

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, REOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DOS
CULTIVOS DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE**

Gabriel Gonçalves Silva

São Carlos - SP

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, REOLÓGICOS E FISIOLÓGICOS DOS
CULTIVOS DE *ESCHERICHIA COLI* RECOMBINANTE**

Gabriel Gonçalves Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^ª. Teresa Cristina Zangirolami (DEQ-UFSCar)

Co-orientador: Prof. Adilson José da Silva (DEQ-UFSCar)

São Carlos - SP

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Gabriel Gonçalves
Aspectos morfológicos, reológicos e fisiológicos dos
cultivos de Escherichia coli recombinante / Gabriel
Gonçalves Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
141 p.


Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.


1. Reologia. 2. Morfologia. 3. Escherichia coli.
4. Proteína recombinante. 5. Balanço de carbono. I.
Título.


MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE GABRIEL GONÇALVES SILVA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE ABRIL DE 2015.


BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar


Adilson José da Silva
Coorientador, UFSCar


Viviane Maimoni Gonçalves
Instituto Butantan


Alberto Colli Badino Júnior
UFSCar


Daniela Matilde Marques Correia
UFSCar

À minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Walter e Maria Aparecida, que sempre me apoiaram em todos os momentos.

A minha querida avó Marina, que jamais será esquecida.

A minha família: o amor dos meus tios e tias, ao companheirismo dos meus primos e primas e a sabedoria dos meus avôs a avós.

A todos os colegas de laboratório, os quais sempre me ajudaram a tornar esse trabalho realidade: Gilson Campani, Cíntia Sargo, Jéssica Bonomo, Antônio Carlos Horta, João Victor Andrade, Mariana Martins, Letícia Passos, Carolina Ferreira, Caroline Borges, Adilson Júnior, Maurício dos Santos e Paula Higasi, e tantos outros colegas dos laboratórios vizinhos.

A todos que estiveram sempre ao meu lado durante toda a graduação, pós-graduação e minha vida: Gustavo de Oliveira, Mariana Batistão, Mateus Nordi, Jaqueline Vidotti, Gabriel Michigami, Luiza Mota, Isabela Martinatti, Felipe Matos, Juliana de Sá, Daniela Rossetto, Naiara Souza, Ana Carolina Corazza, Natália Carrion, Raul Costa, Gustavo Costa, Tainá Colachequi, Marina Luccas, José Diniz, Anna Paula Tófoli e Artur Quini.

A todos os meus demais amigos e meus colegas de curso, cuja grande amizade jamais será esquecida.

A Professora Teresa Cristina Zangirolami, pelos conselhos, orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Adilson José da Silva pela ajuda, paciência, além de contribuições e sugestões valiosas para esse trabalho.

Aos demais professores e pesquisadores que integraram a banca avaliadora deste trabalho e aos que também, de alguma forma, contribuíram para a realização dele.

Aos técnicos, cujo trabalho e dedicação possibilitaram a realização deste trabalho.

A UFSCar e seus docentes e funcionários, sem os quais nada disso seria possível.

A todos que possam usar esse trabalho de forma positiva para a humanidade e que, com ele, possam contribuir à ciência.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: CAPES e FAPESP.

“It is sometimes said that scientists are unromantic, that their passion to figure out robs the world of beauty and mystery. But [...] it does no harm to the romance of the sunset to know a little bit about it.”

(Carl Sagan)

RESUMO

O uso de cultivos de *Escherichia coli* para obtenção de proteínas heterólogas tem se mostrado uma área de aplicação bem sucedida da biotecnologia para a produção de fármacos e enzimas. Contudo, o estresse provocado pela síntese da proteína recombinante e pelas condições de cultivo pode desencadear respostas fisiológicas na célula, assim como provocar mudanças na morfologia celular e na reologia do caldo de cultivo. O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar as mudanças na morfologia celular, na reologia dos caldos e o efeito de diferentes temperaturas e indutores sobre as respostas celulares durante o processo de produção de proteínas recombinantes por *rE. coli* em cultivos em batelada. Foram acompanhados cinco cultivos de média densidade celular de dois clones de *rE. coli*, conduzidos em meio definido contendo glicerol como principal fonte de carbono e como indutores IPTG e lactose em duas temperaturas (37°C e 27°C). Todos os cultivos foram realizados em biorreator de bancada de 5 L dotado de sistema de monitoramento e controle. Durante esses cultivos, amostras foram coletadas e os parâmetros reológicos foram avaliados por meio de um reômetro de cilindros concêntricos. As características morfológicas do microrganismo foram também acompanhadas com auxílio de microscopia ótica associada a programa de análise de imagens digitalizadas. Foram ainda monitoradas a concentração celular da suspensão (por medida de densidade ótica e massa seca), a concentração de açúcares e ácidos orgânicos (por HPLC), a retenção plasmidial (repicagem em placas com e sem antibiótico), a concentração de células cultiváveis (por contagem de unidades formadoras de colônia), a produção de proteína recombinante (por densitometria), a concentração de proteína solúvel (pelo método de Bradford) e a presença de polissacarídeo no caldo (pelo método fenol sulfúrico). Verificou-se que os caldos, inicialmente newtonianos, passam por uma mudança de comportamento reológico durante a fase de crescimento, passando a se comportar como um fluido Binghamiano. Durante a fase de indução, o índice de consistência e a tensão de cisalhamento inicial tiveram respostas ligadas à concentração celular e ao estresse causado pela síntese de proteína, respectivamente, e a intensidade desta resposta dependeu do indutor usado. A análise do comprimento celular não permitiu associar as mudanças reológicas com mudanças significativas na morfologia da população durante o cultivo. Verificou-se alteração na correlação entre a concentração celular (medida pelo método da massa seca) e a densidade ótica quando lactose foi empregada como indutor, em função do acúmulo de galactose no interior das células devido à incapacidade da bactéria em metabolizar essa fonte de carbono resultante da hidrólise da lactose. Foi possível observar a presença uma pequena quantidade de PspA e de material genético no caldo de cultivo, provavelmente devido a permeabilização e lise de pequena parte da população. Contabilizou-se a recuperação do carbono para todos os experimentos, obtendo-se valores próximos de 100 % antes da indução em todos os casos. Após a indução foi verificada uma acentuada queda nessa recuperação. Porém, incluindo o carbono presente no polissacarídeo quantificado no caldo de cultivo, foi possível recuperar todo o carbono fornecido na forma de biomassa, CO₂ e polissacarídeo. Por fim, a maior produção de proteína foi obtida a 37°C e induzida por IPTG, alcançando 125 mgPspA/gMS, em cultivo caracterizado pela curta duração da fase de indução (apenas 4 horas). Os resultados contribuem para ampliar a compreensão do processo de produção de proteínas heterólogas por *rE. coli* e permitem definir estratégias de intensificação da produção de proteína.

Palavras-chave: Reologia, Morfologia, *Escherichia coli*, Proteína Recombinante, Balanço de Carbono.

ABSTRACT

The use of *Escherichia coli* cultures to obtain heterologous proteins poses as a successful application of biotechnology for the production of drugs and enzymes. However, the stress caused by the synthesis of the recombinant protein as well as by the culture conditions may trigger physiological responses on the cell and also cause changes in the cell morphology, impacting on the rheology of the culture broth. This study aimed to evaluate changes in cell morphology, on the rheology of the broth and the effect of different temperatures and inducers in the cellular responses during recombinant protein production by *E. coli* in batch cultures. Five medium cell density cultures were conducted with two clones of *rE. coli*, using defined medium containing glycerol as main carbon source and different inducers (IPTG and lactose), at two different temperatures (37°C and 27°C). All experiments were performed in 5 L bench bioreactor, equipped with a monitoring and control system. Samples were collected throughout the experiments and rheological parameters were measured using a concentric cylinder rheometer. The morphological characteristics of the microorganism were also examined by optical microscopy associated with image analysis. The concentrations of cellular suspension (optical density and dry cell weight) as well as of sugars and metabolites (HPLC), the plasmid retention (subculture on plates with and without antibiotic), the concentration of viable cells (colony forming units), the production of recombinant protein (densitometry), the concentration of soluble proteins (Bradford protein assay) and the presence of polysaccharide in the broth (phenol–sulfuric method) were also monitored. It was found that broths, initially behaving as Newtonian fluids, undergo a change in rheological behavior during the growth phase, exhibiting a Bingham fluid behavior. During the induction phase, the consistency index and the initial shear stress seemed to follow the changes in cell concentration or the stress caused by the protein synthesis, respectively. In addition, the intensity of the variation of both rheological parameters seemed to be dependent upon the used inducer. The morphology analysis showed that rheological properties could not be explained by changes in cell length. The correlation between the cell concentration (measured by dry-weight method) and the optical density when lactose was employed as inducer, due to galactose accumulation within the cells as a result of the inability of the bacteria to metabolize this carbon source. The presence of a small amount of PspA and genetic material in the culture broth was probably due to permeabilization and lysis of a small part of the population. Carbon recovery analysis was performed for all cultures, leading to values close do 100 % before induction, in all studied cases. After induction, a sharp decrease on the recovery was observed. However, by including the carbon present in the polysaccharide quantified in the cultivation broth, it was possible to recover all supplied carbon as biomass, CO₂ and polysaccharide. Finally, the highest production of protein was obtained at 37°C when induced by IPTG, reaching 125 mgPspA/gMS. The results contribute to a deeper understanding of the heterologous proteins production by *rE. coli* and allow the definition of intensification strategies for protein production.

Keywords: Rheology, Morphology, *Escherichia coli*, Recombinant Protein, Carbon Balance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Representação esquemática do projeto global de mapeamento dos aspectos fisiológicos, morfológicos e reológicos em cultivos de <i>rE. coli</i> .	17
Figura 2.1	Curvas genéricas de escoamento de fluidos independentes do tempo.	23
Figura 2.2	Curvas genéricas de escoamento de fluidos dependentes do tempo.	24
Figura 2.3	Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da célula de <i>E. coli</i> para: A - cultivo em batelada com 6,5g/L; B - cultivo em batelada alimentada com 127g/L.	25
Figura 2.4	Formato, comprimento e diâmetro médio de uma célula de <i>E. coli</i> em condições normais, não estando em processo de divisão	28
Figura 2.5	Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da célula de <i>E. coli</i> em: A - cultivo em batelada com 6,5g/L; B - cultivo em batelada alimentada com 127g/L.	30
Figura 2.6	Microscopia ótica mostrando a morfologia da <i>E. coli</i> : A - durante expressão de proteína CBD fusionada à lunasina; B - durante expressão de proteína CBD sozinha.	31
Figura 3.1	Biorreator de bancada exibindo aspectos exteriores e interiores (Escala: régua 20cm).	39
Figura 3.2	Esquematização do biorreator com sistema de aquisição e controle das variáveis do processo.	40
Figura 3.3	Reômetro de cilindros concêntricos e acessórios. A - Banho termostatizado; B: Reômetro de cilindros concêntricos; C: Computador de controle e aquisição de dados.	42
Figura 3.4	Reograma típico obtido para fluido newtoniano.	43
Figura 3.5	Gel de poliacrilamida 12% exemplificando a presença da proteína PspA.	44
Figura 3.6	Cálculo da porcentagem relativa da proteína recombinante em relação a proteínas totais obtidas no gel de eletroforese (A) Quantificação da área sob a curva através do software ImageJ [®] (B).	45
Figura 3.7	Imagem da geometria aproximada da célula para o cálculo do volume.	46
Figura 3.8	Imagem de lâmina bacteriológica adquirida para determinação do diâmetro, comprimento e volume celular.	47
Figura 3.9	Imagem do biorreator em operação durante experimento e detalhe do caldo de cultivo em seu interior.	54
Figura 4.1	Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de PspA, reologia e UFC no Cultivo 1 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG, 37°C).	57
Figura 4.2	Distribuição do comprimento celular no Cultivo 1 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).	60
Figura 4.3	Distribuição do volume celular no Cultivo 1 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).	61
Figura 4.4	Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 2 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose).	64

Figura 4.5	Distribuição do comprimento celular no Cultivo 2 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).	67
Figura 4.6	Distribuição do volume celular no Cultivo 2 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).	68
Figura 4.7	Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, reologia e UFC no Cultivo 3 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose).	72
Figura 4.8	Distribuição do comprimento celular no Cultivo 3 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose a 37°C).	75
Figura 4.9	Distribuição do volume celular no Cultivo 3 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose a 37°C).	76
Figura 4.10	Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 4 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG, 27°C).	79
Figura 4.11	Distribuição do comprimento celular no Cultivo 4 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 27°C).	81
Figura 4.12	Distribuição do volume celular no Cultivo 4 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 27°C).	82
Figura 4.13	Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 5 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose, 27°C).	85
Figura 4.14	Proteína solúvel presente no sobrenadante do caldo do Cultivo 5 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).	88
Figura 4.15	Distribuição do comprimento celular no Cultivo 5 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).	89
Figura 4.16	Distribuição do volume celular no Cultivo 5 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).	90
Figura 4.17	Relação entre DO e Cx para os 5 cultivos.	94
Figura 4.18	Relação entre Cx e k para os 4 cultivos.	97
Figura 4.11	Relação entre Cx e τ_0 para os 4 cultivos..	98
Figura 4.20	Relação entre a produção de proteína e os parâmetros k (A) e τ_0 (B) para os cultivos onde houve a expressão da proteína PspA.	100
Figura 4.21	Relação entre o Cx e a produção de proteína, e as células filamentosas para os cultivos.	102
Figura 4.22	Recuperação do carbono no Cultivo 1 (PspA4Pro, 37°C induzido por IPTG).	103
Figura 4.23	Recuperação do carbono n o Cultivo 2 (pspA4Pro, 37°C induzido por lactose).	104
Figura 4.24	Recuperação do carbono n o Cultivo 3 (Ø, 37°C induzido por lactose).	105
Figura 4.25	Recuperação do carbono n o Cultivo 4 (pspA4Pro, 27°C induzido por IPTG).	105
Figura 4.26	Recuperação do carbono n o Cultivo 5 (pspA4Pro, 27°C induzido por lactose).	106

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Comprimento médio da <i>E. coli</i> para diferentes fontes de carbono.	29
Tabela 3.1	Composição do meio complexo LB.	37
Tabela 3.2	Meio de cultura definido empregado em cultivos em batelada de <i>rE. coli</i> .	38
Tabela 4.1	Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 1 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).	58
Tabela 4.2	Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 2 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).	65
Tabela 4.3	Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 3 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose a 37°C).	73
Tabela 4.4	Produção de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, galactose, polissacarídeo e ácidos nucleicos no Cultivo 5 (<i>E. coli</i> BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1	Características dos cultivos realizados para obtenção das suspensões celulares utilizadas nas análises.	53
Quadro 4.1	Comparação do crescimento, da formação de biomassa e da produção de proteína nos diferentes cultivos realizados.	92

NOMENCLATURA

A_{pi}	Área da curva da proteína de interesse	unidade arbitrária
A_{pt}	Área da curva da proteína total	unidade arbitrária
C_{AN}	Concentração de ácidos nucleicos	µg/mL
C_i	Concentração da fonte de carbono, ácido orgânico ou composto solúvel de carbono	g/L
C_P	Concentração das proteínas totais solúveis	g/L
C_{PspA}	Concentração de PspA	g/L
C_S	Concentração total de substrato (glicerol)	g/L
C_t	Concentração total de carbono em um dado momento	mol de carbono
C_x	Concentração celular	gMS/L
C_{x0}	Concentração celular inicial	gMS/L
C₀	Concentração total de carbono presentes no reator no tempo de referência	mol de carbono
D	Diâmetro da célula	µm
H	Comprimento da célula	µm
K	Índice de consistência	Pa.s ⁿ
K	Viscosidade	Pa.s
MM_i	Massa molar da fórmula mínima	g/mol
MM_x	Massa molar da fórmula mínima da biomassa	g/mol
n	Índice de comportamento do escoamento	-
N_{CO2}	Número de mols de carbono no CO ₂	mol de carbono
\dot{n}_{CO2}^P	Vazão molar de CO ₂	mol de CO ₂ /h
N_{CX}	Número de mols de carbono nas células	mol de carbono
N_{FC}	Número de mols de carbono nas fontes de carbono ou ácidos orgânicos	mol de carbono
N_{PS}	Número de mols de carbono no polissacarídeo	mol de carbono
P_E	Pressão do gás de entrada do reator	atm
P_S	Pressão do gás de saída do reator	atm
Q_E	Fluxo do gás de entrada no reator	m ³ /h
Q_S	Fluxo do gás de saída do reator	m ³ /h
R	Constante universal dos gases	(atm.m ³)/(mol.K)
t	Tempo	s ou h
T	Temperatura	K ou °C
T_E	Temperatura do gás de entrada no reator	K

T_s	Temperatura do gás de saída no reator	K
u	Velocidade de escoamento de um fluido	m/s
v	Volume do reator	L
V	Volume da célula	μm^3
y	Distância entre placas	m
$y_{CO_2}^E$	Fração molar de CO_2 no gás de entrada do reator	-
$y_{CO_2}^S$	Fração molar de CO_2 no gás de saída do reator	-
$Y_{PspA/x}$	Produção específica de PspA	mgPspA/gMS
$Y_{x/glicerol}$	Coeficiente de rendimento em biomassa a partir do glicerol	gMS/g

Símbolos gregos

$\dot{\gamma}$	Taxa de cisalhamento	s^{-1}
η	Viscosidade aparente da suspensão	Pa.s
μ_{max}	Velocidade específica de crescimento celular	h^{-1}
τ	Tensão de cisalhamento	Pa
τ_0	Tensão de cisalhamento inicial	Pa

Abreviações

ATP	Adenosina trifosfato
CADC	Cultivos de alta densidade celular
COD	Concentração de oxigênio dissolvido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DO_{260nm}	Densidade ótica a 260nm
DO_{490nm}	Densidade ótica a 490nm
DO_{600nm}	Densidade ótica a 600nm
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
gMS	Gramas de massa (celular) seca
GTP	Guanosina trifosfato
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB	Lauria Bertani
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida

PPG	Polipropilenoglicol
PS	Polissacarídeo capsular.
PsaA	Antígeno A de superfície de <i>Pneumococo</i>
PspA	Proteína A de superfície de <i>Pneumococo</i>
PspA4Pro	Proteína A de superfície de <i>Pneumococo</i> do caldo 4
PspC	Proteína C de superfície de <i>Pneumococo</i>
RBS	Sítio de ligação ao ribossomo
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	16
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 - <i>Escherichia coli</i>.....	19
2.1.1 - Uso de <i>E. coli</i> recombinante para produção de proteínas heterólogas.....	19
2.1.2 - Cultivos de <i>rE. coli</i> para produção de vacina pneumocócica.....	20
2.2 - Reologia.....	22
2.2.1 - Comportamento reológico de cultivos de alta densidade celular.....	26
2.2.2 - Produtos extracelulares e sua influência no comportamento reológico.....	27
2.3 - Morfologia da <i>Escherichia coli</i>.....	28
2.3.1 - Mudanças morfológicas associadas a fatores ambientais e de crescimento.....	29
2.3.2 - Mudanças morfológicas associadas à produção de proteína recombinante.....	30
2.4 - Aspectos fisiológicos da <i>Escherichia coli</i>.....	32
2.4.1 - Respostas fisiológicas em cultivos de <i>Escherichia coli</i>	32
2.4.2 - Respostas fisiológicas durante a indução de <i>Escherichia coli</i> recombinante.....	33
2.4.3 - Células viáveis mas não cultiváveis (VBNC).....	34
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 - Materiais.....	37
3.1.1 - Microrganismos.....	37
3.1.2 - Meios de cultura.....	37
3.1.3 - Biorreator de bancada.....	39
3.2 - Métodos Analíticos.....	41
3.2.1 - Determinação da concentração celular.....	41
3.2.2 - Determinação das propriedades reológicas.....	41
3.2.3 - Determinação da concentração de proteína.....	44
3.2.4 - Acompanhamento da morfologia celular.....	46
3.2.5 - Concentração de açúcares e ácidos orgânicos.....	48
3.2.6 - Determinação da estabilidade do plasmídeo e contagem de UFC.....	48
3.2.7 - Balanço de carbono nos cultivos.....	49
3.2.8 - Estimativa da velocidade específica máxima de crescimento e do rendimento em biomassa.....	50
3.2.9 - Concentração de ácidos nucleicos.....	51
3.2.10 - Concentração de polissacarídeos.....	51
3.3 - Procedimento experimental.....	52
3.3.1 - Semeadura de <i>rE. coli</i> em meio semi-sólido.....	52
3.3.2 - Preparação das pré-culturas (pré-inóculo e inóculo).....	52
3.3.3 - Ensaios em Biorreator.....	52
4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	55
4.1 - Cultivos em batelada empregando biorreator de bancada.....	55
4.1.1 - Cultivo 1 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 37°C.....	55
4.1.2 - Cultivo 2 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 37°C.....	62
4.1.3 - Cultivo 3 – <i>rE. coli</i> sem inserto com pulso de lactose a 37°C.....	70
4.1.4 - Cultivo 4 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 27°C.....	77

4.1.5 - Cultivo 5 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 27°C.....	83
4.2 - Análise integrada dos resultados.....	92
4.2.1 - Relação entre C_x e DO.....	93
4.2.1 - Relação entre a reologia e a concentração celular e produção de proteína nos cultivos.....	95
4.3 - Balanços de carbono nos cultivos.....	103
5 - CONCLUSÃO E SUGESTÕES.....	108
5.1 - Conclusões finais.....	108
5.2 - Sugestões de trabalhos futuros.....	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
APÊNDICE A - Histogramas das medidas de comprimento célula.....	122
APÊNDICE B - Histogramas das medidas de volume celular.....	132

1. INTRODUÇÃO

Com os avanços e a popularização das técnicas de Biologia Molecular, células de microrganismos passaram a ser utilizadas para a produção de uma grande diversidade de proteínas recombinantes, abrangendo desde enzimas como lipases, penicilina G acilase e celulases (VÉLEZ *et al.*, 2011; VÉLEZ, 2009; DEMAIN e VAISHNAV, 2009) até fragmentos de proteínas antigênicas (SARGO, 2011; SILVA, 2011) e outras proteínas de uso farmacológico como interferon humano, fatores de crescimento humanos e estimuladores de linfócitos (KHALILZADEH *et al.*, 2004; SEEGER *et al.*, 1995, LI *et al.*, 2006). Dentre os organismos mais empregados como hospedeiros dos genes codificando a síntese de diferentes proteínas, destaca-se a bactéria *Escherichia coli*. Vetores (plasmídeos) de expressão muito difundidos para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* são baseados no operon *lac*, onde lactose e/ou seu análogo, o isopropil β -D1-tio-galactopiranosídeo (IPTG), são utilizados para a indução da produção da proteína de interesse (SORENSEN e MORTENSEN, 2005).

A síntese de proteína recombinante por sistemas de expressão baseados no operon *lac* é um fenômeno intracelular complexo, influenciado por diversos fatores, que incluem desde a estabilidade da construção realizada por meio de técnicas de Biologia Molecular, o número de cópias do plasmídeo e a força do promotor e se estendem pela trajetória do cultivo, incluindo as condições de cultivo presentes durante a fase de indução e a estratégia de indução. As velocidades das reações envolvidas na síntese de proteína heteróloga são características de cada construção, mas são fortemente influenciadas pela temperatura. Assim, a escolha da temperatura de indução modula a intensidade do processo, desde que a quantidade de indutor não seja o fator limitante.

A síntese da proteína recombinante de interesse é um fenômeno estranho às células do hospedeiro. Intermediários e energia são drenados do metabolismo e direcionados para a produção de uma proteína sem função para a célula, causando mais ou menos estresse, dependendo da estratégia de indução empregada e da natureza da proteína (KILIKIAN *et al.*, 2000). Durante a realização de um cultivo, não é possível quantificar rapidamente a produção de uma proteína terapêutica sem atividade biológica. A quantificação da produção da proteína normalmente é realizada por densitometria de banda, exigindo o rompimento das células e aplicação do conteúdo intracelular em géis de eletroforese (SANTOS *et al.*, 2012). Geralmente, as informações sobre a produção de proteína ao longo do cultivo só se tornam

disponíveis depois que o cultivo foi concluído e nada mais pode ser feito para alterar sua trajetória. Por outro lado, o esforço metabólico de síntese da proteína e o estresse gerado afetam a fisiologia e a morfologia das células (KOOALEE et al., 2006), manifestando-se macroscopicamente com alterações na reologia do caldo, na produção de CO₂, na velocidade de crescimento e nas velocidades de consumo de fontes de carbono e do indutor.

A possibilidade de integração dos diversos fenômenos observados durante um cultivo de *E. coli* recombinante esquematizados na Figura 1.1 constitui a principal motivação para o desenvolvimento do presente trabalho. Dentre os diferentes clones de *E. coli* sendo atualmente estudados no Laboratório de Estratégias Avançadas de Cultivo do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, escolheu-se como objeto de estudo o organismo geneticamente modificado *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+/PspA4Pro, que expressa fragmento da proteína imunogênica PspA presente na parede celular do procarionto *Streptococcus pneumoniae*. Devido às suas características imunogênicas, as PspAs foram escolhidas para o desenvolvimento de uma nova vacina antipneumocócica conjugada no Projeto Temático FAPESP “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína de superfície de pneumococo A” (Processo n° 08/05207-4), coordenado pela pesquisadora Dr^a. Martha Massako Tanizaki do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan. Mais especificamente, o presente trabalho de Mestrado se insere no subprojeto “Automação e Otimização de Bioprocessos em Cultivos de r*E. coli* para produção de PspA”, que integra o referido projeto temático.

Figura 1.1. - Representação esquemática do projeto global de mapeamento dos aspectos fisiológicos, morfológicos e reológicos em cultivos de r*E. coli*.



Fonte: Acervo pessoal

Desta forma, o presente trabalho teve como principais objetivos contribuir para o entendimento das principais respostas celulares à síntese de proteína recombinante e para a identificação de condições de cultivo que favoreçam a intensificação da produção da mesma.

De forma a cumprir os objetivos propostos, foram realizadas as seguintes etapas:

- Caracterizar as mudanças observadas nas diferentes variáveis do cultivo assim como na reologia do caldo e na morfologia celular durante a fase de indução;
- Verificar o efeito de diferentes níveis de indução (temperatura e tipo de indutor) sobre as respostas celulares;
- Mapear o estresse gerado pela produção de proteína sobre as células;
- Avaliar e sistematizar as informações coletadas visando propor uma estratégia de cultivo que favoreça a intensificação da produção de proteína.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este trabalho aborda tópicos relacionados com a Engenharia Bioquímica, a Biotecnologia, a reologia, a morfologia e a fisiologia celular. Assim, esta seção apresenta uma revisão sintética dos assuntos mais relevantes associados aos referidos tópicos.

2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa sobre a qual foi acumulada uma grande quantidade de informação. Ela não foi apenas o primeiro microrganismo a ser submetido à análise genética e estudos de biologia molecular detalhados, mas também o foi primeiro a ser empregado na engenharia genética e na produção de proteína recombinante. Nosso conhecimento sobre sua estrutura genética, seu crescimento, evolução e genoma é muito vasto (NELSON e COX, 2006).

Muitos dos processos bioquímicos que ocorrem na *E. coli* são bem compreendidos e suas vias metabólicas já foram amplamente estudadas, técnicas para transferência rápida de DNA entre células e vetores de clonagem, como bacteriófagos e plasmídeos são bem caracterizadas, estando disponíveis diferentes métodos para modificação do seu genoma (NELSON e COX, 2006; DEMAINE e VAISHNAV, 2009).

2.1.1. Uso de *E. coli* recombinante para produção de proteínas heterólogas

De um organismo modelo para pesquisa básica em laboratório, a *E. coli* evoluiu para um microrganismo de uso industrial, e agora se tornou o sistema de expressão procariótica mais frequentemente utilizado. A *E. coli* se tornou o organismo padrão para a produção de enzimas para uso em diagnósticos e para fins analíticos, e ainda é utilizada para a síntese de proteínas de interesse farmacêutico, desde que o produto desejado não consista de subunidades múltiplas diferentes ou requeira substancial modificação pós-traducional (GELLISSEN, 2005).

A *E. coli* é um microrganismo simples, que contém os aparatos básicos para a expressão de proteínas. Apesar de não conseguir sintetizar proteínas complexas (ALTENBUCHNER e MATTES, 2005), seu uso atualmente é muito amplo e diversificado

devido ao grande conhecimento de suas características fisiológicas, morfológicas e de crescimento.

O emprego de *E. coli* em cultivos celulares é fácil, e seu crescimento é rápido, o que permite que sejam alcançadas altas concentrações celulares em pouco tempo e, além disso, esse microrganismo proporciona uma alta produtividade de proteína recombinante (DEMAIN e VAISHNAV, 2009; HORTA et al., 2011). Desta forma, o uso de cultivos de *E. coli* para produção dessas proteínas recombinantes têm se mostrado uma aplicação bem sucedida da biotecnologia aliada à área de saúde.

2.1.2. Cultivos de r*E. coli* para produção de vacina pneumocócica

Streptococcus pneumoniae é um dos principais causadores de várias doenças, incluindo pneumonia, otite, meningite e bacteremia. Cerca de 1 milhão de crianças morrem a cada ano devido a doenças pneumocócicas, principalmente nos países em desenvolvimento e a população idosa mundial também se enquadra nesse grupo de risco (MIYAJI et al., 2002).

Atualmente estão disponíveis vacinas conjugadas contra *S. pneumoniae* baseadas na proteção dada por polissacarídeos capsulares (PS), utilizados isoladamente (vacina 23-valente) ou conjugados a uma proteína carregadora (vacinas 10 e 13-valente) (SARGO, 2011). No entanto, as vacinas conjugadas disponíveis comercialmente são produzidas com proteínas não relacionadas à doença pneumocócica, como o toxóide diftérico mutado CRM₁₉₇.

Uma alternativa para ampliar a cobertura das vacinas conjugadas é a utilização de uma proteína carregadora do próprio *S. pneumoniae* (BRILES et al., 2000; CSORDAS et al., 2008). Muitas proteínas pneumocócicas, como pneumolisina, PsaA, PspC e PspA apresentam propriedades antigênicas e são candidatas potenciais para a produção de uma nova vacina. A proteína A de superfície de pneumococo (PspA) é uma candidata potencial para a produção de uma nova vacina, pois é um importante fator de virulência que inibe a deposição de complemento na superfície do microrganismo e está presente em todos os pneumococos isolados de material clínico (HOLLINGSHEAD et al. 2006; ROLO et al., 2009). Além disso, PspA é uma proteína exposta externamente à cápsula polissacarídica e estudos mostram a sua capacidade protetora em vários modelos de animais (JEDRZEJAS, 2001). Neste contexto, a escolha de um processo de alta produtividade para obtenção da PspA é crucial para diminuir os custos, produzindo-se uma vacina acessível e de alta eficiência contra *S. pneumoniae* e possibilitando seu uso em campanhas nacionais de vacinação. O emprego da *Escherichia coli*

como hospedeiro para a produção da PspA oferece uma estratégia muito adequada para atingir esse objetivo, utilizando o sistema de expressão baseado no forte promotor *lac/T7* de *E. coli*, mediante indução por lactose ou IPTG (SARGO, 2011).

Cultivos em média e alta densidade celular vêm sendo empregados com a finalidade de aumentar a produtividade em biomassa, diminuindo a geração de efluentes e os custos de produção (RIESENBERG e GUTHKE, 1999). Durante a produção da vacina pneumocócica, os processos de purificação da PspA e sua conjugação com o polissacarídeo (PS) ocasionam uma perda de quase 70% da proteína recombinante, fazendo com que seja imprescindível atingir altas concentrações intracelulares de produto em cultivos de *E. coli* recombinante caracterizados também por grande acúmulo de biomassa, denominados cultivos de alta densidade celular – CADC (CSORDAS et al., 2008; SILVA et al., 2007). Entretanto, segundo Lee (1996), esta mesma técnica de cultivo pode ocasionar dificuldade de transferência de oxigênio, além de inibição por substrato e formação de ácidos orgânicos inibitórios.

Durante os cultivos de alta densidade, a concentração celular atinge valores superiores a 100 g/L (HORTA, 2011) e conjuntamente ou não com a expressão da proteína de interesse, o aumento da concentração celular pode desencadear respostas fisiológicas, metabólicas e morfológicas das células às condições de estresse presentes. Essas mudanças podem refletir na reologia do caldo de cultivo e, portanto, estudos de comportamento reológico são interessantes do ponto de vista de acompanhamento do processo e de caracterização da suspensão celular nas diferentes fases dos cultivos.

Embora a escolha das condições de aeração e agitação seja normalmente feita visando garantir a transferência de oxigênio necessária para atender a demanda celular, a agitação e aeração também podem afetar a produção de proteína de interesse. Ao contrário do esperado, alguns trabalhos relatam a diminuição do rendimento específico em proteína heteróloga sob condições mais intensas de agitação e aeração em reatores convencionais (TOMAZETTO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2011; VOULGARIS et al., 2011; CASTRO-MARTÍNEZ et al., 2012; WAEGEMAN et al., 2013). Alguns trabalhos atribuem a menor produção de proteína ao estresse oxidativo, outros apresentam como justificativa as mudanças nos fluxos metabólicos em condições de limitação por oxigênio, enquanto que alguns pesquisadores consideram o cisalhamento como o principal responsável pelo menor rendimento.

2.2. Reologia

A reologia é o estudo da deformação e escoamento da matéria (BENNETT e MYERS, 1978), ou seja, é uma ciência que tem como objetivo analisar a continuidade da deformação de fluidos enquanto esses sofrem a aplicação de uma tensão, permitindo compreender e prever o seu comportamento durante processos de escoamento. Os diversos comportamentos reológicos possíveis para esses fluidos derivam de suas características químicas e estruturais, e também dessas características associadas às propriedades de outras substâncias que nele podem estar solubilizadas ou suspensas.

O estudo reológico permite a classificação dos fluidos de acordo com o comportamento da tensão de cisalhamento (τ) e sua dependência com relação à taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). A taxa de cisalhamento representa a deformação que é sofrida por um fluido e é função da velocidade linear com que o fluido escoar. A tensão de cisalhamento é a força ou tensão aplicada sobre esse fluido para que o mesmo passe a sofrer o escoamento.

Um dos modelos matemáticos mais gerais que descreve o comportamento dos fluidos submetidos a uma força cisalhante foi proposto por Winslow H. Herschel e Ronald Bulkley e está apresentado na Equação 2.1 mostrada a seguir (BENNETT e MYERS, 1978).

$$\tau = \tau_0 + K * \left(\frac{du}{dy} \right)^n \quad (2.1)$$

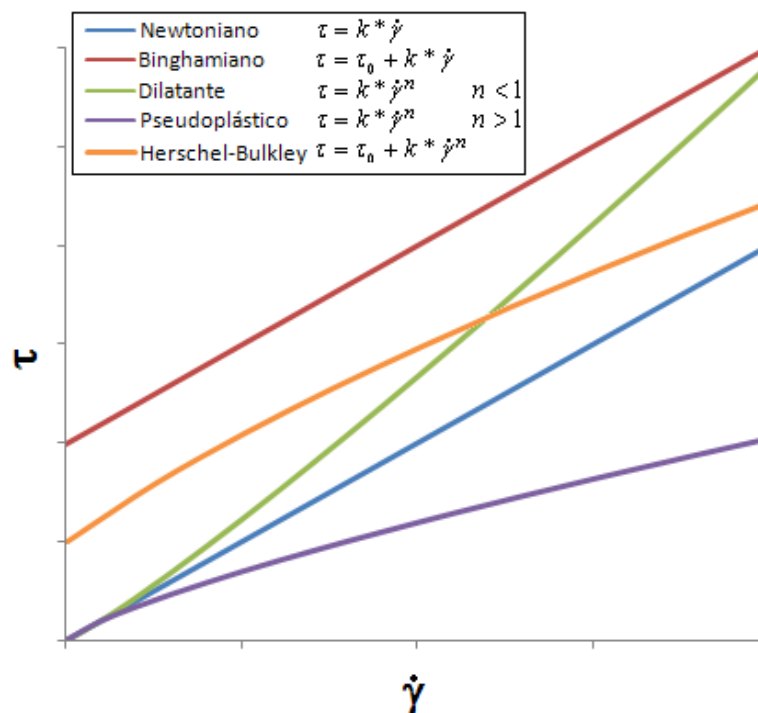
onde, τ é a tensão de cisalhamento (Pa); τ_0 , a tensão de cisalhamento inicial (Pa); K, o índice de consistência (Pa.sⁿ); n, o índice de comportamento do escoamento (-) e $\left(\frac{du}{dy} \right)$, o gradiente de velocidade, que pode ser simplificado a uma taxa na qual a deformação ocorre, ou seja, uma taxa de cisalhamento $\dot{\gamma}$ (s⁻¹).

Os fluidos submetidos a uma força cisalhante são divididos em dois grandes grupos: os fluidos independentes do tempo e os fluidos dependentes do tempo. Os fluidos independentes do tempo são classificados de acordo com a função que descreve a tensão de cisalhamento e são separados em newtonianos e em um grupo que engloba os fluidos não newtonianos.

Os fluidos newtonianos são aqueles que exibem uma proporcionalidade direta entre τ e $\dot{\gamma}$ numa região de escoamento laminar, onde a viscosidade do fluido é considerada o fator de proporcionalidade (METZNER, 1956), enquanto os fluidos não newtonianos, que compreendem todos os materiais que não obedecem à proporcionalidade direta entre τ e $\dot{\gamma}$ (LOZANO, 1982), podem ser convenientemente subdivididos em três tipos distintos classificados como fluidos: binghamiano-plástico, pseudoplástico e dilatante, dependendo da natureza da função que os descreve e dos parâmetros reológicos que compõem essa função (TANNER, 2000). Para fluidos não newtonianos, a razão entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento é conhecida como viscosidade aparente (η).

Todos os fluidos independentes do tempo são descritos por simplificações da equação geral de Herschel-Bulkley para casos onde um ou mais parâmetros podem ter valor nulo ou unitário. Os fluidos newtonianos apresentam $\tau_0 = 0$, $n = 1$ enquanto o parâmetro K é não nulo e maior que 0; os fluidos binghamianos apresentam $n = 1$, τ_0 e K não nulos e maiores que 0, fluidos dilatantes possuem $\tau_0 = 0$; $n > 1$ e K não nulo e maior que 0; enquanto fluidos pseudoplásticos possuem $\tau_0 = 0$, $n < 1$ e K não nulo e maior que 0. Assim, é possível criar curvas genéricas de escoamento de fluidos independentes do tempo, como as que são mostradas na Figura 2.1.

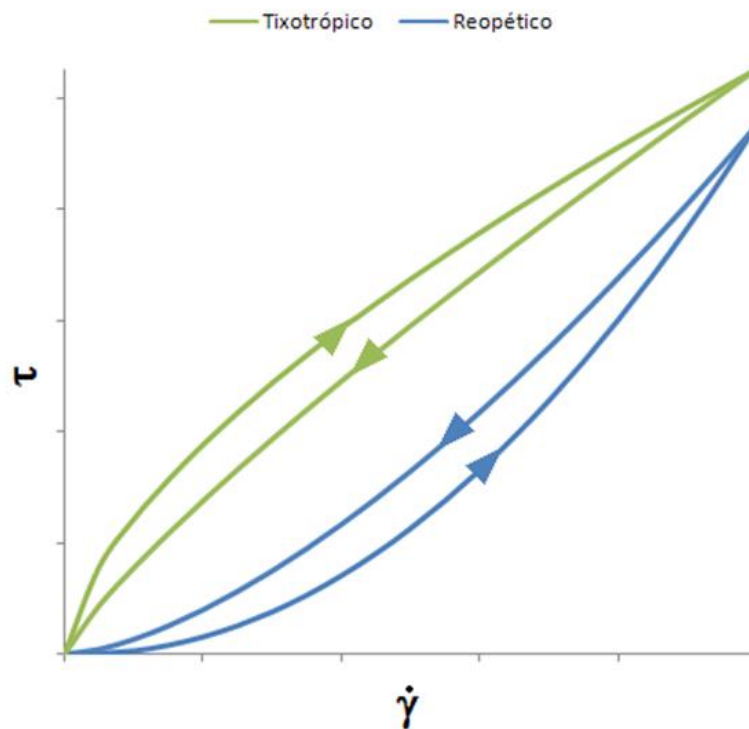
Figura 2.1. - Curvas genéricas de escoamento de fluidos independentes do tempo.



Fonte: Acervo pessoal.

Para os fluidos chamados dependentes do tempo, a tensão de cisalhamento é uma função do tempo para taxas de cisalhamento constantes (BENNETT e MYERS, 1978), sendo divididos em fluidos reopéticos, em que a viscosidade aparente aumenta com a passagem do tempo, e tixotrópicos, em que a viscosidade aparente diminui com a passagem do tempo. As curvas genéricas de escoamento de fluidos dependentes do tempo são mostradas na Figura 2.2.

Figura 2.2. - Curvas genéricas de escoamento de fluidos dependentes do tempo.

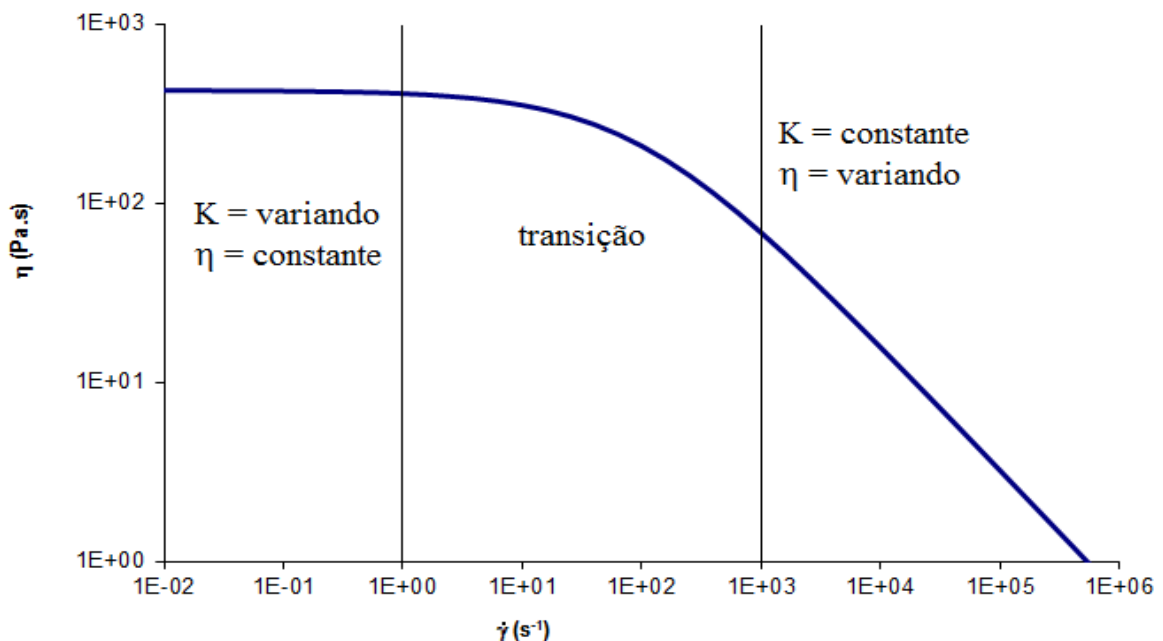


Fonte: Acervo pessoal.

Existem também diversos outros modelos que descrevem fluidos com comportamentos reológicos complexos que misturam características dos modelos mais simplificados descritos anteriormente. Entre esses modelos, um modelo aplicado a polímeros com algumas particularidades foi proposto por Malcolm M. Cross (CROSS, 1965). O modelo de Cross descreve um fluido cujo reograma apresenta três regiões distintas: para altas taxas de cisalhamento o fluido se ajusta ao modelo pseudoplástico, apresentando os parâmetros índice de consistência (K) e índice de comportamento do escoamento constantes (n) enquanto η cai exponencialmente; a baixas taxas de cisalhamento, K deixa de ser constante e passa diminuir com a diminuição de $\dot{\gamma}$ enquanto a η passa a se aproximar de uma constante; e a região

intermediária de transição entre os dois comportamentos anteriores, onde K e η variam. Análises reológicas de fluidos de Cross cobrindo pequenas faixas de variação da taxa de cisalhamento podem ser interpretadas de diferentes formas: na região onde $\dot{\gamma}$ é baixo, η é constante e os pontos nos reogramas de τ por $\dot{\gamma}$ irão se apresentar dispostos em uma reta, assemelhando-se a um fluido newtoniano; no começo da região de transição, quando η começa a cair lentamente, a curvatura nos pontos do reograma ainda é de difícil percepção, podendo facilmente ser tomada como uma reta, porém, um ajuste de uma reta já não mais passará pela origem, o que pode ser interpretado com a presença de τ_0 (sendo ele muito menor que os valores de τ do reograma), assemelhando-se assim a um fluido binghamiano; na parte final da região de transição, a curvatura dos pontos no reograma já é evidente quando a variação de K passa a ser pequena. Ainda assim, sendo K menor no começo do pontos que na parte final, o ajuste do modelo pseudoplástico aos pontos ainda não é satisfatória, sendo que o modelo de Herschel-Bulkley (semelhante ao modelo pseudoplástico, mas que considera a existência de um τ_0) tem um melhor ajuste; e, por fim, na região de altos valores de $\dot{\gamma}$, K torna-se constante e os pontos do reograma finalmente passam a demonstrar o comportamento pseudoplástico do fluido. A figura 2.3 apresenta um exemplo de fluido de Cross.

Figura 2.3. - Curvas para fluidos descritos pelo modelo de Cross.



Fonte: Acervo pessoal.

2.2.1. Comportamento reológico de cultivos de alta densidade celular

Em processos bioquímicos, o crescimento dos organismos em cultivos em biorreatores é muito dependente da transferência de massa dos nutrientes para as células. Além disso, o adequado suprimento de oxigênio para organismos cultivados em aerobiose, como é o caso da bactéria *Escherichia coli*, é fundamental para manter os níveis desejados de crescimento e evitar a formação de ácidos orgânicos por ativação das vias fermentativas. A quantidade de oxigênio requerida pelo microrganismo é alta devido ao seu rápido metabolismo, o que torna a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido um ponto crítico, já que a quantidade máxima de oxigênio que pode ser dissolvido no meio é baixa. Desta forma, a agitação e o fornecimento de ar devem ser controlados para suprir as necessidades de cada bioprocessos.

A utilização da agitação em níveis relativamente altos pode afetar a integridade celular, podendo levar à morte do organismo. Além disso, a velocidade de dissolução de oxigênio é controlada pela transferência de massa do gás das bolhas para o líquido. A forma mais eficaz de aumentar a velocidade de passagem do oxigênio para o meio é ampliar a área de contato entre as interfaces dos fluidos, aumentando o número de bolhas e reduzindo assim, o volume individual das mesmas. Porém, para que isso ocorra, é preciso recorrer ao aumento na agitação, o que nem sempre é possível.

Vários estudos já demonstraram que fermentações que utilizam fungos e bactérias filamentosas encontram dificuldades devido a problemas de transferência de oxigênio ligados a formação de aglomerados que acabam apresentando um comportamento não newtoniano (KAROW et al., 1953; LEDUY et al., 1974; RICHARDS, 1976; entre outros). Esses aglomerados celulares do tipo miceliar acarretam altas viscosidades aparentes do caldo de fermentação principalmente devido a sua concentração, morfologia e interação com o caldo de cultivo (BOWERS, 1955; OLSVIK e KRISTIANSEN, 1994). Por outro lado, culturas usando bactérias não filamentosas unicelulares, como o caso da *E. coli*, não devem apresentar grandes variações no comportamento reológico devido a não formação de aglomerados celulares (LOZANO, 1982).

Manon et al. (2009) realizaram experimentos de monitoramento *on-line* e *off-line* da reologia de um cultivo de *E. coli* em batelada alimentada sem a expressão de proteínas recombinantes, em biorreator entre as concentrações de 40 gMS/L (concentração de inoculação) até atingir 110 gMS/L. Neste experimento verificaram que o comportamento reológico da suspensão celular permaneceu newtoniano e as medidas *off-line* da reologia

(tomadas a 20°C) mostraram a passagem da viscosidade de $2,2 \times 10^{-3}$ Pa.s, na concentração inicial, para $3,8 \times 10^{-3}$ Pa.s na concentração final.

2.2.2. Produtos extracelulares e sua influência no comportamento reológico

Apesar de parte das mudanças reológicas de caldos de cultivo estar ligada às características morfológicas e à concentração do microrganismo no caldo de cultivo, outro fator importante é a presença de produtos extracelulares que alteram o comportamento reológico da fase líquida da suspensão celular. Situações em que a morfologia do organismo e a liberação de produtos extracelulares interagem para contribuir para a reologia do caldo podem tornar seu comportamento muito complexo, mesmo em casos de cultivos de microrganismos unicelulares (McNEIL e HARVEY, 1993).

Vários tipos de compostos que podem estar presentes em algum momento no caldo de cultivo podem influenciar de formas diferentes a reologia do caldo. A presença de material genético ou proteínas suspensas em um meio afetam a reologia do mesmo, aumentando o seu índice de consistência (KONG et al., 2009).

Outra classe de substâncias que podem causar grande alteração no caldo de cultivo são os polissacarídeos. Alguns polissacarídeos extracelulares produzidos por microrganismos podem ser usados como agentes modificadores de viscosidade, como o caso da goma diutana e da goma welana, produzidas por diferentes cepas de *Sphingomonas sp.* Sonebi (2006) estudou a viscosidade de soluções dessas gomas em diferentes concentrações, mostrando que o comportamento reológico dessas soluções é pseudoplástico e sua descrição é compatível com o modelo geral de Herschel- Bulkley. O mesmo vale para a goma xantana, polissacarídeo produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* (REUSS et al., 1982).

Ren et al. (2003) estudaram a reologia de soluções diluídas de ácido colônico, nome dado ao exopolissacarídeo sintetizado por uma cepa de *E. coli* mucóide responsável pela formação de biofilmes, e mostraram que o mesmo possui um comportamento descrito pelo modelo de Cross. De acordo com os estudos conduzidos sobre a influência do ácido colônico, quanto maior a concentração dele na solução, menor a taxa de cisalhamento necessária para que K se torne constante e a região intermediária de transição comece.

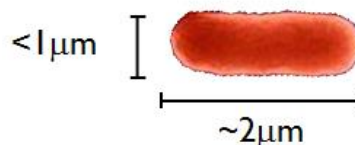
Assim, a presença de substâncias de diferentes classes e propriedades reológicas no caldo de cultivo de *E. coli* podem causar mudanças no comportamento reológico da fase líquida da suspensão. Essas mudanças afetam a reologia da suspensão como um todo e podem se somar àquelas causadas pelas mudanças na geometria do material

particulado (fase sólida da suspensão), tornando o comportamento reológico do caldo de cultivo ainda mais complexo. O efeito sinérgico das influências da reologia das fases sólidas e líquidas pode ser visto na comparação entre a análise reológica do caldo de cultivo e do sobrenadante de cultivos de *Aureobasidium pullulans* para produção de goma pululana. Foram observadas variações do perfil do índice de consistência e do índice de comportamento do escoamento para a análise feita usando o modelo reológico da Lei das Potências (REUSS et al., 1982), mostrando a ausência de tendências observáveis na variação dos parâmetros.

2.3. Morfologia da *Escherichia coli*

A célula da *Escherichia coli* em condições normais possui um formato cilíndrico muitas vezes denominado como bastonete. Diferentes cepas expostas a diferentes condições podem apresentar comprimentos, diâmetro e, conseqüentemente, volumes celulares diferentes. Ainda assim, de forma geral, para células de *E. coli* em estado natural, sem possuir genes para expressão de proteínas recombinantes e que não estejam passando por processos de divisão celular são adotados como referência valores de comprimento médio em torno de 2 μm e um diâmetro médio de um pouco menos de 1 μm (NELSON e COX, 2006), como pode ser visto na Figura 2.4. Células em fase final de divisão apresentam um comprimento máximo igual ao dobro do esperado para o comprimento de uma célula que não esteja em processo de divisão. Para os valores normais de tamanho, o valor calculado do volume é estimado como pouco superior a 1 μm^3 .

Figura 2.4. - Formato, comprimento e diâmetro médio de uma célula de *E. coli* em condições normais, não estando em processo de divisão.



Fonte: (acesso 18/06/2014) Modificado de

http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#mediaviewer/File:EscherichiaColi_NIAID.jpg

A morfologia celular da *E. coli* pode ser afetada por diferentes fatores incluindo as condições ambientais às quais a célula é exposta durante seu crescimento, como

por exemplo a exposição a diferentes fontes de carbono e demais nutrientes disponíveis no meio de cultura (PIERUCCI, 1978), ao aumento da concentração celular (MANON et al., 2009) ou à elevação da temperatura (DONACHIE e BEGG, 1989). As próprias características genéticas da cepa e mudanças associadas à expressão de proteínas recombinantes em organismos geneticamente modificados também influenciaram a morfologia das células (KYLE et al., 2012; JEONG e LEE, 2003; LEE et al. 1994).

2.3.1. Mudanças morfológicas associadas a fatores ambientais e de crescimento

Pierucci (1978) avaliou diferentes comprimentos celulares em duas cepas diferentes de *E. coli* em condições normais e logo após a divisão celular, crescendo em diferentes velocidades em diferentes meios de cultura. Ele observou que células recém-nascidas em condições de crescimento exponencial passam por mudanças em seu comprimento médio quando transferidas para meios de composição diferente. Quanto maiores as velocidades de crescimento proporcionadas pelos meios de cultura para os quais foram transferidas, mais compridas as células passam a ficar. Foram testadas oito condições nutricionais diferentes, havendo mudança da fonte de carbono e diferentes suplementações de aminoácidos. Os resultados mais importantes são resumidos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. - Comprimento médio da *E. coli* para diferentes fontes de carbono.

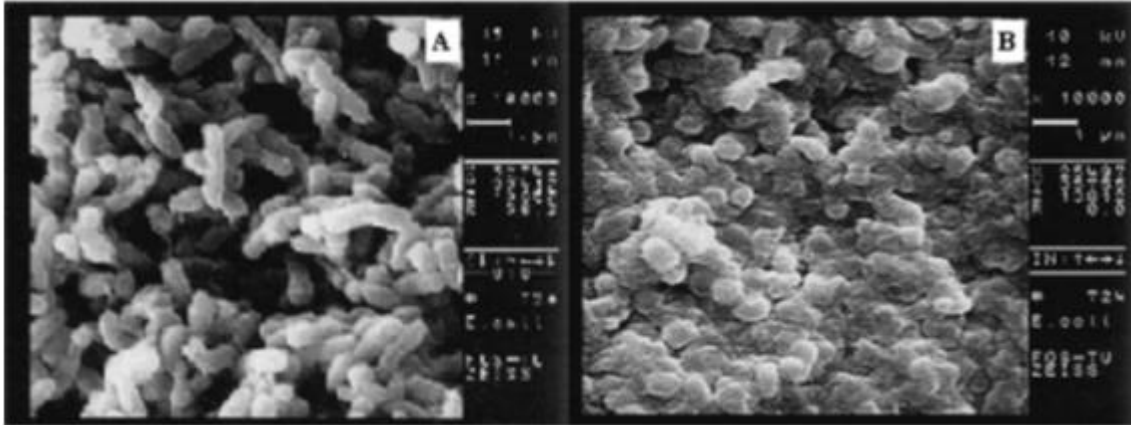
Fonte de carbono	Comprimento médio (μm)	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
Acetato	1,67 \pm 0,19	0,58
Glicerol	1,94 \pm 0,20	1,01
Glicose	2,27 \pm 0,23	1,28

Fonte: Adaptado de PIERUCCI, 1978.

Ligeiras modificações na morfologia da *E. coli* também foram observadas quando as células foram expostas densidades celulares mais altas. Essas mudanças observadas no formato das células ocorreram em condições não associadas à expressão de proteínas, sendo que elas deixaram de apresentar o formato de bastonete para exibir um formato esférico ou cocóide. Koolae et al. (2006) observaram a mudança na morfologia da célula ao final de um cultivo em batelada alimentada que alcançou 127 gMS/L e Manon et al. (2009) verificaram que, ao final do cultivo que alcançou 110gMS/L, a bactéria apresentava um

formato esférico, porém com um diâmetro médio de $1,05\mu\text{m}$, bem inferior ao comprimento médio da célula quando em formato de bastonete. Uma imagem obtida da mudança morfológica da *E. coli* em cultivos de alta densidade (127 g/L) é mostrada na Figura 2.5.

Figura 2.5. - Microscopia eletrônica de varredura mostrando a morfologia da célula de *E. coli* em: A - cultivo em batelada com $6,5\text{g/L}$; B - cultivo em batelada alimentada com 127g/L .



Fonte: MANON et al., 2009.

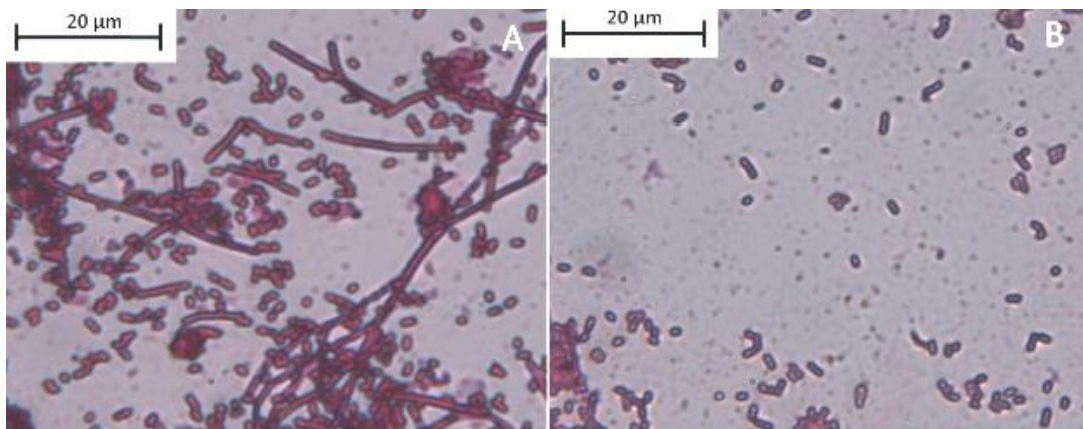
Donachie e Begg (1989) estudaram mutações de cepas de *E. coli* sensíveis a temperatura, sendo que ao atingir 42°C apresentavam morfologia esférica, enquanto que, em temperaturas mais amenas ainda apresentavam o formato de bastonete. Eles também trabalharam com mutantes intermediários que a alta temperatura apresentavam formato elipsoidal. Apesar desses mutantes apresentarem um formato esférico (mesmo em baixas concentrações), o diâmetro médio das células era igual ao comprimento médio dos bastonetes. Entre os diferentes mutantes em diferentes temperaturas o comprimento celular médio variou entre cerca de $3\mu\text{m}$ e $3,5\mu\text{m}$, porém o volume (medido eletronicamente em unidades arbitrárias) foi 4,5 vezes maior nas células mutantes de formato esférico.

2.3.2. Mudanças morfológicas associadas à produção de proteína recombinante

Além das mudanças morfológicas em células de *E. coli* causadas por fatores ambientais, como em suspensões de alta densidade celular, ainda há o efeito da produção de proteínas recombinantes, que pode também acarretar alterações morfológicas. Caldos de cultivo contendo bactérias usadas para expressão de proteínas recombinantes passaram a

apresentar células alongadas com o avanço do tempo de indução da expressão da proteína. Kyle et al. (2012) observaram que a divisão celular parece ter sido inibida em uma porção das células, resultando em células alongadas, não septadas, com comprimentos de até 100 μm , sem revelar, contudo, a concentração celular em que foram feitas as medições. Uma imagem obtida da mudança morfológica da *E. coli* durante a expressão de proteínas recombinantes é mostrada na Figura 2.6.

Figura 2.6. - Microscopia ótica mostrando a morfologia da *E. coli*: A - durante expressão de proteína CBD fusionada à lunasina; B - durante expressão de proteína CBD sozinha.



Fonte: KYLE et al., 2012.

Lee e colaboradores (1994) observaram várias cepas de *E. coli* modificadas geneticamente para a produção de ácido poli-(3-hidroxi-butírico) e, pela medição de aproximadamente 300 indivíduos de cada cepa, puderam avaliar que, apesar da observação de organismos morfolologicamente modificados apresentando comprimentos de até 150 μm , nem todas as cepas apresentaram mesmo grau de modificação. Enquanto a cepa XL1-Blue apresentou 22% do total de indivíduos com comprimento celular superior a 8 μm , a cepa K12 obteve apenas 1% do total dos indivíduos apresentando comprimento celular variando entre 2,8 μm e 7 μm .

Jeong e Lee (2003) observaram a filamentação de células de *E. coli* recombinante em cultivos de alta densidade celular como uma resposta de estresse à produção da proteína de interesse. A filamentação foi justificada como sendo decorrente de problemas na fase final da divisão celular, assim propuseram a coexpressão na bactéria dos genes *ftsA* e *ftsZ*, que codificavam proteínas envolvidas nesse processo de divisão, de forma a eliminar o aparecimento das células morfolologicamente alteradas. Fujiwara e Taguchi (2007) realizaram estudos com uma cepa de *E. coli* mutante incapaz de sintetizar a proteína GroE, sendo esta

uma chaperona que auxilia no enovelamento de outras proteínas, entre elas, proteínas relacionadas à formação da parede celular durante a divisão. Nos cultivos da mutante, foi observado o aparecimento de bactérias filamentosas, corroborando com a hipótese de que falhas na divisão celular podem causar alterações morfológicas.

Assim, as mudanças morfológicas em *E. coli* causadas pela síntese de uma proteína recombinante aliadas a mudanças causadas por modificações na composição do meio de cultivo e pelo aumento da concentração celular podem provocar mudanças na reologia dos caldos de cultivo. A interação das características reológicas da suspensão relacionadas com a concentração e o formato das partículas suspensas com aquelas derivadas da presença de substâncias que conferem à fase líquida da suspensão características não newtonianas podem fazer com que o caldo de cultivo passe por diferentes fases de comportamento reológico distinto. No caso de cultivos de microrganismos unicelulares em que possa haver produção e o acúmulo de substâncias extracelulares, os valores dos parâmetros reológicos do modelo adotado para descrever o caldo de cultivo se alteram gradativamente, como foi observado por Silva et al. (2013) em cultivos de alta concentração celular de *E. coli*.

2.4. Aspectos fisiológicos da *Escherichia coli*

Os mecanismos de ação presentes na *E. coli* permitem que a mesma possa reagir a diversos estímulos químicos ou físicos, apresentando assim respostas fisiológicas que podem ou não ser de interesse durante os cultivos. Há um grande número de cepas com diferentes características genéticas que podem apresentar diferentes respostas a esses estímulos. Além disso, a criação de organismos geneticamente modificados aumenta as possibilidades de reação do microrganismo. Algumas das respostas a estímulos são naturais à bactéria, enquanto outras acabam sendo consequências diretas ou indiretas da própria produção da proteína recombinante.

2.4.1. Respostas fisiológicas em cultivos de *Escherichia coli*

Um efeito fisiológico observado em células de *E. coli* é a produção de polissacarídeo como resposta a presença de antibiótico. A produção de polissacarídeos por células de *E. coli* é uma forma importante de intermediar as interações entre as bactérias e o meio que as cerca, sendo que esse polissacarídeo pode ficar preso à superfície da célula ou ser

liberado na forma de muco (WHITFIELD e ROBERTS, 1999). O principal componente desse polissacarídeo extracelular é o chamado ácido colânico (GOTTESMAN e STOUT, 1991). Ganal et al (2007) mostraram que a produção do polissacarídeo é estimulada pela presença de doses não letais de antibióticos, como a canamicina. A produção de polissacarídeo é uma forma de a célula aumentar sua espessura e diminuir a difusão do antibiótico para seu interior, sendo que, após a retirada do antibiótico, essa produção é cessada (LU et al., 2008).

Outro efeito fisiológico observado em algumas cepas de *E. coli* é o acúmulo de galactose no interior das células. Há ocorrência da retenção de galactose no interior das células de *E. coli* que não apresentam a galactosequinase, ou seja, que não são capazes de metabolizar a galactose (WU et al., 1969), sendo a BL21(DE3) é uma delas (STUDIER et al., 2009). A lactose é uma substância que pode ser usada como indutora e fonte de carbono pela célula. Ao ser assimilada sob a ação da β -galactosidase ocorre a clivagem da molécula em glicose (consumida pela célula) e em galactose. Apesar de existirem mecanismos capazes de promover a secreção da galactose pela célula, há a possibilidade de que concentração de galactose intracelular atinja níveis elevados (STUDIER, 2014).

2.4.2. Respostas fisiológicas durante a indução de *Escherichia coli* recombinante

A síntese de uma proteína estranha pelo organismo hospedeiro drena uma quantidade considerável de recursos celulares (ATP ou GTP, nucleotídeos, aminoácidos e precursores) para essa finalidade específica, causando o chamado estresse metabólico. Como consequência, o metabolismo e a fisiologia da célula são dramaticamente alterados e o hospedeiro se torna debilitado (GLICK, 1995; HEYLAND et al., 2011; MARISCH et al., 2013; MORWVAT et al., 2014). De maneira geral, a literatura (GLICK, 1995; ASHRAF et al., 2013; BABAEIPOUR et al., 2013, dentre outros) relaciona a magnitude do estresse metabólico a diversos fatores, destacando a intensidade na qual a proteína heteróloga é produzida, o número de cópias do plasmídeo e o tamanho do vetor, as características da proteína recombinante, o estado metabólico da célula (incluindo a velocidade específica de crescimento), a composição do meio de cultivo e as condições de indução (tipo de indutor e quantidade adicionada, tempo de indução, temperatura).

A sobrecarga metabólica desencadeia respostas fisiológicas nas células de *E. coli* similares às causadas pelo choque térmico, o que pode desencadear a produção de diversas proteínas tipo chaperonas ou similares (NELSON e COX, 2006). Assim, ao mesmo

tempo em que a adoção de uma estratégia mais agressiva de indução pode promover o rápido acúmulo de grande quantidade de proteína dentro da célula, ela pode também provocar a produção de várias outras proteínas de resposta ao estresse, que constituirão um *pool* de proteínas contaminantes que devem ser removidas nas etapas de purificação que ocorrem após o cultivo.

Além da resposta tipo choque térmico, outras respostas fisiológicas são frequentemente relatadas na literatura. Em sistemas de expressão baseados em plasmídeos, a energia celular é desviada para a manutenção e replicação do plasmídeo assim como para síntese da proteína de interesse, levando a um menor crescimento da célula hospedeira, à diminuição do rendimento em biomassa, ao aumento na velocidade de respiração, à instabilidade plasmidial e ao surgimento de uma população de células que não carrega o plasmídeo (ou parte dele) mesmo na presença de pressão seletiva, o que acarreta em grande prejuízo em termos de produção da proteína de interesse (GLICK, 1995; YAZDANI e MUKHERJEE, 2002; HEYLAND et al., 2011; WAEGEMAN e SOETAERT, 2011; MARISCH et al., 2013; MORWAT et al., 2014). A ocorrência de permeabilização da membrana celular externa, com consequente escape de proteínas para o meio de cultivo também foi observada em alguns estudos (GLICK, 1995; RODRÍGUES-CARMONA et al., 2012; MARISCH et al., 2013). As alterações na morfologia celular também estão presentes, sendo relatada a presença de células alongadas que se formam pela divisão celular incompleta que ocorre pela ausência ou má formação das proteínas envolvidas nesse processo (JEONG e LEE 2003, FUJIWARA e TAGUCHI 2007), conforme já mencionado no Item 2.3.2.

Assim, considerando os inúmeros pontos discutidos anteriormente, observa-se a grande importância da compreensão dos fenômenos relacionados à fisiologia celular, da identificação dos mesmos durante os cultivos e de uma abordagem integrada para a otimização da produção da proteína recombinante e de sua pureza.

2.4.3. Células viáveis mas não cultiváveis (VBNC)

Bactérias podem entrar em um estado no qual são consideradas viáveis mas não cultiváveis (VBNC, do inglês *viable but nonculturable*), no qual as células viáveis perdem a habilidade de se desenvolver no meio de cultura no qual normalmente crescem ou produzem colônias, mas ainda assim estão vivas e apresentam uma atividade metabólica em níveis inferiores ao normal, de forma que, em condições favoráveis, possam recuperar sua condição de cultivabilidade, processo conhecido como ressuscitação (OLIVER, 2005).

Desde a primeira descrição desse estado celular em 1982 para células de *E. coli* e *V. cholerae*, mais de setenta espécies de bactérias, na sua maioria gram-negativas, foram documentadas como tendo a capacidade de entrar no estado de VBNC. Esse estado é descrito como uma estratégia de crescimento ou de sobrevivência adaptativa ao estresse celular, uma vez que células apenas irão passar por esse estado quando expostas a condições ambientais adversas (STOKELL e STECK, 2012).

Apesar de não detectáveis por técnicas de cultura convencionais como a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), estudos revelaram que as células VBNC são capazes de realizar diversas atividades comuns a células viáveis como: produzir biomassa e consumir nutrientes, manter um metabolismo ativo, realizar a respiração celular, manter a integridade da membrana celular, fazer a transcrição de genes e a síntese de proteínas, entre outras, ainda que a taxa de transporte e síntese de substância apresente reduções significativas (PINTO et al., 2013). As células podem apresentar mudanças significativas na sua morfologia, como diminuição do seu tamanho, mudanças genômicas (OLIVER, 2005), e alteração na composição da parede celular (PINTO et al., 2013).

O estado de VBNC não pode ser confundido com demais estados como a esporulação e a dormência. No primeiro caso, as células passam por um processo no qual a atividade metabólica e a síntese proteica são cessadas, tornando as células estruturas desidratadas e morfologicamente muito distintas daquelas em crescimento, passando a ter grande resistência às condições ambientais adversas. No caso da dormência, que ocorre em algumas espécies de bactérias, também é possível diferenciá-lo do estado de VBNC devido a alterações na atividade metabólica. Como na esporulação, o metabolismo cai para níveis abaixo dos limites de detecção, porém, não são observadas as grandes mudanças morfológicas, desidratação nem o aumento da resistência acentuada às mudanças ambientais (PINTO et al., 2013).

Diversas condições que induzem grande estresse celular podem desencadear o aparecimento de células VBNC em diferentes quantidades. Darcan et al (2009) estudaram a passagem de células de *E. coli* para estado de VBNC devido ao estresse de mudança de pH, pressão osmótica e ausência de nutrientes cultivadas na água do mar. Foi mostrado também que células que não conseguiam detectar as mudanças ambientais devido a ausência de proteínas na sua membrana demoraram mais para entrar no estado de VBNC, mas também desapareceram do meio de cultura primeiro, evidenciando que esse estado é uma importante estratégia de sobrevivência das células. Diversos outros fatores podem desencadear o estado de VBNC nas diferentes espécies onde ele foi verificado como, por exemplo, mudanças de

temperatura, baixa disponibilidade de oxigênio, presença de luz solar, entre outros (PINTO et al., 2013). Foi sugerido que as células de *E. coli* armazenadas em ambientes menos favoráveis podem produzir radicais livres quando expostas a altas concentrações de nutrientes (BLOOMFIELD et al., 1998). Algumas células de *E. coli* VBNC puderam ser cultivadas até atingir altas concentrações em meios contendo substâncias que evitavam a acumulação desses radicais como a catalase, piruvato de sódio ou α -cetogluturato, sugerindo que subprodutos tóxicos como o peróxido de hidrogênio podem estar envolvidos em algum nível com o estado VBNC (MIZUNOE et al., 2000). Outras formas descritas para a ressuscitação de células de *E. coli* em estado de VBNC incluem a suplementação do meio de cultura com aminoácidos (PINTO et al., 2011).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismos

Durante os ensaios realizados, os microrganismos utilizados foram os geneticamente modificados: *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro, que expressa o fragmento da proteína PspA do clado 4, e também *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+ Ø, cuja construção apresenta os mesmos componentes da anterior, exceto a região que codifica o fragmento proteico de PspA. Estas construções foram obtidas no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan e gentilmente cedidas pela Dra. Eliane N. Miyaji.

O vetor pET37b+ contém o promotor T7 (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.

3.1.2. Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura em diferentes momentos do cultivo e durante algumas análises. O meio sólido Luria Bertani – Ágar (LB – Ágar - Tabela 3.1), descrito por Sambrook e Russel, (2001), foi usado na preparação de placas de Petri usadas para o crescimento e isolamento das colônias de *rE. coli* (com adição de canamicina, 100 mg/L), para a análise de estabilidade do plasmídeo (com e sem adição de canamicina, 100 mg/L) e para a avaliação da concentração de células cultiváveis por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por volume (sem adição de canamicina).

Tabela 3.1. - Composição do meio complexo LB.

Componente	Concentração
Triptona	10 g/L
Extrato de Levedura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Ágar	20 g/L

Fonte: Sambrook e Russel, 2001.

Nos cultivos em batelada de *rE. coli* nas duas etapas de crescimento celular em frascos agitados (pré-inóculo e inóculo) realizadas antes de todos os cultivos, foi utilizado meio definido, adaptado de Sargo, 2011. A composição do meio de cultura definido no início dos cultivos está mostrada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. - Meio de cultura definido empregado em cultivos em batelada de *rE. coli*.

Componente	Concentração
Glicerol	60 g/L
KH ₂ PO ₄	17,73 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,3 g/L
Ácido Cítrico	2,27 g/L
Citrato de Ferro (III)	133,33 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	3,33 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	20 mg/L
CuCl ₂ .2H ₂ O	2 mg/L
Zn(CH ₃ COO) ₂ .2H ₂ O	33,8 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,8 mg/L
H ₃ BO ₄	4 mg/L
EDTA	18,8 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,6 g/L
Tiamina	45 mg/L
Canamicina	100 mg/L
Antiespumante PPG 30%	1 mL/L

Fonte: Adaptado de Sargo, 2011.

A fase de indução dos cultivos foi iniciada com a adição de um pulso de 4,5mL contendo IPTG (concentração de 1mM no reator) ou de 500 mL de lactose (concentração de 20 g/L no reator). Caso a concentração da fonte de carbono atingisse valores baixos durante a fase de indução, um pulso contendo solução de substrato concentrada em meio de cultivo era adicionado ao caldo de cultivo, de forma a evitar que a produção de proteína fosse afetada pela falta da fonte de carbono. Nos cultivos induzidos com IPTG, um pulso de 250 mL contendo glicerol (30 g/L) e demais sais foi realizado com essa finalidade, enquanto em cultivos induzidos por lactose, um pulso de 250 mL contendo glicerol (30 g/L), lactose (10

g/L) e demais sais foi adicionado ao meio de cultivo. A lactose, cuja solubilidade em água é de aproximadamente 200 g/L (20°C), diferentemente do IPTG, é consumida pela bactéria como fonte de carbono e precisa estar em concentrações maiores para uma indução efetiva. O controle do pH foi realizado com a adição de alíquotas de ácido (HCl) e base (NH₄OH).

3.1.3. Biorreator de bancada

Os cultivos foram conduzidos em biorreator de bancada construído no DEQ/UFSCar, dotado de sistema de monitoramento e controle baseado no *software* SuperSys_HCDC®, detalhadamente descrito em Horta (2011). O biorreator de bancada possui volume útil de 5 L (diâmetro de 16 cm e altura de 25 cm) contendo 4 chicanas diametralmente opostas com largura de 1,7 cm. O eixo contém 3 impelidores tipo Rushton com diâmetro de 8 cm e espaçamento entre eles de 9 cm, sendo os dois inferiores para agitação e o superior prioritariamente para controle da altura da espuma. Uma imagem do biorreator é apresentada na Figura 3.1.

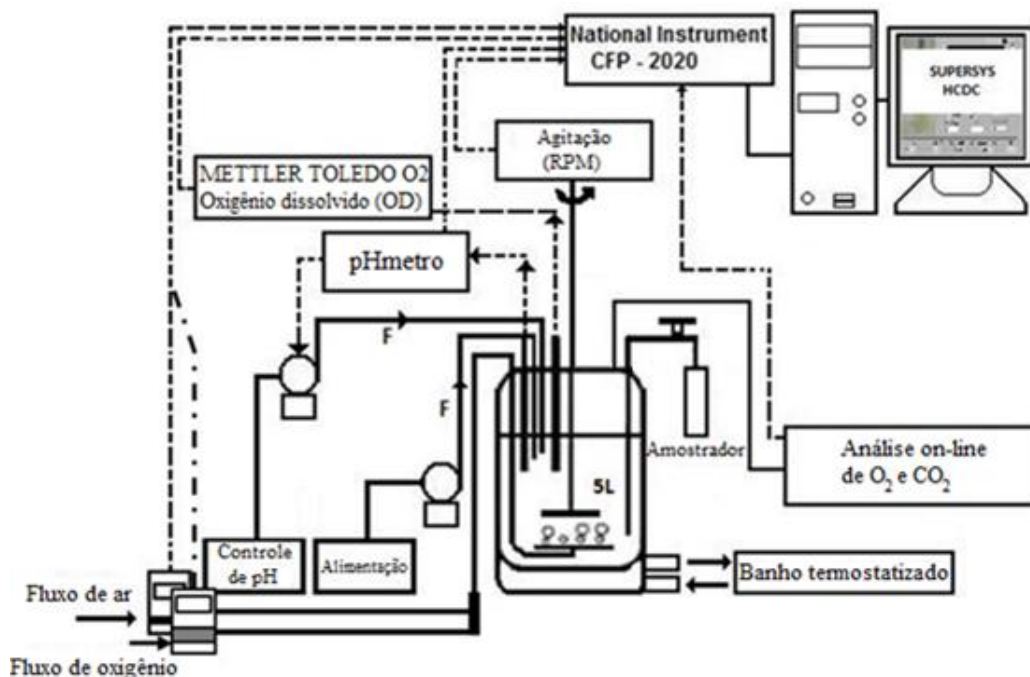
Figura 3.1. - Biorreator de bancada exibindo aspectos exteriores e interiores (Escala: régua 20cm).



Fonte: Acervo pessoal.

O aparato mostrado na Figura 3.2 é composto por: computador, software SuperSys_HCDC®, desenvolvido em LabVIEW e MATLAB® pela equipe de pesquisadores do LADABio/DEQ-UFSCar (HORTA, 2011); compact FieldPoint (cFP 2020 / National Instruments) como conversor A/D e D/A; transmissor de pH (GLI Pro) com aquisição analógica via cFP; pHmetro Redox (3100-32-Pt1000 / Mettler Toledo); transmissor de COD (CE-O2-4050 / Mettler Toledo) com aquisição analógica via cFP; sensor amperométrico de O₂ dissolvido (InPro 6830-12-220 / Mettler Toledo); transmissor de pressão (Zürich modelo PSI-420) com aquisição analógica via cFP; banho termostatizado; termopar com aquisição via interface NOVUS®; bombas de ácido (HCl) e base (NH₄OH) (L/S - Masterflex) com controle on/off via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa (GFC / AALBORG) empregados para suprir ar e O₂ controlados remotamente via computador/cFP; filtro de ar (Sartofluor 0,2 µm / Sartorius). Diferentemente do que foi feito por Horta (2011), não foi usado o sensor de capacitância FOGALE® Nanotech, pois as concentrações obtidas durante os cultivos se mantem, em sua maior parte, abaixo do nível de sensibilidade do equipamento. Os instrumentos listados apresentaram a aquisição de dados em tempo real, com intervalo de salvamento escolhido de 10 segundos. Todo o aparato experimental está esquematizado na Figura 3.2.

Figura 3.2. - Esquematização do biorreator com sistema de aquisição e controle das variáveis do processo.



Fonte: Adaptado de Sargo, 2011.

3.2. Métodos Analíticos

3.2.1. Determinação da concentração celular

A avaliação do crescimento celular foi feita através da leitura quasi *online* da absorvância em espectrofotômetro a 600 nm (DO_{600nm}) utilizando uma pequena alíquota da cultura adequadamente diluída, a fim se obter uma absorvância máxima de até 0,8. Foi utilizado também o método da massa seca, onde um volume conhecido do caldo foi filtrado a vácuo em membrana (poro de 0,22 μ m) cuja massa foi previamente aferida. A membrana foi então submetida à secagem a 70°C por 48 h. A diferença entre as massas da membrana antes e depois da filtração foi utilizada para o cálculo da concentração celular - C_x (gMS/L).

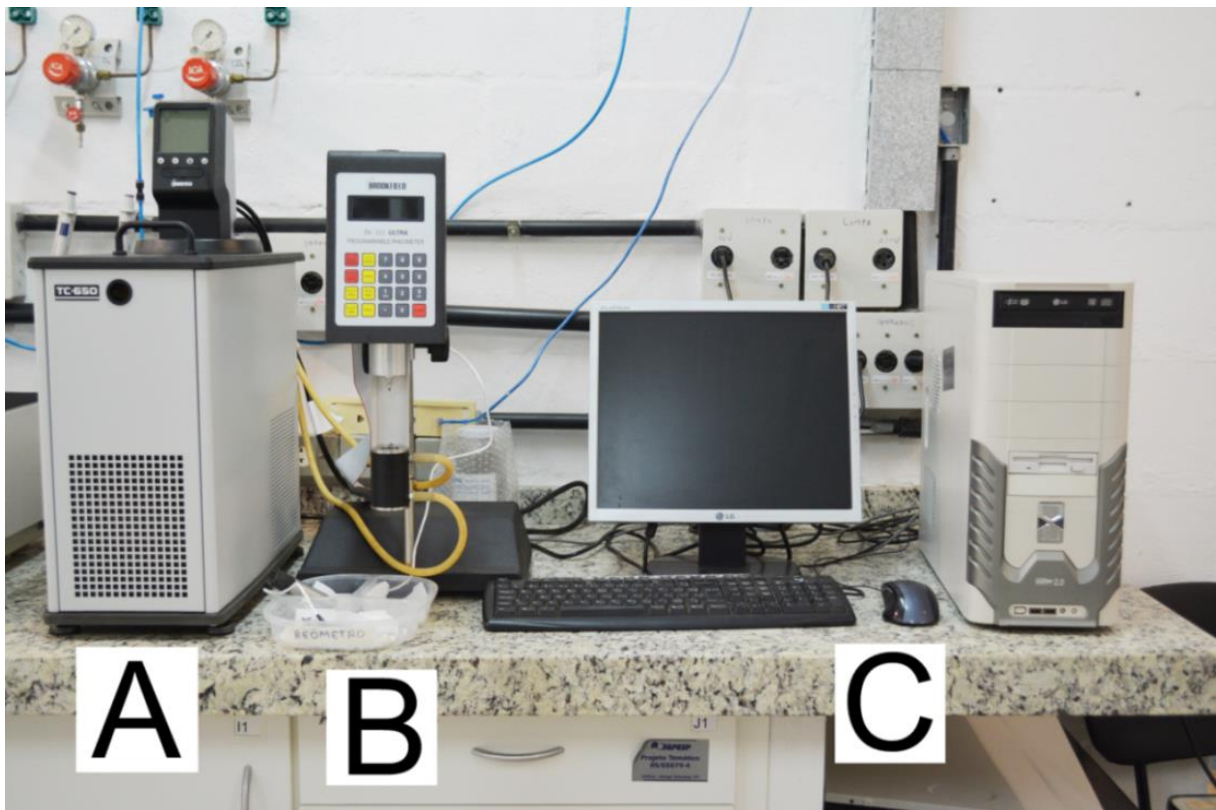
3.2.2. Determinação das propriedades reológicas

A análise da reologia das suspensões celulares obtidas foi feita de acordo com o procedimento descrito por Bellão (2005). Alíquotas de volume conhecido foram retiradas do biorreator em intervalos de tempo regulares durante os cultivos e transferidas para o interior do cilindro fixo do reômetro, dentro do qual o cilindro rotativo (*spindle*) gira em frequências definidas. As análises reológicas foram realizadas em amostras cuja DO aferida era superior a 5 para que a concentração celular já fosse capaz de influenciar na reologia da suspensão.

Para a análise da reologia das amostras das diversas suspensões celulares utilizou-se um reômetro de cilindros concêntricos, da marca Brookfield, modelo DV-III ULTRA. Para a realização das medidas reológicas existe, acoplado ao reômetro, um computador que realiza controle e aquisição de dados em tempo real. Além disso, há um banho termostaticado ligado ao cilindro fixo externo do reômetro, garantindo a permanência da amostra à temperatura constante. As análises foram realizadas mantendo-se a temperatura da amostra constante a 30°C com auxílio de um banho termostaticado acoplado ao reômetro de cilindros concêntricos. A temperatura de análise foi escolhida como uma temperatura fixa intermediária entre as temperaturas de cultivo (37°C e 27°C). As frequências de rotação do *spindle* foram determinadas pelo computador, que seleciona automaticamente 18 velocidades diferentes de rotação, variando entre 10 e 250 RPM, com intervalos de tempo entre as aquisições para que o escoamento entre em regime estacionário a cada condição de velocidade estudada. Para cada frequência de rotação, o valor correspondente à tensão de cisalhamento é calculado pelo reômetro para a suspensão sob análise e adquirido pelo software. O valor de 10

RPM foi estabelecido como mínimo, pois para frequências de rotação menores podem ocorrer falhas na obtenção dos valores corretos da taxa de cisalhamento. Durante a realização das medidas de reologia, os pontos experimentais foram obtidos em condições de escoamento laminar, sendo que os dados em que essa condição não foi respeitada foram excluídos. Segundo o manual do fabricante, o erro associado à medida é de $\pm 1\%$. Para a construção dos gráficos utilizados nas análises reológicas, a região inicial foi extrapolada para se obter o valor de τ_0 quando $\gamma = 0$ a partir da tendência dos demais dados obtidos. O reômetro e acessórios são reproduzidos na Figura 3.3.

Figura 3.3. - Reômetro de cilindros concêntricos e acessórios. A - Banho termostatzado; B: Reômetro de cilindros concêntricos; C: Computador de controle e aquisição de dados.



Fonte: Acervo pessoal.

Após a coleta dos dados de tensão de cisalhamento em função da frequência de rotação, estes foram exportados para o software Origin[®] e processados com o uso de ferramentas matemáticas de regressão linear e não linear, para o ajuste do modelo matemático e determinação dos parâmetros cinéticos K , n e τ_0 com o menor erro possível. A escolha da regressão e dos parâmetros usados foi feita após se observar o comportamento dos dados

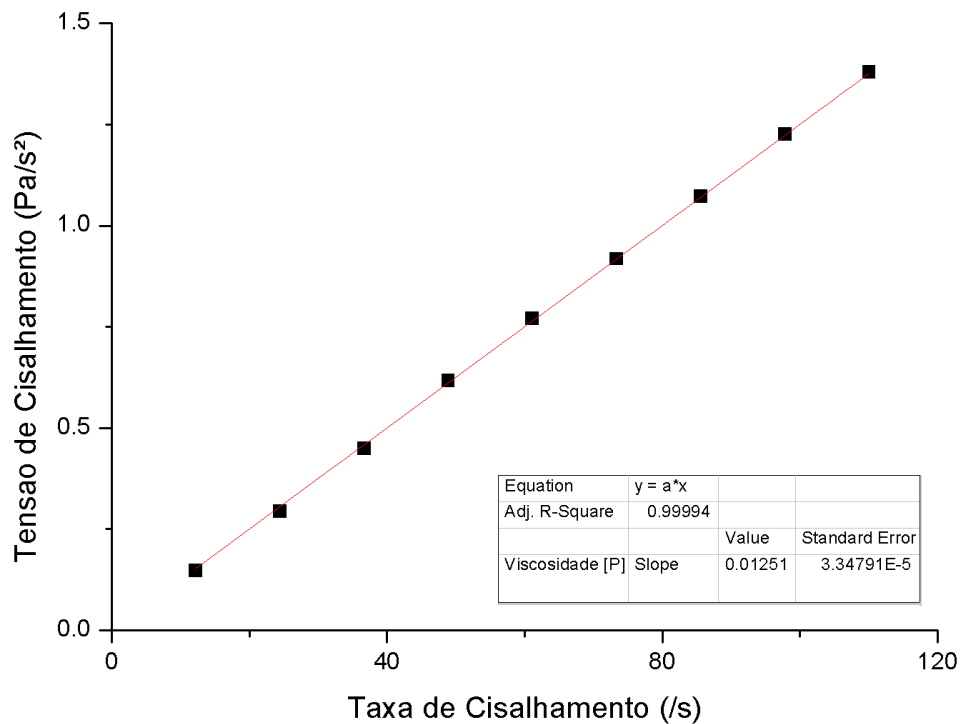
obtidos em cada ponto, de forma a permitir os melhores ajustes, e ainda assim mais simples, a esses valores experimentais. O modelo adotado obedece a seguinte Equação 3.1:

$$\tau = \tau_0 + K * \dot{\gamma}^n \quad (3.1)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento (Pa); τ_0 , a tensão de cisalhamento inicial (Pa); K, o índice de consistência (Pa.sⁿ); n, o índice de comportamento do escoamento (-) e $\dot{\gamma}$ a taxa de cisalhamento (s⁻¹).

Um reograma típico obtido durante os experimentos, onde é possível observar a análise de um fluido com comportamento newtoniano, é exemplificado na Figura 3.4.

Figura 3.4. - Reograma típico obtido para fluido newtoniano.



Fonte: Acervo pessoal.

A análise da reologia pelo procedimento descrito acima foi conduzida em parceria com os alunos Adilson de Oliveira Leandro Jr. e Mariana de Jesus, bolsistas do Programa Jovens Talentos para a Ciência, CAPES.

3.2.3. Determinação da concentração de proteína

Alíquotas retiradas durante os cultivos foram centrifugadas e os corpos de fundo ressuspensos em tampão tris (tris 20 mM, NaCl 250 mM e pH 8,0). Essas suspensões foram submetidas a processo de rompimento celular por sonicação (5 minutos, com pulsos ON/OFF de 30 s, amplitude de 20%, 130 W e 20 kHz). Após a sonicação, os extratos brutos resultantes foram centrifugados (10.000 RPM, 4°C, 5 min) a fim de separar os componentes intracelulares solúveis (sobrenadante) dos insolúveis (corpo de fundo). Os sobrenadantes foram submetidos ao procedimento desenvolvido por Bradford (1976) para a determinação da concentração das proteínas totais solúveis (C_P).

O próximo passo foi estimar a quantidade de PspA presente no total de proteínas solúveis quantificadas pelo método de Bradford. A determinação da produção de proteína recombinante foi baseada na densitometria das bandas de proteína separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 e a produção da proteína foi estimada utilizando-se o software ImageJ[®] (ABRAMOFF et al., 2004), como exemplificado na Figura 3.5.

Figura 3.5. - Gel de poliacrilamida 12% exemplificando a presença da proteína PspA.

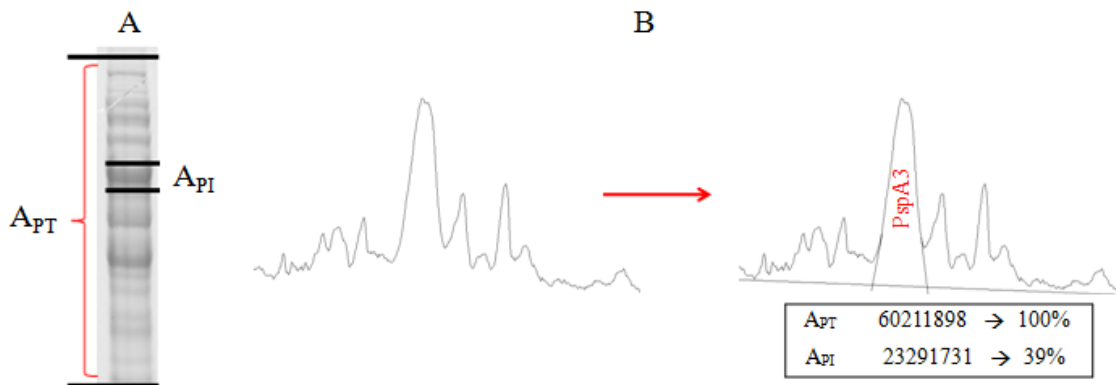


Fonte: Acervo pessoal.

Conforme descrito por Sargo (2011), a imagem digitalizada do gel é processada gerando curvas cujos picos são proporcionais à largura e à intensidade de coloração das bandas correspondentes às proteínas presentes na amostra sob análise. 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 obter um valor numérico que corresponde à concentração de proteínas totais observadas no gel (A_{PT}). Já quantificando apenas a área sob a curva correspondente à proteína recombinante de interesse (A_{PI}) obtém-se o valor numérico representativo da mesma e a partir destes dois valores calcula-se a fração relativa da proteína recombinante, como é mostrado na Figura 3.6.

Figura 3.6. - Cálculo da porcentagem relativa da proteína recombinante em relação a proteínas totais obtidas no gel de eletroforese (A) Quantificação da área sob a curva através do software ImageJ® (B).



Fonte: Adaptado de Sargo, 2011.

Finalmente, considerou-se que a intensidade da banda de PspA (A_{PI}) em relação à soma das intensidades de todas as bandas da amostra presentes no gel (A_{PT}) é igual à porcentagem mássica de PspA dentre todas as proteínas intracelulares solúveis presentes na célula. A partir desses dados, foi possível calcular a concentração de PspA solúvel (C_{PspA}) mostrada na Equação 3.2 e, com os dados da concentração celular, C_x (gMS), foi estimada a produção específica, $Y_{PspA/X}$ (mgPspA/gMS), de PspA solúvel, através da Equação 3.3.

$$C_{PspA} = \frac{A_{PI}}{A_{PT}} \cdot C_P \quad (3.2)$$

$$Y_{PspA/X} = \frac{C_{PspA}}{C_X} \quad (3.3)$$

3.2.4. Acompanhamento da morfologia celular

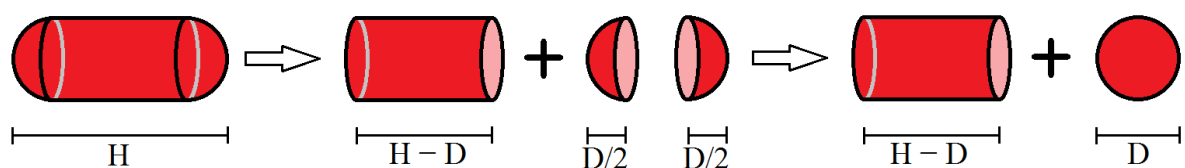
Em todos os cultivos realizados, a morfologia das células foi acompanhada em microscópio, após tratamento da suspensão pelo método de Gram (KYLE et al., 2012), sendo que, para isso, uma alíquota de 20 µl de caldo de cultivo contendo o microrganismo recombinante (diluída para atingir uma DO entre 2 a 3) foi espalhada na superfície de uma lâmina e fixada com calor. Solução de cristal violeta foi então aplicada sobre a amostra por um período de 1 minuto, sendo então lavada extensivamente. A lâmina foi então coberta com solução de lugol por 30 segundos antes de ser novamente enxaguada. Procedeu-se em seguida à descoloração com álcool etílico absoluto por cerca de 5 segundos e a lavagem com água destilada. O corante fucsina foi então aplicado, ficando 30 segundos antes da lavagem final com água destilada.

As lâminas bacteriológicas foram então examinadas usando um microscópio ótico (Olympus BX50) munido de um sistema de aquisição digital de imagens. As imagens adquiridas via câmera digital acoplada ao microscópio foram binarizadas utilizando o programa ImageJ[®] e processadas em rotina desenvolvida em Matlab[®] para determinação do diâmetro (D) e do comprimento (H) e cálculo do volume (V), da população de células presente em cada quadro analisado (ANDRADE et al., 2013; ZIMER et al. 2013). A Equação 3.4 é utilizada para o cálculo do volume considera o bastonete como um cilindro cujas extremidades são cobertas por semiesferas, como visto na Figura 3.7.

$$V = \frac{4}{3} * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^3 + \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^2 * (H - D) \quad (3.4)$$

onde, V é o volume da célula (µm³), D é o diâmetro (µm) e H é o comprimento (µm). Caso a célula tenha formato esférico, H se iguala a D na equação, reduzindo-a ao volume de uma esfera.

Figura 3.7. - Imagem da geometria aproximada da célula para o cálculo do volume.



Fonte: Acervo pessoal.

As imagens foram adquiridas com o uso de uma lente objetiva proporcionando um aumento total de 400 vezes, sendo esse valor escolhido por proporcionar uma boa resolução de imagem aliado a um grande campo, o que permite a medição de um maior número de indivíduos. Para cada amostra foram medidos no mínimo 1000 indivíduos aleatoriamente e então foi realizada uma análise estatística da população para verificar se a mesma havia sofrido mudanças estatisticamente significativas através da análise de variância de Kruskal-Wallis (MONTGOMERY e RUNGER, 2009), já que as amostras, submetidas a um teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov (RODRIGUES e IEMMA, 2009), mostraram que não são bem representadas por uma distribuição normal. Um exemplo de imagem adquirida através do procedimento descrito pode ser visto na Figura 3.8.

Figura 3.8. - Imagem de lâmina bacteriológica adquirida para determinação do diâmetro, comprimento e volume celular.



Fonte: Acervo pessoal.

Por fim, os dados obtidos foram representados em histogramas e *boxplots*, onde os *whiskers* indicam o 5° percentil (*whisker* inferior), e o 95° percentil (*whisker*

superior) e as três divisões da caixa indicam, da parte inferior para a superior, o 1º quartil, a mediana (2º quartil), e o 3º quartil. O Apêndice A trás a relação completa dos histogramas de comprimento celular gerados, enquanto o Apêndice B trás a relação completa dos histogramas de volume celular gerados.

A metodologia de confecção das lâminas foi desenvolvida e implementada em parceria com a aluna Jéssica Bonomo (bolsista IC FAPESP, Processo 2013/20985-1). Já o procedimento de processamento das imagens e análise da morfologia da população foi implementado pelo aluno João Victor de Lima Andrade (bolsista IC FAPESP, Processo 2014/11557-9) e o procedimento de análise e quantificação da morfologia foi conduzido em parceria com a aluna Caroline Borges (bolsista do Programa Jovens Talentos para a Ciência, CAPES) e com o aluno João Victor de Lima Andrade.

3.2.5. Concentração de açúcares e ácidos orgânicos

A determinação da concentração de glicerol, glicose, lactose, galactose (sobrenadante do caldo e sobrenadante da célula rompida), etanol e ácidos orgânicos (ácidos acético, fórmico, láctico e succínico) foi feita por HPLC (sistema Waters Co; Bombas HPLC 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 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min, a 50°C.

3.2.6. Determinação da estabilidade do plasmídeo e contagem de UFC

Para a análise de estabilidade do plasmídeo (ou retenção plasmidial), amostras de 100 µL da suspensão celular retiradas da cultura de forma estéril foram diluídas entre 10⁶ e 10⁸ e semeadas em placas de LB-Ágar sem canamicina. Após 24 h de incubação a 37°C, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) formadas nessas placas (VÉLEZ et al., 2014), e repicou-se 50 ou mais colônias para placas de LB-Ágar contendo 100 mg/L de canamicina. O mesmo procedimento foi aplicado para placas idênticas, mas sem o antibiótico (controle). As porcentagens de colônias que cresceram nas placas com o antibiótico em relação às placas controle foram calculadas a fim de se obter uma estimativa da estabilidade plasmidial. Essa estabilidade, que é essencial para a produção da proteína recombinante, foi determinada ao longo da fase de indução.

3.2.7. Balanço de carbono nos cultivos

Para a realização do cálculo do balanço de carbono nos cultivos, são necessários dados da concentração celular, obtidos através de medidas de massa seca e da correlação entre o C_x e DO, dados de concentração de açúcares e ácidos orgânicos, dados de vazão de ar e fração molar de CO_2 no efluente gasoso que deixa o reator e dados do volume do reator.

O balanço foi realizado através de uma comparação entre o número total de C-moles de carbono (ΣC_t) presentes em um determinado instante no cultivo e o número total de C-moles de carbono presentes no reator no tempo de referência do experimento (ΣC_0). Para tal cálculo, estimou-se o número de C-moles de carbono presentes no cultivo como biomassa (N_{Cx}), conforme mostrado na Equação 3.5; o número de C-moles de carbono presentes no cultivo na forma de fontes de carbono e ácidos orgânicos (N_{FC}) e polissacarídeo (N_{PS}), como mostrado na Equação 3.6, e o números de C-moles de carbono que deixam o reator na forma de CO_2 (N_{CO_2}), como mostrado na Equação 3.7. A fórmula mínima adotada para o cálculo da quantidade de carbono (mol de carbono) presente na biomassa de *E. coli* foi $CH_{1,77}O_{0,49}N_{0,24}P_{0,014}$, e para os cálculos dos valores de N_{cx} , foram considerados que até 5,5% da biomassa como sendo constituída por cinzas (von STOCKAR e LIU, 1999). Os valores obtidos para a fórmula mínima através de análise elementar podem variar significativamente de acordo com as condições adotadas durante o cultivo (VILLADSEN et al., 2011), sendo assim, a fórmula mínima adotada para os balanços de massa é considerada um valor médio.

$$N_{Cx} = \frac{C_x * v}{MM_x} \quad (3.5)$$

$$N_{FC} \text{ ou } N_{PS} = \sum_{i=1}^{\infty} \frac{C_i * v}{MM_i} \quad (3.6)$$

$$N_{CO_2} = \int \dot{n}_{CO_2}^P * dt \quad \text{onde, } \dot{n}_{CO_2}^P = y_{CO_2}^S * Q_S * \frac{P_S}{R * T_S} - y_{CO_2}^E * Q_E * \frac{P_E}{R * T_E} \quad (3.7)$$

onde C_x é a concentração celular (gMS/L), v é o volume do reator (L), MM_x é a massa molar da fórmula mínima (ou elementar) da biomassa, C_i é a concentração da fonte de carbono, ácido orgânico ou composto solúvel de carbono, MM_i é a massa molar da fórmula mínima (ou elementar) da fonte de carbono, ácido orgânico ou composto solúvel de carbono, $\dot{n}_{CO_2}^P$ é a

vazão molar de CO₂ (mol de CO₂/h), t é o tempo de cultivo (h), $y_{CO_2}^S$ e $y_{CO_2}^E$ são a fração molar de CO₂ no gás de saída e entrada respectivamente (-), Q_S e Q_E são as vazões volumétricas de gás na saída e na entrada respectivamente (L/h), e a razão $\frac{P_S}{R*T_S}$ e $\frac{P_E}{R*T_E}$ representam as condições de pressão, temperatura e a constante universal dos gases para o gás de saída e a entrada, respectivamente.

Com esses dados é calculada a recuperação (R) do carbono baseado no carbono total disponível em um determinado ponto de referência. Para efeito de cálculo, o sistema é considerado fechado, não havendo a entrada nem a saída de carbono. Desta forma, o primeiro ponto de referência para o cálculo da recuperação do carbono é o início do cultivo. Contudo, sempre que é necessária a adição de algum componente no sistema (como indutor ou pulsos de suplementação de fonte de carbono), o ponto de referência para o cálculo do carbono total passa a se tornar o momento exatamente posterior a essa adição. O cálculo da recuperação de carbono é mostrado na Equação 3.8.

$$R = \frac{\sum C_t}{\sum C_0} * 100 \quad (3.8)$$

onde R é a recuperação do carbono (%), $\sum C_t$ é a somatória de N_{CX} , N_{FC} , N_{CO_2} e N_{PS} para um dado instante do cultivo (C-mol de carbono), e $\sum C_0$ é a somatória de N_{CX} , N_{FC} , N_{CO_2} e N_{PS} para o carbono total disponível em um determinado ponto de referência (mol de carbono).

A verificação da recuperação de carbono para o fechamento do balanço de carbono é importante para avaliação da consistência dos dados obtidos. Esta avaliação também pode permitir a constatação da ocorrência de fenômenos até então desconhecidos durante o cultivo.

3.2.8. Estimativa da velocidade específica máxima de crescimento e do rendimento em biomassa

A fase de crescimento exponencial presente no início de todos os cultivos foi caracterizada em termos de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e do coeficiente de rendimento em biomassa a partir do glicerol consumido ($Y_{x/glicerol}$). Os valores

de μ_{max} e $Y_{x/glicerol}$ foram determinados por regressão linear empregando os dados da fase exponencial (SHULER e KARGI, 2002) a partir das equações 3.9 e 3.10:

$$\mu_{max} = \ln\left(\frac{C_X}{C_{X0}}\right) t \quad (3.9)$$

$$Y_{x/glicerol} = \frac{\Delta C_X}{-\Delta C_S} \quad (3.10)$$

3.2.9. Concentração de ácidos nucleicos

A avaliação da concentração de ácidos nucleicos no sobrenadante do caldo de cultivo foi feita através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 260 nm (DO_{260nm}) utilizando uma pequena alíquota do sobrenadante do caldo de cultivo adequadamente diluído, a fim de obter uma absorbância máxima de até 0,8 (HEPTINSTALL e RAPLEY, 2000). A concentração final de ácidos nucleicos (C_{AN}) é obtida através da Equação 3.11.

$$C_{AN} = 50 * DO_{260nm} \quad (3.11)$$

onde, C_{AN} é a concentração de ácidos nucleicos ($\mu\text{g/mL}$), DO_{260nm} é a absorbância em espectrofotômetro a 260 nm (-).

3.2.10. Concentração de polissacarídeos

A quantificação da concentração de polissacarídeos no sobrenadante do caldo de cultivo foi feita de acordo com o procedimento conhecido como método fenol sulfúrico. Para cada amostra, uma alíquota previamente diluída de 200 μL do sobrenadante foi adicionada em um tubo de ensaio, juntamente com uma alíquota de 200 μL de uma solução de 5% m/v de fenol. Em seguida, adiciona-se uma alíquota de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, mantendo então a reação no tubo de ensaio sob agitação por 10 minutos. Após esse período, é feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490 nm (DO_{490nm}). As amostras foram então quantificadas de acordo com o procedimento descrito por Brimacombe e Beatty (2013). Por fim, foram descontadas as concentrações das substâncias interferentes (lactose e galactose), quando presentes, cujos valores já haviam sido obtidos pelo método descrito no Item 3.2.5.

3.3. Procedimento experimental

3.3.1. Semeadura de *rE. coli* em meio semi-sólido

A suspensão de células de *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro ou *Escherichia coli* BL21(DE3) pET37b+ Ø, armazenada sob congelamento a -80°C em meio definido (Tabela 3.2) acrescido com 10% v/v de glicerol, foi estriada em uma placa de Petri com LB-Ágar contendo 100 mg/L canamicina. Em seguida, a placa foi incubada por 24 horas a 37°C.

3.3.2. Preparação das pré-culturas (pré-inóculo e inóculo)

Para a preparação do pré-inóculo, dois Erlenmeyers esterilizados de 500 mL foram preenchidos com 50 mL de meio definido idêntico ao usado no início do cultivo. Com uma alça de platina, uma colônia da placa LB-Ágar com canamicina, preparada no dia anterior (Item 3.3.1.), foi semeada em cada frasco. Os frascos foram deixados em uma câmara incubadora rotativa a 250 RPM e 37°C por cerca de 12 h, com acompanhamento periódico do crescimento por meio de medida de absorbância. Ao alcançar o valor de absorbância próxima a 2,5 (garantindo que o mesmo esteja em fase exponencial de crescimento) teve início a preparação do inóculo.

Para a preparação do inóculo, três Erlenmeyers esterilizados de 500 mL foram preenchidos com 100 mL de meio definido idêntico ao usado no início do cultivo. Uma alíquota de um único frasco de pré-inóculo foi adicionada em cada Erlenmeyer do inóculo de forma que todos tivessem inicialmente uma absorbância igual a 0,1. Os frascos foram deixados em uma câmara incubadora rotativa a 250 RPM e 37°C por cerca de 8 h, com acompanhamento periódico do crescimento também por meio de medida de absorbância em DO_{600nm}. Ao alcançar o valor de absorbância próximo a 2,5 (garantindo que o mesmo esteja em fase exponencial de crescimento) os 300 mL de inóculo foram transferidos para o biorreator.

3.3.3. Ensaios em Biorreator

Os cultivos foram conduzidos no biorreator de bancada descrito no Item 3.1.3., adotando-se o regime em batelada. O meio de cultura utilizado foi o listado na Tabela 3.2., e,

caso fosse verificada a necessidade de suplementação com algum nutriente que se esgotasse durante o cultivo, o mesmo era fornecido ao reator por meio da adição de um pulso. A expressão da proteína recombinante pela bactéria foi induzida utilizando um pulso de IPTG ou lactose.

Para dar início aos cultivos, o volume inicial de 4,5L do meio de batelada presente no biorreator, foi inoculado com \cong 300 mL de inóculo cultivado conforme descrito no Item 3.3.2. Em todos os experimentos foram adotadas as seguintes condições de cultivo: pH inicial de 6,3, sendo que, após alcançar uma DO \cong 15, foi gradativamente elevado até atingir um pH de 6,7 (alcançado logo antes 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 amônio. 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 900 rpm integrada ao enriquecimento gradativo do ar com oxigênio puro (HORTA, 2011). As principais características de cada cultivo são resumidas no Quadro 3.1.

Quadro 3.1. - Características dos cultivos realizados para obtenção das suspensões celulares utilizadas nas análises.

Cultivo	Indutor	Microorganismo	T (°C)	Objetivo
1	IPTG	pET37b+/PspA4Pro	37	Avaliar o efeito da indução com IPTG em condição de metabolismo acelerado
2	lactose	pET37b+/PspA4Pro	37	Avaliar o efeito da indução com lactose em condição de metabolismo acelerado
3	lactose	pET37b+ Ø	37	Avaliar a indução com lactose na ausência da expressão da proteína de interesse
4	IPTG	pET37b+/PspA4Pro	27	Avaliar o efeito da indução com IPTG em condição de metabolismo moderado
5	lactose	pET37b+/PspA4Pro	27	Avaliar o efeito da indução com lactose em condição de metabolismo moderado

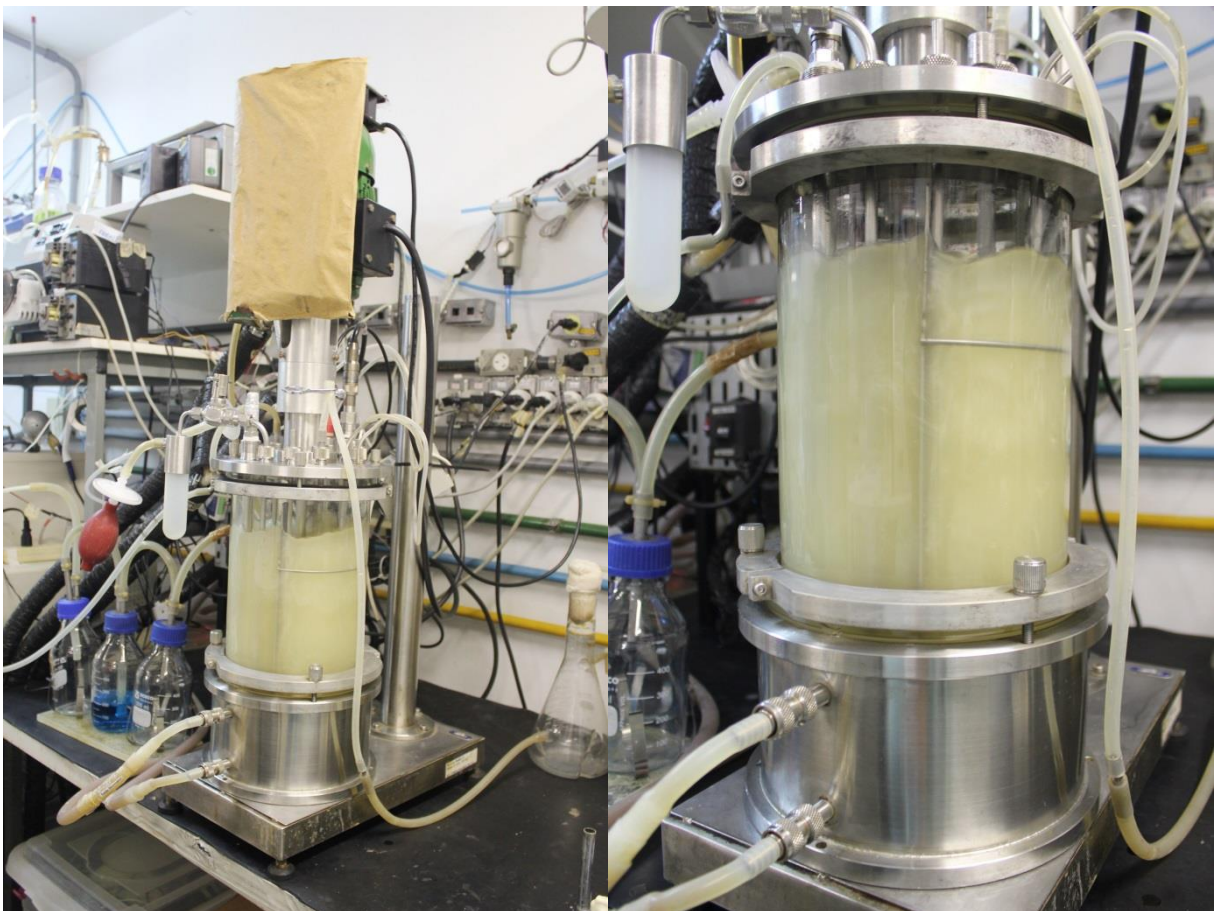
Fonte: Acervo pessoal.

Durante os experimentos foram retiradas amostras regularmente para: determinação da concentração celular (Item 3.2.1.); realização das análises reológicas (Item 3.2.2.); quantificação da produção de proteína recombinante (para cultivos de *rE. coli*

contendo o inserto que codifica a produção da PspA) (Item 3.2.3.); análises de morfologia (Item 3.2.4.); quantificação dos açúcares e ácidos orgânicos (Item 3.2.5.); análise de estabilidade do plasmídeo e concentração de células cultiváveis (Item 3.2.6.); determinação da concentração de material genético no sobrenadante do cultivo (para os cultivos 4 e 5) (Item 3.2.9); e quantificação da concentração de polissacarídeos e de proteína liberada no sobrenadante do cultivo (para os cultivos 4 e 5) (Itens 3.2.10 e 3.2.11).

Com os dados obtidos através das análises das amostras retiradas durante os experimentos foi possível realizar o balanço de carbono nos cultivos (Item 3.2.7) e estimar os valores da velocidade específica máxima de crescimento e do rendimento em biomassa (Item 3.2.8). A Figura 3.9 mostra o biorreator em operação durante um experimento e, em detalhe, o caldo de cultivo no interior do mesmo.

Figura 3.9. - Imagem do biorreator em operação durante experimento e detalhe do caldo de cultivo em seu interior.



Fonte: Acervo pessoal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Esta seção apresenta os resultados dos cultivos realizados e a integração entre os mesmos. O Item 4.1 irá abordar individualmente os resultados obtidos nos cinco cultivos realizados, destacando todos os dados obtidos através das análises descritas no Item 3.2. O Item 4.2 apresenta uma visão integrada dos resultados obtidos nos diferentes cultivos, destacando os efeitos observados na concentração celular e sua relação com a absorvância a 600 nm, as variações e tendências observadas na reologia dos caldos de cultivo e as mudanças estatisticamente significativas observadas na morfologia celular, permitindo assim, realizar uma avaliação da influência da produção de proteína sobre os aspectos analisados. Por fim, o Item 4.3 abordará o balanço de massa dos cultivos.

4.1. Cultivos em batelada empregando biorreator de bancada

4.1.1. Cultivo 1 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 37°C

O Cultivo 1 foi realizado com o microrganismo capaz de expressar a proteína PspA4Pro e ocorreu inteiramente a 37°C, sendo induzido com a adição de um pulso de IPTG. Esse indutor é capaz de promover uma indução mais intensa do que a lactose devido a sua rápida assimilação, o que pode intensificar o estresse associado à produção da proteína recombinante, resultando em um esforço metabólico mais intenso. A temperatura escolhida foi aquela onde o metabolismo do microrganismo se apresenta mais acelerado, levando a uma velocidade maior de crescimento e de produção de proteína. Desta forma, esse ensaio teve como objetivo avaliar o cenário com potencial de desencadear um maior estresse metabólico na célula.

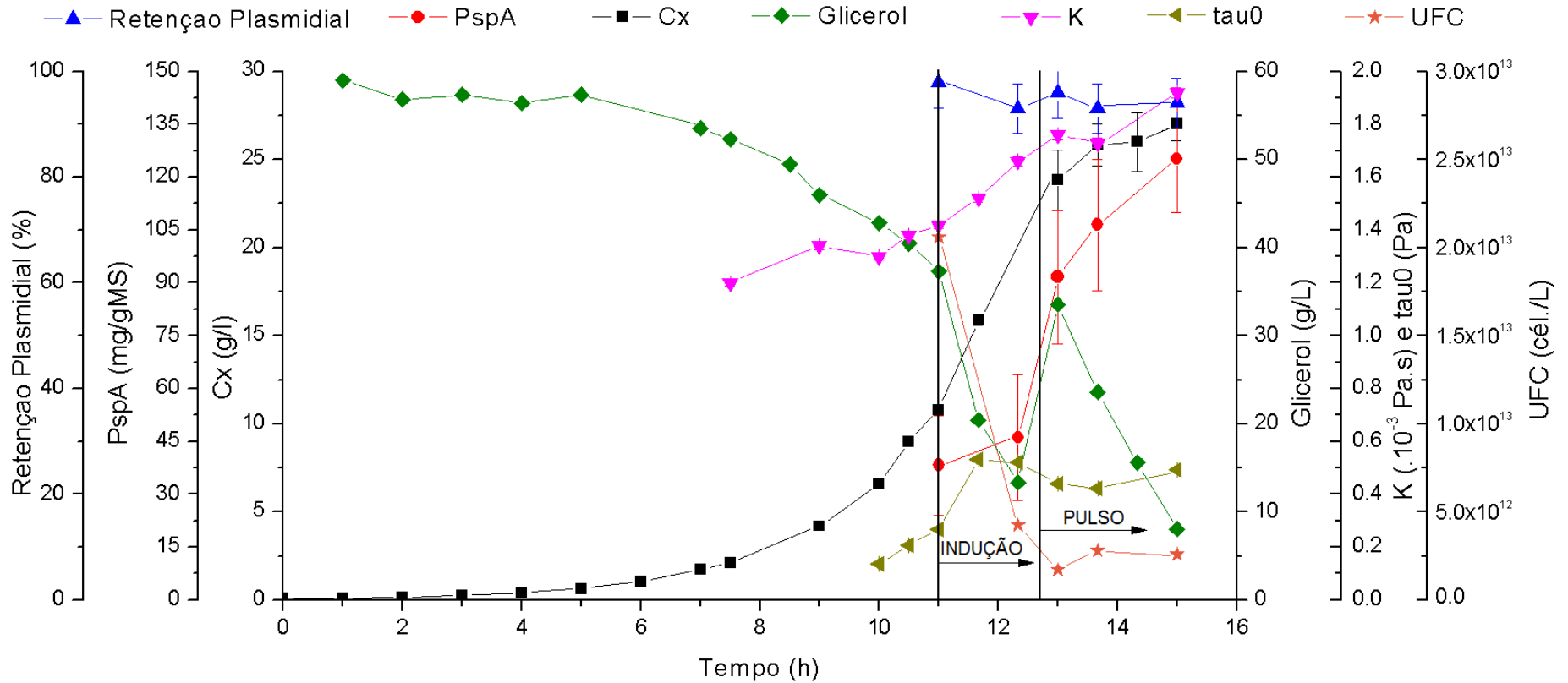
O ensaio foi realizado utilizando o meio descrito na Tabela 3.2., e as condições de operação do reator são as mesmas apresentadas no Item 3.3.3. Contudo, por uma falha no controle de pH, o mesmo acabou transcorrendo completamente em pH 6,3. Esse fato pode contribuir para uma menor disponibilidade da fonte de nitrogênio para as células, já que a suplementação de NH₄OH é mediada pelo controle de pH. Assim, o crescimento celular e a síntese da proteína heteróloga podem ter sido afetados.

O cultivo teve início com a inoculação do reator, obtendo uma DO inicial igual a 0,24. A indução ocorreu com um pulso de 1 mM de IPTG após atingir-se uma DO = 27. Após aproximadamente 1,7 h da indução, foi necessária a suplementação da fonte de carbono através de um pulso que elevou a concentração de glicerol no meio em ~ 30 g/L. O cultivo foi encerrado 4 h após a indução quando o mesmo alcançou DO = 71,6.

É possível observar na Figura 4.1 o perfil de variação da concentração celular (C_x). A estratégia de cultivo que apresentava como fonte de carbono exclusiva 60 g/L de glicerol permitiu o crescimento contínuo da bactéria, evidenciado pelo perfil exponencial do mesmo, atingindo um $\mu_{\max} = 0,448 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$. Após a indução, observa-se que o crescimento celular se mantém, porém, ele deixa de apresentar o perfil exponencial observado na fase de crescimento. O elevado crescimento celular, mesmo após a indução, levou a um rápido consumo da fonte de carbono, havendo, assim, a necessidade do pulso contendo glicerol (250 mL) quando a estimativa da concentração de glicerol presente no meio de cultivo era de 10 g/L. Porém, depois da realização do pulso, tanto o crescimento celular quanto o consumo de glicerol passaram a ser mais lentos.

A produção de ácidos orgânicos foi observada ainda durante a fase de crescimento, devido à grande velocidade de crescimento e ao metabolismo acelerado do microrganismo decorrentes da temperatura de 37°C (Tabela 4.1). Durante essa fase foi observada a produção de ácido acético e, principalmente, de ácido fórmico, não sendo detectada a produção de ácido láctico. Durante a fase de indução acentuou-se a produção de ácido fórmico, enquanto isso houve a manutenção da baixa concentração de ácido acético, até quase o final do cultivo, quando o mesmo deixou de ser detectado devido sua assimilação. A concentração máxima de ácido fórmico alcançou cerca de 1,6 g/L enquanto a concentração máxima de ácido acético atingiu 0,22 g/L. Etanol e ácido succínico não foram detectados. Esses valores máximos de ácidos orgânicos foram verificados logo após a realização do pulso de glicerol, durante a fase de indução, como pode ser visto a seguir na Tabela 4.1.

Figura 4.1. - Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de PspA, reologia e UFC no Cultivo 1 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG, 37°C).



Nota: As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de concentração celular, retenção plasmidial e produção de proteína em triplicata enquanto os parâmetros reológicos apresentam precisão de $\pm 1\%$ fornecida pelo equipamento. O parâmetro n manteve-se constante e igual a 1.

Tabela 4.1. – Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 1 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).

Tempo (h)	Ácidos orgânicos (g/L)		
	Ác. fórmico	Ác. acético	Ác. láctico
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
7,5	0,1	0	0
8,5	0,156	0,062	0
9	0,194	0,08	0
10	0,409	0,135	0
10,5	0,496	0,121	0
11*	0,673	0,117	0
11,67*	0,78	0,123	0
12,33*	1,558	0,187	0
13 [†]	1,645	0,216	0
13,67 [†]	1,221	0,157	0
14,33 [†]	0,996	0	0
15 [†]	1,373	0	0

Nota: * Depois da indução; [†] Depois da indução e do pulso de glicerol

A fase de indução foi iniciada após cerca de 11 horas de cultivo, momento em que o mesmo apresentava um $C_x = 10,8$ gMS/L. Antes da indução foi registrada uma produção específica de proteína de cerca de 38 ± 8 mg/gMS. A produção de proteína antes da indução (“escape”) já era esperada, tendo em vista que o meio continha apenas glicerol como fonte de carbono, que não é capaz de desempenhar o papel de repressor do operon *lac*, como ocorre com a glicose. Após a indução, o acúmulo de proteína apresentou um rápido crescimento, chegando ao valor final de 125 ± 10 mg/gMS. Não foi verificada a presença da proteína PspA na fração insolúvel da bactéria, indicando que a mesma não formou corpos de inclusão, apresentando-se sempre como proteína solúvel. A estabilidade do plasmídeo manteve-se alta durante toda a fase de indução, não sendo inferior a 90% em nenhuma amostra avaliada. Apesar disso, a contagem de UFC apresentou grande redução após a indução, passando de cerca de 2×10^{13} UFC/L até aproximadamente 2×10^{12} UFC/L logo após o pulso de glicerol. Essa redução pode estar associada ao estresse sofrido pela célula devido à indução, fazendo com que a mesma apresente uma capacidade limitada de se reproduzir, o

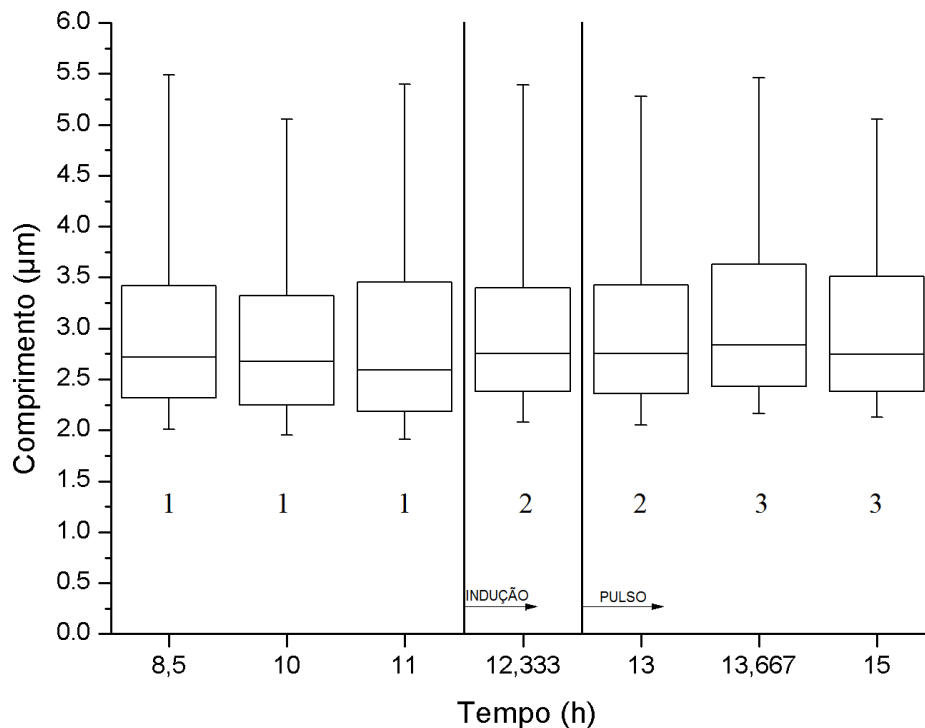
que pode indicar que parte da população celular tenha entrado em um estado de VBNC. Apesar de manter seu metabolismo, o que pode ser verificado pelo consumo da fonte de carbono, há uma diminuição na velocidade de crescimento após a indução, coincidente com a queda na contagem de UFC.

A Figura 4.1 mostra também que a reologia do caldo sofreu alterações com o decorrer do tempo. O caldo de cultivo comportou-se como um fluido newtoniano no início do cultivo, sendo que o parâmetro K (viscosidade) apresentou uma tendência de crescimento acompanhando o aumento da concentração. Contudo, ao atingir uma concentração celular de 6,6 gMS/L, a suspensão passou a apresentar um comportamento binghamiano, caracterizado pela presença dos parâmetros K (índice de consistência) e τ_0 (tensão de cisalhamento inicial). Esses parâmetros apresentam tendências distintas: o aumento gradual do índice de consistência continua acompanhando a concentração celular, como ocorria com a viscosidade, atingindo um valor máximo ao final do cultivo de 1,92 cP. Já a tensão inicial de cisalhamento possui uma tendência de crescimento até o momento da indução, atingindo o valor máximo em 0,532 Pa logo após a adição do IPTG, e então manteve-se relativamente constante até o final do cultivo.

A morfologia celular apresentou poucas mudanças com o transcorrer do cultivo. Apesar disso, estatisticamente, foram observados 3 momentos com diferenças populacionais significativas tanto em relação ao comprimento quanto ao volume celular. Ainda que sejam distintos, de forma geral, o comprimento das bactérias pouco variou durante a fase de crescimento ou durante a indução. Na Figura 4.2 é possível observar que a mediana do comprimento das bactérias manteve-se entre 2,5 μm e 2,75 μm em todos os pontos. Observa-se um leve aumento na posição do 5° percentil e do 1° quartil nos pontos após a indução, porém, não é possível identificar aumento na mediana, nem no 3° quartil ou no 95° percentil. Isso indica que houve uma pequena diminuição no número de bactérias com um menor comprimento sem que houvesse um aumento geral no comprimento das demais células da população. O 95° percentil, que indica o comprimento mínimo alcançado pelo grupo formado pelas maiores células, oscilou sempre entre 5 μm e 5,5 μm , ainda assim, essa variação não representa uma resposta direta à indução nem mostra uma tendência clara durante o cultivo. O pulso com a fonte de carbono (glicerol) realizado durante a fase de indução não causou mudanças expressivas que indicassem um aumento no comprimento geral da população, nem a diminuição no número de bactérias situadas nos extremos de comprimento, ainda que o acompanhamento do cultivo manteve-se apenas por mais cerca de

duas horas após a realização deste pulso, tempo inferior ao necessário para a verificação de mudanças mais significativas, como será mostrado na descrição dos demais experimentos.

Figura 4.2. - Distribuição do comprimento celular no Cultivo 1 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).

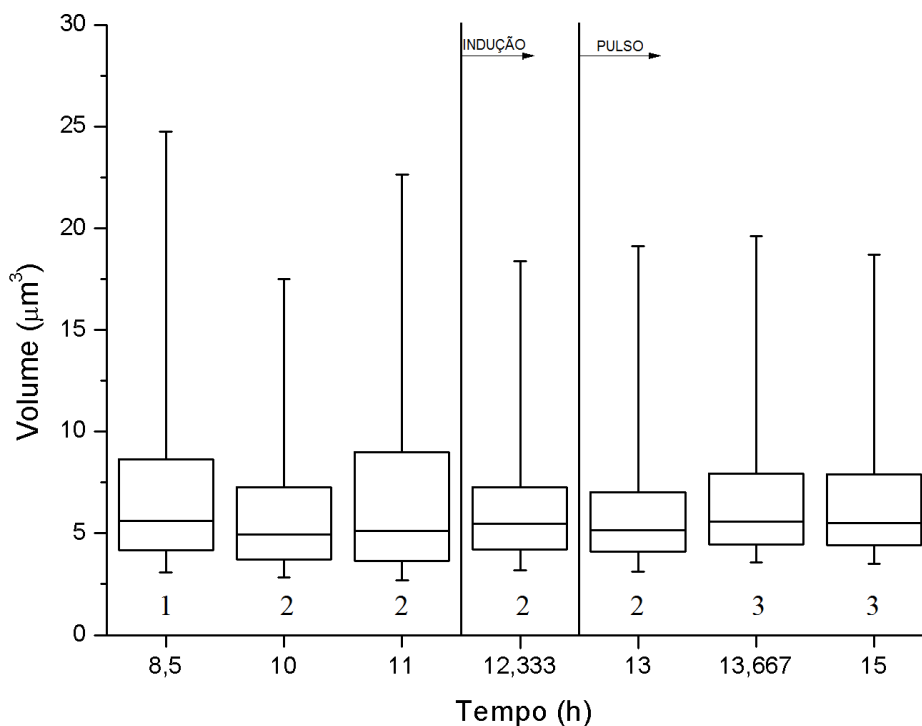


Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

O volume das bactérias acompanhou as mesmas tendências observadas nas medidas de comprimento celular, porém apresentou diferenças mais acentuadas em alguns aspectos. Na Figura 4.3 é possível observar que a mediana do volume de todas as amostras manteve-se sempre entre $5 \mu\text{m}^3$ e $6 \mu\text{m}^3$. Novamente observou-se uma tendência de aumento na posição do 5º percentil e do 1º quartil após a indução, reforçando a observação na diminuição do número de indivíduos de menor tamanho e volume. As amostras após a

indução apresentam também uma diminuição na posição do 3º quartil e do 95º percentil se comparado com o que é observado nos momentos antes da indução (excetuando-se a amostra 10 h, que apresenta padrão semelhante ao das amostras após a indução). As marcas do 3º quartil das amostras 8,5 h e 11 h apresentaram-se sempre superiores a $8,5 \mu\text{m}^3$, enquanto as amostras após a indução variam entre $7 \mu\text{m}^3$ e $8 \mu\text{m}^3$. Uma queda ainda mais acentuada no 95º percentil é observada na comparação entre os dois momentos do cultivo, sendo que os valores superiores a $22,5 \mu\text{m}^3$ encontrados antes da indução (excetuando a amostra 10 h) tornam-se inferiores a $20 \mu\text{m}^3$ depois da indução. Assim, apesar de pouco afetar o comprimento celular, a indução levou a uma diminuição da distribuição de volumes celulares, refletindo na diminuição do número de indivíduos com volumes muito grandes e muito pequenos se comparados à mediana.

Figura 4.3. - Distribuição do volume celular no Cultivo 1 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 37°C).



Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras

imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

Como mostra o Quadro 4.1, o Cultivo 1 apresentou as condições mais extremas de metabolismo e crescimento (37°C), e de indução (IPTG como indutor). A produção de proteína foi intensa e obteve-se o maior valor final entre os quatro cultivos, porém não se verificou mudança relevante no comprimento celular ligada a essa produção, enquanto o volume celular indicou a diminuição de organismos em condições extremas após a indução. A manutenção de todo o cultivo em pH baixo de 6,3 pode ter contribuído para uma intensificação ainda maior do estresse sofrido pelo microrganismo. Durante o cultivo houve a produção de ácidos orgânicos, ainda que os valores máximos obtidos não tenham sido altos. Contudo, a grande queda nos valores de UFC indica que o estresse sofrido foi intenso. O acompanhamento da reologia evidenciou a complexidade da suspensão celular através da verificação da mudança do comportamento reológico do caldo de cultivo e das diferentes tendências apresentadas pelos parâmetros reológicos.

4.1.2. Cultivo 2 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 37°C

O Cultivo 2 foi realizado com o microrganismo capaz de expressar a proteína PspA4Pro e ocorreu inteiramente a 37°C , sendo induzido com a adição de um pulso de lactose. A indução por lactose é considerada menos intensa do que a proporcionada pelo IPTG devido à sua assimilação gradual e pelo fato da lactose ser consumida como fonte de carbono pelo microrganismo. Desta forma, a duração da fase de indução precisou ser superior ao período da indução por IPTG, gerando um estresse diferenciado na bactéria, associado não só à produção da proteína recombinante, mas também ao longo tempo em que as células foram expostas às condições de indução, resultando em um esforço metabólico mais prolongado. A temperatura escolhida é aquela onde o metabolismo do microrganismo se apresenta de forma mais acelerada, levando a uma velocidade maior de crescimento e de expressão de proteína. Assim, esse ensaio teve como objetivo avaliar o cenário com potencial de desencadear um alto estresse metabólico na célula que perdurasse por um longo período de tempo.

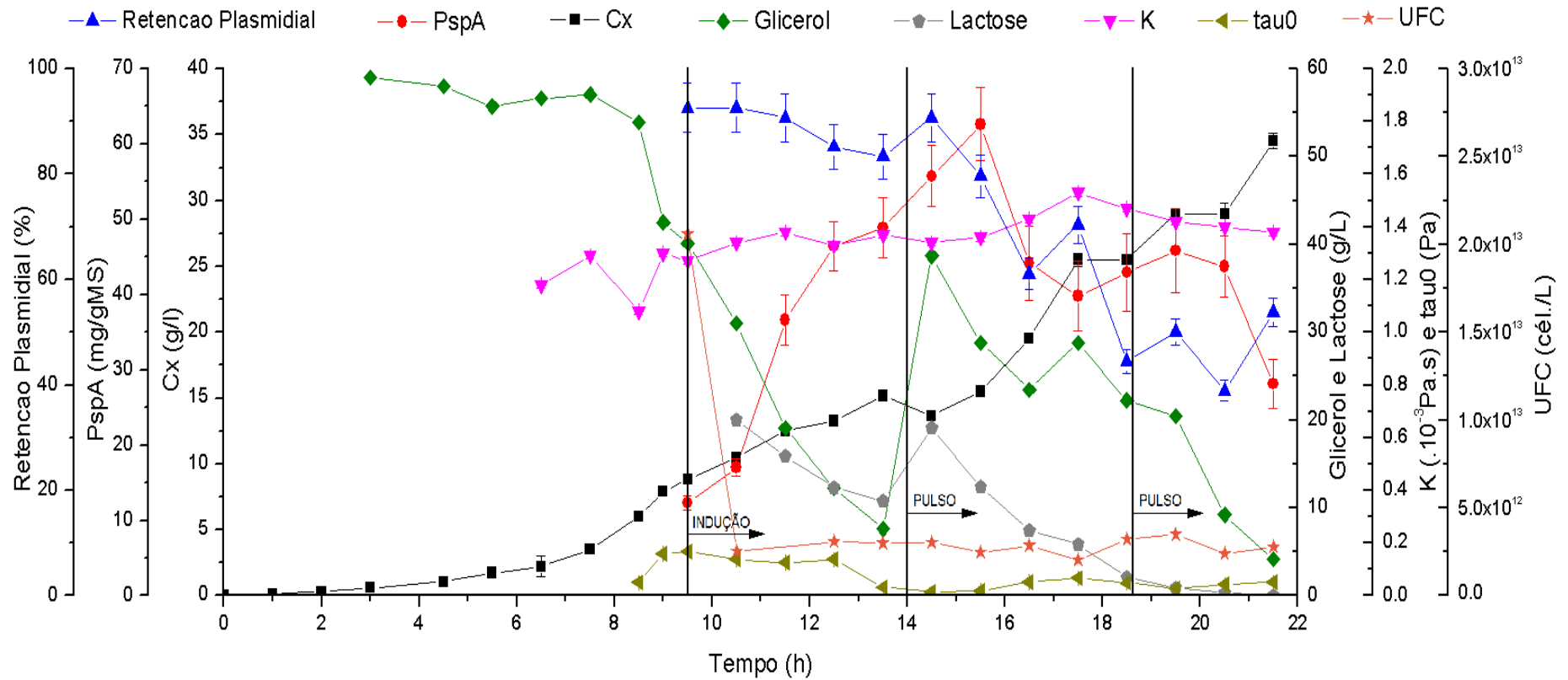
O ensaio foi realizado utilizando o meio descrito na Tabela 3.2. e as condições de operação do reator são as mesmas apresentadas Item 3.3.3. O cultivo teve início com a inoculação do reator, obtendo uma DO inicial igual a 0,173. A indução ocorreu com um pulso de 20 g/L de lactose (500 mL) após atingir-se uma DO = 24,5 e ter sido retirado cerca de 500

mL de caldo de cultivo para a manutenção do volume do reator. Após 4,5 h da indução, foi necessário a realização da suplementação da fonte de carbono através de um pulso contendo glicerol e lactose (250 mL) e por isso foram retirados cerca de 250 mL de caldo de cultivo novamente. Passadas aproximadamente 4,7 h do primeiro pulso, foi realizado um novo pulso levando a um aumento de 15 g/L de glicerol e 5 g/L de lactose (250 mL) no reator e a nova retirada de cerca de 250 mL de caldo de cultivo para a manutenção do volume do reator. O cultivo foi encerrado após 12 h de indução quando o mesmo alcançava $DO = 52,5$.

É possível observar na Figura 4.4 o comportamento de aumento da concentração celular (C_x) ao longo do tempo. O cultivo apresentou como fonte de carbono exclusiva 60 g/L de glicerol durante a fase de crescimento, permitindo o crescimento contínuo da bactéria, evidenciado pelo perfil exponencial do mesmo, atingindo um $\mu_{max} = 0,523 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$. Após a indução, observa-se que o crescimento celular não manteve o perfil exponencial, tornando-se mais lento. Contribuem para a queda na velocidade de crescimento a retirada de grandes alíquotas de caldo de cultivo, necessária para evitar o transbordamento do reator, já que o volume do pulso precisa ser maior devido à baixa solubilidade da lactose, e a própria adição do pulso, responsável por reduzir a concentração das células. Da mesma forma, a introdução de uma diferente fonte de carbono, responsável também pela indução da expressão da proteína de interesse pode ter influenciado a velocidade de crescimento.

A produção de ácidos orgânicos foi novamente observada ainda durante a fase de crescimento, devido a grande velocidade de duplicação celular e metabolismo acelerado do microrganismo decorrentes da temperatura de 37°C (Tabela 4.2). Durante essa fase foi detectada a produção de ácido acético e, principalmente, de ácido fórmico, não sendo detectada a produção de ácido láctico, etanol e ácido succínico, similar ao Cultivo 1. Durante a fase de indução acentuou-se a produção de ácido fórmico, porém, diferente do observado no Cultivo 1, acentuou-se também a produção de ácido acético, com valores muito mais expressivos do que os observados para o ácido fórmico, sendo também verificada a produção de ácido láctico em alguns momentos. Foram obtidos valores de concentração máxima de ácido fórmico de 0,76 g/L, ácido acético atingindo 4,3 g/L e ácido láctico alcançando até 1,4 g/L. A formação mais acentuada de ácido acético pode estar relacionada com a assimilação de glicose originada pela quebra da lactose. Apesar da produção de ácidos orgânicos durante a fase de indução, os ácidos acético e láctico foram consumidos e o ácido fórmico se volatilizou ou foi reassimilado antes do término do cultivo. Os valores máximos foram verificados cerca de 2 a 3 horas após a realização da indução pela adição da lactose, porém antes da realização dos pulsos para a complementação das fontes de carbono, como visto na Tabela 4.2.

Figura 4.4. - Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 2 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose, 37 °C).



Nota: As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de concentração celular, retenção plasmidial e produção de proteína em triplicata enquanto os parâmetros reológicos apresentam precisão de $\pm 1\%$ fornecida pelo equipamento. O parâmetro n manteve-se constante e igual a 1.

Tabela 4.2. – Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 2 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).

Tempo (h)	Ácidos orgânicos (g/L)		
	Ác. fórmico	Ác. acético	Ác. láctico
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4,5	0	0	0
5,5	0	0	0
6,5	0	0	0
7,5	0,145	0,035	0
8,5	0,262	0,052	0
9	0,35	0,214	0
9,5*	0,517	0,603	0
10,5*	0,757	1,959	0,638
11,5*	0,748	3,275	1,388
12,5*	0,537	4,302	0,667
13,5*	0,268	4,245	---
14,5 [†]	0,242	3,595	1,179
15,5 [†]	0,336	3,652	0
16,5 [†]	0,357	1,468	0
17,5 [†]	0	0,159	0
18,5 [†]	0	0	0
19,5 [§]	0	0	0
20,5 [§]	0	0	0
21,5 [§]	0	0	0

Nota: * Depois da indução; [†] Depois da indução e do pulso de lactose e glicerol; [§] Depois da indução e do segundo pulso de lactose e glicerol.

A fase de indução foi iniciada após cerca de 9,5 horas de cultivo, momento em que o cultivo apresentava um $C_x = 8,8$ gMS/L. A produção específica de proteína foi cerca de 12 ± 1 mg/gMS antes da indução e demorou entre uma e duas horas após a adição do pulso de lactose para começar a ter um aumento expressivo, a partir do qual manteve um crescimento constante, chegando ao valor máximo de 63 ± 5 mg/gMS, cinco horas após a indução. Após atingir o valor máximo a concentração de proteína caiu, oscilando entre 40 mg/gMS e 45 mg/gMS até quase o final do cultivo, encerrando o mesmo em 28 ± 3 mg/gMS, ainda que a concentração de lactose só tenha zerado totalmente na amostra final do cultivo. A estabilidade do plasmídeo manteve-se alta durante parte da fase de indução, concomitantemente com o

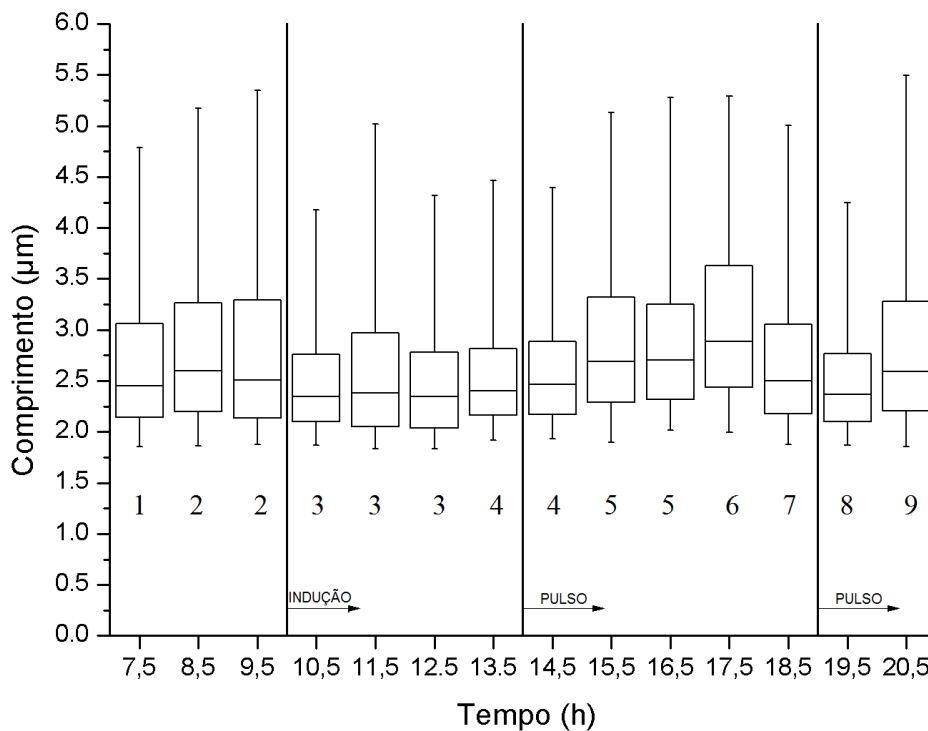
crescimento da produção da proteína e não sendo inferior a 80%. Contudo, decorridas 6 horas da indução, a estabilidade plasmidial passou a diminuir, chegando a valores inferiores a 40% uma hora antes do término do cultivo. A queda mais acentuada na estabilidade plasmidial coincide com a queda na concentração de proteína. A contagem de UFC apresentou uma grande variação, alcançando cerca de 2×10^{13} UFC/L antes da indução, e passando a oscilar entre 2×10^{12} UFC/L e 3×10^{12} UFC/L após a indução, podendo indicar o estado de VBNC.

A Figura 4.4 mostra que a reologia do caldo novamente sofreu pequenas alterações com o decorrer do tempo. A suspensão comportou-se como um fluido newtoniano no início do cultivo, sendo que, novamente, o parâmetro K apresentou a tendência de crescimento acompanhando o aumento da concentração celular. Ao atingir a concentração celular de 6 gMS/L o caldo de cultivo passou a se comportar como fluido binghamiano. Desta vez, porém o comportamento dos parâmetros reológicos não foi evidente como no caso do Cultivo 1. O índice de consistência apresentou uma sutil tendência de crescimento, chegando a um valor máximo de 1,53 cP sete horas após a indução, voltando então a cair, terminando o cultivo em 1,38 cP. A tensão de cisalhamento inicial atingiu seu máximo no momento da indução, alcançando um valor de 0,167 Pa, consideravelmente inferior ao alcançado no Cultivo 1, e manteve-se em valores próximos a 0,130 Pa por cerca de 3 horas após a indução. Após esse período, o caldo de cultivo passou a apresentar um τ_0 ainda menor, oscilando em um patamar sempre inferior a 0,070 Pa.

A morfologia celular passou por várias mudanças durante o cultivo, apresentando vários momentos com diferenças estatisticamente significativas. Os comprimentos variaram bastante, sendo possível observar tendências distintas de aumento e diminuição no tamanho celular da população e que podem estar associados aos momentos de indução e dos pulsos de fontes de carbono. Na Figura 4.5 é possível observar que, apesar de estatisticamente diferentes entre si, as três primeiras amostras são parecidas com as amostras iniciais obtidas no Cultivo 1, com medianas próximas a 2,5 μm . Destaca-se também a semelhança do 3° quartil, variando entre 3 μm e 3,25 μm , próximo ao observado no Cultivo 1, e o 95° percentil com valores oscilando entre 4,75 μm e 5,25 μm . Todavia, podemos perceber uma grande mudança no comprimento das células após a indução, com a introdução da lactose como fonte de carbono. As cinco amostras obtidas após a indução mostram que as medianas passam a ser inferiores a 2,5 μm , os valores do 3° quartil tornam-se sempre inferiores a 3 μm enquanto os valores do 95° percentil passam a oscilar entre 4 μm e 4,5 μm (excetuando a amostra de 11,5 h de cultivo, que alcançou 5 μm). Essa queda evidencia que a

introdução da lactose provoca uma diminuição no número de indivíduos da população com um comprimento maior. O esgotamento das fontes de carbono levou à necessidade de um pulso contendo tanto glicerol (30g/L) quanto lactose (10 g/L) às 14 h do cultivo. Apesar de nenhum efeito ser percebido na amostra retirada 30 minutos após a realização do pulso, as três amostras seguintes (15,5 h, 16,5 h e 17,5 h) já mostram a recuperação na quantidade de indivíduos maiores, observando-se um sutil aumento nos valores do 1° quartil, alcançando valor superior a 2,25 μm , medianas próximas a 2,75 μm , o 3° quartil superior a 3,25 μm e o 95° percentil superior a 5 μm . As duas amostras seguintes mostram uma tendência de nova queda no número de indivíduos maiores, alcançando, na amostra de 19,5 h, valores semelhantes aos obtidos logo após a indução do cultivo. Porém, menos de uma hora antes desta amostra houve a necessidade de um novo pulso de glicerol e lactose o que se refletiu em um novo aumento no número de bactérias de maior comprimento na última amostra, com valores semelhantes aos obtidos logo após o primeiro pulso.

Figura 4.5. - Distribuição do comprimento celular no Cultivo 2 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).

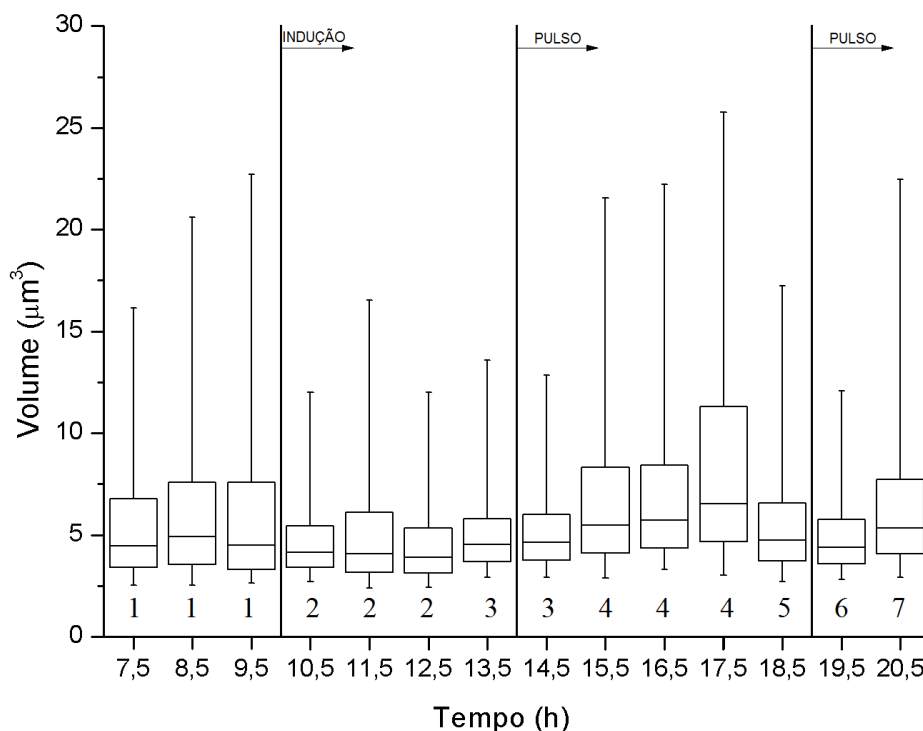


Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as

constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

O volume celular passou por mudanças semelhantes as observadas no comportamento do comprimento celular, porém de forma mais acentuada, como pode ser visto na Figura 4.6. Semelhante ao Cultivo 1, as amostras antes da indução possuem medianas próximas a $5 \mu\text{m}^3$ e valores para o 95° percentil bem acima de $15 \mu\text{m}^3$. Após a indução, porém, nas primeiras 5 amostras é perceptível a diminuição no número de indivíduos com grande volume, evidenciado pela diminuição do 95° percentil, apresentando apenas uma amostra superior a $13,5 \mu\text{m}^3$, e da passagem do 3° quartil de $7,5 \mu\text{m}^3$ (antes da indução) para no máximo $6 \mu\text{m}^3$ (depois da indução).

Figura 4.6. - Distribuição do volume celular no Cultivo 2 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 37°C).



Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as

constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

Uma tendência de retomada no número de indivíduos de maior volume começa a ser perceptível na amostra de 15,5 h (1,5 h após a realização do pulso contendo glicerol e lactose) que coincide com o momento de maior concentração da PspA. Deste momento em diante há uma queda na produção da proteína, estabilidade plasmidial e presença de mais indivíduos de maior volume celular. A mediana, que havia alcançado o menor valor em 12,5 h ($4 \mu\text{m}^3$), alcança $6,5 \mu\text{m}^3$ em 17,5 h, momento com maior número de indivíduos de maior volume. Neste ponto, o 3º quartil atinge $11,25 \mu\text{m}^3$ e o 95º chega a quase $26 \mu\text{m}^3$. Depois de passar por este máximo, o volume celular apresenta uma queda e, na amostra 19,5 h, volta a valores comparáveis aos obtidos logo após a indução, onde seu 3º quartil alcança apenas $5,75 \mu\text{m}^3$ (quase a metade do valor encontrado para a amostra colhida 2 horas antes). Por fim, a última amostra mostra um novo crescimento no número de indivíduos com maior volume. É perceptível que o padrão de crescimento observado nas duas amostras retiradas logo após o primeiro pulso (14,5 h e 15,5 h) é semelhante ao das duas amostras retiradas após o segundo pulso (19,5 h e 20,5 h).

O Cultivo 2 apresentou condições extremas de metabolismo e crescimento (37°C), e de estresse associado a uma indução mais branda, porém de duração mais longa (lactose como indutor). A produção de proteína foi menor se comparada com os cultivos induzidos com IPTG (Quadro 4.1), porém foi possível verificar novamente a ocorrência de uma grande queda nos valores de estabilidade do plasmídeo e de concentração de células cultiváveis. Além disso, durante o cultivo foi observada produção maior de ácidos orgânicos, ainda que estes tenham sido assimilados novamente até o fim do cultivo. O acompanhamento da reologia indicou novamente mudança no comportamento reológico do caldo de cultivo, porém os parâmetros reológicos apresentaram variações bem menores após a indução do que havia sido verificado no Cultivo 1. A morfologia, contudo, apresentou mudanças mais evidentes, ligadas às mudanças na composição do meio (pela adição da lactose como fonte de carbono) e à mudanças fisiológicas relacionadas a expressão da proteína recombinante. Essas mudanças ocorreram com aumento e diminuição do número de indivíduos mais alongados e

mais volumosos na população e são concomitantes com os momentos de indução e de pulso das fontes de carbono.

4.1.3. Cultivo 3 – *rE. coli* sem inserto com pulso de lactose a 37°C

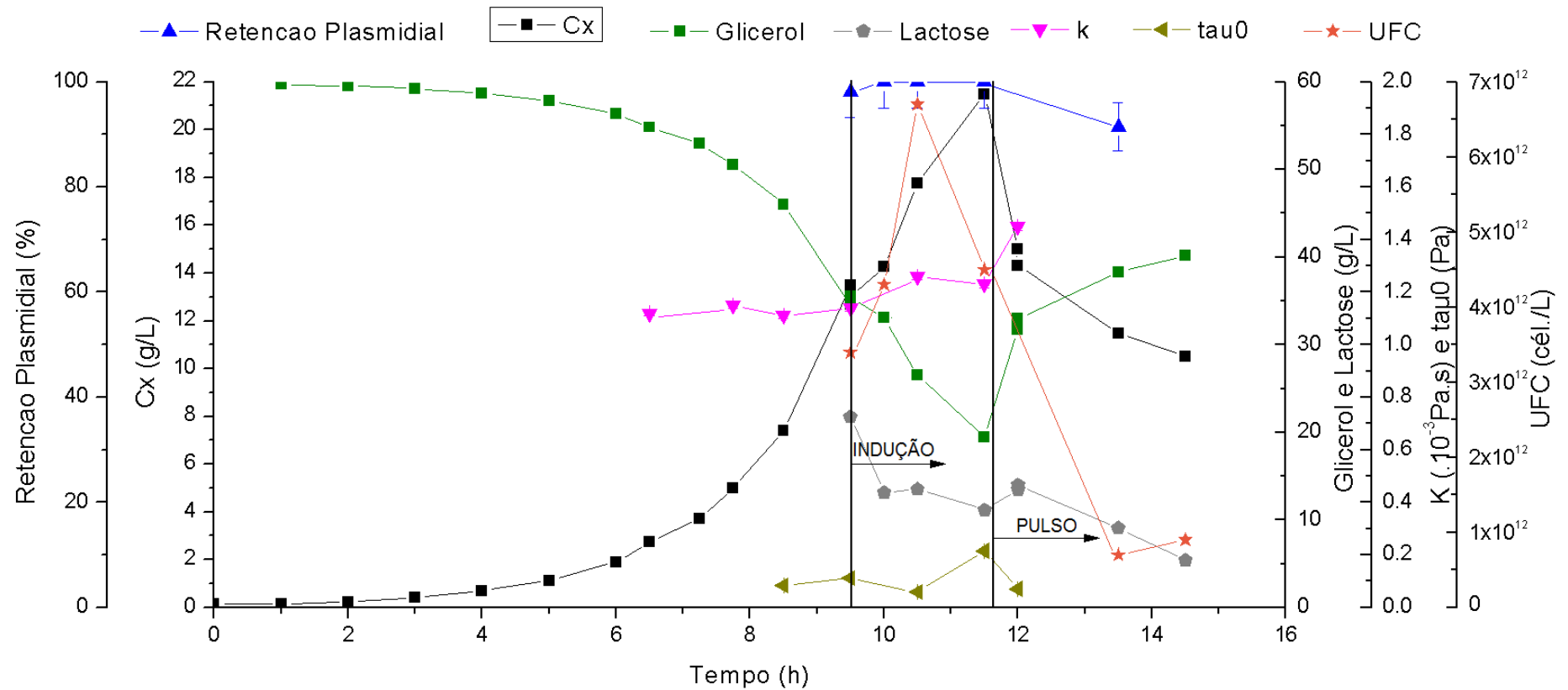
O Cultivo 3 foi realizado com o microrganismo sem o inserto e portanto, sem produção da proteína PspA. O cultivo foi conduzido a 37°C (fases de crescimento e indução), com a adição de um pulso de lactose. Apesar de não ocorrer a síntese da proteína PspA, a presença do plasmídeo leva à expressão dos genes das outras proteínas codificados no vetor (*lacI* e *Kan*), o que demanda certo esforço metabólico. A adição de lactose leva à indução do operon *lac* presente no cromossomo da bactéria, provocando a expressão das proteínas naturalmente constituintes deste operon e também da T7 RNA polimerase, aumentando a carga metabólica de expressão de proteínas pela célula. Apesar disso, ambas sobrecargas também ocorrem no clone com inserto e, portanto, o grau de estresse gerado nesta condição (linhagem sem inserto) deveria ser semelhante ao observado nas células não induzidas da linhagem que possui o inserto, sendo bastante inferior àquele sentido pelo clone que expressa a PspA. Novamente a escolha da temperatura favorece o metabolismo acelerado, levando a um crescimento mais rápido. Já a escolha da lactose como indutor se baseia no fato da mesma também ser consumida como fonte de carbono pela bactéria. O cultivo 3 teve como objetivo avaliar o efeito da mudança da fonte de carbono sobre a morfologia celular e a reologia, de forma que essa análise pudesse ser feita sem a interferência da produção da proteína heteróloga.

O ensaio foi realizado utilizando as mesmas condições do Cultivo 2, sendo o meio o descrito na Tabela 3.2., sob as condições de operação do reator apresentadas no Item 3.3.3. O cultivo se iniciou com a inoculação do reator, obtendo-se uma DO inicial igual a 0,297. A indução ocorreu com um pulso de 20 g/L de lactose após atingir-se uma DO = 29,5, antecedida por uma retirada de cerca de 250 mL de caldo de cultivo para a manutenção do volume do reator dentro do limite operacional. Após 2 h da indução, foi necessário suplementar o cultivo com fonte de carbono por meio de um pulso contendo 30 g/L de glicerol e 10 g/L de lactose, o qual foi antecedido por nova retirada de cerca de 500 mL de caldo de cultivo. O cultivo foi encerrado 5 h após a indução quando o mesmo possuía DO = 24, após ter entrado em fase de morte. A DO máxima atingida foi de 39,8 após 11,5 h de cultivo.

A Figura 4.7 mostra o perfil de crescimento apresentado pela bactéria, caracterizado por um $\mu_{\max} = 0,499 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ na fase exponencial. Após a indução, porém, foi observada uma rápida desaceleração do crescimento, que atingiu sua máxima concentração 2 h após a adição de lactose, logo antes da realização da suplementação da fonte de carbono com pulso contendo glicerol e lactose. A partir deste momento observa-se acentuada morte celular, não verificada em nenhum outro cultivo, e que pode ser explicada por alguma característica específica do clone. Apesar da utilização da mesma cepa para a construção do clone contendo o plasmídeo sem inserto, as células competentes utilizadas na transformação não foram as mesmas. As células competentes utilizadas para a preparação do clone sem inserto eram mais velhas que a originalmente usada para a preparação do clone que expressa a PspA4Pro, sendo que elas passaram muito tempo congeladas, assim o clone empregado no Cultivo 3 pode apresentar características diferentes (e inferiores) às apresentadas pelo clone utilizado nos outros cultivos. Desta forma, o clone sem inserto se mostrou muito mais sensível à mudança na fonte de carbono e à indução, fazendo com que a morte celular no Cultivo 3 fosse muito maior que a observada nos experimentos anteriores.

A produção de ácidos orgânicos começou a ser observada na fase de crescimento, associada ao metabolismo acelerado do microrganismo (Tabela 4.3). Foi observada novamente uma baixa produção tanto de ácido acético quanto ácido fórmico até o final da fase de crescimento. Durante a fase de indução houve o aumento na produção dos ácidos citados, sendo que a produção do ácido fórmico apresentou uma tendência de crescimento durante a maior parte da indução, alcançando o seu máximo em 2,39 g/L pouco antes do fim do cultivo. O mesmo foi observado para a produção de ácido acético, que alcançou seu máximo pouco antes, em uma concentração de 1,56 g/L. O ácido fórmico se volatilizou ou foi reabsorvido enquanto o ácido acético foi consumido, porém o cultivo se encerrou antes que a concentração de ambos se reduzisse a zero. Etanol e ácido succínico não foram detectados. A produção do ácido láctico se limitou a um momento intermediário do cultivo atingindo um valor máximo de 1,35 g/L, sendo rapidamente assimilado. Os valores máximos de concentração dos ácidos orgânicos ocorreram cerca de 2,5 a 3 horas após a realização da indução pela adição da lactose, como pode ser visto na Tabela 4.3.

Figura 4.7. - Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, reologia e UFC no Cultivo 3 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+ \emptyset induzido por lactose 37 °C).



Nota: As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de concentração celular e retenção plasmidial em triplicata enquanto os parâmetros reológicos apresentam precisão de $\pm 1\%$ fornecida pelo equipamento. O parâmetro n manteve-se constante e igual a 1.

Tabela 4.3. – Produção de ácido fórmico, ácido acético e ácido láctico no Cultivo 3 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose a 37°C).

Tempo (h)	Ácidos orgânicos (g/L)		
	Ác. fórmico	Ác. acético	Ác. láctico
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
6,5	0,116	0	0
7,25	0,116	0	0
7,75	0,156	0	0
8,5	0,172	0,168	0
9,5*	0,448	0,324	0
10*	0,388	0,644	0
10,5*	0,536	0,948	0,292
11,5*	1,676	1,56	1,328
12 [†]	1,568	1,56	1,352
12,5 [†]	2,388	1,364	0,992
13,5 [†]	1,564	0,524	0
14,5 [†]	1,1	0,576	0

Nota: * Depois da indução; [†] Depois da indução e do pulso de lactose e glicerol.

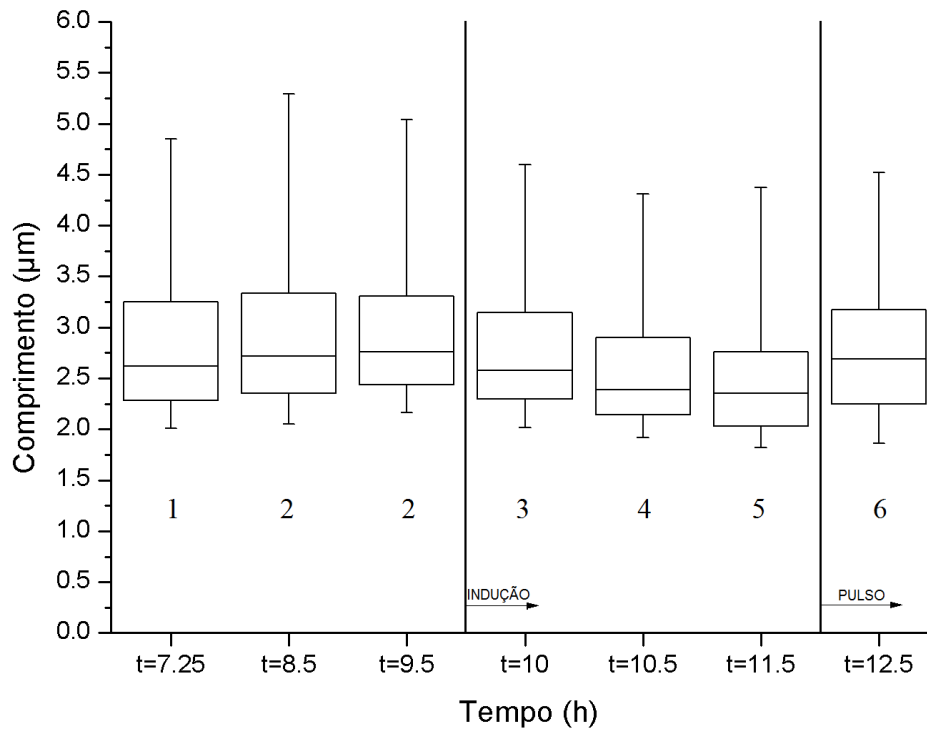
A indução com lactose foi iniciada após 9,5 horas de cultivo, quando a concentração celular era de 13 gMS/L. A análise de retenção plasmidial mostra que durante todo o cultivo a estabilidade do plasmídeo foi alta, mesmo durante o declínio da concentração celular, nunca atingindo valores inferiores a 90%. A contagem de células cultiváveis apresentou resultados diferentes dos anteriores, revelando que, mesmo antes da indução, o número de UFC era inferior aos obtidos nos cultivos anteriores, começando em cerca de 3×10^{12} UFC/L. Depois da indução houve uma tendência de crescimento, alcançando um máximo próximo a 7×10^{12} UFC/L, concomitante às maiores concentrações celulares. Após esse máximo, houve uma queda muito acentuada na contagem de UFC que acompanhou a diminuição da concentração celular. Desta forma, o cultivo terminou com uma contagem de apenas 9×10^{11} UFC/L.

A Figura 4.7 mostra que a evolução da reologia do caldo de Cultivo 3 foi semelhante a do Cultivo 2 e também apresentou alterações com o decorrer do tempo. A suspensão inicialmente se comportou como um fluido newtoniano, sendo que o parâmetro K apresentou uma pequena tendência de aumento acompanhando o crescimento da concentração celular. Ao atingir a concentração celular de 7,4 gMS/L o caldo de cultivo já havia passado a se comportar como fluido binghamiano. Novamente, a tendência dos parâmetros reológicos foi pouco evidente, como ocorrido no Cultivo 2. O índice de consistência mostrou crescimento, chegando ao seu máximo de 1,45 cP após 2,5 h da indução. A tensão de cisalhamento inicial atingiu um pico no momento da indução, alcançando um valor de 0,113 Pa. Durante todo o cultivo, τ_0 manteve-se abaixo de 0,1 Pa, excetuando uma ocasião em que registrou o valor de 0,216 Pa, coincidindo com o único momento em que a tendência de crescimento do parâmetro K foi interrompida. Esse efeito pode ser explicado devido a grande ligação entre os parâmetros na equação geral do modelo, já que eles são obtidos apenas através do ajuste dessa equação aos dados experimentais.

A morfologia celular durante o Cultivo 3 passou novamente por mudanças que podem ser associadas à alteração na fonte de carbono. As mudanças de comprimento estatisticamente significativas durante o Cultivo 3 mostram tendências similares às observadas no Cultivo 2. Na Figura 4.8 é possível observar que, novamente, as amostras obtidas antes da indução são muito semelhantes entre si e muito próximas ao que tinha sido observado nos cultivos anteriores. De forma geral, as amostras da fase de crescimento apresentam o 1° quartil em torno de 2,25 μm , o 3° quartil superiores a 3,25 μm e o 95° percentil oscilando em torno de 5 μm . Após a indução, de maneira geral, é possível observar uma tendência de diminuição no comprimento da população de bactérias, havendo decréscimo de todas as regiões do *boxplot*. No ponto onde a população alcança menor comprimento global, duas horas após a indução, podemos encontrar o 1° quartil com um comprimento de 2 μm , a mediana com valor de 2,25 μm , semelhante ao que era encontrado no 1° quartil das amostras anteriores a indução. O 3° quartil da amostra de duas horas após a indução se assemelha aos valores das medianas dos pontos anteriores a indução, com valor próximo a 2,75 μm , e por fim, seu 95° percentil é inferior a 4,5 μm . Logo após a retirada desta amostra foi aplicado pulso contendo glicerol e lactose, o que acabou refletindo na retomada do crescimento da população cerca de uma hora depois. O deslocamento do *boxplot* é evidente entre a amostra de 11,5 h e 12,5 h, destacando-se que o 1° quartil da amostra 12,5 h

e sua mediana correspondem ao comprimento da mediana e do 3° quartil da amostra de 11,5 h, aproximadamente 2,25 μm e 2,75 μm respectivamente.

Figura 4.8. - Distribuição do comprimento celular no Cultivo 3 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+ \emptyset induzido por lactose a 37°C).

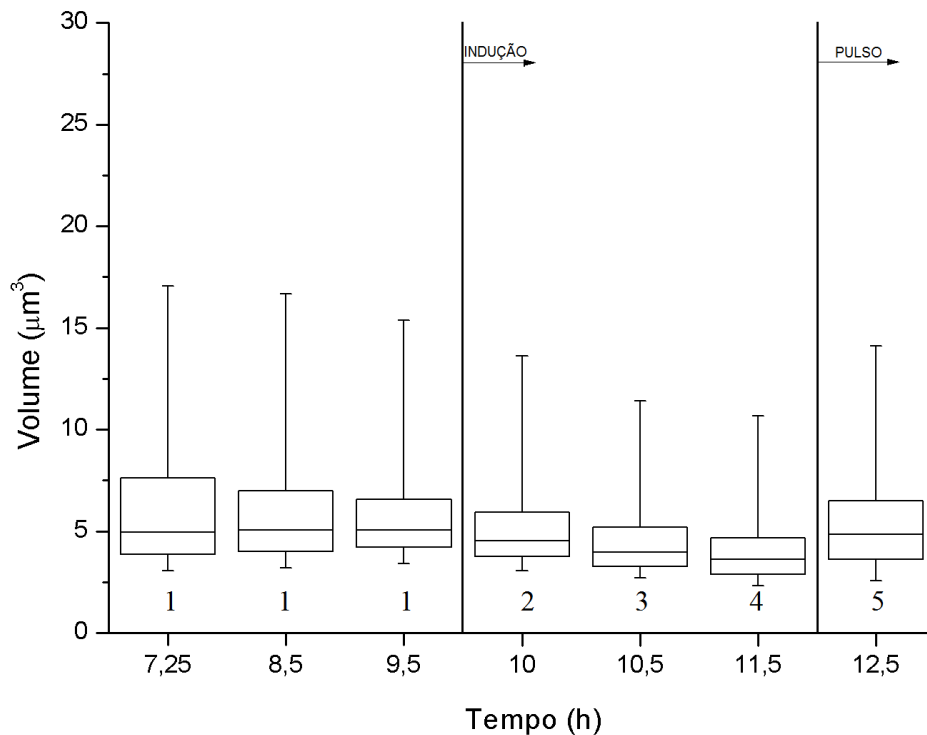


Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

As mudanças observadas no volume celular mostram a tendência de diminuição do volume celular durante grande parte do cultivo. É possível observar na Figura 4.9 que, apesar de estatisticamente semelhantes, as amostras antes da indução apresentam uma pequena e contínua redução no número de indivíduos de maior volume, destacando-se a diminuição do valor do 95° percentil e do 3° quartil, sem que, no entanto, haja mudança na mediana, que permanece em 5 μm^3 . Após a indução, essa tendência se acentua e passa a

ocorrer em todos os elementos do *boxplot*, culminando na amostra 11,5 h, na qual a mediana alcança apenas $3,75 \mu\text{m}^3$, inferior ao 1° quartil das amostras antes da indução, e seu 3° quartil alcançando $4,75 \mu\text{m}^3$, inferior à mediana das amostras anteriores a indução. A diminuição tanto no comprimento quanto no volume das bactérias expostas à lactose é estatisticamente significativa em ambos os casos. Por fim, a realização do pulso contendo glicerol e lactose eleva novamente os valores de todos os elementos do *boxplot* voltando a um patamar comparável, mas levemente inferior, ao que havia antes da indução.

Figura 4.9. - Distribuição do volume celular no Cultivo 3 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+ Ø induzido por lactose a 37°C).



Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

O Cultivo 3 foi realizado nas condições que favorecem o máximo crescimento celular (37°C), aplicados em um clone transformado com o plasmídeo pET37b+, porém sem conter o inserto que codifica a proteína de interesse (Quadro 4.1). O crescimento celular foi afetado pela mudança de fonte de carbono e, após atingir um ponto de máximo de concentração celular, começou a apresentar intensa morte. Isso pode estar relacionado à escolha de célula competente com menor viabilidade no momento da transformação, à ocorrência de mutações devido a manutenção da cepa original em criotubo contendo meio complexo ou devido à geração dos clones em momentos diferentes, tornando a população progênie detentora de características diferentes das encontradas na cepa que expressa a PspA. Ficou evidenciado que a saúde celular do clone transformado para o Cultivo 3 era diferente do clone utilizado para os demais experimentos. O cultivo apresentou altos valores de estabilidade do plasmídeo e uma variação na contagem de UFC/mL compatível com as mudanças apresentadas pela concentração celular. A produção de ácidos orgânicos seguiu um padrão semelhante ao observado no Cultivo 2, porém as concentrações máximas alcançadas pelos ácidos orgânicos foram inferiores. A reologia do caldo de cultivo mostrou novamente a mudança do comportamento reológico e uma variação menos intensa dos parâmetros reológicos, como observado no cultivo anterior com lactose. Ainda assim, as tendências do parâmetro K de acompanhar a concentração celular e de τ_0 de atingir seu máximo durante ou logo após a indução, mantendo-se posteriormente estável ou até diminuindo, foram novamente verificadas. A ocorrência da mudança morfológica associada a diferentes fontes de carbono foi constatada em experimento sem produção de proteína, confirmando essa hipótese. A diminuição do comprimento e volume das bactérias foi generalizada na população, não ficando restrita à parcela da população de maior comprimento.

4.1.4. Cultivo 4 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 27°C

O Cultivo 4 foi realizado de forma muito semelhante ao Cultivo 1, com a célula produtora da proteína PspA4Pro e sendo induzido com a adição de um pulso de IPTG. Todavia, este cultivo ocorreu inteiramente a 27°C, permitindo um metabolismo menos acelerado e contribuindo para uma indução menos intensa. Devido ao metabolismo mais lento, o acompanhamento da fase de indução foi prolongado, aumentando o tempo de exposição da bactéria ao efeito tóxico do indutor, agregando o estresse associado à produção da proteína recombinante ao causado pela exposição mais demorada das células às condições de indução, ainda que isso tenha ocorrido a uma temperatura inferior. A temperatura escolhida

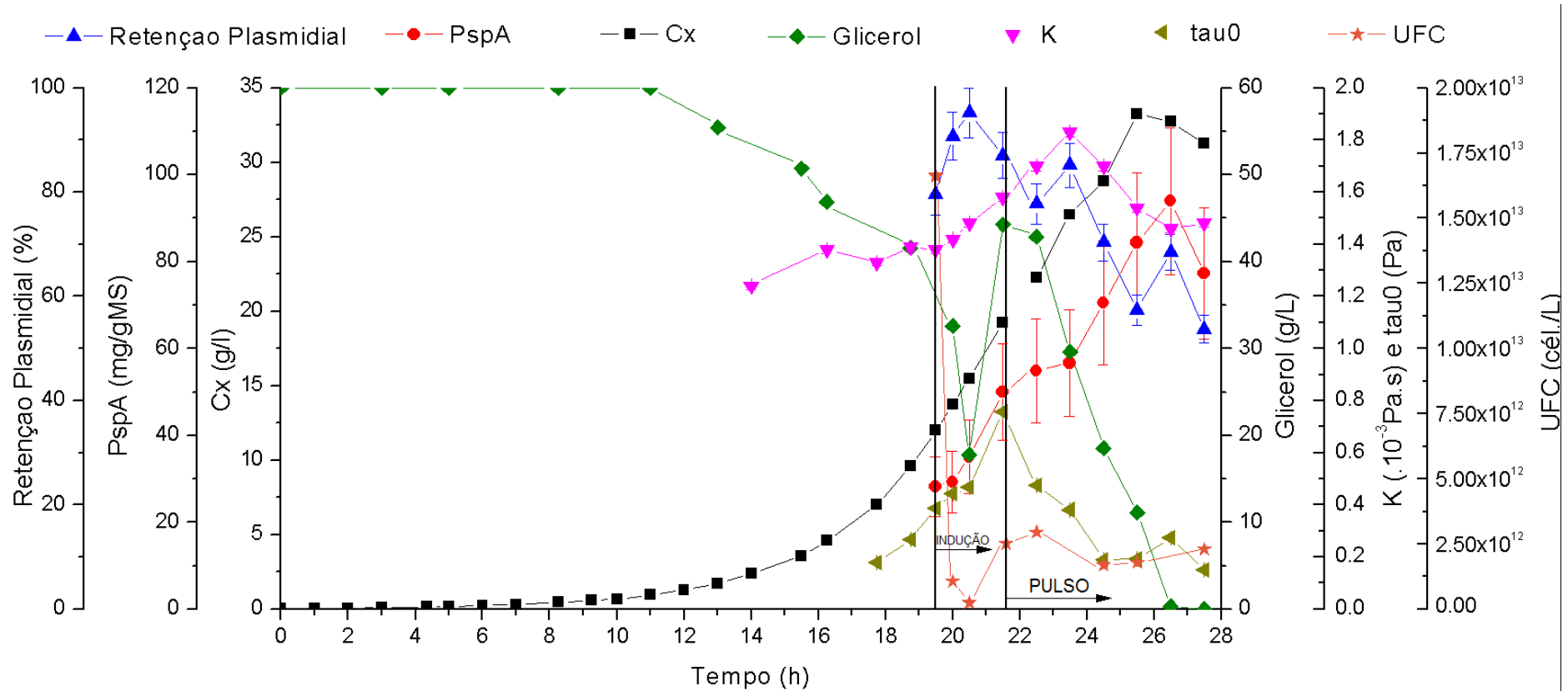
é 10°C inferior àquela usada nos cultivos anteriores de forma a reduzir aproximadamente à metade a velocidade de crescimento do microrganismo. Desta forma esse experimento pretendeu expor a bactéria a condições mais brandas de estresse metabólico associado ao crescimento enquanto a indução realizada por IPTG ocorreu por um maior período de tempo.

O ensaio foi realizado utilizando o mesmo meio descrito na Tabela 3.2., e as condições de operação do reator são as mesmas apresentadas no Item 3.3.3, com destaque para a temperatura de operação a 27°C. O cultivo teve início com a inoculação do reator, obtendo uma DO inicial igual a 0,146. A indução ocorreu com um pulso de 1 mM de IPTG após atingir-se uma DO = 24,5, e após 2 h foi necessária a realização da suplementação da fonte de carbono através de um pulso que promoveu um aumento de 30 g/L de glicerol no reator, precedida pela retirada de 250 mL de caldo de cultivo para evitar o transbordamento do reator. O cultivo foi encerrado 8 h após a indução quando o mesmo alcançou DO = 75,2.

A Figura 4.10 apresenta, entre outros, os dados do crescimento celular (C_x). No cultivo foi usado como fonte de carbono apenas glicerol, em uma concentração de 60 g/L no início da fase de crescimento. Observa-se o perfil exponencial de aumento da concentração celular com o passar do tempo, caracterizado por $\mu_{\max} = 0,281 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, aproximadamente metade dos valores de μ_{\max} observados nos ensaios a 37°C. Após a indução, pode-se observar que o crescimento celular manteve um perfil praticamente exponencial até que a concentração celular atingiu 33,3 gMS/L com 25,5 h de cultivo. O fim precoce da fonte de carbono acarretou o início da morte celular.

Devido à baixa temperatura, não ocorreu produção de ácidos orgânicos e etanol, e concentrações desprezíveis de ácido fórmico, ácido acético ou ácido láctico foram detectadas. A indução foi realizada após 19,5 horas de cultivo com a adição do indutor IPTG, quando a concentração celular atingiu 12 gMS/L. A produção específica de proteína antes da indução foi cerca de $28 \pm 7 \text{ mg/gMS}$ e o acúmulo de proteína se acentuou entre uma e duas horas após a indução, mantendo uma tendência de aumento relativamente constante. A produção específica de PspA chegou ao valor máximo de $94 \pm 17 \text{ mg/gMS}$, uma hora antes do término do cultivo, sofrendo uma posterior queda associada à morte celular causada pelo fim da fonte de carbono. A estabilidade do plasmídeo começou alta no início da indução, mantendo-se por quatro horas em valores superiores a 80%. Contudo, uma tendência de queda começou a se estabelecer ao longo da indução, levando o cultivo a terminar com uma estabilidade de 54%. A contagem de células cultiváveis apresentou variação como nos demais cultivos com expressão de proteína, interpretada como a entrada no estado de VBNC, saindo de um valor de $1,7 \times 10^{13} \text{ UFC/L}$ antes da indução, passando a oscilar entre $3 \times 10^{11} \text{ UFC/L}$ e $3 \times 10^{12} \text{ UFC/L}$ após a indução.

Figura 4.10. - Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 4 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG, 27°C).



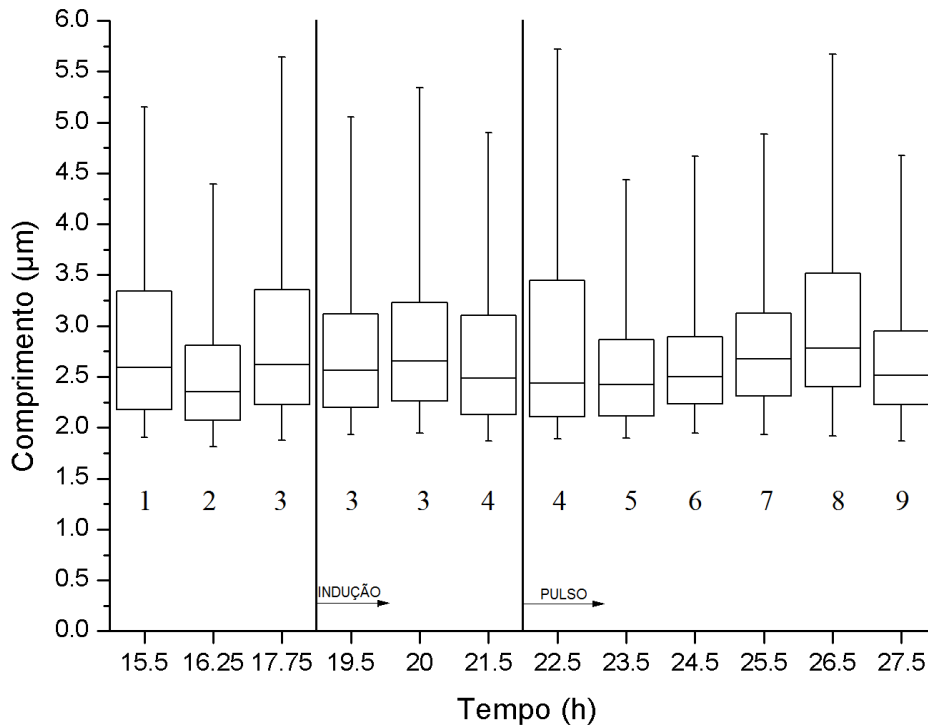
Nota: As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de concentração celular, retenção plasmidial e produção de proteína em triplicata enquanto os parâmetros reológicos apresentam precisão de $\pm 1\%$ fornecida pelo equipamento. O parâmetro n manteve-se constante e igual a 1.

A Figura 4.10 mostra uma diminuição inesperada nos valores do K na parte final do cultivo. Mais uma vez, a suspensão comportou-se como um fluido newtoniano no início e a viscosidade apresentou tendência de crescimento acompanhando a concentração celular. Ao atingir a concentração celular de 7 gMS/L o caldo passou a se comportar como um fluido binghamiano. O índice de consistência continuou a apresentar crescimento de forma a acompanhar o C_x , alcançando o valor máximo de 1,83 cP quatro horas após a indução, voltando então a cair, terminando o cultivo em 1,48 cP. A tensão de cisalhamento inicial apresentou um crescimento desde seu aparecimento até atingir seu máximo duas horas após indução, alcançando um valor de 0,757 Pa. Após atingir o máximo, τ_0 teve um recuo e, nas últimas horas do cultivo, ficou oscilando entre 0,275 Pa e 0,150 Pa.

A análise da morfologia celular mostrada na Figura 4.11 apresentou dados de difícil análise devido à grande variação observada nas amostras anteriores ao pulso de glicerol, sem que se possa observar, no entanto, tendências claras. Excetuando-se a amostra obtida após 16,25 h de cultivo, que aparentemente apresentou algum erro de análise, todas as demais amostras entre 15,5 h e 22,5 h de cultivo aparentam não sofrer grandes mudanças de comprimento. Os valores obtidos para as diferentes regiões do *boxplot* para as amostras anteriores ao pulso de fonte de carbono mostram que o 5° percentil, 1° quartil e mediana são muito similares aos obtidos nos demais cultivos antes da indução, alcançando cerca de 2 μm , 2,25 μm e 2,5 μm respectivamente. Os valores do 3° quartil e do 95° percentil já apresentam uma maior oscilação, ainda assim obtendo valores compatíveis com os obtidos antes da indução dos demais cultivos, alcançando variações entre 3 μm a 3,5 μm , e 4,75 μm a 5,75 μm , respectivamente. Mudanças mais consistentes aparecem a partir da amostra obtida após 23,5 h de cultivo, menos de duas horas após o pulso de glicerol. A partir dela é possível ver uma diminuição no número de bactérias com maior comprimento, trazendo os valores do 3° quartil e do 95° percentil para 2,75 μm e 4,5 μm respectivamente. Nas amostras seguintes, vemos uma tendência de crescimento para todas as regiões dos *boxplots*, excetuando o 5° percentil, sendo que essa tendência se mantém até quase o final do cultivo, onde a última amostra volta a ter uma pequena diminuição em todas as regiões do *boxplot*. A ausência de alterações e tendências antes e depois da indução reforça o fato de que o indutor IPTG não gera mudanças morfológicas intensas. A fase de mudanças mais evidentes no comprimento celular ocorre a partir da amostra 23,5 h, coincidindo com a fase final da indução, momento em que começa a ocorrer a redução na retenção do plasmídeo, diminuição do valor dos

parâmetros reológicos e estabilização da concentração celular e da concentração da proteína de interesse

Figura 4.11. - Distribuição do comprimento celular no Cultivo 4 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 27°C).

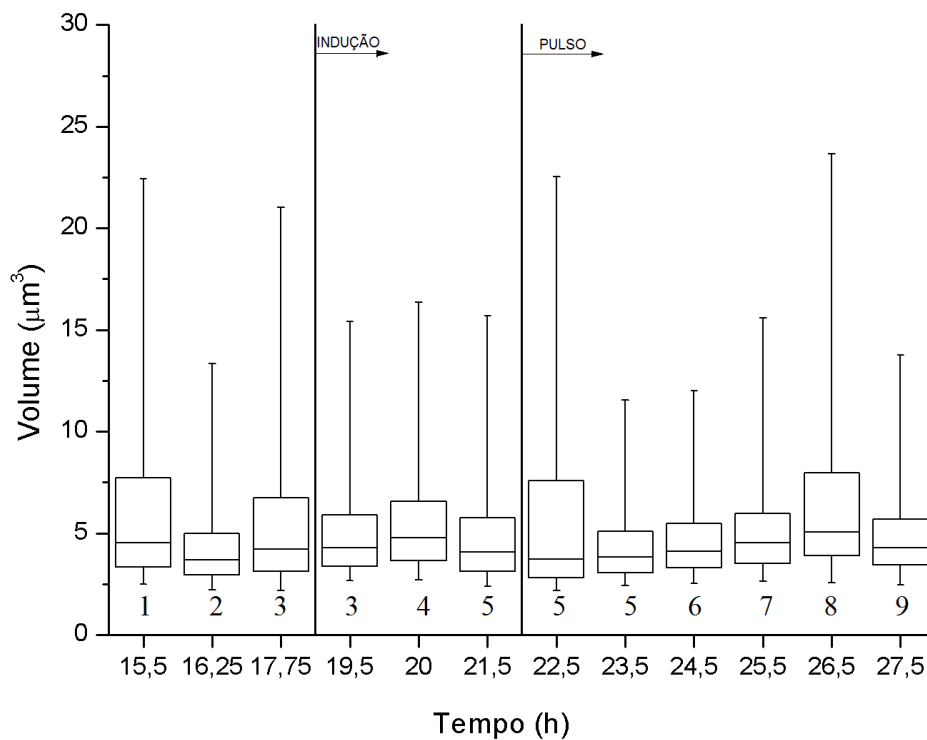


Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

O comportamento do volume celular foi muito similar ao comportamento encontrado no comprimento celular, como pode ser visto na Figura 4.12. Não há tendências evidentes nas primeiras sete amostras, e os valores dos elementos do *boxplot*, como a mediana e os quartis, apresentam certa oscilação. Tal qual visto na análise do comprimento celular, a partir da amostra 23,5 h há uma perceptível diminuição no número de indivíduos maiores, sendo que, neste ponto, o 95° percentil atinge seu menor valor (11,5 µm³). A tendência de

crescimento é observada em todos os elementos do *boxplot* das amostras, de forma que o valor obtido para o 3º quartil da amostra 23,5 h ($5 \mu\text{m}^3$) é igual a mediana da amostra retirada 3 horas depois, enquanto o 95º percentil dobra de valor. Por fim, a tendência de crescimento é interrompida na última amostra do cultivo.

Figura 4.12. - Distribuição do volume celular no Cultivo 4 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por IPTG a 27°C).



Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

O Cultivo 4 foi caracterizado por uma condição mais amena de crescimento (27°C), associada ao uso de IPTG como indutor, responsável por causar um estresse maior na bactéria. A produção de proteína foi inferior à obtida a 37°C (Quadro 4.1), mas novamente

apresentou-se praticamente constante enquanto houve a disponibilidade de fonte de carbono. A retenção plasmidial manteve-se alta durante parte da indução, mas verificou-se uma queda gradativa devido ao longo tempo de exposição do microrganismo ao indutor, já a queda nos valores da contagem de UFC repete o que foi verificado nos demais cultivos, provavelmente ligado ao estado de VBNC. A ausência da produção de ácidos orgânicos corrobora o fato de que a temperatura mais amena propicia um metabolismo celular mais lento, com assimilação completa e gradual do glicerol. A mudança observada no comportamento reológico foi mais intensa para ambos os parâmetros do modelo de fluido binghamiano, semelhante ao observado no Cultivo 1, também com IPTG. Entretanto, para o Cultivo 4, o tempo de resposta do τ_0 à indução foi maior, enquanto o K acabou sofrendo uma queda próximo ao fim do cultivo. Por fim, a morfologia novamente não sofreu mudanças relacionadas à indução com IPTG. Porém, o pulso de glicerol inicialmente gerou uma resposta de redução no número de indivíduos de maior comprimento e volume, que pode estar ligada a diminuição no número de células em processo de divisão celular e a mudanças nas condições fisiológicas das células.

4.1.5. Cultivo 5 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 27°C

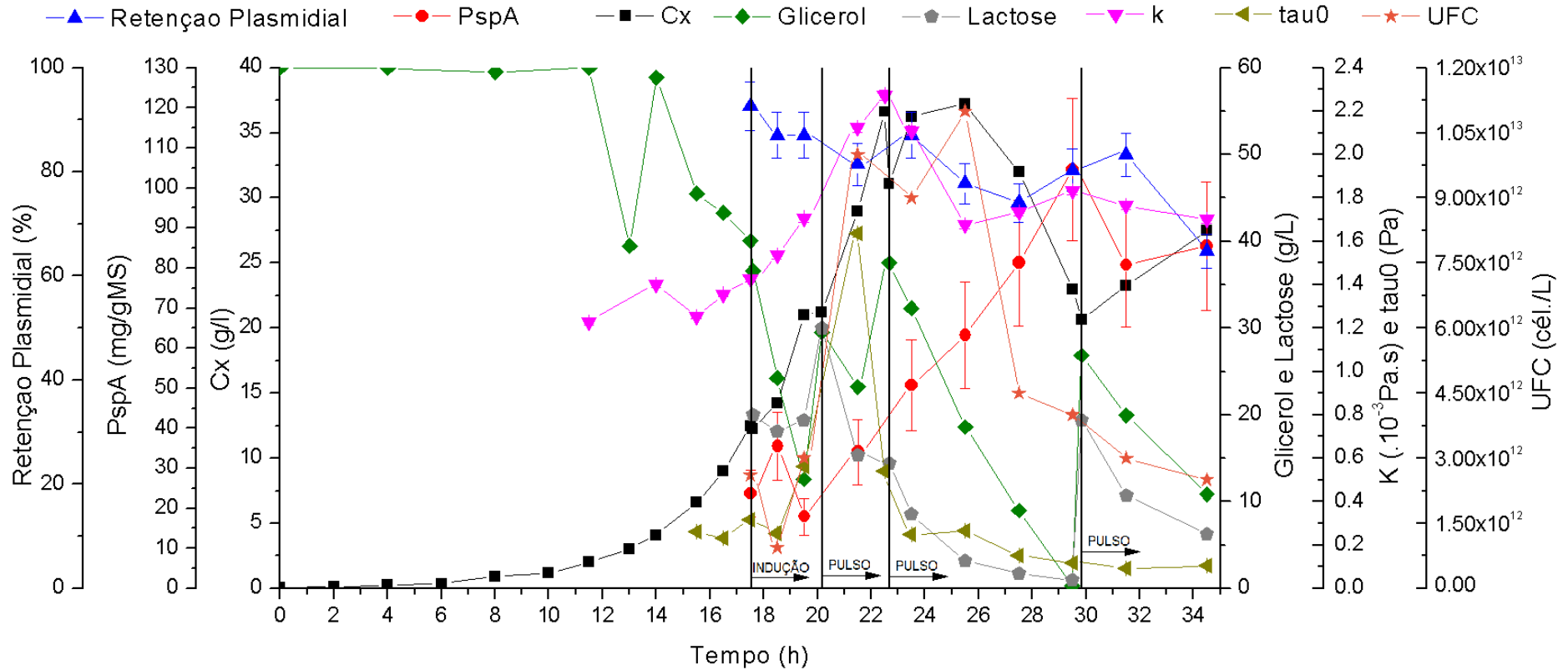
O Cultivo 5 foi realizado utilizando-se a cepa capaz de expressar a proteína recombinante PspA4Pro, sendo que, para isso, foi utilizada a lactose como indutor. A temperatura escolhida para todo o cultivo foi 27°C, de forma que o cultivo se assemelhasse ao Cultivo 2, porém permitindo que o metabolismo ocorresse de forma mais moderada. A esta temperatura, a velocidade de crescimento cai a cerca de metade do que é observado em cultivos semelhantes realizados a 37°C, por isso a duração da fase de indução foi estendida para que a produção de proteína pudesse ocorrer de forma apropriada. O prolongamento da fase de indução introduz uma carga metabólica mais prolongada, apesar de ser menos intensa pelo efeito da temperatura. Assim, o objetivo deste cultivo foi expor a bactéria a um menor estresse metabólico ligado ao crescimento da concentração celular enquanto a indução, realizada pela adição de lactose, se prolongasse por um maior período de tempo.

Para a realização deste experimento utilizou-se o meio definido descrito na Tabela 3.2 e o reator foi operado como descrito no Item 3.3.3, sendo que a temperatura adotada para o mesmo foi 27°C. O início do ensaio foi marcado pela inoculação do reator fazendo com que o mesmo atingisse a DO inicial igual a 0,167. Após a fase de crescimento, a indução se iniciou com a retirada de cerca de 500 mL do caldo de cultivo e a adição de um pulso de lactose igual a 20 g/L (500mL), sendo que, neste momento a DO = 31,2. Durante a

fase de indução houve a necessidade da realização de três pulsos de 250 mL contendo 30 g/L de glicerol e 10 g/L de lactose, sempre precedidos pela retirada de 250 mL do caldo de cultivo para a manutenção do volume do reator. Por fim, o cultivo foi encerrado após 17 horas de indução, sendo que a $DO = 75,4$.

Durante a fase de crescimento, a fonte de carbono disponível para o crescimento celular foi o glicerol, inicialmente em uma concentração de 60 g/L. A Figura 4.13 apresenta o perfil da concentração celular na fase de crescimento, seguindo um padrão exponencial caracterizado por um $\mu_{\max} = 0,294 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$. Durante a fase de indução, que se iniciou após 17,5 h de experimento, o crescimento continuou de forma acelerada, apesar de não apresentar mais o comportamento exponencial. O valor máximo de concentração celular foi alcançado na amostra de 25,5 h, onde o $C_x = 37,25 \text{ gMS/L}$. Nas quatro horas seguintes, porém, houve uma significativa queda da concentração celular, que alcançou o mínimo de 20,7 gMS/L, simultaneamente a uma breve falta de fontes de carbono, que haviam sido completamente consumidas. Nesse momento ocorreu o último dos pulsos de fonte de carbono supracitados, que levou a uma breve recuperação da concentração celular, que, na última amostra retirada antes do encerramento do experimento chegou a 27,5 gMS/L. A fase de indução se iniciou com a adição de lactose, que é um indutor de assimilação mais lenta. Associado a isso, os efeitos sobre a produção de proteína demoram mais a serem notados, principalmente quando em condições de crescimento mais brandas, como a temperatura de 27°C. O consumo inicial da lactose e a produção da PspA demoram ao menos duas horas para se tornarem perceptíveis. A partir da amostra de 19,5 h a produção de proteína começou uma grande fase de crescimento praticamente constante, culminando em uma produção específica de $105 \pm 15 \text{ mg/gMS}$, sofrendo em seguida uma pequena queda nas duas últimas amostras do experimento devido a uma momentânea falta de fonte de carbono. Destaca-se a ocorrência de um escape da produção de proteína antes da indução de $24 \pm 6 \text{ mg/gMS}$, similar ao encontrado no Cultivo 4. A estabilidade do plasmídeo manteve-se alta durante grande parte da fase de indução, apesar de apresentar algumas oscilações. A retenção manteve-se sempre maior do que 80% durante as primeiras seis horas de indução, período em que o crescimento celular ainda se mantinha positivo. Após esse momento, porém, começou a oscilar entre 80% e 70%, e, quando do encerramento do experimento, o mesmo alcançava apenas 65%. A contagem de UFC apresentou um resultado diferente do observado anteriormente, visto que a contagem continuou crescendo mesmo após o início da fase de indução, alcançando seu máximo de $1,1 \times 10^{13} \text{ UFC/L}$ no momento de maior da C_x . Após esse máximo, porém, a contagem sofre queda atingindo $2,5 \times 10^{12} \text{ UFC/L}$ no final do cultivo, talvez devido ao estado VBNC..

Figura 4.13. - Crescimento, fontes de carbono, retenção plasmidial, produção de proteína, reologia e UFC no Cultivo 5 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose, 27°C).



Nota: As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de concentração celular, retenção plasmidial e produção de proteína em triplicata enquanto os parâmetros reológicos apresentam precisão de $\pm 1\%$ fornecida pelo equipamento. O parâmetro n manteve-se constante e igual a 1.

Tabela 4.4. – Produção de ácido fórmico, ácido acético, ácido láctico, galactose, polissacarídeo e ácidos nucleicos no Cultivo 5 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).

Tempo (h)	Ácidos orgânicos (g/L)			Galactose		Polissacarídeo (g/L)	DNA/RNA (g/L)
	Ác. fórmico	Ác. acético	Ác. láctico	Interior cel. (mg/gMS)	Caldo de cultivo (g/L)		
0	0	0	0	0	0	---	---
2	0	0	0	0	0	---	---
4	0	0	0	0	0	---	---
6	0	0	0	0	0	---	---
8	0	0	0	0	0	---	---
10	0	0	0	0	0	---	---
11,5	0	0	0	0	0	4,503	0
13	0	0	0	0	0	7,092	0
14	0	0	0	0	0	6,379	0
15,5	0	0	0	0	0	12,310	0
16,5	0	0	0	0	0	21,950	0
17,5	0	0	0	0	0	---	0
17,6*	0	0	0	---	0,240	---	0
18,5*	0	0,052	0	6	0,160	0,556	0
19,5*	0	0,181	0	60	0,180	---	0,635
20,167†	0	0,608	0	---	0,800	---	0,285
21,5†	0	0,616	0	159	3,080	0,706	0,610
22,5†	---	---	---	---	---	---	---
22,667§	0	0,345	0,104	248	5,780	7,909	0,500
23,5§	0	0,382	0,093	253	7,360	6,258	0,525
25,5§	0	1,649	1,004	206	11,700	7,185	1,100
27,5§	0	1,965	2,062	161	15,000	3,677	1,020
29,5§	0	3,637	3,816	210	20,080	2,246	1,660
29,833#	0	2,866	3,404	---	17,300	---	1,120
31,5#	0	2,062	3,680	224	15,480	21,200	0,990
34,5#	0	1,627	4,448	103	20,180	26,610	1,245

Nota: * Depois da indução; † Depois da indução e do pulso de lactose e glicerol; § Depois da indução e do segundo pulso de lactose e glicerol; # Depois da indução e do terceiro pulso de lactose e glicerol; --- não houve medição.

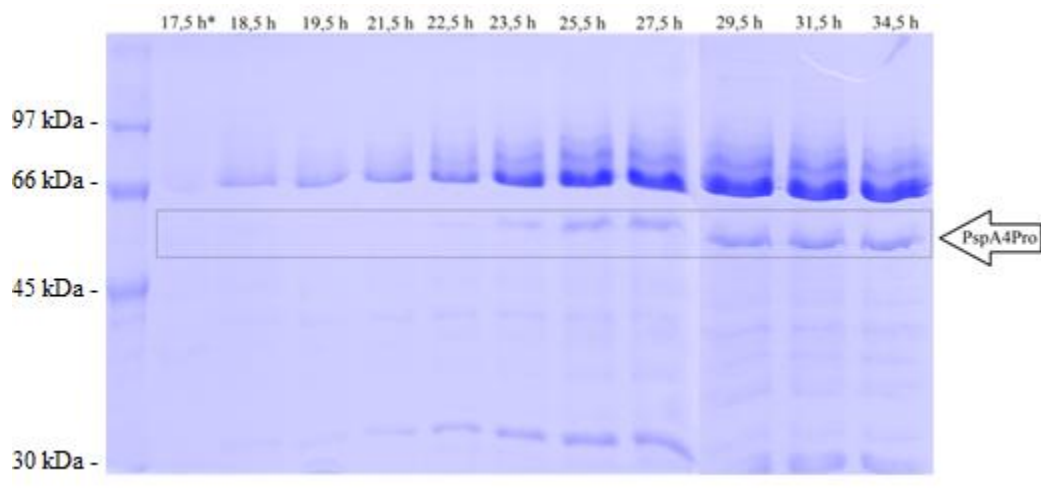
A produção de ácidos orgânicos foi desprezível durante a fase de crescimento, como pode ser visto na Tabela 4.4, devido à temperatura mais baixa adotada para o cultivo. Apesar de um metabolismo mais lento propiciar o não aparecimento de concentrações significativas de ácidos orgânicos, a presença da glicose liberada pela quebra da lactose

adicionada no momento da indução faz com que sejam observadas concentrações crescentes de ácido láctico, cujo máximo de 4,45 g/L foi atingido no fim do experimento, e de ácido acético, cujo máximo atingiu 3,64 g/L cinco horas antes do término do cultivo e então presenciou uma tendência de queda. Em nenhum momento do cultivo foi detectada quantidades significativas de ácido fórmico, etanol e ácido succínico. Foi realizado o acompanhamento da presença da galactose tanto no interior das células quanto no caldo de cultivo, sendo que foi detectado um acúmulo de até 253 mg/gMS de galactose no interior da célula seis horas após a indução. Como a galactose possui uma densidade de 1,7 g/L, maior que a densidade média de uma célula comum de *E. coli*, a qual é aproximadamente 1,105 g/mL (MARTÍNEZ-SALAS et al., 1981), ela contribui para um aumento na massa da célula, sem afetar diretamente a medida de DO, fazendo com que a relação Cx X DO seja afetada sempre que lactose é introduzida no meio como fonte de carbono. Realizou-se também a medição da concentração de polissacarídeo solúvel produzido pelas células. Essa medição, feita pelo método descrito no Item 3.2.10, o qual detecta a presença de pentoses e hexoses, as quais são constituintes do polissacarídeo, mas que também constituem a lactose e a galactose. A interferência causada pela presença da lactose e da galactose na medida da concentração de polissacarídeo é minimizada graças à medição da concentração dessas substâncias pelo método descrito no Item 3.2.5. Contudo, o acúmulo de erro das análises e das diluições necessárias faz com que haja diferença nas amostras obtidas antes e depois da indução. Antes da indução, a concentração de polissacarídeo apresentou crescimento alcançando quase 22 g/L, todavia, após a indução, sua concentração cai drasticamente, voltando a valores mais altos apenas nas duas últimas amostras, sendo a última, a maior, com 26,6 g/L. A análise de material genético no caldo de cultivo indicou sua presença a partir de duas horas após a indução tendo tendência de crescimento ao longo da fase de indução, sua maior concentração, 1,66 g/L, é detectada na amostra 29,5 h, coincidindo com a maior concentração de PspA nas células.

Amostras do sobrenadante do caldo de cultivo também foram analisadas para verificar a presença de proteína solúvel. Para isso, alíquotas foram analisadas através de um gel de poliacrilamida (12%) para a separação das proteínas, como descrito no Item 3.2.3. Na Figura 4.14 é possível observar a evolução da presença das proteínas solúveis no caldo. Antes da indução da produção da proteína de interesse, a presença de proteínas no caldo de cultivo é desprezível. Contudo, após a indução começam a aparecer bandas mais fortes de proteína solúvel, incluindo uma banda mais fraca, indicando a presença de uma proteína com aproximadamente 20 kDa e outra, mais forte, indicando a presença de uma proteína de um

pouco mais de 45 kDa. Além disso, é possível observar o aparecimento da banda indicativa da presença da PspA4Pro de 42,719 kDa (EXPASY, 2012). Tanto o aparecimento da PspA4Pro quanto a intensificação da banda próxima a 45 kDa ocorrem a partir de 25,5 h de cultivo, que coincide com o valor máximo da concentração celular e de UFC. A partir deste momento, a Figura 4.13 mostra a diminuição na concentração celular e na viabilidade celular decorrentes da exaustão do glicerol, assim como o aumento expressivo na concentração de ácidos nucleicos (Tabela 4.4) e na liberação de proteína para o meio (Figura 4.14), que pode indicar a ocorrência de lise celular. A Tabela 4.4 também mostra o aumento da concentração de ácidos orgânicos nessa fase do cultivo, o que provavelmente está relacionado à menor velocidade de reassimilação dos ácidos orgânicos produzidos em função da morte celular.

Figura 4.14. – Proteína solúvel presente no sobrenadante do caldo do Cultivo 5 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).



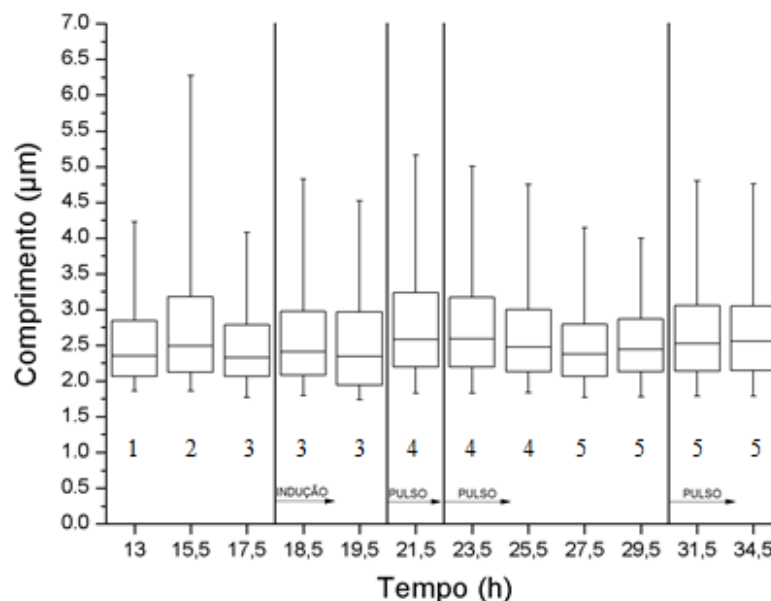
Nota: * Antes da indução.

A Figura 4.15 apresenta os resultados da análise da reologia, mostrando novamente que a suspensão se comportou como um fluido newtoniano no começo do experimento e assim se manteve nas duas primeiras amostras, sendo que o parâmetro K apresentou tendência de crescimento. Ao atingir a concentração celular de 6,6 g/L, porém, o fluido já apresentava um comportamento de fluido binghamiano, ainda que o parâmetro K continuasse a apresentar uma tendência de forte crescimento, alcançando seu valor mais alto após cinco horas de indução (2,28 cP). Depois de alcançar o ponto máximo, K tem uma queda e passa a oscilar num patamar entre 1,68 cP e 1,83 cP. O perfil visto para K e τ_0 é diferente do que foi observado nos demais cultivos induzidos por lactose, mas semelhante ao Cultivo 4,

que também foi a 27°C, mas induzido por IPTG. O τ_0 também apresentou comportamento de crescimento no começo da fase de comportamento como fluido binghamiano, até atingir um máximo de 1,638 Pa quatro horas após a indução (e uma hora antes de K atingir seu máximo). Após passar pelo máximo, τ_0 apresenta grande queda até atingir 0,103 Pa no fim do cultivo.

As amostras obtidas no Cultivo 5 apresentaram uma morfologia com poucas mudanças, durante as primeiras cinco amostras do experimento, sendo que em três amostras antes da indução, o comprimento oscilou sem apresentar tendência, como pode ser visto na Figura 4.15. O grande destaque foi a presença de um valor alto de bactérias com grande comprimento na amostra de 15,5 h sem motivo aparente, sendo que seu 95° percentil alcançou um valor de 6,25 mm, o maior entre todos os cultivos. Após a realização do primeiro e segundo pulsos contendo glicerol e lactose há um aumento no comprimento global das bactérias visto pelo deslocamento de todos os elementos do *boxplot* para valores maiores do que na amostra anterior. A mediana das amostras passou de 2,35 mm para 2,6 mm na amostra 21,5 h, enquanto seu 1° quartil chegou a 2,2 mm, ambas as maiores medidas para cada elemento nesse experimento. As amostras seguintes então mostraram uma tendência de diminuição no comprimento das bactérias, principalmente aquelas de maior comprimento, como, por exemplo, no 95° percentil, passando de 5 mm para 4 mm. Após o último, as bactérias recuperam novamente um padrão similar ao observado antes da indução.

Figura 4.15. - Distribuição do comprimento celular no Cultivo 5 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).

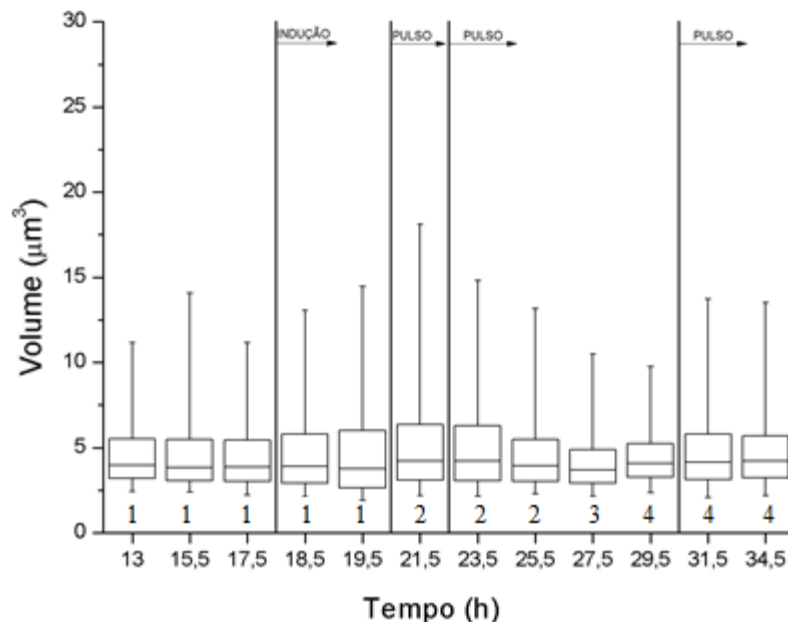


Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as

constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

A análise do volume celular evidenciou ainda mais as tendências observadas nas medidas de comprimento como pode ser visto na Figura 4.16. A análise estatística mostrou que as cinco primeiras amostras não apresentam mudanças estatisticamente significativas enquanto as medianas se mantiveram em $3,8 \mu\text{m}^3$. Na amostra 21,5 h, primeira após o primeiro pulso, há um pequeno aumento nas bactérias de maior volume e seu 95° percentil alcança $18 \mu\text{m}^3$. A partir deste momento há uma tendência de diminuição no volume das bactérias, com redução principalmente no número de bactérias maiores, já que o 95° percentil cai para menos de $10 \mu\text{m}^3$. Após esta queda e a realização do terceiro pulso de fonte de carbono, as células voltam ao volume similar ao observado antes do primeiro pulso.

Figura 4.16. - Distribuição do volume celular no Cultivo 5 (*E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro induzido por lactose a 27°C).



Nota: A avaliação da semelhança estatística das amostras deve ser feita comparando-se um determinado elemento apenas com os elementos imediatamente vizinhos ao mesmo, devido as constantes mudanças das condições durante o cultivo. Assim, os elementos foram numerados através de uma comparação entre dois elementos sequenciais de forma que duas amostras

imediatamente vizinhas com mesma numeração são estatisticamente semelhantes e duas amostras imediatamente vizinhas com numeração distinta são estatisticamente diferentes.

A realização do Cultivo 5 ocorreu de forma a expor o microrganismo a um crescimento mais brando causado pela temperatura de 27°C e usou a lactose para induzir a produção da proteína PsaA de forma mais amena. A produção de proteína foi comparável a obtida no Cultivo 4 (Quadro 4.1) e como tal ocorreu de forma mais gradativa durante um longo período de tempo, mas essa produção pode ter sido afetada por uma falta momentânea na disponibilidade de fonte de carbono após o pulso. A retenção do plasmídeo manteve-se alta no início da fase de indução, porém foi se reduzindo aos poucos devido ao longo período em que as bactérias estiveram expostas ao indutor. A contagem de UFC apresentou um resultado diferente do que foi visto na maioria dos demais experimentos, pois apresentou valores altos e crescentes durante a primeira metade da fase de indução. A ocorrência de uma contagem de UFC alta durante parte da indução e sua eventual queda pode evidenciar que os efeitos da indução na fisiologia da célula observados nos demais experimentos demoraram mais para ocorrer devido às condições de cultivo escolhidas mais amenas. O único experimento que teve um comportamento parecido foi o Cultivo 3, no qual foi usada a bactéria sem o inserto e houve adição de um pulso de lactose. A ausência de ácidos orgânicos na fase de crescimento foi similar ao que ocorreu no Cultivo 4 devido a temperatura mais baixa, porém a introdução da lactose como indutor levou a produção dos ácidos orgânicos durante a fase de indução. Observou-se a presença da galactose não metabolizada pela bactéria no sobrenadante do caldo de cultivo, porém ela também foi encontrada em altas concentrações no interior da célula, contribuindo para o seu aumento de massa durante a indução com lactose, fato verificado pela mudança da relação $Cx \times DO$. Foi possível detectar também a existência de diversas substâncias no sobrenadante do caldo de cultivo que foram produzidas pela bactéria, como material genético e, principalmente, polissacarídeo, que alcançou altas concentrações. Essa alta produção de polissacarídeo mostra que uma parte considerável do esforço metabólico e da fonte de carbono é direcionada para sua produção. A reologia do caldo mostrou a mesma mudança de comportamento reológico dos outros ensaios, sendo que a detecção da presença crescente de polissacarídeo associada com o crescimento da concentração celular pode explicar melhor porque o fluido deixa de ser newtoniano e passa a ter comportamento binghamiano no início da fase de crescimento. Após a indução, os parâmetros reológicos apresentaram crescimento e atingiram valores máximos entre quatro e cinco horas após início da indução, sendo que os valores foram maiores que os observados nos demais cultivos

induzidos por lactose. O perfil de variação dos parâmetros foi semelhante ao observado no Cultivo 4, feito a 27°C, induzido por IPTG, o que pode indicar que a resposta reológica também pode estar ligada à temperatura e às respostas metabólicas. A morfologia de forma geral sofreu poucas mudanças, apresentando apenas um momento com tendência de diminuição tanto no comprimento quanto no volume. Essa mudança pode indicar uma diminuição do número de indivíduos em divisão celular em uma resposta a mudanças fisiológicas ou ao pulso de fontes de carbono.

4.2. Análise integrada dos resultados

Os principais resultados dos 5 experimentos realizados são apresentados no Quadro 4.1. A temperatura influenciou a velocidade de crescimento de forma esperada, sendo que a velocidade observada para cultivos conduzidos a 27°C foi aproximadamente a metade da velocidade observada para os cultivos a 37°C. No Cultivo 1 a velocidade específica de crescimento foi ligeiramente menor do que as observadas nos demais cultivos a 37°C e pode ser atribuída ao menor valor de pH mantido durante esse experimento (6,3) em comparação com o empregado nos outros cultivos (6,7), o que provavelmente levou ao fornecimento mais restrito de nitrogênio. Observando os resultados dos cultivos 1, 2, 4 e 5, o coeficiente de rendimento em biomassa também apresentou a variação esperada, sendo favorecido a 27 °C. A produção específica máxima obtida foi de 125±10 mg/gMS no Cultivo 1. Os maiores valores de concentração celular foram obtidos nos cultivos realizados com lactose (para o clone *E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro), que também serve como fonte de carbono, sendo a máxima concentração de 37±1 gMS/L ocorrendo a 27°C.

Quadro 4.1. - Comparação do crescimento, da formação de biomassa e da produção de proteína nos diferentes cultivos realizados.

Cultivo	T (°C)	Indutor	C _X indução (g/L)	μ _{max} (h ⁻¹)	Y _{x/glicérol} (gMS/g)	Y _{PspA/X} (mg/gMS)	C _{x,máx} (gMS/L)
1	37	IPTG	10,8	0,448±0,004	0,46±0,08	125±10	27±1
2	37	Lactose	8,8	0,523±0,006	0,44±0,05	63±5	34,5±0,6
3*	37	Lactose	13,5	0,499±0,007	0,52±0,02	-	21,5±0,3
4	27	IPTG	12	0,281±0,002	0,54±0,04	94±17	33±1
5	27	Lactose	12,5	0,294±0,003	0,50±0,03	105±15	37±1

**E. coli* BL21(DE3) pET37b+ Ø, demais experimentos *E. coli* BL21(DE3) pET37b+/pspA4Pro,

4.2.1. Relação entre C_x e DO

Durante a realização dos cultivos, a concentração total de células foi avaliada por duas metodologias distintas: a retirada de amostra para análise de massa seca e leitura de absorvância em espectrofotômetro a 600 nm, além da avaliação de feita com a contagem por UFC. No primeiro caso, é preciso realizar a filtração e posterior secagem da amostra por um período de 48 h, enquanto a contagem de UFC requer o crescimento das colônias em placas de petri contendo meio LB-ágar por pelo menos 24 h a temperatura de 37°C tornando-se inviável para obtenção de dados para acompanhamento quasi *online* do experimento. Assim, necessita-se de uma análise que possa ser feita rapidamente para avaliação da concentração celular. Desta forma, o uso da leitura de absorvância fornece dados com grande rapidez e pode ser facilmente relacionada com a concentração celular através de uma correlação.

Verificou-se que os valores de C_x e DO_{600nm} obtidos pelo método de massa seca e de leitura de absorvância, respectivamente, apresentam uma correlação linear durante a fase de crescimento para todos os cultivos e também durante a indução dos cultivos induzidos pela adição de IPTG. O ajuste linear aos dados obtidos nos 5 cultivos realizados (nas condições acima estabelecidas) forneceu um coeficiente angular no valor de $0,423 \pm 0,008$ gMS/ DO_{600nm} , expresso pela Equação 4.1 a seguir. Os dados e o ajuste da Equação 4.1 são mostrados na Figura 4.16.

$$C_x = 0,423 \pm 0,008 * DO \quad (4.1)$$

Contudo, a partir do momento em que houve a indução por lactose nos cultivos a 37°C (Cultivos 2 e 3) ou a 27°C (Cultivo 5), a correlação deixa de ser linear e passa a ser melhor representada por uma função exponencial. Assim, foram obtidas as Equações 4.2 e 4.3 a seguir. Os dados e o ajuste da Equação 4.2 e 4.3 são mostrados na Figura 4.16.

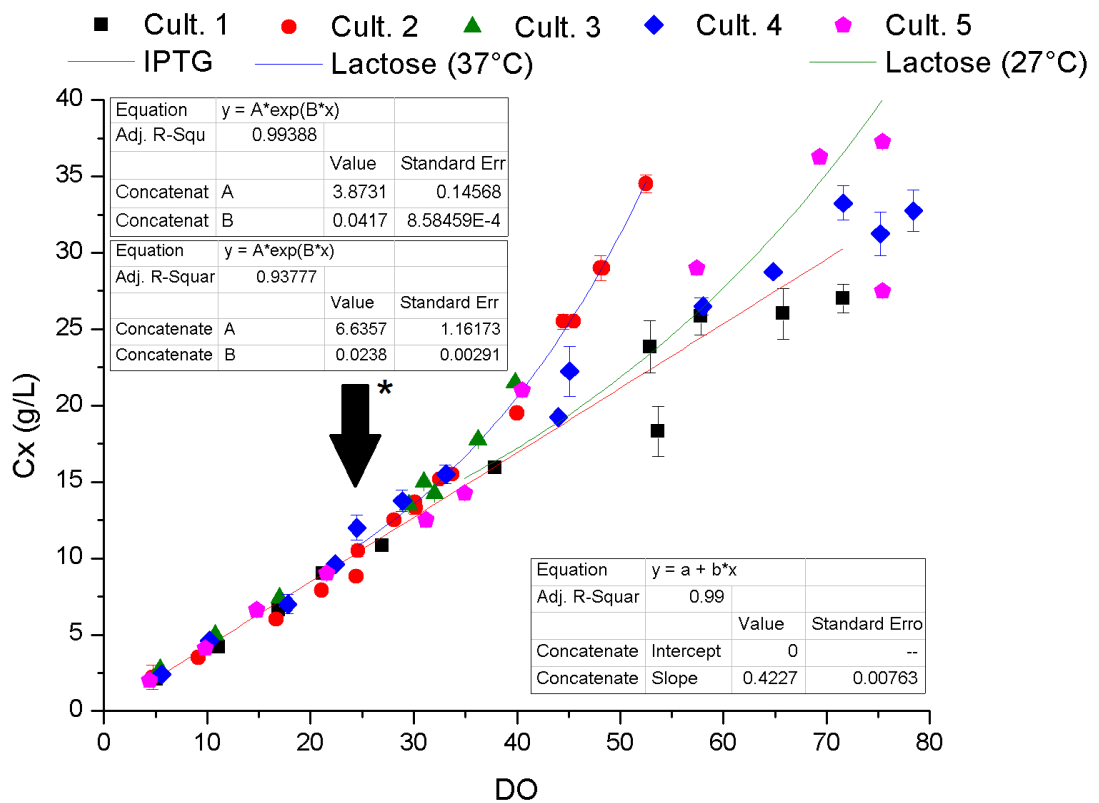
$$C_x = 3,9 \pm 0,1 * \exp^{(4,17 \cdot 10^{-2} \pm 9 \cdot 10^{-4} * DO)} \quad (4.2)$$

$$C_x = 6 \pm 1 * \exp^{(2,4 \cdot 10^{-2} \pm 3 \cdot 10^{-3} * DO)} \quad (4.3)$$

O Cultivo 5, realizado também com indução com lactose a 27°C apresentou uma tendência intermediária entre o comportamento das amostras utilizadas no ajuste da equação 4.1 e das amostras utilizadas no ajuste da equação 4.2.

Os resultados obtidos durante os ensaios estão representados na Figura 4.17 e mostram a tendência de distanciamento dos valores de C_x das amostras obtidas após a indução com lactose, descritas pelas Equações 4.2 e 4.3 (representadas pelas curvas em azul e verde) da reta obtida pela relação direta entre C_x e DO, descrita pela Equação 4.1 (em vermelho) para a fase de crescimento e a indução por IPTG.

Figura 4.17. – Relação entre DO e C_x para os 5 cultivos.



Nota: *A seta indica o momento aproximado da adição dos indutores nos diversos cultivos.

O distanciamento apresentado pelas amostras induzidas por lactose ocorre em direção a um aumento da concentração mássica de células sem que haja um aumento expressivo da DO. A medida de DO apresenta uma relação direta com o número de células em suspensão e o tamanho das mesmas, o que indica que o fenômeno observado envolve um aumento na massa celular enquanto que o tamanho das células e o seu número aparentemente não se altera. Isso leva a crer que a adição de lactose gera um acúmulo de matéria na célula, fazendo com que a mesma tenha um aumento em sua massa. Esse acúmulo no interior da célula poderia ser de PspA, devido à super expressão da proteína de interesse, porém o mesmo não é verificado em cultivos induzidos por IPTG, nos quais foi alcançada uma concentração

de PspA maior do que os obtidos pela indução por lactose. Além disso, no Cultivo 3, foi verificado o deslocamento da relação C_x versus DO, sendo que a bactéria não possuía o vetor para expressar a PspA. Corrobora também para a hipótese do acúmulo da galactose o fato de que houve uma constância da concentração de proteína total para uma mesma DO nas amostras induzidas por IPTG, já que, durante a realização da medida de produção de PspA, é feita a medida da concentração de proteína total para uma DO fixa igual a 2.

No Cultivo 2 também foi verificada uma diminuição gradativa na concentração mássica da proteína total, sendo que, ao final do cultivo essa concentração havia se reduzido em 40 %. Para que isso ocorra, é necessário um grande aumento na massa celular, o qual é compatível com a massa de galactose produzida pela quebra da lactose pela bactéria durante o cultivo. A lactose é um dissacarídeo e sua molécula é formada pela condensação de uma molécula de glicose e uma de galactose. O consumo da lactose pela bactéria durante a indução envolve primeiramente a quebra da mesma em glicose, que é consumida como fonte de carbono, e em galactose, que, diferentemente do que acontece em outras linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas, não é metabolizada por células de BL21(DE3). Desta forma, ocorre um acúmulo de galactose no interior das células, aumentando sua massa total, sem, no entanto, gerar um aumento na concentração celular como observado e discutido no Item 2.3.1. Esse acúmulo de galactose no interior da célula foi comprovado experimentalmente durante o Cultivo 5, conforme mostra a Tabela 4.4. No caso dos Cultivos 2 e 3, o efeito de distanciamento da correlação linear é maior devido à temperatura empregada, o que provoca uma velocidade maior de assimilação de lactose e naturalmente acúmulo mais acentuado de galactose. Devido à temperatura mais branda, o efeito de acúmulo da galactose no Cultivo 5 foi atenuado em relação ao observado para os Cultivos 2 e 3, de forma que o desvio em relação à Equação 4.1 foi menor.

4.2.2. Relação entre a reologia e a concentração celular e produção de proteína nos cultivos

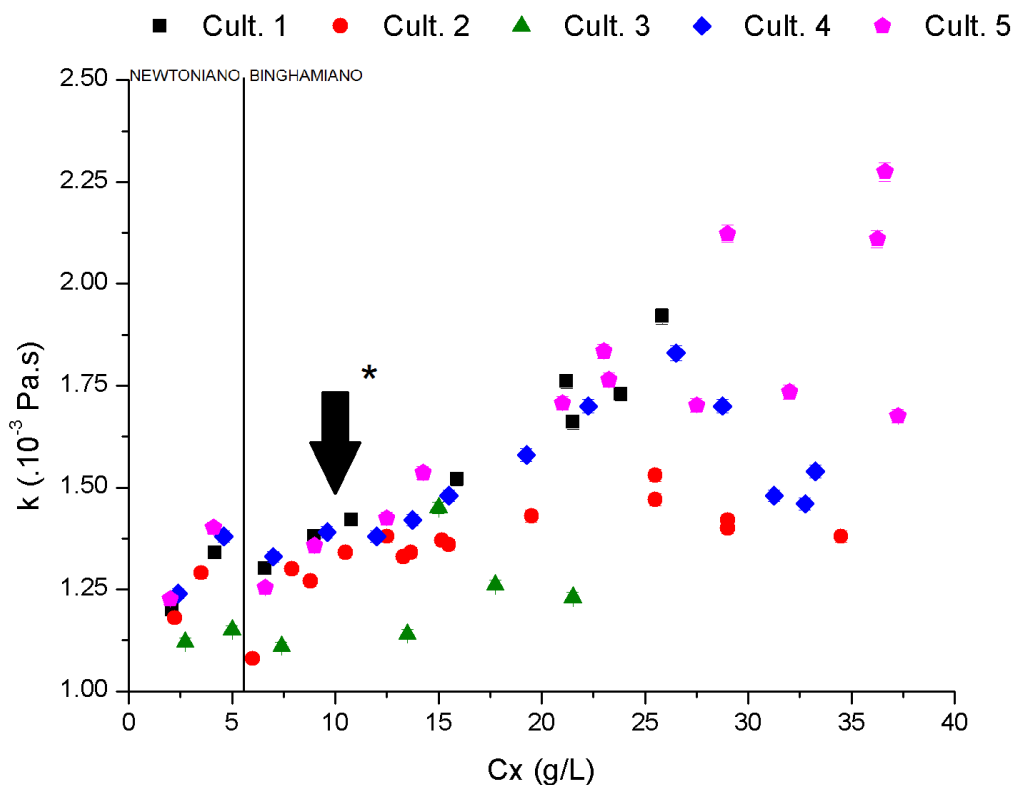
A reologia de suspensões é dependente, entre outras coisas, das características da fase líquida, da concentração da fase sólida e das características estruturais da superfície da fase sólida. Desta forma, buscava-se observar na reologia dos caldos de cultivo as mudanças causadas pelo aumento de concentração celular e pela expressão da proteína, que poderiam se refletir em alterações na morfologia e na composição do caldo.

Todos os cultivos se iniciaram com a adição do inóculo ao meio de cultura no reator. O meio de cultura definido que é usado é um fluido newtoniano com uma viscosidade média igual a 1,12 cP. A partir da inoculação do reator começa a haver o crescimento do microrganismo, gerando uma suspensão de células. O aumento da concentração celular reflete-se no aumento da viscosidade da suspensão, como esperado para o comportamento de suspensões coloidais onde a fase líquida da mesma é um fluido newtoniano. Porém, durante todos os cinco cultivos realizados foram verificadas mudanças no comportamento reológico do caldo enquanto o mesmo ainda estava em fase de crescimento. Em todos os casos, a passagem do comportamento newtoniano para o comportamento binghamiano ocorreu na faixa de C_x entre 5 g/L e 6 g/L (Figura 4.17), antes da realização da indução em todos os experimentos. Isso denota que a mudança de comportamento reológico está ligada apenas às características do crescimento da bactéria e não à indução da produção de proteína. O comportamento binghamiano pode estar associado à produção de exopolissacarídeos (avaliada para o Cultivo 5) e a eliminação de outras substâncias para o caldo de cultivo. Além disso, a morfologia celular e a interação entre as superfícies das células com as demais substâncias presentes no caldo tornam a reologia da suspensão muito mais complexa. Com o aumento da concentração de substâncias que apresentam grandes cadeias poliméricas, essas substâncias podem sofrer grande interação entre suas moléculas. Contudo, essas interações são muito frágeis e são facilmente desfeitas com a aplicação de uma tensão de cisalhamento inicial (τ_0), a partir da qual o fluido passa a escoar normalmente, comportando-se como se fosse um fluido newtoniano. No caso dos valores de τ_0 observados nos caldos de cultivo, os mesmos não ultrapassam 1,6 Pa, valor muito pequeno, principalmente se comparado às tensões de cisalhamento aplicadas durante as análises reológicas. O baixo valor de τ_0 também está de acordo com o que se espera observar caso o exopolissacarídeo seja o principal responsável pela reologia do caldo. Se ele apresentar um comportamento compatível com o modelo de Cross, quando é avaliado para uma pequena faixa da taxa de cisalhamento ele pode se assemelhar a um fluido binghamiano, como visto no Item 2.2.

A Figura 4.18 apresenta os valores obtidos para o parâmetro K do modelo geral de Herschel-Bulkley para todos os cultivos, em função da concentração celular. É possível verificar que para os cinco cultivos realizados há uma tendência de crescimento dos valores de K com o aumento de C_x . Contudo, após C_x alcançar 25 g/L passou a existir uma queda para alguns valores de K, isso sendo verificado para a maior parte das amostras dos três cultivos que ultrapassaram essa concentração celular, sendo dois deles induzidos por lactose e o outro

por IPTG. Em termos individuais, três situações distintas podem ser observadas. Inicialmente, quatro dos cinco cultivos possuem valores iniciais de K próximos, sendo o Cultivo 3, realizado com o microrganismo sem inserto, o único a apresentar valores mais baixos de K desde o início, tendência que se mantém ao longo de todo o cultivo, indicando que o mesmo possui propriedades que tornam sua reologia diferente dos demais. Os outros quatro cultivos apresentam valores para K próximos mesmo após a mudança do comportamento reológico, porém após C_x ultrapassar 15 gMS/L, a velocidade de crescimento de K em função do aumento do C_x passa a ser menor para o Cultivo 2, onde a indução foi realizada com lactose. A mudança de K pode estar ligada ao acúmulo de galactose no interior da célula, que poderia causar mudanças nas características mecânicas e estruturais da bactéria, levando a uma diferença na reologia do caldo, ou a condições que reduzam a liberação de substâncias no caldo de cultivo.

Figura 4.18. – Relação entre C_x e K para os 4 cultivos.

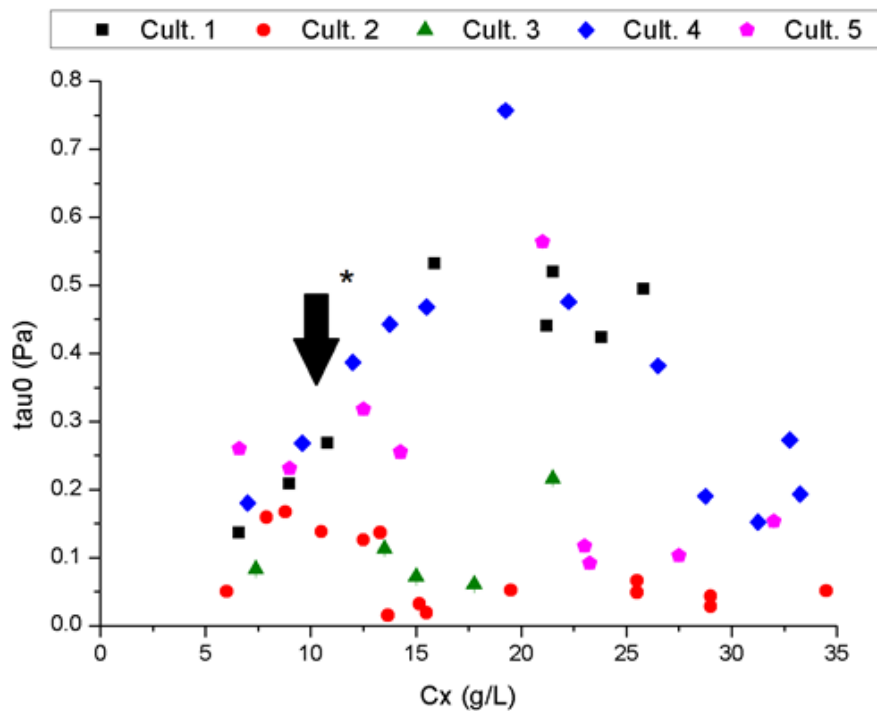


Nota: *A seta indica o momento aproximado da adição dos indutores nos diversos cultivos.

Após a mudança no comportamento reológico e o aparecimento do τ_0 não nulo, novamente é possível ver diferenças entre o comportamento do parâmetro em relação ao C_x

para indução com lactose e com IPTG. A Figura 4.19 mostra um aumento maior de τ_0 para cultivos induzidos por IPTG, chegando a patamares de 0,5 Pa após o C_x alcançar 15 gMS/L. Ainda nos cultivos induzidos por IPTG, esse patamar se mantém superior a 0,4 Pa até cerca de 25 gMS/L, valor máximo de C_x obtido por um dos cultivos induzidos por IPTG. Após atingir essa região de máximo, passa a ocorrer uma queda dos valores de τ_0 para C_x superiores a 25 gMS/L, sendo que esses dados foram obtidos exclusivamente no Cultivo 4. No caso dos Cultivos 2 e 3, induzidos por lactose, o aumento dos valores de τ_0 cessa logo após a indução, mesmo que haja um aumento expressivo da concentração celular, sendo possível observar um único ponto em que τ_0 ultrapassa 0,2 Pa. No caso do Cultivo 5, também induzido por lactose, em baixas concentrações celulares, τ_0 apresenta um comportamento intermediário entre os demais cultivos com lactose e os cultivos com IPTG, variando entre 0,2 Pa e 0,4 Pa. Após ultrapassar a marca de 20 gMS/L, a tensão de cisalhamento inicial aparentemente apresenta uma queda, semelhante a experimentada pelo Cultivo 4, ainda assim, esse experimento acaba apresentando uma amostra que atingiu o maior valor para τ_0 de todos os experimentos realizados, $\tau_0 = 0,76$ Pa.

Figura 4.19. – Relação entre C_x e τ_0 para os 4 cultivos.

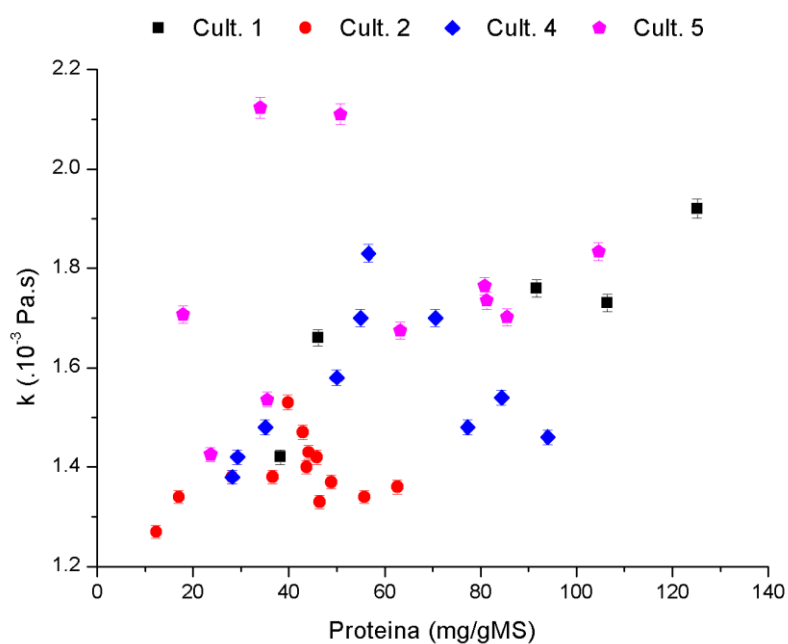


Nota: *A seta indica o momento aproximado da adição dos indutores nos diversos cultivos.

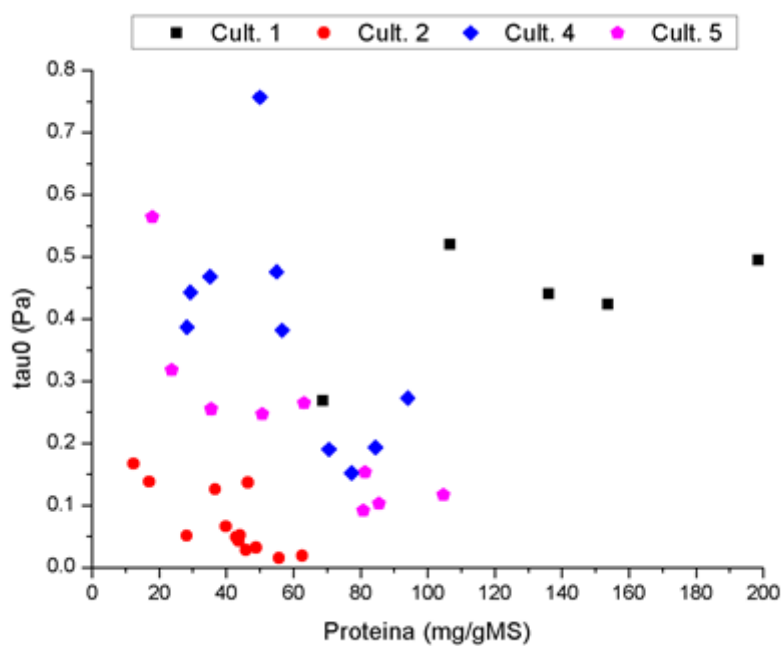
Quando a reologia é comparada com a produção de proteína PspA, porém, torna-se mais difícil achar uma associação direta da evolução das características reológicas do caldo com uma maior ou menor produção da proteína. A Figura 4.20 compara a produção de proteína separadamente com os parâmetros K e τ_0 do modelo de Herschel-Bulkley. Para o parâmetro K , o Cultivo 2 apresentou uma menor expressão de proteína e concentra seus dados na região de produção de proteína inferior a 70 mg/gMS. Já para os Cultivos 1, 4 e 5 parece existir um aumento, ainda que discreto, dos valores de K com o aumento da produção específica de PspA. Esse aumento de K com o aumento da concentração de PspA pode ser uma consequência do aumento da concentração celular e da presença de substâncias liberadas no meio durante a indução da produção de proteína. Desta forma, K poderia ser um indicador indireto da produção de proteína, já que, ao invés de detectar o aumento de sua concentração, detecta as respostas fisiológicas e populacionais que ocorrem durante o cultivo. O parâmetro τ_0 se apresenta como de difícil interpretação, sendo que os valores obtidos para cada cultivo apresentam um comportamento próprio. Os valores mais baixos de τ_0 e de produção de proteína fazem com que os dados se concentrem em uma região inferior esquerda do gráfico. Já os valores mais altos de τ_0 obtidos principalmente no Cultivo 1 aparecem distribuídos sem que haja uma tendência aparente.

A complexidade da reologia dos caldos de cultivo gera uma grande dificuldade na interpretação dos dados, porém é possível observar a influência dos diferentes indutores afetando os parâmetros reológicos. Quando comparada a relação entre a reologia e a concentração celular nas condições propostas, é possível detectar diferentes níveis para as respostas metabólicas. As características da suspensão, como concentração, propriedades mecânicas e superficiais apresentam influência nas características reológicas do cultivo, fazendo com que a produção de proteína, isoladamente, torne-se uma influência de difícil detecção pela análise da reologia. As respostas fisiológicas da indução podem levar a mudanças nas características da fase líquida da suspensão, mas dependem dos níveis das respostas metabólicas das células que, por sua vez, dependem do nível de estresse sofrido principalmente com a indução. Assim, a presença dessas respostas metabólicas ligadas à produção da proteína de interesse pode influenciar a reologia, permitindo que a produção de proteína possa ser inferida indiretamente.

Figura 4.20. – Relação entre a produção de proteína e os parâmetros K (A) e τ_0 (B) para os cultivos onde houve a expressão da proteína PspA.



A



B

4.2.3. Relação entre a morfologia e a reologia e concentração celular nos cultivos

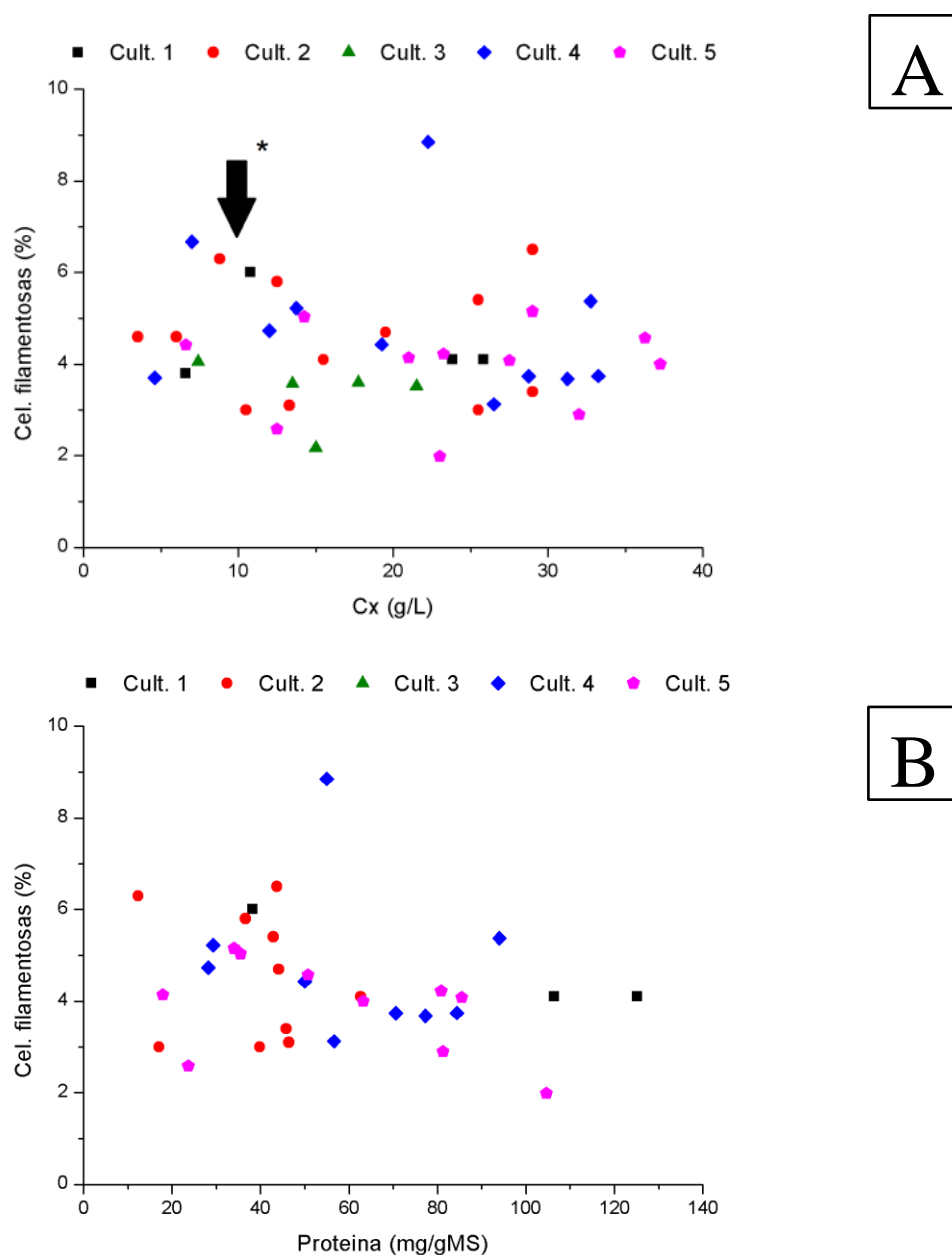
A análise morfológica focada no comprimento celular mostrou a existência de uma população muito heterogênea durante todo o cultivo, ainda que condizente com o que foi

descrito por Donachie e Begg (1989). A heterogeneidade da população de bactérias se deve ao fato desta população se apresentar em diferentes fases de crescimento e de divisão celular. Considerando o ciclo de vida desse microrganismo, células que passaram recentemente por divisão celular apresentam um tamanho reduzido, inferior ao normal. Essa célula passa por uma fase de crescimento e recupera seu tamanho normal, até que começam os preparativos para uma nova divisão, quando passa a gerar mais material celular, que será posteriormente dividido com as células filhas. Até que o processo de divisão seja finalizado, a célula irá então apresentar um comprimento superior ao normal. Soma-se a essa população aquela que sofre uma modificação morfológica causada pela expressão da proteína de interesse, que implica em problemas nas fases finais da divisão celular, tornando a célula detentora de uma morfologia filamentosa (JEONG e LEE, 2003)

Dentro desta distribuição de comprimentos, as medianas observadas para o comprimento variaram sempre entre 2,3 μm e 2,9 μm , próximos aos valores obtidos por alguns autores para o comprimento médio (PIERUCCI, 1978) e a mediana (DONACHIE e BEGG, 1989) de uma célula de *E. coli*. O grupo formado pelas bactérias com maior comprimento (englobando as 5% maiores) sempre apresentou um tamanho mínimo que variou entre 4 μm e 6,25 μm . O volume celular apresentou uma variação maior entre as medianas, sendo que para situações de mínimo, ela alcançou 3,75 μm^3 enquanto para o máximo, chegou perto de 6 μm^3 . Já as bactérias de maior volume (englobando as 5% maiores) variaram de apenas 10 μm^3 a até quase 25 μm^3 .

Adotando o valor da mediana de uma amostra como aquele que representa o tamanho normal de uma célula que não está em processo de divisão naquele momento, o tamanho máximo de uma célula em processo de divisão pode ser considerado o dobro desta mediana. Desta forma, esse seria o valor máximo que uma célula pode ter sem que a mesma seja interpretada como apresentando uma morfologia filamentosa. A Figura 4.21 apresenta a porcentagem das populações amostradas nos cultivos que podem ser interpretadas como possuidoras de uma morfologia filamentosa e sua relação com C_x e com a produção de proteína. A porcentagem de células filamentosas varia desde 2% até 8,9%, sendo que, em média, corresponde a 4,3% considerando todos os cultivos.

Figura 4.21. – Relação entre o C_x e a produção de proteína, e as células filamentosas para os cultivos.



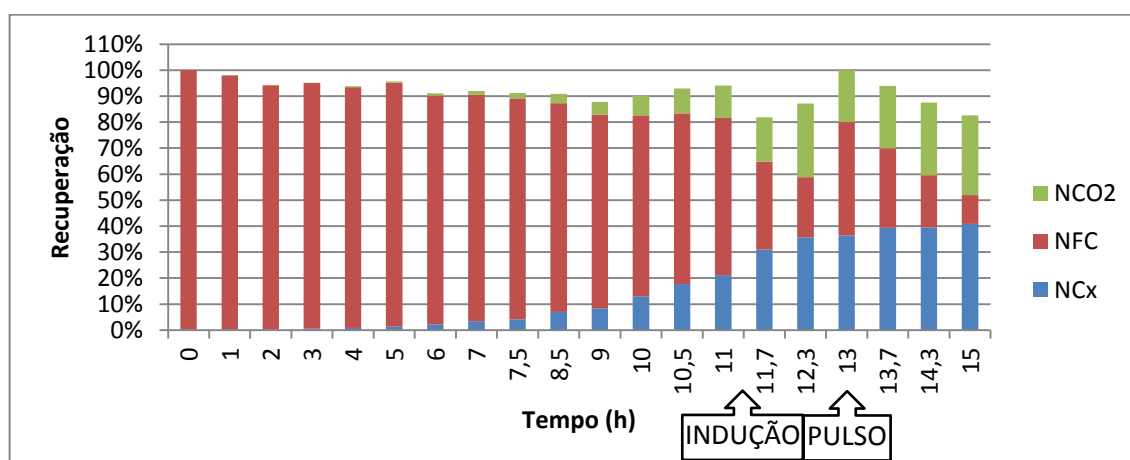
Apesar da variação na quantidade de células alongadas ser significativa, não parece existir um padrão envolvendo essas mudanças, nem com o aumento da concentração celular, nem com a produção de proteína. Era esperada uma relação entre o aumento no número de células alongadas e a produção da proteína recombinante, já que o efeito de filamentação é decorrente de problemas na expressão de proteínas ligadas à divisão celular em células dedicadas a produção de proteínas recombinantes (JEONG e LEE, 2003). Porém, esse fenômeno não foi observado no presente estudo e, de fato, a ocorrência de células

filamentosas parece mais estar associada a uma porcentagem da população que apresenta falha no processo de divisão celular, independentemente das mesmas apresentarem ou não produção de proteína heteróloga. Outra hipótese seria que o cisalhamento no biorreator levaria ao rompimento de parte da população das células mais alongadas mantendo o número de indivíduos filamentosos relativamente constante com o tempo.

4.3. Balanços de carbono nos cultivos

O Cultivo 1, que se desenvolveu a 37°C e foi induzido com IPTG, apresentou um bom valor de recuperação de carbono durante toda a fase de crescimento, que se encerrou em 11 h com a adição de IPTG. Na Figura 4.22, é possível observar que, durante o crescimento, a recuperação apresentou valores altos, sendo a amostra obtida com 9 h de cultivo a única em que o valor da recuperação esteve abaixo de 90%. Contudo, após a indução os valores de recuperação caíram para a faixa entre 80% e 90%. Logo antes da amostra de 13 h, foi realizado o pulso com glicerol e, devido ao aumento na quantidade total de carbono no cultivo, esta amostra passa a ser o novo valor de referência para a recuperação. Com o decorrer do cultivo, porém, pode-se ver que continua ocorrendo uma queda gradativa dos valores de recuperação, sendo que o cultivo é encerrado com um valor de apenas 83%. A Figura 4.22 mostra ainda o direcionamento do carbono presente no substrato para a formação de biomassa e a produção de CO₂, como esperado.

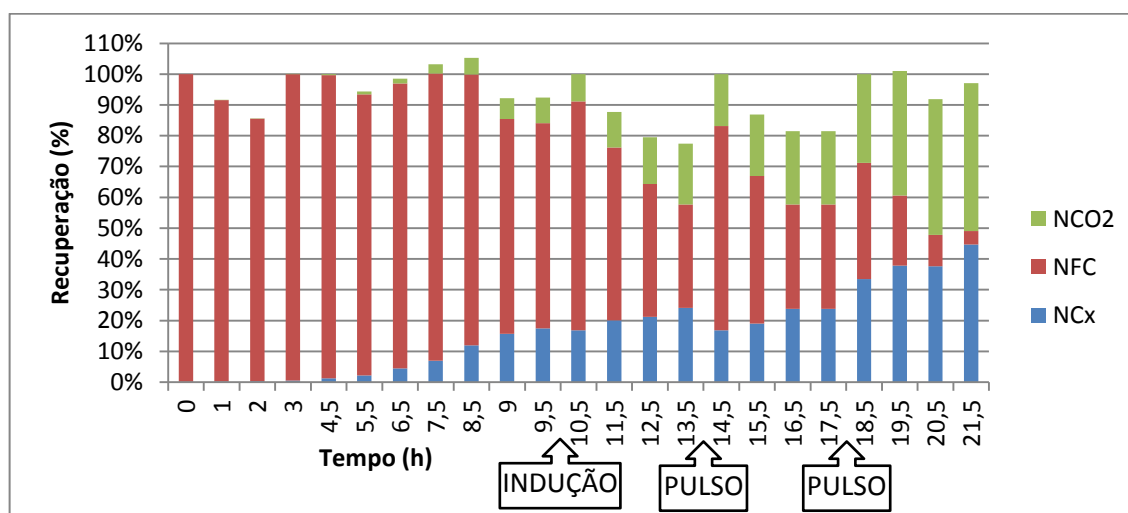
Figura 4.22. – Recuperação do carbono no Cultivo 1 (PspA4Pro, 37°C induzido por IPTG).



Na Figura 4.23 é apresentada a recuperação do Cultivo 2, que ocorreu a 37°C e foi induzido com lactose. Esse cultivo apresentou uma fase de crescimento de certa forma

semelhante ao observado no Cultivo 1, onde novamente apenas uma amostra apresenta recuperação abaixo de 90%. Neste cultivo, porém aparecem amostras nas quais a recuperação alcança valores superiores a 100%. Essas variações, que ocorrem principalmente no início do cultivo, se devem a erros analíticos, principalmente devido à alta concentração de fonte de carbono, frente a sua baixa velocidade de consumo pelo microrganismo, cuja concentração ainda é incipiente (visível pela baixa porcentagem de carbono em N_{Cx}). Após a indução por lactose ocorrida no tempo 10,5 h, volta a ocorrer uma tendência de forte queda nos valores de recuperação de carbono. A suplementação de fonte de carbono através do pulso de glicerol e lactose ocorre logo antes da amostra de 14,5 h e se repete na amostra 18,5 h. A tendência de queda na recuperação de carbono ocorre até a amostra 18,5 h, quando então a recuperação passa a apresentar bons valores novamente.

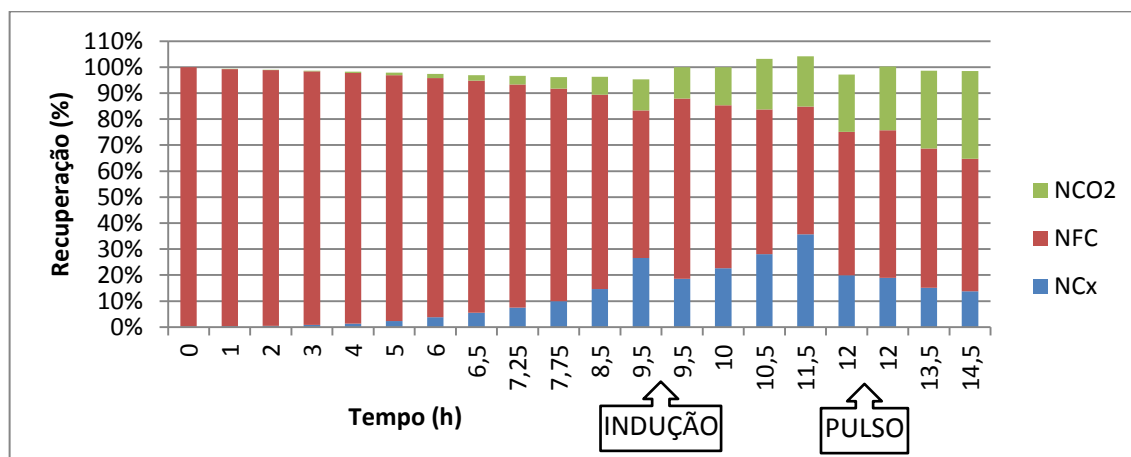
Figura 4.23. – Recuperação do carbono no Cultivo 2 (PspA4Pro, 37°C induzido por lactose).



O Cultivo 3 ocorreu a 37°C e foi induzido com lactose, porém foi o único com o microrganismo sem o inserto. A Figura 4.24 mostra que este foi o único experimento a apresentar uma boa recuperação durante todo o acompanhamento, sendo que os valores obtidos mantiveram-se altos, sempre acima de 90% e, em dois casos, acima de 100%. É possível observar que mesmo com a indução, que ocorreu na amostra de 9,5 h e o pulso contendo lactose e glicerol na amostra de 12 h, os valores de recuperação pouco se alteraram, indicando que o motivo para os demais balanços não estarem fechando está ligado com a fase de indução, provavelmente ao estresse causado pela produção de proteína e não necessariamente à presença de indutor. É importante ressaltar que a presença de duas

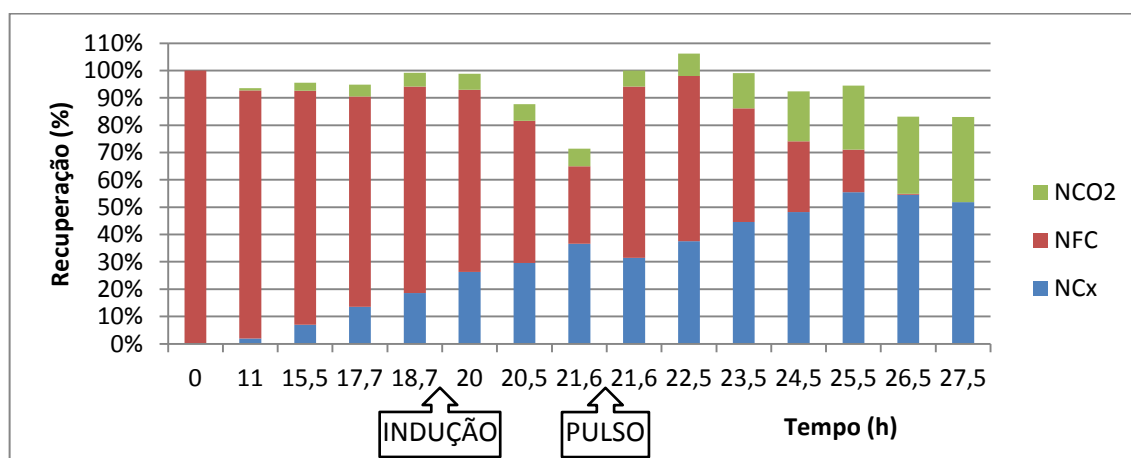
amostras duplicadas se refere a amostras tiradas exatamente antes e exatamente após a introdução das fontes de carbono.

Figura 4.24 – Recuperação do carbono no Cultivo 3 (\emptyset , 37°C induzido por lactose).



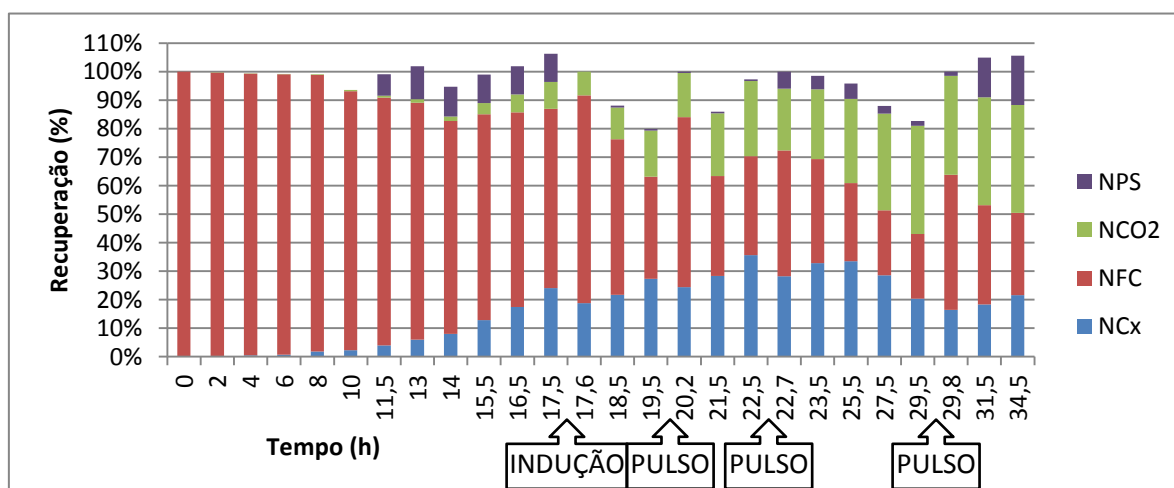
A Figura 4.25 mostra os dados de recuperação para o Cultivo 4, que ocorreu a 27°C e foi induzido por IPTG. Devido a temperatura, a velocidade de crescimento foi menor e optou-se por fazer retiradas de amostras mais espaçadas. Novamente, os valores de recuperação de carbono mantiveram-se altos para a fase de crescimento, até o momento da indução, realizada antes da amostra de 20 h. Depois do IPTG ser adicionado, ocorre uma forte tendência de queda da recuperação, sendo que ela continua a ser observada após o pulso de glicerol, que acontece na amostra 21,6 h, porém de forma menos intensa. O experimento foi encerrado com uma recuperação pouco superior a 80%, apesar do esgotamento da fonte de carbono já ter ocorrido, sendo marcado pelo desaparecimento da porção N_{FC} no gráfico.

Figura 4.25. – Recuperação do carbono no Cultivo 4 (PspA4Pro, 27°C induzido por IPTG).



A Figura 4.26 mostra os dados de recuperação do carbono para o Cultivo 5, que ocorreu a 27°C e foi induzido pela adição de um pulso de lactose. A velocidade de crescimento foi menor devido à temperatura ter sido mais baixa, assim optou-se por fazer retiradas de amostras mais espaçadas. Novamente, os valores de recuperação de carbono mantiveram-se altos para a fase de crescimento, até o momento da indução, realizada antes da amostra de 17,6 h. Depois da lactose ser adicionada, ocorre uma forte tendência de queda da recuperação. Houve a necessidade da realização de três pulsos contendo as fontes de carbono, sendo que o primeiro ocorreu antes da amostra 20,2 h, o segundo antes da amostra 22,7 h e o terceiro antes da amostra 29,8 h. Após os pulsos ainda foi verificado a queda na recuperação do carbono, porém de forma menos intensa, sendo que em nenhum momento mais a recuperação este abaixo de 80%. Momentos de alta recuperação foram observados mesmo após a indução devido a inclusão do carbono presente no caldo de cultivo na forma de polissacarídeo solúvel. Contudo, ocorreram grandes oscilações nas concentrações obtidas para o polissacarídeo devido à existência de interferentes no caldo e nem todas as amostras apresentaram boa recuperação. Ainda assim, o cultivo foi encerrado com uma recuperação de 106%.

Figura 4.26. – Recuperação do carbono no Cultivo 5 (PspA4Pro, 27°C induzido por lactose).



As informações obtidas com a análise da recuperação de carbono indicam que após a indução da produção de proteína PspA ocorre a formação de algum composto, não identificado nos Cultivos 1 a 4, para a qual parte do carbono fornecido é destinada. A

obtenção de uma boa recuperação do carbono presente no Cultivo 3 indica que a formação desse composto deixar de ocorrer ou ocorre em menor quantidade quando a proteína não é sintetizada. Assim, é levantada a hipótese de que esse fenômeno esteja ligado não só com a fase de indução, mas também com o estresse da produção de proteína, independente do indutor usado. A menor recuperação de carbono poderia ser explicada pela intensificação da lise celular e permeabilização de parte da população celular, indicadas pela presença de PspA e material genético no caldo. Porém, a incorporação desses compostos no balanço de carbono não contribui significativamente para aumentar a recuperação. Os resultados da análise da recuperação do carbono no Cultivo 5 mostram que a hipótese mais provável seja a da formação de polissacarídeos solúveis pelas células de *E. coli*. Incorporando esse novo composto no balanço de carbono, foi alcançada recuperação de 100 %. Infelizmente, não foi possível quantificar o polissacarídeo em amostras armazenadas dos Cultivos 1, 2 e 4, devido à degradação do mesmo. A metodologia de quantificação do polissacarídeo é bastante sensível à presença de hexoses e pentoses, exigindo correções nas amostras contendo lactose e galactose. Por isso, há dispersão nos dados mostrados na Tabela 4.4. Porém, quando há baixa concentração de açúcares, a quantificação se torna mais precisa e os resultados do balanço de carbono mais confiáveis. Além da formação de polissacarídeos, não é descartada a hipótese da formação de outros compostos em concentrações em que poderiam afetar a recuperação do carbono. Entre esses compostos poderia haver a formação, por exemplo, de compostos originários da oxidação do glicerol, formados a partir da reação dele com radicais e proteínas gerados pelo metabolismo das células, principalmente em momentos de maior estresse e que também poderiam estar associados ao estado de VBNC das células.

5. CONCLUSÕES

5.1. Conclusões finais

No presente trabalho foi feita a avaliação da produção de proteína recombinante (PspA4Pro) em cultivos de *E. coli* em meio definido em diferentes condições de temperatura (27°C e 37°C) e utilizando diferentes indutores (IPTG e lactose). O experimento cuja condição propiciou a maior produção de proteína foi aquele conduzido inteiramente a 37°C, com indução de 4 h pela adição de IPTG, sendo alcançada a concentração de PspA de 125±10 mg/gMS. Esse cultivo era o que reunia as condições de metabolismo mais acelerado entre os realizados.

Durante a avaliação dos experimentos, o acompanhamento reológico de cultivos de *E. coli* se apresentou como uma forma alternativa para o monitoramento de cultivos com produção de proteína recombinante ainda que não foi viável obter uma relação direta entre a reologia e a produção da proteína de interesse. Uma análise dos parâmetros reológicos de uma suspensão celular pode ser realizada em tempo hábil durante o próprio cultivo e seus resultados podem ser analisados em poucos minutos. O presente trabalho mostrou que a reologia desses caldos de cultivo é complexa e envolve a mudança do comportamento reológico independente do indutor usado. Além disso, existe uma relação direta entre a concentração da suspensão celular de *E. coli* e a reologia do caldo, porém essa relação depende também de qual indutor é utilizado para disparar a produção da proteína recombinante.

Dentro do modelo geral de Herschel-Bulkley, o parâmetro K mostrou uma resposta aparentemente associada à concentração celular e às moléculas de grande tamanho que são liberadas no caldo de cultivo, principalmente à presença de grandes quantidades de polissacarídeo solúvel produzido pelas células e que pode possuir grande influência na reologia da fase líquida da suspensão. A liberação dessas substâncias está associada ao estresse metabólico e tem ligação com a produção da proteína de interesse. O parâmetro τ_0 parece responder mais ao estresse causado pela indução, já que atinge seu valor máximo durante ou logo após a indução, passando então a manter-se constante ou a diminuir com o decorrer da indução. Apesar de que o acompanhamento reológico não ter fornecido uma relação direta para quantificação da concentração celular ou produção da proteína de

interesse, ele permite uma avaliação qualitativa da saúde celular e o estresse metabólico sofrido pela bactéria.

A análise morfológica da célula focada no comprimento celular não apresentou os resultados esperados, devido principalmente a grande heterogeneidade da população celular. Foi possível observar a presença de indivíduos filamentosos durante o cultivo que se formam devido a mudanças fisiológicas ligadas ao aparato responsável pela produção da proteína heteróloga, porém não foi possível verificar aumentos significativos no número desses indivíduos durante a indução, nem associar variações nesse número com diferentes níveis de estresse causados por diferentes temperaturas de indução e diferentes indutores. Também não foi possível associar as mudanças reológicas com mudanças significativas da população durante o cultivo. Apesar disso, mudanças na morfologia da população (comprimento e volume celular) foram observadas, associadas principalmente a mudanças nas concentrações e nos tipos de fontes de carbono disponíveis para o microrganismo, refletindo possíveis mudanças fisiológicas nas células. Outra mudança fisiológica observada foi a redução na contagem de UFC, que indica que o estresse da produção de proteína pode ter levado as células a entrarem no estado de VBNC.

Este trabalho mostrou também que ocorrem alterações nas relações entre a concentração celular e a densidade ótica medida pela absorbância das amostras. Essas mudanças estão associadas ao uso de lactose como indutor e revelaram que ocorre um acúmulo de galactose no interior das células devido à incapacidade da *E. coli* BL21(DE3) em metabolizar essa fonte de carbono resultante da quebra da lactose. Esse efeito de acúmulo de galactose poderia também estar influenciando outras propriedades do cultivo, como, por exemplo, a própria reologia do caldo.

Os cálculos do balanço de carbono apresentam excelente recuperação na fase de crescimento dos Cultivos 1, 2 e 4 e para todo o Cultivo 3, no qual não houve a produção da proteína PspA. Porém, a partir da indução da proteína PspA (Cultivos 1, 2, 4 e 5), os valores de recuperação tendem a cair. Investigou-se a presença de vários compostos no caldo de cultivo associados a diferentes hipóteses para o direcionamento do carbono não recuperado na forma de biomassa, CO₂ ou ácidos orgânicos. Tais hipóteses envolvem a liberação para o meio de ácidos nucleicos e proteínas devido à permeabilização das células ou ainda a solubilização no meio do lipopolissacarídeo presente na superfície células de *E. coli*. Embora a presença de ácidos nucleicos e proteínas solúveis tenha sido verificada no sobrenadante do caldo, os resultados do presente trabalho indicam a intensa formação e solubilização de polissacarídeo como o principal destino do carbono não recuperado. Estudos adicionais são

necessários para avaliar se as condições de cultivo e indução podem ser manipuladas para minimizar a formação desse bioproduto, cuja formação corresponde a até 20 % do carbono fornecido.

5.2. Sugestões de trabalhos futuros

Para a continuação do trabalho, sugere-se realizar mais dois cultivos: um cultivo de referência, sem indução, a 37 °C, além da repetição do cultivo conduzido a 37 °C e induzido por IPTG, que levou à maior produção de proteína, para verificação da reprodutibilidade do mesmo e confirmação do resultado.

A partir dos dados gerados em todos os cultivos, recomenda-se estimar as velocidades de assimilação de glicerol e lactose, assim como as de produção de CO₂ e de ácidos orgânicos. Essas informações poderão ser analisadas de forma integrada para avaliar a existência de relações com a produção específica de proteína.

Para melhorar a qualidade da análise da concentração do polissacarídeo recomenda-se realização de diálise para a sua purificação antes da quantificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALMEIDA, A., GIORDANO, A. M., NIKEL, P. I., PETTINARI, M. J. **Effects of aeration on the synthesis of poly(3-hydroxybutirate) from glycerol and glucose in recombinant *Escherichia coli***. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2036-2040. Mar. 2010.

ALTENBUCHNER, J., MATTES, R. ***Escherichia coli***. In: GELLISSEN, G. **Production of recombinant proteins: novel microbial and eukaryotic expression systems**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 7-43.

ANDRADE, J. V. L; CARRA, M.; SILVA, G. G.; CAMPANI JR., G.; ZANGIROLAMI, T.C. **Acompanhamento de mudanças morfológicas em cultivos de *Escherichia coli* recombinante por análise de imagens utilizando recursos computacionais**. Trabalho aceito para publicação nos Anais do X Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, Vassouras, RJ, 2013.

ASHRAF, K., RAMALINGAM, S., MUJEEB, M., HAIDER, A. **Recombinant protein production of abundant larvar transcript (alt-2) in *Escherichia coli***. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2 (4), 2466-2480. 2013.

BABAEIPOUR, V., SHOJAOSADATI, S. A., MAGHSOUDI, N. **Maximizing production of human interferon- γ in HCDC of recombinant *E. coli***. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (3): 563-572. 2013.

BELLÃO, C. **Avaliação de fontes de carbono e condições de indução na expressão de canacistatina em *Escherichia coli* BL21(DE3)**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.

BENNETT, C. O., MYERS, J. E. **Fenômenos de Transporte: Quantidade de Movimento, Calor e Massa**. McGraw-Hill, São Paulo, 1978.

BLOOMFIELD, S. F., STEWARD, G. S. A. B., DODD, C. E. R., BOOTH, I. R., POWER, E. G. M. **The viable but non-culturable phenomenon explained?** *Microbiology* 144, P. 1–3. 1998.

BOWERS, R. H., **The mechanics of bubble formation.** *J. Appl. Chem.*, 5: 542-548, 1955.

BRADFORD, M. M. **Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976

BRILES, D. E., HOLLINSHEAD S., BROOKS-WALTER A., NABORS G. S., FERGUSON L., SCHILLING M., GRAVENSTEIN S., BRAUN P., KING J., SWIFT A. **The potential to use PspA and other pneumococcal proteins to elicit protection against pneumococcal infection,** *Vaccine*, v.18, 1707-1711, 2000.

BRIMACOMBE, C. A., BEATTY, J. T. **Surface Polysaccharide Extraction and Quantification.** *Bio-protocol* 3(20): e934. <<http://www.bio-protocol.org/e934>>. 2013

CASTRO-MARTÍNEZ, C., LUNA-SUÁREZ, S., LÓPEZ-PAREDES, O. **Overexpression of a modified protein from amaranth seed in *Escherichia coli* and effect of environmental conditions on the protein expression.** *Journal of Biotechnology*, 158, 59-67. 2012.

CROSS, M. M. **Rheology of non-newtonian fluids: a new flow equation for pseudoplastic systems.** *Journal of Colloid Science* 20, 417-437. 1965.

CSORDAS, F. C., PERCIANI, C. T., DARRIEUX, M., GONCALVES, V. M., CABRERA-CRESPO, J., TAKAGI, M., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., LEITE, L. C., TANIZAKI, M. M. **Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide.** *Vaccine*, v. 26, 2925 – 2929, 2008.

DARCAN, C., ÖZKANCA, R., IDIL, Ö., FLINT, K. P. **Viable but non-Culturable State (VBNC) of *Escherichia coli* Related to EnvZ under the Effect of pH, Starvation and Osmotic Stress in Sea Water.** Polish journal of Microbiology, Vol. 58, No 4, p. 307 - 317. 2009.

DEMAIN, A.; VAISHNAV, P. **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.** Biotechnology Advances 27, 297-306, 2009.

DONACHIE, W. D.; BEGG, K. J. **Cell length, nucleoid separation, and cell division of rod-shaped and spherical cells of *Escherichia coli*.** J. Bacteriol. 1989, 171(9):4633. 1989.

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

FUJIWARA, K.; HIDEKI, T. **Filamentous Morphology in GroE-Depleted *Escherichia coli* Induced by Impaired Folding of FtsE.** Journal of Bacteriology, v. 189, n. 16, p. 5860-5866, ago. 2007.

GANAL, S., GAUDIN, C., ROENSCH, K., TRAN, M. **Effects of streptomycin and kanamycin on the production of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* B23 cells.** J. Exp. Microbiol. Immunol. 11, 54-59. 2007.

GELLISSSEN, G. **Production of Recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems.** Wiley-VCH. Weinheim, 2005.

GLICK, R. B. **Metabolic load and heterologous gene expression.** Biotechnology Advances, Vol. 13, No. 2, pp. 247-261. 1995.

GOTTESMAN, S., STROUT, V. **Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K12.** Mol. Microbiol. 5: 1599-1606.1991.

HEPTINSTALL, J., RAPLEY, R. **Spectrophotometric analysis of nucleic acids.** In: RAPLEY, R. **The nucleic acid protocols handbook.** Humana Press Inc. Totowa, NJ. pp 57-60. 2000.

HEYLAND, J., BLANK, L. M., SCHMIDT, A. **Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*.** *J Biotechnol*, 155, 178– 184. 2011.

HOLLINGSHEAD, S., K., BARIL, L., FERRO, S., KING, J., COAN, P., BRILES, D. **E. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries.** *Journal of Medicine Microbiology*, v. 55, 215 - 21, 2006.

HORTA, A.C.L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante.** Tese de Doutorado, PPG-EQ/UFSCar, Dezembro 2011.

JEDRZEJAS MJ. **Pneumococcal virulence factors: structure and function.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:187-207, 2001.

JEONG, K., J., LEE, Y., S., **Enhancer Production of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* by Filamentation Suppression.** *Applied and Environmental Microbiology*, 1295 - 1298. Feb. 2003.

KAROW, E. O., BARTHOLOMEW, W. H., SFAT, M. R., **Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations.** *Agricultural and Food Chemistry*, 1(4): 302-306, 1953.

KHALILZADEH, R.; SHOJAOSADATI, S. A.;MAGHSOUDI, N.; MOHAMMADIAN-MOSAABADI, J.; MOHAMMADI, M. R.; BAHRAMI, A.; MALEKSABET, N.; NASSIRI-KHALILLI, M. A.; EBRAHIMI, M.; NADERIMANESH, H. **Process development for Production of recombinant human interferon- γ expressed in *E. coli*.** *J Ind Microbiol Biotechnol.*, v.31, p.63-69, 2004.

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.** *Process Biochemistry.* v.35. p. 1019-1025. 2000.

KONG, S., DAY, A. F., O'KENNEDY, R. D., SHAMLOU, P. A., TITCHENER-HOOKER, N. J. **Using viscosity-time plots of *Escherichia coli* cells undergoing chemical lysis to measure the impact of physiological changes occurring during batch cell growth.** J. Chem. Technol. Biotechnol. 84: 696-701. 2009.

KOOLAEI, S. M. V., SHOJAOSADATI, S. A., BABAEIPOUR, V., GHAEMI, N., **Physiological and morphological changes of recombinant *E. coli* during over-expression of human interferon- γ in HCDC.** Iranian Journal of Biotechnology. v 4 (4). Outubro de 2006.

KYLE, S., JAMES, K. A. R., MCPHERSON, M. J., **Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin.** Microbial Cell Factories, 2012.

LEDUY, A., MARSAN, A. A., COUPAL, B., **A study of the rheological properties of a non-newtonian fermentation broth.** *Biotechnology and bioengineering*, XVI: 61-76, 1974.

LEE, S. Y., LEE, K. M., CHANG, H.N., STEINBÜCHEL, A. **Comparison of recombinant *Escherichia coli* strains for synthesis and accumulation of poly-(30hydroxybutiric acid) and morphological changes.** *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 44, Pp. 1337-1347. 1994.

LEE, S. Y., **High cell-density culture of *Escherichia coli*.** *Ibitech March*, v. 14, 98-105, 1996.

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

LOZANO, D. C., **Estudo da caracterização das propriedades reológicas de caldos de fermentação.** Tese de mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola/UNICAMP, 1982.

LU, E., TRINH, T., TSANG T., YEUNG, J. **Effect of growth in sub-lethal levels of kanamycin and streptomycin on capsular polysaccharide production and antibiotic resistance in *Escherichia coli* B23.** J. Exp. Microbiol. Immunol. 12, 21-26. 2008.

MANON Y., FILLAUDEAU L., ANNE-ARCHARD D., URIBELARREA J.L., MOLINA-JOUVE C., **On-line rheology of cell cultures in a bioreactor.** 8th World Congress of Chemical Engineering, WCCE8, Montréal, Canada, Agosto 23-27, 2009.

MARISCH, K., BAYER, K., CSERJAN-PUSCHMANN, M., LUCHNER, M., STRIEDNER, G. **Evaluation of three industrial *Escherichia coli* strains in fed-batch cultivations during high-level SOD protein production.** Microbial cell factories, 12:58. 2013.

MARTÍNEZ-SALAS, E., MARTÍN, J. A., VICENTE, M. **Relationship of *Escherichia coli* density to growth rate and cell age.** Journal of Bacteriology. Vol. 147, No 1. p. 97-100. 1981.

McNEIL, B., HARVEY, L. M. **Viscous fermentation products.** Critical Reviews in Biotechnology, 13(4):275-304. 1993.

METZNER, A. B., **Non-newtonian technology: Fluid mechanics, mixing and heat transfer.** *Am. Chem. Eng.*, 1: 79-153, 1956.

MIYAJI, E. M., FERREIRA, D. M., LOPES, A. P. Y., BRANDILEONE, M. C. C., DIAS, W. O., LEITE, L. C. C. **Analysis of serum cross-reactivity and cross-protection elicited by immunization with DNA vaccines against *Streptococcus pneumoniae* expressing PspA fragments from different clades.** Infection and Immunity, v. 70, 5086 – 5090, 2002.

MIZUNOE, Y., WAI, S. N., ISHIKAWA, T., Takade, A., YOSHIDA, S. I. **Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation.** FEMS Microbiol. Lett. Vol. 186, p. 115-120. 2000.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. Editora LTC. 4ª Ed. Rio de Janeiro – RJ. 2009.

MOROWVAT, M. H., BABAEIPOR, V., MEMARI, H. R., VAHIDI, H. **Metabolic changes of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) during overexpression of recombinant human interferon beta in HCDC**. Intern J Biosciences, 4(4): 131-138. 2014.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Lehninger princípios de Bioquímica**. Editora Sarvier, 4ª Ed., São Paulo, 2006.

OLIVER, J. D. **The Viable but Nonculturable State in Bacteria**. The Journal of Microbiology, Vol. 43, p. 93-100. 2005.

OLSVIK, E., KRISTIANSEN, B. **Rheology of filamentous fermentations**. Biotech. Adv. Vol. 12, pp. 1-39, 1994.

PIERUCCI, O. **Dimensions of *Escherichia coli* at various growth rates: model for envelope growth**. J. Bacteriol., 135:559-574, 1978.

PINTO, D., ALMEIDA, V., SANTOS, M. A., CHAMBEL L. **Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli**. J Appl Microbiol Vol. 110, p.: 1601–11. 2011.

PINTO, D., SANTOS, M. A., CHAMBEL, L. **Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms**. Critical Reviews in Microbiology, Early Online: 1 - 16. 2013

REN, Y., ELLIS, P. R., SUTHERLAND, I. W., ROSS-MURPHY, S. B. **Dilute and semi-dilute solution properties of an exopolysaccharide from *Escherichia coli* strain S61**. Carbohydrate Polymers 52, 189-195. 2003.

REUSS, M., DEBUS, D., ZOLL, G. **Rheological properties of fermentation fluids**. Chem. Eng. 318, 233. 1982.

RICHARDS, J. W. in BLANCH, H. W., and BHAVARJU, S. M. **Non-Newtonian fermentation broths: Rheology and mass transfer**, *Biotechnology and Bioengineering*, XVIII: 181-208, 1976.

RIESENBERG, D., GUTHKE, R. **High-cell-density cultivation of microorganisms**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 51 (4), 422 – 430, 1999.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 1ª ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005.

ROLO D, ARDANUY C, FLEITES A, MARTÍN R, LIÑARES J: **Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain**. *BMC Microbiology*, v. 9, 1471-2180, 2009.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd ed. New York, 2001.

SANTOS, M. P., CAMPANI JR, G., SARGO, C. R., HORTA, A. C. L., GONÇALVES, V. M., ZANGIROLAMI T.C., **Influência da temperatura e de fontes de nitrogênio na produção de proteína recombinante por *Escherichia coli***. XIX Congresso brasileiros de Engenharia Química. Búzios/RJ, 2012

SARGO, C.R. **Aperfeiçoamento das Condições de Cultivo em Alta Densidade de *E. coli* recombinante com Glicerol como Fonte de Carbono**. Dissertação de Mestrado, PPG-EQ/UFSCar, Julho de 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, nº 10, p.947-953, 1995.

SILVA, A. J., **Vacinas recombinantes contra erisipela suína: desenvolvimento integrado de bioprocesso, da biologia molecular ao biorreator.** Tese de Doutorado, PPG-Biotecnologia/UFSCar, Outubro, 2011 (disponível on-line em www.bco.ufscar.br).

SILVA, G. G., CAMPANI, G., SANTOS, M. P., SARGO, C. R., HORTA, A. C. L., GONÇALVES, V. M., BADINO, A. C., ZANGIROLAMI, T. C. **Estudo reológico de cultivos de alta densidade celular de *Escherichia coli* recombinante.** In: SIMPÓSIO NACIONAL DE Bioprocessos, 18., 2013, Foz do Iguaçu. **Anais...** 1 DVD.

SILVA, M., CABRERA-CRESPO, J., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., MIYAJI, E. N., HO, P. L., LEITE, L. C. C., LOPES, A. P. Y. **Optimizing expression of *Streptococcus pneumoniae* Surface Protein A, PspA: serocross-reactivity within families of antisera induced against clades 1 and 3.** *Molecular Biotechnology*, v. 37, 146-154, 2007.

SONEBI, M. **Rheological properties of grouts with viscosity modifying agents as diutan gum and welan gum incorporating pulverized fly ash.** *Cement and Concrete Research* 36, 1609-1618. 2006.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Journal of Biotechnology*, v. 115, p. 113-128, 2005.

STOKELL, J. R., STECK, T. R. **Viable but Nonculturable Bacteria.** eLS, John Wiley & Sons, 2012.

STUDIER, F. W., DAEGELEN, P., LENSKI, R. E., MASLOV, S., KIM, J.F., **Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes.** *J. Mol. Biol.* 394 (2009) 653–680. 2009.

STUDIER, F. W. **Stable expression clones and aturo-induction for protein production in *E. coli*.** In: CHEN, Y. W. **Structural genomics.** *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1091, pp 17-32. 2014.

TANNER, R. I. **Engineering Rheology.** Oxford University Press, New York, 2000.

TOMAZETTO, G., MULINARI, F., STANISCHUASKI, F., SETTEMBRINI, B., CARLINI, C. R., AVUB, M. A. Z. **Expression kinetics and plasmid stability of recombinant *E. coli* encoding urease-derived peptide with bioinsecticide activity.** *Enz Microb Technol*, 41, 821–827 2007.

VÉLEZ A.M.; HORTA, A.C.L.; SILVA, A.J.; SARGO, C.R.; MATEO, E.C.; ZANGIROLAMI, T.C.; GIORDANO, R.L.C., **Produção em frascos agitados e em batelada alimentada de Penicilina G Acilase (PGA) de *Escherichia coli* Recombinante com o meio sintético HDF.** Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos, Caxias do Sul/RS, 2011.

VÉLEZ, A.M.E. **Estudo da expressão de lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenulatus* em *E. coli* recombinante.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, 2009.

VÉLEZ, A. M.; SILVA, A. J.; HORTA, A. C. L.; SARGO, C. R.; CAMPANI, G.; SILVA, G. G.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C. **High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* fed-batch cultivations.** *BMC Biotechnology*, v. 14, p. 6, 2014.

VILLADSEN, J., NIELSEN, J., LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles.** Springer Science Business Media, New York. 2011.

von STOCKAR, U., LIU, J.-S. **Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1412, 191-211. 1999.

VOULGARIS, I., ARNOLD, S. A., SPEIGHT, R., HARVEY, L. M., McNEIL, B. **Effects of dissolved oxygen availability and culture biomass at induction upon the intracellular expression of monoamine oxidase by recombinant *E. coli* in fed batch bioprocesses.** *Process Biochemistry*, 46, 721-729. 2011.

WAEGEMAN, H., De LAUSNAY, S., BEAUPREZ, J., MAERTENS, J., De MEY, M., SOETAERT, W. **Increasing recombinant protein production in *Escherichia coli* K12 through metabolic engineering.** *New biotechnology*, 30(2): 255-261. 2013.

WHITFIELD, C., ROBERTS, I. S. **Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli***. Mol. Microbiol. 31, 1307-1319. 1999.

WU, H. C. P., BOOS, W., KALCKAR, H. M., **Role of the galactose transport system in the retention of intracellular galactose in *Escherichia coli***. J. Mol. Biol. 41, 109-120. 1969.

YAZDANI, S. S., MUKHERJEE, K. J. **Continuous-culture studies on the stability and expression of recombinant streptokinase in *Escherichia coli***. Bioprocess Biosyst. Eng. 24, 314-346. 2002.

ZIMER, A. M.; CARRA, M. A. S.; RIOS, E. C.; PEREIRA, E. C.; MASCARO, L. H. **Initial stages of corrosion pits on AISI 1040 steel in sulfide solution analyzed by temporal series micrographs coupled with electrochemical techniques**. Corrosion Science, v. 76, p. 27-34, nov. 2013.

APÊNDICE A - Histogramas das medidas de comprimento celular.

Esse apêndice trás a relação completa dos histogramas das medidas de comprimento celular gerados para todas as amostras analisadas durante os experimentos.

A.1. Cultivo 1 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 37°C

Figura A.1.1. - Amostra 8,5 h.

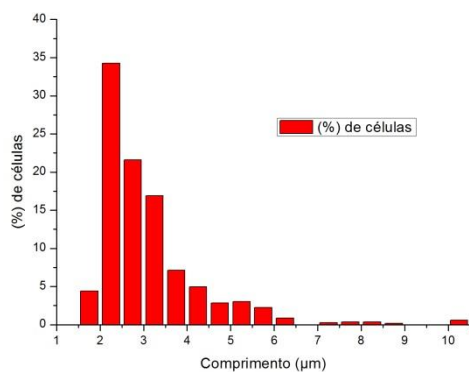


Figura A.1.2. - Amostra 10 h.

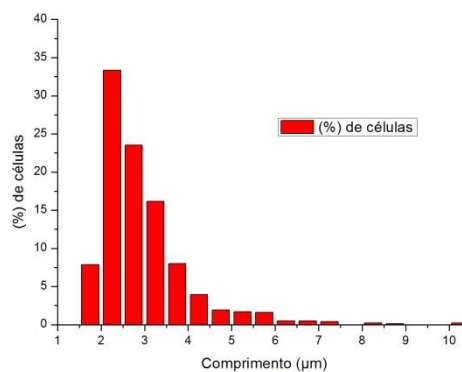


Figura A.1.3. - Amostra 11 h.

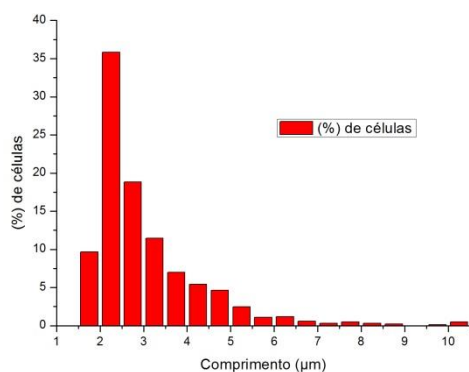


Figura A.1.4. - Amostra 12,333 h.

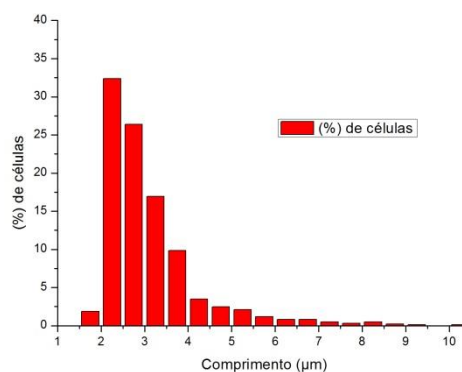
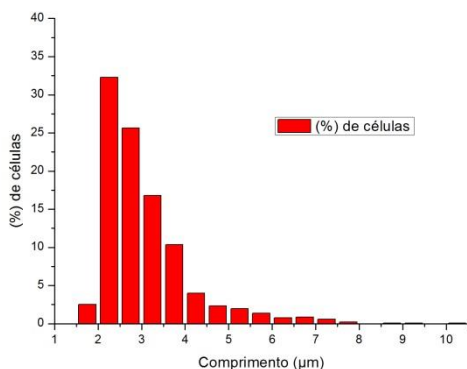
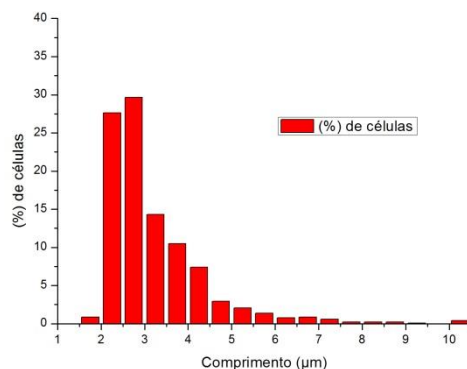
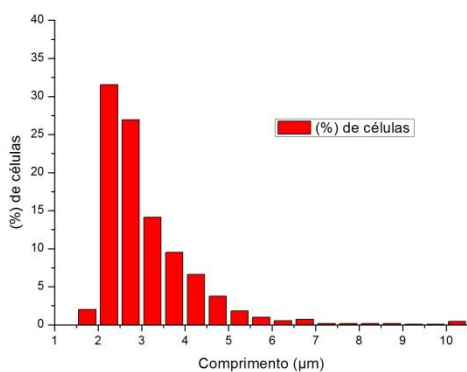


Figura A.1.5. - Amostra 13 h.**Figura A.1.6.** - Amostra 13,667 h.**Figura A.1.7.** - Amostra 15 h.

A.2. Cultivo 2 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 37°C

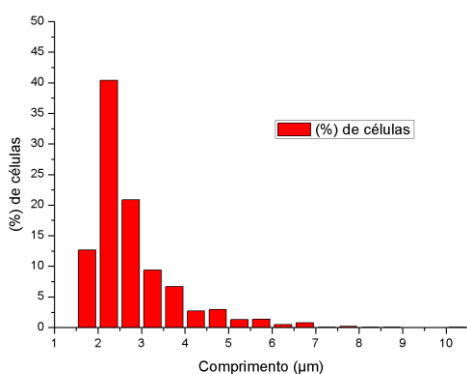
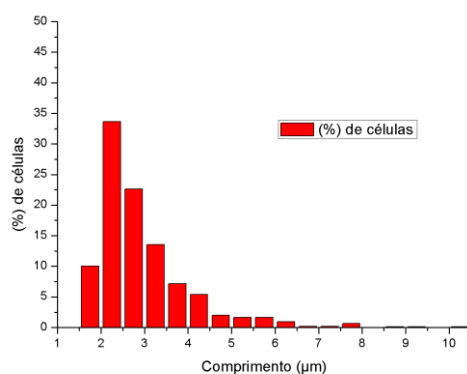
Figura A.2.1. - Amostra 7,5.**Figura A.2.2.** - Amostra 8,5 h.

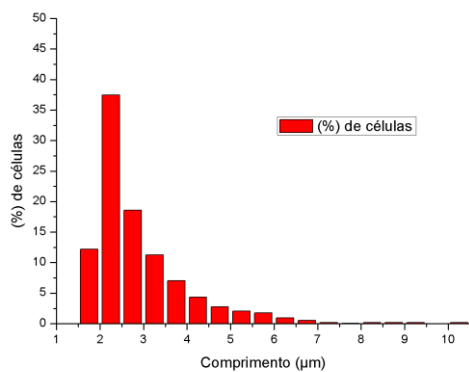
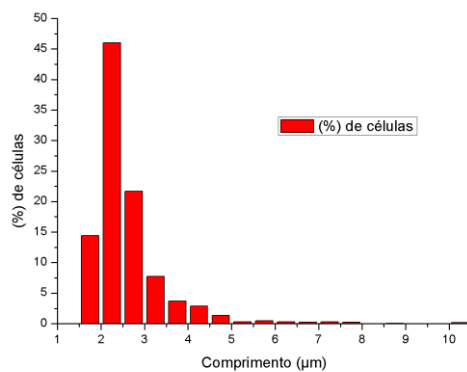
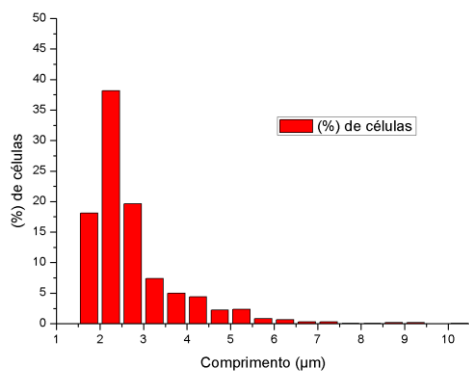
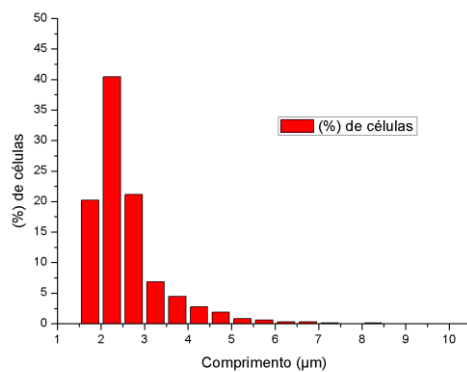
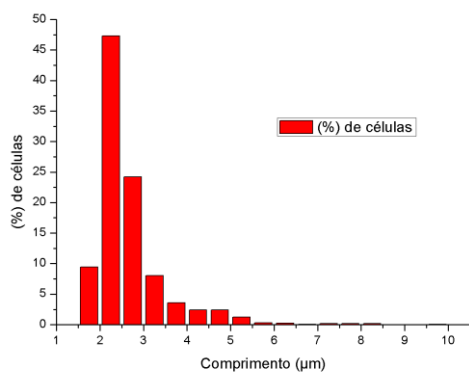
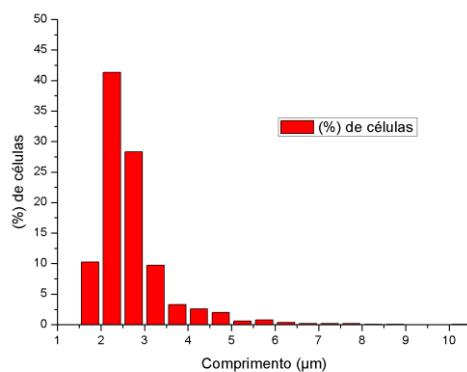
Figura A.2.3. - Amostra 9,5.**Figura A.2.4.** - Amostra 10,5 h.**Figura A.2.5.** - Amostra 11,5 h.**Figura A.2.6.** - Amostra 12,5 h.**Figura A.2.7.** - Amostra 13,5 h.**Figura A.2.8.** - Amostra 14,5 h.

Figura A.2.9. - Amostra 15,5 h.

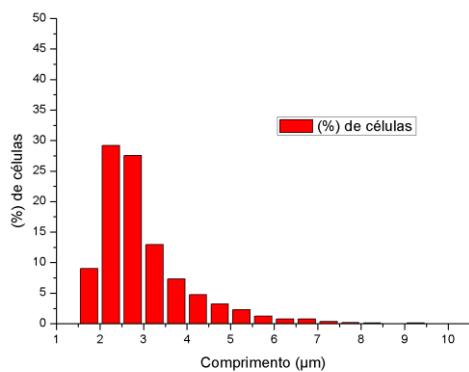


Figura A.2.10. - Amostra 16,5 h.

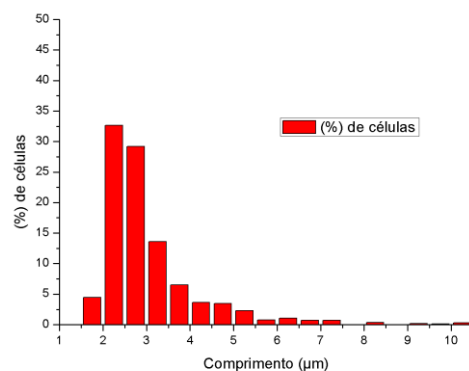


Figura A.2.11. - Amostra 17,5 h.

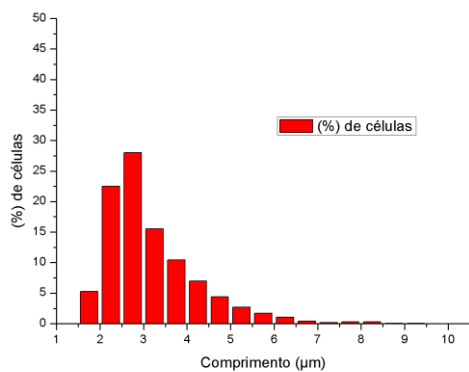


Figura A.2.12. - Amostra 18,5 h.

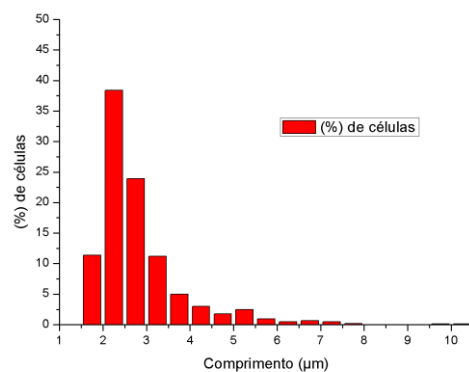


Figura A.2.13. - Amostra 19,5 h.

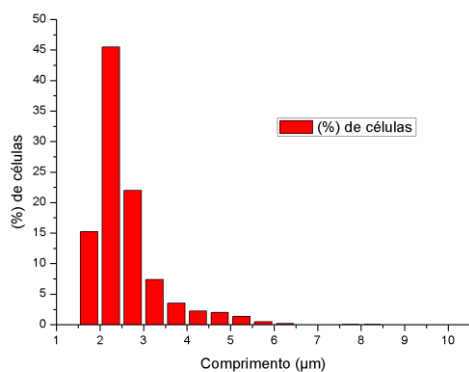
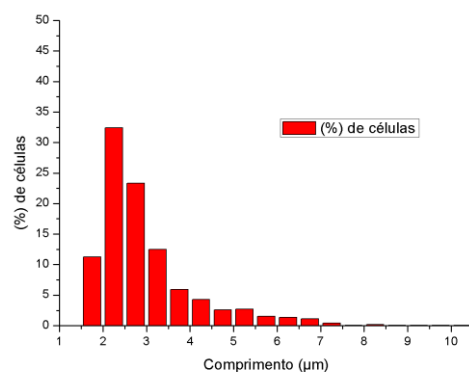


Figura A.2.14. - Amostra 20,5 h.



A.3. Cultivo 3 – *rE. coli* sem inserto com pulso de lactose a 37°C

Figura A.3.1. - Amostra 7,25 h.

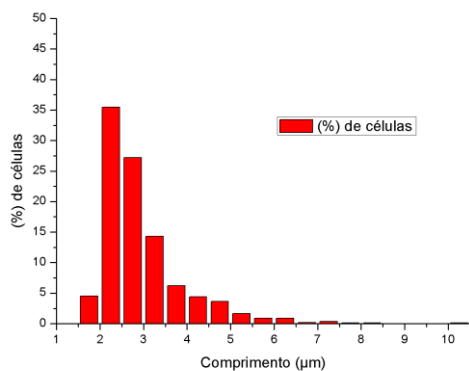


Figura A.3.2. - Amostra 8,5 h.

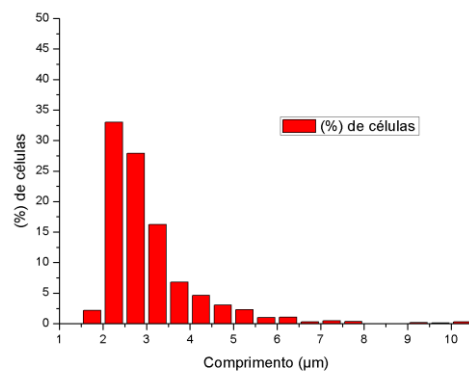


Figura A.3.3. - Amostra 9,5 h.

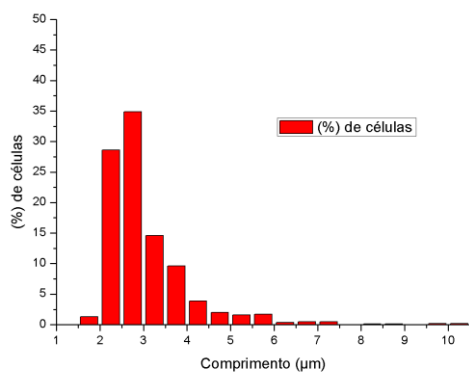


Figura A.3.4. - Amostra 10 h.

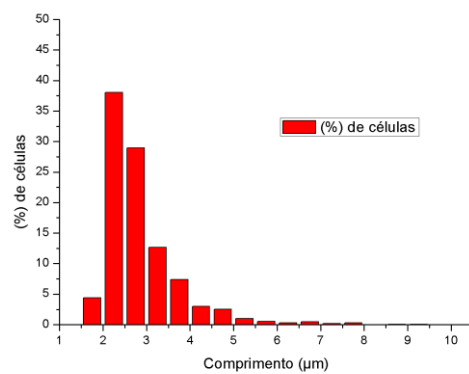


Figura A.3.5. - Amostra 10,5 h.

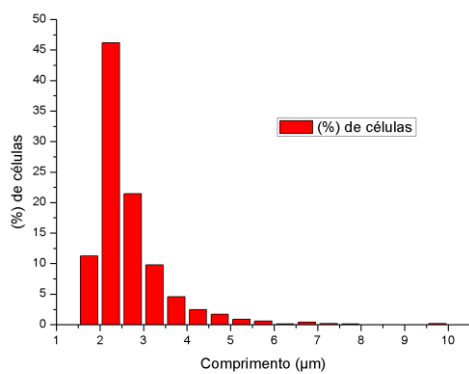


Figura A.3.6. - Amostra 11,5 h.

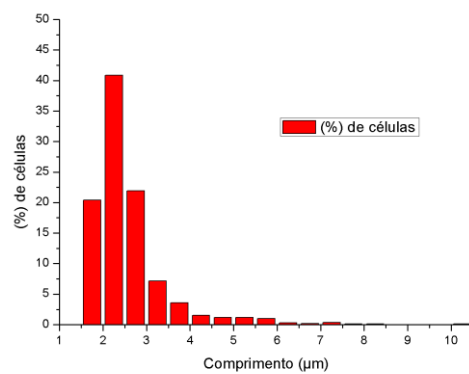
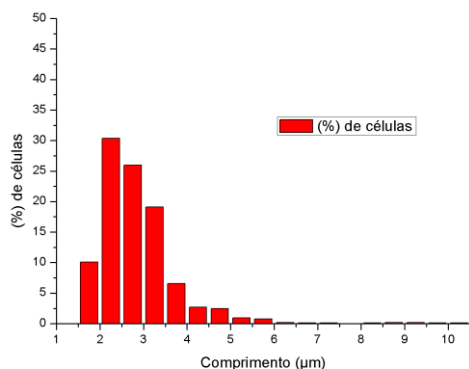


Figura A.3.7. - Amostra 12,5 h.

A.4. Cultivo 4 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 27°C

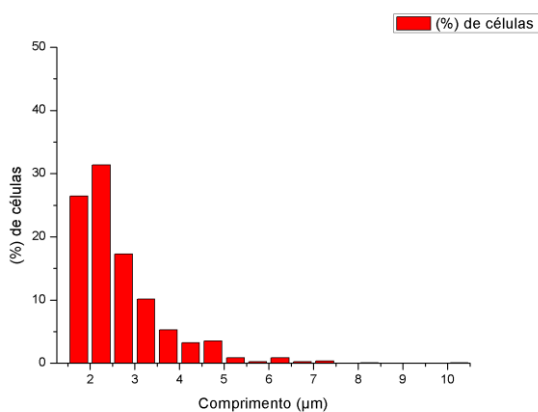
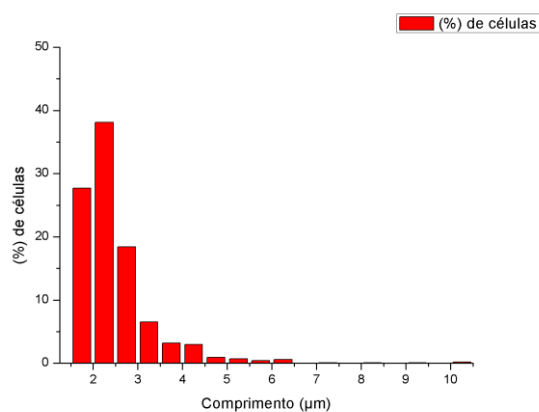
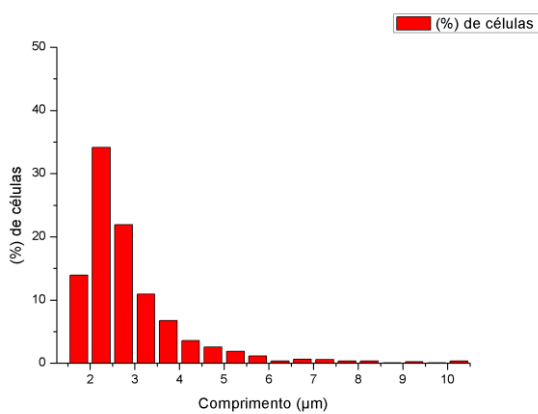
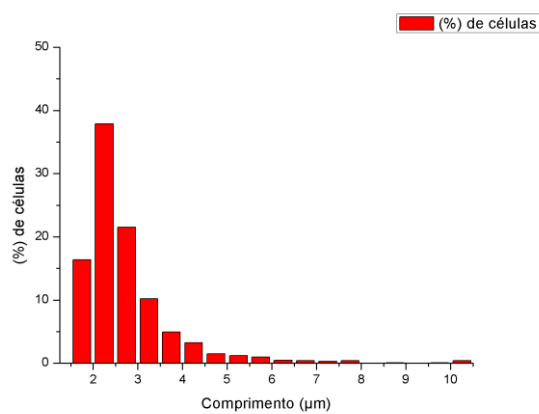
Figura A.4.1. - Amostra 15,5 h.**Figura A.4.2.** - Amostra 16,25 h.**Figura A.4.3.** - Amostra 17,75 h.**Figura A.4.4.** - Amostra 19,5 h.

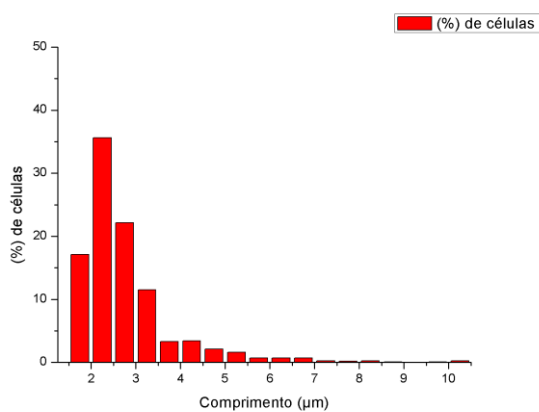
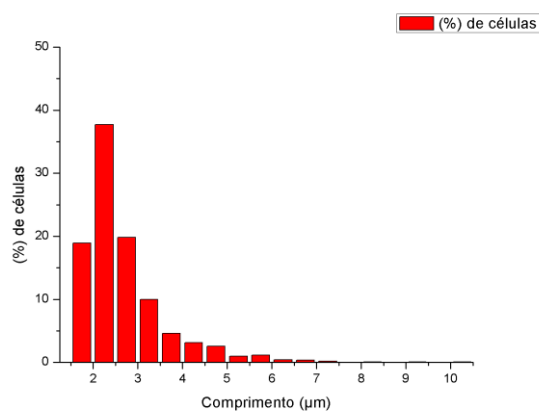
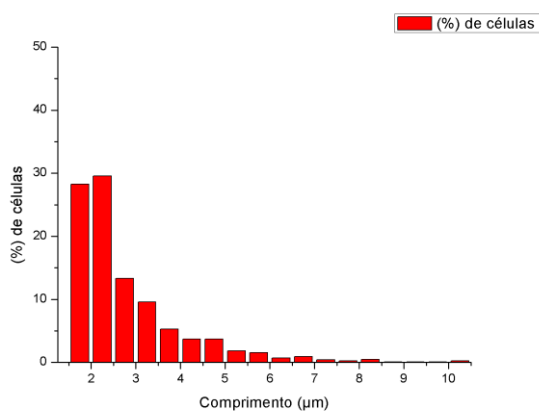
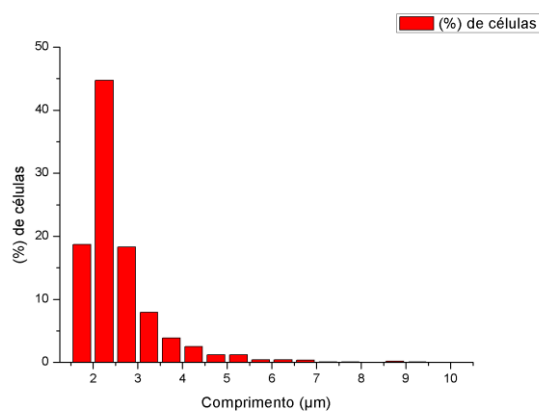
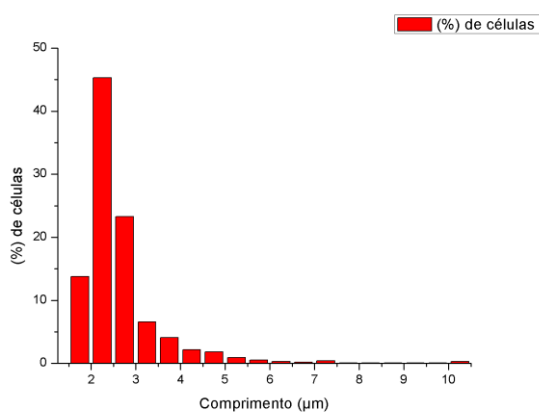
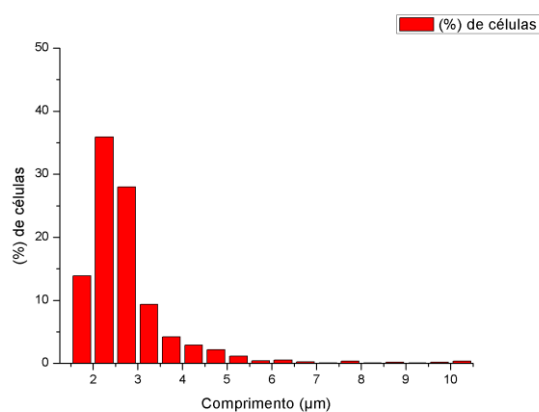
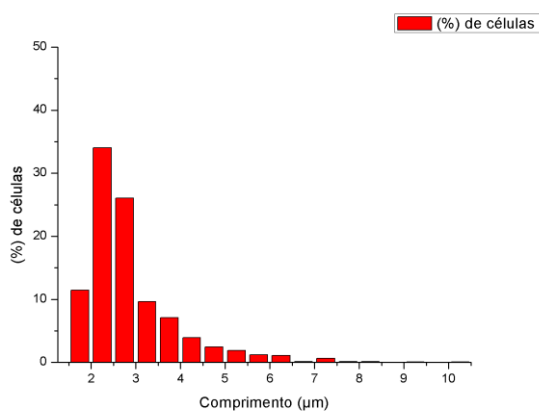
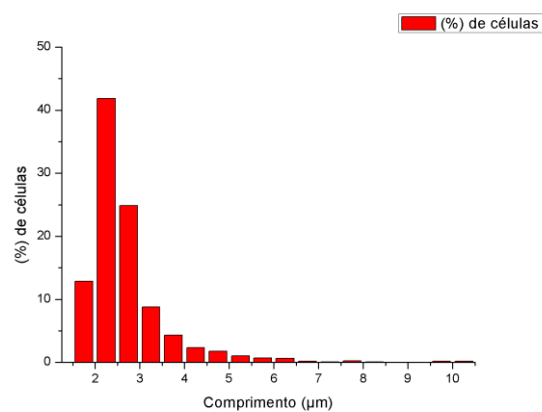
Figura A.4.5. - Amostra 20 h.**Figura A.4.6.** - Amostra 21,5 h.**Figura A.4.7.** - Amostra 22,5 h.**Figura A.4.8.** - Amostra 23,5 h.**Figura A.4.9.** - Amostra 24,5 h.**Figura A.4.10.** - Amostra 25,5 h.

Figura A.4.11. - Amostra 26,5 h.**Figura A.4.12.** - Amostra 27,5 h.

A.5. Cultivo 5 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 27°C

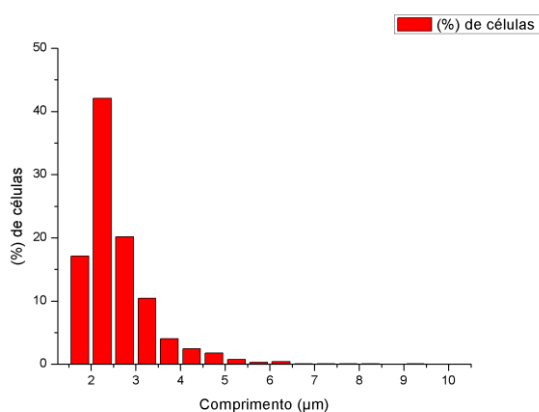
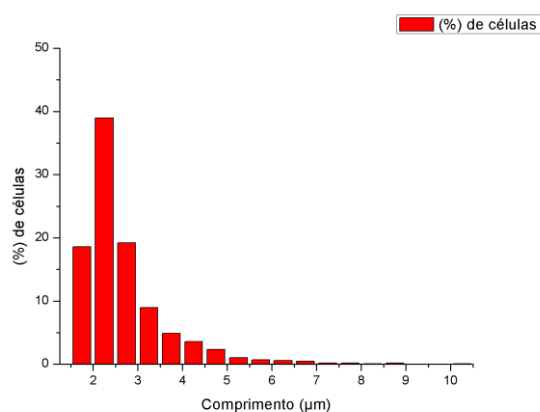
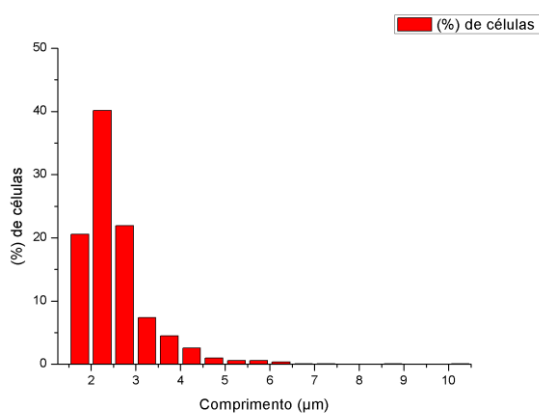
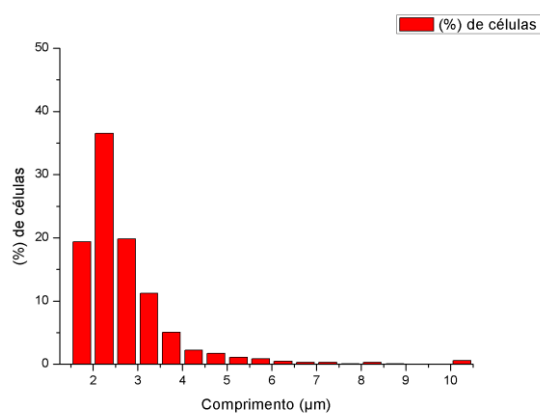
Figura A.5.1. - Amostra 13 h.**Figura A.5.2.** - Amostra 15,5 h.**Figura A.5.3.** - Amostra 17,5 h.**Figura A.5.4.** - Amostra 18,5 h.

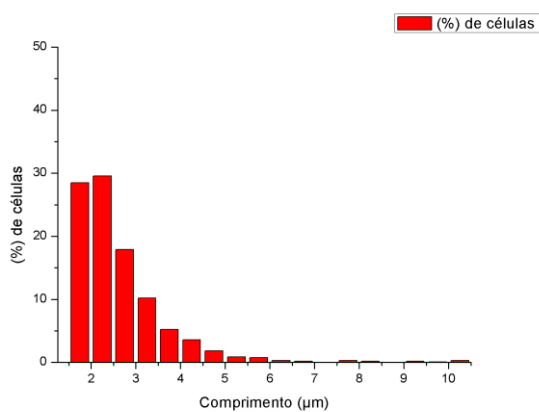
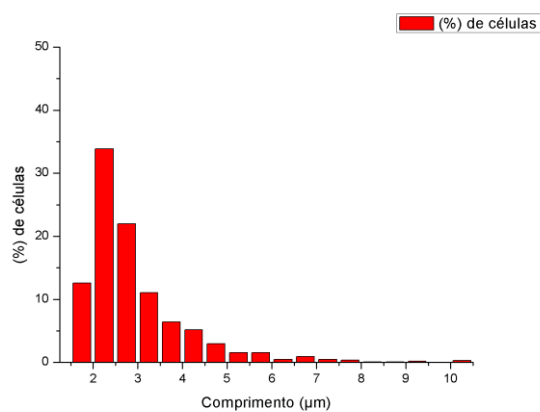
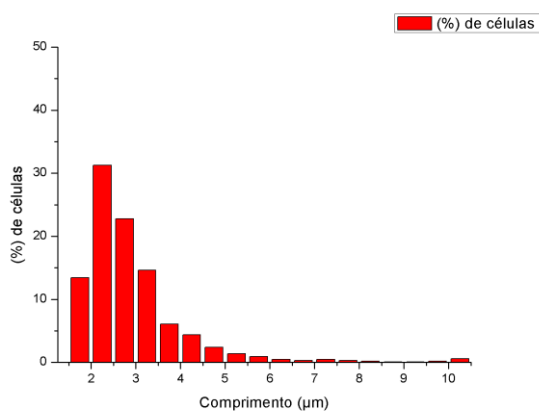
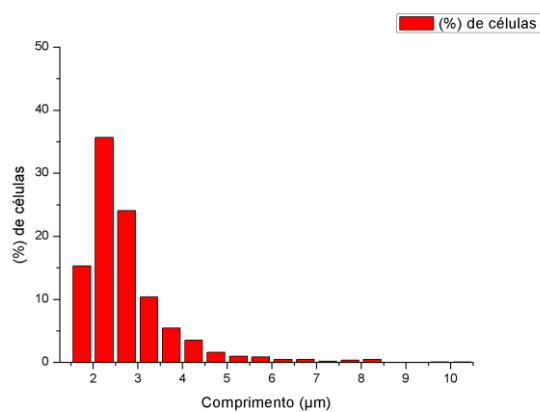
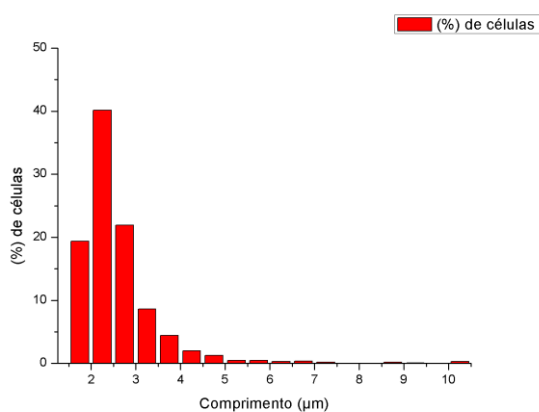
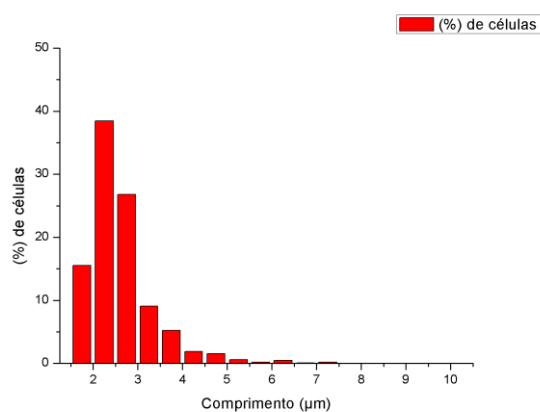
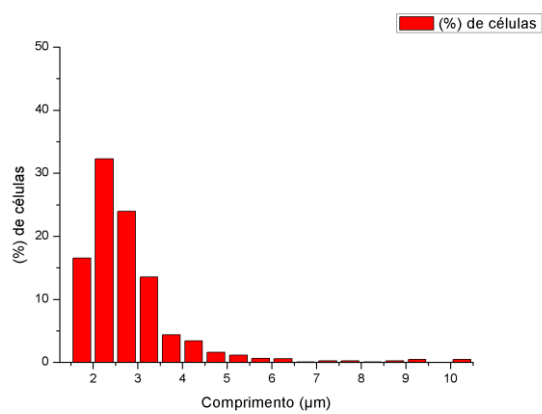
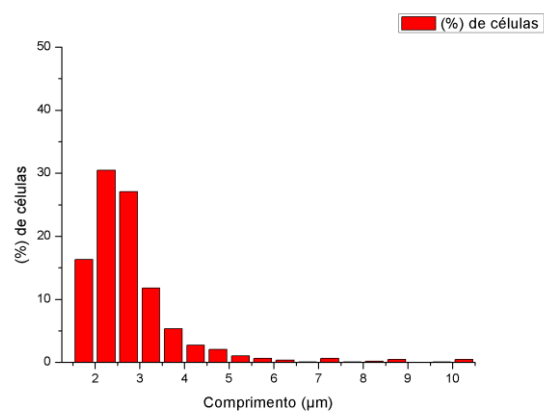
Figura A.5.5. - Amostra 19,5 h.**Figura A.5.6.** - Amostra 21,5 h.**Figura A.5.7.** - Amostra 23,5 h.**Figura A.5.8.** - Amostra 25,5 h.**Figura A.5.9.** - Amostra 27,5 h.**Figura A.5.10.** - Amostra 29,5 h.

Figura A.5.11. - Amostra 31,5 h.**Figura A.5.12.** - Amostra 34,5 h.

APÊNDICE B - Histogramas das medidas de volume celular.

Esse apêndice trás a relação completa dos histogramas das medidas de volume celular gerados para todas as amostras analisadas durante os experimentos.

B.1. Cultivo 1 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 37°C

Figura B.1.1. - Amostra 8,5 h.

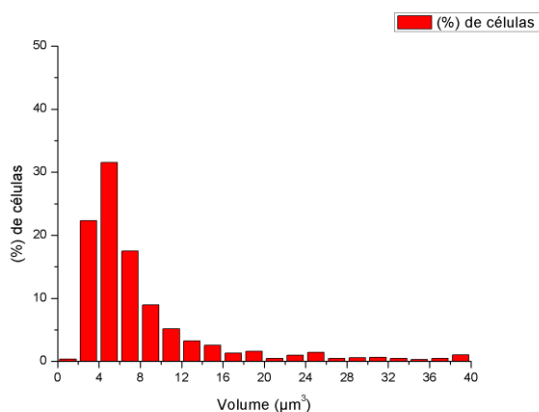


Figura B.1.2. - Amostra 10 h.

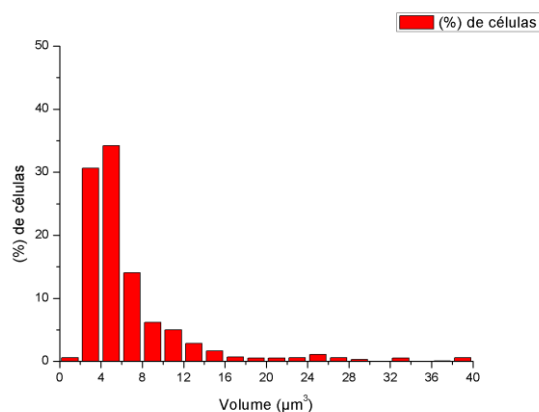


Figura B.1.3. - Amostra 11 h.

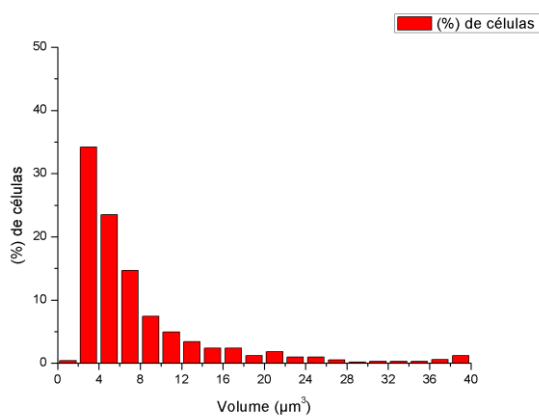


Figura B.1.4. - Amostra 12,333 h.

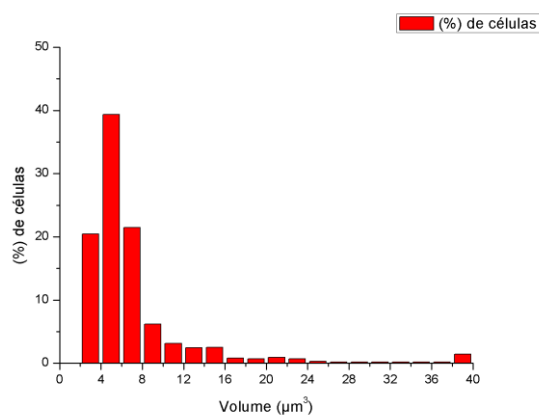
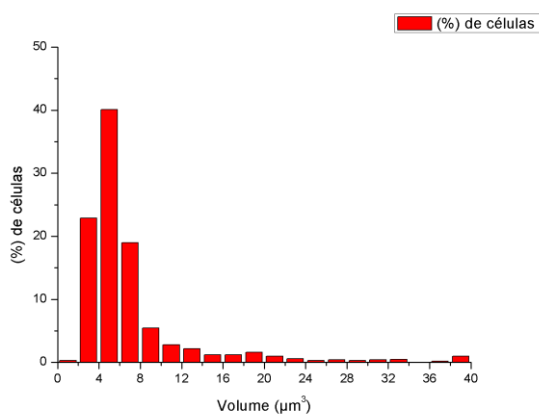
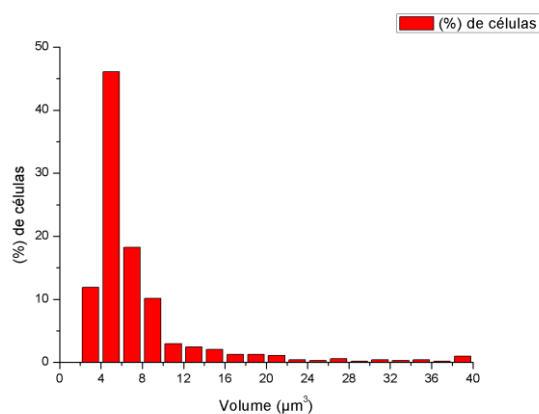
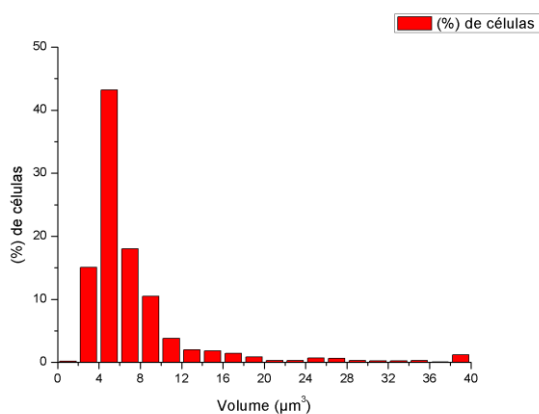


Figura B.1.5. - Amostra 13 h.**Figura B.1.6.** - Amostra 13,667 h.**Figura B.1.7.** - Amostra 15 h.

B.2. Cultivo 2 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 37°C

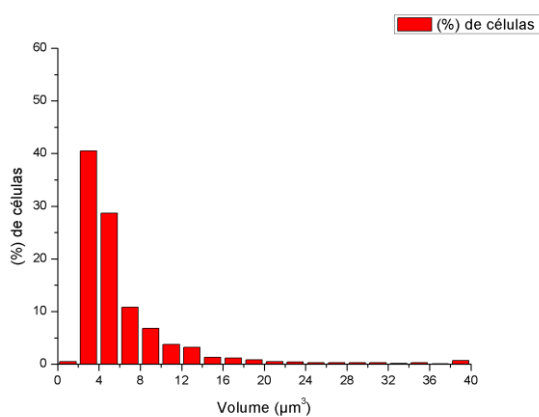
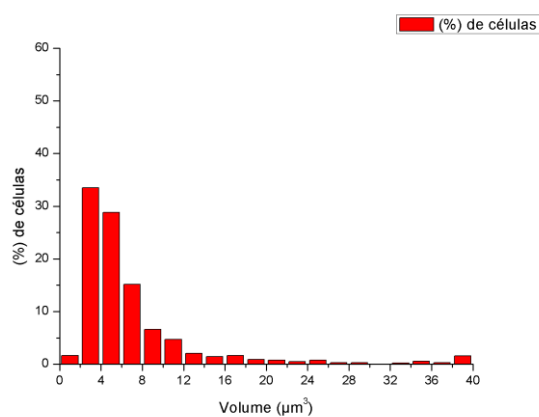
Figura B.2.1. - Amostra 7,5 h.**Figura B.2.2.** - Amostra 8,5 h.

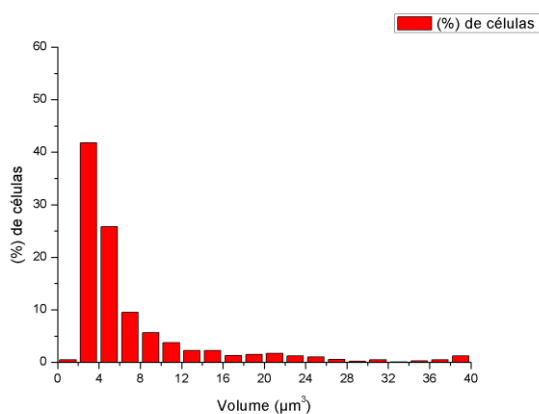
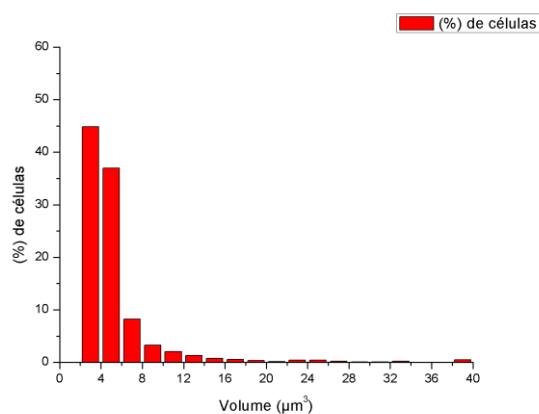
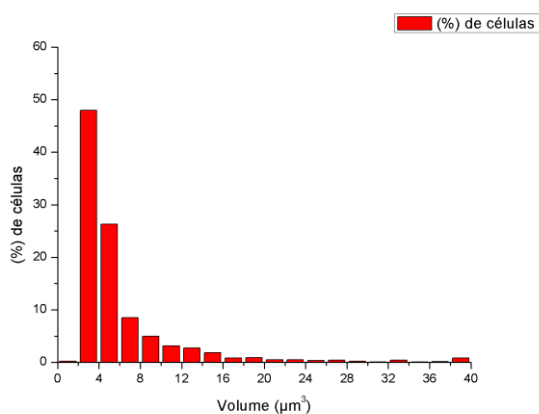
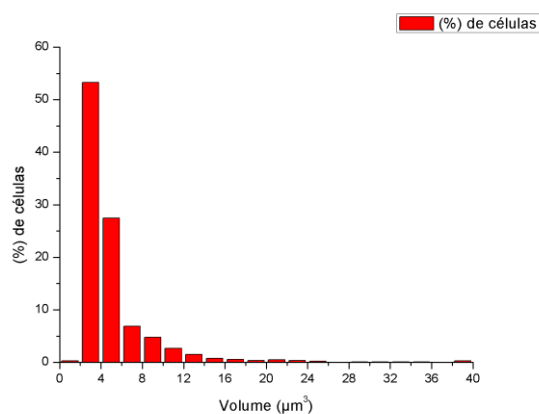
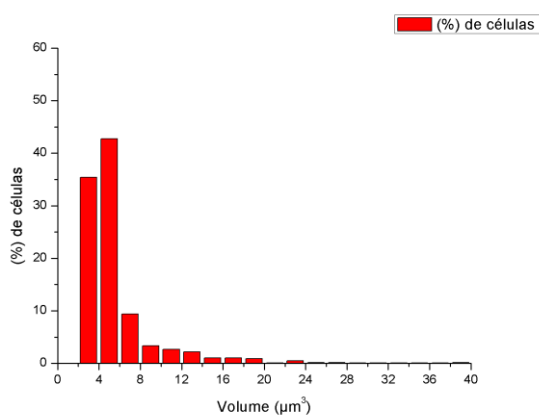
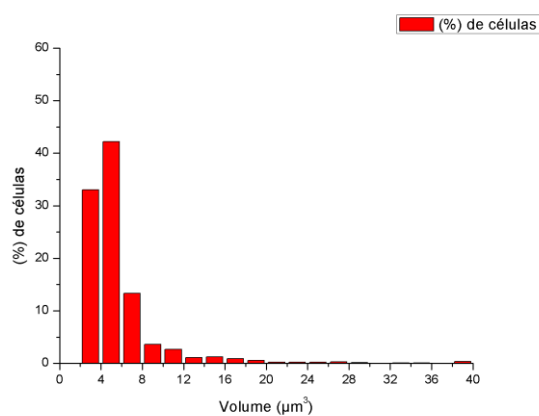
Figura B.2.3. - Amostra 9,5 h.**Figura B.2.4.** - Amostra 10,5 h.**Figura B.2.5.** - Amostra 11,5 h.**Figura B.2.6.** - Amostra 12,5 h.**Figura B.2.7.** - Amostra 13,5 h.**Figura B.2.8.** - Amostra 14,5 h.

Figura B.2.9. - Amostra 15,5 h.

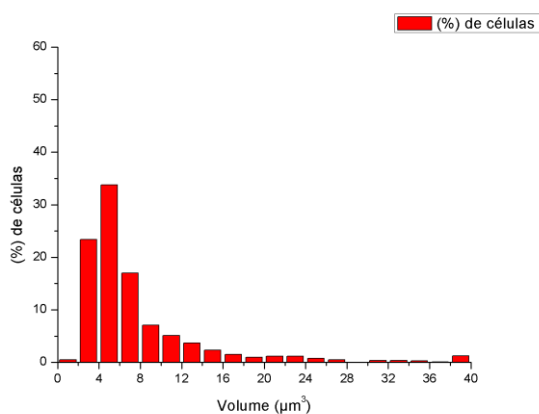


Figura B.2.10. - Amostra 16,5 h.

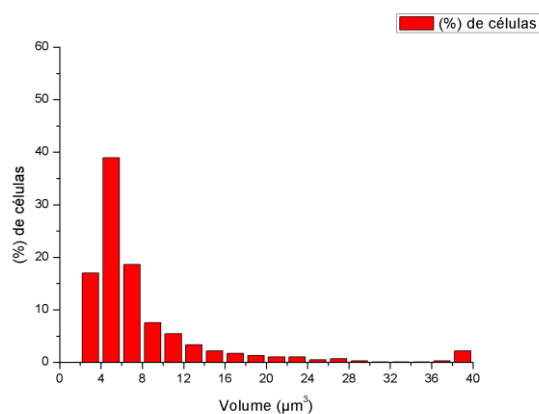


Figura B.2.11. - Amostra 17,5 h.

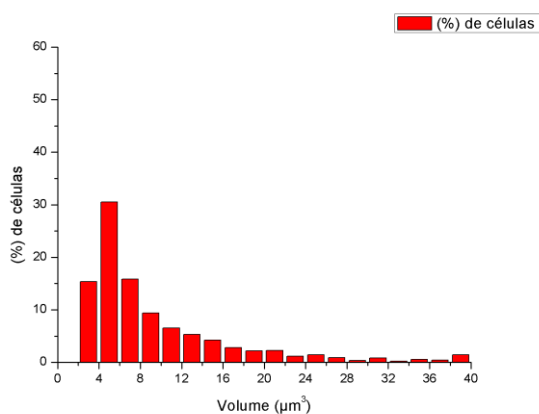


Figura B.2.12. - Amostra 18,5 h.

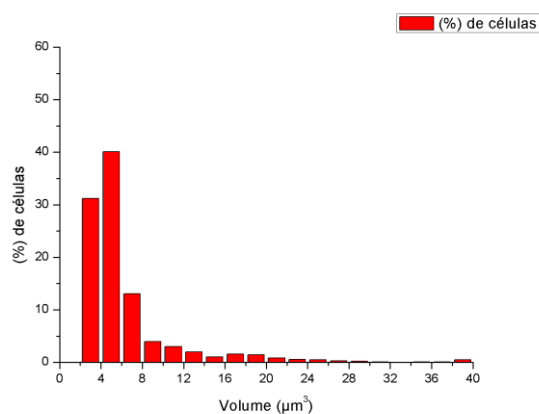


Figura B.2.13. - Amostra 19,5 h.

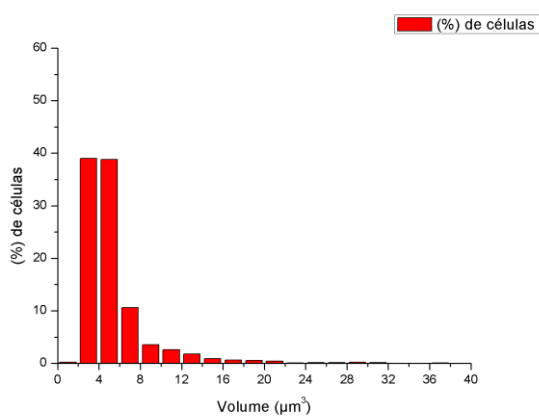
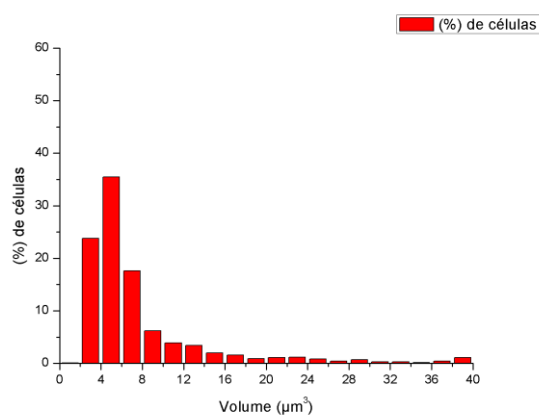


Figura B.2.14. - Amostra 20,5 h.



B.3. Cultivo 3 – *rE. coli* sem inserto com pulso de lactose a 37°C

Figura B.3.1. - Amostra 7,25 h.

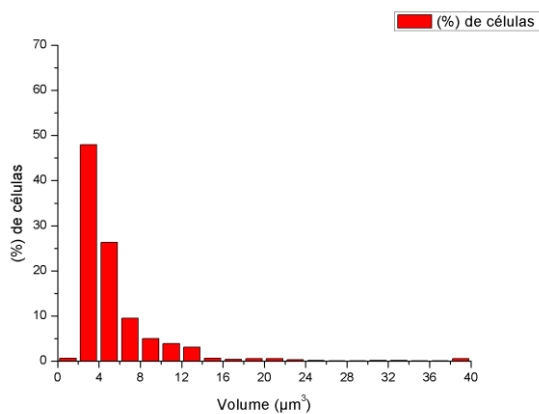


Figura B.3.2. - Amostra 8,5 h.

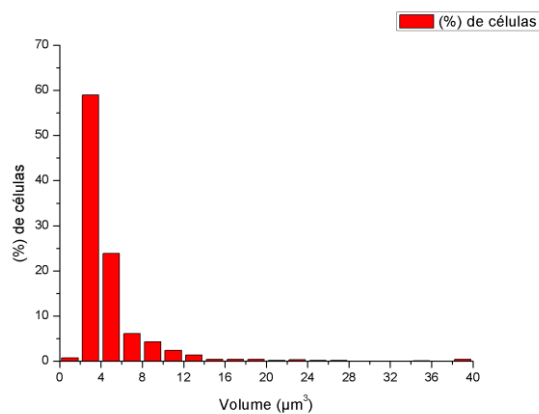


Figura B.3.3. - Amostra 9,5 h.

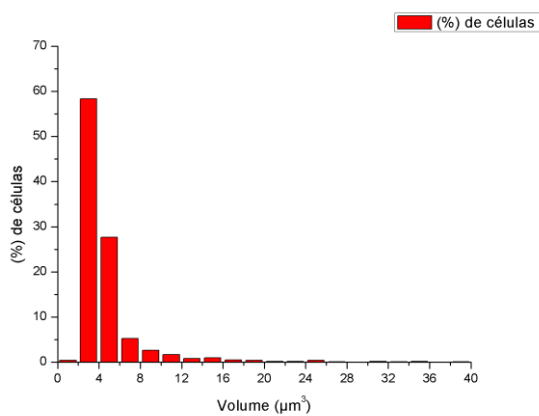


Figura B.3.4. - Amostra 10 h.

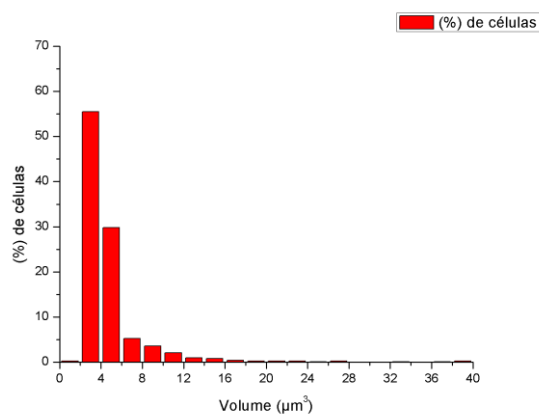


Figura B.3.5. - Amostra 10,5 h.

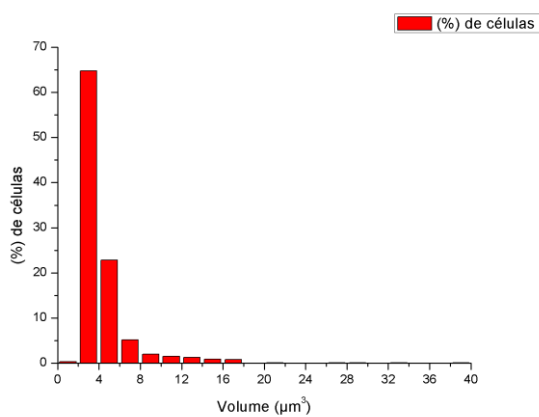


Figura B.3.6. - Amostra 11,5 h.

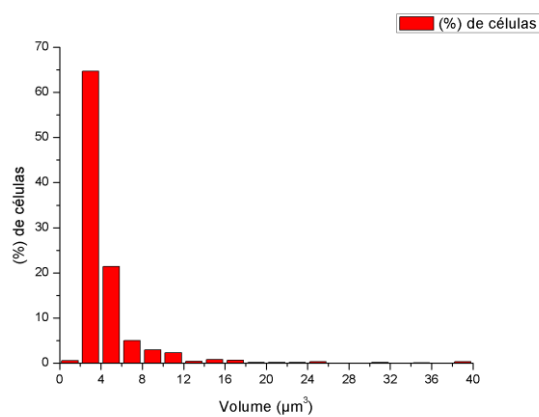
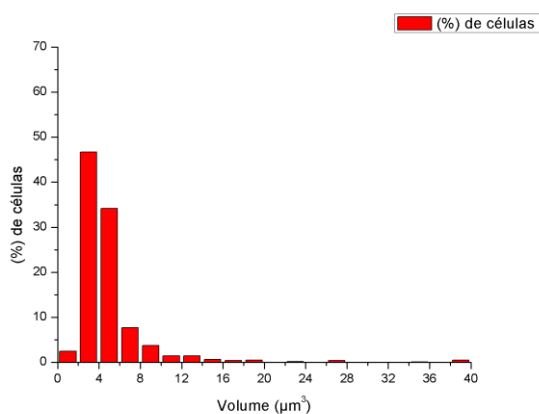


Figura B.3.7. - Amostra 12,5 h.

B.4. Cultivo 4 – Expressão de PspA4Pro induzida por IPTG a 27°C

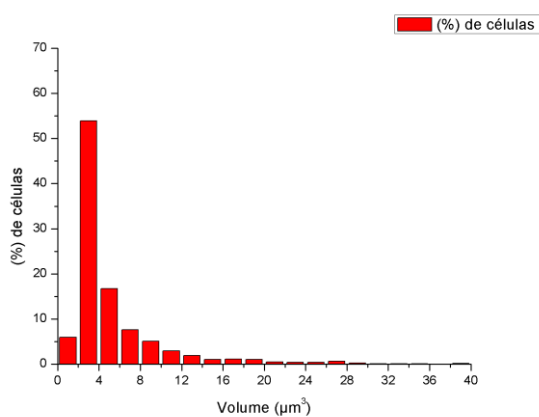
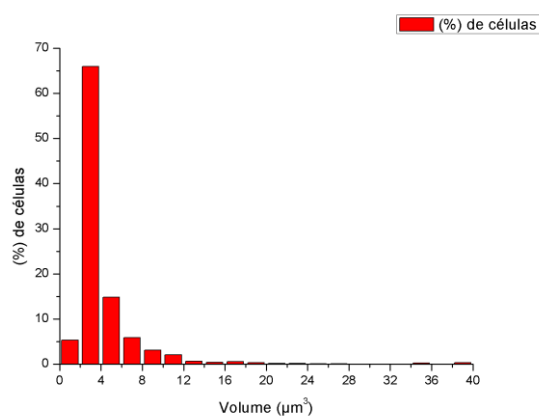
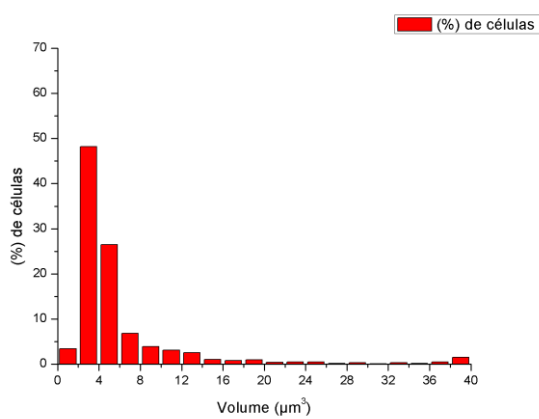
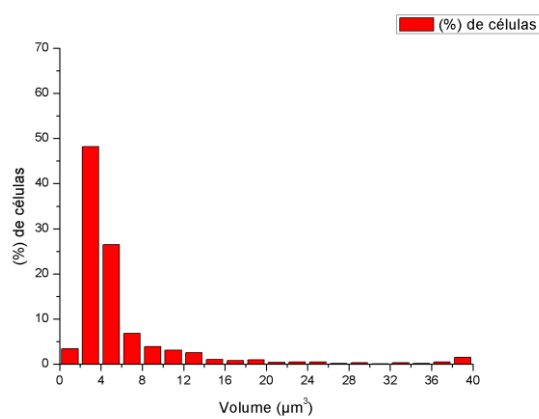
Figura B.4.1. - Amostra 15,5 h.**Figura B.4.2.** - Amostra 16,25 h.**Figura B.4.3.** - Amostra 17,75 h.**Figura B.4.4.** - Amostra 19,5 h.

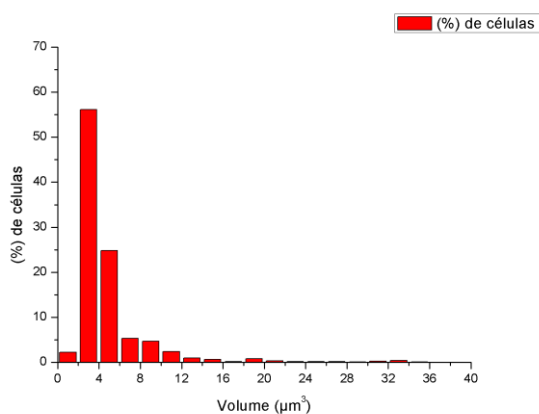
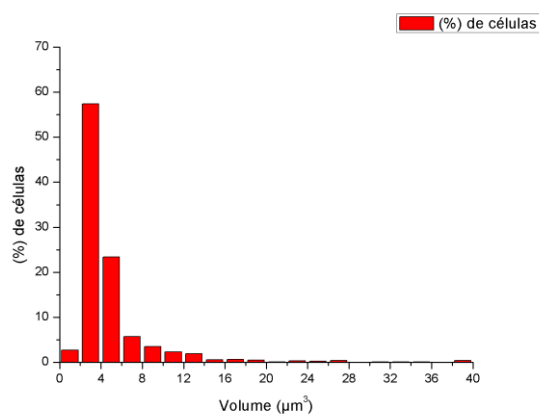
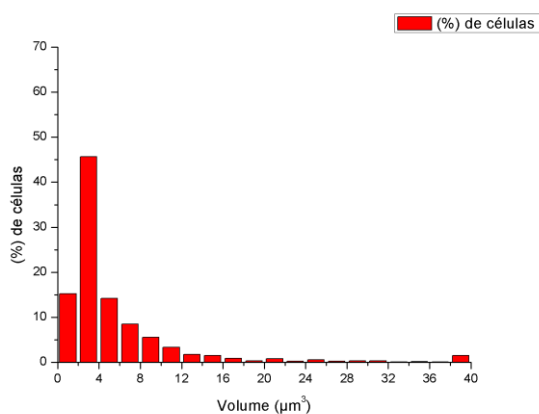
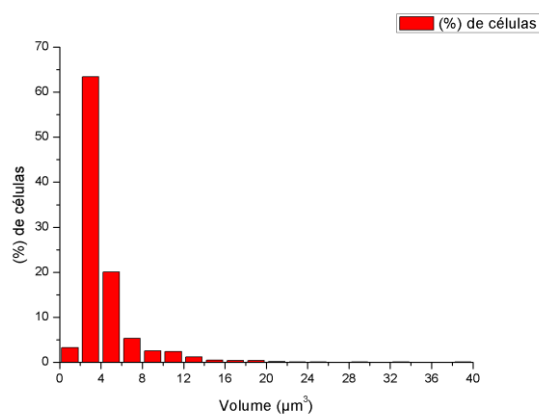
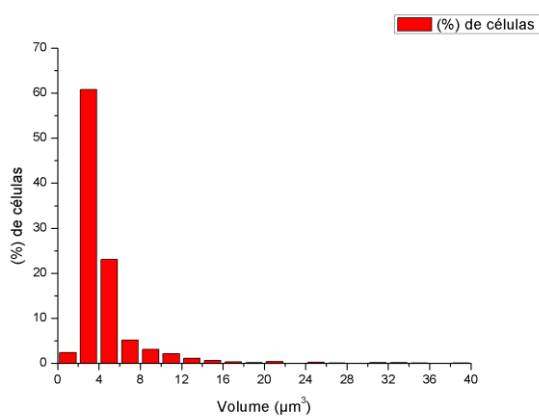
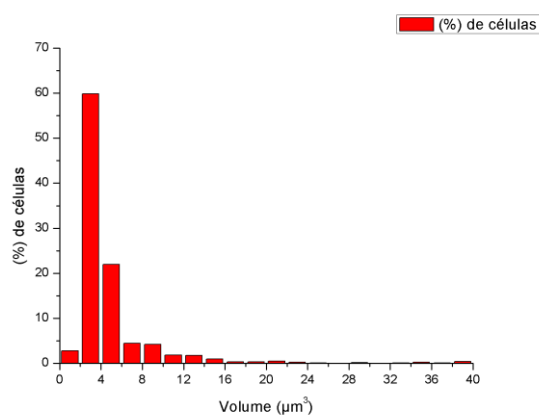
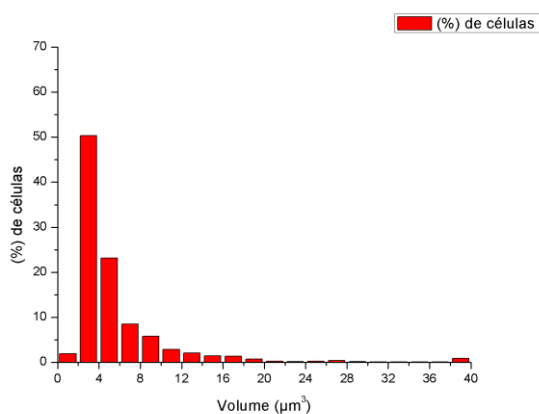
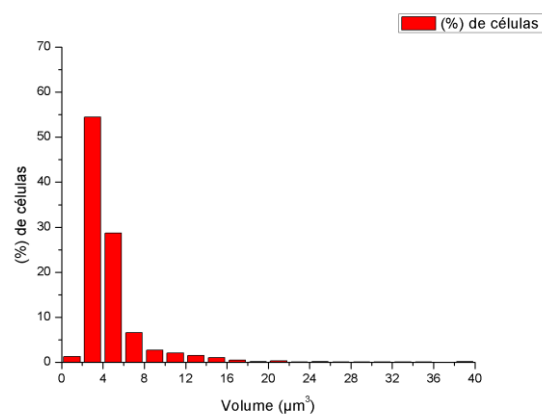
Figura B.4.5. - Amostra 20 h.**Figura B.4.8.** - Amostra 21,5 h.**Figura B.4.6.** - Amostra 22,5 h.**Figura B.4.9.** - Amostra 23,5 h.**Figura B.4.7.** - Amostra 24,5 h.**Figura B.4.10.** - Amostra 25,5 h.

Figura B.4.11. - Amostra 26,5 h.**Figura B.4.12.** - Amostra 27,5 h.

B.5. Cultivo 5 – Expressão de PspA4Pro induzida por lactose a 27°C

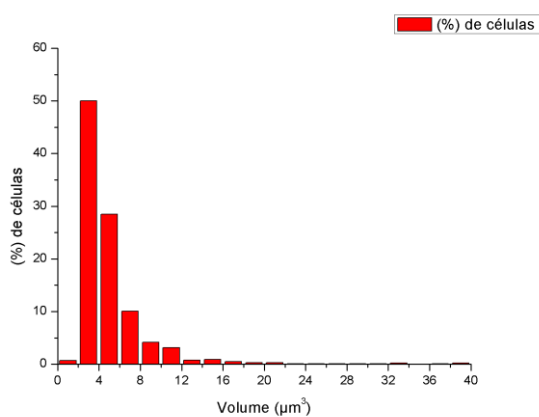
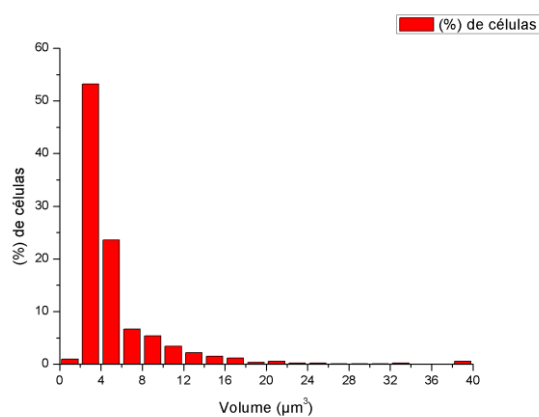
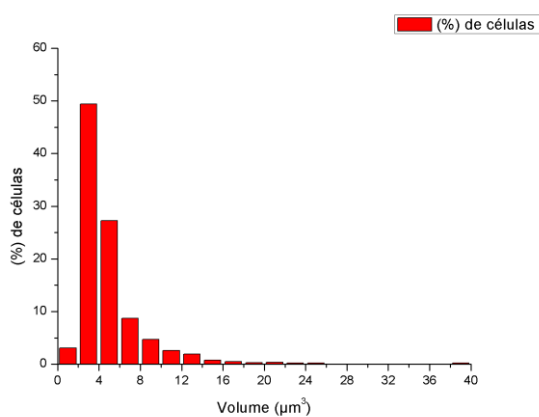
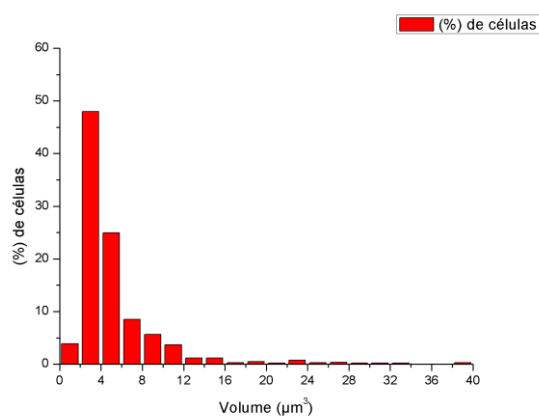
Figura B.5.1. - Amostra 13 h.**Figura B.5.2.** - Amostra 15,5 h.**Figura B.5.3.** - Amostra 17,5 h.**Figura B.5.4.** - Amostra 18,5 h.

Figura B.5.5. - Amostra 19,5 h.

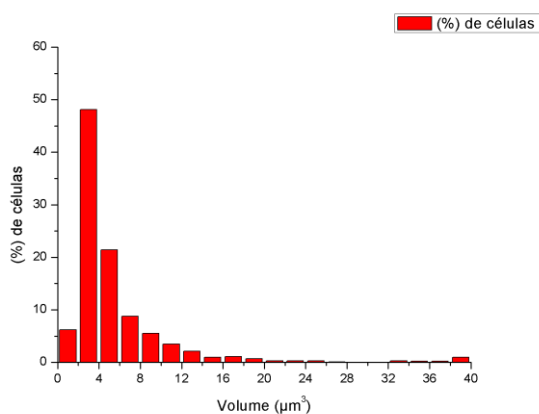


Figura B.5.6. - Amostra 21,5 h.

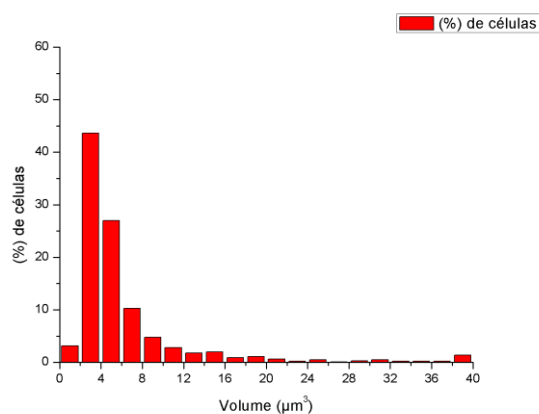


Figura B.5.7. - Amostra 23,5 h.

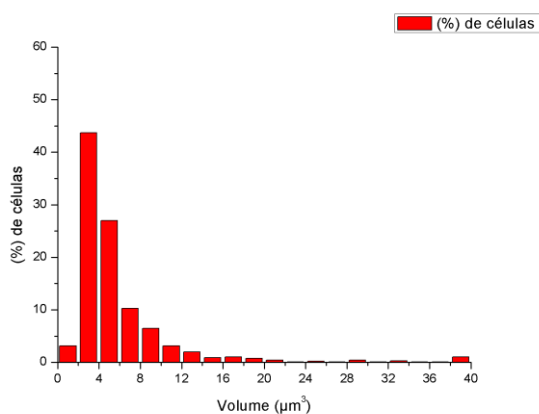


Figura B.5.8. - Amostra 25,5 h.

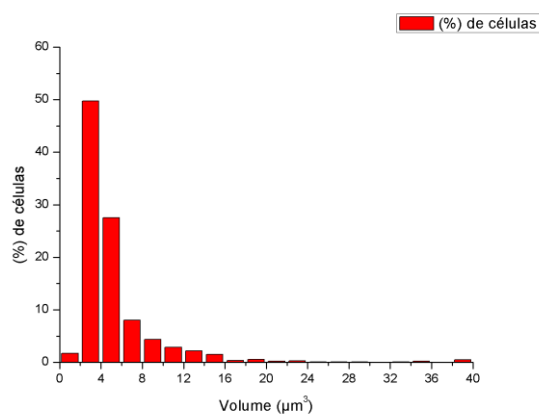


Figura B.5.9. - Amostra 27,5 h.

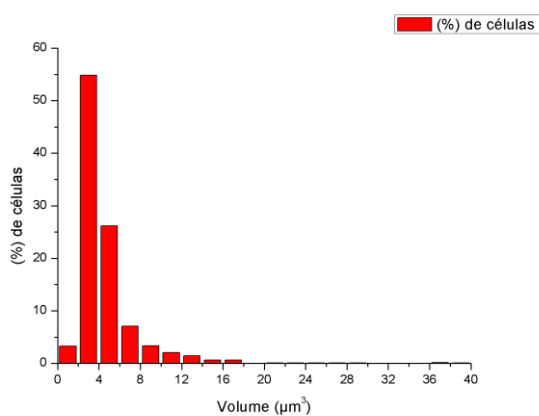


Figura B.5.10. - Amostra 29,5 h.

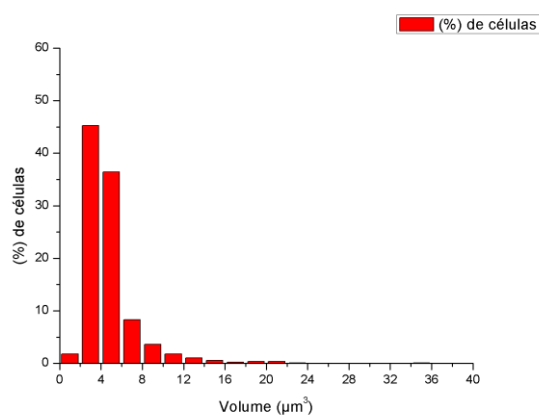
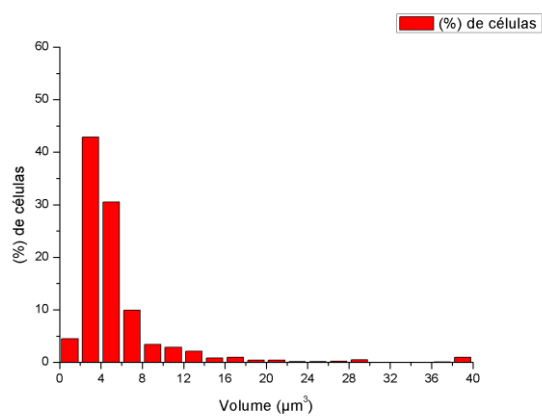


Figura B.5.11. - Amostra 31,5 h.**Figura B.5.12. - Amostra 34,5 h.**