

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS– UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SHEYLA ALEXANDRA HIDALGO PAREDES

***Escherichia coli* DETOXIFICADA COMO PLATAFORMA PARA
PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE A DE SUPERFÍCIE DE
PNEUMOCOCO**

SÃO CARLOS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS– UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

SHEYLA ALEXANDRA HIDALGO PAREDES

***Escherichia coli* DETOXIFICADA COMO PLATAFORMA PARA
PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE A DE SUPERFÍCIE DE
PNEUMOCOCO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

Co-orientadora:

Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

SÃO CARLOS

2018

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE SHEYLA ALEXANDRA HIDALGO PAREDES APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 02 DE MARÇO DE 2018.

BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirolami
Orientadora, UFSCar


Viviane Maimoni Gonçalves
Instituto Butantan


Álvaro de Baptista Neto
UNESP


Cíntia Regina Sargo
UFSCar

Dedico este trabalho à minha família
pelo suporte e incentivo dado ao longo
do caminho mesmo estando longe.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me apoiaram ao longo do caminho, incentivando-me sempre a crescer pessoal e profissionalmente e seguir os meus sonhos aonde quer que eles me levem.

À meus irmãos por sempre estarem ao meu lado quando mais preciso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, pelo incentivo, dedicação, paciência e ensinamentos, sendo um exemplo de profissional.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves que acrescentou muito ao trabalho desenvolvido, com conhecimento e me recebendo no Instituto Butantan para treinamento.

À Valdemir Cardoso pela ajuda nos experimentos, pelas noites mal dormidas e pela amizade ao longo do mestrado.

Aos colegas de trabalho, pela ajuda nos experimentos, companheirismo e trocas de conhecimento, em especial a: Cíntia Sargo, Thiago Mesquita, Matheus Harth, Thais Baldez, Gilson Campani e tantos outros colegas de laboratório.

À Universidade Federal de São Carlos e ao programa de Pós-Graduação de Engenharia Química por disponibilizarem laboratórios, equipamentos e diversos recursos que tornaram possível a elaboração deste trabalho.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: CNPq e FAPESP.

RESUMO

Um dos principais desafios na produção de proteínas terapêuticas por *Escherichia coli* é a obtenção de um produto de alta pureza. Dentre os principais contaminantes (ácidos nucleicos, polissacarídeos e proteínas contaminantes) os lipopolissacarídeos merecem especial atenção, uma vez que possuem ação inflamatória e podem levar ao choque séptico em mamíferos, por esta razão a sua remoção é crucial. Recentemente tornou-se disponível comercialmente a ClearColi, linhagem de *E. coli* capaz de produzir proteínas recombinantes com reduzida atividade endotóxica. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção do fragmento de proteína A de superfície do pneumococo (PspA) em ClearColi, o crescimento e as respostas fisiológicas dessas células, sob diferentes condições de crescimento e indução. Experimentos em *shaker* foram realizados com meio definido (HDF) contendo glicerol como fonte de carbono, utilizou-se como indutores lactose e IPTG, nas temperaturas de 37, 32 e 27 °C, de acordo com a metodologia de planejamento fatorial 2². Foram determinadas as concentrações de biomassa (DO_{600nm}), ácidos nucleicos (Abs_{260nm}), polissacarídeos (método fenol-sulfúrico), lipopolissacarídeos (método KDO) e proteínas, tanto a PspA quanto as contaminantes (Bradford e eletroforese seguida de densitometria). Experimentos semelhantes foram realizados com a plataforma convencional de produção dessa proteína recombinante, baseada em *E. coli* BL21 (DE3), para comparação. Também foi realizado um cultivo com ClearColi em biorreator tipo tanque agitado, em batelada, empregando a melhor condição identificada nos experimentos em *shaker*. Por meio dos experimentos em *shaker* verificou-se que a velocidade específica máxima de crescimento da ClearColi foi cerca de 25 % menor do que a observada para a *E. coli* convencional. A maior produção específica de PspA foi alcançada na temperatura de 32 °C com a mistura de IPTG e lactose, como indutores, sendo 165 ± 3 mg/gMS com ClearColi e 221 ± 13 mg/gMS com *E. coli* BL21. Verificou-se também que a produção de proteínas contaminantes não foi influenciada por nenhuma das condições avaliadas para ClearColi, enquanto para *E. coli* BL21 foi menor a 32°C. Em relação à formação de ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos, observou-se que são produzidos majoritariamente durante a fase exponencial, para a maioria das condições estudadas, portanto, a sua minimização depende da escolha de condições de cultivo durante a fase exponencial. A partir dos dados do biorreator, obteve-se a produtividade em biomassa de 0,63 gMS/Lh e em proteína de interesse de 81,2 mgPspA/Lh. As produtividades alcançadas com a ClearColi são cerca de 64 % inferiores às obtidas com a BL21 devido ao maior tempo requerido para o cultivo com ClearColi. No entanto, a linhagem detoxificada apresentou como vantagem altos valores de produção específica de PspA e uma baixa produção de proteínas contaminantes, quando comparada a linhagem convencional. Além disso a ClearColi produz LPS modificados que não provocam reação pirogênica significativa. Assim, o presente estudo demonstrou que o emprego da cepa detoxificada como plataforma de produção de proteínas recombinantes em escala industrial é tecnicamente possível e apresenta-se como uma alternativa bastante interessante para a produção de proteínas terapêuticas.

Palavra-chave: ClearColi, *E. coli* detoxificada, PspA, proteína contaminante, lipopolissacarídeos, indução, temperatura.

ABSTRACT

One of the main challenges in the therapeutic proteins production using *Escherichia coli* is to obtain a high purity product. Among the main contaminants (nucleic acids, polysaccharides and contaminating proteins) lipopolysaccharides deserve special attention, since its inflammatory action can lead to septic shock in mammals and for this reason its removal is crucial. Recently a *E. coli* genetically modified strain capable of producing recombinant proteins with low endotoxic response became commercially available and it is known as ClearColi. In this context, the purpose of the present study was to evaluate the pneumococcal surface protein A fragment (PspA) production in ClearColi as well as the growth and the physiological responses under different growth and induction conditions. The experiments were performed on shaker using a chemically defined medium (HDF) with glycerol as the main carbon source and lactose and IPTG, as inducers, at 37, 32 and 27 °C, using the factorial 2² design method. From the samples were determined the concentrations of biomass (DO_{600nm}), nucleic acids (Abs_{260nm}), polysaccharides (phenol-sulfuric method), lipopolysaccharides (KDO method) and proteins such as PspA and the contaminants (Bradford and electrophoresis followed by densitometry). Similar experiments were performed with a conventional production platform of this recombinant protein, based on *E. coli* BL21 (DE3), for comparison. In addition, an experiment using a stirred bioreactor was performed in the best conditions identified in the preliminary experiments on shaker. Thus, as results of the shaker experiments, ClearColi maximum specific growth rate was found to be about 25% smaller than the achieve with conventional *E. coli*. The highest PspA specific production was achieved using the inducer mixture at 32 ° C, being 165 ± 3 mg/gDCW for ClearColi and 221 ± 13 mg/gDCW for *E. coli* BL21. It was also found that the production of contaminating proteins was not influenced by any of the conditions evaluated for ClearColi, whereas for *E. coli* BL21 only at 32°C it was lower. The production of nucleic acids, polysaccharides and lipopolysaccharides occurred mainly during the exponential phase, for most of the studied conditions, therefore, their minimization depends on the choice of culture conditions during the exponential phase. From the bioreactor culture data a biomass yield of 0.63 gDCW/Lh and a protein yield of 81.2 mgPspA/Lh were estimated. The yields achieved with ClearColi were about 64% lower than those obtained with BL21, due to the longer cultivation time required with ClearColi. However, the detoxified strain has the advantage of achieving high PspA specific production values, as well as a low production of contaminating proteins when compared to the conventional strain. In addition, the detoxified strain produces a modified LPS, which does not cause significant pyrogenic reaction. Thus, the present study demonstrated that the endotoxin-free strain use as a platform for the production of recombinant proteins in industrial scale is technically possible and presents itself as a very interesting alternative for therapeutic proteins.

Keywords: ClearColi; Endotoxin-free *E. coli*; PspA; contaminating protein; lipopolysaccharides; induction; temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração das partes do mecanismo de expressão gênica operon <i>lac</i>	22
Figura 2.(A) LPS de <i>E. coli</i> e (B) LPS modificado expressado por ClearColi.....	32
Figura 3. Sistema utilizado no cultivo em biorreator (controle das variáveis do processo e sistema de aquisição).	41
Figura 4. Esquema de preparação das amostras para análises de AN, PS, LPS, PT, PspA, ácido acético, glicerol, lactose, glicose e galactose	43
Figura 5. Crescimento celular durante os ensaios em <i>shaker</i> . Cultivos sem indução (S/I); cultivos induzidos com IPTG (IPTG) e Lactose (Lac) usando ClearColi (CC) e <i>E. coli</i> BL21, nas temperaturas de 27 °C (a), 32 °C (b) e 37 °C (c).....	51
Figura 6. Acompanhamento da síntese <i>proteica</i> no ensaio com ClearColi a 27 °C e a 32 °C e de BL21 a 32 °C. Padrão de peso molecular na faixa da esquerda.....	54
Figura 7. Dados de produção específica de PspA ($Y_{PspA/X}$) no fim da indução em ensaios com <i>E. coli</i> BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.....	55
Figura 8. Dados de produção específica de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$) no fim da indução em ensaios com <i>E. coli</i> BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	57
Figura 9. Dados de produção específica de ácidos nucléicos ($Y_{AN/X}$) no fim da indução em ensaios com <i>E. coli</i> BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	58
Figura 10. Dados de produção específica de polissacarídeos ($Y_{PS/X}$) no fim da indução em ensaios com <i>E. coli</i> BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	60
Figura 11. Dados de produção específica de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) no fim da indução em ensaios com <i>E. coli</i> BL21(a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	61
Figura 12. P Produção específica de PS (a,b), LPS (c, d), PCt e PC(e, f) em função do tempo de cultivo com as cepas <i>E. coli</i> BL21 (a, c, e) e ClearColi (b, d, f).....	63
Figura 13. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de PspA ($Y_{PspA/X}$) com <i>E. coli</i> BL21.	66
Figura 14. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de PspA ($Y_{PspA/X}$) com ClearColi.	67

Figura 15. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$), com ClearColi.	67
Figura 16. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$), com <i>E. coli</i> BL21.....	68
Figura 17. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) com ClearColi.	69
Figura 18. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) com <i>E. coli</i> BL21.....	69
Figura 19. Consumo de glicerol, formação de acetato, crescimento, produção de PspA e retenção plasmidial (%RP) ao longo do tempo em cultivo com ClearColi em biorreator.....	71
Figura 20. Consumo de lactose, glicerol, glicose e formação de acetato ao longo do tempo em cultivo com ClearColi em biorreator.	72
Figura 21. Dados de produção específica de polissacarídeos ($Y_{PS/X}$) no fim da indução em ensaios com ClearColi em <i>shaker</i> e em biorreator. Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	75
Figura 22. Dados de produção específica de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) no fim da indução em ensaios com ClearColi em <i>shaker</i> e em biorreator. Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de cultivos com ClearColi relatados na literatura	33
Tabela 2. Composição do meio definido utilizado nos cultivos com <i>E. coli</i> BL21 e ClearColi.	38
Tabela 3. Condições de temperatura e indutor empregados em cultivos com <i>E. coli</i> BL21 e ClearColi	40
Tabela 4. Soluções utilizadas na metodologia de quantificação de LPS.	45
Tabela 5. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 ² aplicados na análise de dados de ClearColi e <i>E. coli</i> BL21.	49
Tabela 6. Crescimento específico máximo (μ_{max}) de ClearColi e <i>E. coli</i> BL21 nas temperaturas de 27 °C, 32 °C e 37 °C.	50
Tabela 7. Dados de $Y_{AN/X}$, $Y_{PS/X}$ e $Y_{LPS/X}$, antes da indução e nos ensaios sem indução.	56
Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial 2 ² com as respostas de cada ensaio usando ClearColi.	64
Tabela 9. Matriz de planejamento fatorial 2 ² com as respostas de cada ensaio usando <i>E. coli</i> BL21.....	65
Tabela 10. Resumo das melhores condições de crescimento e indução em ClearColi e BL21 a partir dos dados coletados nos cultivos em <i>shaker</i>	70
Tabela 11. Comparação dos dados do cultivo em <i>shaker</i> e biorreator a 32°C.....	73
Tabela 12. Dados de crescimento encontrados na literatura para a cepa ClearColi	74
Tabela 13. Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator convencional a 32 °C, do atual trabalho com a literatura.....	77
Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator com plataforma convencional (indução com lactose) com o atual trabalho	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AN	Ácidos nucleicos
A _{PspA}	Área da PspA
A _{PT}	Área da proteína total
C _{AN}	Concentração de ácidos nucleicos (mg/L)
CAP	Proteína ativadora de catabólitos
C _{LPS}	Concentração de lipopolissacarídeos (µg/mL)
C _{PS}	Concentração de polissacarídeos (g/L)
C _X	Concentração celular (gMS/L)
C _{Xcc}	Concentração celular de ClearColi (gMS/L)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO _{600nm}	Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilenodiamino-tera-acético
HDF	Meio de cultivo definido
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo
KDa	Kilo Dalton
KDO	2-ceto-3-desoxi-octonato
lac	Lactose
LB	Meio de cultivo Luria Bertani
mM	Mili molar
LPS	Lipopolissacarídeo
PC	Proteínas contaminantes
PE	Planejamento experimental
Pf	Planejamento fatorial
P _{PspA}	Produtividade em PspA
PS	Polissacarídeo
PspA	Proteína A de superfície de pneumococo
Px	Produtividade em células
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Retenção Plasmidial (%)
Rpm	rotações por minuto

SDS-PAGE	Dodecilsulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
$Y_{AN/X}$	Produção específica de ácidos nucleicos (mg/gMS)
$Y_{LPS/X}$	Produção específica de lipopolissacarídeos (mg/gMS)
$Y_{PC/X}$	Produção específica de proteínas contaminantes (mg/gMS)
$Y_{PS/X}$	Produção específica de polissacarídeos (mg/gMS)
$Y_{PspA/X}$	Produção específica de PspA (mg/gMS)
$Y_{PT/X}$	Produção específica de proteínas totais (mg/gMS)
$Y_{X/S}$	Rendimento em células a partir de glicerol (gMS/g _{glicerol})
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
1.1 OBJETIVOS.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 ENGENHARIA GENÉTICA E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i>	19
2.1.1 Proteínas recombinantes obtidas em <i>E. coli</i> e sua aplicação em vacinas.....	20
2.1.2 Sistemas de expressão para a produção de proteínas recombinantes.....	21
2.1.2.1 Expressão de proteínas via operon <i>lac</i>	21
2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO/INDUÇÃO E A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE POR <i>E. COLI</i>	23
2.2.1 Temperatura.....	23
2.2.2 Aeração.....	24
2.2.3 Indutor	25
2.2.4 Meios de cultivo	26
2.2.5 Produção e purificação de PspA.....	27
2.3 CONTAMINANTES E A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES....	28
2.3.1 Metabolismo de <i>E. coli</i> e a formação de contaminantes	28
2.3.2 Endotoxinas e purificação de proteínas recombinantes.....	30
2.3.3 ClearColi.....	32
2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 CEPAS.....	37
3.2 MEIOS DE CULTURA	38
3.3 CULTURA ESTOQUE E ARMAZENAMENTO	39
3.4 ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO EM MEIO SÓLIDO	39
3.5 PREPARO DO PRÉ- INÓCULO	39
3.6 CULTIVOS EM <i>SHAKER</i>	40
3.7 CULTIVO EM BIORREATOR.....	40
3.7.1 Aparato experimental	40

3.7.2 Procedimento experimental	41
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS	42
3.8.1 Determinação da concentração celular	44
3.8.2 Determinação de ácidos nucléicos.....	44
3.8.3 Determinação de polissacarídeos totais.....	45
3.8.4 Determinação da concentração de lipopolissacarídeos	45
3.8.5 Determinação da concentração de proteínas	46
3.8.6 Determinação da retenção plasmidial.....	46
3.8.7 Determinação da concentração de ácidos orgânicos e glicerol	47
3.9 PROCEDIMENTOS DE CÁLCULOS.....	47
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4. RESULTADOS.....	50
4.1 CULTIVOS EM <i>SHAKER</i>	50
4.1.1 Crescimento celular	50
4.1.2 Produção de PspA.....	53
4.1.3 Produção de contaminantes	55
4.1.3.1 Proteínas contaminantes	56
4.1.3.2 Ácidos Nucléicos	57
4.1.3.3 Polissacarídeos.....	59
4.1.3.4 Lipopolissacarídeos	60
4.1.4 Influência do tempo na produção de contaminantes.....	62
4.1.5 Influência das condições de indução na produção dos contaminantes PC e LPS e de PspA.....	64
4.2 CULTIVO EM BIORREATOR.....	70
5. CONCLUSÃO	80
REFERÊNCIAS.....	83
APÊNDICE A- CURVAS DE CRESCIMENTO PARA <i>E. coli</i> BL21 E CLEARCOLI REPRESENTADAS EM TERMOS DE LnDO PELO TEMPO DE CULTIVO, INDICANDO O MOMENTO DE INDUÇÃO.	91

**APÊNDICE B- RESULTADOS DOS ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO DE
PROTEÍNAS (PT, PC E PSPA), NOS CULTIVOS COM E SEM INDUÇÃO DE *E. coli*
BL21 E CLEARCOLI. 92**

**APÊNDICE C- RESULTADOS DOS EFEITOS CALCULADOS PARA PSPA E CADA
CONTAMINANTE ANALISADO NO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL..... 93**

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A bactéria *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais utilizados na produção de proteínas heterólogas, devido a ser bem caracterizada a nível celular, de fácil manipulação genética e poder atingir altas concentrações celulares (SHILOACH e FASS, 2005; JIA e JEON, 2018; EITEMAN e ALTMAN, 2006). Para a produção de proteínas recombinantes podem ser utilizados vetores de expressão baseados no operon *lac*, onde a lactose e o seu análogo isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) são utilizados como indutores (SORENSEN e MORTENSEN, 2005). O IPTG é amplamente utilizado em laboratório pela sua alta eficiência. No entanto, é um composto caro e tóxico, o que restringe a sua utilização. Já a lactose é de origem natural e de baixo custo, apresenta baixa solubilidade em água e é consumida durante o processo (YAN et al., 2004). Juntamente com a temperatura, o indutor modula a síntese de proteína recombinante assim como o estresse metabólico ao qual as células ficam submetidas. A estratégia de indução também pode desencadear diferentes respostas fisiológicas, que levarão à formação de componentes intracelulares, os quais constituirão os contaminantes que precisarão ser removidos posteriormente, caso o produto de interesse seja intracelular e haja necessidade de um alto grau de pureza. Uma vez que a proteína se encontra geralmente no interior da célula, um dos principais desafios reside na obtenção de um produto de alta pureza. As etapas de purificação de produtos biológicos contribuem com uma parcela considerável do custo do produto (FIGUEIREDO, 2014). Estes procedimentos são complexos e implicam em custos elevados, pelo material utilizado e o equipamento necessário.

Dentre os contaminantes que merecem destaque estão os lipopolissacarídeos (LPS), presentes na membrana externa das células de *E. coli*. Os LPS induzem reações pirogênicas e podem levar ao choque séptico em mamíferos. Por isso, a sua remoção é essencial para a qualidade de proteínas recombinantes terapêuticas injetáveis (MAMAT et al., 2015).

Uma nova abordagem para a solução desse problema consiste na utilização de uma linhagem de *E. coli* isenta de atividade endotóxica. A linhagem de *E. coli* BL21(DE3) geneticamente detoxificada (ClearColi) tornou-se disponível comercialmente no ano de 2013 (Lucigen, 2013). No entanto, observou-se que seus rendimentos em proteína e biomassa são menores quando comparados aos obtidos com células de *E. coli* BL21(DE3) (MAMAT et al., 2015). Além disso, estudos utilizando esta cepa foram realizados com meio LB e indução com IPTG (LIANG et al., 2015; PLANESSE et al., 2015), evidenciando-se a falta de estudos publicados com outras condições de cultivo, como por exemplo, meios que pudessem ser

utilizados a nível industrial de baixo custo e em processos nos quais não podem ser utilizados produtos de origem animal como soro, sangue ou peptonas.

No contexto das proteínas terapêuticas, a produção de antígenos vacinais em *E. coli* merece destaque (CARVALHO et al., 2012; FIGUEIREDO, 2014; MIYAJI et al., 2002). No caso específico das vacinas pneumocócicas, estudos sugerem que o uso de proteínas conservadas entre os diversos sorotipos como proteína carreadora na conjugação com polissacarídeos pode aumentar a cobertura das vacinas contra o *Streptococcus pneumoniae*. Uma dessas proteínas é a Proteína A de Superfície do Pneumococo (PspA), presente na parede celular da bactéria patogênica *Streptococcus pneumoniae*, cujos resultados de proteção em vários modelos animais são muito promissores (FIGUEIREDO, 2014). No âmbito do projeto temático “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína A de superfície de pneumococo” (Processo FAPESP no. 08/05207-4), coordenado pela Dra. Martha Tanizaki, do Instituto Butantan, a *E. coli* BL21(DE3) pET37b+/PspA4Pro, que expressa o fragmento da proteína imunogênica PspA vem sendo estudada nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos desde 2010 (SANTOS, 2012). Os resultados obtidos ao longo dos sucessivos estudos desenvolvidos (SANTOS, 2012; CAMPANI, 2014; FIGUEIREDO, 2014; SILVA, 2015) apontaram para a necessidade de aprimoramento integrado do processo, considerando as etapas *upstream* e *downstream* em conjunto, para o estabelecimento de estratégias de cultivo e de purificação mais eficientes do ponto de vista econômico e da qualidade do produto.

Essa nova concepção de processo de produção de proteína recombinante, integrado à purificação, é o escopo do projeto de pesquisa “Intensificação e Integração de Processos de Produção e Purificação de Proteína A de Superfície de Pneumococo” (Processo FAPESP no. 2015/10.291-8). Como parte do referido projeto de pesquisa, o presente trabalho aborda a produção de PspA utilizando a linhagem ClearColi^R, contribuindo para a obtenção de um componente vacinal com reduzida atividade endotóxica.

1.1 OBJETIVOS

Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo principal avaliar a linhagem de *E. coli* detoxificada como plataforma alternativa para a produção da proteína terapêutica PspA, apresentando como objetivos específicos:

- Estudar a influência de diferentes indutores (IPTG e lactose) e da temperatura sobre a produção de proteína;
- Avaliar a resposta fisiológica das células à indução e a temperatura, quantificando a produção de ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos e proteínas e analisar os dados obtidos aplicando o método de planejamento experimental;
- Comparar as linhagens *E. coli* BL21(DE3) pET37b+/PspA4Pro e *E. coli* detoxificada em termos de produção de PspA, formação de biomassa e presença de contaminantes;
- Analisar as informações coletadas e avaliar a melhor estratégia de cultivo em biorreator que favoreça a intensificação da produção da proteína, com menor presença de contaminantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ENGENHARIA GENÉTICA E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *E. coli*

A utilização de microrganismos como hospedeiros na produção de macromoléculas teve grande impulso com a tecnologia de DNA recombinante, a qual foi desenvolvida por Stanley Cohen e Herbert Boyer, com sua primeira publicação no ano de 1973, permitindo a criação de células artificialmente construídas para a produção de bioprodutos (QUEIROZ, 2011). Tal processo mostrou ter grande potencial comercial, atraindo o interesse da indústria e de investidores ao longo dos anos. Isto levou à aplicação das técnicas de Biologia Molecular em vários setores produtivos, como a agropecuária, a agricultura e a indústria farmacêutica (FALEIRO, ANDRADE e REIS, 2011).

Um dos microrganismos mais utilizados como hospedeiro de vetores de clonagem é a *Escherichia coli*. Esta bactéria apresenta como principais vantagens o consumo de diversas fontes de carbono, como sacarose, lactose e glicerol, possibilitando a utilização de substratos de baixo custo, diferentes métodos simples e eficazes de rompimento celular, possibilitando a obtenção de produtos intracelulares (FONSECA, 2003). Possui também a habilidade de crescer até altas concentrações celulares, com disponibilidade de diversos vetores de clonagem, é bem caracterizada a nível molecular, é de fácil manipulação genética e há grande conhecimento acumulado em termos de vias metabólicas (JIA e JEON, 2018; EITEMAN e ALTMAN, 2006).

Em 2002, mais de 115 produtos farmacêuticos e vacinas baseadas em proteínas recombinantes foram desenvolvidos e aprovados para comercialização. Em 2009 este número aumentou para 220, sendo a *Escherichia coli* a plataforma de expressão empregada para quase um terço do total das proteínas sintetizadas (DEMAIN e VAISHAV, 2009; WALSH, 2010). Algumas das cepas mais utilizadas para produção de proteínas recombinantes são a *E. coli* BL21 e a K12 (TERPE, 2006).

Uma das principais diferenças entre as proteínas naturais e as recombinantes é que as modificações genéticas aplicadas para a produção das últimas permitem que possam ser produzidas em grandes quantidades, suprimindo a demanda crescente por bioprodutos tais como insulina, anticoagulantes, citocinas como o interferon, além de enzimas como amilases e proteases (SERRANO e ESPUÑES, 2006; TERPE, 2006).

Além das proteínas recombinantes podem ser encontrados na literatura trabalhos utilizando a *E. coli* para a produção de aminoácidos essenciais e terpenos (WANGA, CHENG e CHEN, 2014; LIU et al. 2016).

2.1.1 Proteínas recombinantes obtidas em *E. coli* e sua aplicação em vacinas

A *E. coli* tem especial destaque como hospedeira na produção de proteínas recombinantes, podendo acumular grande massa de proteínas no seu interior, além de suportar a variação de condições ambientais e de seu rápido crescimento (DEMAIN e VAISHNAV, 2009). Estas proteínas podem ter diferentes aplicações, como por exemplo, serem utilizadas na formulação de vacinas.

No trabalho de Yang *et al.* (2014), *E. coli* foi utilizada como plataforma de expressão da proteína recombinante de NP-M1-HSP60. Essa proteína consiste na fusão da nucleoproteína de matriz M1 da cepa A/PR/8/34 (H1N1) do vírus da gripe e HSP60 (proteína do choque térmico), que se apresentou como nova opção para o desenvolvimento de uma vacina contra a gripe H7N9, que afeta cidades da China, como Hunan e Fujian (OMS, 2016a).

Já no trabalho de Cuevas-Romero et al. (2016), foi produzida a proteína recombinante hemaglutinina-neuraminidase de *Rubulavirus porcino* (rHN-PorPV) utilizando a *E. coli* KRK como plataforma de expressão. Os autores constataram que a proteína pode ser considerada como alternativa de antígeno na obtenção de vacinas para a prevenção e controle da infecção causada pelo *Rubulavirus porcino*, também conhecida como doença do “olho azul”, que atualmente afeta a indústria suína no México.

Certas vacinas vêm sendo produzidas ao longo dos anos, e sendo aprimoradas continuamente, como por exemplo, as vacinas pneumocócicas. O *Streptococcus pneumoniae* é o causador de doenças como meningite, septicemia e pneumonia (FERREIRA et al., 2006). A pneumonia é a causa de 16% das mortes em crianças como menos de cinco anos ao redor do mundo. Em 2015, causou 920.136 mortes de crianças nesta faixa etária (OMS, 2016b). Atualmente, duas vacinas conjugadas, com polissacarídeos capsulares (PS) de 10 e 13 sorotipos de *S. pneumoniae* e uma vacina não conjugada, contendo PS de 23 sorotipos diferentes de *S. pneumoniae* (PPV23), são comercializadas. No entanto, a PPV23 não dá proteção para menores de dois anos. Polissacarídeos capsulares são antígenos que induzem uma resposta timo-independente e a sua ligação como uma proteína carreadora através de conjugação química altera a resposta imune, passando de ser timo-dependente, sendo capaz de proporcionar

proteção a crianças abaixo de dois anos, um dos principais grupos de risco para doenças pneumocócicas (BOGAERT et al., 2004; FIGUEIREDO, 2014). Entretanto, as vacinas conjugadas têm baixa cobertura de sorotipos e alto custo (FIGUEIREDO, 2014). Por esta razão existem pesquisas que propõem a utilização da PspA na sua forma isolada (MIYAJI et al., 2002).

2.1.2 Sistemas de expressão para a produção de proteínas recombinantes

Os sistemas de expressão bacterianos são bastante atraentes para a produção de proteínas heterólogas, uma vez que as bactérias crescem rapidamente em substratos de baixo custo e há uma disponibilidade cada vez maior de vetores e estirpes hospedeiras mutantes (TERPE, 2006). O sistema hospedeiro e promotor pode ser de difícil escolha, dependendo principalmente da proteína alvo. Como as bactérias possuem sistemas de glicosilação limitados, são utilizados na produção de proteínas que não sejam pós-traducionalmente modificadas. Nos casos em que esta modificação seja necessária, podem ser utilizados hospedeiros alternativos como leveduras ou fungos filamentosos, por exemplo. O tamanho da proteína de interesse também deve ser levado em consideração, pois proteínas muito grandes, maiores que 100 kDa, são de difícil produção em sistemas bacterianos (TERPE, 2006; WALSH, 2004).

Abordagens moleculares também podem ser adotadas a fim de aperfeiçoar a produção de proteínas heterólogas, como por exemplo, o uso de promotores para expressão de genes estranhos a célula (KILIKIAN et al., 2000). Os sistemas promotores têm como principais características serem fortemente regulados, de indução fácil e rentável, facilmente transferíveis para outras estirpes de *E. coli* e serem independentes dos ingredientes utilizados nos meios de cultura (TERPE, 2006).

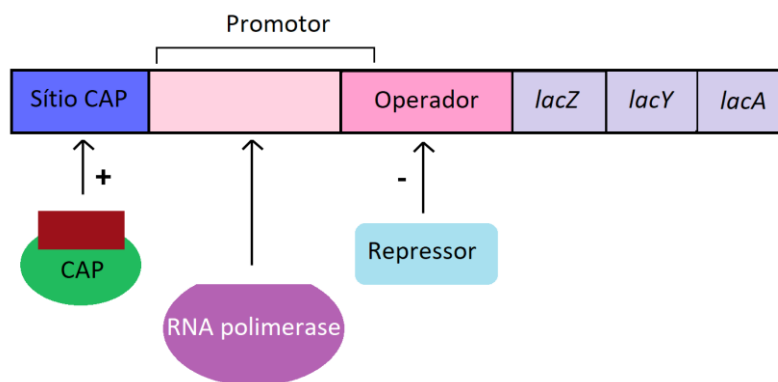
2.1.2.1 Expressão de proteínas via operon *lac*

O operon *lac* é um mecanismo de controle de expressão gênica que regula a assimilação de lactose como fonte de carbono por *E. coli*. O operon *lac* contém três genes: *lacZ*, *lacY* e *lacA*, os quais são transcritos com um único RNAm, sob o controle de um promotor. O *lacZ* codifica a β -galactosidase que quebra a lactose em monossacarídeos. O *lacY* codifica a permease, um transportador que tem como função levar a lactose para dentro da célula. O *lacA* codifica a enzima transacetilase de β -galactosídeos (TURNER et al., 2005).

Além dos três genes, o operon *lac* contém regiões do DNA às quais as proteínas reguladoras podem se ligar, para controlar a transcrição do operon (Figura 1). O promotor é o sítio de ligação da RNA polimerase, a enzima responsável pela transcrição. O operador é o sítio de regulação negativa ao qual se liga a proteína repressora *lac*. O sítio de ligação da proteína ativadora de catabólitos (CAP) é o sítio de regulação positiva na qual se liga a CAP, possibilitando altos níveis de transcrição. A CAP é regulada por uma molécula chamada monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O AMPc corresponde a um sinalizador produzido pela *E. coli* quando os níveis de glicose estão baixos. O repressor *lac*, codificado pelo gene *lacI*, corresponde a uma proteína que inibe a transcrição do operon *lac*. Isto ocorre quando não há lactose disponível e o repressor se liga ao operador, impedindo a transcrição pela RNA polimerase. No entanto, quando há lactose disponível, parte das moléculas de lactose é convertida em alolactose, e esta por sua vez se liga ao repressor alterando a sua conformação (TURNER et al. 2005).

Análogo à lactose, o IPTG pode também ser utilizado na indução dos promotores *lac* e *tac*. Este indutor se liga ao repressor, impedindo a ligação entre o repressor e o operador, possibilitando a transcrição, e não sofre repressão pela presença de glicose, não requerendo transportador para entrar na célula.

Figura 1. Ilustração das partes do mecanismo de expressão gênica operon *lac*.



Fonte: Adaptado de www.khanacademy.org/the-lac-operon (2017)

2.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO/INDUÇÃO E A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE POR *E. coli*

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, BLANK e SCHMIDT, 2011; MARISCH et al., 2013; MOROWVAT et al., 2014). De maneira geral, a literatura (GLICK, 1995; ASHRAF et al., 2013; BABAEIPOUR et al., 2013) 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 ao tamanho do vetor, as características da proteína recombinante, o estado fisiológico da célula, a composição do meio de cultivo e as condições de indução (tipo de indutor e quantidade adicionada, tempo de indução, temperatura).

A qualidade do produto e a quantidade de proteína recombinante presente no material de partida (biomassa obtida ao final de cultivo) para a purificação podem ser afetadas pelo nível de estresse metabólico associado à estratégia de indução adotada. Por isso, os fatores mais relevantes para a produção de proteína são discutidos a seguir.

2.2.1 Temperatura

A *Escherichia coli* tem a capacidade de crescer numa ampla faixa de temperaturas (15 a 42°C), mas é conhecido que a sua taxa de crescimento aumenta proporcionalmente na faixa de 20 a 37°C (FAREWELL e NEIDHARDT, 1998). A temperatura representa um fator importante nos cultivos, uma vez que está diretamente relacionada à taxa de crescimento e à cinética de formação de produto (TOEROEK et al., 2015). A temperatura ótima de crescimento segundo Lee (1996) é 37°C, entretanto a utilização de temperaturas menores diminui a demanda de oxigênio e minimiza os efeitos tóxicos dos metabólitos secundários produzidos (SARGO, 2011).

Em situações em que a demanda de oxigênio ultrapassa a capacidade de transferência do biorreator, uma opção seria a redução da temperatura com a finalidade de diminuir a velocidade de crescimento, diminuindo o consumo de oxigênio (SANTOS, 2012). Sabe-se que temperaturas mais elevadas auxiliam o crescimento celular, no entanto isto também acarreta na

formação de produtos indesejados como o acetato. Em estudo realizado por Maré et al. (2005) foi constatada a eficácia de realizar o controle de temperatura para evitar a formação de metabólitos indesejados. Neste trabalho foi feito um cultivo em batelada alimentada, sendo adicionada glicose em uma concentração de 500 g/L. A estratégia de controle de temperatura consistiu em deixar a temperatura no máximo possível considerando a limitação de oxigênio. Desta forma a massa de células aumentou em 20% chegando a uma concentração de 41 g/L enquanto foi possível manter a concentração de ácido acético baixa chegando a um máximo de 0,3 g/L.

Em relação à produção de proteína recombinante, temperaturas mais elevadas tendem a intensificar o estresse metabólico, reduzindo a velocidade de crescimento, o rendimento em biomassa e a retenção plasmidial. Por outro lado, baixas temperaturas tendem a limitar a síntese de proteína heteróloga pela reduzida atividade metabólica, além de prolongarem o tempo de cultivo, afetando a produtividade (GLICK, 1995; HEYLAND, BLANK e SCHMIDT, 2011; WAEGEMAN e SOETAERT, 2011).

2.2.2 Aeração

Boas condições de aeração são essenciais para obtenção de altas concentrações em biomassa, além de determinar a formação ou não de subprodutos. Em microrganismos como *E. coli*, caso o cultivo seja realizado sobre condições de limitação por oxigênio, as vias fermentativas são ativadas, ocasionando a formação de ácidos orgânicos como o acetato (LEE, 1996). A geração de energia pela célula depende da disponibilidade de oxigênio e, portanto, o fornecimento deficiente desse nutriente pode afetar o metabolismo e a produção de proteína recombinante tanto pela falta de ATP ou pela redução da atividade metabólica. Com a finalidade de melhorar a transferência de oxigênio em cultivos de *E. coli* recombinante e garantir o fornecimento de O₂ algumas medidas vêm sendo investigadas.

Em estudo realizado por Shang et al. (2009) o impacto do fornecimento de oxigênio foi avaliado em biorreatores de 5 e 30 L utilizando *Escherichia coli* BL21 (DE3) para a produção do hormônio de crescimento humano (r-hGH). Foi observado que ao fornecer oxigênio de alta pureza a produtividade de r-hGH duplicou no biorreator de 5L e quadriplicou no de 30L.

No entanto, deve-se levar em consideração que o enriquecimento da fase gasosa com oxigênio tem impacto no custo do processo, uma vez que o oxigênio puro é um insumo caro. Tendo isso em vista, o reator do tipo airlift pressurizado foi utilizado em cultivos de *E. coli*

produzindo PspA em estudos realizados por Campani et al. (2015). A pressurização do biorreator elevou a solubilidade do oxigênio na fase líquida e a pressão parcial na fase gasosa, melhorando assim a taxa de transferência de oxigênio sem a necessidade de fornecer O₂ puro. A produtividade em proteína recombinante foi similar nas duas estratégias comparadas (airlift sobre pressão e reator tipo tanque agitado com ar enriquecido com O₂), atingindo produtividades máximas de 240 mg_{prot}/Lh e 200 mg_{prot}/Lh, respectivamente.

2.2.3 Indutor

No caso do operon *lac*, tanto a lactose quanto o IPTG podem ser utilizados como indutores. As características da indução por ambos foram detalhadas no item 2.1.2.1. O uso da lactose como indutor apresenta como principais vantagens o seu baixo custo e o fato de ser de origem natural (TAMAZETTO, 2006). Por outro lado, a ativação de todo o mecanismo de indução baseada no operon *lac* pela lactose é lenta, requerendo fases de indução mais prolongadas. Além disso, como a lactose é metabolizada pelas células, ela precisa ser fornecida em quantidade suficiente para não limitar a indução. Outro impacto relacionado ao uso da lactose está na formação de galactose, a qual não é metabolizada por células de *E. coli* BL21. Após longos tempos de indução ocorre um aumento da massa celular, sem modificação expressiva da DO, devido ao acúmulo de parte da galactose no interior das células, modificando a relação entre concentração celular (Cx) e densidade ótica (DO), que deixa de ser linear. Por esta razão a conversão de densidade ótica para concentração de células (Cx) deve levar em consideração este fator após períodos prolongados de indução com lactose. O trabalho de Silva (2015) mostra a mudança da relação DO vs Cx pelo tempo de cultivo, realizando a comparação entre o uso de lactose e o de IPTG.

Já em relação ao IPTG, a literatura geralmente considera que seu uso é limitado à pesquisa em laboratórios, devido ao seu alto custo. Por ser tóxico à célula, a quantidade utilizada na indução precisa ser definida com cautela (SERRANO e ESPUÑES, 2006). Por outro lado, o IPTG promove a indução rapidamente, o que leva a fases de indução mais curtas e não é consumido pelas células.

Li et al. (2006) utilizaram *E. coli* BL21(DE3) como plataforma de expressão do estimulador de linfócito B humano, comparando o efeito dos indutores lactose e IPTG na produção da proteína de interesse. No experimento realizado a 37 °C em *shaker* foi constatado que ao usar lactose a produção da proteína foi mais lenta, ou seja, foi necessário um tempo

maior de indução para a obtenção de resultados similares de expressão. A produção específica de proteína usando IPTG (135 ± 7 mg/gMS) foi maior do que com lactose (115 ± 5 mg/gMS), no entanto foi verificado também que a escolha de lactose como indutor apresentou como vantagem a maior concentração de células no final do cultivo.

Além da escolha do indutor, o processo de indução da produção da proteína recombinante é influenciado pelo tempo de indução, pela concentração do indutor e pela velocidade de crescimento específico anterior à indução (NEUBAUER et al., 1992; KILIKIAN et al., 2000).

2.2.4 Meios de cultivo

Os meios de cultura podem ser classificados de acordo com a composição. Os chamados meios complexos apresentam extratos de leveduras e peptonas, enquanto os meios definidos contêm apenas nutrientes de fórmula química conhecida (SANTOS, 2012). A utilização do meio definido apresenta como vantagem a possibilidade de realizar estudos precisos do metabolismo celular, uma vez que permite estabelecer relações estequiométricas de conversão do substrato em produtos e biomassa. Além disso, autores como Rossi (2001) relatam que a utilização de meios definidos auxilia na diminuição da formação de ácidos orgânicos, quando comparados a meios complexos.

Um dos meios complexos mais utilizados em cultivos com *E. coli* é o meio LB. Este meio tem em sua composição extrato de levedura, triptona e NaCl. O meio complexo é rico em nutrientes de fácil assimilação, por esta razão a velocidade específica de crescimento, o rendimento em biomassa e a produtividade são maiores quando comparados a cultivos em meio definido.

Santos (2012) estudou a influência da composição do meio complexo sobre a produção da proteína PspA. Foi analisada a viabilidade da utilização de fontes de nitrogênio de origem vegetal (hidrolisados protéicos de soja) substituindo a triptona de origem animal na composição do meio. O melhor resultado dos cultivos em batelada em termos de produção de proteína foi de 245 ± 7 mgPspA/gMS utilizando o hidrolisado de soja.

A fonte de carbono utilizada no meio também deve ser levada em consideração. Apesar de a glicose ser a mais comumente empregada, ela pode levar à produção de altas concentrações de acetato (CARVALHO et al., 2012). O uso de diferentes fontes de carbono, como glicerol ou xilose, mostrou-se promissor na melhoria da produtividade e diminuição na formação de

subprodutos (HANSEN e ERIKSEN, 2007). Outra vantagem da utilização de glicerol em cultivos de alta de densidade é a maior resistência ao congelamento conferida às células. Esta característica é fundamental em etapas “downstream”, pois evita a perda de proteínas no rompimento celular e nas etapas de purificação (SARGO, 2011).

2.2.5 Produção e purificação de PspA

Na literatura, podem ser encontrados alguns trabalhos visando propor novas alternativas para melhorar a produção de PspA, utilizando *E. coli* como plataforma de expressão. Em estudo realizado por Sargo (2011) foram conduzidos cultivos de alta densidade celular utilizando glicerol como fonte de carbono e foram comparados os indutores lactose e IPTG. Os resultados indicaram que a produtividade celular (1,3 gMS/Lh) e o rendimento máximo de proteína de 220 mg_{PspA}/gMS foram semelhantes usando ambos indutores. Com relação ao uso do glicerol foi constatado que a sua aplicação, além de possibilitar altas velocidades de crescimento, também minimiza a formação de acetato.

No estudo realizado por Carvalho et al. (2011) foram realizados cultivos em batelada alimentada utilizando meio definido com o objetivo de comparar o efeito de duas fontes de carbono (glicerol e glicose) sobre a produção de PspA e o crescimento celular, ao utilizar 0,5mM de IPTG e 20 g/L de lactose. Foi verificado que no cultivo com glicerol houve menor formação de acetato e, ao comparar o crescimento celular, ambos os cultivos com glicose e glicerol obtiveram resultados similares em torno de 62 gMS/L. Entretanto a produção da proteína foi maior com glicose (3,48 g_{PspA}/L) do que com glicerol (2,97 g_{PspA}/L). Além disso, neste trabalho também foi avaliado o processo de purificação da proteína. Foi produzido o fragmento da PspA do clado 3 (PspA3) com cauda de histidina. Utilizando um processo que consistiu em cromatografia de troca aniônica, seguida de cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC) e por fim cromatografia de troca catiônica, os autores obtiveram uma pureza de 96,5% a partir da biomassa do cultivo com glicose e 90,6% a partir da biomassa do cultivo com glicerol, com uma recuperação de aproximadamente 22% e 13%, respectivamente.

Outro trabalho que teve por objetivo desenvolver um processo de purificação de PspA, foi o de Figueiredo (2014). Neste trabalho foi produzido o fragmento da PspA do clado 4 contendo a porção N-terminal, região definidora do clado e a primeira parte da região rica em prolina (PspA4Pro). O processo que levou a uma pureza superior a 95% consistiu na

precipitação com CTAB, cromatografia de troca aniônica, crioprecipitação em pH 4 e cromatografia de troca catiônica. Este processo apresentou uma recuperação entre 14% e 33% e níveis aceitáveis de endotoxinas no produto final, sendo capaz de eliminar em 99% de lipopolissacarídeo (LPS).

2.3 CONTAMINANTES E A PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.3.1 Metabolismo de *E. coli* e a formação de contaminantes

A capacidade de crescimento, de reprodução e de adaptação a alterações ambientais são resultantes de processos bioquímicos. A oxidação de nutrientes por meio da rede complexa de reações bioquímicas é o que torna possível a realização destes processos, é o que conhecemos como metabolismo celular (SARGO, 2011).

As principais vias metabólicas presentes em bactérias como *E. coli* são a glicólise (ou Embden-Meyerhof-Parnas - EMP), a pentose fosfato, a Entner-Doudoroff, o ciclo do ácido tricarboxílico, o ciclo do glioxilato e a respiração.

Cada uma delas leva a formação de compostos de grande importância nas reações de oxidação e redução, como a adenosina trifosfato (ATP) e as coenzimas reduzidas, como NADH (hidrogeno-nicotinamida adenina dinucleótido). O processamento das fontes de carbono pelas vias metabólicas é o que possibilita a obtenção de energia, formação de novas células, assim como a formação das diversas macromoléculas que compõem a célula (LEHNINGER, COX e NELSON, 2002).

As células heterotróficas, como as de *E. coli*, obtêm energia das moléculas de nutrientes e transformam essa energia em adenosina trifosfato (ATP) e outros compostos ricos em energia, que são a base para o funcionamento dos processos biológicos. Por exemplo, quando precursores simples são ligados formando polímeros de alto peso molecular como DNA, RNA e proteínas, se faz necessária energia tanto para a condensação das unidades monoméricas quanto para formação das sequências ordenadas (LEHNINGER, COX e NELSON, 2002).

Ácidos nucleicos, polissacarídeos e proteínas são algumas das macromoléculas formadas por meio da assimilação de fontes de carbono de carbono e nitrogênio.

A *E. coli* tem especificidade antigênica determinada por dois tipos de polissacarídeos: somático (ou do antígeno O) e o capsular (ou K). O polissacarídeo O está ligado a lipídeos e o

K não se encontra combinado. Os lipopolissacarídeos são as macromoléculas que contém o antígeno O, assim como os sítios de recepção dos bacteriófagos (VILLELA, 1972).

Uma resposta de células de *E. coli* à presença de antibióticos é a produção de polissacarídeos, os quais têm como uma das suas funções intermediar interações entre a bactéria e o meio que a cerca, podendo permanecer na superfície da célula ou ainda ser liberado no meio. Em estudo realizado por Silva (2015), foram observadas altas concentrações de polissacarídeos no meio após a indução para a produção de proteínas recombinantes.

Proteínas, por sua vez, são sintetizadas por organismos vivos como parte do seu metabolismo. A introdução de genes estranhos à célula para a produção de proteínas recombinantes origina mudanças no metabolismo do hospedeiro. Essas mudanças são causadas pelo chamado estresse metabólico (GLICK, 1995). O estresse metabólico é resultado de condições estranhas às quais a célula busca se adaptar. A célula passa a produzir ácidos orgânicos, redirecionando a fonte de carbono para a formação de metabólitos como o acetato, que age como inibidor do crescimento celular, da síntese da proteína de interesse e formação do DNA plasmídial (ROSSI, 2001; BENTLEY et al., 1990; GLICK, 1995; BORJA et al., 2012). O acúmulo de acetato é conhecido por ser resultado de vários fatores interligados, como problemas de regulação do metabolismo e de como as células otimizam a utilização de seus recursos (BERNAL, CASTAÑO-CEREZO e CÁNOVAS, 2016).

A formação de acetato é um dos problemas bastante citados na literatura quanto à utilização de *Escherichia coli* como hospedeira, sendo necessário minimizar sua formação para otimizar a produção de proteínas recombinantes (LEE, 1996; SUAREZ e KILIKIAN, 2000; SHANG et al., 2009). Em concentrações acima de 30 mg/L, este ácido é capaz de mostrar indícios de inibição do crescimento celular (LULI e STROHL, 1990). Algumas das estratégias para a diminuição da formação de acetato podem ser: selecionar cepas com baixa capacidade de produção de acetato, fazer a manipulação das vias que levam à formação do mesmo, utilizando estratégias de engenharia metabólica (VAN DE WALLE e SHILOACH, 1998; EITEMAN e ALTMAN, 2006) ou ainda, como estratégias de cultivo, utilizar fontes de carbono alternativas à glicose ou ainda limitar o fornecimento da fonte de carbono (batelada alimentada), impondo velocidades específicas de crescimento menores que a velocidade crítica (SARGO, 2011; SANTOS, 2012).

Embora a minimização da produção de acetato seja uma das principais preocupações ao selecionar as estratégias de cultivo utilizadas, os contaminantes também requerem atenção especial do ponto de vista de purificação do bioproduto. Os contaminantes são aqueles presentes

dentro da célula, tais como os ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipopolissacarídeos e proteínas. Conforme mencionado acima, a presença dessas macromoléculas é inerente ao metabolismo celular. Porém, Figueiredo (2014) observou que as condições de cultivo/indução empregadas podem afetar significativamente a pureza relativa inicial da proteína de interesse, interferindo assim na pureza final alcançada no processo de purificação. Porém, a influência das condições de cultivo/indução na presença de contaminantes é pouco estudada, apesar de sua importância para o desempenho dos processos de purificação. No caso específico de proteínas recombinantes terapêuticas, o LPS (ou endotoxinas) é o contaminante mais preocupante. Devido às características pirogênicas (ver tópico 2.3.2), sua remoção é crucial para a qualidade do bioproduto, sendo a concentração máxima do mesmo sujeita à regulação pela ANVISA. Muitos métodos (ultrafiltração, cromatografia de troca iônica, adsorção em carvão ativo, precipitação por CTAB) vêm sendo estudados para realizar remoção do LPS (MAMAT et al. 2015; FIGUEIREDO, 2014). Uma outra estratégia ainda pouco explorada consiste em utilizar a linhagem de *E. coli* BL21(DE3) geneticamente detoxificada (ClearColi, Lucigen), capaz de produzir proteínas recombinantes isentas de endotoxinas (ver tópico 2.3.3).

2.3.2 Endotoxinas e purificação de proteínas recombinantes

Também conhecida como endotoxina, o lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula derivada da membrana externa da maioria das bactérias Gram-negativas, incluindo a *E. coli* (CRUZ-MACHADO, 2010). Este é um potente imunoestimulante e pode induzir uma resposta pirogênica, desencadeando uma série de reações inflamatórias em mamíferos, incluindo o choque séptico. A parte tóxica do LPS está localizada no lipídio A (Figura 2a). Dois grupos fosfato acoplados a duas glucosaminas no lipídio A determinam a toxicidade do LPS (TUIN et al., 2006). Os principais receptores que desencadeiam as vias de sinalização intracelular estão localizados na membrana. Estes são denominados Toll-like 4 (TLR4), os quais são sensores primários de infecções microbianas (POLTORAK et al., 1998).

A remoção das endotoxinas é um dos principais desafios enfrentados ao se utilizar a *E. coli* como plataforma de expressão de proteínas recombinantes terapêuticas (DRAPER e REHM, 2012). Esta etapa é de fundamental importância para garantir a segurança na utilização do produto final. No entanto, as etapas de purificação em geral são complexas e de alto custo (FIGUEIREDO, 2014; MAMAT et al., 2015). O impacto dos processos de purificação no custo

final do produto é determinado pela quantidade de impurezas contidas no material de partida e do grau de pureza requerido para o produto em questão.

Proteínas recombinantes para aplicação em vacinas requerem altos graus de pureza e os processos de purificação precisam preservar a bioatividade do produto final. Uma grande diversidade de metodologias está disponível hoje em dia, no entanto uma das mais utilizadas é a de cromatografia líquida (CARVALHO et al, 2012).

A cromatografia consiste na separação das moléculas que compõem o produto em duas fases, uma móvel e uma estacionária. A afinidade das moléculas pela fase móvel ou estacionária determinará a velocidade em que passarão pelo sistema, dando-se assim a separação. A fase estacionária é composta por uma matriz porosa e um ligante. A matriz deve ser insolúvel e não pode conter grupos que se liguem aleatoriamente às proteínas. As matrizes mais utilizadas na separação de proteínas são baseadas em polissacarídeos neutros e poliacrilamida. Alguns dos tipos mais utilizados na purificação de proteínas heterólogas são cromatografia de troca iônica, cromatografia de interação hidrofóbica, cromatografia de afinidade por metais imobilizados e a cromatografia mista (FIGUEIREDO, 2014).

A maioria dos métodos de separação utilizados individualmente apresenta baixa eficiência e seletividade insatisfatória. Geralmente, para graus de pureza mais elevados, é necessário empregar uma sequência definida destes métodos.

Tendo em vista o impacto no tempo, a complexidade e os custos de produção associados aos métodos de remoção de endotoxinas, alternativas envolvendo manipulação genética vêm sendo estudadas. Estas modificações permitem que organismos hospedeiros sejam capazes de produzir proteínas recombinantes livres de endotoxinas (CANO-GARRIDO et al., 2016; MAMAT et al., 2015).

Até recentemente, acreditava-se que o LPS era necessário para manter a integridade da membrana externa de bactérias gram-negativas. Esta visão mudou quando se relatou a construção e caracterização de KPM22, um derivado da estirpe de *E. coli* K-12 que é incapaz de sintetizar KDO (2-ceto-3-desoxi-octonato). A descoberta de KPM22 apresentou a oportunidade de construir estirpes de expressão de proteína recombinante de *E. coli* com baixo potencial endotóxico (MAMAT et al., 2015 apud MEREDITH, T. C., 2006).

cadeias acil, reconhecidas pelo receptor Toll-like 4 (TLR4), ocasionando a ativação de NF- κ B e a produção de citocinas pro-inflamatórias. O Lipídeo IVa, produzido pela ClearColi, contém apenas quatro cadeias acil e não é reconhecido pelo TLR4, e, portanto, não desencadeia resposta endotóxica significativa. Após purificação mínima, as proteínas ou plasmídeos produzidos que ainda possam conter o lipídeo IVa, poderão ser utilizados sem provocar resposta endotóxica (LUCIGEN, 2013).

Este fato foi constatado por pesquisa realizada por Planesse et al. (2015), na qual foi realizada a comparação do LPS produzido pela *E. coli* BL21(DE3) convencional e o produzido pela ClearColi. Foi então confirmado que o LPS modificado desta nova estirpe não provocou nenhuma resposta pro-inflamatória via ativação de NF κ B.

Esta nova cepa foi lançada comercialmente pela empresa Lucigen, em 2013. Por esta razão há uma escassez de trabalhos publicados utilizando a referida célula (Tabela 1).

Tabela 1. Dados de cultivos com ClearColi relatados na literatura

Produto	Volume	Indutor	Meio	Referência
Proteínas ApoA-1 e Hsp70	-	0,4 mM de IPTG	LB	Mamat et al. (2015)
Proteína do choque térmico 60 (Hsp60)	1 L	1 mM de IPTG	2YT	Planasse et al. (2015)
Xilanase	1L	0.0125 mM de IPTG	LB	Liang et al. (2015)
Subunidade proteicas formadoras de partículas similares às do vírus Physalis mottle (VLP de PhMV)	500 mL	0,5 mM de IPTG	LB	Masarapu et al. (2017)
Proteína La/SSB	100 mL	1 mM de IPTG	LB	Yoo et al. (2017)
Antígeno do vírus da Zika (ZIKV)	200 mL	1 mM de IPTG	LB	Viranaicken et al. (2017)

Atualmente encontram-se na literatura pesquisas utilizando-a para a produção da enzima 1,3- β -xilanasase, um fator recombinante de células-tronco humanas (rhSCF¹⁶⁴), as proteínas humanas Hsp60, ApoA-1 e Hsp70, grânulos de polihidroxibutirato e antígenos do vírus da Zika (LIANG et al., 2015; UEDA et al., 2016; PLANESSE et al., 2015; MAMAT et al., 2015; MARTÍNEZ-DONATO et al., 2016; VIRANAICKEN et al., 2017). Alguns destes produtos como os citados na Tabela 1 possuem características em comum quanto à estratégia de expressão. Em todas as pesquisas citadas os experimentos foram conduzidos com volumes de no máximo 1L, em meio complexo (LB na maior parte dos casos) e indução por IPTG.

Por esta razão é essencial a realização de estudos voltados a estratégias de produção para aplicação industrial visando à produção de proteínas terapêuticas, uma vez que para este tipo de aplicação são requeridos estudos em maior escala e a definição de condições de cultivo em biorreator.

2.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A metodologia de planejamento experimental (PE) vem sendo usada nos últimos anos na área de bioprocessos na avaliação da composição de meios de cultura (LARENTIS et al., 2012; SILVA et al., 2017), na otimização de processos para a produção de enzimas (MANDENIUS e BRUNDIN, 2008) e proteínas recombinantes (EINSFELDT et al., 2011; MOHAJERI et al., 2017). As principais vantagens do uso desta ferramenta consistem em otimizar mais de uma resposta simultaneamente, reduzir o número de experimentos e avaliar a interação entre fatores (MOHAJERI et al., 2017).

Um conceito importante neste tipo de estudo é o de matriz experimental, uma vez que esta corresponde ao plano formal construído para a condução dos experimentos. Nela são dispostos os fatores, os níveis e também o tratamento dos experimentos. Os níveis de um fator correspondem à escolha dos valores dos fatores feita pelo pesquisador (GALDÁMEZ, 2002).

Há várias abordagens possíveis na utilização do PE. A seleção do PE mais adequado deve levar em consideração aspectos como o objetivo do estudo, a complexidade e o custo dos ensaios. Em estudo realizado por Einsfeldt et al. (2011) foi utilizado um planejamento composto central variando as concentrações de IPTG e de canamicina para a produção de uma serino-protease pertencente ao grupo conhecido como proteínas de choque térmico (ClpP). Esta proteína é derivada de *S. pneumoniae* e neste trabalho a *E. coli* BL21 foi utilizada como plataforma de expressão. As repostas selecionadas foram a produção de proteína recombinante,

juntamente com o crescimento celular e a fração portadora do plasmídeo. Como resultado obteve-se que nem a concentração de canamicina ou de IPTG possuem efeito significativo na produção de ClpP. No entanto, em relação à retenção plasmidial, altas concentrações de IPTG mostraram afetar essa resposta de forma negativa. Assim, os autores concluíram, por meio da análise estatística, que a concentração ótima de IPTG seria de 0,1 mM, não sendo necessária a adição de canamicina. Portanto, por meio do uso da técnica de planejamento experimental foi possível reduzir em dez vezes a concentração de indutor e eliminar o antibiótico, mantendo níveis de expressão semelhantes, reduzindo os custos do processo.

O Planejamento Composto Central Rotacional (PCCR) é o mais citado na literatura para a identificação de condições ótimas para os fatores que levam à maximização ou minimização das respostas. No entanto, existem outras possibilidades, tais como a metodologia de Box-Behnken, o qual consiste em um planejamento envolvendo 3 níveis e também permite otimizar as condições estudadas.

O trabalho de Mohajeri et al. (2017) teve como objetivo otimizar as condições de cultivo para maximizar a produção de endostatina humana sintética (heS) em *E. coli* utilizando o planejamento de Box-Behnken (BBD). Foram investigados três fatores: concentração celular antes da indução, concentração de IPTG e tempo de indução, avaliando como resposta o nível de expressão da mRNA. O planejamento utilizado por Mohajeri et al. (2017) difere do PCCR, pois são utilizados três níveis de cada fator e não possui pontos axiais. Por não requerer pontos axiais este tipo de planejamento pode ser aplicado com menos restrições físicas ou econômicas, ou seja, não são necessários experimentos nos quais todos os níveis precisam ser extremos.

Outra abordagem é o planejamento fatorial (2^k) ou o fatorial fracionado (2^{k-p}), empregado para *screening* dos fatores cujos efeitos sobre as respostas são mais significativos (NORIEGA et al., 2005). Por exemplo, em estudo realizado por Marini et al. (2014) foi utilizado um planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} com replicatas no ponto central, para avaliação do efeito de oito variáveis relacionadas à composição do meio e às condições de indução na produção da proteína pneumolisina em *E. coli*. Além dos efeitos dos fatores selecionados também foi avaliado o efeito da curvatura. A curvatura permitiu determinar se os efeitos eram lineares ou não. Quando um efeito é linear, um efeito positivo indica que a resposta mais alta é obtida no nível mais alto, ou para o caso de um efeito negativo no nível mais baixo. Por outro lado, quando o efeito da variável não é linear, os valores de resposta mais altos ou mais baixos podem ser obtidos em um nível intermediário dentro do intervalo avaliado, o que seria representado por um efeito da curvatura significativo. Assim, por meio do planejamento

fracionado puderam ser identificados fatores que apresentam efeitos significativos e aqueles que não influenciaram as respostas. Por meio deste estudo foi possível determinar as melhores condições de cultivo e indução reduzindo os custos do processo, diminuindo concentrações de indutor (IPTG 0,1 mM), de compostos do meio e a também a concentração de canamicina necessária (30 mg/L), além do tempo de indução (4h).

Para determinar o impacto dos erros experimentais sobre a resposta e viabilizar a análise estatística, é necessária a repetição dos experimentos. Para isto é comum realizar ensaios no ponto central como alternativa à repetição de cada experimento, com significativa redução do número total de experimentos. Este procedimento possibilita o cálculo de resíduos entre outros testes, através do erro puro. Os ensaios no ponto central podem fornecer informações sobre a variação das repostas entre os níveis mínimo e máximo atribuídos aos fatores e também sobre a reprodutibilidade do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia experimental adotada envolveu experimentos em frascos agitados, contendo meio definido (HDF), para comparação entre a linhagem recombinante *E. coli* BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro e a linhagem *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro, obtida por clonagem do fragmento da proteína PspA na linhagem comercial ClearColi, fornecida pela empresa Lucigen. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fábricas Celulares (LaFac) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos. Os estudos conduzidos tiveram como principais objetivos avaliar a influência das condições de indução (temperatura e tipo de indutor) na produção de PspA e na formação de contaminantes (LPS, PS, AN e proteínas). Foram avaliadas três temperaturas (27 °C, 32 °C e 37 °C) e dois tipos de indutores (IPTG e lactose).

A partir dos resultados obtidos nos experimentos em frascos agitados, foram identificadas as condições mais favoráveis para o cultivo e para a produção de proteína por ClearColi, em cultivo em biorreator visando a caracterização da nova plataforma de produção de PspA em termos de velocidade máxima específica de crescimento, coeficientes de rendimento, produtividade em biomassa e proteína recombinante.

3.1 CEPAS

O fragmento do gene PspA da família 2 do clado 4 (PspA4Pro) de *Streptococcus pneumoniae* foi clonado no vetor pET37b+ e inserido em células de *E. coli* BL21(DE3). O vetor pET37b+ apresenta marca de resistência ao antibiótico canamicina e o gene PspA esta sob o controle do promotor T7lac. As construções de *E. coli* BL21 capazes de expressar o fragmento de interesse foram cedidas gentilmente pela pesquisadora Dra. Eliane N. Miyaji do Instituto Butantan. Ela foi utilizada como referência para comparação com os dados obtidos com a ClearColi.

A clonagem do fragmento da proteína PspA da família 2 do clado 4 na ClearColi foi realizada de acordo com as orientações da Lucigen, fornecedora da linhagem. Para o procedimento de transformação da ClearColi foi inicialmente preparado o DNA para inserção a partir da cepa de *E. coli* BL21, utilizando o kit GenElute™ HP Plasmid Miniprep da SIGMA. Em seguida 1 µL DNA foi adicionado a um tubo contendo 25 µL de células de ClearColi

eletrocompetentes, cepa fornecida pela empresa Lucigen, para então ser realizado o procedimento de eletroporação (10 μ F, 600 Ohms e 1800 V). Após 10 s do pulso, adicionou-se o meio de recuperação também fornecido pela empresa e então incubou-se a mistura por 1h, a 37 °C e 200 rpm. Após este período, as células transformadas foram estriadas em placa com meio LB com Canamicina (30 mg/L) por 36h a 37 °C para assim separar as colônias resistentes ao antibiótico, que por sua vez possuem a capacidade de expressar o gene da proteína de interesse.

Nos procedimentos descritos a seguir e nos resultados será realizada a simplificação dos nomes dos microrganismos para:

- *E. coli* BL21 ou BL21: *E. coli* BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro
- ClearColi ou CC: *E. coli* ClearColi BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro

3.2 MEIOS DE CULTURA

Para a reativação das células em estoque a -80 °C (item 3.3) foi utilizado meio definido-ágar (HDF-ágar) empregado por Campani et al. (2016), descrito na Tabela 2. O pH do meio foi ajustado para 6,3 e a fonte de carbono foi glicerol na concentração de 20 g/L.

Tabela 2. Composição do meio definido utilizado nos cultivos com *E. coli* BL21 e ClearColi.

Componente	Concentração
(NH ₄) ₂ HPO ₄	5,3 g/L
KH ₂ PO ₄	17,73 g/L
Ácido Cítrico	2,27 g/L
Fe(III)citrato	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
H ₃ BO ₃	4 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	2,8 mg/L
Zn(CH ₃ COOH) ₂ .H ₂ O	33,8 mg/L
EDTA	18,8 mg/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,6 g/L
Tiamina	45 mg/L
Canamicina	100 mg/L ¹ ou 30 mg/L ²
Glicerol	20 g/L

BL21¹ e CC²

A diferença do meio HDF para as cepas esteve apenas na concentração de Canamicina utilizada, uma vez que pelas recomendações da empresa fornecedora da ClearColi, a

concentração máxima recomendada seria de 30 mg/L, enquanto a concentração utilizada para *E. coli* BL21 é de 100 mg/L.

3.3 CULTURA ESTOQUE E ARMAZENAMENTO

Selecionou-se uma colônia da placa com as células transformadas (item 3.1) e esta foi utilizada para inocular 30 mL de meio LB fresco com canamicina (30 mg/L). Após atingir uma DO_{600nm} de 2, uma alíquota da suspensão de células foi transferida para um frasco contendo 50 mL de meio LB fresco com canamicina (30 mg/L). Após atingir uma DO_{600nm} de 1, a suspensão foi centrifugada (5000g, 4°C por 10 min) e ressuspendida em um mesmo volume de meio fresco. Adicionou-se glicerol para atingir uma concentração de 20 % v/v e depois armazenou-se em criotubos a -80 °C.

Para utilização da cepa transformada em meio definido (HDF-Tabela2) foi realizado o mesmo procedimento descrito para o banco de criotubos em meio LB, substituindo o meio por HDF.

3.4 ATIVAÇÃO E PROPAGAÇÃO EM MEIO SÓLIDO

Uma alíquota da suspensão de células armazenada a -80 °C em meio HDF foi estriada em uma placa de petri contendo meio HDF-ágar. A placa foi incubada a 37 °C por 48h, tempo necessário para a formação de colônias isoladas.

3.5 PREPARO DO PRÉ- INÓCULO

Em erlenmeyers estéreis foram adicionados 30 mL de meio HDF. Com o auxílio de uma alça descartável, foi selecionada uma colônia em placa com meio HDF-ágar e esta foi transferida para um dos erlenmeyers.

A suspensão foi incubada em *shaker* a 250 rpm e 37 °C pelo tempo necessário para atingir uma DO_{600nm} entre 2,0 e 2,5 e ser realizada a transferência de uma alíquota do inóculo para a fase seguinte.

3.6 CULTIVOS EM SHAKER

Em erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 70 mL de meio definido e um volume de inóculo suficiente para alcançar uma DO_{600nm} inicial de 0,1. Posteriormente incubou-se em *shaker* a 350rpm e na temperatura escolhida para a realização do experimento. Quando a DO_{600nm} atingiu um valor entre 2,0 a 2,5, foi feita a adição do pulso de indutor. Também foi incubado um frasco controle, sem indução, nas mesmas condições, acompanhando seu crescimento pelo mesmo tempo que os frascos com indução.

As condições de cada experimento para comparação das cepas estão apresentadas na Tabela 3, assim como os tempos de amostragem. O tempo total de indução foi determinado de forma que a indução com lactose fosse por maior tempo que com IPTG, uma vez que este último tem uma atuação mais rápida na produção de proteínas recombinantes via operon *lac*. Assim também se determinou que o tempo de indução seria inversamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto maior a temperatura menor o tempo de indução (SILVA, 2015).

Tabela 3. Condições de temperatura e indutor empregados em cultivos com *E. coli* BL21 e ClearColi.

Temperatura (°C)	27			32			37								
Indutor	IPTG		Lactose	IPTG + Lactose			IPTG		Lactose						
Conc. do indutor	1 mM		5 g/L	0,5 mM + 2,5 g/L			1 mM		5 g/L						
Tempo de indução (h)	6		12	9			4		8						
Tempo de amostragem	0	3	6	0	6	12	0	6	9	0	2	4	0	4	8

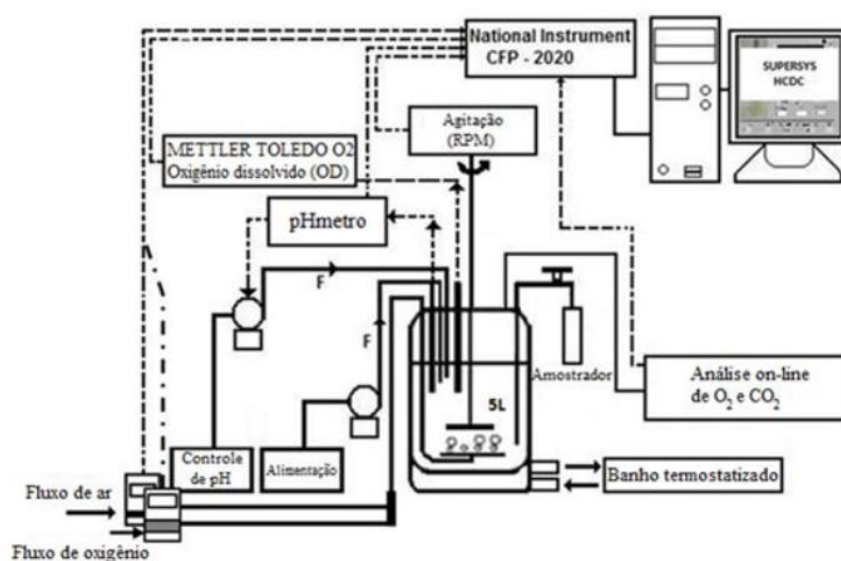
3.7 CULTIVO EM BIORREATOR

3.7.1 Aparato experimental

Os cultivos foram conduzidos em biorreator de bancada com volume útil de 5L. O controle foi baseado no *software* SuperSys_HCDC®, desenvolvido pela equipe de pesquisadores do LADABio/DEQ-UFSCar (HORTA, 2011). O aparato experimental mostrado na Figura 3 é composto por: computador, *software* SuperSys_HCDC®, como conversor A/D e D/A; transmissor de pH (GLI Pro) com aquisição analógica via cFP; pHmetro; transmissor de

concentração de oxigênio dissolvido com aquisição analógica via cFP; sensor amperométrico de O₂ dissolvido; banho termostatizado; termopar com aquisição via interface NOVUS®; bombas de ácido (HCl) e base (NH₄OH) com controle on/off via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa empregados para suprir ar e O₂ controlados remotamente via computador/cFP e filtro de ar (0,2 µm). Os instrumentos listados apresentaram a aquisição de dados em tempo real, com intervalo de salvamento escolhido de 10 segundos.

Figura 3. Sistema utilizado no cultivo em biorreator (controle das variáveis do processo e sistema de aquisição).



Fonte: Silva (2015)

3.7.2 Procedimento experimental

Para iniciar os cultivos em biorreator foram necessárias duas etapas de crescimento em *shaker*, para a preparação do pré-inóculo e, em seguida, do inóculo. Estas etapas foram realizadas utilizando meio HDF, temperatura de 37°C e agitação adequada ao volume contido em cada erlenmeyer, sendo 250 rpm para o pré-inóculo contendo 30 mL e 350 rpm para os dois frascos de inóculo contendo 75 mL.

Os cultivos foram conduzidos no biorreator tipo tanque agitado, descrito no item 3.6.1, em batelada. O meio utilizado foi o meio HDF descrito no item 3.2 com uma concentração inicial de glicerol de 60 g/L, na temperatura de 32 °C.

Os cultivos foram iniciados com um volume de 3,35 L de meio, o qual foi inoculado com 150 mL de inóculo (DO entre 2 e 2,5), totalizando 3,5 L no início da batelada, no qual foi adicionado o antiespumante propilenoglicol. As condições adotadas para o cultivo foram: pH de 6,3; concentração de oxigênio dissolvido controlada em 30% da saturação; vazão total de gás (ar + oxigênio puro) máxima igual a 4,5 L/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, em controle cascata (HORTA, 2011).

A indução foi feita pela adição de um pulso indutor composto pela mistura de IPTG e lactose nas concentrações de 0,5 mM e 10 g/L, respectivamente. Visando melhoria da retenção plasmidial também foram adicionados pulsos de canamicina numa concentração de 30 mg/L a cada 4h no decorrer de todo o cultivo, afim de minimizar a perda plasmidial. Além disso, como verificado no trabalho de Silva (2015) a adição de um pulso de glicerol se fez necessária após atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 40, já que se verificou o esgotamento desta fonte de carbono.

Durante os experimentos foram retiradas amostras regularmente para determinação da concentração celular (Item 3.8.1); quantificação da concentração de ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos (Itens 3.8.2 a 3.8.4); quantificação da produção de PspA e de proteínas contaminantes (Item 3.8.5); análise de retenção plasmidial (Item 3.7.6) e quantificação de açúcares e de ácidos orgânicos (Item 3.8.7). Utilizando estas amostras também, foi possível estimar os valores de velocidade específica máxima de crescimento e produtividade em biomassa e produto de interesse (Item 3.9).

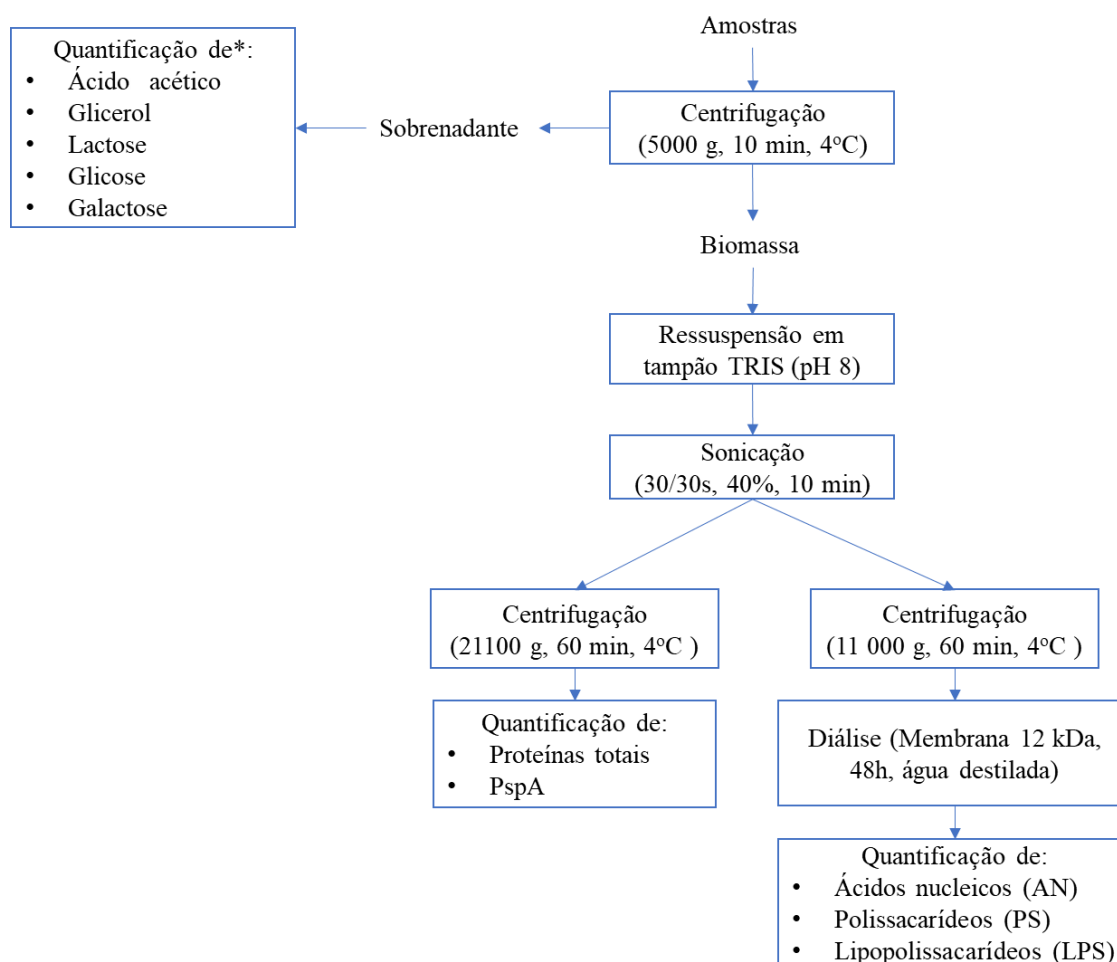
3.8 MÉTODOS ANALÍTICOS

O procedimento de tratamento das amostras está esquematizado na Figura 4. Após a retirada de uma alíquota para determinação da concentração celular por leitura da densidade ótica, as amostras foram centrifugadas (5 000g 15 min, 4 °C) para a separação da biomassa e do sobrenadante (meio de cultivo e componentes solúveis). O *pellet* celular foi ressuscitado em tampão tris (tris 20 mM, NaCl 250 mM e pH 8,0) e a suspensão resultante foi submetida à sonicação para rompimento celular com pulsos de 30 s (on/off), amplitude de 40%, totalizando

10 min. Após este procedimento a suspensão resultante foi centrifugada e a fração solúvel foi separada dos debrís celulares por nova centrifugação (11 000 g, 60 min, 4 °C). O lisado foi utilizado para quantificar proteínas totais solúveis (PT) e a proteína de interesse (PspA).

Para a determinação da concentração de ácidos nucleicos (AN), polissacarídeos (PS) e lipopolissacarídeos (LPS) o lisado foi submetido primeiramente à diálise. A diálise foi realizada utilizando membranas de 12 kDa e água destilada, por um período de 48h. Esta etapa teve por objetivo reduzir possíveis interferências causadas por moléculas de baixo peso molecular e melhorar a precisão dos métodos analíticos.

Figura 4. Esquema de preparação das amostras para análises de AN, PS, LPS, PT, PspA, ácido acético, glicerol, lactose, glicose e galactose.



*Biorreator

3.8.1 Determinação da concentração celular

A quantificação do crescimento celular foi realizada por meio da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm. Retirou-se uma alíquota de 1 mL e diluiu-se de forma a obter uma leitura máxima de 0,8 para maior precisão.

A conversão para concentração celular – $C_{X_{BL21}}$ (gMS/L) de *E. coli* BL21, foi calculada por meio da equação 1 (SILVA, 2015).

$$C_{X_{BL21}}(gMS/L) = 0,423 \pm 0,008 * DO_{600\text{ nm}} \quad (1)$$

Para a ClearColi, foi utilizado o método de quantificação de massa seca para obter a relação de DO e concentração celular. Este método consiste em filtrar à vácuo um volume conhecido do caldo em membrana (poro de 0,22 μm) cuja massa foi previamente aferida. A membrana é então submetida à secagem a 65°C por 48 h. A diferença entre as massas da membrana antes e depois da filtração é então utilizada para o cálculo da concentração celular ($C_{X_{cc}}$). Os resultados e equação são mostrados no item 4.2.

3.8.2 Determinação de ácidos nucleicos

Com as amostras dialisadas do sobrenadante do cultivo e do lisado, previamente diluídas, foi feita a leitura da absorbância num comprimento de onda de 260 nm e este valor foi multiplicado por 50 para obter assim a concentração de ácidos nucleicos (equação 2). Este processo pode ser realizado automaticamente utilizando o NanoDrop.

$$C_{AN} = 50 * Abs_{260\text{nm}} \quad (2)$$

C_{AN} é a concentração de ácidos nucleicos (mg/L), $Abs_{260\text{nm}}$ é a absorbância em espectrofotômetro num comprimento de onda de 260 nm e 50 corresponde à concentração de ácidos nucleicos em mg/L correspondentes a uma unidade de absorbância (HEPTINSTALL e RAPLEY, 2000).

3.8.3 Determinação de polissacarídeos totais

Foi utilizado o método de Fenol Sulfúrico. Este método consiste em adicionar uma alíquota de 200 μ L de amostra dialisada, previamente diluída, em um tubo de ensaio, acrescentando 200 μ L de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. A leitura em espectrofotômetro é feita a 490 nm. A concentração de PS foi quantificada de acordo com a curva padrão obtida com glicose (equação 3) nas concentrações (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0) g/L (DUBOIS *et al.* 1956).

$$C_{PS} = 0,107Abs_{490nm} \quad (3)$$

3.8.4 Determinação da concentração de lipopolissacarídeos

Foi utilizado o método conhecido como KDO (2-ceto-3-desoxi-octonato) descrito por Karkhanis *et al.* (1978). Este método consiste na utilização de 4 soluções (Tabela 4) e Dimetilsulfóxido P.A. (DMSO), adicionadas de forma seriada, sob aquecimento, em amostras previamente dialisadas e diluídas. A leitura em espectrofotômetro é feita a 548 nm. Quantificou-se a concentração de KDO na amostra, seguindo a equação 4 resultante da curva de calibração previamente construída nas concentrações de 16, 8, 4, 2, 1 e 0 μ gKDO/mL.

$$C_{LPS} = 31,501Abs_{548nm} \quad (4)$$

Tabela 4. Soluções utilizadas na metodologia de quantificação de LPS.

SOLUÇÃO	A	B		C		D
SUBSTÂNCIA	Ácido sulfúrico	Ácido periódico	Ácido sulfúrico	Arsenito de sódio	Ácido clorídrico	Ácido tiobarbitúrico
CONCENTRAÇÃO	0,018M	0,04M	0,0625M	2,6%	0,5M	0,3%

3.8.5 Determinação da concentração de proteínas

Como descrito na Figura 4, após a centrifugação das amostras sonicadas, foi separado o sobrenadante contendo a fração solúvel de proteínas. O sobrenadante correspondente ao lisado foi submetido ao procedimento proposto por Bradford (1976) para determinação da concentração de proteínas totais (PT).

A produção de proteína foi quantificada por SDS-PAGE e densitometria de banda para estimar a concentração de PspA solúvel. Este cálculo foi realizado por meio da equação 5, onde A_{PspA} corresponde a área do pico referente a PspA, $\sum_j A_j$ corresponde a soma das áreas de todos os picos e C_{PT} à concentração de proteínas totais determinada por Bradford (CAMPANI, 2016).

$$C_{PspA}(mg_{PspA}/gMS) = \frac{A_{PspA}}{\sum_j A_j} \cdot C_{PT} \quad (5)$$

3.8.6 Determinação da retenção plasmidial

A análise de retenção plasmidial foi realizada retirando-se amostras de 100 μ L de suspensão celular de forma estéril na fase de indução. Esta suspensão foi então diluída dependendo da concentração celular, a fim de obter colônias isoladas na placa. Para experimentos em *shaker* as diluições foram na ordem de 10^5 e 10^6 e de 10^7 e 10^8 , para o cultivo em biorreator. A semeadura foi feita em placas contendo meio LB-ágar sem Canamicina e incubadas por 24h a 37°C. Em seguida repicou-se 50 ou mais colônias em placas de LB-ágar contendo 30 mg/L de Canamicina. O mesmo procedimento foi seguido em placas sem o antibiótico. Após repicadas as placas foram incubadas novamente durante 24h a 37 °C (SILVA, 2015).

A razão entre o número de colônias presentes nas placas com antibiótico em relação ao número de colônias nas placas sem antibiótico foi calculada de forma a obter o valor de retenção plasmidial em percentagem. Esta variável foi determinada apenas ao longo da fase de indução nos cultivos com ClearColi e *E. coli* BL21 em *shaker* a 32 °C e para o cultivo em biorreator.

3.8.7 Determinação da concentração de ácidos orgânicos e glicerol

A determinação da concentração de glicerol e ácido acético 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. Estas análises foram realizadas apenas com as amostras coletadas durante o cultivo em biorreator.

3.9 PROCEDIMENTOS DE CÁLCULOS

Os dados experimentais de crescimento celular na fase exponencial foram utilizados para o cálculo da velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e do rendimento em biomassa a partir do glicerol consumido ($Y_{X/S}$) em cada uma das temperaturas avaliadas nos ensaios em *shaker* e em biorreator. O cálculo foi feito segundo as equações 6 e 7, respectivamente (SHULER e KARGI, 2002).

$$\ln \frac{C_x}{C_{x0}} = \mu_{max} t \quad (6)$$

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta C_X}{-\Delta C_S} \quad (7)$$

A produção específica de PspA ($Y_{PspA/X}$) foi calculada por meio da equação 8 (CAMPANI, 2014).

$$Y_{PspA/X} (mg_{PspA}/gMS) = \frac{C_{PspA}}{C_x} \quad (8)$$

Também foi calculada a produção específica de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$), foram consideradas proteínas contaminantes todas as proteínas produzidas que não fossem a proteína de interesse (PspA), como mostra a equação 9.

$$Y_{PC/X} = \frac{(C_{PT} - C_{PspA})}{C_x} \quad (9)$$

Com relação às proteínas produzidas nos cultivos sem indução, nos quais não havia produção de PspA, chamadas de proteínas constitutivas (PCt), foi calculada a produção específica pela equação 10. Neste caso $Y_{PCt/X}$ corresponde ao valor de $Y_{PT/X}$.

$$Y_{PCt/X} = \frac{C_{PT}}{C_X} \quad (10)$$

A produção específica de AN ($Y_{AN/X}$), PS ($Y_{PS/X}$) e LPS ($Y_{LPS/X}$) também foi calculada utilizando as equações 11, 12 e 13, respectivamente.

$$Y_{AN/X} = \frac{C_{AN}}{C_X} \quad (11)$$

$$Y_{PS/X} = \frac{C_{PS}}{C_X} \quad (12)$$

$$Y_{LPS/X} = \frac{C_{LPS}}{C_X} \quad (13)$$

A produtividade em massa (P_X) e em proteína de interesse (P_{PspA}) foi calculada utilizando as equações 14 e 15, respectivamente, onde Δt_{total} corresponde ao tempo total de cultivo (CAMPANI, 2014).

$$P_X = \frac{C_X}{\Delta t_{total}} \quad (14)$$

$$P_{PspA} = \frac{C_{PspA}}{\Delta t_{total}} \quad (15)$$

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Tukey foi aplicado nos dados dos cultivos com e sem indução de cada cepa. O teste foi utilizado para comparar cada tratamento, em um nível de confiança de 95%.

Para identificação das condições de cultivo que favorecem a produção de PspA e minimizam a produção de contaminantes foi adotado o planejamento fatorial 2^2 com dois pontos centrais. Foram analisados os efeitos de dois fatores (temperatura e indutor), como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 aplicados na análise de dados de ClearColi e *E. coli* BL21.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura	27 °C	32 °C	37 °C
Indutor	IPTG (1mM)	IPTG (0,5mM) + Lactose (2,5g/L)	Lactose (5g/L)

A análise dos fatores foi realizada por meio do cálculo dos efeitos utilizando o software Statistica 7.0. Foram avaliadas 3 respostas: $Y_{PspA/X}$, $Y_{PC/X}$ e $Y_{LPS/X}$.

O nível de significância (p-valor) foi estimado usando o teste t de Student, apresentado no diagrama de Pareto. Foram considerados como fatores significativos aqueles que apresentassem valores acima 90% de nível de confiança.

Os ensaios de quantificação de proteínas totais foram realizados em triplicata, enquanto os referentes a quantificação de PspA foram realizados apenas uma vez. A quantificação de LPS foi feita em triplicata, como mostrado nas Tabelas 8 e 9.

4. RESULTADOS

4.1 CULTIVOS EM *SHAKER*

4.1.1 Crescimento celular

Nos experimentos realizados o crescimento celular foi acompanhado desde a etapa de preparação do inóculo para que todos os ensaios fossem iniciados com a mesma concentração celular (DO_{600nm} de 0,1). Foi possível determinar o perfil de crescimento durante a fase exponencial, e também durante a indução, avaliando a influência tanto dos indutores quanto da temperatura.

A partir dos dados apresentados na Figura 5, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) foi calculada para ambos os microrganismos, como mostrado na Tabela 6. À 37 °C, temperatura na qual se espera que a *Escherichia coli* tenha um metabolismo mais acelerado (LEE, 1996), a *E. coli* BL21 atingiu um valor de $\mu_{max} = 0,656 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$, enquanto a ClearColi foi de apenas $0,504 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$. Esta diferença também foi observada na temperatura de 27 °C. Para ambas temperaturas a ClearColi teve crescimento cerca de 25 % mais lento durante a fase exponencial. Segundo informações fornecidas pela empresa fornecedora da linhagem (Lucigen [s.d]) a diferença na velocidade de crescimento já era esperada. Em estudo realizado pela empresa comparou-se os crescimentos da *E. coli* convencional e da ClearColi, no qual verificou-se que em cultivos realizados com meio LB, a 37 °C com a *E. coli* convencional seria capaz de atingir um μ_{max} de $0,997 \pm 0,097 \text{ h}^{-1}$, enquanto ClearColi nas mesmas condições chegaria a apenas $0,63 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$.

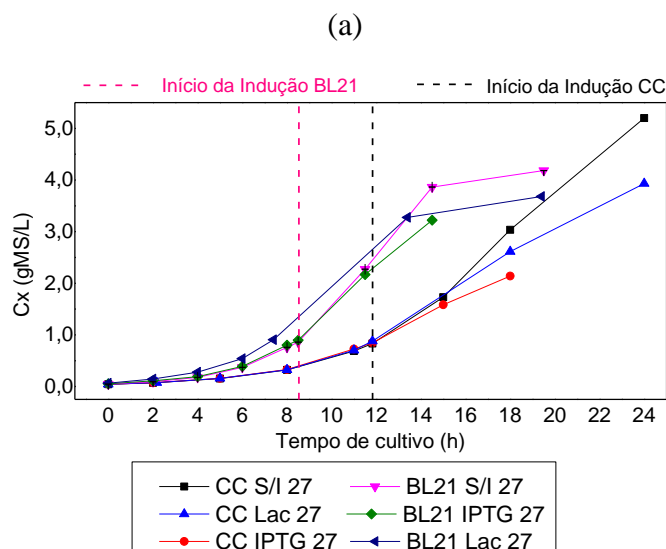
Tabela 6. Crescimento específico máximo (μ_{max}) de ClearColi e *E. coli* BL21 nas temperaturas de 27 °C, 32 °C e 37 °C.

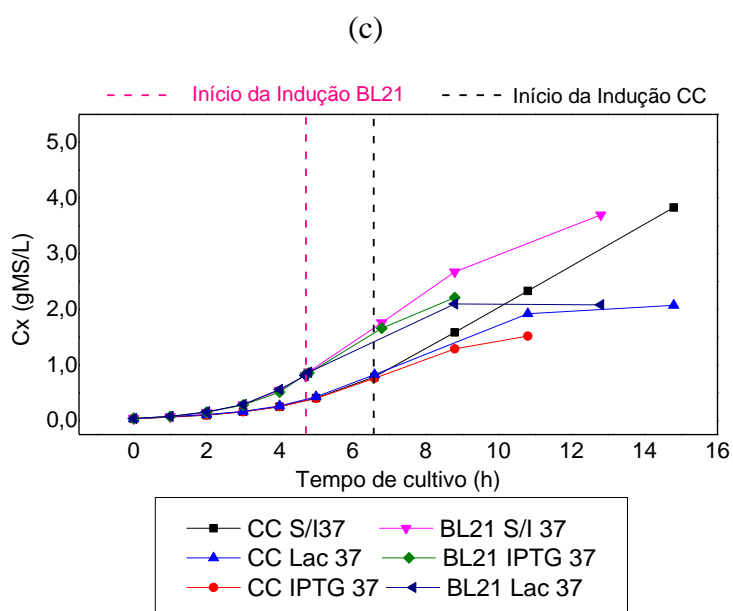
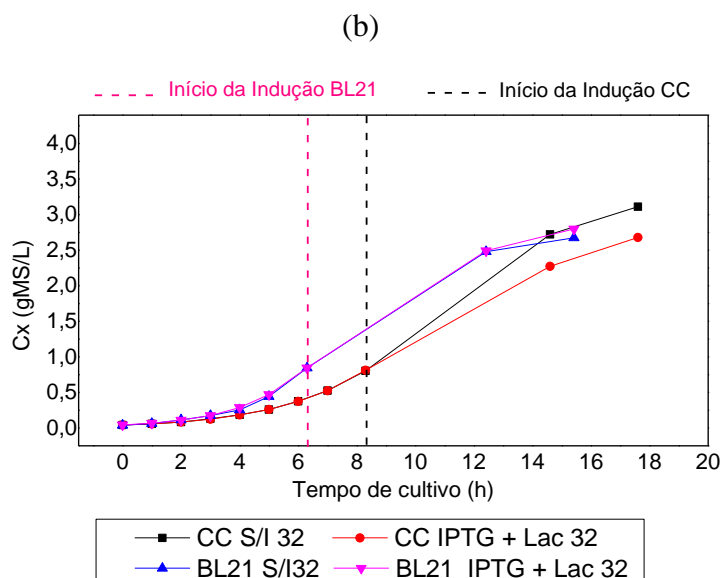
<i>E. coli</i>	T(°C)	μ_{max} (h ⁻¹)	R ²
BL21	37	$0,656 \pm 0,009$	0,999
BL21	32	$0,479 \pm 0,005$	0,997
BL21	27	$0,349 \pm 0,005$	0,999
ClearColi	37	$0,504 \pm 0,005$	0,997
ClearColi	32	$0,363 \pm 0,003$	0,999
ClearColi	27	$0,249 \pm 0,002$	0,999

Ainda que a velocidade específica tenha sido menor em ClearColi, o Cx no fim dos ensaios foi similar para as duas cepas (Figura 5). O perfil de crescimento calculado em termos de lnDO antes e depois da adição do indutor são mostrados no Apêndice A. Por meio desses gráficos foi possível verificar que assim como para a BL21, a adição do indutor em uma DO_{600nm} de 2 foi adequada, uma vez que neste ponto as duas cepas estavam na metade final da fase exponencial.

Para os experimentos apresentados na Figura 5 os fatores que determinaram o tempo de cultivo foram a temperatura, o indutor e a velocidade em que o microrganismo chega na concentração de 0,8 gMS/L ($DO_{600nm} = 2$), concentração na qual ocorre a adição do pulso de indutor. Neste último caso a ClearColi apresenta uma desvantagem em relação a *E. coli* BL21, devido a sua velocidade de crescimento ser menor. A escolha da ClearColi como plataforma de produção de proteínas acarreta no aumento do tempo de cultivo proporcional à velocidade de crescimento, ou seja, entre 1,3 a 1,4 vezes maior do que com *E. coli* BL21 na mesma temperatura, como mostrado na Figura 5 (a, b e c). Este aumento no tempo de cultivo também foi verificado no trabalho de Yoo et al. (2017), no qual além da ClearColi apresentar uma velocidade específica 1,3 vezes menor que a *E. coli* convencional, precisou de mais 4h para atingir as mesmas concentrações celulares para a adição do indutor, sendo o cultivo realizado nas condições sugeridas pela empresa Lucigen (meio LB a 37 °C). Este é um parâmetro importante a ser levado em consideração, devido ao impacto no custo do processo.

Figura 5. Crescimento celular durante os ensaios em *shaker*. Cultivos sem indução (S/I); cultivos induzidos com IPTG (IPTG) e Lactose (Lac) usando ClearColi (CC) e *E. coli* BL21, nas temperaturas de 27 °C (a), 32 °C (b) e 37 °C (c).





Com relação aos cultivos com ClearColi conduzidos com lactose como indutor, foi verificado que a produção de células acompanhou ou até superou a observada com *E. coli* BL21 (Figura 5). É importante lembrar que a lactose é quebrada em galactose e glicose pelas células de ClearColi ou BL21, e que a glicose liberada é assimilada como fonte de carbono, podendo favorecer assim o crescimento celular (TURNER et al., 2005).

O cultivo a 32 °C foi realizado com a adição de um pulso composto pela mistura dos dois indutores (IPTG e lactose). Na literatura é possível encontrar estudos em que esta mistura de indutores foi utilizada (CARVALHO et al., 2012) e as principais vantagens residem na ativação do operador *lac* de forma rápida e contínua pela ação do IPTG, fornecimento de fonte

de carbono adicional (glicose originada da quebra da lactose), além da possibilidade de diminuição da concentração de IPTG no meio, diminuindo a ação tóxica sobre a célula (DVORAK et al., 2015). Por essas razões, o crescimento no ensaio sob indução conduzido a 32°C foi similar ao observado no experimento sem indução realizado na mesma temperatura (Figura 5) seja com a cepa BL21 quanto com a ClearColi.

4.1.2 Produção de PspA

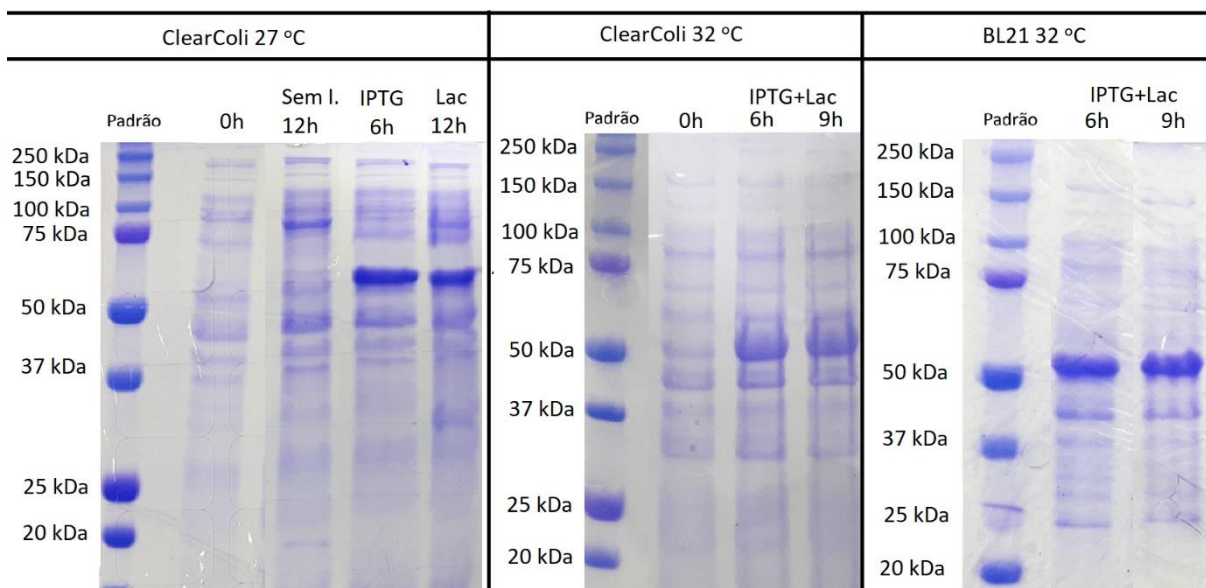
A escolha das condições ótimas de cultivo e indução deve levar em consideração não apenas a maximização da produção específica da proteína de interesse, mas também outros fatores, tais como a minimização da formação de contaminantes.

Os dados da produção de PspA, PC e PT para cada tempo de amostragem, assim como para cada cepa estão no Apêndice B. Constatou-se que a maior produção de PspA por célula ocorreu no fim dos cultivos, portanto foram estas as amostras utilizadas para análise posterior. Ou seja, a quantificação dos contaminantes foi feita apenas nos tempos finais de indução.

Constatou-se que antes do início da indução (0h), assim como nos ensaios sem indução, não houve produção significativa da proteína de interesse (Figura 6). Portanto, não foi verificada a ocorrência de escape de proteína, fato observado em estudos como o de Silva (2015). O escape é prejudicial uma vez que a produção de proteína de interesse antes da adição do indutor significa que a fonte de carbono estaria sendo utilizada para a produção de proteína e não da biomassa, o que afetaria por sua vez a velocidade específica de crescimento. A ausência de um repressor, como a glicose, torna este comportamento possível e visto que foi utilizado apenas glicerol como fonte de carbono, verificar se ocorre escape torna-se necessário. Este comportamento não pode ser descartado para nenhuma das cepas estudadas, mas pode-se afirmar que o método utilizado para a quantificação da PspA não possibilitou determinar quantidade significativa de PspA antes da indução ou no decorrer dos cultivos sem indução em *shaker*.

Além disso, por meio da Figura 6 foi possível identificar a presença de uma proteína de coloração intensa no gel contida no intervalo de 37 e 50 kDa, a qual está presente antes e depois da indução, assim como esta também na BL21. A formação desta proteína independente da adição do indutor indica que esta seria derivada do crescimento da *E. coli* e não das condições de indução, podendo ser um exemplo de proteína contaminante e constitutiva. A produção específica de proteínas contaminantes será avaliada de forma mais aprofundada no item 4.1.3.1.

Figura 6. Acompanhamento da síntese proteica no ensaio com ClearColi a 27 °C e a 32 °C e de BL21 a 32 °C. Padrão de peso molecular na faixa da esquerda.

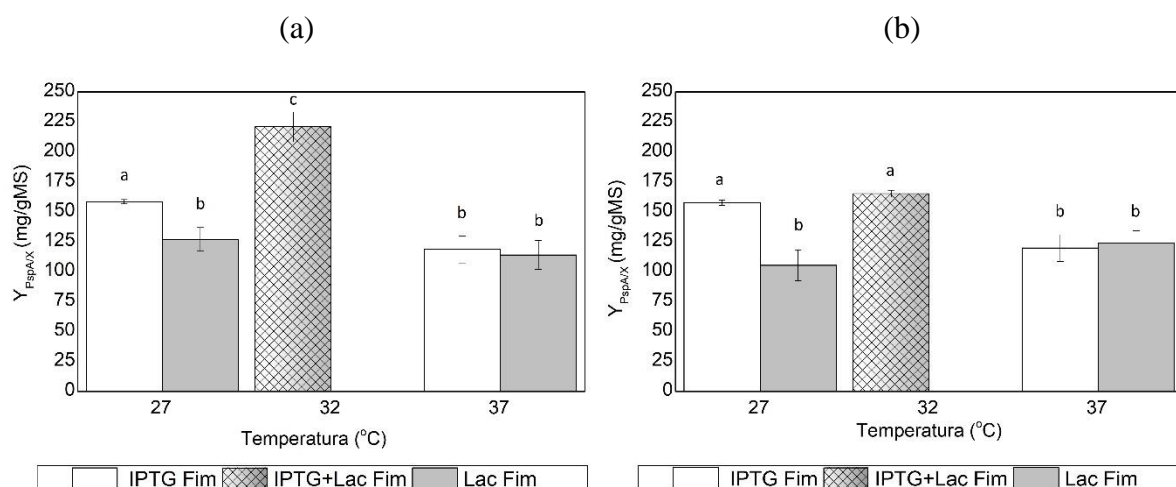


Observou-se também que o maior valor de $Y_{PspA/X}$ foi alcançado utilizando a mistura de IPTG e lactose como indutores, na temperatura de 32 °C, sendo 165 ± 3 mg/gMS para ClearColi e 221 ± 13 mg/gMS para *E. coli* BL21. Além disso, a utilização de IPTG como indutor na temperatura de 27 °C teve um resultado estatisticamente igual ao da temperatura de 32 °C para a ClearColi, segundo o teste de Tukey, como apresentado na Figura 7b. Para a BL21 (Figura 7a) observa-se que o aumento da temperatura de 27 para 37 °C, induzindo com IPTG, resultou em menor produção de PspA, enquanto a condição intermediária resultou em um aumento expressivo na produção da proteína de interesse.

As outras condições investigadas, como a utilização lactose como indutor, ou cultivos na temperatura de 37 °C, não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Nos experimentos realizados na temperatura intermediária (32 °C) a retenção plasmidial, não avaliada nas demais condições de indução estudadas, foi avaliada. Verificou-se que a porcentagem de retenção plasmidial caiu de 98% (no início da indução) para 50% (após 9h de indução) para a ClearColi, enquanto para a BL21 diminuiu a 40%, confirmando que para ambas as cepas as condições de indução utilizadas levam a uma diminuição de mais da metade de células contendo plasmídeo. O valor final da retenção plasmidial foi similar ao obtido nos cultivos da BL21 à mesma temperatura (~50%) tendo IPTG como indutor.

Figura 7. Dados de produção específica de PspA ($Y_{PspA/X}$) no fim da indução em ensaios com *E. coli* BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.



4.1.3 Produção de contaminantes

A importância da avaliação da presença de contaminantes reside no impacto destes sobre os processos de purificação, de modo a torná-los mais caros e de maior complexidade. Por esta razão, a decisão de avaliar os principais contaminantes presentes na biomassa da *E. coli* usada como material de partida no processo de purificação como proteínas contaminantes (PC), ácidos nucleicos (AN), polissacarídeos (PS) e lipopolissacarídeos (LPS), ainda na etapa de seleção das condições de cultivo/indução, com o objetivo de identificar as condições de indução que levem à menor produção de contaminantes.

Os dados referentes à formação de contaminantes antes do início da indução, correspondente ao tempo 0h da indução (a amostra é retirada imediatamente antes da adição do pulso indutor), assim como os dados referentes à presença de contaminantes nos cultivos sem indução (Tabela 7) e ao final da indução (Tabelas 8 e 9) foram utilizados para a construção das Figuras 8 a 11, nas quais foi aplicado o teste de Tukey para um nível de confiança de 95%. Um dos objetivos da análise de Tukey foi comparar as condições de início da indução com as do fim da indução e às do final dos experimentos sem indução, para cada cepa. Outro objetivo foi a comparação das cepas entre si. A análise da influência dos fatores temperatura e indutor na produção de contaminantes para ambas as cepas foi feita por planejamento experimental (tópico 4.1.5).

Tabela 7. Dados de $Y_{AN/X}$, $Y_{PS/X}$ e $Y_{LPS/X}$, antes da indução e nos ensaios sem indução.

<i>E. coli</i>	Temperatura (°C)	Amostra	Tempo de cultivo (h)	$Y_{AN/X}$ (mg/gMS)	$Y_{PS/X}$ (mg/gMS)	$Y_{LPS/X}$ (mg/gMS)
BL21	27	Antes da Ind.	8,5	294 ± 1	175 ± 13	3,6 ± 0,1
		S/ Ind. Fim	14,5	176 ± 5	61 ± 6	2,3 ± 0,2
	32	Antes da Ind.	6,2	143 ± 0,4	94 ± 14	1,62 ± 0,1
		S/ Ind. Fim	15,3	166 ± 0,3	44 ± 7	2,4 ± 0,1
	37	Antes da Ind.	4,8	162 ± 3	124 ± 13	6,3 ± 0,2
		S/ Ind. Fim	12,8	136 ± 2	47 ± 4	3,2 ± 0,1
ClearColi	27	Antes da Ind.	11,8	139 ± 3	84 ± 7	2,4 ± 0,2
		S/ Ind. Fim	24	88 ± 1	84 ± 9	0,9 ± 0,1
	32	Antes da Ind.	8,2	149 ± 3	142 ± 17	2,8 ± 0,3
		S/ Ind. Fim	20,3	137 ± 4	147 ± 1	1,5 ± 0,1
	37	Antes da Ind.	6,6	159 ± 3	85 ± 3	3,0 ± 0,1
		S/ Ind. Fim	14,8	143 ± 1	83 ± 3	1,5 ± 0,1

4.1.3.1 Proteínas contaminantes

As proteínas contaminantes, que correspondem às proteínas produzidas juntamente com a proteína de interesse (PspA), foram quantificadas seguindo o procedimento descrito no item 3.9 na forma da produção específica ($Y_{PC/X}$).

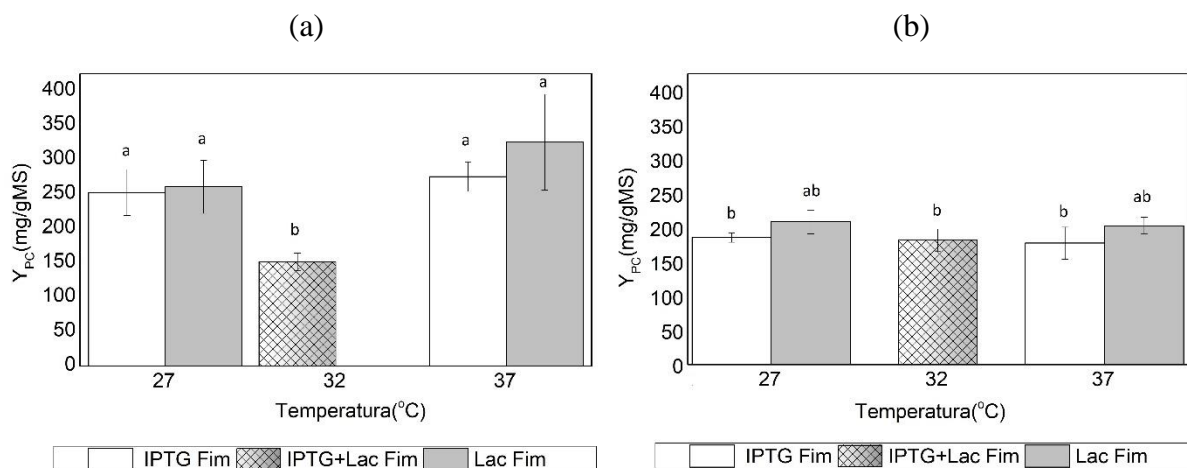
Os resultados de $Y_{PC/X}$ da ClearColi mostraram que nenhuma condição de indução avaliada influencia a formação de proteínas contaminantes, pois os valores de $Y_{PC/X}$ não apresentam diferença estatisticamente significativa (Figura 8b). Isto sugere que a produção de proteínas diferentes da PspA está associada ao metabolismo do microrganismo não diretamente relacionado à indução. Já com relação a *E. coli* BL21 a única condição que mostrou diferença estatística foi a de 32 °C, na qual foi verificada uma diminuição do valor de produção de proteínas contaminantes, chegando a 151 ± 13 (mg/gMS).

Ao comparar os valores de produção específica de proteínas totais ($Y_{PT/X}$) no fim dos cultivos sem indução (Apêndice B) foi observado que estes valores não apresentam diferença estatística quando comparados à produção de proteínas totais dos cultivos com indução. Portanto, a adição do indutor não influenciou o valor final de $Y_{PT/X}$.

No entanto, ao comparar ambas as cepas (Figuras 8a e 8b), foi observada uma diminuição em quase 30% na produção específica de proteína contaminante para a ClearColi nas temperaturas de 27 e 37 °C. Apenas na condição de temperatura intermediária a cepa BL21 apresentou valores de proteína contaminante tão baixos quanto os observados na ClearColi.

Esse resultado potencializa a ClearColi como uma alternativa interessante para produção de PspA, por apresentar qualidades que vão além da presença de LPS com reduzida atividade endotóxica.

Figura 8. Dados de produção específica de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$) no fim da indução em ensaios com *E. coli* BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.

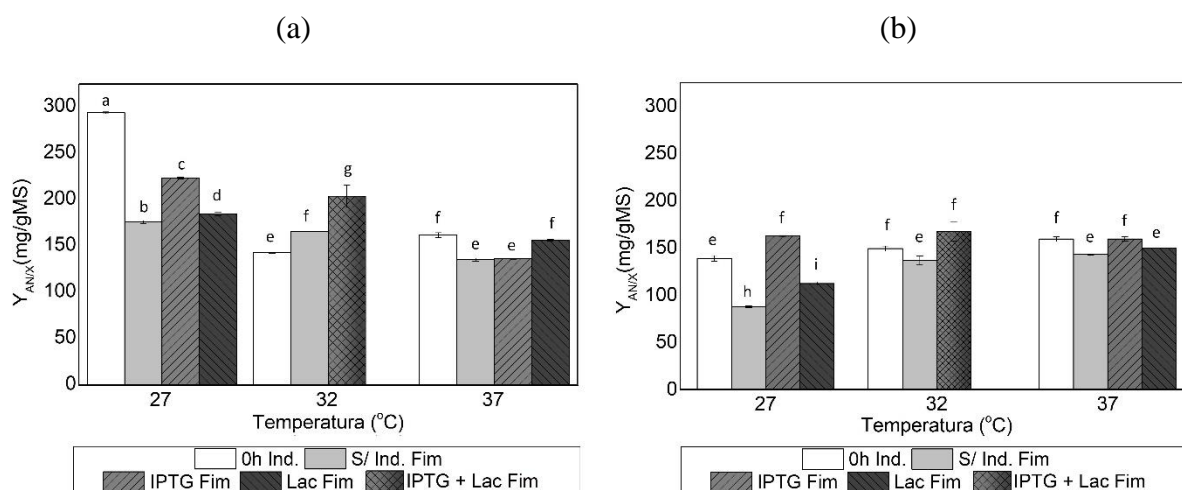


4.1.3.2 Ácidos Nucléicos

Ao comparar as cepas observou-se que a produção de ácidos nucleicos em ClearColi permanece baixa desde o início da indução, sendo por exemplo 139 ± 3 mg/gMS a 27 °C, enquanto em *E. coli* BL21 foi de 294 ± 1 mg/gMS (Figura 9).

Foi possível observar que nos cultivos com ClearColi a formação de ácidos nucleicos até o momento inicial da indução é determinante para a concentração final na célula, ou seja, caso a condição de cultivo na fase exponencial favoreça a formação de maiores quantidades de ácidos nucleicos (Figura 9b), esta quantidade permanecerá até o fim da indução. A maior formação de ácidos nucleicos durante a fase exponencial de crescimento pode ser explicada pelo aumento do material genético (cromossomos e plasmídeo), já que a duplicação do mesmo se intensifica na fase exponencial. Portanto, ao chegar na fase de desaceleração, que corresponde ao fim do cultivo, a duplicação cessa e o $Y_{AN/X}$ diminui.

Figura 9. Dados de produção específica de ácidos nucleicos ($Y_{AN/X}$) no fim da indução em ensaios com *E. coli* BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.



É também no fim fase lag e início da fase exponencial que ocorre a síntese de proteínas de forma mais intensa, havendo também a produção de ácidos nucleicos para a expressão das mesmas (VILLELA, 1972). Isto pode ser facilmente observado nas Figuras 9a e 9b, nas quais os valores correspondentes ao final dos cultivos sem indução (barra cinza claro) são quase sempre menores que os de logo antes do início da indução (barra branca) para ambas as cepas.

Em cultivos com ClearColi também foi constatado que nos ensaios onde foi utilizado IPTG ocorreu uma maior produção de AN nas temperaturas de 27 °C e a 32 °C. Isto pode decorrer do fato do IPTG não ser consumido e com isto o operon *lac* fica sempre ativo. Ou seja, ao utilizar IPTG como indutor ocorre a formação contínua de RNAm para a síntese de PspA, o que não ocorre com o uso da lactose. Quando a lactose se liga ao *lacI*, libera o promotor e ocorre a síntese dos RNAs. No entanto, conforme vai sendo consumida, o *lacI* fica livre e reprime novamente o operon, diminuindo a síntese dos RNAs (TURNER et al., 2005).

Para a BL21 a variação da produção específica de ácidos nucleicos apresentou semelhanças e diferenças em relação à observada com a ClearColi. Entre as semelhanças, constata-se que a maior produção de AN ocorreu na fase exponencial, diminuindo com o tempo de cultivo, como observado para a ClearColi, com exceção do cultivo a 32 °C. Também se observou que a produção de AN antes do início da indução a 37 °C foi estatisticamente igual. Porém, chama a atenção a alta produção específica de ácidos nucleicos a 27 °C antes do início da indução, que é praticamente o dobro da observada a 37 °C para a própria BL21 ou em

qualquer temperatura para a ClearColi. Assim, a diminuição na formação desse contaminante é favorecida com o aumento da temperatura para a BL21.

É importante destacar que o método utilizado para a quantificação dos AN sofre influência de outras substâncias contidas na amostra, o que pode afetar a precisão das medidas. Embora todas as amostras analisadas tenham sido previamente dialisadas, a diálise pode não ter sido suficiente para eliminação de todos os interferentes. Segundo Fleige et al (2006), uma amostra RNA de alta pureza deveria ter uma razão das absorbâncias A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2. Caso isto não ocorra, a amostra poderia estar contaminada devido à presença de proteínas. As amostras de lisado de ambas cepas apresentaram valores entre 1,5 e 1,7. O valor apresentado na Figura 9a para a amostra anterior ao início da indução, 27 °C de BL21 foi o único que apresentou razão A_{260}/A_{280} de 1,83 e, portanto, as outras amostras estão fora da faixa de confiabilidade do método, o que pode comprometer a interpretação apresentada acima.

4.1.3.3 Polissacarídeos

Foi verificado que a produção específica de PS apresenta os valores elevados antes do início da indução, ou seja, a formação de PS ocorre predominantemente durante a fase exponencial de crescimento tanto para a ClearColi como para a BL21 (Figuras 10a e b).

Assim como para ácidos nucleicos, a produção de PS pode estar associada ao crescimento, sendo mais intensamente produzido até o momento da indução. Com ClearColi a temperatura escolhida para a fase de crescimento mostra-se determinante para os valores de $Y_{PS/X}$ e para presença desse contaminante no material de partida, uma vez que tanto ao final dos experimentos com e sem indução, os valores não variam de forma significativa (Figura 10b). Como a formação de PS foi mais intensa na temperatura de 32 °C, a estratégia de cultivo recomendada para minimizar a presença desse contaminante seria conduzir a fase de crescimento a 27 ou 37 °C.

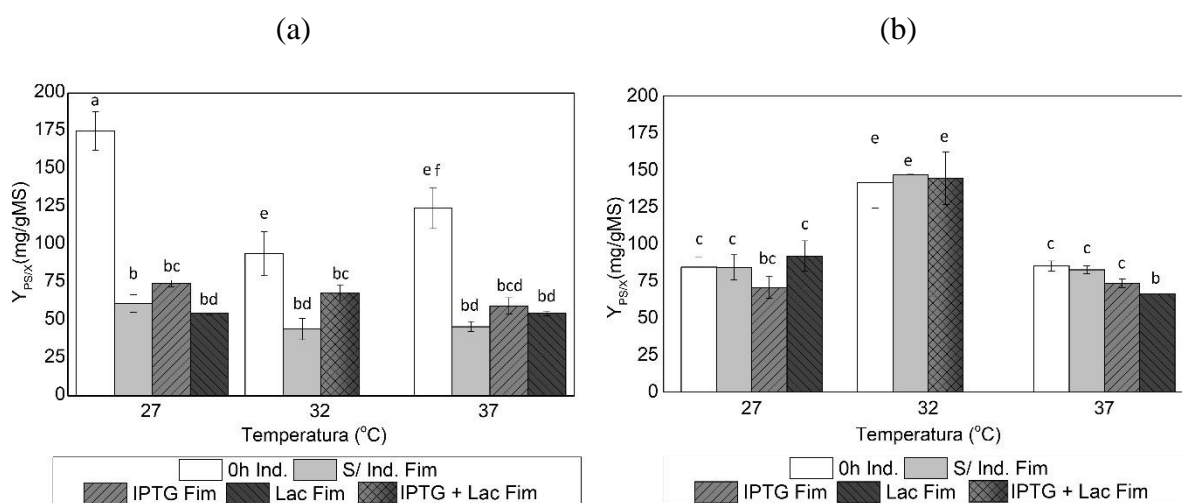
Com relação a *E. coli* BL21 foi observada uma variação grande do início ao fim da indução. Valores menores no fim dos cultivos podem ser explicados pela capacidade da *E. coli* utilizar o PS da cápsula como reserva de carbono. Assim, a hipótese sugerida para este comportamento seria que o polissacarídeo desta cepa pode estar sendo consumido ocasionando a diminuição de $Y_{PS/X}$ ao longo da indução. Este comportamento já foi citado anteriormente no estudo realizado por Tettelin (2001) com *S. pneumoniae*. Neste estudo verificou-se que este microrganismo produzia enzimas capazes de degradar a própria cápsula. Outro microrganismo

capaz de consumir componentes da cápsula é a *Saccharomyces cerevisiae*, que consome o glicogênio e o utiliza como reserva de carbono (THOMSSON, GUSTAFSSON e LARSSON, 2005) sustentando a hipótese que a *E. coli* poderia apresentar comportamento similar, por analogia com estes microrganismos.

A possibilidade de lise celular foi descartada por meio de ensaios de quantificação de polissacarídeos nas amostras de sobrenadante (resultados não mostrados no presente trabalho). Por meio destes ensaios verificou-se que a quantidade de polissacarídeos no meio também diminui com o tempo.

Outra constatação interessante é o maior valor de $Y_{PS/X}$ apresentado pela BL21 antes do início da indução (Figura 10a) em comparação com a ClearColi (Figura 10b) para as temperaturas de 27 e 37 °C, enquanto para a temperatura de 32 °C foi igual estatisticamente.

Figura 10. Dados de produção específica de polissacarídeos ($Y_{PS/X}$) no fim da indução em ensaios com *E. coli* BL21 (a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.

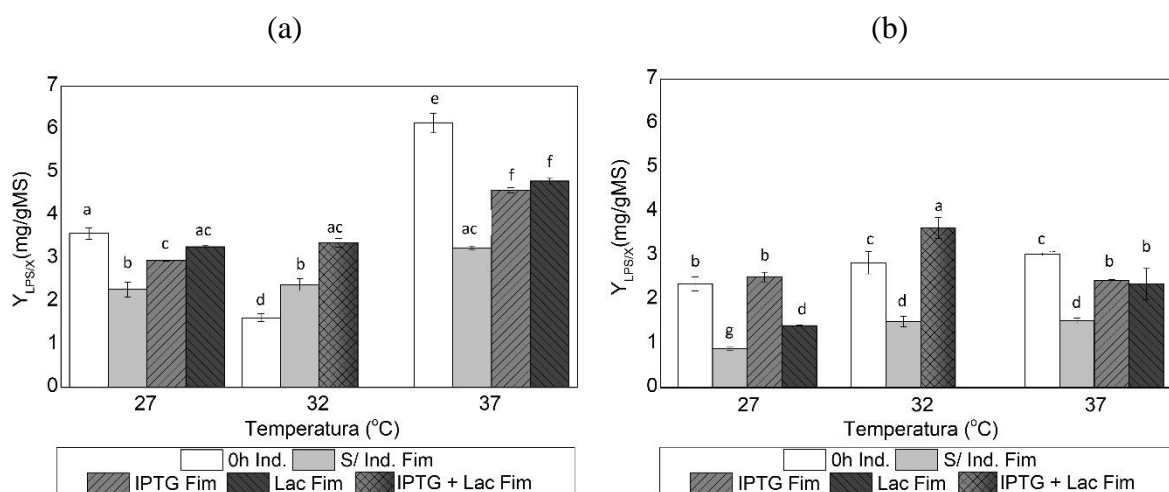


4.1.3.4 Lipopolissacarídeos

Com base na análise dos dados de produção específica de LPS (Figura 11), foi observado o mesmo comportamento em todos os ensaios. O lisado clarificado apresenta maior produção específica de LPS antes do início da etapa de indução (0h Ind.), a qual diminui com o passar do cultivo, independentemente da cepa utilizada, quando não há indução. No entanto,

para ambas as células, as etapas de indução têm valores superiores quando comparados aos ensaios sem indução, sendo um indicativo de que a formação de LPS é favorecida pelo processo de indução. Este fato será comprovado estatisticamente por meio do planejamento experimental descrito no Item 4.1.5. É importante destacar que a quantificação de LPS na ClearColi não implica em atividade endotóxica, já que o LPS produzido pela ClearColi tem estrutura modificada justamente para minimizar a resposta imunológica. Assim, como o método utilizado reage com a parte correspondente ao açúcar do lipopolissacarídeo e não com o lipídeo (parte modificada do LPS de ClearColi), então a análise foi realizada visando estudar o impacto da modificação genética na produção do LPS modificado, e, portanto, para avaliar a resposta endotóxica seria necessária a realização de uma análise específica, a qual será aplicada em trabalhos subsequentes.

Figura 11. Dados de produção específica de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) no fim da indução em ensaios com *E. coli* BL21(a) e ClearColi (b). Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.



A produção mais intensa na fase exponencial mostra-se em concordância com os dados de PS mostrados anteriormente. Como o reagente utilizado para quantificar PS também reage com o açúcar presente no LPS, então estes resultados mostram que o LPS é um dos componentes que leva à quantificação de maiores valores de PS em *E. coli* BL21 antes da adição do indutor (0h Ind.), nas temperaturas de 27 °C e 37 °C.

Para a BL21, a melhor estratégia de cultivo para minimizar a presença de LPS no material de partida seria conduzir a fase de crescimento nas temperaturas de 27 ou 32 °C

(Figura 11a), já que ao fim da indução a produção de LPS não apresenta diferença estatística entre essas duas temperaturas. Para ClearColi a melhor estratégia seria conduzir a fase de crescimento a temperatura mais baixa.

4.1.4 Influência do tempo na produção de contaminantes

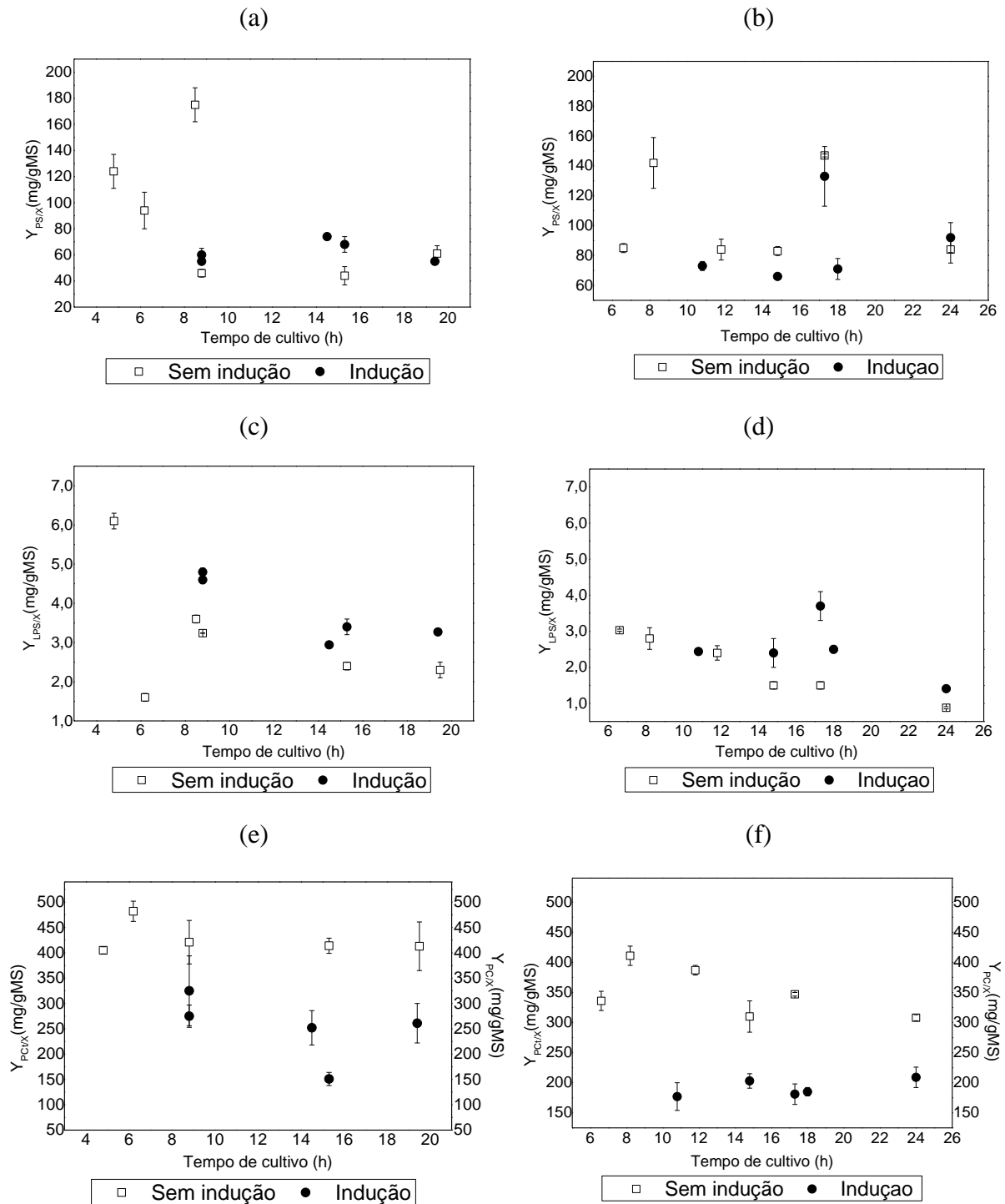
A realização de um cultivo em uma determinada temperatura define a duração de cultivo, o que pode, por sua vez, influenciar o estado fisiológico das células. Da mesma forma, a escolha da temperatura e do indutor modula a duração da fase de indução.

Desta forma, a influência do tempo de cultivo na produção específica de polissacarídeos (PS), lipopolissacarídeos (LPS) e proteínas contaminantes (PC), assim como as proteínas constitutivas (PCt) também foi analisada.

A produção específica de PS em *E. coli* BL21 (Figura 12a), tanto nos cultivos com indução quanto nos sem indução, apresenta uma tendência de diminuição com o tempo. Além da hipótese de reassimilação discutida no item 4.1.3.3, este comportamento pode estar associado à regulação da síntese de PS pelas células. Os resultados sugerem que, para todas as temperaturas estudadas, a síntese de PS é mais intensa antes do início da indução. Durante a fase exponencial, a disponibilidade de nutrientes permite que a célula direcione mais recursos para a síntese de componentes celulares. À medida que os cultivos avançam, os nutrientes vão sendo consumidos. Com disponibilidade limitada de nutrientes, a célula provavelmente irá priorizar a produção de biomassa, direcionando menos recursos para a síntese de componentes celulares não essenciais ao crescimento, como os PS. Assim, a camada de polissacarídeos da parede celular das células geradas após a fase exponencial é provavelmente menor, levando à diminuição de polissacarídeos por grama de célula. O mesmo perfil de diminuição da produção específica de LPS ao longo do tempo foi observado para ambas as cepas, com exceção do cultivo com ClearColi a 32 °C (Figuras 12 c, d).

Em relação à produção de PS em ClearColi (Figura 12b) observou-se um comportamento diferente. A produção permanece constante com o passar do tempo, nos cultivos com indução ou sem indução. No caso da ClearColi, como as vias de síntese de LPS (que também é quantificado como PS) foram manipuladas, é natural esperar que a célula sintetize menos PS, mesmo quando há abundância de nutrientes.

Figura 12. Produção específica de PS (a,b), LPS (c, d), PCT e PC(e, f) em função do tempo de cultivo com as cepas *E. coli* BL21 (a, c, e) e ClearColi (b, d, f).



O efeito do tempo na produção específica de proteínas contaminantes presentes no lisado dos cultivos com indução também foi avaliado. A Figura 12 também mostra dados dos cultivos sem indução, para comparação. No caso dos cultivos sem indução, as proteínas solúveis totais quantificadas foram denominadas como constitutivas (PCt), ou seja, são proteínas cuja produção pelas células de ClearColi ou BL21 está relacionada com o crescimento.

A Figura 12 mostra que a produção de PCt nos cultivos sem indução permanece constante para ambas as cepas, independentemente do tempo de cultivo. O mesmo perfil é observado para a produção de proteínas contaminantes nos cultivos com indução. No entanto, a Figura 12 mostra claramente o impacto da indução na regulação da síntese de proteínas. Ao final da indução, a produção específica de proteínas diminui entre 1,3 a 2,5 em comparação com os valores obtidos, para o mesmo tempo de cultivo, em condição de crescimento nas três temperaturas analisadas. A maior diferença foi observada no cultivo com *E. coli* BL21 a 32 °C.

4.1.5 Influência das condições de indução na produção dos contaminantes PC e LPS e de PspA

Os dados apresentados na Tabela 8 e 9 referem-se à produção específica de PspA, proteínas contaminantes e lipopolissacarídeos (respostas selecionadas) por ClearColi e *E. coli* BL21 ao final da indução. A quantificação da produção de PspA e de PC foi realizada em uma única análise, com repetição apenas no ponto central. Já a quantificação de LPS foi feita em triplicata. Para permitir uma análise estatística dos efeitos da indução na produção da proteína de interesse e dos contaminantes, os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia de planejamento fatorial, com duplicata no ponto central.

Tabela 8. Matriz de planejamento fatorial 2² com as respostas de cada ensaio usando ClearColi.

Matriz de planejamento (ClearColi)							
N. Exp.	T	Ind.	Y _{PspA/X}	Y _{PC/X}	Y _{LPS/X}		
1	-1 (27°C)	-1 (IPTG)	157,4	185,5	2,4	2,6	2,5
2	+1 (37 °C)	-1 (IPTG)	119,7	208,5	2,4	2,4	2,4
3	-1 (27 °C)	+1 (Lac)	105,2	177,4	1,4	1,4	1,4
4	1 (37 °C)	+1 (Lac)	123,7	202,8	2,1	2,6	2,3
5	0 (32 °C)	0 (IPTG + Lac)	167,1	169,7	3,5	4,2	3,8
6	0 (32 °C)	0 (IPTG + Lac)	163,1	193,1	3,5	3,6	3,8

Tabela 9. Matriz de planejamento fatorial 2^2 com as respostas de cada ensaio usando *E. coli* BL21

Matriz de planejamento (<i>E. coli</i> BL21)							
N. Exp.	T	Ind.	$Y_{PspA/X}$	$Y_{PC/X}$	$Y_{LPS/X}$		
1	-1 (27°C)	-1 (IPTG)	158,4	252	2,9	3	2,9
2	+1 (37 °C)	-1 (IPTG)	118,6	275	4,5	4,6	4,6
3	-1 (27 °C)	+1 (Lac)	127	261	3,3	3,3	3,3
4	1 (37 °C)	+1 (Lac)	113,9	325	4,7	4,8	4,8
5	0 (32 °C)	0 (IPTG + Lac)	221	148	3,5	3,3	3,4
6	0 (32 °C)	0 (IPTG + Lac)	213	137	3,5	3,1	3,3

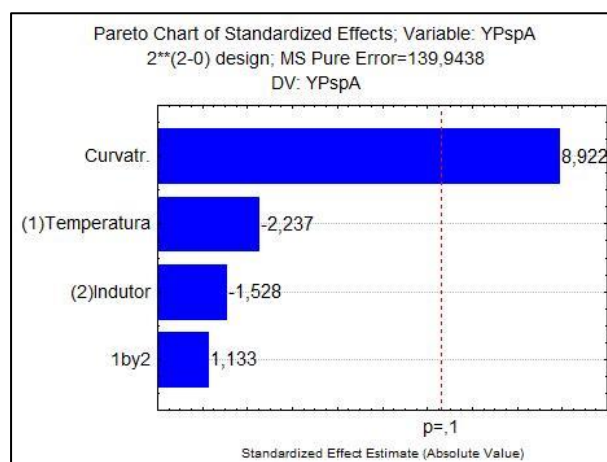
Em relação aos contaminantes AN e PS, a análise estatística dos efeitos da indução na formação desses contaminantes não foi realizada, já que a análise feita no tópico 4.1.3 mostrou que a presença de AN e PS na biomassa obtida ao final da indução é definida pelas condições de cultivo empregadas na fase de crescimento.

Os diagramas de Pareto (Figuras de 13 a 18) foram utilizados para a análise dos efeitos dos fatores temperatura e indutor sobre as respostas selecionadas. Os valores calculados para os efeitos assim como a análise estatística completa estão disponíveis no Apêndice C.

Com relação à ClearColi, os diagramas de Pareto (Figuras 14, 15 e 17) mostram que a curvatura foi o efeito mais significativo para as respostas selecionadas. Lembrando que o efeito da curvatura corresponde ao impacto das condições do ponto central nos fatores avaliados, produção específica de PspA e dos contaminantes. Portanto, a produção de PspA é favorecida se a fase de indução for conduzida a 32 °C, utilizando a mistura dos dois indutores avaliados (IPTG e lactose). No entanto, essas condições também favorecem a produção de LPS. Como mostra o diagrama de Pareto da Figura 13, o único efeito significativo para a BL21 foi o da curvatura. Assim, também para a *E. coli* BL21(DE3), a condição do ponto central (temperatura de 32 °C, mistura de IPTG e lactose como indutores) foi a que mais favoreceu a produção de PspA.

Campani et al. (2017) também observaram a mais alta produção específica de PspA à temperatura de indução de 32 °C em cultivos da mesma cepa *E. coli* BL21(DE3) pET37b+PspA4Pro do presente estudo. Os experimentos de Campani foram realizados em reator tipo tanque agitado, em batelada, utilizando meio definido, glicerol como fonte de carbono e IPTG como indutor. Segundo os autores, a temperatura de 32 °C oferece condições que favorecem a velocidade de síntese de PspA, com estresse metabólico moderado.

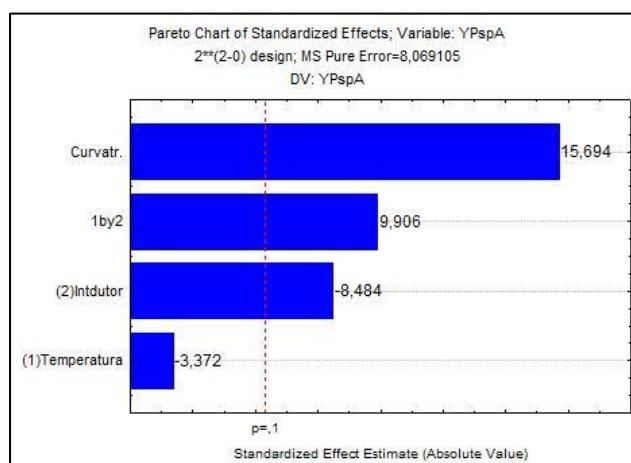
Figura 13. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de PspA ($Y_{PspA/X}$) com *E. coli* BL21.



Com relação à produção específica de PspA com ClearColi (Figura 14), além do efeito da curvatura, os efeitos do indutor e da interação temperatura e indutor também foram significativos. O sinal dos efeitos significativos mostra ainda que a diminuição da temperatura e o uso de IPTG favorecem a produção de PspA.

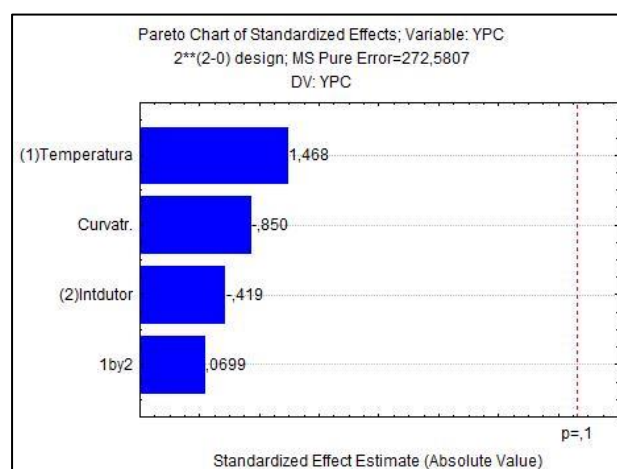
O fato do indutor ter um efeito significativo foi visto também em estudo realizado por Mohajeri et al. (2016). Ele observou que o uso de IPTG em concentrações abaixo de 1 mM foram favoráveis a produção da proteína recombinante estudada (endostantina humana sintética). Para ClearColi já foram relatadas na literatura a utilização de diversas concentrações de IPTG variando de 0.0125 mM para a produção de xilanase (LIANG et al., 2015) a 1 mM para a produção da proteína do choque térmico (Hsp60) (Planasse et al., 2015). Mohajeri e colaboradores (2016) recomendam que para cada variação de cepa e proteína produzida, seja realizada uma análise para determinar a concentração mais adequada de indutor, já que concentrações muito baixas resultam em uma indução ineficiente, enquanto concentrações muito elevadas podem reduzir a velocidade de crescimento da *E. coli*. Nos experimentos aqui relatados foi padronizada a concentração de IPTG de 1 mM, para permitir a comparação com outros estudos já realizados no grupo.

Figura 14. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de PspA ($Y_{PspA/X}$) com ClearColi.



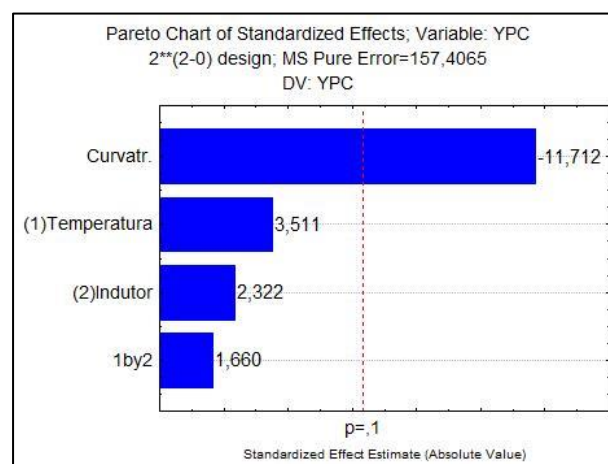
Os resultados de $Y_{PC/X}$ (Figura 15) confirmaram a análise feita anteriormente pelo teste de Tukey. Nenhuma das condições testadas apresentou efeito significativo em um nível de confiança de 90%, ou seja, nem a mudança de temperatura, nem de indutor influencia de forma significativa a produção de proteínas contaminantes quando utilizada a cepa ClearColi. Estas proteínas podem ser em sua maior parte resultantes do metabolismo natural da célula, não estando associadas à produção de proteína recombinante para o caso em estudo.

Figura 15. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$), com ClearColi.



Ao utilizar a cepa *E. coli* BL21, no entanto, verificou-se que uma das condições testadas teve efeito significativo, a curvatura, como observado na Figura 16. O sinal negativo do efeito mostra que a aplicação do pulso indutor constituído de IPTG e lactose, assim como realizar o cultivo na temperatura de 32 °C leva a uma menor produção de proteínas contaminantes. Já que a produção específica de proteínas totais ($Y_{PT/X}$) não muda com o tempo (ver item 4.1.3.1) e a porcentagem de PspA produzida nestas condições superou os 60%, então a produção de proteínas relacionadas ao metabolismo natural da célula diminuiu de forma significativa após a indução.

Figura 16. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de proteínas contaminantes ($Y_{PC/X}$), com *E. coli* BL21



Com relação à produção de LPS em ClearColi (Figura 17) todos os efeitos foram significativos. No entanto, com uma ordem de grandeza de 3 a 5 vezes maior do que a dos outros efeitos, a curvatura se destaca. O sinal dos efeitos mostra que o aumento da temperatura e o uso de lactose favorece a produção de LPS. E, confirmando a observação feita pelo teste de Tukey, o indutor, mais especificamente o uso de IPTG favorece a produção de LPS, conforme mostra o efeito de interação.

Quanto à produção de LPS em *E. coli* BL21 (Figura 18) apenas a interação entre a temperatura e o indutor não foi significativa. O efeito com maior ordem de grandeza foi o da temperatura, sendo aproximadamente 2,5 vezes maior que o efeito da curvatura. O sinal dos efeitos mostra que o aumento da temperatura e o uso de lactose favorece a produção de LPS.

Figura 17. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) com ClearColi.

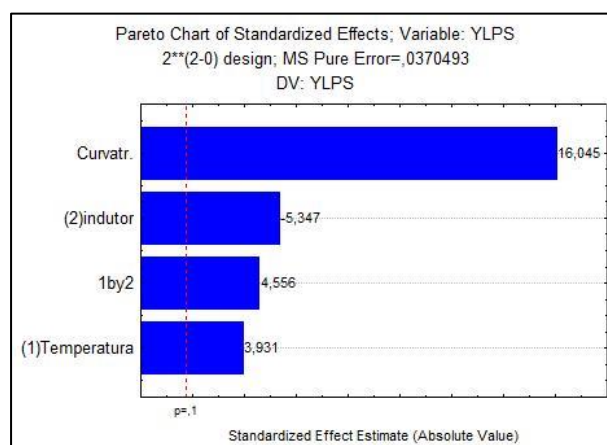
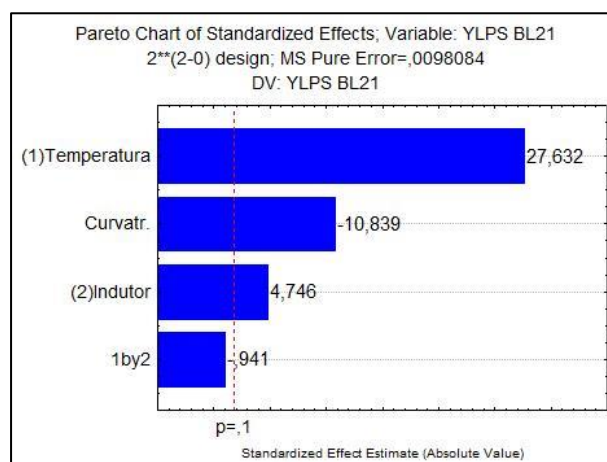


Figura 18. Diagrama de Pareto representando os efeitos dos fatores temperatura e indutor empregados na fase de indução sobre a produção de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) com *E. coli* BL21



Portanto, com base nos resultados apresentados nos tópicos 4.1.2 a 4.1.5, foram identificadas as condições mais favoráveis para a produção de PspA por ClearColi, com menor formação de contaminantes (Tabela 10). Como algumas das condições encontradas foram discrepantes no sentido de serem temperaturas diferentes para favorecer a produção de PspA e diminuir a formação de contaminantes, algumas informações adicionais também foram levadas em consideração, como a velocidade de crescimento. Para a ClearColi a fase de crescimento seria a 27 °C (para minimizar a formação de AN, PS e LPS, devido ao maior tempo de cultivo),

indução a 32 °C, com mistura de IPTG e lactose (condição do ponto central, para maximizar a produção de PspA, com maior velocidade de crescimento). Já para a BL21, as melhores condições identificadas por meio da análise estatística foram crescimento a 27 °C (para minimizar LPS e PS) e indução a 32 °C, utilizando a mistura de indutores, para minimizar a produção de PC, com produção similar de PS e LPS observada à 27 °C, favorecendo a produção de PspA.

Tabela 10. Resumo das melhores condições de crescimento e indução em ClearColi e BL21 a partir dos dados coletados nos cultivos em *shaker*.

Etapa	BL21	ClearColi
Crescimento	32°C ou 37°C: ↓AN	27°C: ↓AN
	27°C (↑t = ↓LPS ↓PS)	27°C (↑t = ↓PS ↓LPS)
Indução	32°C: ↑PspA	32°C e 27°C: ↑PspA
	32°C: ↓PC	PC, PS: Independe das condições estudadas
	27°C (↑t: ↓LPS ↓PS)	LPS: 27°C

4.2 CULTIVO EM BIORREATOR

Tendo por objetivo avaliar o desempenho da ClearColi como plataforma de expressão alternativa em condições industriais, foi realizado um cultivo em biorreator. As condições de cultivo mais promissoras para a obtenção de PspA por *E. coli* detoxificada, identificadas nos experimentos em *shaker*, foram a temperatura de 32 °C (fase de indução), utilizando a mistura dos dois indutores (IPTG e lactose). Como visto nos itens anteriores, o uso de temperaturas mais baixas na fase de crescimento pode contribuir para reduzir a concentração dos contaminantes AN, LPS e PS. Porém, causa impacto no custo do cultivo em biorreator devido à diminuição da velocidade específica de crescimento e ao aumento no tempo de cultivo para alcançar a concentração desejada. Desta forma, o cultivo em biorreator foi realizado como descrito no item 3.7.2, com fase de indução e de crescimento na temperatura de 32 °C.

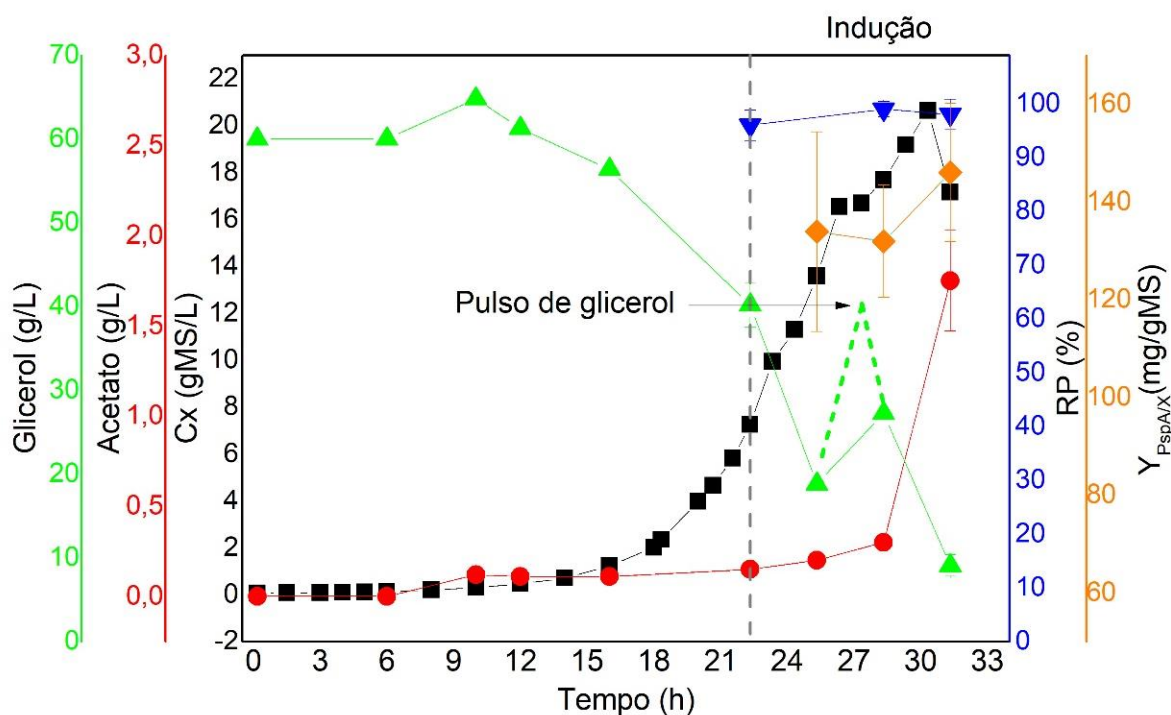
A partir dos resultados de crescimento foi possível construir a curva relacionando Cx e DO_{600nm}, como mostra a equação 16. A correlação foi linear na maior parte dos pontos, no entanto na amostra correspondente ao fim do cultivo isto não ocorreu. Isto poderia estar relacionado ao acúmulo de galactose no interior da célula, este comportamento foi observado

no estudo realizado por Silva (2015). Isto ocorre uma vez que a lactose é hidrolisada, ocorrendo a formação de galactose e glicose na mesma proporção. Enquanto a glicose é imediatamente consumida, a galactose, é em parte liberada no meio e em parte acumulada dentro da célula, mudando a correlação entre densidade ótica e massa seca. A equação (16) foi utilizada para determinar a concentração de células em termos de gMS/L para ClearColi.

$$Cx_{CC}(gMS/L) = 0,408 \pm 0,022 * DO_{600\text{ nm}} \quad (16)$$

O crescimento celular no biorreator apresentou uma fase exponencial caracterizada por um μ_{\max} de $0,245 \pm 0,004\text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$). O perfil exponencial permaneceu até 4h após o início da indução e, a partir deste ponto, o crescimento começou a desacelerar. A concentração final de células após 9h de indução foi de 17,2 gMS/L. Como pode ser observado na Figura 19, foi adicionado um pulso de glicerol logo após a indução, quando a concentração de células chegou a aproximadamente 16 gMS/L, para evitar que a síntese de proteína fosse limitada pelo esgotamento da fonte de carbono.

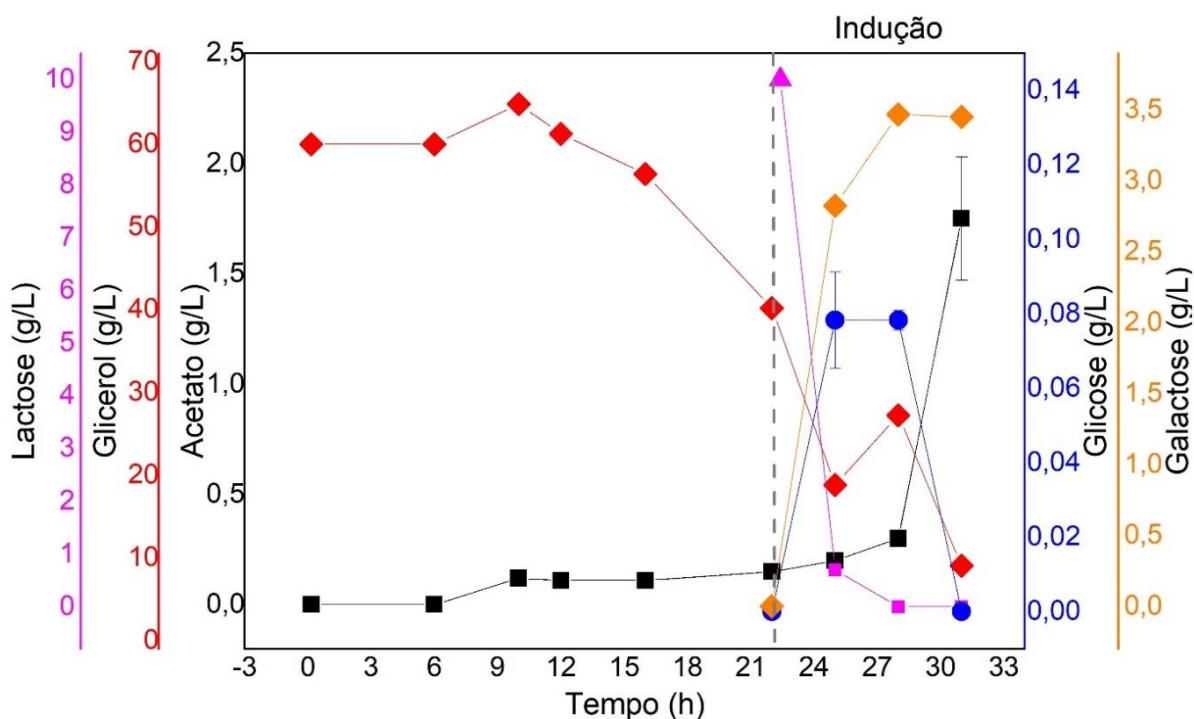
Figura 19. Consumo de glicerol, formação de acetato, crescimento, produção de PspA e retenção plasmidial (%RP) ao longo do tempo em cultivo com ClearColi em biorreator.



Não foi verificada produção de proteína recombinante antes da indução. Já no final do cultivo, a produção específica foi de 146 ± 14 mg/gMS como mostrado na Tabela 11. A estabilidade plasmidial manteve-se alta após as 9h de indução, indicando que a estratégia de adição de pulsos de canamicina a cada 4h foi efetiva.

O consumo de glicose pela *E. coli* pode levar a formação de acetato, o que poderia por sua vez explicar a formação mais acentuada deste metabólito no fim do cultivo, após às 9h de indução, chegando na concentração de $1,8 \pm 0,3$ g/L (Figura 19). No entanto, outra hipótese seria que a formação de acetato seria derivada da própria produção da proteína recombinante. O estudo realizado por Heyland e colaboradores (2011) sugere que a *E. coli* compensa a energia requerida para a formação da proteína recombinante, reduzindo a formação de biomassa e aumentando a geração de energia, com produção de acetato. Buscando estabelecer uma explicação para a formação deste subproduto as concentrações de lactose, glicose e galactose no sobrenadante do cultivo foram quantificadas (Figura 20).

Figura 20. Consumo de lactose, glicerol, glicose e formação de acetato ao longo do tempo em cultivo com ClearColi em biorreator.



Assim, verificou-se que a glicose é rapidamente consumida, não chegando a concentrações maiores que 0,08 g/L. A galactose foi mais intensamente formada durante às 3

primeiras horas de indução, cessando após 6h (3,45 g/L) sendo este dado condicente com o consumo de lactose, que foi mais intensamente consumido após 3h de indução e não estando mais presente no meio após 6h. Estes dados sugerem que a formação de acetato não poderia estar relacionada com o consumo de glicose, pois caso isto ocorresse seria visto uma maior formação deste subproduto a partir das 3 primeiras horas de indução, em que a lactose foi mais intensamente consumida. Portanto, a hipótese relacionada à formação de acetato derivada do processo de produção da proteína recombinante seria mais adequada.

Ao comparar os resultados em biorreator com os resultados em *shaker*, como mostrado na Tabela 11, verificou-se que a velocidade específica de crescimento foi 1,5 vezes menor no biorreator. A menor velocidade de crescimento no cultivo em biorreator pode ser atribuída à maior concentração de canamicina presente no meio ainda durante a fase exponencial devido à estratégia de adição de 4 em 4 h adotada, o que pode ter impactado no crescimento celular.

Tabela 11. Comparação dos dados do cultivo em *shaker* e biorreator a 32°C

Variável	<i>Shaker</i>	Biorreator
Cx (gMS/L)	2,68 ± 0,06	19,6 ± 0,003
Px _{final} (gMS/Lh)	0,15 ± 0,02	0,63 ± 0,01
μ _{max} (h ⁻¹)	0,360 ± 0,001	0,245 ± 0,004
% Retenção plasmidial	50 ± 2	98 ± 3
Y _{PspA/X} (mg/gMS)	165 ± 3	146 ± 14
PspA (g)	0,021 ± 0,002	9,4 ± 0,9
Y _{PC/X} (mg/gMS)	181 ± 17	180 ± 10
Y _{PS/X} (mg/gMS)	133 ± 20	78 ± 9
Y _{LPS/X} (mg/gMS)	3,7 ± 0,4	2,6 ± 0,6

Uma vez que não há dados na literatura quanto à adição de concentrações de canamicina superiores a 50 mg/L em cultivos com ClearColi (YOO et al., 2017; VIRANAICKEN et al., 2017), o efeito da canamicina sobre o crescimento e a estabilidade plasmidial observado no cultivo em biorreator reforça a necessidade de estudos específicos para o aprimoramento de estratégias de cultivo com esta cepa, buscando identificar a concentração que favoreça maior retenção plasmidial, sem comprometer o crescimento e a produção de proteína recombinante. Com relação aos dados encontrados para a BL21, alguns estudos como os de Einsfeldt et al. (2011) e Marini et al. (2014) mostraram que concentrações até 50 mg/L de canamicina não tem efeito significativo no crescimento da cepa convencional. No entanto, em concentrações

menores como 0,1 mM o efeito sobre estabilidade plasmidial é negativo e esta conclusão é consistente nos trabalhos que relatam o uso deste antibiótico.

Outra hipótese para a diminuição da velocidade específica de crescimento seria relacionada à alta concentração inicial de glicerol (60 g/L). Ainda que esta concentração tenha sido utilizada em diversos trabalhos com *E. coli* BL21 (CAMPANI, 2018; SILVA, 2015), a hipótese de inibição pela alta concentração de glicerol não pode ser descartada. A modificação que leva a *E. coli* ser detoxificada, modifica a sua parede celular e, portanto, esta cepa poderia ser mais sensível a altas concentrações dos nutrientes presentes do meio. Uma forma de verificar isto seria calcular o μ_{max} em diferentes etapas antes da adição do indutor. Calculando μ_{max} nas 4 primeiras horas de cultivo e nas 4h que antecederam a adição do indutor observou-se um aumento de 2,2 vezes da velocidade específica indo de 0,13 a 0,28, esta hipótese, sendo, portanto, adequada para explicar a menor velocidade de crescimento no cultivo em biorreator. Assim, mais uma vez torna-se evidente a falta de conhecimento sobre esta nova cepa e também a escassez de trabalhos que busquem a adequação das estratégias de crescimento e indução ao utilizar a ClearColi.

Realizando um resumo dos trabalhos que abordam as condições de cultivo utilizadas durante a fase de crescimento foi construída a Tabela 12. Nesta tabela são mostrados alguns dados de crescimento, como o tempo necessário para a adição do pulso indutor, a DO_{600nm} para a indução e também a concentração final de células.

Tabela 12. Dados de crescimento encontrados na literatura para a cepa ClearColi

Referência	Planasse et al. (2015)	Liang et al. (2015)	Ueda et al. (2016)	Masarapu et al. (2017)	Viranaicken et al. (2017)	Yoo et al. (2017)
Tempo até ind.	-	3	-	4 a 5	7	-
DO_{600} ind.	0,6	0,6	0,6 a 0,8	0,6	0,5 - 0,6	0,6
Cx final	-	-	$0,32 \pm 0,01$	-	-	-
t_{ind} (h)	3	24	4	Aprox. 12h	4	16

A maior parte dos trabalhos publicados até o momento realiza a comparação das cepas convencional e detoxificada em termos de atividade endotóxica ou resposta imunológica do produto expressado pela célula (PLANASSE et al. 2015; VIRANAICKEN et al. 2017; YOO et al., 2017). Há uma escassez de dados quanto às melhores condições de crescimento e de que forma as estratégias de cultivo afetam a resposta celular da cepa detoxificada. Esta observação é comprovada pelas condições de cultivo escolhidas pelos autores, as quais seguem as etapas

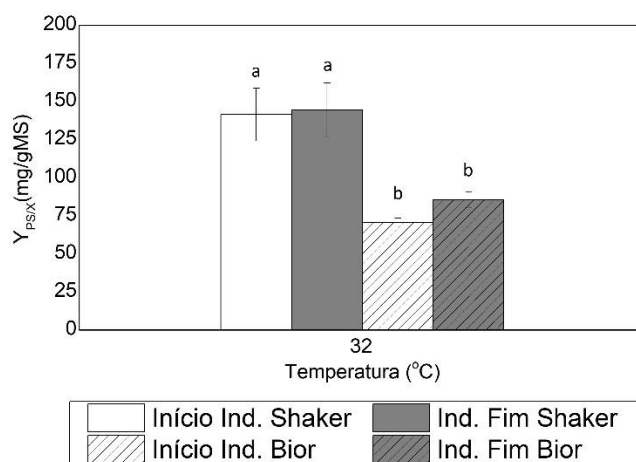
propostas no manual fornecido pela empresa Lucigen, condições como: o meio utilizado, o indutor, a DO_{600nm} de indução e a temperatura. Estratégias como o uso do meio HDF, indutor de origem natural (lactose), ou indução após alcançar Cx maiores com meios contendo diferentes fontes de carbono, como o glicerol, são os diferenciais deste trabalho. Assim, a falta de dados torna difícil realizar a comparação dos resultados do presente trabalho.

Aparentemente, as altas concentrações de canamicina e de glicerol não afetaram a produção de proteína com a mesma intensidade com a qual atingiram o crescimento, já que o valor de produção específica alcançado ao final do cultivo em biorreator é similar ao observado no experimento em *shaker*.

Outra diferença encontrada ao comparar os cultivos em *shaker* e biorreator foi a produção em massa de proteína no fim do cultivo. Com o aumento do volume de 70 mL (*shaker*) para 3,5 L (Biorreator), houve a formação de aproximadamente 450 vezes mais proteína recombinante em massa chegando a 9,4 g. Cultivos com ClearColi em volumes superiores a 1L ainda não foram relatados na literatura, sendo um diferencial do presente trabalho.

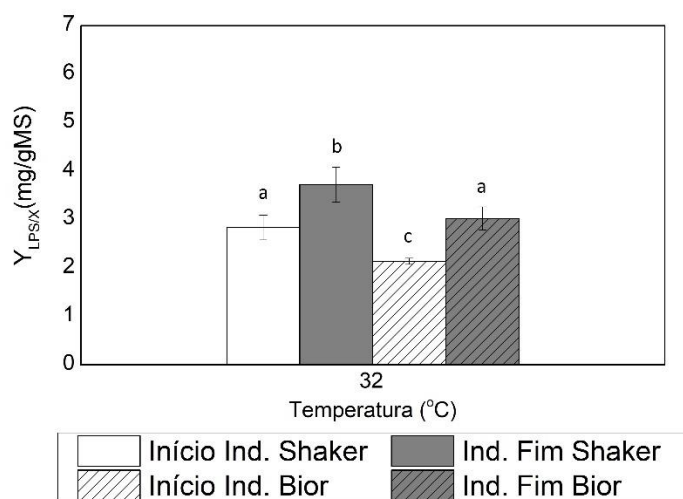
Com relação à formação de contaminantes o cultivo em biorreator se assemelhou ao cultivo realizado em *shaker*. A produção de proteínas contaminantes permaneceu em aproximadamente 180 mg/gMS (Tabela 11). Da mesma forma, a produção de polissacarídeos se manteve constante após a indução (Figura 21), enquanto a de LPS aumentou com a indução (Figura 22). Enquanto a produção de polissacarídeos é determinada pelas condições de cultivo empregadas na fase de crescimento, a de LPS tende a aumentar com durante a fase de indução.

Figura 21. Dados de produção específica de polissacarídeos ($Y_{PS/X}$) no fim da indução em ensaios com ClearColi em *shaker* e em biorreator. Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.



Uma diferença na ordem de grandeza da produção específica de ambos contaminantes foi observada comparando os cultivos em *shaker* com o de biorreator. Tanto em termos de PS como de LPS, observou-se uma maior produção no cultivo em *shaker*. Para o PS, a produção em *shaker* foi cerca de 1,2 vezes maior no início da indução e 1,6 vezes maior após 9h de indução. Da mesma forma, a produção de LPS em *shaker* foi entre 1,3 e 1,4 vezes maior. Novamente, essas diferenças podem ser atribuídas ao efeito da maior concentração de canamicina sobre a velocidade específica de crescimento no cultivo em biorreator.

Figura 22. Dados de produção específica de lipopolissacarídeos ($Y_{LPS/X}$) no fim da indução em ensaios com ClearColi em *shaker* e em biorreator. Comparação por teste de Tukey: resultados estatisticamente diferentes indicados por letras diferentes.



Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com os do trabalho de Campani (2018) que realizou um cultivo em biorreator também a 32 °C, utilizando IPTG (1mM) como indutor, verificou-se que a velocidade específica de crescimento (μ_{max}) foi cerca de 1,8 vezes maior com *E. coli* BL21, do que com ClearColi. A menor velocidade levou a um aumento no tempo necessário de cultivo para a adição do pulso indutor. Enquanto para a ClearColi foi de 22,3h, para a *E. coli* BL21 foi de apenas 11,33h. Este aumento no tempo de cultivo antes da indução impactou na produtividade em células (P_x) e em PspA (P_{PspA}), que foi de 0,63 gMS/Lh e 81,2 mgPspA/Lh, respectivamente. A produtividades foram 2,8 e 2,6 vezes menores que as atingidas com *E. coli* BL21 (Tabela 13).

O rendimento em biomassa foi maior em BL21 do que em ClearColi, sendo $0,44 \pm 0,01$ g/gMS e $0,30 \pm 0,02$ g/gMS respectivamente. Esta diferença foi comprovada pela concentração

de células no final do cultivo sendo Cx 1,5 vezes maior com BL21. Isto sugere que a fonte de carbono é mais eficientemente convertida em biomassa pela BL21 do que pela ClearColi, podendo esta ser uma característica própria da cepa detoxificada.

A produção específica de PspA foi 1,4 vezes maior com ClearColi do que com *E. coli* BL21, devido à porcentagem de PspA ter sido de 47,7% do total de proteínas solúveis, enquanto com *E. coli* BL21 foi de apenas 33 %, em consequência da maior retenção plasmidial obtida no cultivo com a ClearColi (Tabela 13). Assim, a biomassa formada utilizando *E. coli* BL21 produziu PspA com maior porcentagem de proteínas contaminantes. A produção específica de proteínas contaminantes foi de 240,6 mg/gMS com *E. coli* BL21, enquanto com ClearColi foi de apenas 180 mg/gMS.

Tabela 13. Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator convencional a 32 °C, do atual trabalho com a literatura.

Cepa	BL21*	ClearColi
Cultivo	Batelada	Batelada
Meio	Definido	Definido
Indutor	IPTG	Mistura (IPTG + Lactose)
Temperatura (°C)	32	32
Tempo de cultivo (h)	16,8	31,3
Tempo de indução (h)	5,5	9
Tempo até 10< DO<20 (Indução)	11,33	22,3
μ_{max} (h ⁻¹)	0,429 ± 0,003	0,245 ± 0,004
%RP	>50%	> 98%
Cx _{final} (gMS/L)	30 ± 2	17 ± 1
Y _{PspA/X} (mg/gMS)	117,6 ± 11	146 ± 14
Y _{X/S} (gMS/g)	0,44 ± 0,01	0,30 ± 0,02
Y _{PC/X} (mg/gMS)	240,6	180 ± 10
P _x final (gMS/Lh)	1,78 ± 0,09	0,63 ± 0,01
P _{PspA} final (mgPspA/Lh)	209,8	81,2 ± 8

*Campani (2018)

Com relação a produção de acetato, verificou-se que no cultivo com *E. coli* BL21 não houve produção significativa, sendo muito baixa para poder detectada pelo método de quantificação utilizado. Como no cultivo de Campani (2018) não foi usado lactose ou glicose no meio e a indução durou apenas 5,5h, o fato da célula não produzir quantidade considerável deste subproduto era de certa forma esperado. No cultivo com ClearColi observou-se que se a duração da indução tivesse sido de apenas 6h, mesmo utilizando lactose, a produção de acetato não teria sido mais que 0,3 g/L (Figura 19).

Ao comparar cultivos de *E. coli* BL21 que utilizaram lactose como indutor, verificou-se que esta cepa chegou a uma concentração de acetato de 4,3 g/L, após somente 4h de indução, em um cultivo realizado a 37 °C (dados mostrados na tabela 14). Mesmo este cultivo tendo iniciado com uma concentração de 20 g/L, no período em que foi produzida a maior quantidade de acetato, apenas 10 g/L de lactose tinham sido consumidos (mesma concentração do pulso adicionado no cultivo com ClearColi). Já em um cultivo realizado a 27 °C chegou-se a uma concentração máxima acetato de 3,6 g/L após 12h de indução. Comparando estes dois cultivos com os dados coletado com ClearColi, verifica-se que o uso de lactose impacta de forma mais acentuada a produção de acetato com BL21 do que com ClearColi.

Tabela 14. Comparação dos resultados obtidos em cultivos em biorreator com plataforma convencional (indução com lactose) com o atual trabalho.

Cepa	BL21*	BL21*	ClearColi
Cultivo	Batelada	Batelada	Batelada
Meio	Definido	Definido	Definido
Indutor	Pulso inicial: Lactose (20 g/L) Pulso a cada 5h: Lactose (5g/L)	Pulso inicial: Lactose (20 g/L) 2 pulsos a cada 2,5h + 1 pulso em t=30h: Lactose (5g/L)	Pulso único de IPTG 0,5 mM + Lactose 10 g/L
Temperatura (°C)	37	27	32
Tempo de cultivo (h)	21,5	34,5	31,3
Tempo de indução	12	17	9
Cx final (gMS/L)	34,6	27,5	17,2
C _{acetato-max} (t _{indução}) (g/L)	4,3 (4h)	3,6 (12h)	1,75 (9h)

*Silva (2015)

ClearColi e BL21 são cepas que se diferenciam principalmente por causa das modificações genéticas feitas com o intuito de construir uma linhagem capaz de produzir LPS livre de atividade endotóxica. Os diferentes resultados obtidos nos cultivos em biorreator podem estar relacionados tanto às características das células quanto às diferenças nas estratégias de cultivo empregadas. Enquanto no cultivo com a ClearColi houve suplementação com maior quantidade de canamicina e indução com mistura, no cultivo com a BL21 apenas IPTG foi utilizado como indutor e com concentração de canamicina constante e igual a 100 mg/L. Essas diferenças nas condições de cultivo dificultam a análise isolada das respostas fisiológicas diretamente relacionadas às características de cada célula.

Em trabalho realizado por YOON e colaboradores (2012) duas linhagens de *E. coli* bastante utilizadas para a produção de proteínas recombinantes foram comparadas: *E. coli* BL21 e K12. Dentre as diferenças citadas como derivadas das modificações genéticas estão a velocidade de crescimento em meio mínimo, a formação de acetato e as repostas das células às condições de estresse. Em relação às respostas ao estresse, a composição da parede celular desempenha um papel importante, uma vez que a permeabilidade da célula é alterada com mudanças na composição da parede, tornando a célula mais ou menos susceptível a mudanças no ambiente de cultivo.

5. CONCLUSÃO

Considerando que o objetivo principal do trabalho foi avaliar a linhagem de *E. coli* detoxificada como plataforma alternativa para a produção da proteína terapêutica PspA, podemos afirmar que este objetivo foi plenamente alcançado. Para isto foram analisadas diferentes condições de cultivo, buscando não apenas avaliar o impacto dessas condições nos rendimentos em biomassa e proteínas, mas também na formação de contaminantes, integrando assim os processos de produção e de purificação. Avaliou-se também condições de crescimento e indução ainda não relatadas na literatura para o cultivo de ClearColi, incluindo o uso de meio definido, isento de componentes de origem animal, assim como o aumento da escala de produção para biorreator, as quais são mais adequadas para produção industrial.

Os resultados obtidos nos estudos em *shaker* permitiram identificar que, para ambas as cepas, a produção de proteína recombinante é favorecida utilizando a mistura de indutores (IPTG e lactose) na temperatura de 32 °C.

Com relação à resposta fisiológica verificou-se também que a produção de proteínas contaminantes não foi influenciada por nenhuma das condições avaliadas, visto que nenhum dos valores apresentou diferença estatisticamente significativa, em um nível de confiança de 95%, em cultivos com ClearColi. Essa constatação não favorece a integração dos processos de produção e purificação. Junto com as endotoxinas, as proteínas são os contaminantes que mais contribuem para o aumento no número de etapas da purificação para alcançar a pureza necessária. Porém, os resultados sugerem que, infelizmente, não existem mudanças nas estratégias de indução que minimizem a formação de proteínas contaminantes para esta cepa. Já com relação à cepa convencional, a condução do cultivo a 32 °C leva a menor formação de proteínas contaminantes.

Com relação à produção de ácidos nucleicos, polissacarídeos e lipopolissacarídeos observou-se que a maior produção específica, na maior parte dos casos, ocorre logo antes do início da indução. Esta observação leva a crer que, para a minimização destes contaminantes no fim da indução, é importante avaliar as condições de cultivo durante a fase exponencial.

Verificou-se que a utilização do planejamento experimental para avaliação da influência dos indutores e da temperatura sobre a produção de proteína e dos contaminantes foi eficaz. Foi constatado, por meio de análise estatística dos resultados, que o efeito da curvatura foi o que mais impactou a produção de PspA e do contaminante LPS em ClearColi. Assim, a realização

do cultivo na temperatura de 32 °C e utilizando mistura de indutores (IPTG e lactose) foi o efeito mais significativo para a maior parte das variáveis.

Em se tratando da *E. coli* BL21, a curvatura também foi o efeito mais significativo. No entanto, com relação à produção de LPS, a temperatura foi o efeito de maior ordem de grandeza, sendo seguido da curvatura. Ou seja, para a linhagem convencional, a condição que favorece a produção de PspA também impacta a produção de LPS, como constatado para a ClearColi.

Com relação ao crescimento foi observado que o μ_{max} em ClearColi foi cerca de 25% menor que em *E. coli* BL21 nas mesmas condições de cultivo. Verificou-se também que a escolha do indutor impacta no crescimento celular quando utilizada a ClearColi como plataforma de expressão. O uso de IPTG como indutor se mostrou prejudicial ao crescimento desta cepa, já que a desaceleração do crescimento ao usar este indutor foi maior, quando comparada ao usar lactose. O fato do conhecimento sobre a ClearColi se restringir ao seu crescimento em meio complexo, utilizando IPTG como indutor, fez com este fosse o primeiro trabalho relatando o uso de lactose como indutor em cultivos com meio definido com glicerol.

Foram identificadas as condições mais promissoras para a obtenção de PspA por *E. coli* detoxificada, nos experimentos *shaker*, sendo a temperatura de 32 °C (fase de indução), utilizando o IPTG e a lactose como indutores. Estas condições foram reproduzidas no cultivo em biorreator tipo tanque agitado em batelada. Verificou-se que, devido ao tempo requerido para o cultivo com ClearColi ser maior do que para *E. coli* BL21, as produtividades em biomassa e proteína foram menores. No entanto, a linhagem detoxificada apresenta como vantagens valores altos de produção da proteína de interesse, assim como a baixa produção de proteínas contaminantes, quando comparada à linhagem convencional.

Assim, o presente estudo mostra que a linhagem de ClearColi pode ser considerada uma alternativa interessante para a produção de proteínas recombinantes terapêuticas, como a PspA, livre de atividade endotóxica e com menor contaminação por outras proteínas. O impacto dessas características da biomassa de ClearColi produzida no cultivo em biorreator sobre o processo de purificação está em avaliação em estudos em andamento no Instituto Butantan. Constatou-se também que cultivos com ClearColi são escalonáveis, o que viabiliza o uso dessa cepa para a produção de proteínas em larga escala, já que para a produção de proteínas terapêuticas como a PspA o volume relativo a esta escala seria na ordem de 10L. Essa avaliação era importante, uma vez que as modificações na estrutura da parede celular da linhagem detoxificada poderiam afetar sua capacidade de suportar as condições de cultivo em biorreator (agitação mais intensa, maior concentração de sais e indutores), o que não ocorreu.

Há um amplo campo de estudo envolvendo a linhagem detoxificada e algumas sugestões para trabalhos futuros são listadas a seguir, como:

- Estudo mais aprofundado do impacto do tempo de cultivo no custo do processo utilizando ClearColi como plataforma de expressão;
- Otimização das etapas de purificação necessárias para a biomassa produzida com a cepa detoxificada, buscando a minimização ou simplificação das mesmas;
- Avaliar as condições de cultivo que influenciam o tempo de cultivo, como a concentração de canamicina, glicerol e IPTG, buscando encontrar os valores ótimos e escalonar as estratégias otimizadas no biorreator.
- Avaliar outras estratégias de crescimento e indução, ainda não testadas como: temperatura de crescimento de 27°C (para diminuir a produção de contaminantes), início do cultivo com concentrações de glicerol e canamicina menores e cultivos com menor duração de tempo de indução.

REFERÊNCIAS

ARISTIDOU, A A; SAN, K. Y.; BENNETT, G. N. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to enhance recombinant protein production through acetate reduction. **Biotechnology progress**, v. 11, p. 475–478, 1995.

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**, v. 2, n. 4, p. 2466–2480, 2013.

BABAEIPOUR, V; SHOJOAOSADATI, S. A.; MAGHSOUDI, N. Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 112–117, 2007.

BENTLEY, W. E. et al. Plasmid-Encoded Protein: The Principal Factor in the “Metabolic Burden” Associated with Recombinant Bacteria. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 668-681, 1990.

BERNAL, V.; CASTAÑO-CEREZO, S.; CÁNOVAS, M. Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 21, p. 8985–9001, 2016.

BOGAERT, D. et al. Pneumococcal vaccines: An update on current strategies. **Vaccine**, v. 22, n. 17–18, p. 2209–2220, 2004.

BORJA, G. M. et al. Engineering *Escherichia coli* to increase plasmid DNA production in high cell-density cultivations in batch mode. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 40, p. 1–9, 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.

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

CAMPANI, G. et al. Recombinant protein production by engineered *Escherichia coli* in a pressurized airlift bioreactor: A techno-economic analysis. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 103, p. 63–69, 2015.

CAMPANI, G; da SILVA, G. G.; ZANGIROLAMI, T. C.; RIBEIRO, M. P. de A. Recombinant *Escherichia coli* cultivation in a pressurized airlift bioreactor: assessment of the influence of temperature on oxygen transfer and uptake rates. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1621–1633, 2017.

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

CANO-GARRIDO, O. et al. Functional protein-based nanomaterial produced in GRAS microorganism: A new platform for biotechnology. **Acta Biomaterialia**, v. 43, p. 230–239, 2016.

CARVALHO, R. J. et al. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *Escherichia coli* using different carbon sources and chromatography sequences. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 3, p. 683–694, 2012.

CRUZ-MACHADO, S. D. S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. **Revista da Biologia**, v. 4, p. 40–43, 2010.

CUEVAS-ROMERO, J. S. et al. Cloning, expression and characterization of potential immunogenic recombinant hemagglutinin-neuraminidase protein of *Porcine rubulavirus*. **Protein Expression and Purification**, v. 128, p. 1–7, 2016.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DRAPER, J. L.; REHM, B. H. Engineering bacteria to manufacture functionalized polyester beads. **Bioengineered**, v. 3, n. 4, p. 203–208, 2012.

DUBOIS, M., GILLES, A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28:350-355

DVORAK, P. et al. Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 201, 2015.

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

EITEMAN, M. A.; ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 530–536, 2006.

FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JUNIOR, F. B. dos. *Biotecnologia: Estado da arte e aplicações na agropecuária*. 1 ed. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. 721p.

FAREWELL, A; NEIDHARDT, F. C. Effect of temperature on in vivo protein synthetic capacity in *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 17, p. 4704–10, 1998.

FERREIRA, D. M. et al. DNA vaccines expressing pneumococcal surface protein A (PspA) elicit protection levels comparable to recombinant protein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 375–378, 2006.

FIGUEIREDO, D. B. **Desenvolvimento do processo de purificação da proteína A de superfície de pneumococo do clado 4 (PspA4Pro)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

FONSECA, G. G. **Produção de polihidroxicanoatos por *Escherichia coli* recombinante**. 2003. 178f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

GALDÁMEZ, E. V. C. **Aplicação de técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 121f. Dissertação (Mestrado em engenharia) Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

GLICK, B. R. Metabolic load and heterologous gene expression. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 2, p. 247–261, 1995.

HANSEN, R.; ERIKSEN, N. T. Activity of recombinant GST in *Escherichia coli* grown on glucose and glycerol. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1259–1263, 2007.

HEYLAND, J.; BLANK, L. M.; SCHMID, A. Quantification of metabolic limitations during recombinant protein production in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 155, n. 2, p. 178–184, 2011.

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

KARKHANIS, Y. D. et al. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of gram-negative bacteria. **Analytical Biochemistry**, v. 85, n. 2, p. 595–601, 1978.

KHALILZADEH, R. et al. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 23, p. 1989–1992, 2003.

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

KOSINSKI, M. J.; RINAS, U.; BAILEY, J. E. App ed Microbiology Biotechnology. **Journal of Biological Chemistry**, p. 782–784, 1992.

LARENTIS, A. L. et al. Optimization of medium formulation and seed conditions for expression of mature PsaA (pneumococcal surface adhesin A) in *Escherichia coli* using a sequential experimental design strategy and response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 6, p. 897–908, 2012.

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

LEHNINGER, A. L.; COX, M.; NELSON, D. L. **Principios de bioquímica**. 3. ed. Sao Paulo: SARVIER, 2002. 975 p.

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

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

LIU, W. et al. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, 2016.

LODGE, J.; LUND, P.; MINCHIN, S. **Gene Cloning: principles and applications**. New York: Taylor & Francis, 2007. 462 p.

Lucigen Corporation. Manual of ClearColi BL21(DE3) Electrocompetent Cells. 2013. Disponível em: <<http://lucigen.com/docs/manuals/MA145-ClearColi-BL21-DE3-Electrocompetent-Cells.pdf>>. Acesso em: out de 2016.

Lucigen. ClearColi® Competent Cells – Frequently Asked Questions. Disponível em: <<http://www.lucigen.com/faq-clearcoli.html>>. Acesso em jan. 2018.

LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004–1011, 1990.

MALDONADO, L. M. T. P. et al. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: The case of human interferon beta. **Biomolecular Engineering**, v. 24, n. 2, p. 217–222, 2007.

MALIK, A. et al. Optimization of expression and purification of HSPA6 protein from *Camelus dromedarius* in *E. coli*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 410–419, 2016.

MAMAT, U. et al. Detoxifying *Escherichia coli* for endotoxin-free production of recombinant proteins. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 57, 2015.

MANDENIUS, C.; BRUNDIN, A. Review: Biocatalysts and bioreactor design optimization, Bioprocess Methodology, Using Design-of-experiments. **Biotechnol Progr**, v. 24, p. 1191–1203, 2008.

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

MARINI, G. et al. Experimental design approach in recombinant protein expression: determining medium composition and induction conditions for expression of pneumolysin from

Streptococcus pneumoniae in *Escherichia coli* and preliminary purification process. **BMC Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

MARTÍNEZ-DONATO, G. et al. Protective T cell and antibody immune response against Hepatitis C Virus using the biopolyester beads based vaccine delivery system. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 23, n. 4, p. 370–378, 2016.

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**, v. 12, n. 1, p. 58, 2013.

MEREDITH, T. C., AGGARWAL, P., MAMAT, U., LINDNER, B., WOODARD, R.W. Redefining the requisite lipopolysaccharide structure in *Escherichia coli*. **ACS Chem Biol**. v. 1, p. 33-42, 2006.

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

MIYAJI, E. N.; FERREIRA, D. M.; LOPES, A. P. Y.; BRANDILEONE, M. C. C.; DIAS, W. O.; LEITE, L. 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, n. 9, p. 5086–5090, 2002.

MOHAJERI, A. et al. Effect of Culture Condition Variables on Human Endostatin Gene Expression in *Escherichia coli* Using Response Surface Methodology. **Molecular Biotechnology**. v. 9, n. 8, 2016.

MOROWVAT, M. H., BABAEIPOUR, V.; MEMARI, H. R.; VAHIDI, H. Metabolic changes of recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3) during overexpression of recombinant human interferon beta in HCDC. **International Journal of Biosciences (IJB)**, v. 4, n. 4, p. 131–138, 2014.

NEUBAUER, P. et al. Maximizing the expression of a recombinant gene in *Escherichia coli* by manipulation of induction time using lactose as inducer. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 6, p. 739–744, 1992.

NORIEGA, P.; RÖPKE, C. D.; CAMILO, C. M.; FREITA, P. C. D. de; BARROS, S. B. de M. Avaliação por análise fatorial das condições da extração do 4nerolidilcatecol de *Pothomorpheumbellata* (L). **Miq. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 2, p. 261-269, 2005.

Organização Mundial da saúde (OMS). Human infection with avian influenza A(H7N9) virus – China. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/csr/don/17-august-2016-ah7n9-china/en/>> Acesso em: 17 nov.

Organização Mundial da saúde (OMS). Pneumonia: Factsheet. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/>> Acesso em: 17 nov.

- PLANESSE, C. et al. Recombinant human HSP60 produced in ClearColi™ BL21(DE3) does not activate the NFκB pathway. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 190–195, 2015.
- POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5396, p. 2085–8, 1998.
- QUEIROZ, F. A. de. A Revolução biotecnológica: História e indústria no Brasil. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE HISTÓRIA, 2011. **Anais eletrônicos**...São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.snh2011.anpuh.org/resources/anais/14/1300844653_ARQUIVO_AREVOLUCAOBIOTECNOLOGICA.pdf> Acesso em: 03 nov. 2016.
- RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Caso do Pão, 2005.
- ROSSI, M. **Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1**. 2001. 139f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.
- SAINI, M. et al. Potential production platform of n-butanol in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 76–82, 2015.
- SANTOS, M.P. **Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante**. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- SARGO, C.R. **Aperfeiçoamento das Condições de Cultivo em Alta Densidade de *E. coli* recombinante com Glicerol como Fonte de Carbono**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- SERRANO, E. M.; ESPUÑES, S. T. del R. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 37, p. 38–44, 2006.
- SHANG, L. et al. Effects of Oxygen Supply Modes on the Production of Human Growth Hormone in Different Scale Bioreactors. **Chemical Engineering & Technology**, v. 32, n. 4, p. 600–605, 2009.
- SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 5, p. 345–357, 2005.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess engineering: Basic concepts**. 2. ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 2002. 553p.
- SILVA, G. G. **Aspectos Morfológicos, Reológicos e Fisiológicos dos cultivos de *Escherichia coli* recombinante**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- SINGH, A.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of inclusion body proteins. **Insoluble Proteins: Methods and Protocols**, v. 99, n. 4, p. 283–291, 2014.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–128, 2005.

SUÁREZ, D. C.; KILIKIAN, B. V. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 1051–1055, 2000.

TAMAZETTO, G. **Estudo da estabilidade do plasmídeo e da expressão de jaburetox-2Ec em *Escherichia coli* BL21 utilizando lactose como indutor**. 2006. 72 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e Molecular)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–222, 2006.

THOMSSON, E.; GUSTAFSSON, L.; LARSSON, C. Starvation response of *Saccharomyces cerevisiae* grown in anaerobic nitrogen- or carbon-limited chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3007–3013, 2005.

TOEROEK, C. et al. Fed-batch like cultivation in a micro-bioreactor: screening conditions relevant for *Escherichia coli* based production processes. **Springer Plus**, v. 4, p. 490, 2015.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 290, n. 2, p. G377-85, 2006.

TURNER, P. C.; MCLENNAN, A.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. **Molecular biology**. 3. ed. New York: Taylor & Francis, c2005. 370 p. (BIOS Instant Notes Biology). ISBN 0-4153-5167-7.

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

VAN DE WALLE, M.; SHILOACH, J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 1, p. 71–78, 1998.

VILLELA, G. G. **Bioquímica dos microrganismos**. Recife: UFPE, 1972. 356 p.

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

WAEGEMAN, H.; SOETAERT, W. Increasing recombinant protein production in *E. coli* through metabolic and genetic engineering. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 1891–1910, 2011

WALSH, G. Second-generation biopharmaceuticals. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, n. 2, p. 185–196, 2004.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17–18, p. 773–780, 2010.

WANGA, J.; CHENG, L. K.; CHEN, N. High-level production of L-threonine by recombinant *Escherichia coli* with combined feeding strategies. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 3, p. 495–501, 2014.

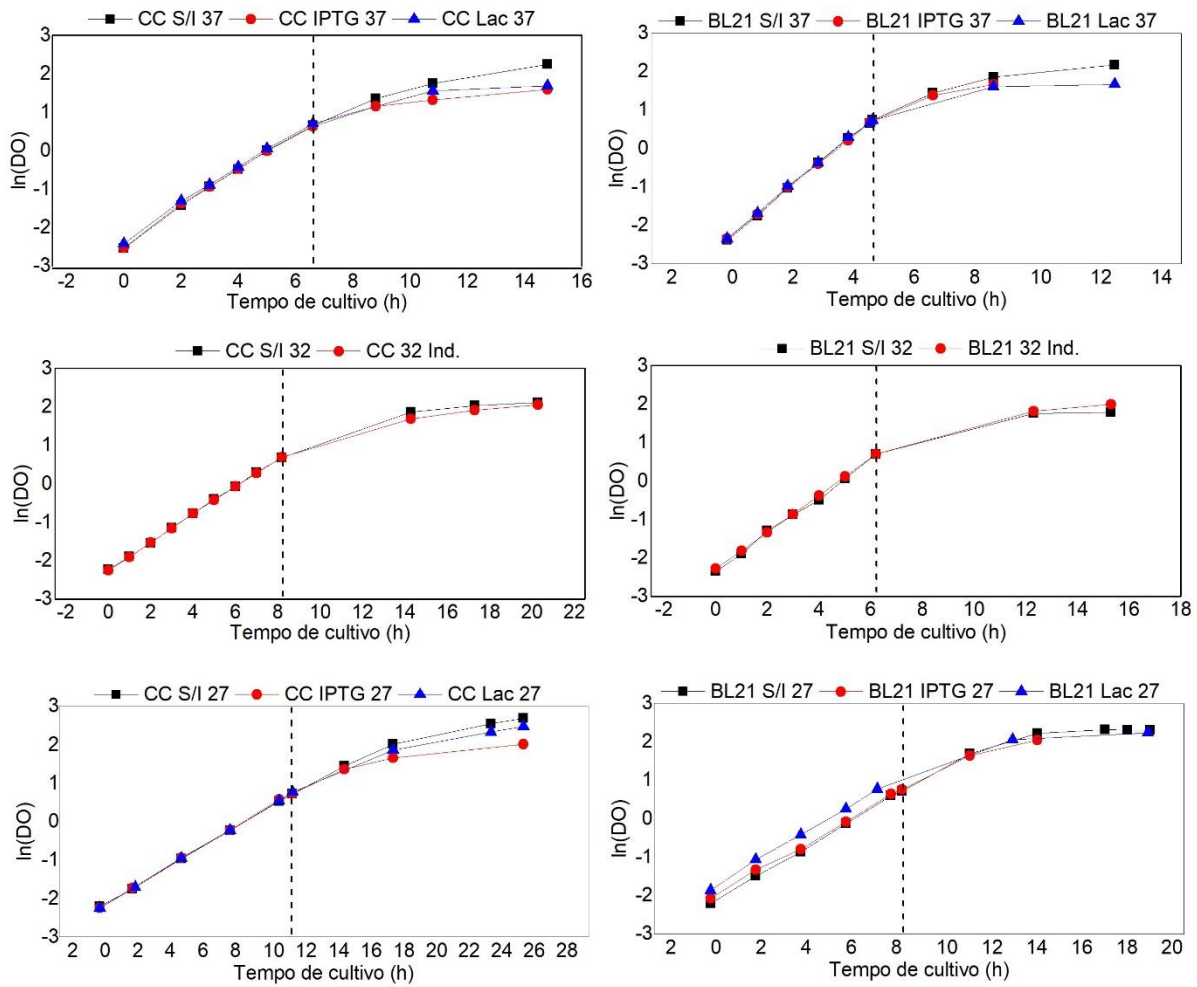
YAN, J. et al. Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 12, p. 1755–1758, 2004.

YANG, P. et al. Protection against influenza H7N9 virus challenge with a recombinant NP-M1-HSP60 protein vaccine construct in BALB/c mice. **Antiviral Research**, v. 111, p. 1–7, 2014.

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

YOON, S. H. et al. Comparative multi-omics systems analysis of *Escherichia coli* strains B and K-12. **Genome Biology**, v. 13, n. 5, 2012.

APÊNDICE A- Curvas de crescimento para *E. coli* BL21 e ClearColi representadas em termos de $\ln(\text{DO})$ pelo tempo de cultivo, indicando o momento de indução.



APÊNDICE B- Resultados dos ensaios de quantificação de proteínas (PT, PC e PspA), nos cultivos com e sem indução de *E. coli* BL21 e ClearColi.

<i>E. coli</i>	Temperatura (°C)	Indutor	Tempo de indução (h)	Y _{PT/X} (mg/gMS)	Y _{PspA/X} (mg/gMS)	Y _{PC/X} (mg/gMS)
BL21	37	IPTG	2	419 ± 8	118 ± 11	301 ± 20
			4	394 ± 6	119 ± 11	275 ± 21
		Lac	4	439 ± 1	114 ± 12	325 ± 41
			8	386 ± 7	98 ± 12	314 ± 46
	Sem Indução	8	372 ± 9	-	-	
		32	IPTG+Lac	6	376,5 ± 11	242 ± 14
	9			372 ± 20	221 ± 13	151 ± 13
	Sem Indução		9	414 ± 7	-	-
	27	IPTG	3	381 ± 15	108 ± 13	273 ± 27
			6	411 ± 31	158 ± 2	252 ± 33
		Lac	6	415 ± 49	121 ± 11	294 ± 60
			12	388 ± 28	127 ± 10	261 ± 39
		Sem Indução	12	413 ± 48	-	-
			ClearColi	37	IPTG	2
4	297 ± 11	120 ± 11				177 ± 23
Lac	4	308 ± 3			104 ± 13	204 ± 18
	8	327 ± 2			124 ± 10	203 ± 12
Sem Indução	8	310 ± 26		-	-	
	32	IPTG+Lac		6	334 ± 31	156 ± 22
9				347 ± 14	165 ± 3	181 ± 17
Sem Indução		9		372 ± 4	-	-
27	IPTG	3		341 ± 1	104 ± 13	237 ± 17
		6		343 ± 4	157 ± 2	185 ± 7
	Lac	6	330 ± 7	59 ± 13	270 ± 43	
		12	314 ± 3	105 ± 13	209 ± 17	
	Sem Indução	12	310 ± 26	-	-	

APÊNDICE C- Resultados dos efeitos calculados para PspA e cada contaminante analisado no planejamento experimental.

a) ClearColi

$Y_{PspA/X}$

Effect Estimates; Var.:YPspA; R-sqr=,99767; Adj:,98834 (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=8,069105 DV: YPspA										
	Effect	Std.Err.	t(1)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	126,5201	1,420309	89,07933	0,007146	117,5527	135,4876	126,5201	1,420309	117,5527	135,4876
Curvatr.	77,2160	4,920093	15,69401	0,040510	46,1517	108,2802	38,6080	2,460046	23,0759	54,1401
(1) Temperatura	-9,5806	2,840617	-3,37273	0,183498	-27,5156	8,3543	-4,7903	1,420309	-13,7578	4,1772
(2) Indutor	-24,1005	2,840617	-8,48424	0,074691	-42,0354	-6,1655	-12,0502	1,420309	-21,0177	-3,0828
1 by 2	28,1401	2,840617	9,90634	0,064047	10,2052	46,0751	14,0701	1,420309	5,1026	23,0375

$Y_{PC/X}$

Effect Estimates; Var.:YPC; R-sqr=,75362; Adj:,0 (Design: 2**(2-0) design (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=272,5807 DV: YPC										
	Effect	Std.Err.	t(1)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	193,5467	8,25501	23,44597	0,027136	141,427	245,6668	193,5467	8,25501	141,427	245,6668
Curvatr.	-24,3171	28,59619	-0,85036	0,551371	-204,866	156,2321	-12,1586	14,29810	-102,433	78,1161
(1)Temperatura	24,2392	16,51002	1,46815	0,380665	-80,001	128,4794	12,1196	8,25501	-40,000	64,2397
(2)Indutor	-6,9142	16,51002	-0,41879	0,747520	-111,154	97,3260	-3,4571	8,25501	-55,577	48,6630
1 by 2	1,1534	16,51002	0,06986	0,955598	-103,087	105,3935	0,5767	8,25501	-51,543	52,6968

$Y_{LPS/X}$

Effect Estimates; Var.:YLPS; R-sqr=,96122; Adj:,94929 (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=,0370493 DV: YLPS										
	Effect	Std.Err.	t(13)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	2,175422	0,055565	39,15109	0,000000	2,077020	2,273823	2,175422	0,055565	2,077020	2,273823
Curvatr	3,088431	0,192482	16,04530	0,000000	2,747558	3,429304	1,544216	0,096241	1,373779	1,714652
(1) Temperatura	0,436871	0,111130	3,93118	0,001722	0,240067	0,633674	0,218435	0,055565	0,120034	0,316837
(2) Indutor	-0,594200	0,111130	-5,34691	0,000133	-0,791003	-0,397397	-0,297100	0,055565	-0,395501	-0,198698
1 by 2	0,506272	0,111130	4,55569	0,000540	0,309469	0,703075	0,253136	0,055565	0,154735	0,351538

b) *E. coli* BL21 $Y_{PspA/X}$

Effect Estimates; Var.: YPspA; R-sqr=,98879; Adj:,94397 (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=139,9438 DV: YPspA										
	Effect	Std.Err.	t(1)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	129,4778	5,91489	21,89013	0,029062	92,133	166,8229	129,4778	5,91489	92,1326	166,8229
Curvatr.	182,8163	20,48979	8,92231	0,071055	53,449	312,1838	91,4082	10,24490	26,7245	156,0919
(1)Temperatura	-26,4635	11,82979	-2,23703	0,267619	-101,154	48,2268	-13,2318	5,91489	-50,5769	24,1134
(2)Indutor	-18,0784	11,82979	-1,52821	0,368879	-92,769	56,6119	-9,0392	5,91489	-46,3844	28,3060
1 by 2	13,3976	11,82979	1,13253	0,460486	-61,293	88,0880	6,6988	5,91489	-30,6464	44,0440

 $Y_{PC/X}$

Effect Estimates; Var.: YPC; R-sqr=,9937; Adj:,96848 (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=157,4065 DV: YPC										
	Effect	Std.Err.	t(1)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	278,411	6,27309	44,3818	0,014342	238,804	318,018	278,411	6,27309	238,804	318,0179
Curvatr.	-254,497	21,73061	-11,7115	0,054227	-391,699	-117,296	-127,249	10,86531	-195,850	-58,6478
(1)Temperatura	44,044	12,54617	3,5105	0,176666	-35,170	123,257	22,022	6,27309	-17,585	61,6286
(2)Indutor	29,136	12,54617	2,3223	0,258853	-50,077	108,350	14,568	6,27309	-25,039	54,1749
1 by 2	20,826	12,54617	1,6599	0,345179	-58,388	100,039	10,413	6,27309	-29,194	50,0196

 $Y_{LPS/X}$

Effect Estimates; Var.: YLPS BL21; R-sqr=,98583; Adj:,98147 (Design: 2**(2-0); MS Pure Error=,0098084 DV: YLPS BL21										
	Effect	Std.Err.	t(13)	p	-90,%	+90,%	Coeff.	Std.Err.	-90,%	+90,%
Mean/Interc.	3,89595	0,028590	136,2717	0,000000	3,84532	3,946584	3,895954	0,028590	3,845323	3,946584
Curvatr.	-1,07353	0,099037	-10,8396	0,000000	-1,24892	-0,898140	-0,536764	0,049519	-0,624458	-0,449070
(1)Temperatura	1,57998	0,057179	27,6320	0,000000	1,47871	1,681236	0,789988	0,028590	0,739357	0,840618
(2)Indutor	0,27139	0,057179	4,7463	0,000382	0,17013	0,372648	0,135693	0,028590	0,085063	0,186324
1 by 2	-0,05379	0,057179	-0,9407	0,364023	-0,15505	0,047474	-0,026894	0,028590	-0,077524	0,023737