido foi realizado automaticamente através do software SuperSys_HCDC® por meio da manipulação da velocidade de agitação entre 150 e 950 rpm integrada ao enriquecimento gradativo do ar com oxigênio puro (HORTA, 2011).

Todos os cultivos foram acompanhados por meio de amostragens em intervalos de 1h para a determinação da Abs (item 3.4.1) e da concentração de carboidratos e ácidos orgânicos (item 3.4.2). A concentração de aminoácidos foi determinada pela metodologia descrita em 3.4.3 utilizando amostras coletadas a cada 2h. A produção de proteína (item 3.4.5) foi acompanhada em amostras retiradas a cada 3h (desde o início do cultivo). Amostras para avaliação da estabilidade do plasmídeo (item 3.4.4) e a determinação da concentração celular pelo método da massa seca (item 3.4.1) foram coletadas a cada 4h.

3.6 Determinação de parâmetros cinéticos, rendimentos, velocidades de consumo e produtividade de proteína

Para facilitar a comparação entre as diferentes condições estudadas, os dados obtidos nos cultivos em câmara incubadora e em biorreator foram utilizados para obter várias grandezas relacionadas ao crescimento (velocidade específica de crescimento), à conversão de substratos em biomassa (rendimentos), à produção de proteína (produtividade volumétrica) e ao consumo dos nutrientes (velocidades de consumo). Os procedimentos utilizados nesses cálculos são detalhados a seguir.

3.6.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 2.

$$\frac{d(Cx.V)}{dt} = \mu.Cx.V \quad (2)$$

Considerando μ na fase exponencial de crescimento, temos que:

$$\mu = \left(\frac{1}{Cx} \right) \frac{dCx}{dt} \quad (3)$$

Rearranjando, temos:

$$\mu \cdot dt = \frac{dCx}{Cx} \quad (4)$$

Quando a velocidade específica de crescimento é máxima, $\mu = \mu_{\max}$ (constante) a Equação 4 pode ser integrada, resultando em

$$\mu_{\max} = \frac{\ln(Cx/Cx_0)}{t - t_0} \quad (5)$$

Nas equações 2 a 5, μ é a velocidade específica de crescimento, μ_{\max} a máxima velocidade específica de crescimento, observada na fase exponencial. O intervalo de tempo “ $t - t_0$ ” corresponde exatamente ao período da fase exponencial; “ Cx_0 ” seria a concentração celular no início da fase *log*, enquanto “ Cx ” seria a concentração celular até o final da fase *log* (BASTOS, 2010). A Equação 5 é linear permitindo o cálculo de μ_{\max} através do método dos mínimos quadrados.

É importante destacar que apenas os dados representativos do crescimento, ou seja, coletados antes do consumo intenso de lactose ser observado, foram utilizados para cálculo do μ_{\max} .

3.6.2 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato em células

O coeficiente de rendimento é definido com base no consumo de um material para a formação de outro, tratando-se de parâmetros relacionados com a estequiometria. Assim para o cálculo de coeficiente de rendimento temos:

$$Y_{x/s} = \frac{Cx - Cx_0}{Cs_0 - Cs} \quad (6)$$

$Y_{x/s}$ é definido como o coeficiente de rendimento de substrato em células. O valor desse parâmetro varia ao longo de um cultivo, alcançando o valor máximo durante a etapa de crescimento exponencial em cultivos descontínuos ou batelada (BASTOS, 2010).

Sendo,

$Y_{x/s}$ = Coeficiente de rendimento de substrato em células (gMS/g_{substrato})

C_x = Concentração celular variando com o tempo durante a fase exponencial (gMS/L)

C_{x_0} = Concentração de biomassa celular no início da fase exponencial (gMS/L)

C_{s_0} = Concentração de substrato no início da fase exponencial (g_{substrato}/L)

C_s = Concentração de substrato variando com o tempo durante a fase exponencial (g_{substrato}/L)

A partir dos dados representando o consumo de glicerol e glicose e a produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, foi possível calcular o valor do $Y_{x/s}$ (Equação 6) através do método dos mínimos quadrados.

É importante destacar, novamente, que apenas os dados representativos da fase de formação de biomassa, ou seja, coletados antes do consumo intenso de lactose ser observado, foram utilizados para cálculo do $Y_{x/s}$.

3.6.3 Determinação da produção específica e da produtividade volumétrica

Os valores de produção específica (PE) e da produtividade volumétrica (Pr) foram calculados a partir das medidas de concentração da proteína solúvel (3.4.5) e da concentração celular (3.3.1), utilizando-se as equações 7 e 8, respectivamente.

$$PE = \frac{m_{P_{spA}}}{m_X} \quad (7)$$

Sendo,

PE = Produção específica (mg PspA/g MS)

$m_{P_{spA}}$ = massa de PspA (mg) presente no sobrenadante obtido a partir do lisado

m_X = massa celular (gMS) presente na suspensão lisada por sonicação

$$Pr = \frac{C_{PspA}(mg/L)}{\Delta t_{indução}(h)} \quad (8)$$

$$C_{PspA} = PE \cdot C_X \quad (9)$$

Sendo,

Pr = Produtividade volumétrica (mg PspA/Lh)

C_X = Concentração de biomassa na amostra retirada do biorreator ou do frasco agitado (gMS/L)

C_{PspA} = Concentração de PspA solúvel (mg/L)

$\Delta t_{indução}$ = Variação do tempo de indução (h)

3.6.4 Velocidade média de consumo de aminoácidos

A velocidade média de consumo de aminoácidos foi estimada a partir das análises de cromatografia líquida de alto desempenho (item 3.4.3) e da concentração celular (item 3.4.1), utilizando-se a Equação 10.

$$Vaai = \frac{\Delta Caai}{\Delta t} \cdot \frac{1}{\overline{Cx}} \quad (10)$$

Sendo,

Vaai = Velocidade média de consumo de aminoácido (mmol/gMS.h)

$\Delta Caai$ = Variação de aminoácidos (mmol)

Δt = Variação de tempo de cultivo (h)

\overline{Cx} = Média da concentração celular (g/L)

3.6.5 Velocidade de consumo de substratos

A velocidade média de consumo de glicerol, glicose e lactose nos cultivos em biorreator foi estimada por regressão linear a partir dos dados representando a variação da concentração da respectiva fonte de carbono com o tempo por meio da Equação 11, resultante do balanço material para o substrato em reator batelada. Para a estimativa de r_{Si} foram utilizados apenas os dados pertencentes à fase de consumo mais intenso de cada fonte de carbono.

$$r_{Si} = -\frac{dC_{Si}}{dt} \quad (11)$$

Onde r_{Si} refere-se à velocidade de consumo (g/L.h), C_S à concentração do substrato (g/L) e o sub-índice “i” está associado ao respectivo substrato (glicose, glicerol ou lactose).

3.6.6 Vazão molar de CO₂ produzido e número de moles de CO₂

acumulado

A vazão molar de CO₂ produzido foi calculada aplicando-se a lei dos gases ideais (Equação 12), utilizando-se os dados adquiridos em tempo real pelo software SuperSys_HCDC® (Figura 3.3).

$$\dot{n}_{CO_2} = Y_{CO_2} \cdot \frac{P}{R \cdot T} \cdot Q_{gás_saída} \quad (12)$$

Onde \dot{n}_{CO_2} é a vazão molar de CO₂ produzido (mol/h), P e T referem-se à pressão e à temperatura nas CNTP, $Q_{gás_saída}$ à vazão total dos gases na saída do reator e Y_{CO_2} a fração molar de CO₂. A vazão de gás na saída do reator, por sua vez, foi estimada a partir do balanço material para o gás inerte N₂, conforme mostra a Equação 13.

$$Q_{gás_saída} = Q_{ar_entr} \cdot \frac{0.79}{1 - Y_{CO_2} - Y_{O_2}} \quad (13)$$

Onde Q_{ar_entr} é a vazão volumétrica da corrente de ar alimentada ao reator (L/h) enquanto Y_{CO_2} e Y_{O_2} referem-se às frações molares de CO₂ e O₂ no gás de saída medidas pelo analisador de gases.

Finalmente, o número de moles de CO₂ acumulado com o tempo (n_{CO_2}) foi determinado por meio da integração da vazão molar de CO₂ (Equação 14).

$$n_{CO_2} = \int_0^t \dot{n}_{CO_2} dt \quad (14)$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios preliminares em frascos agitados

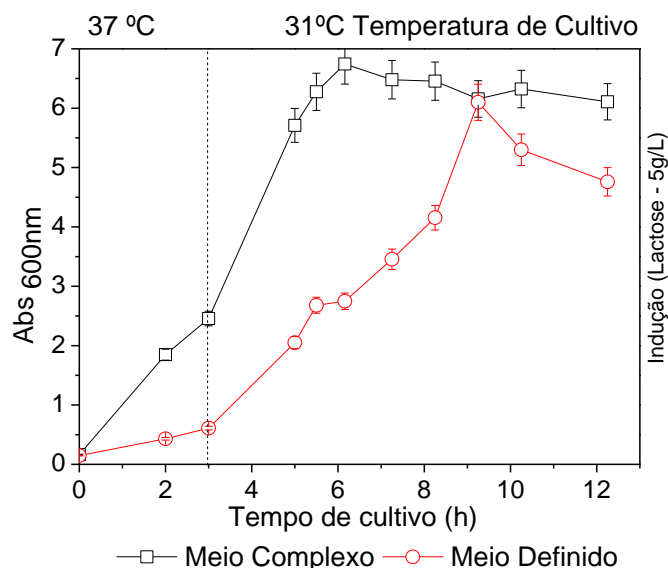
4.1.1 Ensaios 1 e 2. Influência do meio de cultivo sobre o crescimento celular e a expressão da PspA4Pro

Este ensaio teve como objetivo comparar dois meios: meio definido (Tabela 3.5) proposto por Korz *et al.*, (1995) e Seeger *et al.*, (1995) e modificado por Sargo (2011) e o meio complexo proposto por Studier (2005) e modificado por Silva (2011) Tabela 3.4.

A Figura 4.1 mostra a curva de crescimento para os dois meios de cultivo utilizando lactose como indutor. A concentração celular máxima alcançada foi de $3,6 \pm 0,1$ g/L (meio definido) e $3,9 \pm 0,1$ g/L (meio complexo). As velocidades máximas específicas de crescimento foram de $0,48 \pm 0,04$ h⁻¹ e $0,9 \pm 0,2$ h⁻¹ para o meio definido e complexo, respectivamente. Essa grande diferença nas velocidades de crescimento é consequência da presença de nutrientes ricos em aminoácidos e proteínas no meio complexo, que são facilmente assimilados pela célula, permitindo um crescimento mais rápido. Devido à maior velocidade de crescimento, a produtividade de biomassa também foi superior no meio complexo, que alcançou a concentração celular máxima ~ 3,8h antes do cultivo em meio definido. Outra constatação importante refere-se à retenção do plasmídeo, que após 8 horas de indução atingiu um valor de apenas 48% no meio definido e de 82% no meio complexo. Esse resultado também pode ser atribuído à presença dos nutrientes no meio complexo, que contribuem para aliviar o estresse causado pela sobrecarga metabólica gerada pela síntese da proteína de interesse, reduzindo assim a perda de plasmídeo pelas células.

Quanto à síntese da proteína PspA4Pro, o meio complexo mostrou-se novamente superior, com produção máxima de proteína de 190 ± 6 mg de PspA4Pro/g MS, a qual foi, aproximadamente, 42% superior ao alcançado no meio definido. Ambos os valores foram obtidos após 6h de indução.

FIGURA 4.1. Curvas de crescimento da *rE. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro em meio complexo (Tabela 3.4) e em meio definido (Tabela 3.5) para produção de PspA4pro induzida pela adição de lactose 5g/L (momento de indução e mudança de temperatura de cultivo indicados pela linha vertical). As barras de erro referem-se ao desvio padrão (experimento em triplicata – meio complexo) e ao desvio padrão das análises (leitura da absorbância em duplicata – meio definido).



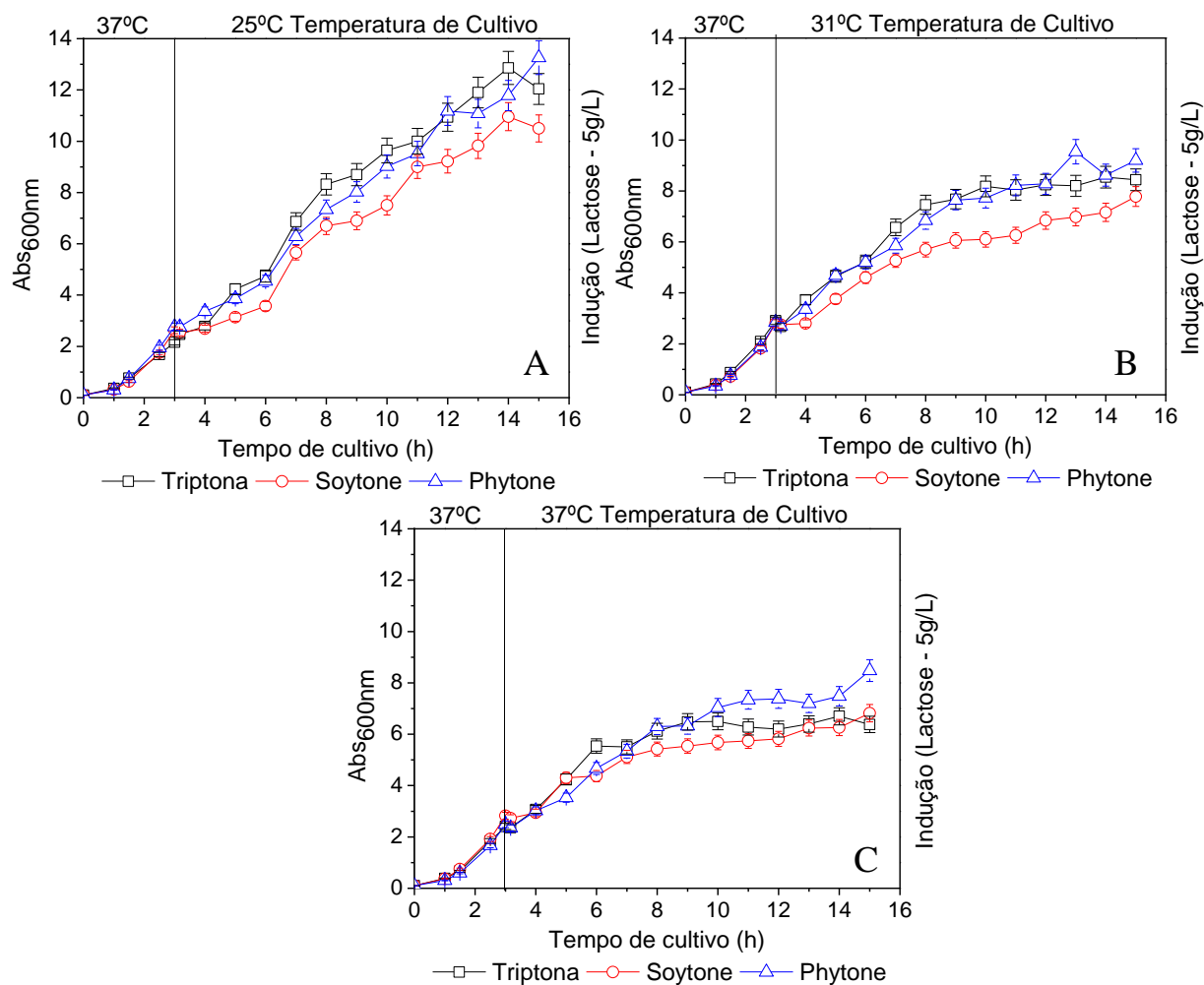
4.1.2 Ensaio 3 a 11. Influência da temperatura e das fontes de nitrogênio sobre o crescimento e a expressão da PspA4Pro

Nestes ensaios, o objetivo foi avaliar o crescimento e a produção da proteína PspA4Pro solúvel conduzidos em três temperaturas (25, 31 e 37°C) para as três diferentes fontes de nitrogênio investigadas (Tryptona, Soytone e Phytone).

Na Figura 4.2 é possível observar as curvas de crescimento celular (Abs_{600nm}) para as diferentes fontes de nitrogênio (Tryptona, Soytone e Phytone) nas temperaturas 25, 31 e 37°C. Nas temperaturas de 25 e 31°C, os meios contendo Phytone e Tryptona apresentaram perfis de crescimento semelhantes e superiores ao observado com Soytone. Já a 37°C, 6h após o início da indução, a curva de crescimento do cultivo com Phytone se manteve superior a dos cultivos com as outras fontes de nitrogênio. Na temperatura de 25°C foi observada a maior formação de biomassa, atingindo valores de Abs_{600nm} final após de 12h de indução de $13,3 \pm 0,7$, $12,0 \pm 0,6$ e $10,5 \pm 0,5$, nos cultivos com Phytone, Tryptona e Soytone, respectivamente. Essa maior formação de biomassa está provavelmente relacionada ao menor acúmulo de ácido acético devido à menor velocidade de crescimento a 25°C. De fato, a

concentração final de ácido acético foi de $\sim 0,5\text{g/L}$ nos experimentos realizados a 25°C , enquanto nos experimentos a 37°C ficou entre $1,7$ e $2,7\text{g/L}$.

FIGURA 4.2. Curvas de crescimento celular ($\text{Abs}_{600\text{nm}}$) nas diferentes fontes de nitrogênio (Tryptona – desvio padrão triplicata, Soytone e Phytone - desvio padrão das análises) nas temperaturas 25 , 31 e 37°C . A linha vertical indica o momento de adição do pulso de lactose (concentração final de 5g/L) e mudança de temperatura (com exceção da temperatura 37°C).



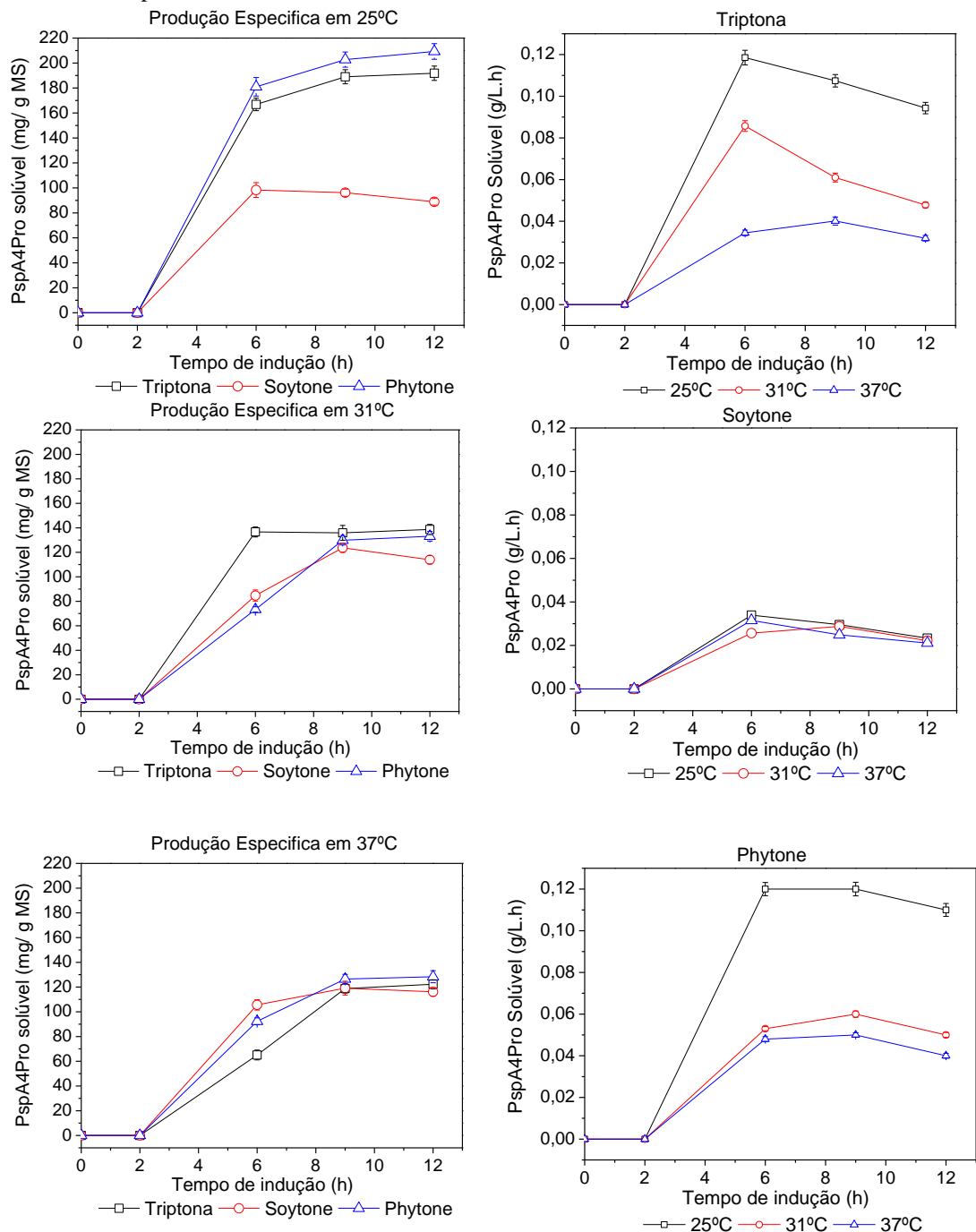
A Figura 4.3 mostra os perfis de produção específica da proteína recombinante solúvel para as diferentes condições de cultivo estudadas. Como esperado, a produção específica aumenta com o tempo de indução, estabilizando após um período entre 6 e 9h, dependendo da condição de indução imposta. Observa-se ainda que a temperatura de 25°C proporcionou uma maior produção específica de PspA4Pro solúvel para as fontes de nitrogênio Phytone e Tryptona, alcançando respectivamente os valores de 209 ± 6 e $192\pm 5\text{mg/g MS}$. Para o Soytone, o maior valor de $124\pm 3\text{mg PspA4Pro solúvel/g MS}$ foi observado na temperatura de 31°C . Segundo Zhang *et al.*, (2003) temperaturas mais altas podem afetar a

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

produção de proteína recombinante, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e, conseqüentemente, a produção de proteína.

Os perfis de produtividade em termos de PspA4Pro solúvel são também apresentados na Figura 4.3, os quais apresentam, em geral, um máximo após 6h de indução. As maiores produtividades ($0,120 \pm 0,003 \text{ g PspA4Pro/L.h}$) foram observadas na temperatura de 25°C para Phytone e Triptona, sendo reduzida à metade no cultivo conduzido com Soytone.

FIGURA 4.3. Perfis de produção específica e produtividade da proteína PspA4Pro durante os cultivos com diferentes fontes de nitrogênio para as diferentes temperaturas de indução. Ensaios com Triptona realizados em duplicata. Para os demais ensaios, o desvio padrão refere-se às duplicatas das análises.



A diferença de produção específica e produtividade de proteína solúvel, observada nos ensaios nas diferentes temperaturas está relacionada com a formação de ácido acético (Tabela 4.1) e com a instabilidade do plasmídeo (Figura 4.4). Na Tabela 4.1 podemos observar, que para todas as fontes de nitrogênio, quanto maior a temperatura maior a produção de ácido acético. A 25°C, a concentração de ácido acético não ultrapassa 1,1g/L, independentemente da fonte de nitrogênio empregada. Já a 31°C, a concentração em g/L aumenta para 1,843±0,09 (Tryptona), 1,291±0,06 (Soytone) e 1,528±0,07 (Phytone). A 37°C, concentrações mais altas de ácido acético são formadas, principalmente no cultivo com a Tryptona (2,674±0,1g/L). O glicerol e a lactose não foram limitantes para a expressão de PspA4Pro, as concentrações finais (12h de indução) de glicerol e lactose dos 9 ensaios realizados permaneceram, respectivamente, de acima de 10g/L e 0,2g/L.

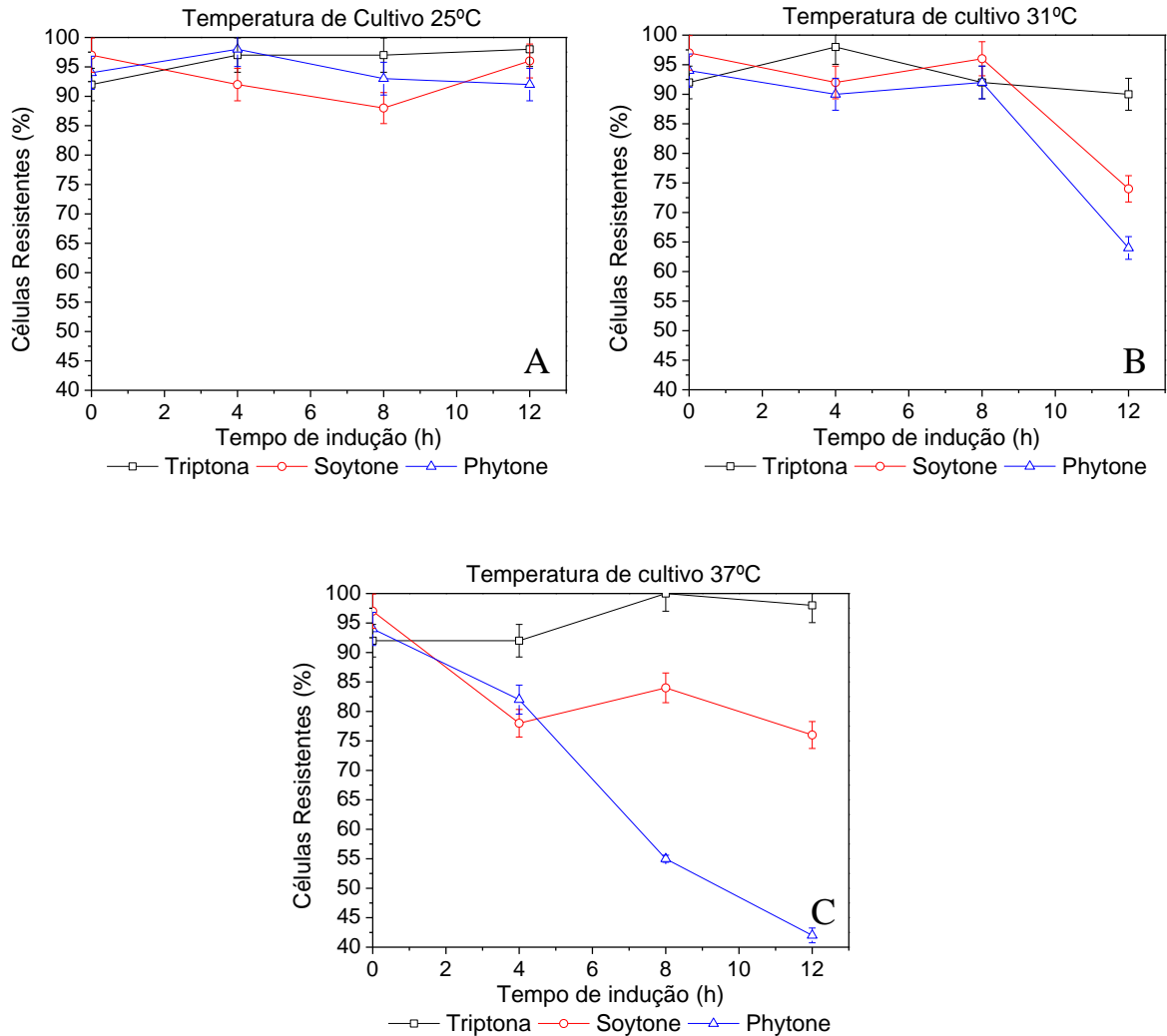
TABELA 4.1. Concentrações máximas de ácido acético nos cultivos realizados com as diferentes fontes de nitrogênio em diferentes temperaturas. (os ensaios com Tryptona foram realizados em duplicata, os demais possuem o desvio padrão das duplicas do tempo 0 de indução).

Concentração Máxima de Ácido Acético produzida (g/L)			
Temperatura de indução (°C)	Fonte de Nitrogênio		
	Tryptona	Soytone	Phytone
25	1,10±0,05	0,87±0,04	0,82±0,04
31	1,84±0,09	1,28±0,06	1,53±0,07
37	2,67±0,1	1,93±0,09	1,67±0,08

A estabilidade do plasmídeo foi influenciada tanto pela temperatura quanto pela fonte de nitrogênio empregada. Na presença de Tryptona, a estabilidade do plasmídeo manteve-se acima de 90% em todas as temperaturas estudadas. Já para os hidrolisados protéicos de soja, a estabilidade manteve-se acima de 90% durante toda a fase de indução a 25°C, diminuindo para a faixa de 60 a 75% após 12h de indução a 31 ou 37°C. A menor retenção do plasmídeo está provavelmente relacionada ao metabolismo mais acelerado nas temperaturas mais elevadas, acentuando o problema de formação de células filhas que não carregam o plasmídeo (RINAS, 1996).

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

FIGURA 4.4. Células resistentes das diferentes fontes de nitrogênio nas diferentes temperaturas.



É interessante notar que apesar da excelente retenção de plasmídeo observada nos experimentos com Tryptona (Figura 4.4), a produção de proteína recombinante (Figura 4.3) diminuiu nos cultivos realizados a 31 e 37°C, provavelmente devido à maior produção de ácido acético observada com essa fonte de nitrogênio (Tabela 4.1). Segundo Rinas (1996), o ácido acético afeta o enovelamento correto da proteína. Assim, na presença de maior concentração de ácido acético, a PspA4Pro pode ter sido sintetizada como corpo de inclusão (insolúvel) ou de forma incompleta, explicando a diminuição da produção de proteína solúvel mesmo com uma boa retenção de plasmídeo.

Já para os experimentos com os hidrolisados de proteína de soja, a diminuição na produção de proteína observada nos experimentos a 31 e 37°C (Figura 4.3) acompanhou o perfil de estabilidade do plasmídeo (Figura 4.4).

A partir dos dados obtidos pela análise das concentrações de aminoácidos (item 3.4.3), durante os experimentos realizados em câmara incubadora, foi calculada a velocidade média de consumo de cada aminoácido (Equação 10) e identificados os aminoácidos mais consumidos. A maior velocidade de consumo dentre todos os aminoácidos, em cada ensaio, foi tomada como referência e foram identificados como aminoácidos mais consumidos aqueles que apresentaram velocidade média de consumo maior de 60% do valor de referência (para cada ensaio).

A estimativa da velocidade média de consumo dos aminoácidos foi feita com os dados obtidos no período de 0-3h de cultivo, devido ao esgotamento da maioria dos aminoácidos durante esse período. Portanto, a avaliação do consumo de aminoácidos se restringe à fase de crescimento, a qual foi conduzida à temperatura de 37°C (Figura 4.2) nas três primeiras horas de cultivo, para todas as fontes de nitrogênio estudadas.

A Tabela 4.2 reuni os valores de velocidade média de consumo dos aminoácidos (em mmol/ gMS.h) estimados nos 3 experimentos realizados para cada fonte de nitrogênio. A partir das médias apresentadas na penúltima coluna Tabela 4.2, verifica-se que os aminoácidos mais consumidos foram (em ordem decrescente):

- para a Triptona: serina, lisina, ácido glutâmico, leucina e arginina;
- para o Phytone: asparagina e serina;
- para o Soytone: serina, ácido glutâmico e lisina.

Dentre os aminoácidos predominantemente consumidos, destaca-se a serina. Este aminoácido é precursor de cisteína e glicina (STRYER, 1996) e pode ser usado para formar piruvato pela enzima L-serina desaminase (KEGG, 2012). Assim, a serina também poderia ser consumida para suprir a demanda energética da bactéria. O ácido glutâmico, além de ser o aminoácido em maior quantidade na composição da PspA4Pro (Tabela 3.1 - 19,6% da composição da PspA4Pro), é também o precursor de glutamina, prolina e arginina. Ele tem papel central no metabolismo de nitrogênio, pois é doador de NH_4^+ para síntese de glutamina, que por sua vez doa NH_4^+ para síntese de asparagina a partir de aspartato, formando novamente o glutamato. (STRYER, 1996). Além disso, o glutamato é usado na síntese de aminoaçúcares e açúcar-nucleotídeos, precursores da formação da peptiglicana, enquanto a glutamina é empregada na síntese de purinas e pirimidinas, precursoras dos ácidos nucleicos.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Portanto, este aminoácido desempenha funções no metabolismo para formação de elementos estruturais, como a parede celular, e para síntese protéica e de ácidos nucléicos. Já a leucina é precursora da biossíntese de acetilcoenzima A, molécula essencial que faz a ligação entre a via glicolítica e o ciclo do ácido cítrico (STRYER, 1996).

No caso específico da Triptona, os aminoácidos com valores maiores de velocidade de consumo são justamente os que estão presentes em maior quantidade no meio de cultivo (Tabela 3.8), com exceção da serina. Com isso, o alto consumo desses aminoácidos pode ser atribuído ao direcionamento dos mesmos para o crescimento celular da *E. coli*.

TABELA 4.2. Velocidade de consumo dos aminoácidos selecionados para as diferentes fontes de nitrogênio. Dados referentes às primeiras 3 horas de cultivo (fase de crescimento).

Fonte de nitrogênio - Triptona - Temperatura 37°C					
Aminoácido (mmol/gDCW.h)	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Des. Pad.
Ácido glutâmico	0,76	0,57	0,69	0,67	0,10
Serina	0,87	0,65	0,78	0,77	0,11
Arginina	0,53	0,4	0,48	0,47	0,07
Leucina	0,63	0,47	0,57	0,56	0,08
Lisina	0,84	0,63	0,75	0,74	0,11

Fonte de nitrogênio - Phytone - Temperatura 37°C					
Aminoácido (mmol/gDCW.h)	Ensaio 4	Ensaio 5	Ensaio 6	Média	Des. Pad.
Asparagina	1	0,98	1,11	1,03	0,07
Serina	0,77	0,75	0,85	0,79	0,05

Fonte de nitrogênio - Soytone - Temperatura 37°C					
Aminoácido (mmol/gDCW.h)	Ensaio 7	Ensaio 8	Ensaio 9	Média	Des. Pad.
Ácido glutâmico	0,48	0,45	0,45	0,46	0,02
Serina	0,7	0,66	0,65	0,67	0,03
Lisina	0,43	0,4	0,4	0,41	0,02

A produção específica, produtividade e concentração celular máximas para as diferentes fontes de nitrogênios, podem ser observadas na Tabela 4.3. Constata-se, portanto, que o cultivo realizado no meio complexo suplementado com Phytone e com temperatura de

indução de 25°C apresentou resultados superiores em termos de produção específica de proteína, produtividade e formação de biomassa.

TABELA 4.3. Produção específica, produtividade e concentração celular máximas para as diferentes fontes de nitrogênio.

Fonte de Nitrogênio	Temperatura de indução (°C)	Produção específica máxima (mg PspA4Pro sóluvel/ g MS)	Produtividade máxima (g PspA4Pro sóluvel/L.h)	Concentração celular máxima (g MS/L)
Triptona	25	192±5	0,120±0,003	6,40±0,3
Soytone	31	124±3	0,050±0,001	5,50±0,3
Phytone	25	209±6	0,120±0,003	6,60±0,3

4.2 Cultivos em Biorreator

A partir dos resultados obtidos nos experimentos conduzidos em frascos agitados, foram definidas as condições para dar continuidade aos estudos em biorreator. Das fontes de nitrogênio (FN) alternativas testadas, o Phytone foi o que apresentou os melhores resultados em termos de formação de biomassa (Figura 4.2), produção específica de proteína, produtividade (Figura 4.3) e com a temperatura de 25°C manteve as células resistentes acima de 90% (Figura 4.4). Por isso, selecionou-se o hidrolisado protéico de soja Phytone para avaliação em cultivos em batelada, em biorreator, utilizando o meio de autoindução com a composição fornecida na Tabela 3.6. Foram realizados três experimentos com o Phytone (Cultivos 1, 2 e 4) e um experimento com meio contendo Triptona como fonte de nitrogênio (Cultivo 3), para comparação. As condições empregadas em cada cultivo foram descritas na Tabela 3.10. Os resultados obtidos nesses cultivos são apresentados e discutidos a seguir.

4.2.1 Cultivo 1. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 25 °C

Este ensaio, assim como os demais, teve como principal objetivo avaliar a estratégia de autoindução em cultivos em biorreator. O cultivo foi conduzido com o meio de autoindução descrito na Tabela 3.6 e monitorado de acordo com as condições estabelecidas no item 3.5.5. No Cultivo 1, escolheu-se como condição de cultivo aquela que levou aos melhores resultados nos experimentos em frascos agitados (Figuras 4.2, 4.3 e 4.4). Assim, iniciou-se o cultivo com a temperatura de 31°C e quando a glicose se esgotou, o que

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

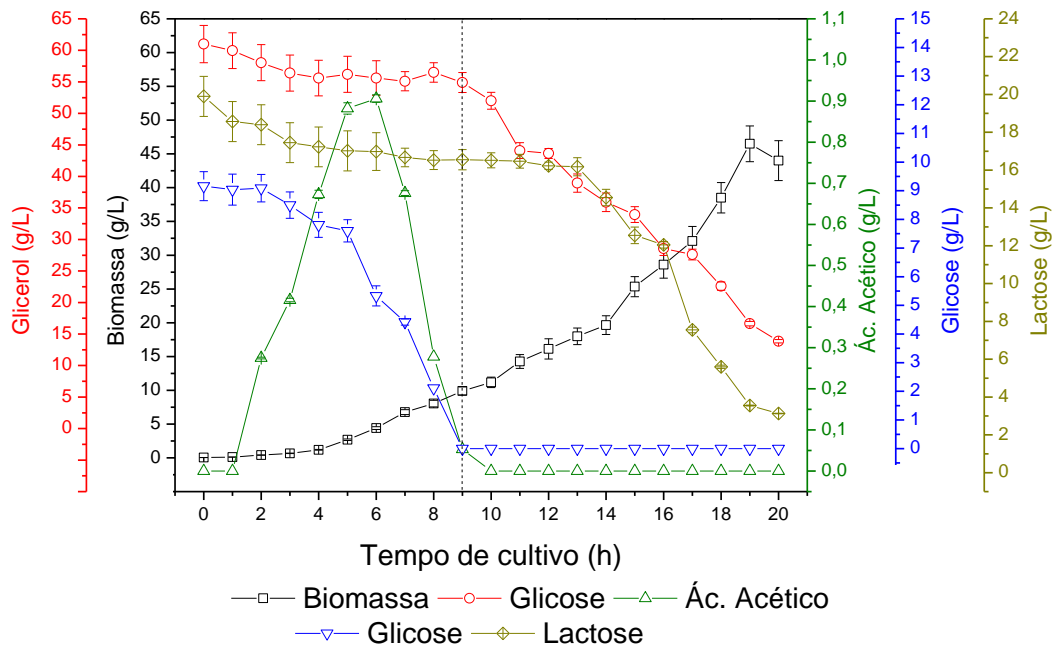
determina o início da assimilação da lactose e da fase de indução, a temperatura foi reduzida para 25°C, a qual foi mantida até o término do cultivo.

Os principais resultados obtidos nesse cultivo foram distribuídos nas Figuras 4.5 a 4.10. Na Figura 4.5 são apresentados os dados relacionados à formação de biomassa, consumo de substratos e produção de metabólitos, enquanto a Figura 4.6 concentra as informações relacionadas à produção de proteína PspA4Pro. Nas Figuras 4.7 a 4.10 são apresentados os dados adquiridos em tempo real pelo sistema de supervisão SuperSys_HCDC para as diversas condições de cultivo (temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido) monitoradas e para algumas variáveis manipuladas (vazão de ar e de oxigênio, velocidade de agitação).

Na Figura 4.5 podemos observar o crescimento celular (Cx), o consumo dos substratos (glicose, glicerol e lactose), além da formação de ácido acético, no cultivo de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio. A concentração de ácido acético atingiu o valor máximo de 0,9g/L após 6h de cultivo, período no qual a glicose foi o principal substrato consumido. Esse metabólito foi reassimilado, não sendo observada formação de ácido acético a partir de glicerol ou lactose. A concentração de biomassa alcançada após 19h de cultivo foi de $46,5 \pm 2,3$ g/L. A glicose foi a primeira fonte de carbono a ser consumida conforme descrito Studier (2005), esgotando-se após 9h de cultivo. Já o glicerol foi consumido lentamente durante as primeiras 9h (~ 5g/L), com a intensificação do consumo desse substrato ocorrendo após o esgotamento da glicose, conforme esperado.

O consumo de lactose apresentou perfil semelhante ao do glicerol, porém ficou mais acentuado ~ 4h após o esgotamento da glicose. Essa demora para o início do consumo mais intenso de lactose está relacionada ao tempo necessário para desreprimir o operon *lac* do genoma das células, que estava reprimido na presença de glicose pelo mecanismo da repressão catabólica. Ao ser desreprimido, ocorre a liberação da síntese das enzimas *lac* permease, que transporta a lactose para o interior das células e induz o operon *lac*, e β -galactosidase, que hidrolisa a lactose em glicose e galactose. A partir então da entrada de uma quantidade maior de lactose no interior das células, forma-se alolactose em quantidade estequiometricamente suficiente para ligar-se ao repressor *LacI* e removê-lo do operon *lac* para liberar a síntese da T7 RNA polimerase, cujo gene está no profago DE3, e da proteína de interesse, cujo gene está no plasmídeo.

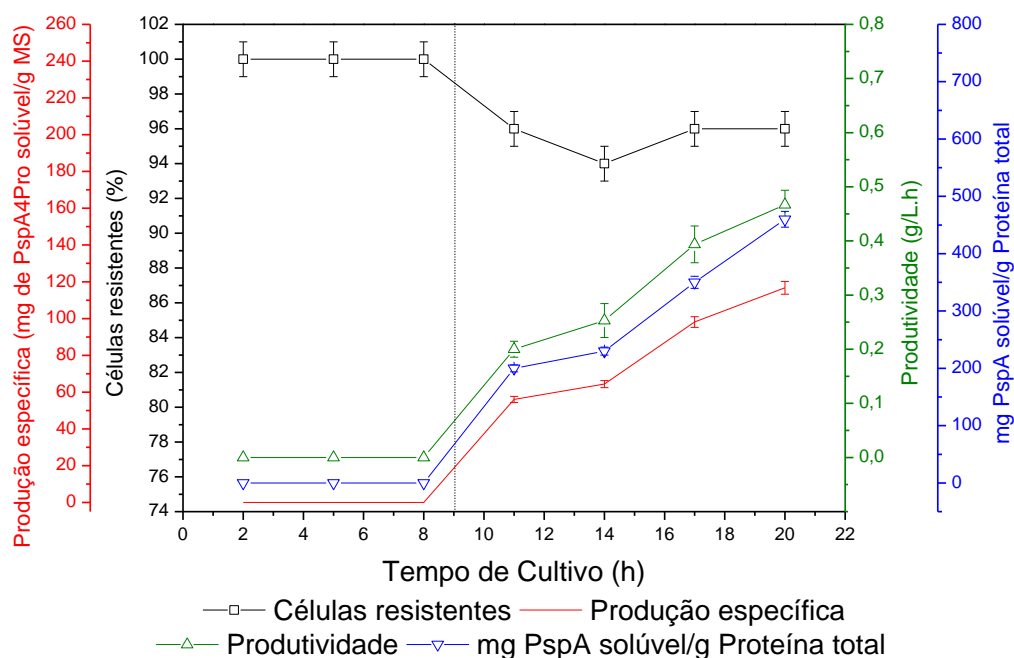
FIGURA 4.5. Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C (Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4). A linha pontilhada indica a mudança de temperatura (31 para 25°C).



Como esperado (Figura 4.6), as células apresentaram retenção de plasmídeo (acima de 90%) igual ao cultivo realizado em frasco agitado com indução a 25°C (Figura 4.4) devido às excelentes condições de controle de pH e de fornecimento de oxigênio proporcionadas pelo biorreator. A figura também mostra que a produção específica e a produtividade em proteína aumentaram gradativamente a partir 8h (momento do esgotamento da glicose – Figura 4.5) alcançando respectivamente, 117 ± 3 mg de PspA4Pro solúvel/g MS $0,47 \pm 0,01$ gPspA4Pro/L.h ao final do cultivo. A relação entre a concentração de proteína PspA4Pro solúvel e a de proteína total solúvel apresenta a mesma tendência observada nos gráficos para produtividade e produção específica, atingindo 460 ± 14 no final do cultivo. A produção específica ficou abaixo da obtida no experimento em frasco agitado realizado em condições semelhantes, no qual obteve-se 209 ± 6 mg de PspA4Pro solúvel/g MS (Figura 4.3). Esse fato, assim como os perfis crescentes de produtividade e produção específica, sugerem que as 12h de indução normalmente empregadas com a lactose não foram suficientes para promover a plena produção da proteína recombinante a 25°C provavelmente por que a desaceleração do metabolismo como um todo também implica em menor velocidade de produção de proteína, resultando em consumo incompleto da lactose fornecida (Figura 4.5).

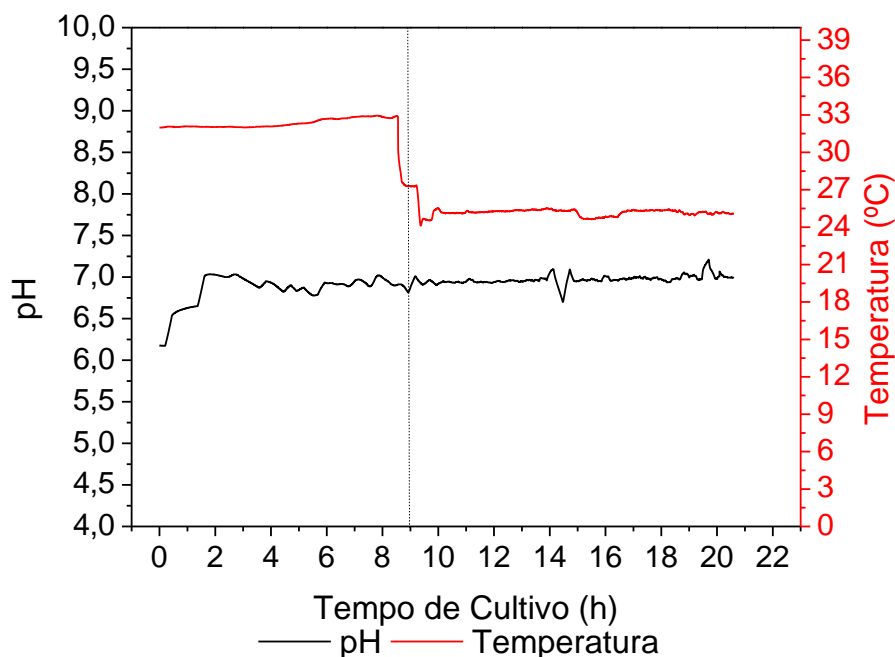
Capítulo 4 – Resultados e Discussão

FIGURA 4.6. Produção específica, células resistentes, produtividade e a razão PspA4Pro solúvel/proteína total solúvel ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C).



Na sequência de Figuras 4.7 a 4.10, são apresentados os dados *on-line* adquiridos automaticamente pela ferramenta de supervisão. Na figura 4.7, a eficiência do sistema de controle em termos de manutenção da temperatura e pH são demonstradas. No momento da transferência do inóculo, o pH do meio no reator era de ~ 6,2 (igual ao do inóculo) logo em seguida, o sistema de controle automático de pH foi acionado, mantendo-se o valor em 7,0 durante todo o cultivo. Em relação ao controle da temperatura, o cultivo iniciou em 31°C, a qual foi reduzida para 25°C após o esgotamento da glicose e mantida automaticamente neste valor até o final do cultivo.

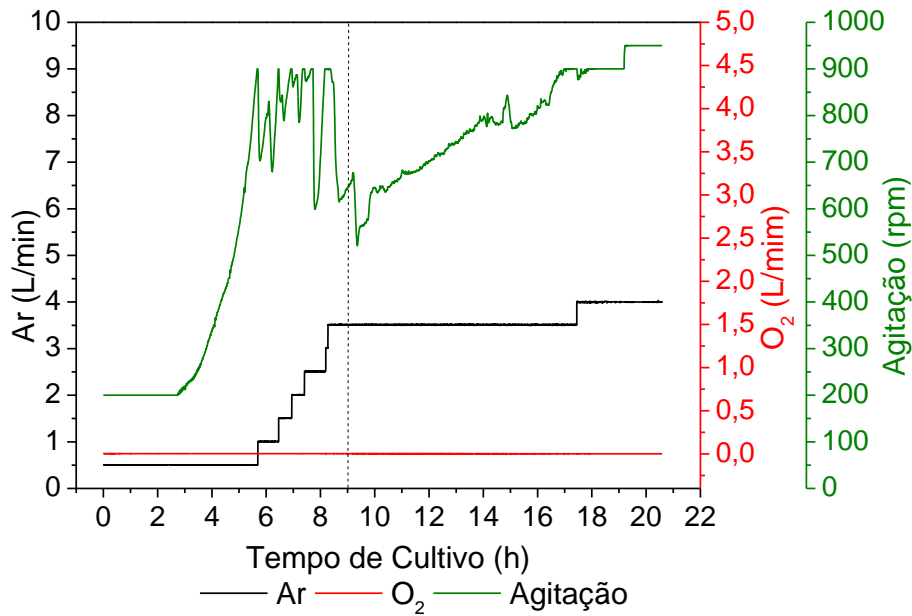
FIGURA 4.7. Temperatura e pH ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose.



As Figuras 4.8 e 4.9 mostram a atuação do sistema de supervisão para controlar a concentração de oxigênio dissolvido. Enquanto a concentração de oxigênio dissolvido permaneceu acima do *set-point* (30 % da saturação) como mostra a Figura 4.9, a agitação e a vazão de ar foram mantidas nos valores mínimos de 200rpm e 0,5 L/min, respectivamente (Figura 4.8). À medida que o crescimento se intensificou (Figura 4.5), a agitação e a vazão de ar (Figura 4.8) aumentaram rapidamente, respectivamente de 200 para 900rpm em 2,9h (2,7 até 5,6h de cultivo) e de 0,5 para 3,5L/min em 5,7h (2,58 até 8,28h de cultivo) de forma a manter a concentração de oxigênio dissolvido no *set-point* (Figura 4.9). As oscilações presentes nos dados de agitação (Figura 4.8) e de vazão molar de CO₂ (Figura 4.9) no período de 4 a 9h são causadas pela alta velocidade de crescimento característica da intensa assimilação de glicose (Figura 4.5). Neste cultivo não houve necessidade de enriquecer o ar com oxigênio puro para manter a concentração de oxigênio dissolvido no valor desejado.

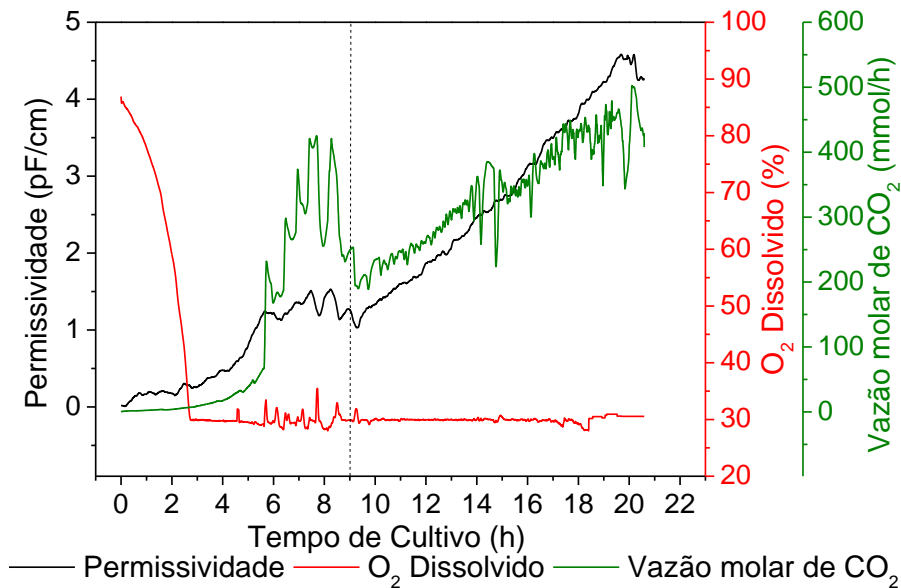
Capítulo 4 – Resultados e Discussão

FIGURA 4.8. Agitação, vazões de ar e de oxigênio puro ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C).



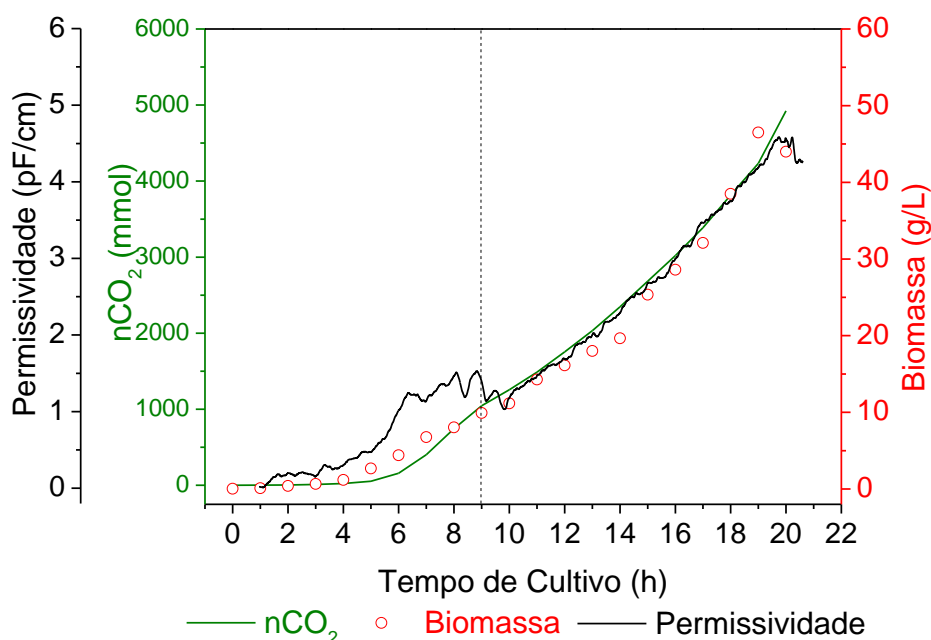
A Figura 4.9 mostra os dados da vazão molar de dióxido de carbono produzido (VMC), estimada pela Equação 14, oxigênio dissolvido e a permissividade. Essas variáveis apresentaram o mesmo perfil de aumento durante todo cultivo, acompanhando a formação de biomassa (Figura 4.5).

FIGURA 4.9. Permissividade, concentração de oxigênio dissolvido e vazão molar de dióxido de carbono ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C).



Finalmente, na Figura 4.10, além do sinal de permissividade medido pelo sensor de capacitância e a biomassa incluiu-se a produção cumulativa de CO_2 com o tempo, a qual foi obtida por integração dos dados de VMC (Equação 14). Uma vez que a membrana plasmática sofre polarização sob a influência de um campo elétrico na frequência entre 0,1 a 10MHz, o sinal de permissividade dielétrica gerado por uma suspensão de células pode ser usado como indicador da concentração de células viáveis (HORTA, 2011). Já a geração de CO_2 está diretamente relacionada ao catabolismo da glicose e do glicerol pelas vias metabólicas principais e à geração de ATP (STRYER, 1996), sendo influenciada tanto pela concentração de células presentes como pela velocidade de crescimento das mesmas. Por essas razões, observa-se uma excelente correspondência entre as 3 variáveis, conforme ilustrado na Figura 4.10, o que indica que tanto a produção de CO_2 como a permissividade podem ser utilizados para inferir a concentração de biomassa durante a realização dos cultivos.

FIGURA 4.10. Biomassa, permissividade e $n\text{CO}_2$ (obtido a partir da integração dos valores de vazão molar de dióxido de carbono) ao longo do Cultivo 1, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 25°C . A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose e mudança de temperatura (31 para 25°C).



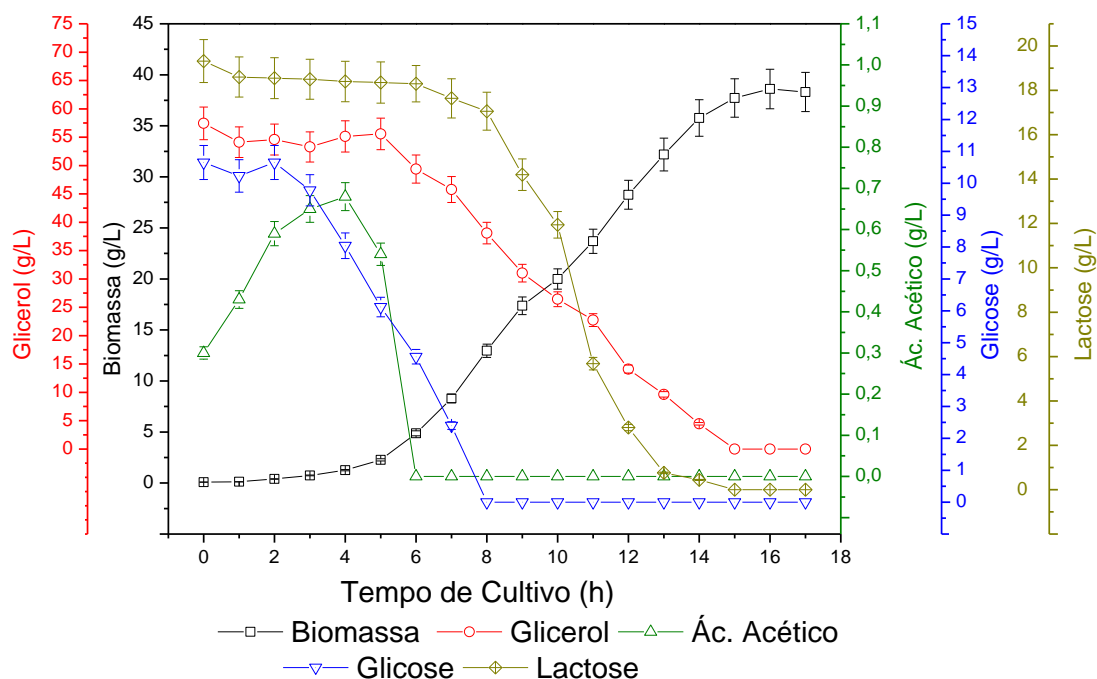
Os dados adquiridos em tempo real para o pH, a temperatura, a vazão de ar e de oxigênio, a velocidade de agitação e a concentração de oxigênio dissolvido durante o Cultivo 1 foram apresentados nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 com a intenção de ilustrar a eficiência do sistema de supervisão empregado. O mesmo sistema de supervisão foi utilizado no monitoramento e supervisão dos outros três cultivos a serem discutidos a seguir e apenas os dados *on-line* de permissividade e de produção de CO₂ serão reproduzidos e discutidos para esses cultivos.

4.2.2 Cultivo 2. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 31°C

A partir dos resultados da produção específica de proteína recombinante obtidos no Cultivo 1 em biorreator (item 4.2.1), com indução a 25°C, os quais foram inferiores aos obtidos nos experimentos em frascos agitados realizados na mesma temperatura de indução, optou-se por estudar a produção de proteína a 31°C no Cultivo 2, empregando o mesmo meio, tendo o Phytone como fonte de nitrogênio, além das demais condições de cultivo adotadas no Cultivo 1. Os principais resultados obtidos no Cultivo 2 estão reunidos nas Figuras 4.11, 4.12 e 4.13.

A Figura 4.11 mostra tendências semelhantes de consumo de glicose, glicerol e lactose às observadas na Figura 4.5 (Cultivo 1). A glicose esgotou-se após 8h de cultivo, disparando um intenso consumo da lactose. Já o consumo mais acentuado de glicerol se inicia antes, quando a concentração inicial de glicose é reduzida à metade (~5h). É interessante notar que, neste caso, não houve um intervalo entre o esgotamento da glicose e a assimilação de lactose, devido à aceleração do metabolismo proporcionada pela maior temperatura mantida na fase de indução. Como no Cultivo 1, a concentração de ácido acético atingiu um máximo de ~ 0,7g/L, sendo o ácido reassimilado posteriormente. A concentração de biomassa alcançada estabilizou-se em 38,6±1,9g/L após 16h de cultivo, 1h depois do esgotamento do glicerol.

FIGURA 4.11. Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerados a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4.



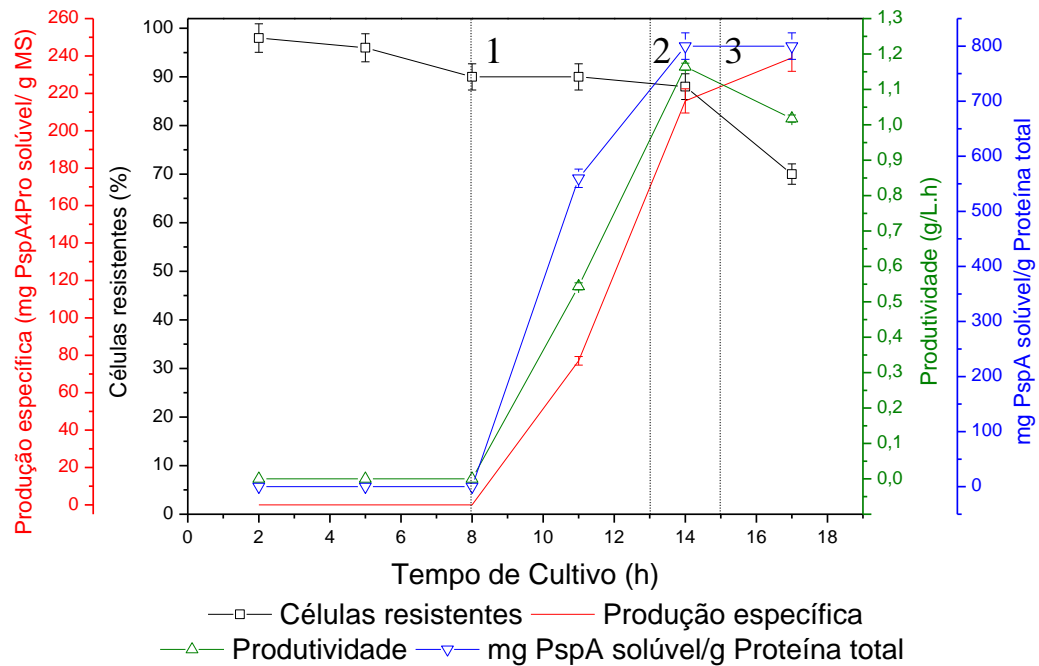
Na Figura 4.12 são apresentados os resultados relacionados à produção de PspA4Pro durante o Cultivo 2. As células resistentes ao antibiótico diminuíram em 30% ao final do cultivo, sugerindo que a estabilidade do plasmídeo foi menor a 31°C. Um perfil semelhante de retenção de plasmídeo foi observado nos experimentos em frascos agitados conduzidos com Phytone e Soytone à mesma temperatura (Figura 4.4). A produção específica e a razão (PspA4Pro solúvel)/(proteína solúvel total) aumentaram intensamente (Figura 4.12) no período de 8 à 14h de cultivo, período que coincide com acentuada formação de biomassa e consumo de lactose e glicerol (Figura 4.11). Os valores máximos para essas variáveis foram, respectivamente, 239 ± 7 mg de PspA4Pro solúvel/g MS e de 800 mg PspA4Pro solúvel/ g proteína total solúvel. Já a produtividade atingiu o máximo de $1,16 \pm 0,03$ g/L.h em 14h.

Estes resultados foram superiores aos obtidos no ensaio em frascos agitados realizado à mesma temperatura de indução e com Phytone como fonte de nitrogênio (Figura 5), correspondendo a um aumento na produção específica de 79% e de 933% na produtividade. É importante destacar que a alta produtividade alcançada foi consequência da

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

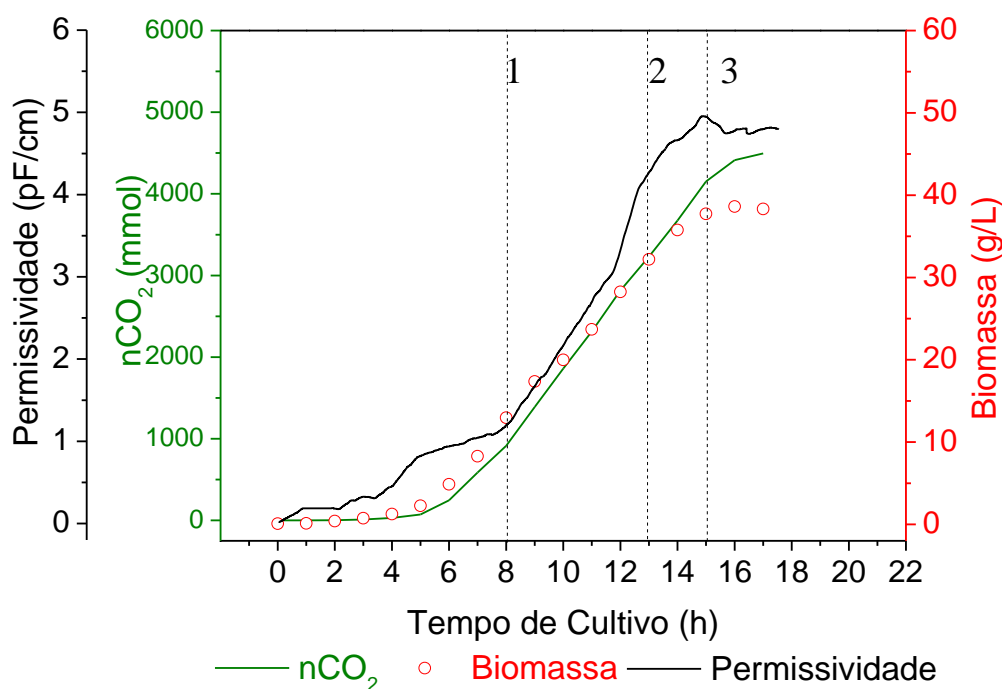
maior concentração de biomassa atingida no biorreator, o qual oferece condições adequadas de controle de pH e transferência de oxigênio.

FIGURA 4.12. Produção específica, células resistentes, produtividade e a relação entre PspA4Pro solúvel/ g de proteína total ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3).



Na Figura 4.13, observa-se o perfil de variação dos dados *on-line* de permissividade e de produção cumulativa de CO₂, que novamente mostraram excelente correlação com a concentração celular, medida *off-line*.

FIGURA 4.13. Permissividade, nCO₂ e o Cx ao longo do Cultivo 2, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3).



Em relação ao Cultivo 2, pode-se afirmar que, de maneira geral, o aumento da temperatura para 31°C proporcionou melhores condições para a produção da proteína recombinante, apesar de ter afetado a estabilidade do plasmídeo (Figura 4.12). Por outro lado, o metabolismo mais acelerado levou ao esgotamento do glicerol e da lactose (Indutor) antes do período de 12h de indução (Figura 4.11), o que pode ter limitado tanto a formação de biomassa quanto a produção de proteína recombinante nas últimas 4h de cultivo. A elucidação dessa questão é o foco do Cultivo 4 (Item 4.2.4).

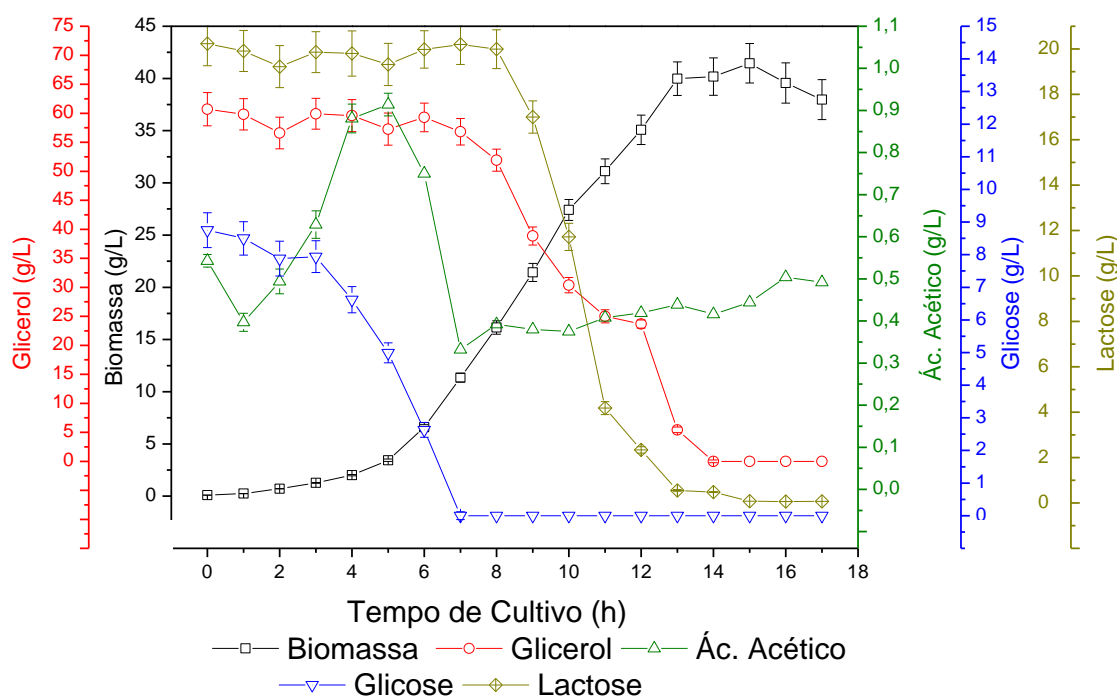
4.2.3 Cultivo 3. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Triptona e indução a 31°C

Este ensaio teve como objetivo avaliar o crescimento e a produção de proteína em cultivo em biorreator de bancada conduzido em meio de autoindução contendo Triptona como fonte de nitrogênio, para servir de referência nas comparações com os cultivos realizados com Phytone. É importante destacar que os meios complexos mais citados na literatura (JIA *et al.*, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2009, , MADURAWA *et al.*, 2000; LIN & SWARTZ, 1992) contêm Triptona (fonte de nutrientes de origem animal) na sua formulação.

Diante dos excelentes resultados obtidos no Cultivo 2 (item 4.2.2) em termos de produção de PspA4Pro e crescimento, optou-se por realizar o Cultivo 3 nas mesmas condições de temperatura da fase de crescimento e de indução (31°C). Os principais resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.14 a 4.16 e discutidos a seguir.

Na Figura 4.14 observa-se o mesmo padrão de consumo de substrato, tendo a glicose como principal fonte de carbono consumida nas primeiras 7 horas de cultivo, o glicerol como fonte de carbono secundária, consumido entre 7 e 14h de cultivo juntamente com a lactose, que foi rapidamente assimilada entre 8 e 12h de cultivo. Mais uma vez observou-se formação de ácido acético no início do cultivo, como resultado da rápida assimilação de glicose, alcançando o máximo de 0,9g/L em 5h de cultivo. Após a reassimilação já observada nos outros experimentos, a concentração residual de ácido acético permaneceu em torno de 0,5g/L até o final do experimento. Ocorreu intensa formação de biomassa entre 4 e 13h de cultivo, alcançando-se concentração celular máxima de ~ 40g/L. Com as fontes de carbono esgotadas após 13h de cultivo, a concentração celular se estabilizou nesse patamar até 15h de cultivo, quando começou a diminuir.

FIGURA 4.14. Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C. Desvio padrão gerados a partir das análises do cultivo.

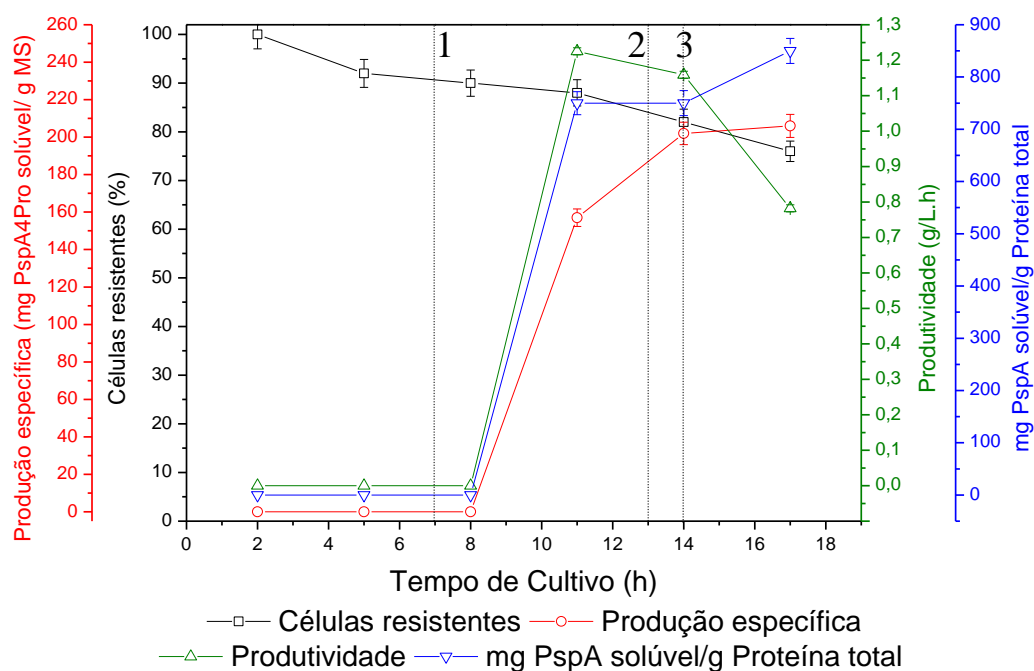


Na Figura 4.15, análoga à Figura 4.12 (Cultivo 2), são apresentados os resultados relacionados à produção da proteína PspA4Pro. A fração de células resistentes à canamicina decaiu até ~ 75% ao final do experimento, mostrando que as condições de cultivo afetaram a estabilidade do plasmídeo. É interessante notar que todos os ensaios em frascos agitados em meio contendo Triptona apresentaram retenção de plasmídeo superior a 90%, inclusive nas temperaturas mais elevadas. Portanto, a menor retenção de plasmídeo observada no Cultivo 3 poderia ser atribuída ao estresse metabólico causado pela intensa produção da proteína recombinante. De fato, a produção específica e a razão PspA4Pro solúvel/(proteína total solúvel) aumentaram rapidamente no período entre 8 a 11h de cultivo. Esse período coincide com a fase de mais intensa assimilação de lactose (Figura 4.14). Os valores máximos de produção específica e razão PspA4Pro solúvel/(proteína total solúvel), foram, respectivamente, 206 ± 6 mg de PspA4Pro solúvel/g MS e de 850 mg PspA4Pro solúvel/g

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

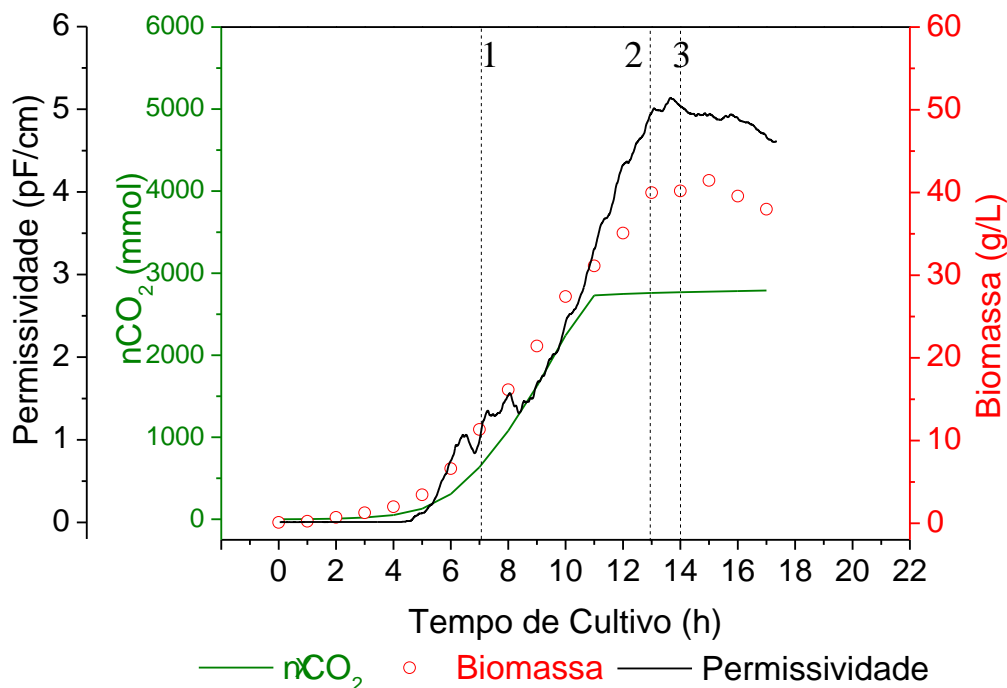
proteína total solúvel. O perfil de variação da produtividade acompanha o da razão proteína solúvel/proteína total, com máximo de $1,23 \pm 0,03 \text{ g/L.h}$ em 11h de cultivo.

FIGURA 4.15. Produção específica, células resistentes, produtividade e a razão PspA4Pro solúvel/ (g de proteína total solúvel) ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C Desvio padrão gerados a partir das análises do cultivo. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3).



Na Figura 4.16 são apresentados os dados de permissividade, concentração celular *off-line* e produção cumulativa de CO_2 ao longo do cultivo 3. Como ocorrido nos gráficos dos Cultivos 1 e 2 (Figuras 4.10 e 4.13), o sinal da permissividade acompanha com precisão os dados de concentração celular. No entanto, o número de moles de CO_2 produzido acompanha o crescimento até 11h de cultivo, estabilizando-se no valor de 3000mol, porém a concentração celular continue aumentando até 14h. Isso pode estar relacionado à perda de viabilidade de uma parcela da população ou a algum nutriente inicialmente presente no meio, mas que tenha se tornado limitante durante o cultivo. Novos experimentos são necessários para esclarecimento da estagnação na produção de CO_2 observada.

FIGURA 4.16. Permissividade, $n\text{CO}_2$ e o biomassa ao longo do Cultivo 3, conduzido com meio de autoindução contendo Triptona e temperatura de indução de 31°C . Desvio padrão gerados a partir das análises. do cultivo. As linhas pontilhadas indicam o esgotamento da glicose (1), lactose (2) e glicerol (3).



No caso do Cultivo 3, nota-se novamente que o metabolismo mais acelerado resultou em excelente produção de proteína, porém levou ao esgotamento antecipado do glicerol e do indutor, que foi totalmente consumido 6h antes do final previsto para a fase de indução. Vale à pena destacar ainda, que comparando-se a produção de proteína e a produtividade do Cultivo 2 e do Cultivo 3, pode-se afirmar que a substituição da Triptona pelo Phytone é factível e recomendável. Essa afirmação é baseada nos níveis semelhantes de produtividade e produção específica obtidos em ambas as fontes de nitrogênio e no fato do Phytone ser um insumo que atende às normas da BPF.

4.2.4 Cultivo 4. Crescimento celular e produção de PspA4Pro em cultivo em biorreator com Phytone e indução a 31°C , suplementado com glicerol e lactose

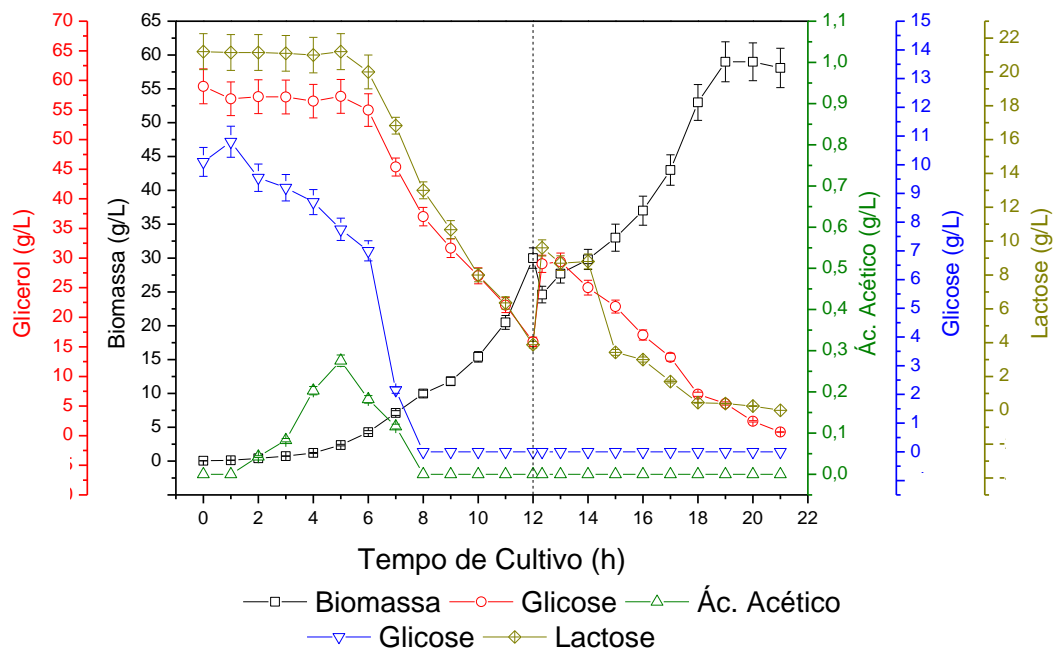
Conforme comentado nas análises finais dos Cultivos 2 e 3, mesmo tendo alcançado uma ótima produção específica (Figuras 4.12 e 4.15) comparados com o cultivo 1

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

(Figura 4.6), esses cultivos (2 e 3) apresentaram esgotamento do glicerol e da lactose antes de 12h de indução (Figura 4.11 e 4.14). Para avaliar o impacto do esgotamento dos substratos sobre o crescimento e a produção da proteína, o Cultivo 4 foi realizado como repetição do Cultivo 2, em meio de autoindução contendo Phytone e a 31°C, porém com aplicação de um pulso contendo glicerol e lactose (composição do pulso Tabela 3.6) próximo ao momento de esgotamento desses substratos. Os resultados obtidos no Cultivo 4 são apresentados nas Figuras 4.17 a 4.19.

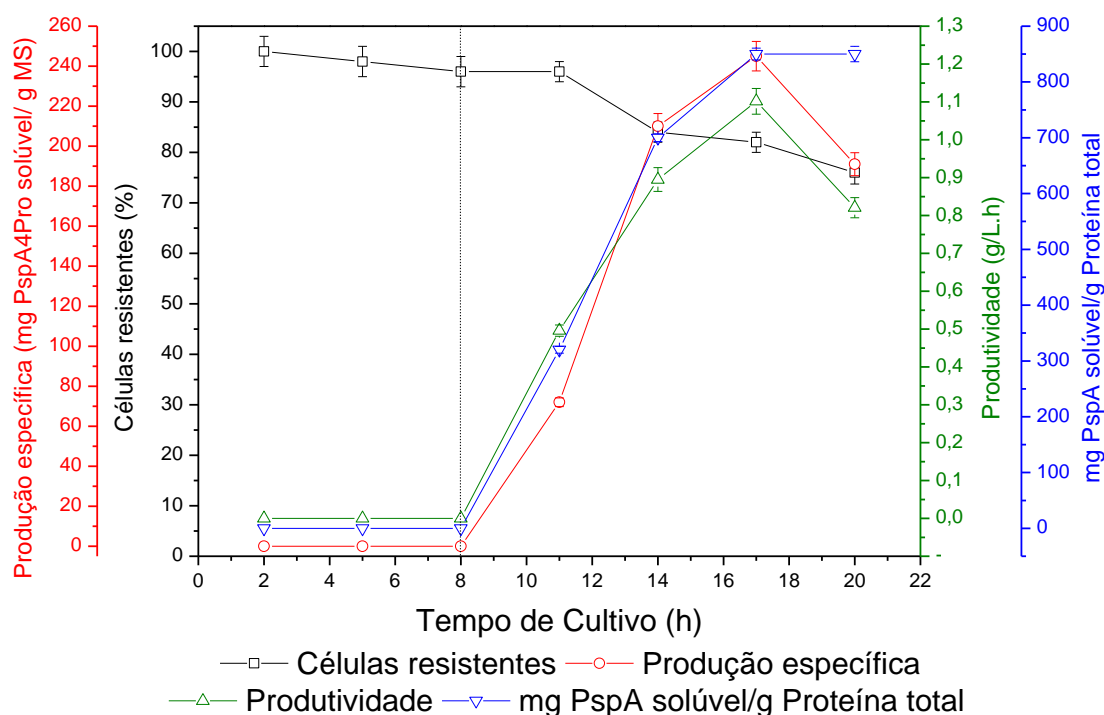
Na Figura 4.17 pode-se observar o crescimento celular, o consumo de glicerol, lactose e glicose, além da formação de ácido acético, no Cultivo 4. O perfil de consumo dos substratos foi similar ao do Cultivo 2 até o momento do pulso, o qual foi aplicado quando restava ~ 4g/L de lactose e ~ 15g/L de glicerol no meio. Após a aplicação do pulso, a concentração de lactose subiu para ~ 10g/L e a de glicerol para ~ 30g/L, evitando o esgotamento desses substratos antes das 12h de indução. A suplementação teve um impacto significativo na formação de biomassa, que atingiu aproximadamente 60g/L em 19h de cultivo.

FIGURA 4.17. Curvas de crescimento celular, consumo de glicerol, glicose e lactose e formação de ácido acético ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose (indicado pela linha vertical) Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4.



Já em termos de produção de proteína, a suplementação com o glicerol e a lactose não levaram a mudanças significativas, conforme mostra a Figura 4.18. A produção específica, a produtividade e razão mg PspA4Pro solúvel/(g de proteína total solúvel) apresentaram um perfil de variação semelhante ao observado no Cultivo 2 (Figura 4.12), aumentando gradativamente das 8 às 17h de cultivo, alcançando valores máximos, respectivamente, de 245 ± 7 mg de PspA4Pro solúvel/g MS, $1,10 \pm 0,03$ g/L.h e 850 ± 25 mg PspA4Pro solúvel/g de proteína solúvel total, os quais são bastante semelhantes aos obtidos no Cultivo 2. Da mesma forma, a fração de células resistentes ao antibiótico diminuiu até 70% ao final do cultivo, conforme ocorreu também no Cultivo 2, o que explicaria a diminuição nos valores da produção específica e produtividade observada em 21h de cultivo.

FIGURA 4.18. Produção específica, células resistentes, produtividade e a relação entre PspA4Pro solúvel/g de proteína total ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose.

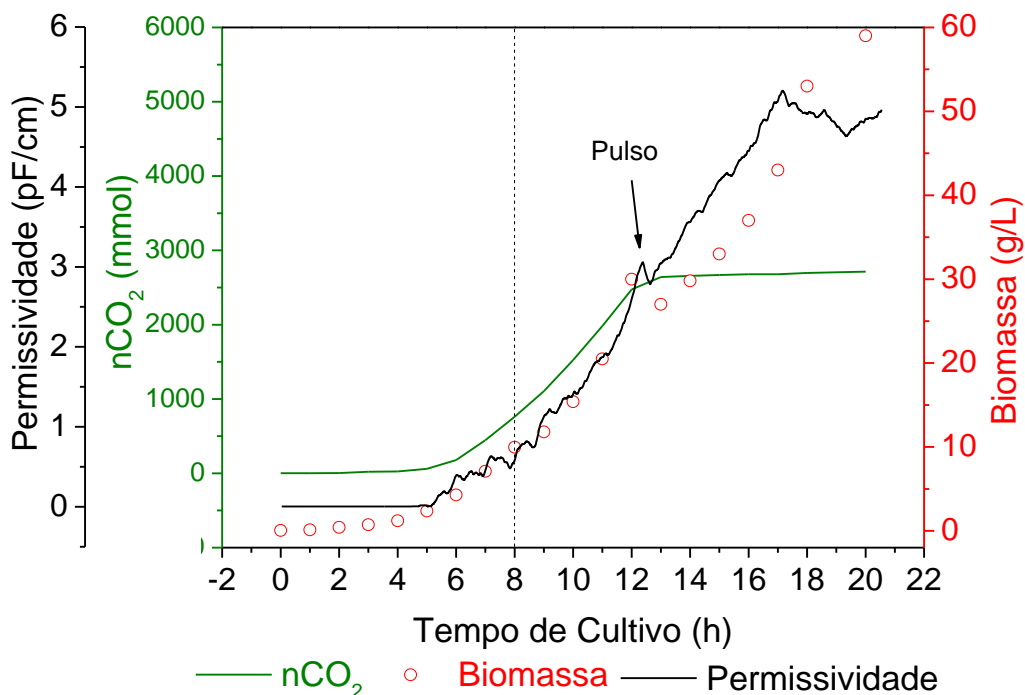


Na Figura 4.19 são mostrados os dados *on-line* de permissividade e de produção acumulativa de CO₂ adquiridos no Cultivo 4. O sinal de permissividade acompanha bem os dados da concentração celular medida nas amostras retiradas do meio até 17h de cultivo. Entre 17 e 21h, embora a concentração celular continue aumentando, a permissividade se mantém em ~ 5pF/cm. Isso decorre da perda de viabilidade, que é detectada pelo sensor de

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

capacitância (apenas células viáveis apresentam polarização da membrana), mas não pelos métodos usuais de medida de concentração celular, a partir da turbidez ou da massa seca, que não conseguem distinguir células viáveis das não viáveis (HORTA, 2011; SILVA, 2011). Já a produção de CO₂ apresentou comportamento análogo ao observado no Cultivo 3 e as possíveis explicações são as mesmas incluídas na discussão da Figura 4.16.

FIGURA 4.19. Permissividade, nCO₂ e o biomassa ao longo do Cultivo 4, conduzido com meio de autoindução contendo Phytone como fonte de nitrogênio, temperatura de indução de 31°C e suplementado com pulso de glicerol e lactose. Desvio padrão gerado a partir dos dados dos cultivos 1, 2 e 4. A linha pontilhada indica o esgotamento da glicose.



4.2.5 Análise comparativa dos cultivos em biorreator

Neste tópico é apresentada uma síntese dos principais resultados obtidos nos quatro cultivos em biorreator, visando comparar as condições de cultivo empregadas, isto é, fontes de nitrogênio (Phytone versus Triptona) e temperatura de indução (25°C versus 31°C). Com esta finalidade foram construídas as Figuras 4.20 a 4.22 e as Tabelas 4.4 a 4.6, que serão analisadas a seguir.

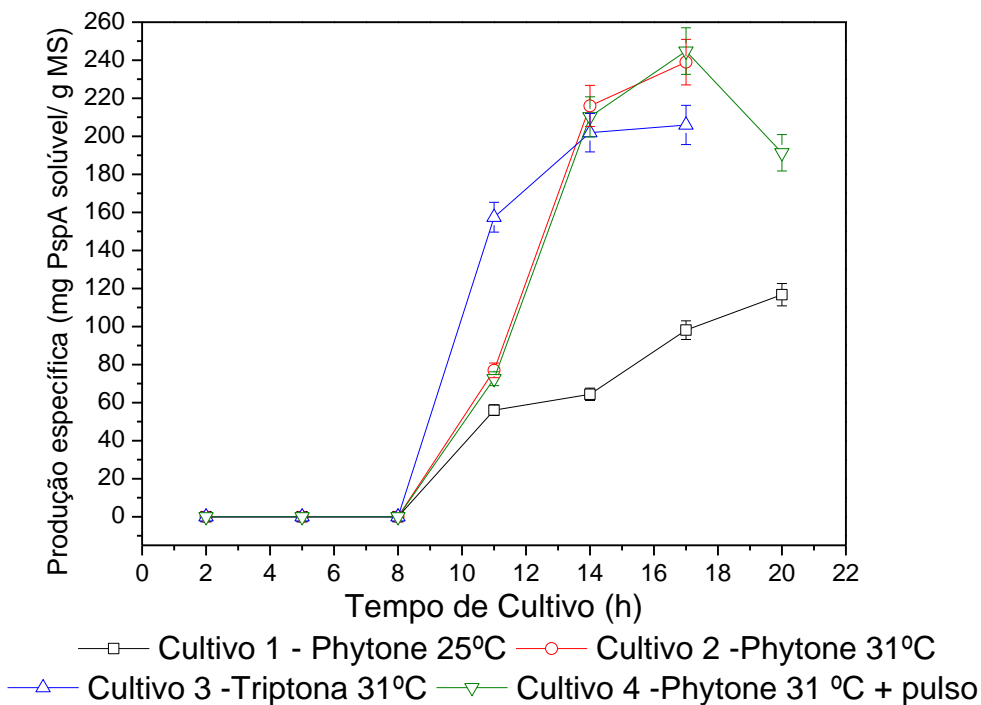
A Figura 4.20 mostra a produção específica de PspA4Pro em todos os cultivos em função do tempo. Observa-se claramente que a temperatura de 31°C favoreceu a síntese de proteína e que, nesta temperatura, 17h de cultivo (correspondendo a ~ 9h de indução) foram

suficientes para atingir a máxima produção específica. Conforme já mencionado anteriormente, os resultados sugerem que os fluxos de fornecimento de energia e precursores durante o esforço metabólico de síntese da proteína recombinante devem ser suficientes para atender a alta demanda da célula. Essa condição é mais facilmente atingida quando a célula é cultivada a temperaturas maiores (SILVA, 2011). Em experimentos em frascos agitados, geralmente a melhor produção de proteína é observada em temperaturas menores. Porém, isso provavelmente acontece por que nessa condição há menor formação de ácidos orgânicos inibidores (como o ácido acético) levando a uma menor variação do pH do meio.

Comprovou-se ainda, pela comparação com os resultados do Cultivo 4, que a falta de lactose e glicerol ao final dos Cultivos 2 e 3 não foi limitante para a produção de proteína PspA4Pro solúvel. Isso também foi consequência da aceleração na produção de proteína resultante da maior temperatura, a qual atingiu seu ápice mais rapidamente, tornando desnecessário prolongar o processo para completar 12 ou mais horas de indução.

Além disso, utilizar o Phytone em substituição à Triptona como fonte de nitrogênio, não só está de acordo com as boas praticas de fabricação, como favoreceu a produção em aproximadamente 16%. Finalmente, a Figura 4.20 mostra que a reprodutibilidade nos cultivos 2 e 4 foi excelente.

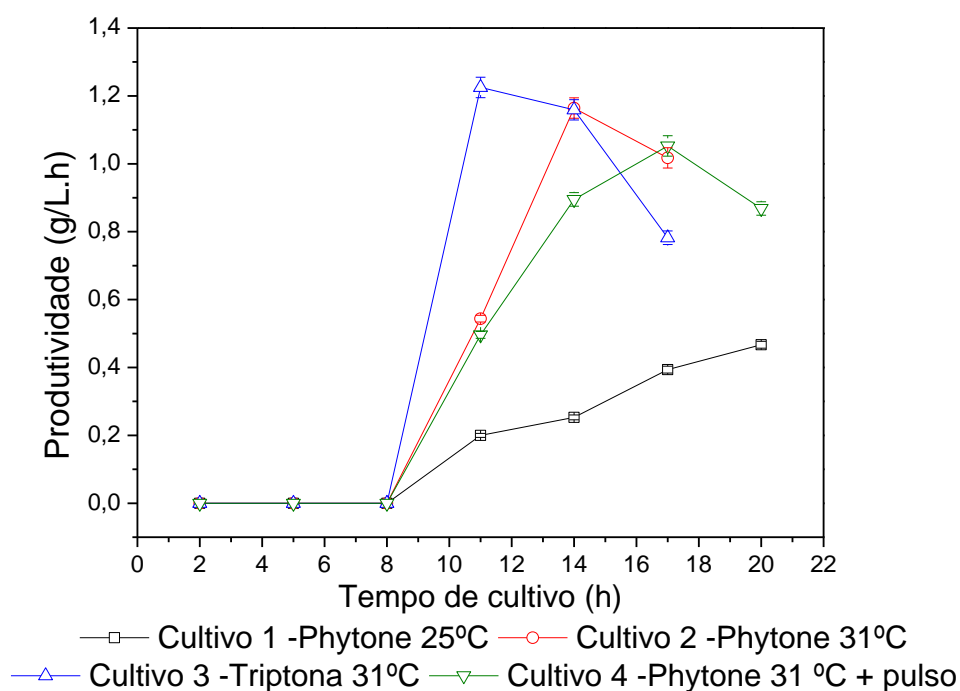
FIGURA 4.20. Produção específica de PspA4Pro nos Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4.



Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Na Figura 4.21, os cultivos são comparados em termos de produtividade. Observa-se que no cultivo 2 a produtividade em 14h foi de $1,16 \pm 0,03 \text{ g/L.h}$, decrescendo para $1,02 \pm 0,03 \text{ g/L.h}$ em 17h, embora a produção específica tenha aumentado ligeiramente nesse período (Figura 4.20). Isso é consequência da estagnação do crescimento (Figura 4.11) devido ao esgotamento das fontes de carbono e também devido ao direcionamento do esforço metabólico da célula para a síntese da proteína recombinante. Essa última hipótese também explica a menor produtividade observada no Cultivo 4, em relação ao Cultivo 2. Embora ambos os experimentos sejam análogos até a aplicação do pulso, o crescimento no cultivo 4 (Figura 4.17) foi mais lento, resultando em menor produtividade apesar dos valores similares de produção específica (Figura 4.20). A Triptona como fonte de nitrogênio favoreceu uma maior produtividade ($\sim 1,2 \text{ g/L.h}$) devido principalmente ao rápido aumento na produção específica de PspA4Pro (Figura 4.20) associado ao rápido crescimento proporcionado por esse nutriente.

FIGURA 4.21. Produtividade em proteína PspA4Pro nos Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4.

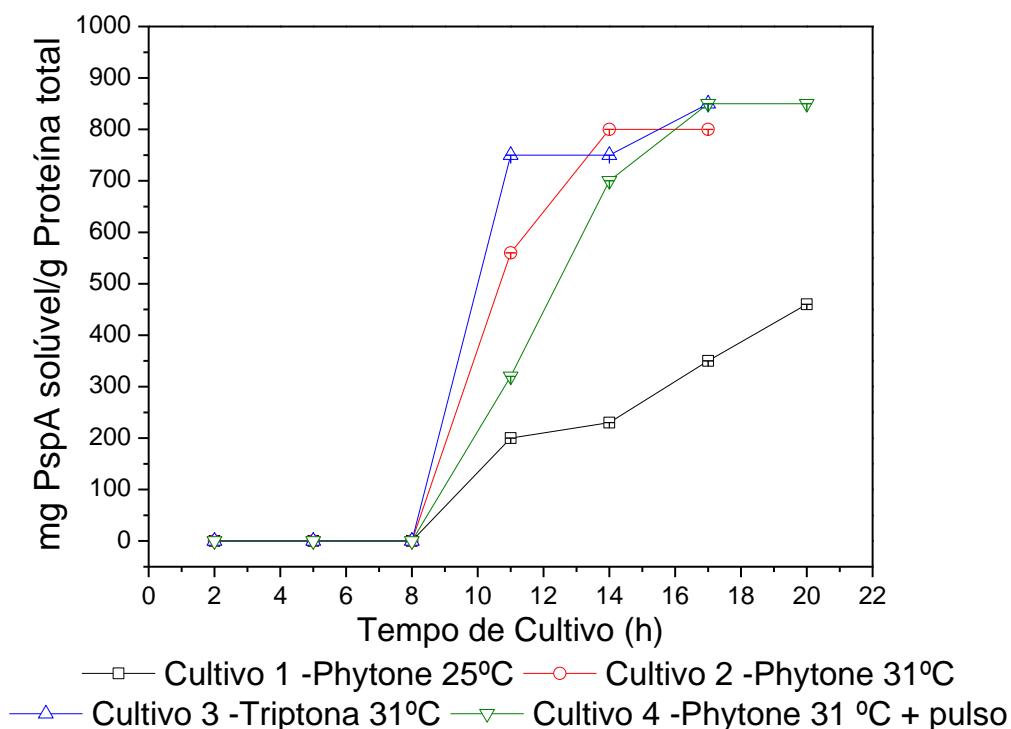


Assim, analisando em conjunto as Figuras 4.20 (produção específica) e 4.21 (produtividade) podemos definir o momento ideal em $\sim 17 \text{ h}$ para interromper os cultivos utilizando o Phytone como fonte de nitrogênio. Além da alta produtividade, é importante que o cultivo seja interrompido quando a biomassa acumula a máxima quantidade de proteína

(alta produção específica) para minimizar os custos do processo de purificação do produto recombinante.

Na figura 4.22 foram representados os resultados referentes à razão PspA4Pro solúvel/proteína total solúvel para os Cultivos 1 a 4. Observa-se que, nos Cultivos 3 e 4 em 17h de cultivo foi alcançado um valor de 85% de proteína PspA4Pro solúvel em relação a proteína total solúvel. No Cultivo 2, um valor de 800mg PspA solúvel/ g proteína total solúvel foi atingido em 14 h de cultivo, mantendo-se neste patamar até o final do cultivo. No Cultivo 1, com indução a 25°C, a fração de PspA4Pro solúvel chegou a no máximo 50% da proteína total solúvel. Esses resultados corroboram as constatações a respeito da influência da temperatura na produção da proteína de interesse, conforme discutido para na Figura 4.20.

FIGURA 4.22. Razão PspA4Pro solúvel/ (g de proteína total solúvel) para os Cultivos em biorreator 1, 2, 3 e 4.



Outras comparações entre os cultivos em biorreator são possíveis através da análise dos dados da Tabela 4.4. Nela, além dos dados relacionados à produção de proteína, são apresentadas informações gerais sobre os cultivos, incluindo a concentração celular máxima, o tempo de cultivo, concentração máxima de ácido acético, o fator de conversão de substrato em célula e a velocidade específica máxima de crescimento. Os dados de produtividade, produção

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

específica e razão PspA4Pro solúvel/(proteína total solúvel) confirmam a influência relevante da temperatura na síntese da proteína, que foi significativamente maior nos Cultivos 2, 3 e 4. Já em termos de crescimento, a maior velocidade específica de crescimento ocorreu no meio contendo Triptona. Essa fonte de nitrogênio é rica em proteínas e aminoácidos, como mostra a Tabela 3.8, que provavelmente são utilizados preferencialmente pelas células para sustentar o crescimento inicial, levando a um maior μ_{\max} . Pela mesma razão, o maior valor para o fator de conversão de substrato em célula foi estimado no cultivo em meio contendo Triptona. Destaca-se ainda na Tabela 4.4 a excelente reprodutibilidade dos valores de μ_{\max} e $Y_{X/S}$ dos Cultivos 1, 2 e 4, os quais foram estimados a partir dos dados da fase de crescimento (31°C) para os cultivos em meio contendo Phytone.

TABELA 4.4. Resumo dos principais resultados e condições de cultivos. Temperatura de cultivo, concentração de biomassa máxima, tempo de cultivo, concentração máxima de ácido acético, fator de conversão de substrato em célula, velocidade específica máxima de crescimento, produção específica máxima de PspA4Pro solúvel, produtividade máxima de PspA4Pro solúvel e máxima relação entre mg PspAPro solúvel por g de proteína total.

	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4
Temperatura antes da indução (°C)	31	31	31	31
Temperatura depois da indução (°C)	25	31	31	31
Biomassa Celular Máxima - C _x (g/L)	46,5±2	38,61±2	41,5±2	59±3
Tempo de cultivo (h)	20	17	17	21
[Ác. Acético] _{máx} (g/L)	0,91±0,04	0,68±0,03	0,91±0,04	0,27±0,01
Fator de conversão de substrato em células - Y _{x/s} (g _x /g _s)	0,45±0,04	0,45±0,02	0,94±0,01	0,44±0,01
Velocidade específica máxima de crescimento - μ _{máx} (h ⁻¹)	0,60±0,04	0,62±0,01	0,7±0,03	0,61±0,04
Produção específica máxima de PspA4Pro solúvel (mg/ gMS)	117±3	239±7	206±6	245±7
Produtividade máxima de PspA4Pro solúvel (g/L.h)	0,47±0,01	1,16±0,03	1,23±0,03	1,05±0,03
Máxima mg PspA4Pro solúvel/ g de proteína total	460	800	850	850

Dando continuidade à comparação entre os cultivos, a Tabela 4.5 contém informações sobre as velocidades de consumo dos principais aminoácidos assimilados durante os experimentos em biorreator. Para esses experimentos, definiu-se como aminoácidos mais consumidos aqueles cuja velocidade média de consumo foi superior a 0,2mmol/ g MS.h (no período de 0-3h). Como constatado nos experimentos em frascos agitados (item 4.1.2), a serina foi o aminoácido assimilado mais intensamente nos três cultivos em biorreator (cultivo 1, 2 e 4) conduzidos com Phytone, apresentando uma velocidade média de consumo de 1,2±0,13mmol/gMS.h.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Ainda, analogamente aos resultados obtidos nos experimentos em frascos agitados, o ácido glutâmico também foi intensamente consumido nos Cultivos 1, 2 e 4. Já no Cultivo 3 em meio de autoindução contendo Triptona, a lisina foi o aminoácido assimilado mais intensamente, com velocidade média de 2,42mmol/gMS.h. A lisina é um dos aminoácidos em maior quantidade na composição da PspA4Pro (Tabela 3.1) cerca de 16,8% ficando em menor quantidade apenas do ácido glutâmico 19,6%.

Devido ao crescimento mais intenso, característico dos biorreatores em consequência do adequado suprimento de oxigênio, as velocidades médias de consumo dos aminoácidos (Tabela 4.5) são significativamente superiores às observadas nos experimentos em câmara incubadora (Tabela 4.2).

No caso específico da produção de proteínas recombinantes, esses aminoácidos exercem um papel importante servindo como “blocos de construção” e também são precursores de muitos tipos de moléculas pequenas que têm diversos papéis biológicos essenciais (STRYER, 1996).

Outros aspectos da importância da serina e do ácido glutâmico para o metabolismo celular já foram discutidos no item 4.1.2.

TABELA 4.5. Velocidade de consumo dos aminoácidos dos cultivos em biorreator.

Fonte de nitrogênio - Phytone cultivo 1, 2 e 4. Triptona cultivo 3 - Temperatura 31°C						
Aminoácido (mmol/gMS.h)	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 4	Média	Des. Pad.	Cultivo 3
Ácido aspártico	0,33	0,49	0,35	0,39	0,09	0,22
Ácido glutâmico	0,44	0,70	0,72	0,62	0,16	0,45
Serina	1,34	1,15	1,11	1,20	0,13	0,49
Arginina	0,19	0,24	0,24	0,23	0,03	0,12
Treonina	0,19	0,22	0,05	0,15	0,09	0,15
Prolina	0,10	0,09	0,24	0,14	0,08	0,06
Tirosina	0,01	0,06	0,41	0,16	0,22	0,03
Valina	0,00	0,00	0,47	0,16	0,27	0,01
Lisina	0,13	1,07	0,24	0,48	0,52	2,42
Histidina	0,01	0,07	0,15	0,08	0,07	0,37

Dados referentes ao tempo de 0-3h de cultivo.

A partir dos dados experimentais representando a variação das concentrações dos diferentes substratos com o tempo nos cultivos em biorreator, foram estimadas as velocidades de consumo de glicose, glicerol e lactose. Os valores estimados são apresentados na Tabela 4.6. As fontes de nitrogênio empregadas (Phytone e Triptona) não afetam muito a assimilação

de glicose, provavelmente porque nessa fase inicial do cultivo, a parcela significativa de formação de biomassa acontece por causa da assimilação de nutrientes presentes nas fontes de nitrogênio (Triptona e Phytone).

No entanto, a fonte de nitrogênio influenciou significativamente a velocidade de assimilação de glicerol e lactose. Os maiores valores velocidade de assimilação foram observadas no Cultivo 3 com Triptona: $8\pm 0,4\text{g/L.h}$ de glicerol e $4,1\pm 0,3\text{g/L.h}$ de lactose. A rápida assimilação dos substratos é coerente com a maior velocidade específica de crescimento desse experimento (Tabela 4.4).

A temperatura influenciou a velocidade de assimilação de glicerol, mas não a de lactose. A velocidade de consumo de lactose é provavelmente influenciada por outros fatores, como por exemplo, de transcrição dos genes que compõem o *operon lac*.

No cultivo 4 (Tabela 4.6), após o pulso, houve alteração nas velocidades de consumo de glicerol (significativa diminuição de 33%) e lactose (pequeno aumento de 14%). O menor consumo de glicerol pode estar relacionado à diminuição do ritmo de crescimento causado pela síntese da proteína. Já a manutenção do consumo de lactose pode ser explicada pela presença das enzimas necessárias para o metabolismo desse carboidrato.

Os resultados obtidos mostram uma boa reprodutibilidade das estimativas das velocidades de consumo de lactose e glicerol para os Cultivos 2 e 4 (antes do pulso), ambos realizados com Phytone a 31°C .

TABELA 4.6. Velocidade de consumo de glicose, glicerol e lactose nos cultivos em biorreator.

Cultivo	1		2		3		4	
T ($^\circ\text{C}$)	31	25	31	31	31	31	31	31
Fonte de Carbono	(Antes 25°C)				(Antes Pulso) (Depois Pulso)			
Glicose (g/L.h)	$1,8\pm 0,1$	ND	$1,92\pm 0,07$	$2,0\pm 0,2$	$1,6\pm 0,1$	ND		
Glicerol (g/L.h)	ND	$3,6\pm 0,1$	$5,7\pm 0,1$	$8,0\pm 0,4$	$6,0\pm 0,4$	$4,0\pm 0,1$		
Lactose (g/L.h)	ND	$2,17\pm 0,06$	$2,18\pm 0,05$	$4,1\pm 0,3$	$2,1\pm 0,1$	$2,4\pm 0,1$		

Para uma última avaliação dos resultados obtidos nos cultivos em biorreator, foi construída a Tabela 4.7, na qual são resumidos alguns dos resultados mais promissores para a produção de proteína recombinante utilizando *E. coli* BL21 (DE3), em cultivos em biorreator com meio complexo. Pode-se observar que a maioria dos valores de produtividade protéica encontra-se na faixa de 0,1 a $0,42\text{g/L.h}$, para temperaturas de cultivo e de indução de 37°C . Mesmo com temperaturas de cultivo e indução menores (31°C), o presente trabalho apresentou uma produtividade 176% maior do que o estudo realizado por Zhang *et al.* (2009) utilizando o meio complexo e IPTG como indutor. Estes resultados (da literatura e do presente

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

trabalho) estão de acordo com Machado (2010), que mostrou que os meios complexos apresentam uma maior produtividade em relação ao meio definido. Considerando que um dos principais objetivos dos cultivos de *rE. coli* é a maximização da produtividade em proteína heteróloga (TRIPATHI *et al.*, 2009), a escolha do meio complexo se torna cada vez mais uma boa opção para esse processo.

A alta produção específica alcançada neste trabalho ($\sim 239 \pm 7$ mg de proteína solúvel/g MS, Cultivo 2, com Phytone) foi significativamente superior à relatada em outros estudos, que varia entre 47 e 191 mg de proteína total/g MS.

Um diferencial da estratégia de cultivo desenvolvida no presente trabalho foi a baixa produção de ácido acético, cuja concentração máxima chegou a $\sim 0,7 \pm \text{g/L}$, sendo produzido apenas durante o consumo da glicose (até 7h de cultivo). Nos estudos com o meio complexo desenvolvidos por Silva (2011), a concentração de ácido acético ficou entre 1 e 5 g/L. Embora a composição dos meios de cultivo empregados neste trabalho e no de Silva (2011) seja semelhante, a maior produção de ácido acético no referido trabalho pode ter sido causada pela temperatura de 37°C empregada ou pelo acúmulo de nutrientes durante a fase de alimentação. Segundo Luli & Strohl (1994), as concentrações de ácido acético acima de 5 g/L são capazes de reduzir a velocidade de crescimento e o rendimento em biomassa. Esta comparação entre o trabalho de Silva (2011) e o agora apresentado é útil para ressaltar a facilidade na manutenção das condições de operação que minimizam a produção do ácido acético em cultivo batelada com o meio de autoindução. De fato, cultivos em batelada alimentada correm sério risco de não serem bem sucedidos devido à formação de ácido acético ou outros metabólitos caso ocorra acúmulo de nutrientes na fase de formação de biomassa ou na fase de indução. XU *et al.* (2012), afirmaram recentemente que cultivos de *Escherichia coli* recombinante em autoindução, já contendo lactose desde o início, têm despertado muito interesse, porque maiores quantidades de proteína podem ser alcançadas sem a necessidade de, por exemplo, definir o momento mais apropriado e a melhor concentração celular para adicionar o indutor. Na última coluna da Tabela 4.7, estimou-se a produção de proteína em termos da massa obtida por volume de caldo de cultivo. Nota-se novamente que o valor alcançado no presente trabalho é significativamente superior aos obtidos em outros trabalhos, ressaltando o potencial da estratégia proposta para a obtenção de grandes quantidades de proteínas recombinantes. No entanto, é importante ressaltar que a comparação dos resultados obtidos em culturas de *rE. coli* expressando diferentes proteínas heterólogas deve ser feito com cautela, já que fatores como o número de cópias do plasmídeo,

a toxicidade da proteína e o tamanho da mesma, dentre outros, determinam a capacidade de síntese da célula e podem variar caso a caso.

TABELA 4.7. Comparação de estudos realizados com *rE. coli* BL 21 (DE3) realizados em biorreator.

Referência	Produto	Meio de Cultivo/ autoindução	Fonte de carbono/ Indutor	Tempo de Cultivo (h)	Produtividade em Biomassa (g/L.h)	Produtividade e Protéica (g/L.h)	Cx máximo (g/L)	mg proteína/g MS	T°C Cultivo/ indução	Ácido acético máximo (g/L)	Concentração de Protéina (g/L)
HU <i>et al.</i> , 2004	Tilapia IGF2	Complexo/ não	Glicose/ IPTG	30	5,2	0,32	183	62	37/37	1	5,15
Li <i>et al.</i> , 2006	hsBlyS	Complexo/ não	Glicose/ Lactose	34	0,92	0,11	35	120	37/37	1,5	4,20
GOYAL <i>et al.</i> , 2009	streptokinase	Complexo/ não	Glicose/ IPTG	11	1,31	0,1	20	50	37/37	1	1,00
ZHANG <i>et al.</i> , 2009	TATm-survivin(T34A)	Complexo/ não	Glicose/ IPTG	14	0,63	0,42	8,8	191	37/37	1,8	1,68
Silva, 2011	SpaA	Complexo/ não	Glicose/ IPTG	11,5	1,81	0,25	22	136	37/37	2,1	2,99
Silva, 2011	SpaA	Complexo/ sim	Glicose+ glicerol+	20	1,16 (t=8h)	0,18 (t=8h)	13,5	158 (t=8h)	37/37	5	2,13
Silva, 2011	SpaA	Complexo/ não	Glicerol/ Lactose	20	2,18	0,32	41,9	155	37/37	3,7	6,49
Silva, 2011	SpaA	Complexo/ não	Glicose+ glicerol/ Lactose	16	4,13	0,39	66,1	95	37/37	1,2	6,28
Presente Trabalho Cultivo 2	- PspA4Pro	Complexo/ sim	Glicose+ glicerol+ lactose/ Lactose	17	3,8	1,16±0,03*	38,61±2	239±7*	31/31	0,68±0,03	9,22

* dados referentes apenas a proteínas solúveis

5. CONCLUSÕES

A produção de um fragmento da proteína PspA4Pro foi estudada em cultivos de *Escherichia coli* recombinante em meio complexo conduzidos em câmara incubadora e em biorreator. Os resultados obtidos demonstraram que a Triptona, fonte de nitrogênio tradicionalmente presente em meios complexos para cultivos de *rE. coli*, pode ser eficientemente substituída por um hidrolisado protéico de soja (Phytone), totalmente isento de componentes de origem animal, proporcionando níveis semelhantes de produção de PspA4Pro e de formação de biomassa.

Constatou-se ainda que a produção da proteína heteróloga foi influenciada pela temperatura e pela fonte de nitrogênio empregada no meio de cultivo, tanto nos experimentos conduzidos em câmara incubadora como em biorreator. No conjunto de ensaios preliminares em frascos agitados, uma produção máxima de proteína solúvel de aproximadamente 200mg de PspA4Pro/gMS foi alcançada à temperatura de 25°C, tanto para Phytone como para Triptona como fontes de nitrogênio, enquanto a produção com Soytone foi 40% menor. Já em biorreator, 240mg PspA4Pro solúvel/gMS foram produzidas no cultivo conduzido com Phytone, a 31°C. Esse valor é cerca de 16% superior ao valor observado no cultivo em biorreator com Triptona, também a 31°C e mais que o dobro do alcançado no cultivo com Phytone a 25°C.

É importante destacar que, ao contrário do normalmente relatado na literatura, os estudos conduzidos não revelaram influência da temperatura (na faixa estudada) ou da fonte de nitrogênio sobre a ocorrência de proteína não solúvel, na forma de corpos de inclusão. Nos cultivos conduzidos a 31°C, em biorreator e com meio contendo Phytone ou Triptona, a fração de PspA4Pro solúvel se manteve acima de 80 % da proteína solúvel total. Além disso, a presença de PspA4Pro nos debris celulares obtidos após a sonicação de amostras desses cultivos foi insignificante. A alta percentagem de proteína recombinante solúvel é ainda uma indicação de que o cultivo de *rE. coli* em temperaturas mais elevadas ou em meio complexo não estimula, necessariamente, a síntese de uma diversidade maior de proteínas, o que dificultaria os processos de recuperação e purificação, fato normalmente apontado na literatura como desvantagem no uso dessas condições de cultivo. É claro que essas constatações são válidas para o caso da *rE. coli* BL21(DE3)pET37b+PspA4Pro e precisam ser avaliadas para outros clones antes de generalizadas. Por outro lado, a menor produção de proteína à temperatura mais baixa observada em biorreator demonstra a importância da

manutenção do crescimento em níveis compatíveis com a demanda metabólica associada à síntese da proteína heteróloga. Esse resultado também ressalta o risco de adotar estratégias de produção em larga escala baseadas em estudos conduzidos em frascos agitados, que podem levar a condições subótimas de produção de proteína. De fato, nos ensaios em câmara incubadora, a concentração de ácido acético ao final do cultivo variou entre 0,5 (25°C) e 3g/L (37°C), influenciando a formação de biomassa e a síntese de proteína, que foram maiores a 25°C. Em biorreator, a produção de ácido acético ocorreu somente durante a assimilação de glicose, chegando ao máximo de ~ 0,9g/L, independentemente da temperatura ou da fonte de nitrogênio empregada.

Em relação à produção de biomassa, o mesmo nível de concentração celular final (~ 40g/L) foi alcançado em todos os cultivos conduzidos como batelada, sem aplicação de pulso, embora a Triptona favoreça conversão maior e mais rápida em biomassa. É importante notar, que a concentração final atingida depende também da formação de biomassa durante a fase de indução, a qual é limitada pela disponibilidade de fontes de carbono, preferencialmente direcionadas para atender os requerimentos de manutenção celular relacionados à síntese de proteína recombinante. Por isso, a suplementação com glicerol e lactose (por aplicação de pulso) durante a fase de indução, permitiu incrementar a formação de biomassa até 60g/L.

Em termos de assimilação de aminoácidos, os resultados mostraram que ~ 90% dos aminoácidos livres presentes nas fontes de nitrogênio estudadas foram totalmente consumidos durante a fase de crescimento para os cultivos em biorreator. Já para os estudos em câmara incubadora cerca de 20% dos aminoácidos foram consumidos até 6h de cultivo. Nos cultivos em biorreator conduzidos com Phytone ou com Triptona a 31°C, os aminoácidos mais consumidos foram a serina, o ácido glutâmico e a lisina. Portanto, pode-se concluir que esses aminoácidos desempenham um papel importante durante o crescimento celular. Devido ao esgotamento dos aminoácidos ainda na fase de crescimento, não foi possível avaliar a assimilação dos mesmos durante a fase de indução a partir dos resultados obtidos nos experimentos realizados. Portanto, experimentos complementares são necessários para o estudo da assimilação de aminoácidos durante a fase de indução.

A assimilação das diferentes fontes de carbono presentes no meio pode ser bem avaliada a partir dos resultados obtidos nos cultivos em biorreator. Como esperado, a glicose foi a fonte de carbono preferencialmente consumida. Glicerol e lactose foram assimilados simultaneamente em todos os cultivos realizados, ao final ou durante a assimilação de glicose.

Capítulo 5 – Conclusões

Devido ao intenso crescimento proporcionado pela Triptona, as velocidades de assimilação de glicerol e lactose foram 30% e 100%, respectivamente, superiores às observadas com Phytone a 31°C. Para a temperatura de 25°C e em meio contendo Phytone, o glicerol também passou a ser assimilado mais rapidamente após o esgotamento da glicose, mas o início da assimilação da lactose ocorreu apenas 4h depois. Já a 31°C, glicerol e lactose foram assimilados mais intensamente quando ainda restava ~ 7g/L de glicose no meio. Esses dados demonstram, mais uma vez, o importante papel da temperatura como moduladora da atividade metabólica e o impacto da escolha de uma temperatura baixa para a fase indução sobre o desempenho do processo.

A estabilidade do plasmídeo foi também influenciada pelas condições de cultivo empregadas. Em câmara incubadora, a retenção do plasmídeo ao final do cultivo diminuiu com o aumento de temperatura para os hidrolisados protéicos de soja e manteve-se acima de 90% nos ensaios com Triptona, em todas as temperaturas empregadas. De maneira semelhante, nos experimentos em biorreator, a fração de células retentoras de plasmídeo permaneceu acima de 94% ao final do cultivo com temperatura de indução de 25°C, enquanto nos cultivos conduzidos a 31°C, com Phytone ou Triptona, esse valor caiu a 70%. Esses resultados são coerentes com os relatados na literatura em relação à maior retenção de plasmídeo em temperaturas menores. Nessa condição, a duplicação celular ocorre mais lentamente, facilitando a distribuição do plasmídeo de forma homogênea entre as células filhas. Porém, uma maior degradação do antibiótico em temperaturas mais elevadas também pode estar relacionada à menor retenção do plasmídeo observada nas temperaturas mais altas. Portanto, verifica-se a necessidade de estudos mais específicos para elucidar as causas da instabilidade do plasmídeo e assim definir ações durante os cultivos para minimizá-la.

A partir das considerações expostas acima, conclui-se que o meio complexo de autoindução proposto e validado no presente trabalho constitui uma estratégia interessante para a produção de proteína recombinante baseada no modo de operação em batelada. Cultivos em batelada são curtos, fáceis de executar e acessíveis a qualquer laboratório ou indústria que disponha de biorreatores dotados dos sistemas básicos para controle de temperatura, pH e concentração de oxigênio dissolvido. Utilizando o meio de autoindução proposto e um biorreator com 4L de volume útil, foi possível produzir mais de 50g de proteína recombinante solúvel, obtida em meio adequado às diretrizes de boas práticas de fabricação, o que pode ser produzido aproximadamente 200 mil doses de vacina conjugada antipneumocócica, isenta de IPTG e de fontes de nitrogênio de origem animal.

6. SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Embora a maioria dos objetivos propostos para o presente trabalho tenha sido atingida, a elucidação de algumas questões depende da realização de estudos complementares.

Em relação ao estudo da influência da temperatura sobre a estratégia de autoindução, a realização de 2 novos experimentos em biorreator a 25°C (de duração prolongada) e a 37°C é recomendável.

O aumento da produção específica e da produtividade em proteína, além dos níveis alcançados no presente estudo, depende de uma maior retenção do plasmídeo ao final do cultivo. Nesse sentido, um estudo específico durante a fase de indução envolvendo suplementação com antibiótico ou com aminoácidos, diminuição de temperatura, dentre outras possibilidades, é recomendável. Por sua vez, a escolha dos aminoácidos a serem suplementados durante a fase de indução depende do conhecimento sobre o perfil de assimilação de aminoácidos nesta fase do cultivo e da identificação dos aminoácidos mais intensamente consumidos.

Os excelentes resultados obtidos com o meio complexo proposto podem ser amplificados em combinação com uma estratégia de cultivo em batelada alimentada. Neste caso, a lactose deve ser retirada da formulação do meio de cultivo da batelada e com base nas velocidades de consumo de fontes de carbono e de aminoácidos, pode ser formulado um meio de alimentação para obtenção de concentrações celulares superiores a 100g/L.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAMOFF, M. D.; MAGALHAES, P. J.; RAM, S. J. **Image processing with Image J.** *Biophotonics International*. v.11. p.36-42. 2004.

ALBERTS, B. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula.** Porto Alegre. Ed. Artmed. p.757. 2005.

ALONSODEVELASCO, E.; VERHEUL, A. F. M.; VERHOEF, J. & SNIPPE, H. ***Streptococcus pneumoniae: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines.*** *Microbiol. Rev.* v.59. n° 4. p.591-603. 1995.

ATKINSON, W.; WOLFE, S.; HAMBORSKY, J; MCLNTYRE, L. **Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.** Centers for Disease Control and Prevention. 11th ed. Washington DC: Public Health Foundation. p.304. 2009.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações. Fundamentos de bioprocessos.** EdUFSCar. Universidade Federal de São Carlos. p.160. 2010.

BD. **BD Bionutrients™. Technical Manual.** Advanced Bioprocessing. Third Edition Revised. p. 72. 2006.

BEALL, B. GHERARDI, G. FACKLAM, R. R. HOLLINGSHEAD, S. K. **Pneumococcal PspA sequence types of prevalent multiresistant pneumococcal strains in the United States and of internationally disseminated clones.** *J Clin Microbiol.* v.38 p.3663-3669. 2000.

BENTLEY S. D.; AANENSEN, D. M.; MAVROIDI, A; SAUNDERS, D; RABBINOWITSCH, E.; COLLINS, M.; DONOHOE, K.; HARRIS, D.; MUEPHY, L. QUAIL, M. A.; SAMUEL, G.; SKOVSTED, I. C.; KALTOFT, M. S.; BARRELL, B. T.; REEVES, P. R.; PARKHILL, J.; SPRATT, B. G. **Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes.** *Plos Genet* v.2 p.31. 2006.

BIOCHEM & SCIENCE NOTAS. **Transcription DNA to RNA.** Disponível em: < <http://biochem.co/2008/08/transcription-dna-rna/> >. Acesso em: 21 de janeiro de 2011.

BLOMMEL, P. G.; BECKER, K. J.; DUVNJAK, P.; FOX, B. G. **Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition.** *Biotechnol. Prog.* v.23. p.585-598. 2007.

BOGAERT, D.; HERMANS, P. W. M.; Adrian, P. V.; RUMKE, H. C.; de GROOT, R. **Pneumococcal vaccines: an update on current strategies.** *Vaccine*, v.22, p.2209-2220, 2003.

BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* v.72 p.248-254. 1976.

BRANDILEONE, M. C. C. **Distribuição de sorotipos, Resistência Antimicrobiana e Perfil Molecular de *Streptococcus pneumoniae* Isolados de Doença Invasiva no Brasil: 1993 a 1998.** p. 156. Tese em Ciências. Escola Paulista de medicina da Universidade Federal de São Paulo. 1999.

BRANDILEONE, M.C., ANDRADE, A.L., Di FABIO, J.L., GUERRA, M.L. and AUSTRIAN, R. **Appropriateness of a pneumococcal conjugate vaccine in Brazil: potential impact of age and clinical diagnosis, with emphasis on meningitis.** *J Infect Dis.* v.187 p.1206-1212. 2003.

BRILES D. E. TART R. C. SWIATLO, E. DILLARD J. P. SMITH, P. BENTON, K. A. RALPH, B. A. BROOKS-WALTER, A. CRAIN M. J. HOLLINGSHEAD, S. K. E MCDANIEL, L. S. **Pneumococcal diversity: considerations for new vaccine strategies with an emphasis on pneumococcal surface protein A (PspA).** *Clin. Microbiological Rev.* v.11 p.645-657. 1998.

BRILES, D. E.; HOLLINGSHEAD, S. K.; KING, J.; SWIFT, A.; BRAUN, P. A.; PARK, M. K.; FERGUNSON, L. M.; NAHM, M. H.; NABORS, G. S. **Immunization of humans with rPspA elicits antibodies, which passively protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae* bearing heterologous PspA.** *Journal Infect. Dis.* v.182. p.1694-1701. 2000.

BROWN, T. A. **Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução.** 4 ed. Porto Alegre. Artmed. p.376. 2003.

BUTLER, J. C.; BREIMAN, R. F.; CAMPBELL, J. F. **El Pneumococcal polysaccharide vaccine efficacy and evaluations of current recommendation.** *JAMA* v.270: p.1826-1831. 1993.

BUTLER, J. C.; DOWELL, S. F.; BREIMAN, R. F. **Epidemiology of emerging pneumococcal drug resistance: implications for treatment and prevention.** *Vaccine.* v.16 p.1693-1697. 1998.

Capítulo 7 – Referência Bibliográfica

CAMPANI JR, G.; SANTOS, M. P.; SARGO, C. R.; HORTA, A. C. L. GONÇALVES, V. M.; ZANGIROLAMI, T. C. **Suplementação com aminoácidos chave como estratégia para aumento da produção de proteína recombinante em *E. coli***. XIX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. 2012.

CARMO, T. S. **Otimização da produção de polissacarídeo capsular do *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 6B em biorreator**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo. Instituto Butantan. São Paulo. p.129. 2010.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. 4º edição. Ed. Artmed. Porto Alegre. p.520. 2009.

CLELAND, D.; JASTRZEMBSKI, K.; STAMENOVA, E.; BENSON, J.; CATRANIS, C.; EMERSON, D. BECK, B. **Growth characteristics of microorganisms on commercially available animal-free alternatives to tryptic soy medium**. *Journal of Microbiological Methods*. v.69. p.345-352. 2007.

CORCHERO, J. L. VILLAVERDE, A. **Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant cultures is dramatically, steadily, and specifically influenced by features of the encoded proteins**. *Biotechnol. Bioeng*. v.58. p.625-632. 1998.

CRAYNEST, M. BARBOTIN, J. N. TRUFFAUT, N. THOMAS, D. **Stability of plasmid pHV1431 in free and immobilized cell cultures**. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. v.782. p.311-322. 1996.

DAWSON C. **What is a pneumococcus?** In: Tuomanen E MT, Morrison DA, Spratt BG. *The Pneumococcus*. 2 ed. Washington D. C. ASM p.30-48. 2004.

DEIBEL, R. H. & SEELEY JR H. W. **Family II: Streptococcaceae**. In: Buchanan RE & Gibbons NE, (ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: Willians & Wilkins. p. 490-517. 1974.

DI FABIO, J. L.; CASTANEDA, E.; AGUDELO, C. I.; DE LA HOZ, F.; HORTAL, M.; CAMOU, T.; ECHANIZ-AVILES, G.; NOEMI, M.; BARAJAS, C.; HEITMANN, I.; HORMAZABAL, J. C.; BRANDILEONE M. C. C.; DIAS VIERA, V. S.; REGUEIRA, M.; RUVINSKI, R.; CORSO, A.; LOVEGREN, M.; TALBOT, J. A.; DE QUADROS, C. **Evolution of *streptococcus pneumoniae* serotypes and penicillin susceptibility in Latin America, Sivera-Vigía Group, 1993 to 1999**. PAHO Sireva-Vigia Study Group. Pan Americam Health Organization. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.20. n.10. p.959-967. 2001.

EXPASY. **Bioinformatics Resource Portal**. Disponível em: < <http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>>. Acesso em: 10 junho de 2012.

FRANÇOIS, B. **Recombinant Protein expression in *Escherichia coli***. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.10. p.411-421. 1999.

FRASCH, CE. **Regulatory perspectives in vaccine licensure. In: Development and clinical uses of Haemophilus conjugate vaccines**. Ellis, RW, Granoff, DM eds. Marcel Dekker, Inc, N.Y. p.435-454. 1994.

FUCHS, S. C.; FISCHER, G. B.; BLACK, R. E.; LANATA, C.; **The burden of pneumonia in children in Latin America**. *Pediatr Respir Rev.* v.6 p.83-87. 2005.

GOMBERT, A. K.; KILIKIAN, B. V. **Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer**. Departamento de Engenharia Química. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. *Journal of Biotechnology.* v.60. p.47-54. 1998.

GOYAL. D.; SAHNI, G. SAHOO, D. K. **Enhanced production of recombinant streptokinase in *Escherichia coli* using fed-batch culture**. *Bioresource Tech.* v.100. p. 4468-4474. 2009.

HÄGG, P.; DePOHL, J. W.; ABDULKARIM, F. & ISAKSSON, L. A. **A host/plasmid system that is not dependent on antibiotics and antibiotic resistance genes for stable plasmid maintenance in *Escherichia coli***. *J. Biotechnology.* v.111. p.17-30. 2004.

HAUSDORFF, W. P.; BRYANT J. PARADISO, P. R.; SIBER, G. R. **Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I**. *Clin Infect Dis.* v.30 p.100-121. 2000.

HENRICHSEN, J. **Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae***. *J Clin Microbiol.* v.33. p2759-2762. 1995.

HOFFMAN, B. J.; BROADWATER, J. A.; JOHNSON, P.; HARPER, J.; FOX, B. G.; KENEALY, W. R. **Lactose fed-bath over expression of recombinant metalloproteins in *Escherichia coli* BL21 (DE3): process control yielding high levels of metal incorporated, soluble protein**. *Protein Expression Purif.* v.6 p.646-654. 1995.

HORTA, A. C. L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante**. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. 2011.

HU, S. Y.; WU, J. L.; HUANG, J. H. **Production of tilapia insulin-like growth factor-2 in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli***. *J. Biotechnol.* v.107. p.161-171. 2004.

HUMBERTO, J. L. & SILVA, T. H. A. **Síntese de derivados de Tio- β -galactopiranosídeos como indutor em sistemas de expressão de proteínas que utilizam o “*lac-operon*”**. 29^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Sociedade Brasileira de Química. 2006.

JANA, S. & DEB, J. K. **Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli***. *Appl. Microbiol Biotechnol.* v.67. p.289-298. 2005.

JIA, L.; CHENG, H. WANG, H. LUO, H.; YAN, H. **From shake flasks to bioreactors: survival of *E. coli* cells harboring pGST-hPTH through auto-induction by controlling initial content of yeast extract**. *Appl Microbiol Biotechnol.* v.90 p.1419-1428. 2011.

KAIJALAINEN, T. **The identification of *Streptococcus pneumoniae***. Academic Dissertation. Department of Viral Diseases and Immunology, National Public Health Institute, Oulu, Finland. Department of Medical Microbiology. Department of Nursing Science and Health Administration, Faculty of Medicine. University of Oulu, Finland. p.76. 2006.

KAMERLING, J. P. **Pneumococcal polysaccharides: A chemical view – *Streptococcus pneumoniae***. Molecular Biology & Mechanisms of Disease (A. Tomasz, ed.), Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, New York. p.81-114. 2000.

KEGG. **Kegg Pathway Maps**. Disponível em: <http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?org_name=ebe&mapno=00260&mapscale=&show_description=hide>. Acesso em: 7 agosto de 2012.

KILIKIAN, B. V.; SUÁREZ, I. D.; LIRIA, C. W.; GOMBERT. A. K. **Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction**. Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. *Process Biochemistry.* v.35. p.1019-1025. 2000.

KLEIN, DL & ELLIS, RW. **Conjugate vaccines against *Streptococcus pneumoniae* in: Newgeneration vaccines**. Ed. Levine, MM, Woodrow, GC, Kaper, JB, Cobon, GS. 2nd ed. Marcel Dekker NY. p.503-525, 1997.

KLEMANN, G. L. & STROHL, W. R. **Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation**. *Current Opinion in Biotechnology.* v.5. p.180-186. 1994.

-
- KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDRES, E. A. & DECKWER, W. D. **Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli***. *Journal of Biotechnology*. v.39. p. 59-65. 1995.
- LAEMMLI, V. K. **Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*. v.227. p.680-685. 1970.
- LEE, J.; SARASWAT, V.; KOH, I.; SONG, K. B.; PARK, Y. H.; RHEE, S. K. **Secretory production of Artrobacter levan fructotransferase from recombinant *Escherichia coli***. *FEMS Microbiology Letters*. v.195. p.127-132. 2001.
- LEE, S. Y. **High cell-density culture of *Escherichia coli***. *Ibitech March*. v.14. p.98-105. 1996.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 4ª edição. Sarvier: São Paulo. p.1204. 2006.
- LI, Z.; ZHANG, X.; TAN, T. **Lactose-induced production of human soluble B lymphocyte stimulator (hsBLys) in *E. coli* with different culture strategies**. *Biotechnol Lett*. v.28. p.477-483. 2006.
- LIMA, B. D. **Produção de insulina humana através de precursores recombinantes em *Escherichia coli***. Tese da Universidade de Brasília. 1993.
- LIMA, W. J. N. **Produção de Proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular**. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. p.158. 2004.
- LIN N. S., & SWARTZ, J. R. **Production of heterologous proteins from recombinant DNA *Escherichia coli* in bench fermentors**. *Methods*. v.4 p.159–168 1992.
- LIRIA, C. W. **Processo descontínuo alimentado no cultivo de *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS para produção de proteína recombinante troponina C**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade de São Paulo. p.128. 1995.
- LULI, G. W. & STROHL, W. R. **Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation**. *Applied and Environmental Microbiology*. v.56. p.1004-1011. 1990.

Capítulo 7 – Referência Bibliográfica

MACHADO, M. M. P. **Inovação nas condições de cultivo visando o melhoramento da produção de vacina contra erisipela suína.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal de São Carlos. UFSCar. p.145. 2010.

MADURAWA, R. D.; CHASE, T. E.; TSAO, E. I.; BENTLEY, W. E. **A recombinant lipoprotein antigen against Lyme disease expressed in *E. coli*: fermentor operating strategies for improved yield.** *Biotechnol Progress* v.16 p.571–576. 2000.

MANGTANI, P.; CUTTS, F. & HALL, A.J. **Efficacy of polysaccharide pneumococcal vaccine in adults in more developed countries: the state of the evidence.** *Lancet Infect Dis*,3, 71-78, 2003.

MARKIDES, S. C. **Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*.** *Microbiological Reviews*. v.60. p.512-538. 1996.

MÄRKL, H. ZENNECK, C.; DUBACH, A. C. H.; OGBONNA, J. C. **Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.39. p.48-52. 1993.

MARTHOS, B. V.; FERRI, A. E. S. ; FIGUEIREDO, D. B.; TAKAGI, M. ;GONÇALVES, V. M. **Estudo da fonte de nitrogênio para produção de polissacarídeo capsular em cultivos de *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 1.** In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos - Sinaferm2011. Caxias do Sul - RS. Anais do Sinaferm 2011. São Paulo - SP: ABEQ. p. 478-1. 2011.

MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A. & GRAMAJO, H. C. **Novel *Escherichia coli* Dtrain Allows Efficient Recombinant Protein Production Using Lactose as Inducer.** *Biotechnology and Bioengineering*. v.82 no.7. p.809-817. 2002.

MERTEN, O. W.; MATTANOVICH, D.; LANG, C.; LARSSON, G.; NEUBAUER, P.; PORRO, D.; POSTMA, P.; TEIXEIRA, M. J.; COLE, J. A: **Recombinant Protein Production with Prokaryotic and Eukaryotic Cells: Selected Articles from the Meeting of the EFB Section on Microbial Physiology, Semmering/A, 5-8 October 2000.** In: A Comparative View on Host Physiology. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. 2001

MIGOWSKI, E.; KFOURI, R. & BRANDILEONE, M. C. C. **Doença Pneumocócica Invasiva (DPI): importância e impacto na saúde.** Informe DPI. Associação Brasileira de Imunizações. Rio de Janeiro. p.12. 2008.

MORENO, A. T.; OLIVEIRA, M. L. S.; FERREIRA, D. M.; HO, P. L.; DARRIEUX, M.; LEITE, L. C. C.; FERREIRA Jr, J. M. C.; PIMENTA, F. C.; ANDRADE, A. L. S. S.; MIYAJI, E. N. **Immunization of mice with single PspA fragments induces antibodies**

capable of mediating complement deposition on different Pneumococcal strains and cross-protection. *Clinical and Vaccine Immunology*. v.17(3). p.439-446. 2010.

NAYAK, D. P. & VYAS, V. V. **Improved stability and expression of a recombinant shuttle plasmid in *Escherichia coli* during fedbatch cultivation.** *World J. Microbiology & Biotechnology*. v.15. p.65-71. 1999.

NEUBAUER, P.; WOLFF, C.; HECKER, M.; HOFFMANN, K. MEYER, KRUSCHKE, L. ; HEINRICH, H. W. **Introduction of the tac-promoter by lactose under fermentation conditions.** *Acta Biotechnol.* v.11. p.23-29. 1991.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines on Tissue Infectivity Distribution in Transmissible spongiform Encephalopathies.** World Health Organization. p. 78. 2006.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products.** p.29. 2003

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The World Health Report. Make every mother and child count.** p.243. 2005.

PARKER, C. & DiBIASIO. D. **Effect of growth rate and expression level on plasmid stability in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Biotechnol. Bioeng.* v. 29. p. 215-221. 1987.

PIMENTA F. C.; RIBEIRO-DIAS, F.; BRANDILEONE, M. C.; MIYAJI, E. N.; LEITE, L. C. E ANDRADE, A. L. S. S. **Genetic diversity of PspA types among nasopharyngeal isolates collected during an ongoing surveillance study of children in Brasil.** *J Clin Microbiol.* v.44. p.2838-2843. 2006.

PRESCOTT, L. M. **Microbiology.** Dubuque, IA: Wm. C. Brown Publishers. 1996.

RAMÍREZ, D. M.; BENTLEY, W. E. **Enhancement of recombinant protein synthesis and stability via coordinated amino acid addition.** *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p.557-565. 1993.

RIESENBERG, D. **High-cell-density cultivation of *Escherichia coli*.** *Current Opinion in Biotechnology*. v.2 p.380-384. 1991.

RIESENBERG, R. & GUTHKE, R. **High cell density cultivation of microorganisms.** *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.51. p.422-430. 1999.

Capítulo 7 – Referência Bibliográfica

RINAS, U. **Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*.** *Biotechnology Progress*. v.12(2). p.196-200. 1996.

ROCHA, I. C. A. P. **Model-based strategies for computer-aided operation of recombinant *E. coli* fermentation.** Thesis submitted to the Graduate Program at the University of Minho. p.285. 2003.

SALYERS, A. A. & WHITT, D. D. **Bacterial Pathogenesis: a molecular approach.** Washington, DC: ASM Press. 1994.

SAMBROCK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd. New York. p.956. 1989.

SAMPAIO, M. D. **Expressão, Purificação e Avaliação Imunológica de Formas Truncadas e Híbridos da Proteína de Superfície de Pneumococo A (PspA).** Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pelo Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo. p.125. 2007.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de r*E. coli* utilizando glicerol como fonte de carbono.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. UFSCar. p. 112. 2011.

SEEGER, A.; SCHNEPPE, B.; CARTHY, M. C.; DECKWER, W. D.; RINAS, U. **Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.17. n° 10, p.947-953. 1995.

SHILOACH, J. & FASS, R. **Growing *E. coli* to high cell density – a historical perspective on method development – review.** *Biotechnology Advances*. p. 345-357, v. 23. 2005.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEI, S. M. V.; BABAEIPOUR, V. & FARNOUD, A. M. **Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein.** Review article. *Iranian Journal of Biotechnology*, v.6. n.2. p.63-84. 2008.

SHULER, M. L. & KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**. ed.2. Prentice Hall. Englewood Cliff. p.553. 2002.

SILVA, A. J. **Vacinas Recombinantes contra Erisipela suína: Desenvolvimento Integrado de Bioprocesso, da Biologia Molecular ao Biorreator.** Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos. p.188. 2011.

SILVA, F.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F. C. **Evaluating metabolic stress and plasmid stability in plasmid DNA production by *Escherichia coli*.** *Biotechnology Advances*. v.30 p.691-708. 2012

SILVA, M. **Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície, PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*.** Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia. USP/Instituto Butantan/IPT. São Paulo. 2005.

SOGAL, A. & TOFE, A. J. **Risk Assessment of Bovine Sponjform Encephalopathy Transmission Through Bone Graft Material Derived From Bovine Bone Used For Dental Applications.** *J Periodontol*. v.70(9) p.1053-1063. 1999.

SPIEGELEER, P.; SERMON, J.; LIETAERT, A.; AERTSEN, A.; MICHIELS, C. W. **Source of tryptone in growth medium affects oxidative stress resistance in *Escherichia coli*.** *Journal of Applied Microbiology*. v.97. p.124-133. 2004.

STRYER, L. **Bioquímica.** 4. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara. p.1000. 1996.

STUDIER, F. W. **Auto-indução for protein production in inducible T7 expression systems.** Annual Meeting of American Cryslallographic Association. Chicago. IL. p.17-22. 2004.

STUDIER, F. W. **Protein production by auto-induction in high-density shaking culture.** *Protein Express Purif*. v.41 p.313-322. 2005.

SUMMERS, D. K. **The kinetics of plasmid loss.** TIBTECH 9. p. 273-278.1991.

TAM, R. & SAIER, M. H. **Structural, Functional, and Evolutionary Relationships among extracellular Solute-Binding Receptors of Bacteria.** *Microbiol. Rev.*, v.57. p.320-346. 1993.

TEELE, D.W. **Pneumococcal Infections.** In: FEIGIN, R. D.; CHERRY, J. D. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 4º ed. Filadélfia: WB Saunders Company. p.1129-1136. 1998.

THE QIAEXPRESSIONIST. **A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.** Qiagen. p.128. 2003.

Capítulo 7 – Referência Bibliográfica

TOMAZETTO, G. **Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL 21 utilizando lactose como indutor.** Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS. Porto Alegre. p.72. 2006.

TRIPATHI, N. K.; SHRIVASTVA, A.; BISWAL, K. C. RAO, P. V. L. **Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli*.** Review methods. *Industrial Biotechnology* v.5(3). p.179-183. 2009

TYLER, R. C.; SREENATH, H. K.; Singh, S.; ACETI, D. J.; BINGMAN, C. A. MARKLEY, J. L.; FOX, B. G. **Auto-induction medium for the production of [U-¹⁵N] and [U-¹³C, U-¹⁵N]-labeled proteins for NMR screening and structure determination.** *Protein Expr. Purif.* v.40 p.268-278. 2005.

VAN HOEK, P.; HULSTER, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK; J. T. **Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast.** *Biotechnol Bioeng.* v. 68,p. 517-523. 2000.

VAZ, M. R. F. **Estudo do cultivo de dois clones de *Escherichia coli* recombinantes (eIF, LACK) para a expressão de antígenos da *Leishmania Chagasi*.** Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em engenharia química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. p.79. 2008.

VIEIRA, A. C.; GOMES, M. C.; ROLO FILHO, M.; EUDES FILHO, J.; BELLO, E. J. M.; FIGUEIREDO, R. B. ***Streptococcus pneumoniae*: a study of strains isolated from cerebrospinal fluid.** *Jornal de Pediatria.* v.83 n.1 . p.71-78. 2007.

WAEGEMAN, H. & SOETAERT. **Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* through metabolic and genetic engineering.** *J Ind Microbiol Biotechnol.* v.38 p.1891-1910. 2011.

WANG, F. & LEE, S. Y. **High cell density culture of metabolically engineered *Escherichia coli* for the production of Poly(3-hydroxybutyrate) in a Defined Medium.** *Biotechnology and Bioengineering.* v.58(2). p.325-328. 1998.

WATSON, D. A.; MUSER, D. M.; JACOBSON, J. W. & VERHOEF, J. **A Brief History of the Pneumococcus in Biomedical Research: A Panoply of Scientific Discovery.** Veterans Affairs Medical Center, Baylor College of Medicine. Houston. Texas. *Clin Infect Dis.* v.5. p.913-924. 1993.

WENGER, J.D.; BOOY, R.; HEATH, P.T.; MOXON, R. **Epidemiological impact of conjugate vaccines on invasive disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. in: New generation vaccines.** Ed. Levine, MM, Woodrow, GC, Kaper, JB, Cobon, GS. 2nd ed. Marcel Dekker NY. P.489-502, 1997.

WILLETT, H.P. *Streptococcus pneumoniae*. In: JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B.; WILFET, C.M. *Zinsser Microbiology*, 20^o ed, USA: Norfolk. p.432-42. 1992.

XU, J.; BANERJEE, A.; PAN, S. H.; LI, Z. J. **Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains.** *Protein Expression and Purification*. v.83. p.30-36. 2012.

YAZDANI, S. S.; SHAKRI, A. R.; CHITNIS, C. E. **A high cell density fermentation strategy to produce recombinant malarial antigen in *E. coli*.** *Biotechnology Letters*. v.26. p.1891-1895. 2004.

YOTHER J. Capsules. In: Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison DA Spratt BG. *The Pneumococcus*. Washington, D. C. ASM Press. p.30-48. 2004.

ZHANG, H. ZHENG, Y. LIU, Q.; TAO, X.; ZHENG, W.; MA, X.; WEI, D. **Development of a fed-batch process for the production of anticancer drug TATm-survivin(T34A) in *Escherichia coli*.** *Biochem Eng J*. v.43. p.163-168. 2009.

ZHANG, J. & GREASHAM, R. **Chemically defined media for commercial fermentations.** *Appl. Microbiol. Biotechnol*. v.51 p.407-421. 1999.

ZHANG, R.; LI, X. B.; XU, M. M.; LI, Y. D.; LU, X. Y.; ZHANG, J. H.; JIANG, N.; CHEN, W. M.; SHI, X. L. e SONG, Z. **Research on animal-free medium of *Streptococcus pneumoniae* and new purification process of pneumococcal polysaccharide.** Chengdu Institute of Biological Products Co. Ltd. China. *Chinese Journal of New Drugs*. v.21 (10) p.1080-1084. 2012.

ZHAO, F. Y.; BAI, Y. L.; ZHANG, X. M.; GAO, C. C. **Segregational stability of the pNK₂₈₉-derived plasmid in *Bacillus subtilis*.** *Microbiology*. v.28. p. 50-55. 2001.