



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

**CÍNTIA REGINA SARGO**

**APERFEIÇOAMENTO DE CULTIVOS DE ALTA DENSIDADE  
CELULAR DE *rE.coli* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE  
CARBONO**

**SÃO CARLOS  
2011**



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

**CÍNTIA REGINA SARGO**

**APERFEIÇOAMENTO DE CULTIVOS DE ALTA DENSIDADE  
CELULAR DE *rE.coli* UTILIZANDO GLICEROL COMO FONTE DE  
CARBONO**

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.

Orientadores:  
Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami  
Dra. Viviane Maimoni Gonçalves

**SÃO CARLOS  
2011**

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

S245ac

Sargo, Cíntia Regina.

Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de *rE.coli* utilizando glicerol como fonte de carbono / Cíntia Regina Sargo. -- São Carlos : UFSCar, 2011.  
112 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Engenharia química. 2. *E. coli* recombinante. 3. Batelada alimentada. 4. Glicerol. I. Título.

CDD: 660 (20<sup>a</sup>)


MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE  
**CINTIA REGINA SARGO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS, EM 29 DE JULHO DE 2011.

BANCA EXAMINADORA:

  
Teresa Cristina Zangirolami  
**Orientadora, UFSCar**

  
Viviane Maimoni Gonçalves  
**Co-Orientadora, INSTITUTO BUTANTAN**

  
Alberto Colli Badino Junior  
**UFSCar**

  
Monica Costa Lemma  
**CNPq, DQ/UFSCar**

Dedico este trabalho aos meus pais, José Marques e Regina Clelia, ao meu irmão Gustavo e a minha querida avó Clelia Gomes que de muitas formas me incentivaram e torceram, tornando possível a concretização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Às minhas orientadoras, profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami e Dra. Viviane Maimoni Gonçalves por toda paciência e dedicação, pelas noites mal dormidas, incentivos e pela confiança em mim depositada ao longo desses dois anos, contribuindo para minha formação.

À todos os professores do Departamento de Química e Engenharia Química da UFSCar pelo incentivo a busca de novos conhecimentos.

À equipe de pesquisadores do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan, por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, José Marques e Regina Clelia que são meus maiores e melhores exemplos de vida. Agradeço por todo amor, carinho, esforço, dedicação e torcida em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão Gustavo, que considero como um pai, por todo o carinho, amizade e momentos inesquecíveis a mim proporcionados.

À minha avó mais do que querida, que graças a ela tenho condições de conquistar tudo o que desejo. Muito obrigada por toda ajuda, carinho e ensinamentos.

Às minhas amigas Amanda e Marina (Garça) que desde a graduação até o presente momento me acompanharam, ajudaram e fizeram com que esses 6 anos de convivência tenham sido simplesmente maravilhosos e inesquecíveis.

Às amigas Lívia, Malu, Mônica que mesmo longe continuam morando em meu coração e sempre presentes em minhas lembranças.

Aos amigos inesquecíveis que conquistei durante a época de graduação. Agradeço todos os momentos de estudo e diversão que tivemos juntos.

Aos amigos que foram essenciais para a execução deste trabalho: Adilson, Ana María, Antônio Carlos (KK). Sem os seus conhecimentos, ajudas e amizade tudo teria sido mais difícil e doloroso.

Aos amigos de laboratório pelas trocas de conhecimento e momentos de descontração repletos de muitas risadas e companheirismo.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: CAPES, CNPq e FAPESP

Àqueles que conheci ao longo da vida e que de alguma forma me ensinaram a acreditar em mim, a amar e a sonhar.

E por fim agradeço à Deus por me permitir cumprir mais essa etapa em minha vida e sonhar com as próximas que virão.

*"Que a inspiração chegue não depende de mim.  
A única coisa que posso fazer é  
garantir que ela me encontre trabalhando."  
(Pablo Picasso)*

## RESUMO

As doenças pneumocócicas são uma das maiores causas de mortalidade mundial e por isso, o desenvolvimento de novas vacinas contra *Streptococcus pneumoniae* é crucial para tornar mais eficiente a prevenção contra as doenças causadas por essa bactéria. A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um importante fator de virulência, sendo uma potencial candidata à antígeno vacinal. Por isso, um fragmento recombinante do gene da PspA foi clonado no plasmídeo pET37b e este foi inserido em células de *E. coli* BL21(DE3) para a produção da proteína em cultivos de alta densidade celular (HCDC). O modo de operação em batelada alimentada é o mais frequentemente empregado para obter altas densidades celulares em culturas de *E. coli* recombinante. Antes de realizar um HCDC de *E. coli*, é normalmente necessário decidir entre o uso de glicose ou glicerol como fonte de carbono em um meio definido ou complexo, tendo IPTG ou lactose como agentes da indução. Glicerol apresenta um excelente potencial como fonte de carbono já que sua assimilação não provoca a formação de metabólitos indesejados, mesmo quando altas velocidades de crescimento são observadas. No entanto, o glicerol é geralmente usado simplesmente como um substituto da glicose em meios de cultivo formulados tendo a última como fonte de carbono. Além disso, a maioria das estratégias de indução em biorreator tem sido baseadas em uma transposição dos estudos de indução em frascos agitados. No presente trabalho, as composições dos meios definidos empregados tanto na batelada como na alimentação foram modificadas visando obter um melhor desempenho do processo tendo glicerol como substrato limitante. Os experimentos foram realizados em biorreator de 5 L, utilizando controle automático da alimentação exponencial e glicerol como fonte de carbono. A formulação do meio definido de cultivo comumente utilizado em HCDCs foi modificada para melhorar o desempenho do processo para glicerol como substrato limitante do crescimento e estudou-se a indução com IPTG e lactose. Velocidades específicas de crescimento de até  $0,57 \text{ h}^{-1}$ , fator de conversão de substrato a células na ordem de  $0,56 \text{ g (DCW)/g}_{\text{glicerol}}$  e produtividades celular em torno de  $6,0 \text{ g (DCW)/L h}$  foram obtidos em HCDC de *E. coli* de curta duração devido, principalmente, ao aumento da concentração de tiamina no meio, adição de sais de fosfato no meio de alimentação e aumento da temperatura da fase de crescimento para  $37^{\circ}\text{C}$ . O desempenho da lactose como indutor foi investigado através da implementação de uma estratégia de indução inovadora, baseada na adição de um pulso de lactose seguido por um fornecimento contínuo de lactose junto com glicerol no meio de alimentação. Os resultados indicaram produtividade celular [ $1,3 \text{ g (DCW)/L h}$ ], rendimento máximo de proteína ( $220 \text{ mg}_{\text{proteína/g DCW}}$ ) e concentração protéica ( $26 \text{ g}_{\text{proteína/L}}$ ) semelhantes ao se utilizar IPTG ou lactose. Estes valores são significativamente maiores do que alguns dos melhores relatados na literatura, confirmando a eficácia da estratégia proposta para a formação de biomassa e produção protéica. O glicerol mostrou um excelente desempenho como fonte de carbono, possibilitando altas velocidades de crescimento celular sem formação de acetato. O controle automático do perfil de alimentação exponencial, juntamente com as estratégias de cultivo empregadas, resultou em maiores velocidades de crescimento celular e produção de proteína, levando a cultivos mais curtos, com maiores produtividades e, conseqüentemente, menores custos de produção. Este trabalho é uma contribuição importante para estudos de HCDC com glicerol como fonte de carbono e lactose como indutor.



## ABSTRACT

Pneumococcal diseases are a major cause of mortality worldwide. New vaccines against *Streptococcus pneumoniae* are being developed. The pneumococcal surface protein A (PspA) is an important pneumococcal virulence factor and a potential vaccine candidate, therefore, a recombinant fragment of PspA gene was cloned into pET37b and the plasmid was inserted into *E. coli* BL21(DE3) for improved protein production in high cell density cultures (HCDC). Fed-batch is the operational mode most frequently used to obtain high cell density in recombinant *E. coli* cultures. Before running a high cell density culture (HCDC) of *E. coli*, it is usually necessary to decide whether to use glucose or glycerol as carbon source in defined or complex media, with IPTG or lactose as inducing agents. Glycerol has outstanding potential as carbon source because its assimilation does not trigger undesirable metabolite formation, even when growth takes place at high rates. However, glycerol is usually simply used as a glucose substitute in media designed for the latter as carbon source. Furthermore, most of the bioreactor induction strategies have been based on a template from molecular biology shake flask expression studies. Here, both batch and fed-batch defined culture medium formulations were modified to improve performance of the process for glycerol as growth limiting substrate. The experiments were carried out in 5 L bioreactor, using an automatically controlled exponential feeding and glycerol as carbon source. The standard defined medium formulation was modified to improve performance of the process for glycerol as growth limiting substrate and induction by both IPTG and lactose was studied. Specific growth rates up to  $0.57 \text{ h}^{-1}$ , biomass formation yield of  $0.56 \text{ g DCW/g}_{\text{glycerol}}$  and cellular productivities around  $6.0 \text{ g (DCW)/ L h}$  were achieved in shortened *rE. coli* HCDC by increasing the thiamine concentration in the medium, adding phosphate salts to the feeding medium and raising the growth phase temperature to  $37^{\circ}\text{C}$ . The performance of lactose as inducer was investigated by implementing an innovative induction strategy, which consisted of addition of a lactose pulse followed by a continuous supply of lactose mixed with glycerol in the feeding solution. The results indicated similar productivity [ $1.3 \text{ g (DCW)/ L h}$ ], protein maximum yield ( $220 \text{ mg}_{\text{protein/g DCW}}$ ) and concentration ( $26 \text{ g}_{\text{protein/L}}$ ) when using IPTG or lactose. These values are significantly higher than some of the best reported in the literature, confirming the efficacy of the proposed biomass formation and protein production strategy. Glycerol showed outstanding performance as carbon source, enabling high growth rates without acetate formation. Together with automatic control of the exponential feeding profile, the cultivation strategy employed resulted in higher rates of cell growth and protein production, leading to shorter cultivations with higher productivities and, consequently, lower production costs. This work is an important contribution to the field of HCDC with glycerol as carbon source and lactose as inducer.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 2.1</b> - Esquema da estrutura da parede celular do pneumococo e ancoramento das proteínas de superfície .....	20
<b>FIGURA 2.2</b> - Sorotipos prevalentes de <i>S. pneumoniae</i> no Brasil, período 2000-2006. ....	21
<b>FIGURA 2.3</b> - Foto ampliada da <i>Escherichia coli</i> .....	24
<b>FIGURA 2.4</b> - Estrutura das bactérias Gram Negativas .....	24
<b>FIGURA 2.5</b> - Representação do metabolismo em <i>E. coli</i> .....	26
<b>FIGURA 2.6</b> - Etapas para um cultivo em batelada-alimentada de <i>E. coli</i> .....	30
<b>FIGURA 3.1</b> - Sequências dos fragmento recombinantes da A) PspA245 e B) PspA3 utilizados neste trabalho.....	37
<b>FIGURA 3.2</b> - Cálculo da porcentagem relativa da proteína recombinante em relação a proteínas totais obtidas no gel de eletroforese (A) Quantificação da área sob a curva através do software Image J (B). ....	41
<b>FIGURA 3.3</b> - Ilustração de Ensaio em frascos agitados.....	44
<b>FIGURA 3.4</b> - Visão esquemática do biorreator usado no presente estudo.....	45
<b>FIGURA 3.5</b> - Procedimento para Cultivos em Biorreator.....	47
<b>FIGURA 4.1</b> - Curvas de crescimento para <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA245 em diferentes temperaturas de indução utilizando-se IPTG 0,25 mM. ....	53
<b>FIGURA 4.2</b> - SDS-PAGE para as amostras obtidas durante o Ensaio em Shaker 1. ....	54
<b>FIGURA 4.3</b> - Curvas de crescimento para <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA245 nas 3 temperaturas de indução estudadas utilizando-se lactose 5 g/L. ....	55
<b>FIGURA 4.4</b> - Acompanhamento da síntese protéica no Ensaio em Shaker 2 utilizando-se lactose como indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda.....	55
<b>FIGURA 4.5</b> - Curvas de crescimento da <i>E.coli</i> BL21(DE3)pET37b+/PspA3 nas temperaturas de indução de 30, 25 e 20°C ao longo do Ensaio em Shaker 3. ....	56
<b>FIGURA 4.6</b> - Eletroforese das amostras obtidas no Ensaio em Shaker 3 com <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e lactose 5 g/L como indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda .....	57
<b>FIGURA 4.7</b> - Biorreator utilizado nos experimentos. A) Início do cultivo, Cx de aproximadamente 0,3 g/L.B) 27 horas de cultivo, Cx de aproximadamente 54 g/L. ....	59
<b>FIGURA 4.8</b> - Resultados do Cultivo 1: Formação de biomassa, dados de permissividade on-line, consumo de substrato e produção de acetato no cultivo de alta densidade celular do recombinante <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET37b/PspA3 utilizando o meio proposto por Seeger <i>et al.</i> (1995).. ....	60
<b>Figura 4.9</b> - Resultados do Cultivo 2: Crescimento celular, permissividade, consumo de glicerol e produção de acetato durante o cultivo de batelada-alimentada de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 utilizando glicerol como fonte de carbono no Cultivo 2... ..	61
<b>FIGURA 4.10</b> - Resultados do Cultivo 3: Crescimento celular, permissividade, consumo de glicerol e faixa de variação do $\mu$ durante o cultivo de batelada-alimentada do	

recombinante <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 utilizando glicerol como fonte de carbono no Cultivo 3.....	63
<b>FIGURA 4.11</b> - Comparação entre concentração de biomassa e produtividade em cultivos de alta densidade celular obtidas na literatura e neste trabalho .....	64
<b>FIGURA 4.12</b> – Resultados do Cultivo 3: crescimento e consumo de substrato e produção de proteína durante o cultivo em batelada-alimentada do recombinante <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET37b/PspA3 usando glicerol como fonte de carbono e uma estratégia diferencia de indução com lactose.....	67
<b>FIGURA 4.13</b> - Eletroforese das amostras obtidas no Cultivo 3 com <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e uma estratégia de indução composta por pulso de 20 g/L de lactose seguido de uma alimentação contínua do indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda.....	67
<b>FIGURA 4.14</b> - Resultados do Cultivo 4: crescimento, consumo dos substratos e produção da PspA3 durante o cultivo de alta densidade celular em batelada-alimentada de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pET37b/PspA3.....	69
<b>FIGURA 4.15</b> - Eletroforese das amostras obtidas no Cultivo 4 com <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e uma estratégia de indução composta por dois pulsos de IPTG durante a fase de indução. ....	70
<b>FIGURA 4.16</b> – Acompanhamento da produção de proteína nos Cultivos 3 e 4. A) Perfis da produtividade de PspA3 nos cultivos 3 e 4 levando em consideração o tempo total de cultivo. (Indução no Cultivo 3 iniciada com um pulso de lactose 20 g/L em 12,5 horas de cultivo e no Cultivo 4 foi iniciada com um pulso de IPTG 1 mM após 16 horas de cultivo). B) Produtividade e concentração de proteína calculadas a partir do tempo correspondente de indução. ....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 2.1</b> - Doenças pneumocócicas.....	19
<b>TABELA 2.2</b> - Grupos de risco para doenças invasivas causadas por <i>S. pneumoniae</i> .....	20
<b>TABELA 2.3</b> - Comparação dos diferentes reatores químicos quanto a forma de alimentação	29
<b>TABELA 3.1</b> - Características físico-químicas dos fragmentos recombinantes da PspA245 e PspA3 .....	37
<b>TABELA 3.2</b> - Composição do meio complexo LB (Spiegelher <i>et al.</i> 2004).....	38
<b>TABELA 3.3</b> - Composição dos meios de batelada e alimentação para os cultivos em biorreator .....	39
<b>TABELA 3.4</b> - Descrição e objetivos dos principais experimentos realizados listados em ordem cronológica. ....	47
<b>TABELA 4.1</b> - Valores da produção de PspA245 ao longo do Ensaio em Shaker 1.....	54
<b>TABELA 4.2</b> - Concentrações e produtividades máximas de PspA245 obtidas no Ensaio em Shaker 2 ao utilizar lactose (5 g/L) como indutor. ....	56
<b>TABELA 4.3</b> - Concentrações e produtividades máximas de PspA3 obtidas no Ensaio em Shaker 3 ao utilizar lactose (5 g/L) como indutor. ....	58
<b>TABELA 4.4</b> - Acompanhamento da perda de plasmídeo ao longo do ensaio em Shaker 3. ....	58
<b>TABELA 4.5</b> – Acompanhamento da produção de PspA3 ao longo do Cultivo 3. Valores de concentração e produtividade da PspA. ....	68
<b>TABELA 4.6</b> - Acompanhamento da perda de plasmídeo durante o Cultivo 3. ....	68
<b>TABELA 4.7</b> - Acompanhamento da produção de PspA3 ao longo do Cultivo 4. Valores de concentração e produtividade da PspA3. ....	70
<b>TABELA 4.8</b> - Produtividades em biomassa e protéica em cultivos de alta densidade celular de <i>Escherichia coli</i> recombinante relatados na literatura e obtidos neste trabalho. ....	72
<b>TABELA 4.9</b> – Parâmetros cinéticos, produção de biomassa e produtividade celular e protéica para Cultivos 1- 4, comparados aos resultados obtidos por Carvalho <i>et al.</i> (2011) ao utilizar glicose como fonte de carbono(*).Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Y_{X/S}$ estimados a partir de dados coletados durante os cultivos na fase de batelada. ....	73

## LISTA DE ABREVIATURA

cAMP: adenosina 3',5' monofosfato cíclico

Cx: Concentração celular (g/L)

DCW: Dry Cell Weight (Massa seca)

DO: Densidade ótica

DO<sub>600nm</sub>: Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm

*E. coli*: *Escherichia coli*

*E. coli* BL21(DE3) – Bactéria *Escherichia coli* cepa BL21 com o gene do fago DE3 inserido em seu gene

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetra-acético

F: Vazão volumétrica (L/h)

HCDC: High Cell Density Culture (Cultivo de Alta Densidade Celular)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: kilo Dalton

Cana: Antibiótico canamicina

LB: Meio de cultivo complexo Luria Bertani

mM: mili molar

PPG: Polipropilenoglicol

PS: Polissacarídeo

PspA: Pneumococcal Surface Protein A (Proteína Pneumocócica A de Superfície)

rfPspA3: Fragmento recombinante da proteína PspA clado 3

rpm: rotações por minuto

*S. pneumoniae*: *Streptococcus pneumoniae*

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Dodecilsulfato de sódio – eletroforese em gel de poliacrilamida)

$Y_{X/S}$ : Fator de conversão de substrato a células (g célula/g substrato)

### **Letras Gregas**

$\mu_{\text{máx}}$ : Velocidade específica máxima de crescimento celular

$\mu$ : Velocidade específica de crescimento celular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Objetivos .....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1. <i>S. pneumoniae</i> e doenças pneumocócicas .....	19
2.2. Vacinas pneumocócicas .....	21
2.2. Potencial de uma vacina conjugada com uma proteína do próprio pneumococo .....	22
2.3. Microrganismo .....	23
2.3.1. Metabolismo de <i>E. coli</i> .....	25
2.4. Cultivos em alta densidade celular – HCDC .....	27
2.4.1. Meio de cultivo .....	27
2.4.2. Biorreatores, modos de operação e cultivos de alta densidade celular .....	28
2.4.3. A formação de acetato e as estratégias de cultivo .....	31
2.3. Síntese protéica .....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
3.1. Microrganismo .....	37
3.2. Meios de cultivo .....	38
3.2.1. Meio complexo LB-Ágar .....	38
3.2.2. Meio definido para alta densidade celular (HCD) .....	38
3.3. Métodos Analíticos .....	39
3.3.1. Determinação da concentração celular .....	39
3.3.2. Determinação da estabilidade do plasmídeo .....	40
3.3.3. Determinação da concentração de proteína .....	40
3.3.4. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos .....	41
3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos .....	41
3.4.1. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular .....	41
3.4.3. Determinação do fator de conversão de substrato a células .....	42
3.5. Metodologia Experimental .....	43
3.5.1. Estudo da estabilidade dos clones fornecidos .....	43
3.5.2. Preparação de cultura estoque em criotubos .....	43
3.5.3. Ensaio em frasco agitado .....	44
3.5.4. Cultivos em Biorreator .....	44
3.5.4.1. Biorreator .....	44

3.5.4.2. Condições de cultivo .....	45
3.5.4.3. Preparo do Inóculo - Biorreator .....	46
3.6. Descrição dos experimentos.....	47
3.6.1. Ensaio em frasco agitado .....	48
3.6.1.1. Ensaio em Shaker 1 .....	48
3.6.1.2. Ensaio em Shaker 2.....	49
3.6.1.3. Ensaio em Shaker 3.....	49
3.6.2. Cultivos em Biorreator .....	49
3.6.2.1. Temperatura e composição do meio para cultivos de alta densidade celular (HCD) com glicerol como fonte de carbono.....	49
3.6.2.1.1. Cultivo 1 - Implementação da metodologia de cultivos de <i>E. coli</i> em meio definido HCD descrito na literatura com glicerol como fonte de carbono...49	
3.6.2.1.2. Cultivo 2 – Otimização dos meios de cultivo .....	50
3.6.2.1.3. Cultivo 3 – Aprimoramento do procedimento de cultivo em biorreator .....	51
3.6.2.2. Estratégias de indução em biorreator .....	51
3.6.2.2.1. Cultivo 3 - Desenvolvimento de uma estratégia de indução com lactose .....	51
3.6.2.2.2. Cultivo 4 – IPTG como indutor da síntese de PspA3.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1. Ensaio em frascos agitados.....	53
4.1.1. Ensaio em shaker 1 .....	53
4.1.2 Ensaio em shaker 2.....	54
4.1.3. Ensaio em shaker 3.....	56
4.2. Cultivos em Biorreator.....	58
4.2.1. Estudo da influência da temperatura e da composição do meio em cultivos de alta densidade celular (HCD) com glicerol como fonte de carbono. ....	58
4.2.1.1. Cultivo 1 - Implementação da metodologia de cultivos de <i>E. coli</i> em meio definido HCD descrito na literatura com glicerol como fonte de carbono .....	58
4.2.1.2. Cultivo 2 – Otimização dos meios de cultivo .....	60
4.2.1.3. Cultivo 3 – Aprimoramento do procedimento de cultivo em biorreator.....	62
4.2.2. Estratégias de indução em biorreator .....	65
4.2.2.1. Cultivo 3 – Desenvolvimento de uma estratégia de indução com lactose ..	66
4.2.2.2. Cultivo 4 – IPTG como indutor da síntese de PspA3 .....	69
4.2.2.3. Indução com lactose (Cultivo3) vs Indução com IPTG (Cultivo 4) .....	70



4.3. Discussão final .....	73
5. CONCLUSÕES .....	75
6. SUGESTÕES .....	77
7. REFERÊNCIAS .....	78
APÊNDICE .....	86

## 1. INTRODUÇÃO

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

Atualmente estão disponíveis vacinas conjugadas contra *S. pneumoniae* baseadas na proteção dada por polissacarídeos capsular (PS), utilizados isoladamente (vacina 23-valente) ou conjugados a uma proteína carregadora (vacinas 10 e 13-valente). A ligação covalente do PS a uma proteína carregadora através de uma conjugação química altera a resposta imune contra o PS, como resultado, é possível alcançar uma resposta imune dependente de células T e, assim, o efeito de reforço é observado e crianças passam a ser protegidas.

No entanto, as vacinas conjugadas disponíveis comercialmente são produzidas com proteínas não relacionadas à doença pneumocócica, como o toxóide diftérico mutado CRM<sub>197</sub>. Uma alternativa para ampliar a cobertura das vacinas conjugadas é a utilização de uma proteína carregadora do próprio *S. pneumoniae* (BRILES *et al.*, 2009; CSORDAS *et al.*, 2008). Muitas proteínas pneumocócicas, como pneumolisina, PsaA, PspC e PspA apresentam propriedades antigênicas e são candidatas potenciais para a produção de uma nova vacina. A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um importante fator de virulência que inibe a deposição de complemento na superfície do microrganismo e está presente em todos os pneumococos isolados de material clínico (HOLLINGSHEAD *et al.* 2006; ROLO *et al.*, 2009). Além disso, PspA é uma proteína exposta externamente à cápsula polissacarídica e estudos mostram a sua capacidade protetora em vários modelos de animais (JEDRZEJAS, 2001). Devido às suas características antigênicas únicas, a PspA foi escolhida como proteína carregadora alternativa para a produção de uma nova vacina conjugada pneumocócica no projeto temático “Vacina conjugada antipneumocócica: estudos sobre a viabilidade de uma vacina polissacarídeo-proteína de superfície de pneumococo A” (08/05207-4), coordenado pela pesquisadora Dra. Martha Massako Tanizaki do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan. A presente dissertação de mestrado se insere no sub-projeto “Processos otimizados e ampliação de escala do cultivo de *Escherichia coli* recombinante para a produção de PspA”, que por sua vez integra o referido projeto temático.

Neste contexto, a escolha de um processo de alta produtividade da PspA é crucial para diminuir os custos, produzindo-se uma vacina acessível e de alta eficiência contra

*S. pneumoniae* possibilitando seu uso em campanhas nacionais de vacinação. O emprego da *Escherichia coli* como hospedeiro para a produção da PspA oferece uma estratégia muito adequada para atingir esse objetivo.

*E. coli* é o procaríoto mais utilizado para obtenção de altos níveis de proteínas heterólogas. Esta bactéria já foi amplamente caracterizada em nível molecular, estando disponíveis métodos precisos e rápidos para modificação de seu genoma. Além disso, há protocolos bem estabelecidos para cultivos de alta densidade celular de *rE. coli*, usando meios de cultivos baratos e biorreatores comerciais (DONOVAN *et al.*, 1996; HANNIG e MAKRIDES, 1998;).

Inúmeros estudos encontrados na literatura buscam otimizar a produção da proteína-alvo através da manipulação da composição do meio de cultivo, tempo de indução, concentração do indutor e temperatura, juntamente com o controle da velocidade específica de crescimento antes e depois da indução (KILIKIAN *et al.*, 2000). Para se obter uma elevada produção da proteína recombinante é necessário, primeiramente, atingir elevadas concentrações celulares. Lactose e IPTG são amplamente utilizados para a expressão do gene de interesse no sistema de expressão *lac/T7* de *E. coli*. IPTG é um análogo estrutural da lactose que não é consumido durante o processo e independe de transportador para entrar na célula. Porém, é extremamente caro e tóxico, o que restringe sua aplicação como indutor em processos industriais. Já a lactose é um indutor menos caro e natural que, no entanto, apresenta baixa solubilidade em água e é consumido como fonte de carbono durante a fase de indução, fazendo com que a escolha da estratégia de indução seja uma tarefa difícil. Por estas razões, há poucos estudos que utilizam lactose como indutor para a produção de proteínas heterólogas em cultivos de alta densidade celular de *rE. coli* (YAN *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2009).

Segundo Yim *et al.* (2001) a batelada-alimentada é o modo de operação mais utilizado para atingir altas concentrações celulares. Quando aplicado para a produção de proteínas heterólogas, o cultivo é geralmente realizado em três etapas: batelada, batelada alimentada e fase de indução. Condições de cultivo como fonte de carbono, temperatura e vazão da alimentação influenciam o desempenho dos cultivos em termos de biomassa e produção da proteína recombinante (PASSARINHA *et al.* 2009; SHOJAOSADATI *et al.*, 2008). A glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilada pela *E. coli* oferecendo elevada velocidade específico máxima de crescimento. No entanto, a célula pode direcionar seu metabolismo para a formação de metabólitos indesejados, que podem causar a inibição do crescimento e produção de proteína. Acetato, conhecido por ser o principal inibidor do

crescimento e síntese protéica (KLEMAN e STROHL, 1994; LEE, 1996; LULI e STROHL, 1990), é formado quando o fluxo de carbono na via metabólica central supera a demanda da biossíntese e da capacidade de geração de energia dentro da célula (LEE, 1996). Por esta razão, em cultivos em batelada-alimentada com glicose como fonte de carbono, a velocidade de crescimento deve ser mantida próxima à velocidade de crescimento específica crítica ( $0,1 - 0,3 \text{ h}^{-1}$ ), durante as fases de batelada e batelada-alimentada, o que pode ser feito promovendo o crescimento das células a uma temperatura abaixo da ideal e/ou manipulando a vazão de alimentação (KORZ *et al.*, 1995; MENZELLA *et al.*, 2003).

Glicerol é uma fonte de carbono promissora para cultivos de alta densidade celular de *E. coli*, já que o glicerol, ao contrário da glicose, não possui um sistema de transporte ativo para sua entrada na célula (LEHNINGER, 2006). Assim, maiores velocidades de crescimento podem ser empregadas durante a fase de alimentação sem que haja formação de acetato. Porém a maioria dos estudos realizados são baseados apenas na substituição da glicose por glicerol, sem considerar as diferenças durante o processamento destas duas fontes de carbono na via metabólica central da célula.

## **1.1 Objetivos**

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal melhorar a produtividade em biomassa e PspA em cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante, apresentando como objetivos específicos:

- i) estudar a influência da composição do meio de cultivo na produtividade em biomassa em cultivos de alta densidade celular de *Escherichia coli* recombinante, utilizando glicerol como fonte de carbono;
- ii) investigar a influência da temperatura no crescimento e na produção da PspA;
- iii) desenvolver e implementar estratégias alternativas de indução com lactose.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. *S. pneumoniae* e doenças pneumocócicas

A bactéria *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo) é comumente encontrada na mucosa da nasofaringe e orofaringe de seres humanos saudáveis, sem causar doenças, mas sua disseminação pode ocasionar pneumonias e doenças pneumocócicas invasivas em crianças e adultos, como mostra a Tabela 2.1 (VIEIRA *et al.*, 2007).

Em países em desenvolvimento estima-se que o pneumococo seja responsável por mais de 1 milhão de óbitos por ano em crianças menores de 5 anos, a maioria por pneumonia. Apesar de as pneumonias causarem o maior número de mortes, as doenças de mucosas causadas por pneumococo são mais comuns, e o uso de antibióticos para o tratamento de otites e sinusites tem sido associado ao surgimento e disseminação de cepas resistentes aos antibióticos (BRICKS *et al.*, 2006).

TABELA 2.1 - Doenças pneumocócicas

Principais grupos de risco para doenças pneumocócicas
Crianças menores de 5 anos;
Idosos (maiores de 65 anos);
Portadores de doenças crônicas (nefropatias, doenças cardíacas, diabetes, alcoolismo, cirrose, asma);
Indivíduos com fratura de crânio
Alguns grupos étnicos (índios Navajos, Apaches, nativos do Alasca e Austrália, raça negra);
Pessoas expostas à fumaça de cigarro;
Após infecções virais principalmente pós-influenza.

As doenças pneumocócicas são mais comuns em lactentes, jovens e idosos, além de ser muito comum em determinados grupos de indivíduos que apresentam condições associadas ao desenvolvimento de doenças invasivas por pneumococo (BRICKS *et al.*, 2006). Alguns desses grupos de riscos são apresentados na Tabela 2.2.

TABELA 2.2 - Grupos de risco para doenças invasivas causadas por *S. pneumoniae*

Doenças não-invasivas	Doenças invasivas
Otite média aguda	Meningite
Sinusite	Bacteremia
Conjuntivite	Pneumonia bacterêmica / Empiema
Bronquite	Artrite / Osteomielite
Pneumonia	Peritonite

A infecção por *S. pneumoniae* é considerada uma das maiores causas de morbidade e mortalidade mundial. Em países subdesenvolvidos entre 1 e 5 milhões de crianças morrem a cada ano (BRILES *et al.*, 2000).

A virulência de *S. pneumoniae* está associada principalmente às características da superfície da célula. A superfície do pneumococo consiste de 3 estruturas distintas: membrana plasmática, parede celular e cápsula polissacarídica. A membrana plasmática apresenta estrutura conservada, com moléculas de ácido lipoteicoico, contendo resíduos de fosfocolina inseridas na bicamada lipídica. A parede celular, como mostra a Figura 2.1 é composta de polissacarídeos e ácido teicoico (que contém resíduos de colina, que é um dos responsáveis pela resposta inflamatória intensa observada na infecção por pneumococo e ancora diversas proteínas de superfície). E a cápsula polissacarídica é o envoltório externo da bactéria constituída de polissacarídeos (PS) de alto peso molecular, que são polímeros cuja unidade básica é composta por 2 a 8 monossacarídeos, cuja estrutura é diferente para cada sorotipo. A cápsula polissacarídica é considerada o principal fator de virulência do pneumococo, pois permite que a bactéria escape da fagocitose pelo sistema imune, estando esta estrutura envolvida diretamente no processo de invasão do hospedeiro (SILVA, 2005).

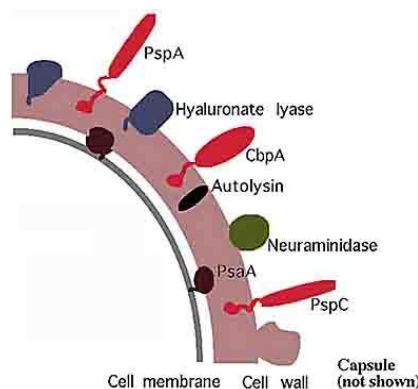


FIGURA 2.1 - Esquema da estrutura da parede celular do pneumococo e ancoramento das proteínas de superfície

A cápsula polissacarídica é uma estrutura bastante variável, e suas diferenças químicas e antigênicas permitem subdividir esta bactéria em mais de 90 sorotipos, entretanto, um número reduzido deles predomina como agente causador de doenças no homem. Estima-se que apenas 11 sorotipos sejam responsáveis por 75% das infecções graves em todo o mundo (KAMERLING, 2000).

O perfil epidemiológico da doença pneumocócica varia de um país a outro, ao longo do tempo e de acordo com a faixa etária da população afetada e está relacionado com a prevalência dos diferentes sorotipos, o que determina a necessidade de avaliações locais periódicas para o estabelecimento de estratégias de controle (KAMERLING, 2000).

Segundo Migowski e colaboradores (2008), no Brasil, como mostra a Figura 2.2, existem cerca de 10 sorotipos prevalentes, sendo que 45% das doenças são causadas pelos sorotipos 6B e 1 (prevalentes em todas as idades) e 14 (causador de infecções em crianças)

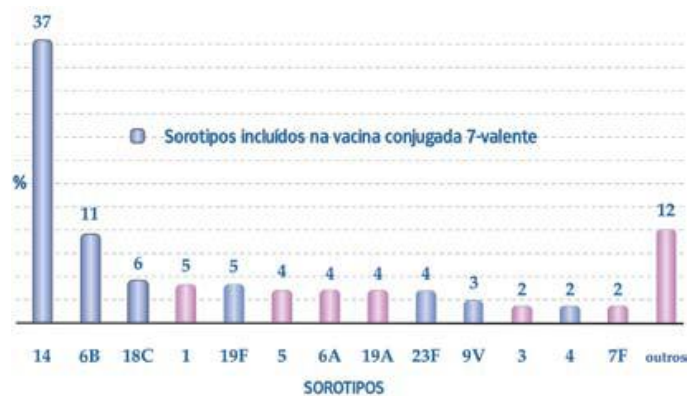


FIGURA 2.2 - Sorotipos prevalentes de *S. pneumoniae* no Brasil, período 2000-2006.

A resistência do *S. pneumoniae* as principais classes de antibióticos (penicilinas, cefalosporinas e macrolídeos) cresce a cada dia, criando a necessidade de prevenir adequadamente as infecções invasivas causadas por esse agente. Desta forma, atualmente, o método mais eficaz de prevenção é a vacinação (VIEIRA *et al.*, 2007).

## 2.2. Vacinas pneumocócicas

Atualmente existem dois tipos de vacina pneumocócica: a polissacarídica (vacina 23-valente) e as conjugadas a uma proteína carregadora (vacinas 10 e 13-valente). A vacina polissacarídica não induz à produção de IgG (um dos 5 isotipos de anticorpos capaz de proporcionar a principal imunidade contra os patógenos que invadem o corpo) e, portanto, não

confere memória imunológica, mas uma proteção parcial dada por IgM por, no máximo, cinco anos. Além disso, repetidas aplicações dessa vacina induzem o fenômeno de tolerância imunológica, o que impede a repetição regular da mesma (MIGOWSKI *et al.*, 2008). Mas o principal problema desta vacina é que polissacarídeos são antígenos independentes de células T, por isso não protegem as crianças com menos de 2 anos de idade que é a população infantil mais suscetível (BAGAERT *et al.*, 2004). Já a vacina conjugada a uma proteína carregadora é altamente imunogênica a partir dos 2 meses de idade, induz a produção de IgG e, portanto, memória imunológica, além de ser capaz de eliminar a colonização.

A primeira vacina conjugada contra pneumococo foi licenciada em 2000, sob o nome comercial de Prevenar (Wyeth) e continha polissacarídeos de 7 sorotipos (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F) conjugados ao toxóide diftérico mutado CRM<sub>197</sub>. Esta formulação mostrou-se eficaz contra doenças invasivas em crianças abaixo dos 2 anos, porém, o reduzido número de PS inseridos (uma limitação imposta pelo complicado processo de conjugação aliado à ausência de reatividade cruzada entre sorotipos) tornou sua cobertura reduzida por não incluir sorotipos prevalentes em diversas partes do globo. Ausências importantes são dos sorotipos 1 e 5 importantes no Brasil (PICHICHERO *et al.*, 2005). Para diminuir estes problemas, atualmente a vacina Prevenar é 13-valente, ou seja, é produzida com PS de 13 sorotipos, os sete já citados e mais seis (1, 3, 5, 6A, 7F e 19A).

O processo de obtenção de uma vacina conjugada é um processo complexo, com muitas etapas e cujo rendimento final é em torno de 30%. O cultivo do microrganismo é também um processo difícil visto que nem todos os sorotipos crescem da mesma forma nas mesmas condições de cultivo, acarretando em um preço final da vacina muito elevado inviabilizando sua ampla utilização em países em desenvolvimento.

Devido a esta grande dificuldade, estuda-se a possibilidade de utilizar antígenos protéicos como alternativa para as vacinas de PS. Segundo Jedrzejak (2004), algumas proteínas presentes na membrana do pneumococo tem mostrado grande potencial, tais como a Proteína de superfície de pneumococo A (PspA), Proteína de superfície de pneumococo C (PspC), Pneumolisina (Ply), Neuraminidase A (NamA) e Antígeno de superfície de pneumococo A (PsaA).

## **2.2. Potencial de uma vacina conjugada com uma proteína do próprio pneumococo**

A estratégia adotada pelo Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para o desenvolvimento de uma nova vacina pneumocócica envolve a conjugação de alguns PS de



sorotipos prevalentes no Brasil com proteínas recombinantes do próprio pneumococo. Deste modo, uma vacina bifuncional seria produzida, onde a proteção dada pelos sorotipos mais importantes no Brasil (1, 6B e 14) seria ampliada pela porção protéica do conjugado, que daria então uma cobertura vacinal independente do sorotipo.

A proteína de superfície de pneumococo A (PspA) é um importante fator de virulência que inibe a deposição de complemento na superfície do pneumococo e foi encontrado em todos os pneumococos isolados de material clínico (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000; ROLO *et al.*, 2009;), além disso, a PspA é uma proteína exposta externamente à cápsula do polissacarídeo. Outra característica desta proteína é apresentar alguma variabilidade de sequência principalmente na sua sequência N-terminal, em especial nos últimos 100 aminoácidos, conhecidos como “região definidora de clado” (CDR). Com base em variações no CDR, a PspA foi dividida em 3 famílias, e subdivididas em 6 clados, de acordo com o grau de identidade (família 1, com clados 1 e 2, família 2, clados 3 a 5, e família 3, clado 6). As PspAs de famílias 1 e 2 (especialmente os clados 1 a 4) são predominantes em todo o mundo, desta forma, uma vacina que tenha uma boa cobertura deve conter pelo menos PspA dessas duas famílias (HOLLINGSHEAD *et al.*, 2000).

Devido às suas características antigênicas únicas, a PspA foi escolhida como proteína carregadora alternativa para produzir uma vacina pneumocócica conjugada. Para diminuir os custos de produção por meio da obtenção de grandes quantidades de proteína recombinante, optou-se pela produção da PspA em células de *E. coli*. Para isso um fragmento do gene da PspA foi clonado em *E. coli*, abarcando a porção de PspA que se projeta para fora da superfície do pneumococo (Figura 2.1) e que contém a região antigênica, eliminando assim a porção hidrofóbica da proteína que fica ancorada na parede celular e que, além de ser pouco imunogênica, poderia prejudicar a síntese da proteína recombinante.

### **2.3. Microrganismo**

A produção de proteínas em microrganismos recombinantes tem sido uma técnica fundamental no desenvolvimento da pesquisa biotecnológica moderna, havendo uma grande variedade de opções de microrganismos hospedeiros.

Segundo Choin *et al.* (2006), a bactéria *Escherichia coli*, ilustrada na Figura 2.3, é um dos hospedeiros para expressão de proteínas recombinantes mais utilizados e atrativos no momento, pois apresenta habilidade de crescer rapidamente em altas

concentrações celulares e em substratos baratos, além de sua genética ser bem conhecida e haver disponibilidade de muitos vetores de clonagem e cepas mutantes.

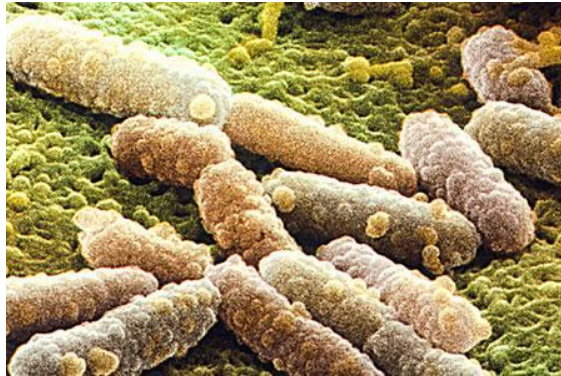


FIGURA 2.3 - Foto ampliada da *Escherichia coli*

Esta é uma bactéria bacilar gram-negativa, ou seja, sua parede celular é composta por uma camada de peptidoglicano e três outros componentes que a envolvem externamente (lipoproteína, membrana externa e lipopolissacarídeo), como pode ser observado na Figura 2.4.

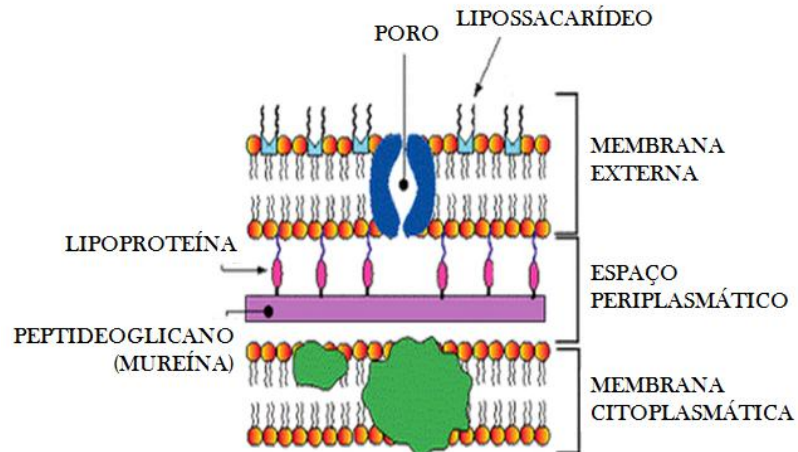


FIGURA 2.4 - Estrutura das bactérias Gram Negativas

*E. coli* é um habitante natural da microbiota do trato intestinal de humanos e da maioria dos animais de sangue quente, sendo portanto, normalmente encontrado nas fezes destes animais, vivendo de forma aeróbica ou então anaeróbica facultativa.

A *E. coli* é uma bactéria mesófila, podendo crescer a temperaturas entre 8 a 48°C. No entanto, a sua temperatura ótima de crescimento é de 37°C. Segundo Neidhardt *et al.* (1990), ela cresce bem em ambientes próximos da neutralidade, isto é, a um pH entre 6 a 8.

De acordo com Eiteman *et al.* (2006), atualmente há muitos exemplos de produtos recombinantes produzidos em *E. coli*, como algumas enzimas industriais (renina, amilases, proteases e celulasas) além de proteínas terapêuticas (insulina, hormônios de crescimento e interferons).

Segundo Georgiou e Segatori (2005) ao se utilizar a bactéria *E. coli* como hospedeiro torna-se possível atingir valores de concentração da proteína alvo na ordem de 0,5 a 0,8 g/L, embora concentrações da ordem de 5 a 10 g/L já tenham sido reportados para a produção de algumas enzimas e de proteínas terapêuticas.

### **2.3.1. Metabolismo de *E. coli***

O crescimento celular é garantido pela oxidação de nutrientes através de uma complexa rede de reações bioquímicas. Durante esse processo é produzido novo material biológico acompanhado pela produção de energia utilizada para manter a organização celular. Assim, observa-se a combinação de fluxos associados à síntese de biomassa e outros fluxos metabólicos que produzem energia utilizada na manutenção do gradiente iônico, reparação de proteínas e nucleotídeos existentes, assim como para manter a infra-estrutura bioquímica que permite à célula uma rápida adaptação a alterações ambientais.

Segundo Lehninger (2006), o princípio de conversão de substratos em biomassa e energia consiste no transporte da fonte de carbono para dentro da célula e depois na sua degradação a moléculas mais simples e incorporação nas vias metabólicas centrais. A conversão de compostos intermediários é catalisada por enzimas organizadas em vias metabólicas como a glicólise, via das pentoses fosfato e o ciclo do ácido cítrico. Estas vias conduzem à produção de energia, sob a forma de ATP (adenosina trifosfato), assim como de coenzimas reduzidas, como o NADH (hidrogeno-nicotinamida adenina dinucleótido) e o FADH<sub>2</sub> (hidrogeno-flavina adenina dinucleótido). Moléculas de baixo peso molecular que são utilizadas na síntese de importantes precursores (aminoácidos, bases púricas e pirimídicas, açúcares fosfatados e outros derivados de açúcares, ácidos orgânicos e diferentes metabólitos) das diferentes macromoléculas que constituem as células (proteínas, ácidos nucléicos, lipídios e polissacarídeos) são também obtidas no processamento da fonte de carbono pelas vias metabólicas principais.

A descrição geral realizada acima se aplica para a maioria dos microrganismos assim como para a *E. coli*. Da mesma forma, para muitos organismos aeróbios facultativos, a ocorrência do chamado "metabolismo overflow" é uma característica do processamento de

algumas fontes de carbono pela via glicolítica (RIESENBERG, 1991). O “metabolismo overflow” (Figura 2.5) ocorre quando o fluxo de glicose catabolisado a piruvato e posteriormente oxidado a acetil-CoA pela ação de piruvato desidrogenase, enzima ativa somente em condições de aerobiose, supera a capacidade de assimilação do acetil-CoA pela via do ácido cítrico e/ou cadeia transportadora de elétrons. Neste caso, o acetil-CoA é transformado em acetato e secretado para o meio de cultura (HOLMS, 1986; KLEMAN e STROHL, 1994; LEE, 1996).

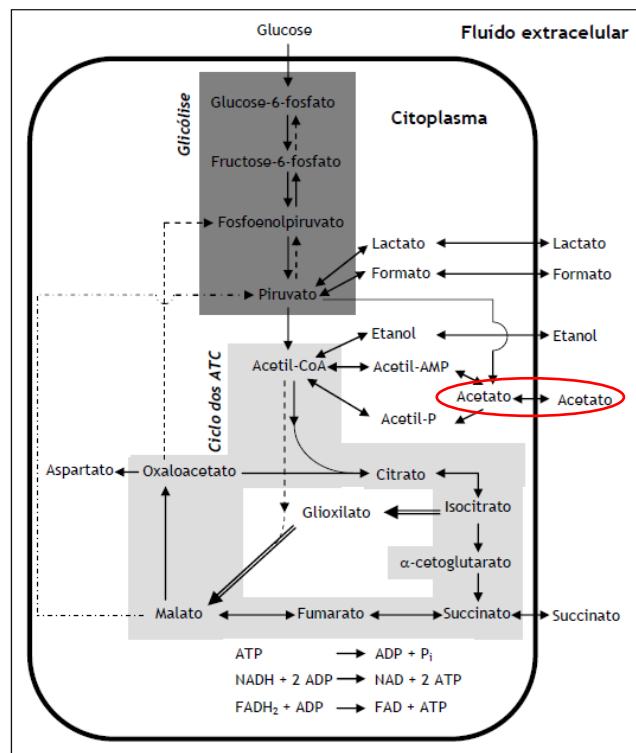


FIGURA 2.5 - Representação do metabolismo em *E. coli*

Em condições anaeróbicas, a enzima piruvato desidrogenase não é ativa. Dessa forma, o piruvato é reduzido a lactato pela ação da lactato desidrogenase, que é em parte metabolizado a outros produtos da fermentação ácida mista (formiato, succinato, etanol,  $CO_2$  e  $H_2$ ).

Segundo Luli e Strohl (1994), concentrações de acetato acima de 5,0 g/L são capazes de reduzir a velocidade de crescimento e o rendimento em biomassa. Consequentemente há uma redução na produção da proteína recombinante desejada.

A glicose é o substrato mais utilizado experimentalmente, já que é simultaneamente uma fonte de carbono e de energia, além de ser facilmente metabolizada e

apresentar um baixo preço. No entanto, devido a essa facilidade de assimilação, a *E. coli* pode ativar o metabolismo “overflow”, levando à formação de acetato.

Desta forma, a composição do meio, a fonte de carbono de carbono empregada, a temperatura de cultivo, inovações nas estratégias de alimentação, além de mudanças genéticas, vêm sendo estudadas a fim de limitar o acúmulo de acetato durante cultivos de *E. coli* e maximizar o rendimento da proteína recombinante (LEE, 1996).

## **2.4. Cultivos em alta densidade celular – HCDC**

Cultivos em alta densidade celular vêm sendo empregados com a finalidade de aumentar a produtividade em biomassa em volume de cultivo reduzido, diminuindo a geração de efluentes e os custos de produção, já que requer menor investimento em equipamentos (RIESENBERG e GUTHKE, 1999).

Durante a produção da vacina pneumocócica, projeto no qual o presente estudo se insere, os processos de purificação da PspA e sua conjugação com o polissacarídeo (PS) ocasionam uma perda de quase 70% da proteína recombinante, fazendo com que seja imprescindível atingir altas concentrações de produto em HCDC de *E. coli* recombinante (CSORDAS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2007).

Entretanto, segundo Lee (1996), esta mesma técnica de cultivo pode ocasionar problemas de inibição por substrato, dificuldade de transferência de oxigênio e formação de metabólitos inibitórios.

Todos esses problemas, acima mencionados, podem ser solucionados com a escolha de um meio de cultivo e de uma estratégia de alimentação adequados a HCDCs.

### **2.4.1. Meio de cultivo**

Para o crescimento celular alcançar altas densidades, é necessário o uso de um meio de cultura balanceado, que contenha todos os nutrientes necessários para alcançar a concentração celular desejada, evitando inibição por substratos. Riesenber *et al.* (1991) identificaram concentrações de diferentes componentes do meio que podem se tornar inibitórias para o crescimento celular de *E. coli*, tais como: glicose (50,0 g/L), amônia (3,0 g/L), ferro (1,15 g/L), magnésio (8,7 g/L), fósforo (10,0 g/L) e zinco (0,04 g/L).

O excesso de nutrientes pode causar a inibição por substrato, mas sua limitação também pode causar problemas ao crescimento do microrganismo e a obtenção do produto

final. De acordo com Lima (1993), a limitação de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos podem ser prejudiciais à estabilidade do plasmídeo.

Os meios de cultura disponíveis na literatura podem ser classificados em três categorias: definidos (KORZ *et al.* 1995; SEEGER *et al.* 1995), complexos (LI *et al.* 2006; STUDIER, 2005) e semi-definidos. Os meios complexos e semi-definidos utilizam nutrientes como extrato de levedura e triptona cuja composição pode variar em quantidade e qualidade. Já os meios definidos são constituídos por sais, vitaminas e aminoácidos de composição conhecida, porém exigem maior cuidado na preparação.

Segundo estudos realizados por Brown (2003), meios complexos proporcionam maiores velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ), devido à presença da triptona, que fornece os aminoácidos e pequenos peptídeos à bactéria, enquanto que o extrato de levedura supre a demanda de nitrogênio, nutrientes orgânicos e inorgânicos. Em contrapartida, são os meios definidos que permitem atingir maiores concentrações celulares ( $C_x$ ) devido à maior facilidade de controle do fornecimento da fonte de carbono e, conseqüentemente, da velocidade específica de crescimento, o que torna possível contornar efeitos de inibição por substrato e por metabólitos tóxicos.

#### **2.4.2. Biorreatores, modos de operação e cultivos de alta densidade celular**

A escolha de um biorreator depende de inúmeros fatores, tais como a velocidade de reação, o volume de produção, o número de fases envolvidas no processo (sistema homogêneo ou heterogêneo), o custo envolvido, a produtividade, o tempo de operação, entre outros (RIESENBERG e GUTHKE, 1999).

Dependendo do regime de alimentação, o bioreator pode operar em modo descontínuo (*batch*), semi-contínuo (*fed-batch*) ou contínuo. Em reatores descontínuos não há adição de substratos e nenhum meio de cultura é retirado ao longo do cultivo. Por isso, o volume permanece aproximadamente constante. Por outro lado, em reatores com operação semi-contínua, os substratos são adicionados continuamente ou intermitentemente sem que nenhum meio de cultura seja retirado até ao final da fermentação, originando um aumento de volume. Já nos reatores contínuos, o volume permanece constante, uma vez que simultaneamente à adição contínua de substratos ocorre a saída contínua de meio de cultura (SHULER e KARGI, 2002).

Na Tabela 2.3 são apresentadas as principais vantagens e desvantagens destes modos de operação no que se refere à sua utilização para o crescimento de microrganismos e para a formação de produtos.

**TABELA 2.3** - Comparação dos diferentes reatores químicos quanto a forma de alimentação

Modo de Operação	Vantagens	Desvantagens
<b>Descontínuo (Batch)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Equipamento simples;</li> <li>- Adequado para produção em baixa escala;</li> <li>- Adequado para formação de produto associada ao crescimento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Longo tempo de espera para enchimento e lavagem (tempo morto);</li> <li>- Variação das condições de reação com o tempo.</li> </ul>
<b>Contínuo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Adequado para produção em grande escala;</li> <li>- Ideal para estudos cinéticos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilidade de wash-out;;</li> <li>- Risco de contaminação e instabilidade genética;</li> <li>- Requer controle da vazão de alimentação.</li> </ul>
<b>Semi-Contínuo (Fed-batch)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Permite o controle da concentração do substrato;</li> <li>- Adequado para formação de produto associada ou não ao crescimento.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessita de estratégia de alimentação definida para se obter a concentração desejada de substrato e produto;</li> <li>- Necessita de equipamentos e software sofisticados.</li> </ul>

De acordo com Riesenber e Guthke (1999), os tipos de biorreatores usualmente empregados em cultivos de alta densidade celular incluem os tradicionais reatores de tanque agitado com instrumentação e sistema de alimentação de nutrientes usuais, reatores de membrana, reatores do tipo “airlift”, entre outros.

Com o intuito de diminuir ou até mesmo evitar a formação de acetato durante os cultivos, os cultivos em batelada alimentada são os mais indicados. Por isso, nos últimos vinte anos esta técnica vem sendo largamente explorada na produção de proteínas recombinantes, sendo hoje o processo mais utilizado e difundido na literatura para obtenção de altas concentrações celulares com altas produtividades em reator.

Segundo relatos da literatura, em cultivos de alta densidade de *E. coli* recombinante realizados em batelada alimentada, a concentração celular máxima pode variar entre 160,0 a 200,0 g (DCW)/L tendo glicose como fonte de carbono (MÄRKL *et al.* 1993).

Os cultivos em batelada alimentada permitem o controle do fornecimento de substrato e conseqüentemente da velocidade específica de crescimento ( $\mu$ ) a fim de minimizar a ocorrência do metabolismo “overflow”. No caso da produção de proteínas heterólogas por *E. coli* recombinante, os cultivos podem ser divididos basicamente três fases, como mostra a Figura 2.6.

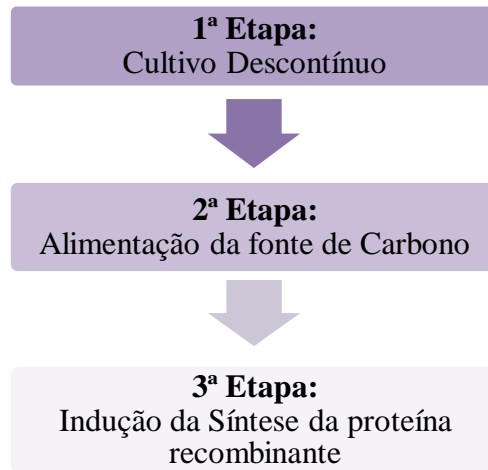


FIGURA 2.6 - Etapas para um cultivo em batelada-alimentada de *E. coli*

A etapa 1 deste processo ocorre até que a fonte de carbono, inicialmente adicionada ao meio, seja consumida, com  $\mu = \mu_{\text{máx}}$ . Na etapa seguinte, inicia-se fase de alimentação. Se a fonte de carbono escolhida for a glicose, essa alimentação deve ser de maneira a não permitir o seu acúmulo, evitando que ocorra a formação de subprodutos inibidores. Para tanto,  $\mu$  deve ser mantido abaixo do  $\mu_{\text{máx}}$ . E por fim ocorre a indução da síntese da proteína, com  $\mu \ll \mu_{\text{máx}}$  devido ao alto estresse metabólico (CARVALHO, 2009).

A adição dos nutrientes é um fator crítico para o sucesso do cultivo em batelada-alimentada, já que afeta a concentração máxima de células atingível, a produtividade celular e a formação de produto. Por isso, diversas estratégias de alimentação podem ser utilizadas para alcançar elevadas concentrações celulares, entre elas:

- i. Velocidade de alimentação constante de nutrientes: nutrientes são alimentados a uma vazão constante e pré-determinada. Neste caso, a  $\mu$  decresce continuamente graças ao aumento do volume da cultura e da concentração celular (Lee, 1996).
- ii. Velocidade de alimentação de nutrientes incrementada gradualmente: este tipo de estratégia permite alcançar maiores concentrações celulares quando comparado ao



- item (i), devido ao suprimento de maiores quantidades de nutrientes para concentrações celulares cada vez maiores.
- iii. Velocidade de alimentação exponencial de nutrientes: método desenvolvido a fim de manter a  $\mu$  constante, de forma que  $\mu_{\text{set}} < \mu_{\text{crítico}} < \mu_{\text{máx}}$ . Possibilita minimizar a formação de acetato controlando a velocidade de crescimento específica abaixo de valores propiciam sua formação ( $\mu_{\text{crítico}}$ ).

### **2.4.3. A formação de acetato e as estratégias de cultivo**

Alguns parâmetros são importantes para o bom andamento de um cultivo de alta densidade celular, entre eles pode-se citar a temperatura de cultivo, a velocidade específica de crescimento celular e a demanda de oxigênio dissolvido no meio de cultura.

A temperatura ótima de crescimento para *E. coli* é 37° C. Segundo Lee (1996), ao diminuir este valor para 30° C reduz-se a capacidade de consumo de nutrientes, bem como a velocidade específica de crescimento. Este efeito que pode parecer prejudicial ao cultivo, minimiza os efeitos tóxicos dos produtos metabólicos secundários, a geração de calor pelo metabolismo e a demanda de oxigênio.

Han *et al.* (1993), descrevem que a adição de alguns aminoácidos, como glicina e metionina, pode aliviar os efeitos prejudiciais do acetato, melhorando a produção de proteínas recombinantes. Em estudos contendo 2 g/L de acetato, a adição de 0,5 g/L de um desses aminoácidos resultou em um aumento da velocidade específica de crescimento.

Outra maneira de reduzir a concentração de acetato no meio de cultura é realizar sua remoção “in situ” utilizando microfiltração com reciclo de células para o biorreator, como realizado por Märkl *et al.* (1993), que obtiveram 174 g/L em apenas 23 horas de cultivo. No entanto, este modo de operação é de alta complexidade, de difícil implementação em escala industrial e, além disso, as vazões das correntes de alimentação e retirada de meio devem ser cuidadosamente calculadas para que problemas como falta de nutrientes ou acúmulo de acetato não ocorram.

Os meios de cultivos propostos na literatura normalmente apresentam glicose como fonte de carbono, porém a rápida assimilação da glicose acarreta também em uma intensa formação de acetato causando inibição do crescimento e da produção da proteína de interesse. Desta forma, substratos mais lentamente assimilados pela *E. coli* como glicerol (KORZ *et al.*, 1995), frutose (ARISTIDOU *et al.*, 1999) e galactose (BELLÃO, 2006) levam a um crescimento mais lento, porém com menor acúmulo de acetato.

Glicerol é uma fonte de carbono promissora para cultivos de alta densidade celular, já que a *E. coli* não possui um sistema de transporte ativo para a entrada do glicerol na célula. Assim, a assimilação do glicerol pela célula é mais lenta quando comparada a da glicose. Devido a esta importante diferença, maiores velocidades de crescimento podem ser atingidas durante a fase de alimentação quando as células são cultivadas com glicerol, com pouca formação de acetato (CARVALHO *et al.* 2011; LEE, 1996). Esta condição de crescimento mais intenso também pode evitar uma resposta de estresse devido à falta de substrato, assim a produção de proteína heteróloga não é prejudicada (SANDÉN *et al.* 2002), além de atender a demanda metabólica, já que o coeficiente de manutenção com glicerol é cerca de 10 vezes maior do que com glicose (NEIJSSSEL *et al.* 1999). Sandén *et al.* (2002) também observaram que maiores velocidades de crescimento específico favorecem a produção da proteína-alvo.

Outra vantagem importante da utilização do glicerol como substrato em HCDC é a produção de células mais resistentes ao congelamento quando estocadas. Estudos realizados por Carvalho (2009) mostraram que o glicerol agiu como conservante da célula durante o congelamento. A maior resistência ao congelamento conferida pelo glicerol é fundamental para as etapas de “downstream”, evitando perdas de proteína durante rompimento celular e etapas de purificação.

Korz *et al.* (1995), compararam a diferença no crescimento celular da *Escherichia coli* TGI em cultivos de alta densidade celular ao utilizar glicose e glicerol como fontes de carbono. Neste estudo, o glicerol proporcionou uma maior concentração celular no fim do cultivo, chegando a 148 g (DCW)/L. Já com glicose foram obtidos 128 g (DCW)/L. Além disso, observaram uma menor formação de acetato na presença de glicerol como fonte de carbono. Porém, nesse estudo, houve a simples substituição da glicose por outra fonte de carbono, sem terem sido consideradas as mudanças nas necessidades das células em função das diferenças no metabolismo dos diferentes substratos.

### **2.3. Síntese protéica**

De acordo com Rossi (2001), a síntese da proteína recombinante em *E. coli* é um processo estranho à célula, já que não faz parte de sua rede de reações metabólicas naturais e geralmente acaba causando problemas à células hospedeiras que reagem às condições adversas de várias formas, dificultando, assim, a obtenção da proteína de interesse.

Sabendo disso, a escolha cuidadosa dos vetores, hospedeiros e das condições de crescimento são considerados fatores essenciais para obtenção de altos níveis de expressão.

O processo que ativa a transcrição de um gene é a indução, através de uma substância denominada indutor, capaz de provocar a síntese das enzimas induzíveis. Uma proteína indutiva é produzida por uma célula quando necessário e somente na presença de um indutor. A indução é utilizada principalmente para o controle da síntese de proteínas que são utilizadas para transportar e degradar nutrientes, evitando assim que a célula desperdice energia sintetizando grande quantidade de proteínas para catabolizar um nutriente que não está disponível.

Muitos dos promotores dos vetores para transcrição de genes heterólogos em *E. coli* são derivados do operon *lac* de regulação da utilização da lactose como substrato pela bactéria. Em *E. coli*, as proteínas necessárias para a degradação da lactose são indutivas, ou seja, só são sintetizadas na presença de lactose ou algum composto similar.

Segundo Donovan *et al.* (1996) o operon *lac* contém os seguintes elementos: o *lac I* (gene da proteína repressora, que quando ligada ao promotor impede a ligação da RNA polimerase e a transcrição dos genes das enzimas para catabolismo da lactose), *lacP* (promotor), *lacY* (gene que codifica a Lac permease, responsável pelo transporte de lactose para dentro da célula) e *lacZ* (gene estrutural transcrito para o mRNA da  $\beta$ -galactosidase, enzima que catalisa a quebra da lactose em glicose e galactose).

Para a produção da proteína recombinante clona-se o DNA de interesse em um fago ou plasmídeo sob o controle do promotor *lac*. Frequentemente o vetor de expressão contém também o *lacI*. A indução da transcrição é obtida pela adição de lactose ou IPTG (isopropiltio- $\beta$ -d-galactosídeo, um análogo de lactose sintético e não degradável), que se associam ao repressor, inibindo-o e deixando o promotor livre para a interação da RNA polimerase e consequentemente para a transcrição dos genes do genoma para catabolismo da lactose e dos genes do vetor para síntese da proteína heteróloga.

Em laboratório, normalmente utiliza-se o IPTG como indutor, já que ele não é consumido durante o processo e independe de transportador para entrar nas células. Entretanto, o IPTG apresenta desvantagens que restringem seu uso em um processo industrial: é caro, tóxico e indesejável na produção de proteínas recombinantes com finalidades terapêuticas ou na produção em larga-escala. A alternativa ao uso do IPTG é a própria lactose, já que ela apresenta baixo custo, não é tóxica às células e funciona como fonte de carbono e energia coadjuvante, sendo convertida a glicose e galactose. Todavia, a lactose também apresenta a desvantagem de ser consumida durante o processo, depende da presença da Lac

permease na superfície das bactérias, além de ser pouco solúvel em água (MENZELLA *et al.* 2003; ZHANG *et al.* 2009).

Nos últimos anos, muitos estudos voltados ao desenvolvimento de estratégias de cultivo para alcançar altas densidades celulares em cultivos de *rE. coli* vêm sendo conduzidos (KORZ *et al.*, 1995; SEEGER *et al.*, 1995; SHILOACH e FASS, 2005). No entanto, relativamente poucos estudos estão direcionados ao desenvolvimento de estratégias para intensificar a produção de proteínas na fase pós-indução. Nesse período do cultivo, a atividade metabólica da célula é intensamente alterada com a produção da proteína recombinante, o que dificulta o controle adequado do suprimento de nutrientes e pode levar à perda de viabilidade e à baixa síntese da proteína. Além da preocupação com a estabilidade da cultura durante a fase de indução, ações voltadas especificamente para o aumento da produção da proteína podem ser incorporadas nas estratégias de cultivo.

O tempo ideal para iniciar e finalizar a indução e a concentração do indutor utilizado são fatores importantes a serem considerados a fim de aumentar a produção da proteína recombinante desejada (NORSYAHIDA *et al.* 2009). De qualquer forma, não existe uma estratégia universal para a expressão de proteínas heterólogas e a melhor estratégia deve ser definida caso a caso, em função das características da proteína de interesse e do sistema de expressão utilizado.

Para que o cultivo apresente bons resultados, este deve fornecer condições equilibradas para o crescimento da bactéria mantendo um alto nível de síntese da proteína recombinante. Norsyahida *et al.* (2009) compararam o rendimento da produção do antígeno BmR1 em *E. coli* utilizando diferentes velocidades de alimentação e comprovaram que uma baixa velocidade de alimentação constante produziu, significativamente, uma maior quantidade de produto do que a obtida ao utilizar alta velocidade de alimentação constante. Porém muitos estudos desenvolvem estratégias em batelada-alimentada utilizando  $\mu \approx \mu_{\text{máx}}$  sem que haja limitação ou inibição do crescimento celular e síntese protéica (RIESENBERG e GUTHKE, 1999).

Um grande problema observado após a indução é a frequente perda de plasmídeo (elementos móveis de DNA que são auto-replicantes, circulares, onde são inseridos os genes de interesse), ocorrendo principalmente quando o cultivo das células é feito em densidades muito altas ou quando há limitações de nutrientes, gerando um estresse nas bactérias (KHALILZADEH *et al.* 2003).

Uma maneira de resolver o problema de perda de plasmídeo é cultivar a célula em meio com o antibiótico cujo gene de resistência está presente no plasmídeo, como a canamicina, ampicilina e outros, evitando o crescimento da bactéria sem o vetor.

Em relação à influência da temperatura, está bem estabelecido que altas temperaturas favorecem um rápido crescimento celular, mas não a produção da proteína alvo, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e conseqüentemente a produção de proteína (ZHANG *et al.*, 2003). Portanto, a diminuição da temperatura durante a fase de indução constitui um método simples e eficaz para aumentar a produção de proteína (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008).

Segundo Yazdani *et al.* (2004) 1 mM de IPTG é o bastante para que ocorra a plena indução do antígeno recombinante da malária em *E. coli*. Neste caso, verificou-se que a elevada concentração de indutor ocasionou a diminuição da produção da proteína alvo. Este fato por ser explicado pelo aumento da toxicidade causado pelo IPTG.

Poucas estratégias de indução utilizando lactose como indutor são relatadas para cultivos de alta densidade celular. Lim *et al.* (2004) implementaram uma estratégia bastante eficiente combinando lactose e glicerol no meio de alimentação, o que lhes permitiu aumentar a concentração do produto em 1,6 vezes. No entanto, a indução precoce causada pela presença de lactose no meio suplementar ocasionou uma baixa produção de biomassa (~ 35 g/L) e conseqüentemente baixa produtividade (1,4 g /L h).

A escolha da fonte de carbono também pode influenciar a produção de proteína. Estudos realizados por Khalilzadeh *et al.* (2004) comparam a produção de biomassa e proteína ao utilizar glicose e glicerol. Foram realizados cultivos de alta densidade celular com meio definido com indução através de um pulso de IPTG 3mM e observaram um rendimento específico de hIFN- $\gamma$  similar na presença de ambas as fontes de carbono.

Essa influência da fonte de carbono se torna mais perceptível ao se utilizar lactose como indutor, já que a glicose diminui a concentração do cAMP que é responsável por estimular o início da transcrição de muitos operons indutíveis (DONOVAN *et. al* 1996).

Embora seja considerada um dos hospedeiros mais adequados para a produção de proteínas recombinantes, a escolha da *E. coli* apresenta algumas limitações, como a incapacidade de realizar glicosilação e modificações pós-traducionais (comuns em eucariotos) e uma limitada capacidade de produzir algumas proteínas complexas, principalmente aquelas com muitas pontes dissulfeto. Porém, uma das principais desvantagens está relacionada à frequente produção de proteínas agregadas e insolúveis expressas em corpos de inclusão no

citoplasma bacteriano, representando um sério obstáculo para a produção eficiente de proteínas recombinantes (DUILIO *et al.* 2004).

Para Bowden *et al.* (1991) corpos de inclusão são agregados densos de polipeptídios sem conformação ou com conformação parcial que são formados intracelularmente pela agregação característica de proteínas e pela incapacidade das células hospedeiras em produzir polipeptídios solúveis e em sua conformação correta. São desprovidos de atividades biológicas e necessitam de um elaborado processo de isolamento, solubilização do agregado e renaturação das proteínas solubilizadas para obter um produto funcionalmente ativo.

De acordo com Singh e Panda (2005), apesar da produção de corpos de inclusão ser, de modo geral, considerada indesejável, sua formação pode ser vantajosa. Entre os benefícios, Singh e Panda (2005) citam:

- i. altos níveis de expressão, chegando a mais de 30% do total de proteínas celulares em alguns casos;
- ii. baixo custo;
- iii. produção e homogeneidade da proteína alvo;
- iv. baixos níveis de degradação das proteínas expressas.

Se, por ventura, a proteína de interesse for tóxica à célula, então, a expressão em corpos de inclusão pode ser a única alternativa viável.

Estes corpos de inclusão estão normalmente localizados no citoplasma, embora as proteínas secretadas também possam formar corpos de inclusão no espaço periplasmático bacteriano.

Mas, segundo Lee (1996), muitas técnicas estão sendo desenvolvidas para que as proteínas recombinantes estejam em forma solúvel e/ou secretadas, facilitando sua recuperação e diminuindo o custo, já que a formação de corpos de inclusão continua sendo uma barreira para a expressão gênica no citosol.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Microrganismo

Fragmentos da região N-terminal do gene da PspA do clado 1 da família 1 (PspA245) e também do clado 3 da família 2 (PspA3) de *Streptococcus pneumoniae* foram clonados no vetor pET37b+ (Departamento de Genética Microbiana, National Institute of Genetics Shizuoka-ken, Japan) com cauda de poli-histidina no amino terminal, e inseridos em células de *E. coli* BL21(DE3).

As seqüências de aminoácidos dos fragmentos das PspAs utilizadas neste trabalho podem ser observados na Figura 3.1.

**A**

```
MHHHHHLE EAPVASQSKA EKDYDTAKRD AENAKKALEE AKRAQKKYED
DQKKTEEKAK EEKQASEAEQ KANLQYQLKL REYIQKTGDR SKIQKEMEEA
EKKHKNAKAE FDKVRGKVIP SAEELKETRR KAEEAKAKEA ELTKKVEEAE
KKVTEAKQKL DAERAKEVAL QAKIAELENO VHRLETELKE IDESDSEYDV
KEGLRVPLQS ELDVKQAKLS KLEELSDKID ELDAEIAKLE KDVEDFKNSD
GEYSALYLEA AEKDLVAKKA ELEKTEADLK KAVNEPEKPA EEPENPAPAP
KPAPAPQPEK PAPAPAPKPE KSADQQAED YARRSEEEYN RLTQQQPPKA
EKPAPAPVPK PEQPAPAPKT GWKQENGMW
```

**B**

```
MHHHHHLEE EAPVASQSKA EKDYDAAVKK SEAAKKHYEE VKKKAEDAOK
KYDEGQKKTV EKAKREKEAS EKIAEATKEV QQASNESQRK EADKKIKEAT
QRKDEAEAAF ATIRTTIVVP EPSELAETKK KAEEAKAEK VAKRKYDYAT
LKVALAKKEV EAKELEIEKL QYEISTLEQE VATAQHQVDN LKKLLAGADP
DDGTEVIEAK LNKGEAELNA KQAEALAKKQT ELEKLLDSDL PEGKTQDELD
KEAEEAELDK KADELQNKVA DLEKEISNLE ILLGGADSED DTAALQNKLA
TKKAELEKTQ KELDAALNEL GPDGDEEETP APAPQPEQPA PAPKPEQPAP
APK
```

FIGURA 3.1 - Seqüências dos fragmento recombinantes da A) PspA245 e B) PspA3 utilizados neste trabalho

As características físico-químicas de cada fragmento recombinante são mostradas na Tabela 3.1.

TABELA 3.1- Características físico-químicas dos fragmentos recombinantes da PspA245 e PspA3

	PspA245	PspA3
Número de aminoácidos	378	353
Massa Molecular (kDa)	43	40
Ponto Isoelétrico	5,11	4,74

O vetor pET37b+ apresenta marca de resistência ao antibiótico canamicina (cana) e o gene da PspA está sobre o controle do promotor T7lac.

As construções contendo PspA3 e PspA245 foram gentilmente cedidas, respectivamente, pelas pesquisadoras Dra. Eliane Miyaji e Dra. Luciana C. C. Leite, ambas do Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

As células foram semeadas e enviadas para o LaDABio/UFSCar em placas LB-Ágar contendo canamicina.

### 3.2. Meios de cultivo

Dois meios diferentes foram utilizados: o meio sólido Luria Bertani – Ágar (LB – Ágar - Tabela 3.2), descrito por Speigleer *et al.* (2004) e o meio definido para alta densidade celular (HCD - Tabela 3.3) descrito por Korz *et al.* (1995) e Seeger *et al.* (1995).

#### 3.2.1. Meio complexo LB-Ágar

Todos os componentes descritos na Tabela 3.2 foram dissolvidos em água Milli-Q e em seguida autoclavados a 121°C e 1 atm por 30 minutos.

**TABELA 3.2** - Composição do meio complexo LB (Speigleer *et al.* 2004)

Componentes	Concentração (g/L)
<b>Triptona</b>	5
<b>Extrato de Levedura</b>	10
<b>NaCl</b>	10
<b>Ágar</b>	20

#### 3.2.2. Meio definido para alta densidade celular (HCD)

Durante o decorrer do trabalho foram realizados 3 cultivos em biorreator para a otimização do meio de cultivo. A composição dos meios utilizados é dada na Tabela 3.3. Preparou-se uma solução contendo EDTA, ácido cítrico, ácido bórico e todos os sais descritos na Tabela 3.3, com exceção do sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O). Ajustou-se o pH para 6,3 e esterilizou-se esta solução a 121°C e 1 atm por 30 minutos. Tanto a solução de glicerol quanto a solução de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O foram esterilizadas separadamente em



autoclave também a 121°C e 1 atm por 30 minutos e adicionadas assepticamente à primeira solução.

As soluções de canamicina, tiamina e IPTG foram esterilizadas por filtração em membranas de 0,22 µm. A solução de canamicina foi adicionada assepticamente ao meio em temperatura ambiente, evitando sua inativação.

**TABELA 3.3** - Composição dos meios de batelada e alimentação para os cultivos em biorreator

	Meio de batelada			Meio da batelada-alimentada		
	Cult. 1 (por L)	Cult. 2 (por L)	Cult. 3 & 4 (por L)	Cult. 1 (por L)	Cult. 2 (por L)	Cult. 3 & 4 (por L)
Glicerol	40,00 g	40,00 g	40,00 g	800,00 g	800,00 g	800,00 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,30 g	13,30 g	17,73 g	-	21,28 g	21,28 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,00 g	4,00 g	5,30 g	-	6,40 g	6,40 g
Ácido Cítrico	1,70 g	1,70 g	2,27 g	-	2,27 g	2,27 g
Citrato de Fe (III)	100,00 mg	100,00 mg	133,33 mg	40,00 mg	40,00 mg	40,00 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2,50 mg	2,50 mg	3,33 mg	4,00 mg	4,00 mg	4,00 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15,00 mg	15,00 mg	20,00 mg	23,50 mg	23,50 mg	23,50 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,50 mg	1,50 mg	2,00 mg	2,50 mg	2,50 mg	2,50 mg
Zn(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	33,80 mg	33,80 mg	33,80 mg	16,00 mg	16,00 mg	16,00 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2,10 mg	2,10 mg	2,80 mg	4,00 mg	4,00 mg	4,00 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00 mg	3,00 mg	4,00 mg	5,00 mg	5,00 mg	5,00 mg
EDTA	13,00 mg	13,00 mg	18,80 mg	13,00 mg	13,00 mg	13,00 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,20 g	1,20 g	1,60 g	20,00 g	20,00 g	20,00 g
Tiamina	4,50 mg	45,00 mg	45,00 mg	4,50 mg	45,00 mg	45,00 mg
Canamicina	25,00 mg	25,00 mg	50,00 mg	25,00 mg	25,00 mg	50,00 mg
Antiespumante PPG 30%	1,00 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

### 3.3. Métodos Analíticos

#### 3.3.1. Determinação da concentração celular

O crescimento celular foi medido de acordo com a densidade óptica do meio de cultura no comprimento de onda de 600nm (DO<sub>600nm</sub>), bem como por medidas de massa seca (g/L) e por estimativas on-line de permissividade (pF/cm).

As medidas de massa seca foram determinadas nos cultivos em biorreator, através da filtração de um volume conhecido da amostra em uma membrana com poro de 0,22

µm previamente pesada. A amostra foi submetida a secagem por 24 horas em estufa a 60°C e pesada posteriormente.

A partir das medidas de  $DO_{600nm}$  e  $C_x$  obteve-se a correlação  $C_x = 0,49 * DO_{600nm}$ .

### **3.3.2. Determinação da estabilidade do plasmídeo**

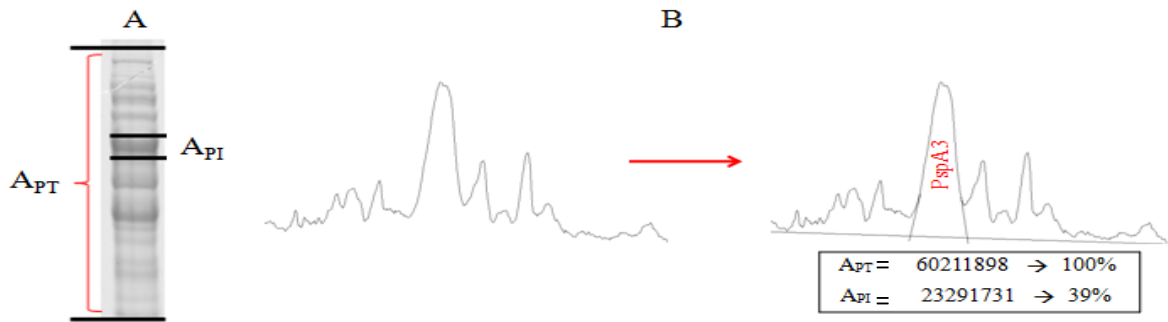
A estabilidade do plasmídeo foi determinada em diferentes momentos do cultivo, coletando-se uma amostra imediatamente antes do momento antes da indução, e em pelo menos outros dois momentos após a indução.

A amostra da suspensão celular retirada do reator de forma estéril foi diluída adequadamente (entre  $10^6$  a  $10^8$ ) e um volume de 100 µL foi semeado em uma placa de LB-Ágar sem canamicina. Após 24 horas de incubação a 37°C, repicou-se um número razoável de colônias (cerca de 100) para uma placa com 50 mg/L de canamicina e outra placa sem antibiótico (controle) e novamente as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Calculou-se, então, em porcentagem, a quantidade de colônias que cresceram na placa com antibiótico em relação às colônias que cresceram na placa sem antibiótico.

### **3.3.3. Determinação da concentração de proteína**

O método utilizado para a análise de produção de proteína foi baseado na densitometria das bandas de proteína separadas em eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes, segundo Laemmli (1970). Os géis foram corados com Coomassie Blue R-250 e a produção da proteína foi estimada utilizando-se o software Image J (Abramoff *et al.*, 2004).

Neste software, a imagem escaneada do gel é processada gerando curvas cujos picos são proporcionais à largura e à intensidade de coloração das bandas correspondentes às proteínas presentes na amostra sob análise. O programa utiliza integrações simples para transformar as áreas sob as curvas em valores numéricos. Somando-se as áreas de todos os picos obtidos é possível obter um valor numérico que corresponde à concentração de proteínas totais observadas no gel ( $A_{PT}$ ). Quantificando apenas a área sob a curva correspondente à proteína recombinante de interesse ( $A_{PI}$ ) obtém-se o valor numérico representativo desta proteína e a partir destes dois valores calcula-se a fração relativa da proteína recombinante, como mostra a Figura 3.2.



**FIGURA 3.2** - Cálculo da porcentagem relativa da proteína recombinante em relação a proteínas totais obtidas no gel de eletroforese (A) Quantificação da área sob a curva através do software Image J (B).

Para estimar a concentração da PspA obtida nos ensaios em shaker e nos cultivos em biorreator pela Equação 1 foi assumido que a célula contém 0,5 g de proteína total por g de biomassa (em massa seca), de acordo com Bailey e Ollis (1986).

$$C_{PspA} = \frac{A_{PI}}{A_{PT}} (0,5C_X) \quad (1)$$

**FIGURA 3.3** - Cálculo da porcentagem relativa da proteína recombinante em relação a proteínas totais obtidas no gel de eletroforese (A) Quantificação da área sob a curva através do software Image J (B).

### 3.3.4. Determinação de açúcares e ácidos orgânicos

A concentração de açúcares (glicose, lactose e galactose), glicerol e ácidos orgânicos nas amostras retiradas durante os cultivos foi determinada 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min e 60°C.

## 3.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

### 3.4.1. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

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

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

Na fase exponencial de crescimento  $\mu = \mu_{\text{máx}}$ , desta forma, após integrar e rearranjar a Equação 2, é possível calcular a velocidade específica de crescimento máxima através da Equação 3.

$$\ln \frac{Cx}{Cx_0} = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (3)$$

onde  $Cx_0$  é a concentração celular no início do Cultivo (tempo zero) e  $t$  é o tempo de cultivo.

A Equação 3 é linear permitindo o cálculo de  $\mu_{\text{máx}}$  através do método dos mínimos quadrados.

### 3.4.2. Determinação da velocidade específica de crescimento celular real

Para o cálculo da velocidade específica de crescimento celular real ( $\mu_{\text{real}}$ ) utilizou-se a Equação 2.

Através da regra da derivada da multiplicação, obtem-se:

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

$$\text{onde } \frac{dV}{dt} = F \quad (5)$$

O rearranjo da Equação 4 permite o cálculo do  $\mu_{\text{real}}$

$$\frac{1}{Cx} \frac{dCx}{dt} + \frac{F}{V} = \mu \quad (6)$$

A determinação de  $\frac{dCx}{dt}$  foi feita por meio de ajuste de polinômio aos dados da concentração celular ( $Cx$ ) representados contra o tempo, seguida pela derivação do mesmo.  $F$  e  $V$  foram obtidos diretamente do conjunto de dados adquiridos *on-line* pelo *software* SuperSys\_HCDC.

### 3.4.3. Determinação do fator de conversão de substrato a células

Para o cálculo do fator de conversão de substrato a células ( $Y_{X/S}$ ) foi utilizada a Equação 7.

$$Cx - Cx_0 = Y_{X/S} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad (7)$$

onde  $Cs_0$  é a concentração inicial de substrato e  $Cs$  é a concentração de substrato variando com o tempo.

A partir do cálculo do consumo de glicerol e da produção de biomassa correspondente para cada intervalo de tempo, foi possível calcular o valor do  $Y_{X/S}$  através do método dos mínimos quadrados.

### **3.5. Metodologia Experimental**

#### **3.5.1. Estudo da estabilidade dos clones fornecidos**

Ensaio em frascos agitados foram realizados para cada clone recebido a fim de verificar a estabilidade do plasmídeo e a síntese da proteína alvo em meio definido. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 500 mL com 30 mL de meio HDF (observado na Tabela 3.3 – Meio de batelada do Cultivo 1 com 20 g/L de glicerol). Com uma alça de platina, uma colônia de cada clone foi isolada da placa LB-Ágar/cana recebida e semeada em meio líquido estéril. Os frascos foram deixados em mesa incubadora rotativa a 300 rpm e 30°C. Quando atingiu-se uma densidade óptica a 600nm ( $DO_{600nm}$ ) de aproximadamente 2,5 realizou-se a indução pela adição de 0,25 mM de IPTG e o cultivo prosseguiu por mais 4 horas. Foram avaliados o crescimento celular por medidas de  $DO_{600nm}$  e a estabilidade do plasmídeo pela porcentagem de colônias obtidas resistentes a canamicina. A síntese da proteína alvo foi analisada por eletroforese SDS-PAGE.

#### **3.5.2. Preparação de cultura estoque em criotubos**

Após os testes em frascos agitados para cada clone foi feito um estoque de células da colônia escolhida. A produção de cultura estoque foi realizada nas condições descritas no item 3.5.1 com meio HCD. Ao atingir uma  $DO_{600nm}$  de 1,0 (garantia de que o crescimento ainda estava na fase exponencial), interrompeu-se o cultivo e um volume de 20 mL de caldo foi centrifugado. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi re-suspendido em 10 mL de meio fresco. Como crioprotetor foi adicionado glicerol em volume e concentração adequados para se obter uma solução final com 10% v/v de glicerol. Em seguida as soluções foram transferidas para criotubos e estocadas a - 80°C.

### 3.5.3. Ensaio em frasco agitado

Estudos preliminares foram realizados em frascos agitados, como mostra a Figura 3.3, com o intuito de se identificar a temperatura ótima de indução ao se utilizar lactose ou IPTG como indutores.



FIGURA 3.4 - Ilustração de Ensaio em frascos agitados.

Para a realização destes ensaios semeou-se o estoque congelado em uma placa de LB-Ágar/cana que foi incubada por 24 horas a 37°C. Uma única colônia dessa placa foi transferida para um frasco de 500 mL com 30 mL de meio HCD, sendo este o inóculo. O frasco foi incubado a 300 rpm e 30°C (nos ensaios em shaker 1 e 2) e 37°C (no ensaio em shaker 3) por cerca de 12 horas. Após atingir uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 2,0, transferiu-se uma alíquota de 5 mL do inóculo para frascos de 500 mL contendo 50 mL de meio HCD fresco, que também foram incubados a 300 rpm e 30°C (nos ensaios em shaker 1 e 2) e 37°C (no ensaio em shaker 3) até se obter uma densidade óptica entre 2,0 e 2,5 que ainda se encontra em uma fase de crescimento exponencial. A partir deste momento adicionou-se o indutor (IPTG 0,25 mM ou lactose 5 g/L) e acompanhou-se o crescimento celular e a produção da proteína em diferentes temperaturas. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE para se avaliar a temperatura ótima de produção de PspA.

### 3.5.4. Cultivos em Biorreator

#### 3.5.4.1. Biorreator

Todos os experimentos foram realizados em biorreator de 5L, de montagem própria no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos (LADABio - do

Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos). O aparato experimental para aquisição, monitoramento e controle do reator é formado pelos seguintes acessórios: computador munido de software de controle e monitoramento desenvolvido em Labview pela equipe de pesquisadores do LADABio; compact Field Point (cFP) da National Instruments, para a comunicação entre os instrumentos e o computador; inversor de frequência controlando a velocidade de agitação via computador/cFP; bomba de alimentação ISMATEC controlada via computador/cFP; pHmetro GLI com aquisição via cFP; transmissor da concentração de oxigênio dissolvido (modelo CE, O2 4050) com aquisição via cFP; analisador de gases (Sick/MAIHAK S710) com aquisição digital direta via RS232 e também analógica via cFP; banho térmico; termopar com aquisição via cFP; bombas de ácido e base (Masterflex) com controle on/off via computador/cFP; 2 fluxômetros de massa (GFC AALBORG) empregados para suprir ar e oxigênio controlados remotamente via cFP; um sensor de biomassa baseado em capacitância (FOGALE nanotech) com aquisição analógica via cFP e digital via RS232, como esquematizado na Figura 3.4. Todos os instrumentos listados apresentam dados com aquisição em tempo real, com intervalos de salvamento, múltiplos de segundo (s), escolhidos pelo usuário, que neste caso foi de 10 em 10 s.

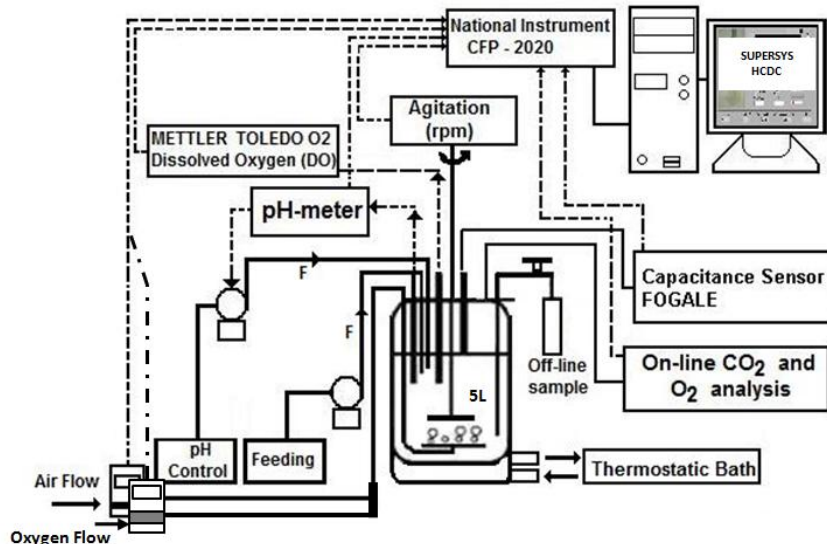


FIGURA 3.5 - Visão esquemática do biorreator usado no presente estudo.

### 3.5.4.2. Condições de cultivo

Os cultivos tiveram controle de pH automático, pela adição de hidróxido de amônio (PA), controle da concentração de oxigênio dissolvido por atuação tanto na velocidade de agitação como no enriquecimento automático da corrente gasosa com oxigênio

puro, identificação do término da etapa batelada e início automático da alimentação por sistema baseado em redes neurais e lógica fuzzy,

O volume inicial de batelada foi de 3,7 L para que após a alimentação e a indução se atingisse um volume final próximo a 5 L. A formação de espuma foi controlada pela adição de polipropilenoglicol (PPG) 30%.

O esgotamento da fonte de carbono foi identificado pelo aumento da concentração de O<sub>2</sub> dissolvido no reator e consequente diminuição da velocidade de agitação, já que nesta condição as células param de consumir oxigênio. Neste momento, o bombeamento do meio de alimentação foi iniciado automaticamente para dentro do biorreator.

A alimentação dos cultivos seguiu perfil exponencial de acordo com a equação

8.

$$F = \left( \frac{\mu_{\text{SET}}}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot \frac{C_{X0} \cdot V_0}{C_{S0} - C_{SR}} \cdot e^{(\mu_{\text{SET}} \cdot t)} \quad (8)$$

onde:

F = vazão de alimentação de meio fresco (L/h);

$\mu_{\text{SET}}$  = velocidade específica de crescimento adotada (h<sup>-1</sup>);

$Y_{X/S}$  = coeficiente de rendimento (g<sub>X</sub>/g<sub>S</sub>);

m = manutenção (g<sub>X</sub>/g<sub>S</sub> h);

$C_{X0}$  = concentração celular no início da alimentação (g/L);

$V_0$  = volume no início da alimentação (L);

t = tempo (h);

$C_{S0}$  = concentração de substrato no meio de alimentação (g/L);

$C_{SR}$  = concentração de substrato residual (g/L).

### 3.5.4.3. Preparo do Inóculo - Biorreator

Antes de iniciar os cultivos em biorreator, foram necessárias duas etapas de crescimento celular em frascos agitados (pré-inóculo e inóculo), como mostra a Figura 3.5. Essas etapas foram feitas nas mesmas condições descritas no item 3.5.1 utilizando meio HCD. Após se atingir uma DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 2,5, 300 mL do inóculo foi transferido para o biorreator.



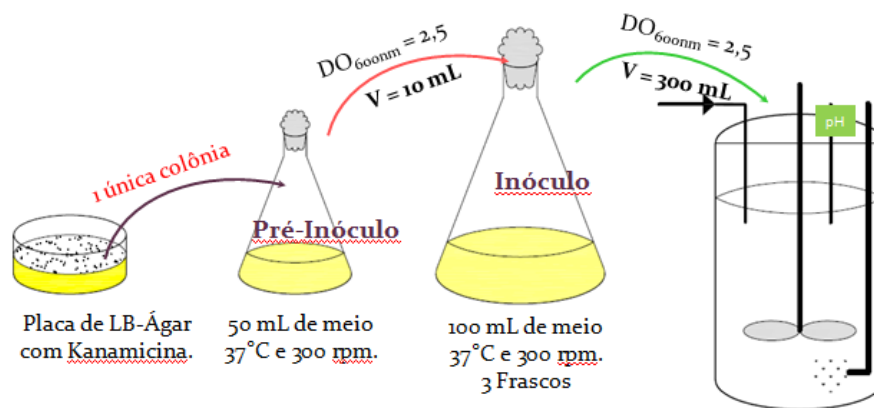


FIGURA 3.6 - Procedimento para Cultivos em Biorreator

### 3.6. Descrição dos experimentos

Na Tabela 3.4 estão descritos os experimentos realizados neste trabalho que apresentaram os resultados mais relevantes.

TABELA 3.4 - Descrição e objetivos dos principais experimentos realizados listados em ordem cronológica.

Experimento	Descrição/objetivo
Cultivo em Biorreator 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Implementação da metodologia de cultivo de alta densidade celular em batelada-alimentada de <i>E. coli</i> em meio definido de alta densidade celular descrito na literatura com glicerol como fonte de carbono;</li> <li>- Clone: BL21(DE3)pET37b+/PspA3.</li> </ul>
Cultivo em Biorreator 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Otimização dos meios de cultivo para cultivo de alta densidade celular em batelada-alimentada de <i>E. coli</i>;</li> <li>- Aumento da produtividade em biomassa.</li> <li>- Clone: BL21(DE3)pET37b+/PspA3.</li> </ul>
Ensaio em shaker 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo da influência da temperatura durante a fase de indução ao se utilizar IPTG com o clone <i>E. coli</i> BL21(DE3)pET37b+/PspA245.</li> </ul>
Ensaio em shaker 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo da influência da temperatura durante a fase de indução ao se utilizar lactose com o clone <i>E. coli</i> BL21(DE3)pET37b+/PspA245.</li> </ul>
Ensaio em shaker 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mudança na temperatura da fase de pré-indução de</li> </ul>

	30°C (nos ensaios em shaker 1 e 2) para 37°C; - Estudo da influência da temperatura durante a fase de indução ao se utilizar lactose com o clone <i>E. coli</i> BL21(DE3)pET37b+/PspA3.
Cultivo em Biorreator 3	- Otimização do meio de batelada para cultivo de alta densidade celular em batelada-alimentada de <i>E. coli</i> ; - Aumento da temperatura durante a fase de pré-indução de 30°C para 37°C; - Estudo de uma estratégia diferenciada de indução com lactose. - Clone: BL21(DE3)pET37b+/PspA3.
Cultivo em Biorreator 4	- Indução com IPTG (estudo comparativo com a indução por lactose, cultivo 3); - Clone: BL21(DE3)pET37b+/PspA3.

### 3.6.1. Ensaios em frasco agitado

#### 3.6.1.1. Ensaio em Shaker 1

Este experimento em batelada teve como principal objetivo estudar a influência da temperatura na a fase de indução ao se utilizar IPTG (0,25mM) como indutor e o clone *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA245.

Sabe-se que altas temperaturas favorecem um rápido crescimento celular, mas não a produção da proteína alvo, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e conseqüentemente a produção de proteína (ZHANG *et al.*, 2003). Portanto, a diminuição da temperatura durante a fase de indução constitui um método simples e eficaz para o aumento da síntese protéica (SHOJAOSADATI *et al.*, 2008).

Desta forma, comparou-se o crescimento celular, a produção da PspA245 e a estabilidade do plasmídeo nas temperaturas de 25 e 20°C durante a indução, enquanto a fase de pré-indução foi conduzida a uma temperatura de 30°C.

O procedimento de cultivo adotado está descrito no item 3.5.1 com meio HDF (mostrado na Tabela 3.3 – Meio de batelada do Cultivo 1 com 20 g/L de glicerol).

### **3.6.1.2. Ensaio em Shaker 2**

Neste experimento em batelada foi realizado um estudo semelhante àquele do Ensaio em Shaker 1 (item 3.6.1.1) mas, neste caso, utilizou-se lactose (5 g/L) como indutor.

Comparou-se o crescimento celular, a produção da PspA245 e a estabilidade do plasmídeo nas temperaturas de 30, 25 e 20°C durante a indução, enquanto a fase de pré-indução foi conduzida a uma temperatura de 30°C.

### **3.6.1.3. Ensaio em Shaker 3**

Durante a etapa de purificação da PspA245 observou-se o aparecimento de duas bandas muito próximas, provavelmente devido à hidrólise da proteína, fato este que impossibilitou obter-se a PspA245 com um elevado grau de pureza. Desta forma, decidiu-se investir no recombinante *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA3 já que apresentou boa estabilidade e ótimas respostas em cultivos em biorreator.

Um novo estudo da influência da temperatura durante a indução foi realizado, analisando-se a produção da PspA3 e estabilidade do plasmídeo nas temperaturas de 30, 25 e 20°C durante a indução com lactose.

Após observar os resultados obtidos nos cultivos 1 e 2 (itens 4.2.1.1 e 4.2.1.2) a temperatura da fase de pré-indução foi aumentada de 30°C para 37°C.

## **3.6.2. Cultivos em Biorreator**

### **3.6.2.1. Temperatura e composição do meio para cultivos de alta densidade celular (HCD) com glicerol como fonte de carbono.**

A formação de biomassa foi estudada em três cultivos em batelada-alimentada de alta densidade celular, modificando-se os meios de batelada e alimentação e utilizando-se duas temperaturas distintas durante a fase de crescimento.

#### **3.6.2.1.1. Cultivo 1 - Implementação da metodologia de cultivos de *E. coli* em meio definido HCD descrito na literatura com glicerol como fonte de carbono**

Estudos recentes realizados por Carvalho *et al.* 2011 destacaram a grande vantagem de se utilizar glicerol como fonte de carbono e energia ao invés de glicose, frequentemente empregada.

Este experimento foi realizado com o objetivo de testar as condições de cultivo de *Escherichia coli* mencionadas na literatura. Os meios de cultivo neste experimento (Tabela 3.3) apresentaram composição idêntica à proposta por Seeger *et al.* (1995). O procedimento de cultivo adotado foi o descrito no item 3.5.4.3.

Durante todo o cultivo, o “*set-point*” da temperatura permaneceu em 30°C, de acordo com protocolos descritos na literatura (KORZ *et al.*, 1995; SEEGER *et al.*, 1995; LEE, 1996).

Amostras de 15 mL foram retiradas de hora em hora para a determinação da DO<sub>600nm</sub>, concentração celular (g/L), de glicerol e acetato e com esses dados experimentais pode-se determinar os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}$  (equações 3 e 4).

#### **3.6.2.1.2. Cultivo 2 – Otimização dos meios de cultivo**

Estudos realizados por Korz *et al.* (1995) mostraram que o fosfato pode se tornar um substrato limitante do crescimento celular em cultivos de alta densidade celular. Porém no meio de cultivo sugerido por Seeger *et al.* (1995) os sais de fosfato estão presentes apenas no meio de batelada, havendo a necessidade de um pulso destes ao longo do cultivo, conforme relatado por Korz *et al.* (1995). Desta forma, no Cultivo 2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> foram incluídos no meio de alimentação buscando adequar o meio à nova formulação tendo glicerol como substrato (Tabela 3.3).

Além disso, a concentração de tiamina foi aumentada em 10 vezes, visto que esta é uma vitamina de grande importância para as células, pois a tiamina pirofosfato (TPP) atua como coenzima em duas etapas controladoras da via glicolítica (LEHNINGER, 2006).

Ao longo do cultivo foram coletadas amostras que possibilitaram a determinação dos valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e  $Y_{X/S}$  (equações 3 e 4).

### **3.6.2.1.3. Cultivo 3 – Aprimoramento do procedimento de cultivo em biorreator**

Neste cultivo as concentrações de todos os sais do meio de batelada foram ajustadas de modo a balancear o meio com a nova concentração de glicerol, já que o protocolo de Korz *et al.* (1995) sugere 30 g/L de glicerol e neste trabalho optou-se por se estender a fase de batelada iniciando-se o cultivo com 40 g/L de glicerol (Tabela 3.3).

A temperatura durante a fase de crescimento também foi alterada, passando de 30°C nos cultivos anteriores para 37°C neste.

Com o intuito de aumentar a eficiência da pressão seletiva do ambiente de cultivo aumentou-se a concentração da canamicina nos meios, passando de 25 para 50 mg/L.

Além disso, uma nova estratégia para o controle da vazão da alimentação foi implementada, seguindo o procedimento desenvolvido por Horta *et al.* (2011). Este controle foi baseado na estimativa “*on-line*” da velocidade específica de crescimento a partir de dados da permissividade, atualizando automaticamente o valor do  $\mu_{set}$  na equação 8.

### **3.6.2.2. Estratégias de indução em biorreator**

#### **3.6.2.2.1. Cultivo 3 – Desenvolvimento de uma estratégia de indução com lactose**

Uma estratégia diferenciada de indução foi adotada neste cultivo, combinando um pulso de lactose (20 g/L) seguido de uma alimentação contínua deste indutor (80 g/L) juntamente com glicerol (400 g/L).

Durante a fase de indução a temperatura foi alterada, seguindo os resultados obtidos no ensaio em shaker 3 (item 3.6.1.3).

Amostras foram coletadas de hora em hora para determinação da  $DO_{600nm}$  e da concentração celular (g/L). Essas amostras foram centrifugadas e com o sobrenadante realizou-se as análises de HPLC para determinação da concentração de glicerol, lactose, glicose, galactose e acetato. Já os pellets foram utilizados para a análise de eletroforese e posterior quantificação da PspA3. Uma amostra imediatamente antes do momento da indução e duas após o pulso de lactose foram retiradas de maneira estéril para análise da estabilidade do plasmídeo.

### **3.6.2.2.2. Cultivo 4 – IPTG como indutor da síntese de PspA3**

Este experimento foi realizado com o objetivo de comparar a produção de proteína ao se utilizar lactose ou IPTG. O procedimento de cultivo adotado foi o mesmo descrito no item 3.5.4.3 e os meios descritos na Tabela 3.3 – Meio de batelada e alimentação Cultivos 3 & 4.

A indução foi feita com 2 pulsos de IPTG, sendo o primeiro de 1 mM e o segundo de 0,5 mM. Nesta fase do cultivo, a temperatura foi alterada seguindo os resultados obtidos no ensaio em shaker 1 (item 4.1.1).

No decorrer do cultivo foram coletadas amostras de 15 mL para a determinação da  $DO_{600nm}$ , concentração celular, de glicerol e acetato possibilitando o cálculo do  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}$  (equações 3 e 4).

As amostras foram centrifugadas e os pellets foram utilizados para a análise de eletroforese e posterior quantificação da PspA3. Uma amostra do momento antes da indução e duas após o primeiro pulso de IPTG foram retiradas de maneira estéril para análise da estabilidade do plasmídeo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

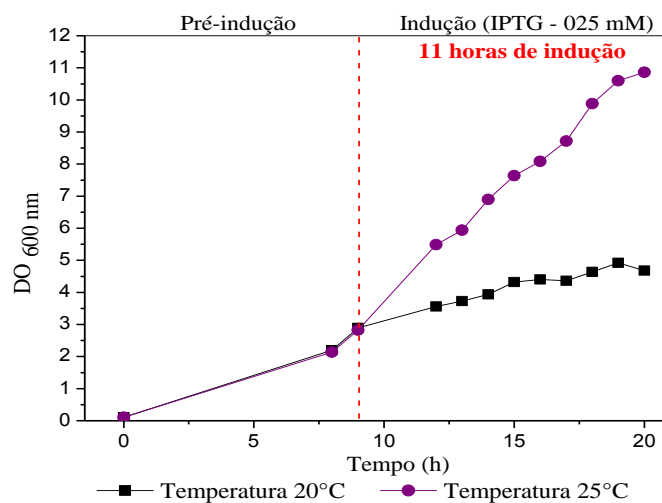
### 4.1. Ensaio em frascos agitados

#### 4.1.1. Ensaio em shaker 1

A temperatura e o indutor são parâmetros importantes que influenciam a produção de proteínas recombinantes.

Este experimento teve como principal objetivo estudar a influência da temperatura durante a fase de indução ao se utilizar IPTG (0,25mM) como indutor e o clone *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA245.

A Figura 4.1 mostra os valores das  $DO_{600nm}$  ao longo do ensaio nas temperaturas de indução de 25 e 20°C.



**FIGURA 4.1** - Curvas de crescimento para *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA245 em diferentes temperaturas de indução utilizando-se IPTG 0,25 mM.

Como pode ser observado na Figura 4.1, o crescimento celular a 25°C é muito superior do que a 20°C, já que a medida que a temperatura se aproxima de um valor ótimo (próximo a 37°C) a velocidade de crescimento aumenta rapidamente.

A produção da proteína foi acompanhada por análises de SDS-PAGE (Figura 4.2) seguida por quantificação pelo software ImageJ. Os principais resultados estão resumidos na Tabela 4.1.

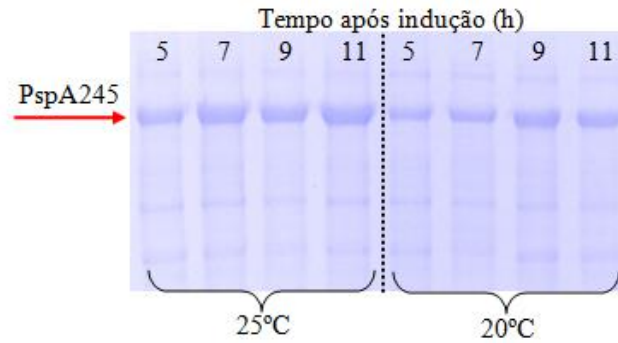


FIGURA 4.2 – SDS-PAGE para as amostras obtidas durante o Ensaio em Shaker 1.

Com relação à perda de plasmídeo, após 8 horas de indução 63% das células permaneceram com plasmídeo na temperatura de 20°C, enquanto a 25°C apenas 36%.

Os maiores valores de rendimento e produtividade foram obtidos a 25°C ( $176 \pm 5$  mg proteína/g DCW e 46,8 mg/L h, respectivamente – Tabela 4.1), sendo esta a temperatura de indução escolhida para a realização de estudo futuros ao se utilizar IPTG como indutor

TABELA 4.1 - Valores da produção de PspA245 ao longo do Ensaio em Shaker 1.

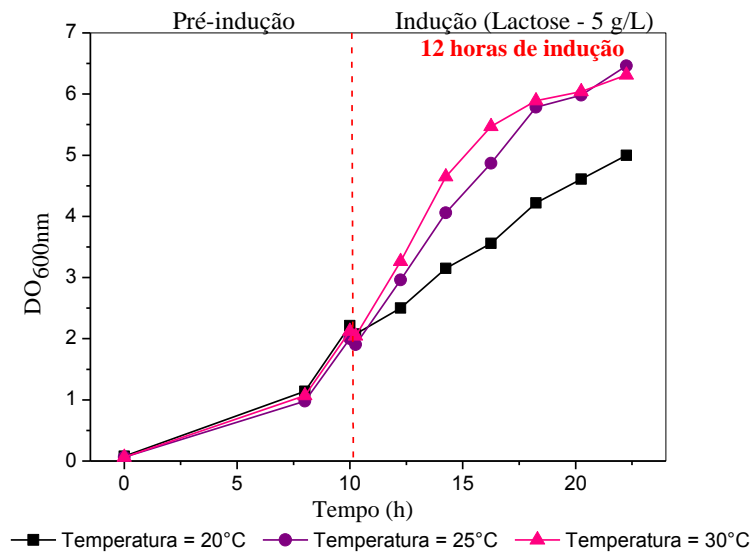
	Tempo de indução (h)	Tempo de cultivo (h)	PspA (%)	[Proteína] mg/g cél.	Cx g cél./L	Produtiv. mg/(L.h)
25°C <sup>E</sup>	5	13	28	154	2,91	34,48
	7	15	32	176	3,74	43,92
	9	17	32	176	4,27	44,24
	11	20	32	176	5,32	46,83
20°C	5	13	21	115	1,83	16,24
	7	15	21	115	2,12	16,30
	9	17	28	154	2,14	19,35
	11	20	28	154	2,29	17,66

#### 4.1.2 Ensaio em shaker 2

Neste experimento investigou-se a influência da temperatura durante a fase de indução ao se utilizar lactose (5 g/L) como indutor e o clone *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA245.

As curvas de crescimento nas diferentes temperaturas de indução testadas (30, 25 e 20°C) podem ser observadas na Figura 4.3.

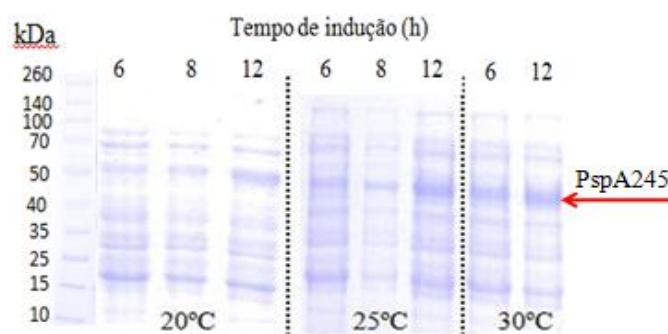




**FIGURA 4.3** - Curvas de crescimento para *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA245 nas 3 temperaturas de indução estudadas utilizando-se lactose 5 g/L.

A análise da Figura 4.3 nos permite perceber que há uma semelhança no perfil de crescimento celular nas temperaturas de 25 e 30°C e, conforme observado no item 4.1.1, na temperatura de indução de 20°C o crescimento é menos intenso.

Através da análise por SDS-PAGE (Figura 4.4) pode-se observar uma maior intensidade na banda correspondente da PspA245 nas temperaturas de 25 e 30°C após 12 horas de indução.



**FIGURA 4.4** - Acompanhamento da síntese proteica no Ensaio em Shaker 2 utilizando-se lactose como indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda

Após a quantificação, foi possível identificar a temperatura de 30°C como sendo a temperatura ótima de indução, como mostra a Tabela 4.2, já que com 12 horas de indução (correspondente a 22,25 horas de cultivo) foi possível obter 159,5 mg prot./g célula, com produtividade de 22,2 mg/L h.

**TABELA 4.2** - Concentrações e produtividades máximas de PspA245 obtidas no Ensaio em Shaker 2 ao utilizar lactose (5 g/L) como indutor.

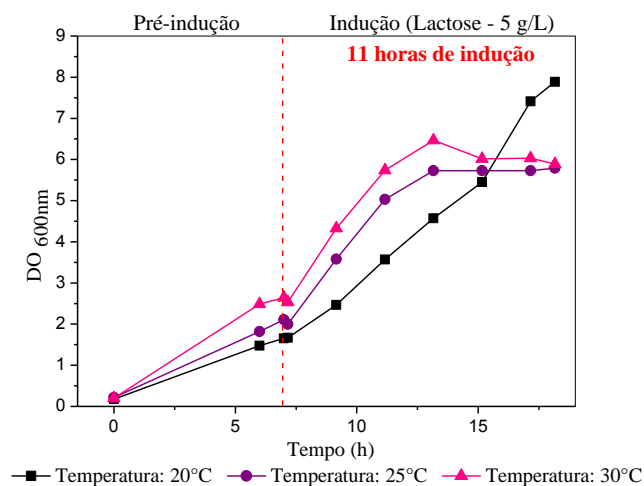
	20°C	25°C	30°C
[PspA245] máxima (mg prot./g DCW)	121 ± 5	137,5 ± 5	159,5 ± 5
Produtividade máxima (mg prot. /Lh)	13,32	19,56	22,16

A estabilidade do plasmídeo após 12 horas de indução foi similar para as temperaturas de 25 e 30°C, sendo de 76 e 73%, respectivamente, e superior para a temperatura de 20°C, na qual 90% das células permaneceram com plasmídeo. Essa diferença de estabilidade pode estar relacionada com a superexpressão da PspA245 em temperaturas mais elevadas, resultando em uma rápida resposta de estresse e mudança no metabolismo da *E. coli*, gerando a instabilidade dos plasmídeos (RINAS, 1996).

#### 4.1.3. Ensaio em shaker 3

Neste ensaio realizou-se um novo estudo da influência da temperatura durante a indução, analisando-se a produção da PspA3 e estabilidade do plasmídeo nas temperaturas de 30, 25 e 20°C durante a indução ao se utilizar lactose 5 g/L.

Na Figura 4.5 é possível observar as curvas de crescimento nas diferentes temperaturas de indução testadas.

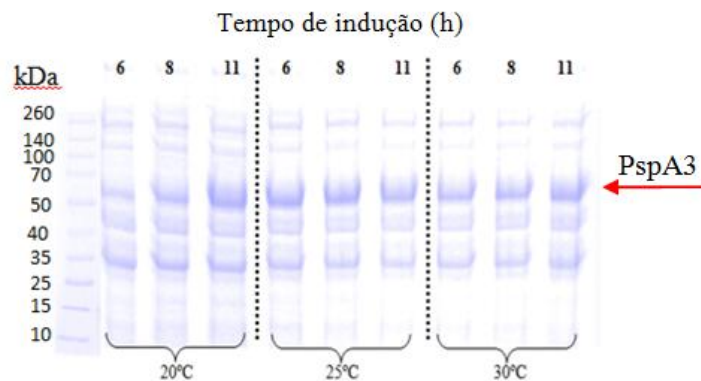


**FIGURA 4.5** - Curvas de crescimento da *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA3 nas temperaturas de indução de 30, 25 e 20°C ao longo do Ensaio em Shaker 3.

Semelhante ao observado nos ensaios em shaker com o recombinante *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA245, as curvas nas temperaturas de indução de 30 e 25°C apresentaram o mesmo perfil de crescimento. A estabilização desse crescimento, nestas temperaturas, ocorreu após 13 horas de cultivo, enquanto que a 20°C o microrganismo continuou crescendo rapidamente, ultrapassando as  $DO_{600nm}$  obtidas nas outras temperaturas após 17 horas de cultivo. Essa estabilização do crescimento observada nos cultivos a 30 e 25°C pode estar relacionada à maior formação de metabólitos tóxicos que acompanha a maior velocidade de formação de células e cujo acúmulo levou à inibição do crescimento.

Além do clone, a temperatura da fase de pré-indução também foi alterada, passando de 30°C, nos ensaios anteriores, para 37°C neste. Essa mudança permitiu a redução de 3 horas de cultivo nesta fase.

A foto do gel de eletroforese realizado com amostras do Ensaio em Shaker 3 encontra-se na Figura 4.6 e os resultados da produção da proteína ao longo do ensaio podem ser observados na Tabela 4.3.



**FIGURA 4.6** - Eletroforese das amostras obtidas no Ensaio em Shaker 3 com *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e lactose 5 g/L como indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda

Os maiores valores de rendimento e produtividade foram atingidos com a temperatura de 20°C (186 mg/g DCW e 39,8 mg/L h, respectivamente). Entretanto, essa baixa temperatura é problemática em cultivos de alta densidade celular com meio definido, já que na formulação do meio em uso estão presentes vários sais que apresentam baixa solubilidade em água e a temperatura de 20°C pode levar à precipitação desses sais. Desta forma, 25 e 30°C foram identificados como as melhores temperaturas para a fase de indução, já que ambas também apresentaram boas produtividades (32,7 e 38,6 mg/L h, respectivamente).

**TABELA 4.3** - Concentrações e produtividades máximas de PspA3 obtidas no Ensaio em Shaker 3 ao utilizar lactose (5 g/L) como indutor.

	20°C	25°C	30°C
Máximo rendimento de PspA3 (mg/g DCW)	186 ± 5	171 ± 5	168 ± 5
Produtividade máxima PspA3 (mg/Lh)	39.8	32.7	38.6

Na Tabela 4.4 observa-se a perda de plasmídeo ao longo do ensaio para as 3 temperaturas estudadas. Nota-se um comportamento semelhante para as 3 temperaturas após 6 horas de indução, com retenção de plasmídeo ligeiramente maior para a expressão conduzida na menor temperatura (20°C), como era esperado. Porém, após 10 horas de indução esse comportamento mudou e as maiores perdas de plasmídeo foram justamente observadas nas temperaturas mais baixas. A elevada instabilidade plasmidial observada a 20 e 25°C pode ter ocorrido devido à agitação ineficiente do shaker, já que foram utilizados 3 shakers distintos, cada um com um padrão de agitação diferente. A agitação ineficiente pode ter ocasionado falta de oxigênio dissolvido, favorecendo a formação de acetato que contribui para aumentar o estresse celular e conseqüentemente uma maior perda de plasmídeo.

**TABELA 4.4** - Acompanhamento da perda de plasmídeo ao longo do ensaio em Shaker 3.

Amostra	Células Resistentes (%)		
	T = 20°C	T = 25°C	T = 30°C
Antes da Indução		80	
6 horas após a indução	91	81	82
10 horas após a indução	60	48	80

Levando em consideração que o crescimento é favorecido a 30°C, esta temperatura foi empregada durante a indução com lactose nos cultivos em biorreator.

## 4.2. Cultivos em Biorreator

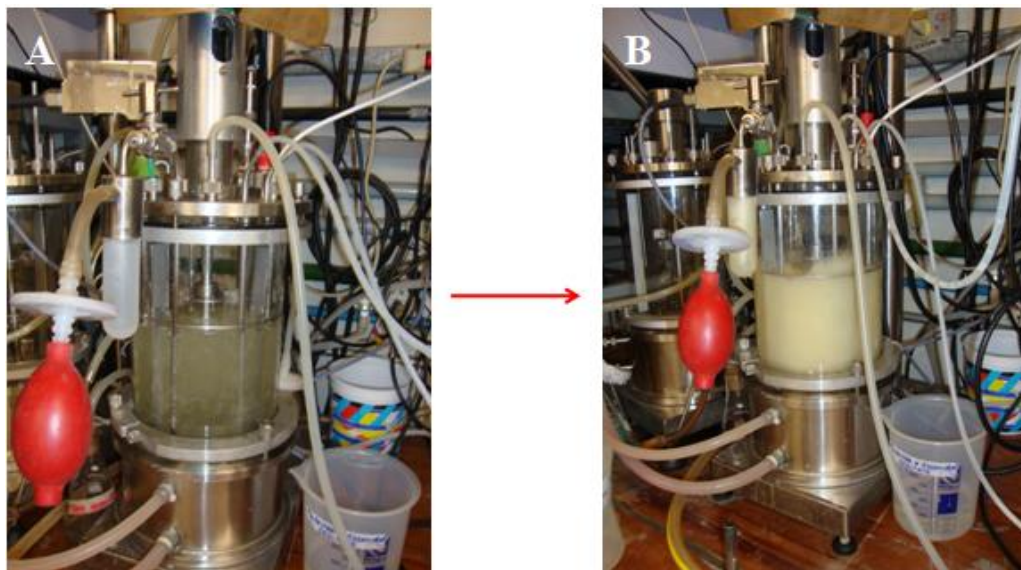
### 4.2.1. Estudo da influência da temperatura e da composição do meio em cultivos de alta densidade celular (HCD) com glicerol como fonte de carbono.

#### 4.2.1.1. Cultivo 1 - Implementação da metodologia de cultivos de *E. coli* em meio definido HCD descrito na literatura com glicerol como fonte de carbono

O objetivo deste cultivo foi testar as condições de cultivo de *Escherichia coli* recombinante em HCDC estabelecidas na literatura, utilizando um meio definido com glicerol como fonte de carbono e energia ao invés da glicose, frequentemente empregada.

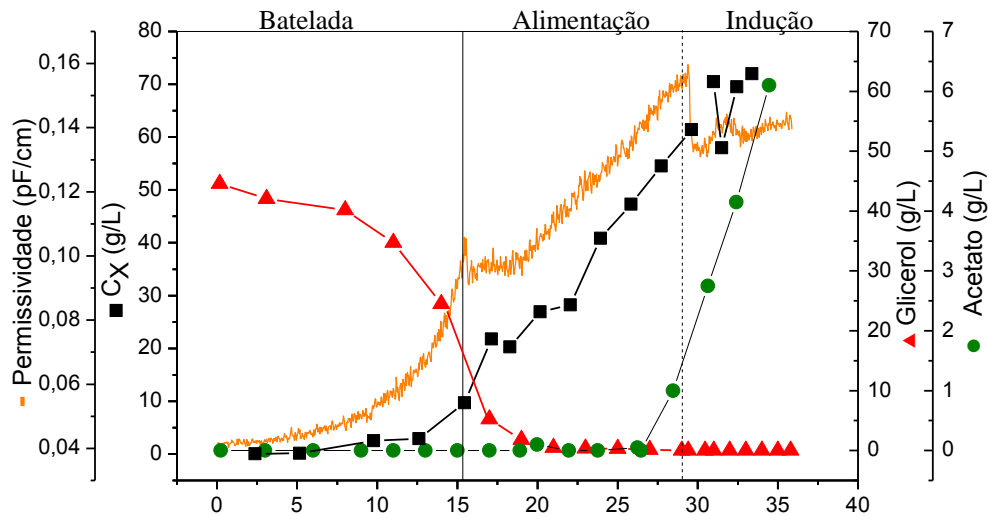
A fase de alimentação começou após 15,8 horas de cultivo e foi muito eficaz na manutenção de uma concentração de glicerol baixa durante o restante do cultivo, onde a velocidade específica de crescimento pré-determinada ( $\mu_{set}$ ) foi de  $0,1 \text{ h}^{-1}$ .

A modificação na densidade do meio ao longo do cultivo pode ser observada na Figura 4.7



**FIGURA 4.7-** Biorreator utilizado nos experimentos. A) Início do cultivo, Cx de aproximadamente 0,3 g/L. B) 27 horas de cultivo, Cx de aproximadamente 54 g/L.

Após 34 horas de cultivo foi possível obter 72 g célula/L, como mostra a Figura 4.8, fazendo com que a produtividade deste cultivo fosse de 2,1 g/L h. Também pode-se perceber uma similaridade no perfil das curvas de crescimento celular e permissividade, indicando que a permissividade obtida on-line a partir do sensor de biomassa é uma medida confiável para inferência da concentração celular.



**FIGURA 4.8** - Resultados do Cultivo 1: Formação de biomassa, dados de permissividade on-line, consumo de substrato e produção de acetato no cultivo de alta densidade celular de *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 utilizando o meio proposto por Seeger *et al.* (1995). A alimentação iniciou com um  $\mu_{set}$  pré determinado de  $0,1 \text{ h}^{-1}$  após 15,8 horas de batelada. Após 29,5 adicionou-se IPTG e a velocidade de crescimento foi reduzida para  $0,08 \text{ h}^{-1}$ .

A partir dos dados obtidos de concentração celular e de glicerol foi possível calcular a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) no cultivo e o fator de conversão de substrato à células ( $Y_{X/S}$ ), sendo estes  $0,37 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  e  $0,44 \pm 0,05 \text{ g c\acute{e}l/g}$  glicerol, respectivamente.

Durante toda a fase de batelada não houve produção de acetato, porém após cerca de 28 horas de cultivo uma formação extremamente acentuada pode ser observada, chegando a uma concentração de  $6,0 \text{ g/L}$ . Este resultado indicou que a formação de acetato poderia estar relacionada à utilização de um meio de cultivo desbalanceado, uma vez que não houve acúmulo de glicerol na cultura nem limitação de oxigênio.

#### 4.2.1.2. Cultivo 2 – Otimização dos meios de cultivo

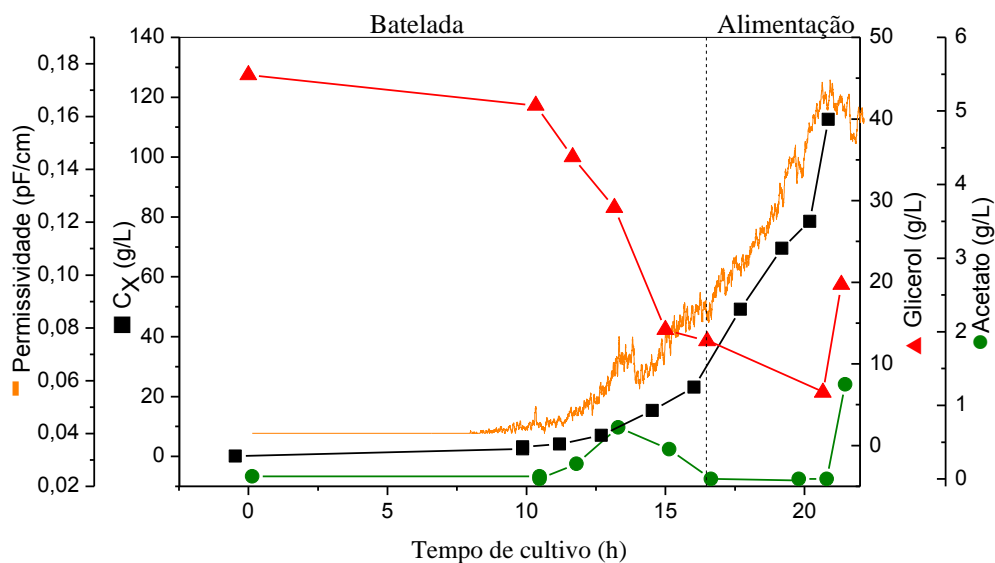
Estudos realizados por Korz *et al.* (1995) relataram que o fosfato pode se tornar um fator limitante ao crescimento celular e a escassez desse nutriente pode acarretar a formação de acetato.

Desta forma, decidiu-se introduzir os sais  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  no meio de alimentação a fim de minimizar ou até mesmo eliminar a formação de acetato observado no

Cultivo 1. Além disso, a concentração de tiamina foi aumentada em 10 vezes nos meios de batelada e alimentação, com o intuito de melhorar a assimilação do glicerol pela célula.

O Cultivo 2 foi realizado com a definição do perfil de alimentação exponencial com um valor próximo à velocidade de crescimento específica máxima atingida durante a fase de batelada no Cultivo 1 ( $\mu_{\text{set}} = 0,3 \text{ h}^{-1}$ ).

A Figura 4.9 mostra os valores de concentração celular, juntamente com os dados de permissividade, de consumo de glicerol e de formação de acetato ao longo do Cultivo 2.



**FIGURA 4.9** - Resultados do Cultivo 2: Crescimento celular, permissividade, consumo de glicerol e produção de acetato durante o cultivo de batelada-alimentada de *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 utilizando glicerol como fonte de carbono no Cultivo 2. Alimentação realizada com  $\mu_{\text{set}}$  pré determinado de  $0,3 \text{ h}^{-1}$  iniciada em 16,5 horas de cultivo. A concentração celular foi calculada a partir da  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de acordo com curva de calibração:  $C_x = 0,49 * \text{DO}_{600\text{nm}}$ .

Com as modificações nos meios de batelada e alimentação foi possível reduzir bastante a formação de acetato, o qual alcançou uma concentração máxima de 1,2 g/L. Além disso, a otimização do meio proporcionou um aumento significativo na produtividade em biomassa, já que em apenas 21,5 horas de cultivo obteve-se 116 g/L, fazendo com que a produtividade passasse de 2,1 g/L h (Cultivo 1) para 5,4 g/L h neste cultivo.

Neste cultivo houve acúmulo de glicerol (cerca de 20 g/L) causado, provavelmente, pelo elevado valor de  $\mu_{\text{set}}$ . No entanto, essa alta concentração de glicerol não desencadeou a formação de acetato nem ocasionou uma queda no crescimento celular.

Outro fato muito interessante neste cultivo foi o elevado valor de  $Y_{X/S}$  atingido. No cultivo anterior (item 4.2.1) e nos cultivos anteriormente realizados por Carvalho *et al.* 2011, que utilizou o mesmo clone e o mesmo meio, os valores de  $Y_{X/S}$  obtidos foram entre 0,30 a 0,44 g célula/g glicerol, já no Cultivo 2, após o aumento da concentração de tiamina nos meios de cultivo, obteve-se um  $Y_{X/S}$  de 0,56 g célula/g glicerol, acarretando em um aumento de 28% em relação ao Cultivo 1. Yoon *et al.* (2003), através de análises conjuntas do transcriptoma e proteoma da *E. coli* em cultivos de alta densidade em meio definido com a glicose como fonte de carbono, observaram que os genes das vias de biossíntese de tiamina têm sua transcrição aumentada (*up-regulated*) durante toda a batelada alimentada e mais ainda no final do cultivo, o que indica que a demanda por tiamina é intensificada nessas fases do cultivo, justificando a adição de maiores concentrações dessa vitamina no meio. Nesse mesmo estudo, observa-se que os genes que são ativados em condições de falta de fosfato têm a transcrição muito aumentada próximo ao fim do cultivo, desta forma, fosfato deve ser adicionado no início ou durante o cultivo para se atingir maiores concentrações celulares.

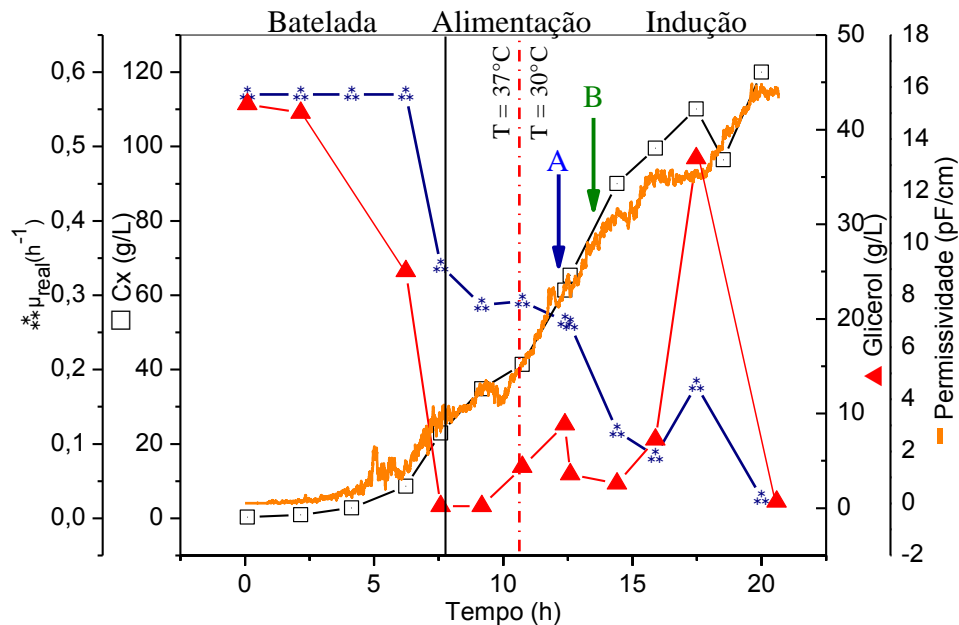
#### 4.2.1.3. Cultivo 3 – Aprimoramento do procedimento de cultivo em biorreator.

Neste cultivo outras modificações foram feitas no meio de batelada com o objetivo de balanceá-lo, já que o protocolo de Korz *et al.* (1995) sugere 30 g/L de glicerol e neste trabalho optou-se por se estender a fase de batelada iniciando-se o cultivo com 40 g/L de glicerol (Tabela 3.3). Analisando-se os resultados do Cultivo 2, percebeu-se que ao se utilizar glicerol como fonte de carbono e um meio de cultivo balanceado a formação de acetato se tornou mínima. Desta forma, a temperatura durante a fase de crescimento foi alterada, passando de 30°C nos cultivos anteriores (protocolo de cultivo descrito para glicose como fonte de carbono, LEE, 1996) para 37°C neste (temperatura ótima de crescimento da *E. coli*).

Nas Figuras 4.8 e 4.9 pode-se constatar que o perfil da curva de permissividade segue semelhante ao da curva de concentração celular durante praticamente todo o cultivo. Por isso, o controle da vazão da alimentação passou a ser baseado na estimativa on-line da velocidade específica de crescimento a partir de dados da permissividade, atualizando-se automaticamente o valor do  $\mu_{set}$  (Horta *et al.* 2011).

A Figura 4.10 mostra os valores de concentração celular, a curva de permissividade, consumo de glicerol e os valores de velocidade específica de crescimento real ao longo do Cultivo 3.





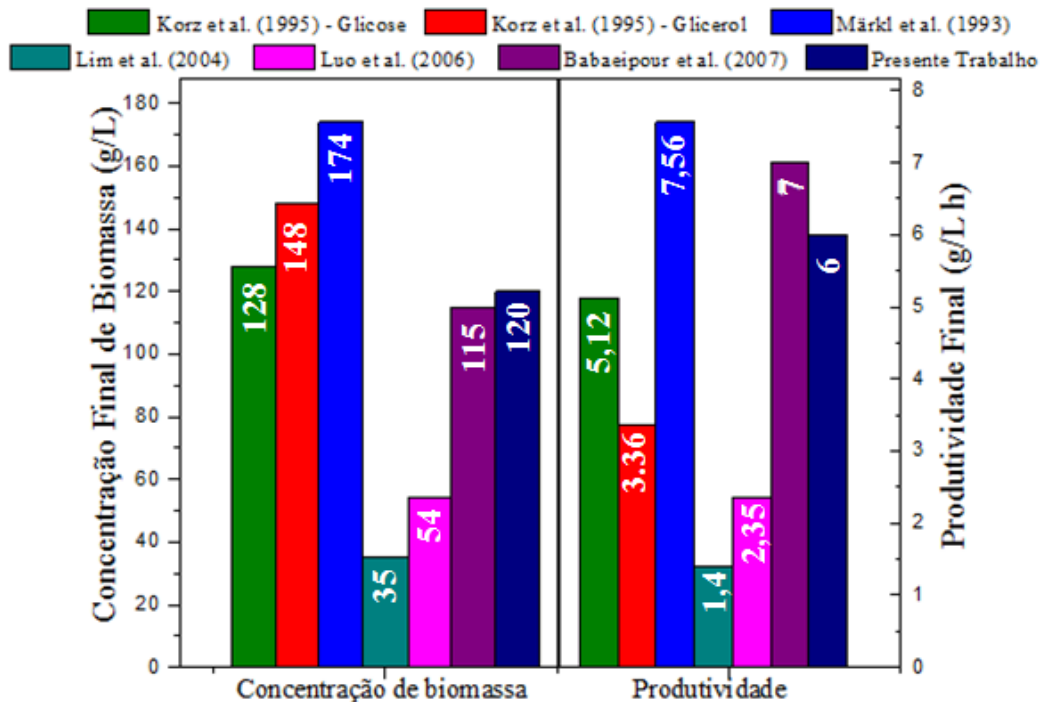
**FIGURA 4.10** - Resultados do Cultivo 3: Crescimento celular, permissividade, consumo de glicerol e faixa de variação do  $\mu$  durante o cultivo de batelada-alimentada do recombinante *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 utilizando glicerol como fonte de carbono no Cultivo 3. Alimentação realizada com controle automático da velocidade de crescimento específico iniciada em 7,8 horas de cultivo. A concentração celular foi calculada a partir da  $DO_{600nm}$  de acordo com curva de calibração:  $Cx = 0.49 * DO_{600nm}$ . A mudança de temperatura é indicada pela linha tracejada vermelha.

No cultivo 3 a formação de acetato foi nula, mesmo havendo um forte acúmulo de glicerol, que chegou a uma concentração de aproximadamente 37 g/L durante a fase de alimentação. Esse resultado reforça a vantagem de se utilizar glicerol como fonte de carbono desde que acompanhado por uma formulação balanceada de meio de cultivo, contendo todos os nutrientes necessários para um bom funcionamento do metabolismo da célula.

Observando os valores de velocidade específica de crescimento real na Figura 4.10 obtidos através da equação 6, constata-se que o  $\mu$  é definido pela concentração de glicerol. Quando essa concentração está em níveis abaixo de 10 g/L, nota-se uma queda na velocidade de crescimento, mas se a concentração de glicerol encontra-se a cima deste valor é observa-se um aumento no  $\mu$ . Também é possível concluir que durante a fase de indução há uma diminuição nos valores de velocidade de crescimento, uma vez que o metabolismo está direcionado para a produção da proteína.

O aumento da temperatura durante a fase de crescimento proporcionou um maior  $\mu_{m\acute{a}x}$  no valor de  $0,57 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ , equivalente a um aumento de quase 1,6 vezes, comparado aos valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  dos cultivos anteriores conduzidos a 30 °C, sem que houvesse formação de acetato.

Após as mudanças no meio de batelada e no de alimentação (Cultivo 2), na estratégia para o controle do fluxo da alimentação e o aumento da temperatura na fase de crescimento foi possível realizar um cultivo de apenas 20 horas e atingir uma concentração celular de 120 g/L, fazendo com que a produtividade em biomassa desse cultivo fosse extremamente alta, de 6,0 g/L.h, superior a grande maioria obtida em cultivos de alta densidade celular de *E. coli*, como pode ser observado na Figura 4.11.



**FIGURA 4.11** - Comparação entre concentração de biomassa e produtividade em cultivos de alta densidade celular obtidas na literatura e neste trabalho

Nota-se que os melhores resultados em concentração celular e produtividade foram obtidos por Märkl *et al.* (1993), chegando a uma concentração próxima à concentração celular máxima teórica estimada de 200 g/L (LEE *et al.* 1996). Porém, como já mencionado no item 2.4.3, para obterem tal resultado recorreram a um modo de operação de difícil execução que é o da perfusão. Outros bons resultados apresentados na Figura 4.11 foram obtidos por Korz *et al.* (1995) que comparam o desempenho da glicose e do glicerol como fonte de carbono e em ambos os cultivos chegaram a concentrações celulares elevadas, porém necessitaram de um longo tempo para chegarem nesses valores (25 horas com glicose e 44 horas com glicerol) fazendo com que as produtividades obtidas fossem significativamente menores do que a obtida neste presente trabalho.

Babaeipour *et al.* (2007) também apresentam resultados bastante significativos para cultivos em alta densidade celular ao utilizar meio definido com glicose como fonte de carbono. Os autores empregaram uma estratégia de alimentação exponencial modificada para cultivos de *E. coli* BL21(DE3) mantendo uma velocidade específica de crescimento celular entre 0,55 a 0,4 h<sup>-1</sup> antes da indução, com uma formação de acetato abaixo de 5 g/L, por meio de monitoramento *quasi on-line* (amostragem de 10 em 10 minutos) da concentração de glicose e controle manual da vazão de alimentação para manter a concentração de glicose nos níveis desejados. Ao utilizar esta estratégia Babaeipour *et al.* (2007) conseguiram atingir uma concentração celular máxima de 115 g/L em apenas 16,5 horas, obtendo uma elevada produtividade em biomassa (7 g/L h).

#### **4.2.2 Estratégias de indução em biorreator**

A maioria dos cultivos de alta densidade celular de *E. coli* tem como principal objetivo a produção de proteínas heterólogas. Para tanto, quando a *E. coli* está sob o controle do promotor *lac*, a estratégia de indução convencional através da adição de pulsos de IPTG ou lactose após se obter a concentração de biomassa desejada é normalmente utilizada. Porém, estas estratégias usuais foram desenvolvidas, originalmente, para experimentos em frasco agitado, não sendo totalmente efetivas para cultivos em biorreator, havendo a necessidade de se investigar novas estratégias.

A produção da PspA3 foi o foco principal dos cultivos realizados neste trabalho. Assim, testou-se diferentes estratégias de indução, alterando o indutor, a sua concentração, o momento de se iniciar a indução, dentre outros parâmetros.

A primeira tentativa para produzir PspA3 em HCDC em biorreator ocorreu no Cultivo 1. Um pulso de IPTG foi aplicado após 29,5 horas de cultivo e logo em seguida pode ser observada uma diminuição da permissividade causada pela perda de viabilidade associada à expressão do gene heterólogo, como mostra a Figura 4.8. Desta forma, durante a fase de indução, a curva de permissividade deixou de apresentar a mesma tendência da curva de formação de biomassa. A perda de viabilidade celular também foi constatada pela análise de retenção de plasmídeo que passou de 96% (momento antes da indução) para 79% (6,4 horas após a indução). Análises de SDS-PAGE não foram capazes de detectar a produção da PspA ao longo do cultivo. No entanto, uma análise de Western blot realizada no Instituto Butantan confirmou sua produção, porém em baixa concentração. Este fato, provavelmente, está

relacionado com a estratégia de indução adotada, que foi diferente daquela aplicada com sucesso por Carvalho *et al.* (2011) usando glicerol como fonte de carbono, onde a indução tinha sido realizada com um pulso de IPTG (0,5 mM) somado a 20 g/L de lactose e um  $\mu_{\text{set}}$  de 0,05 h<sup>-1</sup>. Além disso, a baixa produção de PspA também está relacionada com a elevada formação de acetato durante a fase de alimentação, já que o acetato é o principal inibidor da formação de biomassa e da síntese protéica.

No Cultivo 2 não houve fase de indução, pois o experimento teve que ser interrompido após 21 horas de cultivo devido a uma adição acidental de base que elevou o pH para 10.

Já os Cultivos 3 e 4 apresentaram resultados muito interessantes com relação à produção da PspA3, merecendo destaque neste trabalho.

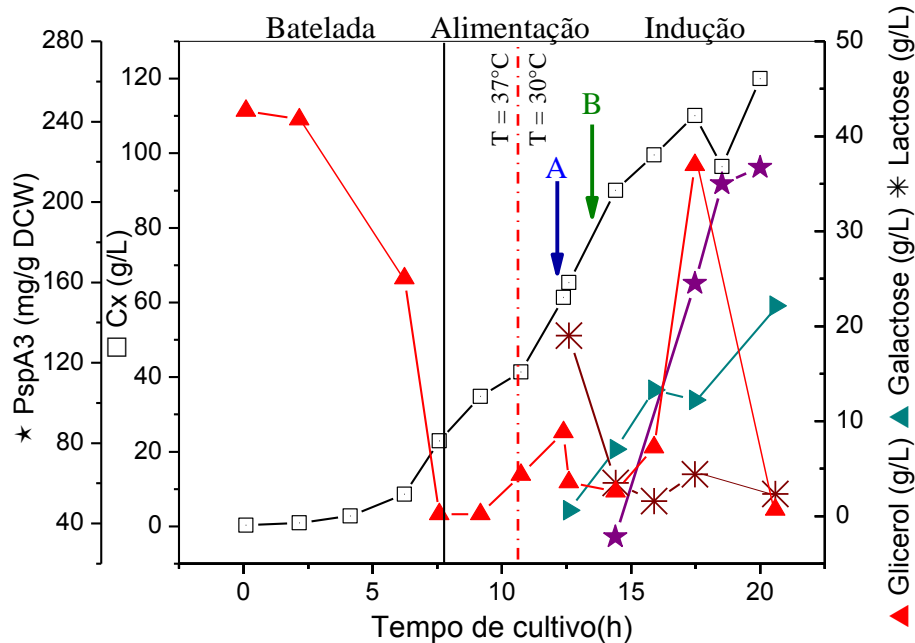
#### **4.2.2.1. Cultivo 3 – Desenvolvimento de uma estratégia de indução com lactose**

Vários estudos recentes focam o desenvolvimento de estratégias de indução utilizando lactose.

Como já mencionado anteriormente, a lactose apresenta inúmeras vantagens em comparação com o IPTG, principalmente por ser natural, não-tóxica e barata. Por estas razões, ela se torna o indutor mais adequado para a produção de proteínas recombinantes em escala industrial. No entanto, a implementação de uma estratégia de indução viável é uma tarefa difícil, pois a lactose é consumida como fonte de carbono, o que provoca a diminuição sua concentração ao longo da fase de indução. Além disso, apresenta baixa solubilidade em água e como é necessária uma quantidade razoavelmente grande deste substrato para que haja uma boa produção da proteína de interesse, a sua adição exclusivamente como pulso é operacionalmente difícil.

O Cultivo 3 foi realizado em regime de batelada-alimentada com uma alimentação exponencial e foi dividido em quatro fases (como indicado na Figura 4.12). Após o esgotamento completo de glicerol durante a fase de batelada iniciou-se a alimentação com o meio descrito na Tabela 3.3 (meio de alimentação 1 – cultivo 3 e 4) e com o  $\mu_{\text{SET}}$  sendo ajustado automaticamente. Em 10,7 horas de cultivo, a temperatura foi reduzida de 37°C para 30°C, seguindo os resultados obtidos anteriormente nos experimentos em frasco agitado para a expressão da PspA3 (item 4.1.3). A fase de indução foi iniciada com a adição de um pulso de lactose (20 g/L) quando a biomassa atingiu cerca de 50 g/L (indicado pela seta A na Figura 4.12). Uma hora após a adição do pulso de lactose iniciou-se a alimentação contínua do

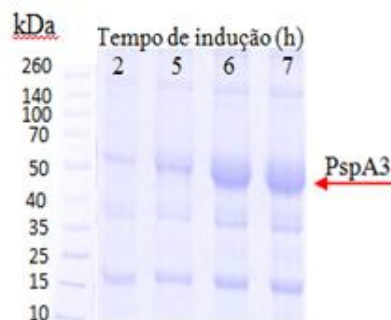
indutor (indicada pela seta B na Figura 4.12), utilizando, para tanto, o meio de alimentação 2 (semelhante ao meio de alimentação 1, substituindo-se os 800 g/L de glicerol pela mistura de 400 g/L de glicerol e 80 g/L de lactose).



**FIGURA 4.12** – Resultados do Cultivo 3: crescimento e consumo de substrato e produção de proteína durante o cultivo em batelada-alimentada do recombinante *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 usando glicerol como fonte de carbono e uma estratégia diferencia de indução com lactose. Alimentação realizada com controle automático da velocidade de crescimento específico após 7,8 horas com o meio de alimentação Médio 1. A) Indução iniciada pela adição de 20 g/L de lactose em 12,5 horas. B) Em 13,12 horas, inicia-se alimentação com meio de alimentação 2, contendo lactose (80 g/L) e glicerol (400 g/L). Mudança na temperatura de cultivo indicada pela linha tracejada em vermelho.

Esta estratégia diferenciada de indução foi adotada com o intuito de acelerar a síntese protéica através do pulso de lactose e manter a concentração do indutor a um nível mínimo através da alimentação contínua de lactose.

A produção de proteína ao longo do Cultivo 3 foi analisada por eletroforese (Figura 4.13) e quantificada através do software Image J (Tabela 4.5).



**FIGURA 4.13** - Eletroforese das amostras obtidas no Cultivo 3 com *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e uma estratégia de indução composta por pulso de 20 g/L de lactose seguido de uma alimentação contínua do indutor. Padrões de peso molecular de proteína na esquerda

**TABELA 4.5** – Acompanhamento da produção de PspA3 ao longo do Cultivo 3. Valores de concentração e produtividade da PspA.

Tempo de indução (h)	Tempo de Cultivo (h)	PspA (%)	[proteína] (mg/g célula)	Concentração Celular (g/L)	Produtividade [g prot/(L.h)]
2	14,40	10	32,6	91,9	0,20
5	17,47	29	159,5	110,0	1,00
6	18,52	38	209,0	96,4	1,09
7	20,00	39	217,25	120,0	1,30

O fornecimento contínuo de lactose mostrou-se um método eficaz para o aumento da produção de PspA3 e permitiu que a fase de indução fosse de apenas sete horas, obtendo-se 217 mg/g célula, o equivalente a 26,1 g proteína/L.

A concentração de lactose permaneceu sempre em níveis baixos, como desejado, durante toda a fase de indução (Figura 4.12). A lactose foi progressivamente convertida em glicose, que foi completamente consumida pelas células, enquanto que a galactose foi sendo acumulada uma vez que a *E. coli* BL21 não é capaz de assimilar este açúcar.

Pode-se observar um forte acúmulo de glicerol no meio da fase de indução, como consequência da preferência das células pela a glicose obtida a partir da lactose. Este resultado indica que a formulação do meio de alimentação 2 poderia ser melhorada, definindo uma relação de lactose/glicerol ligeiramente superior ao valor de 0,4 (m/m) empregada no cultivo 3. Esse forte acúmulo de glicerol não causou problemas para a síntese da PspA3, fato que não poderia ocorrer caso a glicose fosse utilizada como fonte de carbono, pois quando em excesso, a glicose reprime o promotor *lac* (GÖRKE e STÜLKE, 2008) e impede a utilização de lactose pelas células, o que por sua vez inviabiliza o emprego de lactose como indutor. Esta é, portanto, uma outra vantagem da utilização do glicerol como fonte de carbono, pois o glicerol não reprime o operon *lac*.

A Tabela 4.6 mostra a retenção de plasmídeo ao longo do Cultivo 3, onde após 8 horas de indução houve uma grande perda de plasmídeo (50%), que pode ter sido causada pela elevada temperatura de indução utilizada (30°C) e pela estratégia mais agressiva.

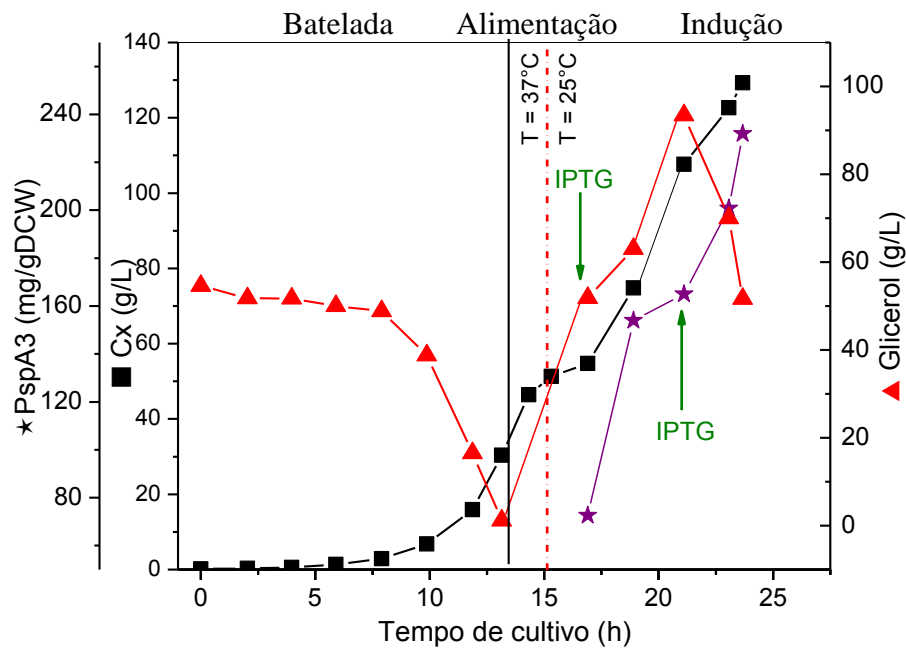
**TABELA 4.6** - Acompanhamento da perda de plasmídeo durante o Cultivo 3.

Células com plasmídeo (%)	
Antes da Indução	100
4 horas de indução	98
8 horas de indução	50

#### 4.2.2.2. Cultivo 4 – IPTG como indutor da síntese de PspA3

O Cultivo 4 foi realizado com o intuito de comparar a produtividade da PspA3 ao utilizar uma estratégia mais convencional de indução. Para tanto, neste cultivo de alta densidade celular em biorreator, utilizou-se um perfil de alimentação pré-definido ( $\mu_{\text{set}} = 0,40 \text{ h}^{-1}$ ) e IPTG como indutor.

A alimentação foi iniciada após 13 horas de cultivo com a adição do meio de alimentação 1 (Tabela 3.3 - Cultivo 3 e 4), como mostra a Figura 4.14. Um pouco antes da indução, a temperatura foi diminuída de 37°C (durante a fase de crescimento) para 25°C, seguindo os resultados obtidos anteriormente nos experimentos em frasco agitado para a expressão de proteína (item 4.1.1). Ao se atingir uma concentração celular de 50 g/L adicionou-se IPTG (1mM), iniciando a fase de indução. Após 4 horas de indução, um novo pulso de IPTG (0,5 mM) foi aplicado para garantir que houvesse uma elevada produção de PspA3.

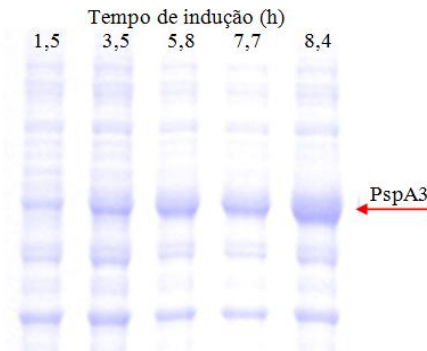


**FIGURA 4.14** - Resultados do Cultivo 4: crescimento, consumo dos substratos e produção da PspA3 durante o cultivo de alta densidade celular em batelada-alimentada de *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3. Alimentação com  $\mu_{\text{set}}$  pré-definido de  $0,4 \text{ h}^{-1}$  iniciada com 13 horas de cultivo. Indução por adição de IPTG 1 mM em  $t = 16 \text{ h}$  e 0,5 mM em  $t = 20 \text{ h}$ . Dados de permissividade não disponíveis. Cx calculado a partir da densidade óptica:  $Cx = 0,49 * DO_{600\text{nm}}$ . Mudança na temperatura de cultivo indicada pela linha tracejada em vermelho.

Analisando a Figura 4.14 é possível observar que um único pulso de IPTG (estratégia convencionalmente utilizada) foi insuficiente para proporcionar uma boa produção protéica. Quando o segundo pulso de IPTG foi adicionado, a produção de proteína começou a

aumentar rapidamente de novo, chegando a uma concentração de 230 mg/g célula após 3 horas. Neste cultivo também houve um elevado acúmulo de glicerol, fato que não afetou a formação da proteína nem provocou a produção de acetato.

Através da análise de eletroforese (Figura 4.15) e posterior quantificação (Tabela 4.7) pode-se estimar a concentração máxima obtida neste cultivo, sendo de 232 mg/g célula.



**FIGURA 4.15** - Eletroforese das amostras obtidas no Cultivo 4 com *E. coli* BL21 (DE3)pET37b+/PspA3 e uma estratégia de indução composta por dois pulsos de IPTG durante a fase de indução.

**TABELA 4.7** - Acompanhamento da produção de PspA3 ao longo do Cultivo 4. Valores de concentração e produtividade da PspA3.

Tempo de indução (h)	Tempo de Cultivo (h)	PspA (%)	[proteína] (mg/g célula)	Concentração máxima celular (g/L)	Produtividade [g prot./ (L.h)]
1,5	16,9	13	72,6	53,5	0,16
3,5	18,9	28	154	73,1	0,60
5,8	21,11	31	165	105,3	0,82
7,7	23,07	36	200,75	120,0	1,04
8,4	23,67	30	231,91	126,5	1,24

A estabilidade do plasmídeo também foi avaliada neste cultivo e após 7 horas de indução 65% das células permaneceram com o plasmídeo.

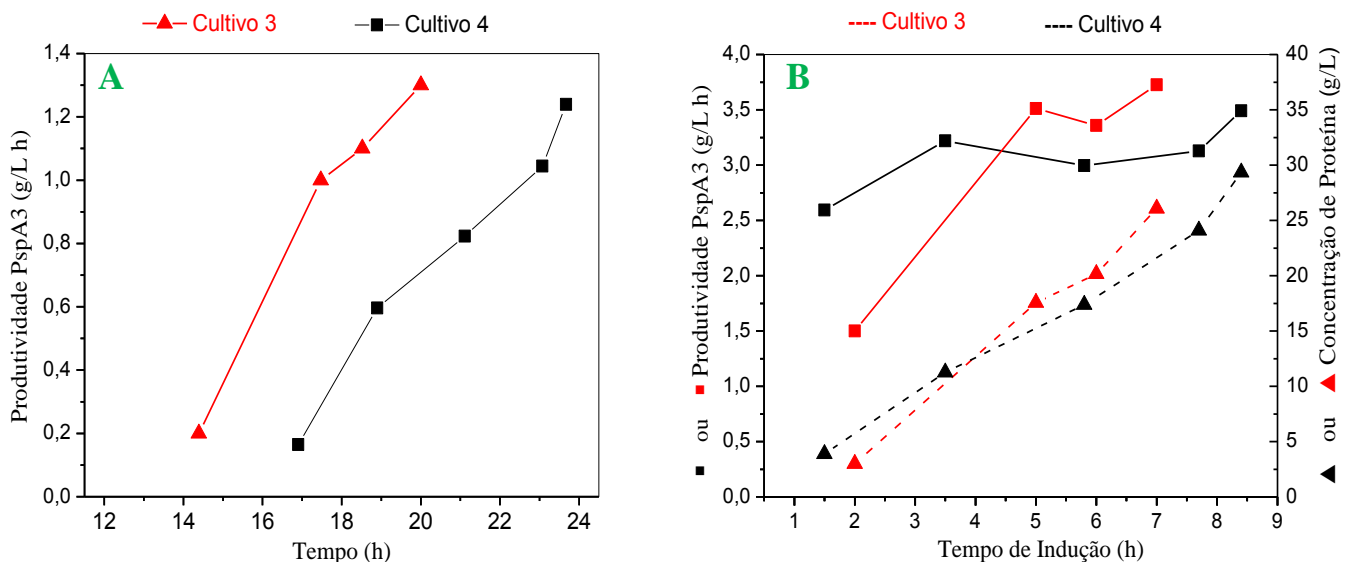
#### 4.2.2.3. Indução com lactose (Cultivo3) vs Indução com IPTG (Cultivo 4)

Duas estratégias de indução foram avaliadas neste trabalho, uma nova estratégia, composta de um pulso de lactose somado a uma alimentação contínua da mesma, e outra estratégia mais usual, utilizando-se pulsos de IPTG.



Para avaliar a influência do tempo nos perfis de produção da PspA3, a produtividade pode ser calculada considerando-se o tempo de cultivo total (Figura 4.16-A) ou apenas o tempo de indução (Figura 4.16-B).

A Figura 4.16-A mostra que a produtividade aumentou com o tempo total de cultivo ao utilizar lactose ou IPTG como indutores, sendo resultado do acúmulo intracelular da proteína que ocorre ao longo da fase de indução. Também é possível notar que a produtividade com lactose foi superior quando comparada com a produtividade com IPTG. No entanto, essa menor produtividade com IPTG foi causada principalmente pela longa fase *lag* no início do Cultivo 4. Considerando apenas o tempo de indução no cálculo da produtividade (Figura 4.16-B) observa-se que as curvas de produtividade se tornam mais próximas. Na verdade, a Figura 4.16-B confirma que ambos os protocolos de indução utilizados apresentaram padrões de produção protéica muito próximos. Como esperado, a concentração de proteína aumentou continuamente durante o período de indução, independente do indutor utilizado. No Cultivo 4, a produtividade de PspA3 praticamente estabilizou-se após a usual 4 horas de indução. No Cultivo 3, como consequência da nova estratégia empregada, a estabilização foi observada após apenas 5 horas de indução, tempo considerado relativamente curto quando comparado às 8 horas de indução geralmente utilizadas quando o indutor é a lactose.



**FIGURA 4.16** – Acompanhamento da produção de proteína nos Cultivos 3 e 4. A) Perfis da produtividade de PspA3 nos cultivos 3 e 4 levando em consideração o tempo total de cultivo. (Indução no Cultivo 3 iniciada com um pulso de lactose 20 g/L em 12,5 horas de cultivo e no Cultivo 4 foi iniciada com um pulso de IPTG 1 mM após 16 horas de cultivo). B) Produtividade e concentração de proteína calculadas a partir do tempo correspondente de indução.

Os resultados obtidos mostram que a produção de proteína alcançada foi similar em ambos os cultivos, desta forma, a estratégia adotada para indução com lactose

merece um grande destaque neste trabalho, já que através dela foi possível alcançar concentrações elevadas de proteína heteróloga utilizando-se um substrato barato e não-tóxico.

Para fins comparativos, a Tabela 4.8 apresenta alguns resultados promissores para a produção de proteínas heterólogas utilizando *E. coli* BL21 (ou estirpes semelhantes), sob o controle do operon *lac*, sendo a maioria deles obtidos com IPTG como indutor. Pode-se observar que a maioria dos valores reportados na literatura para a produtividade de proteína encontra-se na faixa de 0,1 a 0,16 g/L h, sendo significativamente inferiores às produtividades obtidas neste trabalho (1,3 g PspA3/L h e 1,2 g PspA3/L h, Cultivo 3 e 4, respectivamente). A melhor produtividade de proteína foi de 2,6 g/L h relatada para a produção de interferons humanos, sendo esta uma molécula de aproximadamente 20 kDa também produzida em um HCDC de alta produtividade em biomassa.

**TABELA 4.8** - Produtividades em biomassa e protéica em cultivos de alta densidade celular de *Escherichia coli* recombinante relatados na literatura e obtidos neste trabalho.

Linhagem hospedeira	Meio de Cultivo	Tempo Cultivo (h)	Produtividade em Biomassa (g/L h)	Produto	Indutor	Produtividade de Protéica (g/L h)	Ref.
BL21 (DE3)	Definido*	32	1,75	hIFN- $\gamma$	IPTG	0,162	KHALILZADEH <i>et al.</i> 2004
BL21 (DE3)	Definido <sup>§</sup>	40	1,52	hIFN- $\gamma$	IPTG	0,138	KHALILZADEH <i>et al.</i> 2004
TGI	Definido*	~ 35	~ 3,90	bFGF	IPTG	~ 0,030	SEEGER <i>et al.</i> 1995
BL21 (DE3)	Complexo*	34	~ 1,03	hsBLyS	Lactose	0,110	LI <i>et al.</i> 2006
BL21 (DE3)	Definido*	29,5	2,10	rfPspA3	IPTG	0,12	CARVALHO <i>et al.</i> 2011
BL21 (DE3)	Definido <sup>§</sup>	33	1,90	rfPspA3	IPTG	0,09	CARVALHO <i>et al.</i> 2011
BL21 (DE3)	Definido*	16,5	7,00	hIFN- $\gamma$	IPTG	2,57	BABAEIPOUR <i>et al.</i> 2007
BL21 (DE3)	Definido <sup>§</sup>	20	6,00	rfPspA3	Lactose	1,3	Presente trabalho
BL21 (DE3)	Definido <sup>§</sup>	23,7	5,34	rfPspA3	IPTG	1,2	Presente trabalho

\* Glicose como fonte de carbono

<sup>§</sup> Glicerol como fonte de carbono

A alta concentração de proteína atingida neste trabalho, cerca de 25 g/L, é muito superior às concentrações de proteínas obtidas em outros estudos, que se encontram na faixa de 5 a 6 g/L. É importante ressaltar que o tamanho da proteína e sua estrutura devem ser considerados para uma comparação mais completa, por exemplo, a PspA3, produzida neste trabalho, tem uma massa molar de aproximadamente 50 kDa, sendo portanto maior do que os interferons humanos listados na Tabela 4.8 que têm massas molares próximas a 20 kDa. Dessa forma, a obtenção da PspA3, levando em consideração sua complexidade estrutural, é

um processo mais complicado, fazendo com que o resultado, aqui obtido seja ainda mais relevante.

Carvalho *et al.* (2011) cultivaram o mesmo clone de *E. coli* produzindo o mesmo fragmento do gene da PspA3, sendo este um ótimo trabalho de referência para comparação com o atual. Os excelentes resultados de concentrações de proteína, de rendimentos e produtividades obtidos neste trabalho estão relacionados principalmente a três fatores principais: i) aumento da produtividade em biomassa, resultado da utilização de um meio de cultivo bem balanceado e maiores velocidades específicas de crescimento; ii) estratégias de indução adotadas que permitiram a diminuição do tempo de indução e o aumento da concentração final de proteína; iii) utilização do glicerol como fonte de carbono, que permitiu atingir elevadas concentrações celulares sem que houvesse formação de acetato.

### 4.3. Discussão final

Finalizando a análise dos resultados gerados neste trabalho, na Tabela 4.9 é possível observar a evolução dos cultivos aqui realizados e também comparar estes resultados, em termos de biomassa e produção de proteína, com os obtidos por Cavalho *et al.* (2011) ao utilizar glicose como fonte de carbono.

**TABELA 4.9** – Parâmetros cinéticos, produção de biomassa e produtividade celular e protéica para Cultivos 1- 4, comparados aos resultados obtidos por Carvalho *et al.* (2011) ao utilizar glicose como fonte de carbono(\*). Valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  e  $Y_{X/S}$  estimados a partir de dados coletados durante os cultivos na fase de batelada.

	Cultivo com Glicose*	Cult. 1	Cult. 2	Cult. 3	Cult. 4
Temperatura (bat. e alimentação)	30°C	30°C	30°C	37°C	37°C
Temperatura (indução)	30°C	30°C	-	30°C	25°C
Biomassa Final $C_x$ (g/L)	62	72	116	120	126
Tempo de Cultivo (h)	29,5	34	21,5	20	23,7
Produtividade Celular (g/L h)	2,1	2,1	5,4	6,0	5,3
[Acetato] $_{m\acute{a}x}$ (g/L)	4,5	6,0	0,7	0,0	0,0
Fator de conversão $Y_{X/S}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	0,35	0,44 ± 0,05	0,56 ± 0,04	0,54 ± 0,02	0,53 ± 0,03
Velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{m\acute{a}x}$ (h <sup>-1</sup> )	0,54	0,37 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,57 ± 0,02	0,40 ± 0,01
Velocidade específica de crescimento $\mu_{set}$ pré determinada (h <sup>-1</sup> )	-	0,1	0,3	-	0,4
Rendimento de PspA3 (mg/g célula)	56	-	-	220	232
Produtividade de PspA3 (g/L h)	0,12	-	-	1,3	1,2

Pode-se observar um aumento de três vezes na produtividade em biomassa, passando de 2,1 g/L h, no Cultivo 1, para 6,0 g/L h, no Cultivo 3, ocasionado pelas mudanças no meio de batelada e alimentação, pelo desenvolvimento de uma estratégia para o controle da vazão de alimentação e aumento da temperatura durante a fase de crescimento.

Comparando-se os resultados de Carvalho *et al.* (2011) com os aqui obtidos observa-se um aumento de cerca de 4 vezes na produção de proteína (de 56 para 220 mg/g célula) e de 10 vezes na produtividade em proteína (de 0,12 para 1,2 g/L h).

Os resultados obtidos até o momento são semelhantes ou superiores aos melhores relatados na literatura para cultivos de alta densidade celular realizados em batelada alimentada de *rE. coli* com glicerol como fonte de carbono.

## 5. CONCLUSÕES

Em um futuro próximo, a maioria dos fármacos e antígenos vacinais de origem protéica, usados na prevenção ou tratamento de doenças humanas ou animais, bem como muitas enzimas industriais, provavelmente serão produzidos como proteínas heterólogas obtidas através de microrganismos hospedeiros. Embora o processo de cultivo, normalmente, tenha um baixo impacto sobre o custo total do processo, a obtenção de uma elevada produtividade de proteína é crucial para minimizar os custos das etapas subsequentes de purificação.

O presente trabalho descreve um novo protocolo para cultivos de alta densidade de *E. coli* em meio definido contendo glicerol como fonte de carbono, composto por quatro fases: as usuais fases de batelada e batelada alimentada seguidas de uma fase de indução através da adição de um pulso de lactose, que é estendida e reforçada por uma quarta fase, onde lactose e glicerol são continuamente alimentados. O sucesso desta estratégia de cultivo também conta com a otimização da composição dos meios de batelada e alimentação.

As concentrações mais elevadas de tiamina e fosfato utilizadas no presente trabalho foram decisivas para alcançar elevadas concentrações de biomassa e excelentes rendimentos de proteína em meio contendo glicerol como fonte de carbono.

Além disso, a estratégia de alimentação baseada em uma elevada velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{set}}$  nunca abaixo de  $0,3 \text{ h}^{-1}$  na equação 8 para a fase de crescimento) mostrou-se muito eficaz ao conseguir suprir o glicerol necessário para atender a demanda metabólica, já que o coeficiente de manutenção é cerca de 10 vezes maior como glicerol do que com a glicose (NEIJSSSEL *et al.*, 1999). Além disso, permitiu que a concentração residual de glicerol fosse mantida em uma faixa de 5 a 10 g/L, que foi crucial para manter o rápido crescimento e evitar o estresse causado pela baixa concentração residual de substrato.

É importante ressaltar a grande vantagem de se utilizar glicerol como fonte de carbono em cultivos de alta densidade celular de *E. coli*. Com ele pode-se atingir um elevada velocidade específica de crescimento, mantida a um valor próximo ao da velocidade máxima de crescimento celular durante todas as fases do cultivo, sem que houvesse formação de acetato. Além disso, com glicerol, a temperatura do cultivo pode ser mantida a 37°C, atingindo-se valores elevados de concentração de biomassa mais rapidamente, sem provocar o metabolismo “overflow”.

Comparando-se os rendimentos e produtividades de proteína obtidos nos ensaios em frasco agitado e os obtidos nos cultivos em biorreator, nota-se um desempenho muito superior em biorreator, apresentando um rendimento aproximadamente 30% maior e um aumento de 30 vezes na produtividade. Essa grande diferença é causada pelo melhor controle das condições de cultivo em reator, incluindo pH, concentração de oxigênio dissolvido, bem como a concentração das fontes de carbono e nitrogênio.

Neste trabalho estudou-se a influência na produtividade de PspA3 empregando-se duas estratégias distintas de indução, uma utilizando um pulso de lactose seguido de uma alimentação contínua de lactose e glicerol e a outra composta por dois pulsos de IPTG (no início da indução e outro após 4 horas) e o resultado foi uma produção similar de proteína recombinante. Conclui-se que a lactose, substância barata e não-tóxica, pode ser considerada um indutor muito eficiente do promotor T7/*lac*, e devido aos bons resultados alcançados, a estratégia proposta poderia ser escalonada para cultivos de *E. coli* em biorreatores industriais.

## **6. SUGESTÕES**

Para a continuidade do trabalho sugere-se a realização de novos estudos para o aprimoramento da estratégia de indução com lactose na alimentação, analisando se o aumento de sua concentração no meio de alimentação 2 levaria a uma maior produção de proteína em um menor tempo de indução.

Da mesma forma, os resultados obtidos mostraram que as concentrações de tiamina e fosfato empregadas no presente trabalho foram decisivas para atingir altos níveis de formação de biomassa e de produção de proteína. Portanto, novas melhorias poderão ser alcançadas pela manipulação de condições-chave de cultivo. Por isso, a exploração do potencial completo do glicerol como fonte de carbono depende de esforços em estudar o comportamento celular a nível de transcriptoma e proteoma assim como de traduzir esse conhecimento para condições de cultivo otimizadas.

## 7. REFERÊNCIAS

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

ARISTIDOU, A., SAN, K.Y., BENNETT, G. N. Improvement of biomass yield and recombinant gene expression in *Escherichia coli* by using fructose as the primary carbon source. *Biotechnology Progress* 15, 140-145, 1999.

BAGAERT, D., HERMANSA P. W. M. , ADRIAN P. V. , RÜMKE H. C. , GROOT R. Pneumococcal vaccines: an update on current strategies, *Vaccine*, v.22, 2209–2220, 2004.

BAILEY, J. E., OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 ed. Nova York: McGraw-Hill, 1986. p 78.

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

BRICKS, L. F., BEREZIN, E. Impact of pneumococcal conjugate vaccine on the prevention of invasive pneumococcal diseases. *Jornal de Pediatria*, v. 82, S67-S74, 2006.

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

BOWDEN G. A., PAREDES, A. M., GEORGIU, G. Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, v. 9, 725-730, 1991.

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



CARVALHO, R. J. Produção e purificação de um fragmento recombinante de PspA3 de *S. pneumoniae* em *E. coli*. 2009. Qualificação (Mestrado em Biotecnologia), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e Instituto Butantan. São Paulo/SP.

CARVALHO, R. J., CABRERA-CRESPO, J., GONÇALVES, V. M. Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *E. coli* using different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011(*in press*).

CHOIN, H. J., KEUM, K., LEE, S. Y. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science*, v. 61, 876-885, 2006.

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

DONOVAN, R. S., ROBINSON, C. W., GLICK, B. R. Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* v. 16, 145-54, 1996.

DUILIO, A., TUTINO, M. I., MARINO, G. Recombinant protein production in Antarctic gram-negative bacteria. *Methods in Molecular Biology*, v. 267, 225 – 238, 2004.

EITEMAN, M. A., ALTMAN, E. Overcoming acetate in *Escherichia coli* recombinant protein fermentations. *Trends in Biotechnology*, v. 24 (11), 530-536, 2006.

FAN, D. D., LUO, Y., MI, Y., MA, X. X., SHANG, L. Characteristics of fed-batch cultures of recombinant *Escherichia coli* containing human-like collagen cDNA at different specific growth rates. *Biotechnology Letters*, v. 27, 865–870, 2005.

GEORGIU, G., SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, 538–545, 2005.

- GÖRKE, B., STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, 613-624, 2008.
- HAN, K., HONG, J., LIM, H. C. Relieving effects of glycine and methionine from acetic acid inhibition in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnology Bioengineering*, v. 41, 316– 324, 1993.
- HANNIG, G., MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tib Tech*, v. 16, 54 – 60, 1998.
- HOLLINGSHEAD, S., K., BARIL, L., FERRO, S., KING, J., COAN, P., BRILES, D. E. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *Journal of Medicine Microbiology*, v. 55, 215 - 21, 2006.
- HOLMS, W. H. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Current Topics in Cellular Regulation*, v. 28, 69–105, 1986.
- HORTA, A. C. L., ZANGIROLAMI, T. C., GIORDANO, R. C., CRUZ, A. J. G., REIS, G. B., JESUS, C. D. F. Supervisory system for bioreactor high cell density cultivations. Application for software registration 2010, n° 0000271004222441 INPI, Brazil.
- JEDRZEJAS, M. J. Extracellular virulence factors of *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience*, v.9, 891 – 914. 2004.
- KAMERLING J. P. Pneumococcal polysaccharides: A chemical view – *Streptococcus pneumoniae* - *Molecular Biology & Mechanisms of Disease* (A. Tomasz, ed.), Mary Ann Liebert, Inc., Larchmont, New York, 81-114, 2000.
- KHALILZADEH, R., SHOJAOSADATI, S. A., BAHRAMI, A., MAGHSOUDI, N. Over-expression of recombinant human interferon-gamma in high cell density fermentation of *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, v. 25, 1989–1992, 2003.

- KHALILZADEH, R., SHOJAOSADATI, S. A., BAHRAMI, A., MAGHSOUDI, N. Fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* producing human interferon- $\gamma$  under controlled specific growth rate. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 2, 113-122, 2004.
- KILIKIAN, B. V., SUÁREZ, I. D., LIRIA, C. W., GOMBERT, A. K. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*, v. 35, 1019 – 1025, 2000.
- KLEMMANN, G. L., STROHL, W. R. Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 5, 180-186, 1994.
- KORZ, D. J., RINAS, U., HELLMUTH, K., SNADERS, E. A., DECKWER, W. D. Simple fed- batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 39 (1), 59–65, 1995.
- LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, 680-685, 1970.
- LEE, S. Y., High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Ibitech March*, v. 14, 98-105, 1996.
- LEHNINGER, A. L. *Lehninger princípios de bioquímica*. 4<sup>a</sup> Ed. Sarvier 2006. 534 – 536.
- LIMA, W. J. N. Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular, 2004.
- LULI, G. W., STROHL, W. R. Comparasion of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, 1004-1011, 1990.
- MARKIDES, S. C., Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, v. 60, 512-538, 1996.

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

MENZELLA, H. G., CECCARELLI, E. A., GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, 809 – 817, 2003.

MIGOSWSKI, E., KFOURI, R., BRANDILEONE, M. C. C. Doença pneumocócica invasiva (DPI): importância e impacto na saúde. *Informativo da Sociedade Brasileira de Imunizações*. Ano II N. 12 Abril 2008.

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

NEIDHARDT, F. C., INGRAHAM, J. L., SCHAECHTER, M. *Physiology of the Bacterial Cell. A Molecular Approach*, Sinauer Associates. Sunderland. Massachusetts. 1990.

NORSYAHIDA, A., RAHMAH N., AHMAD, R. M. Y. Effects of feeding and induction strategy on the production of BmR1 antigen in recombinant *E. coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 544–550, 2009.

PASSARINHA, L. A., BONIFÁCIO, M. J., QUEIROZ, J. A. Application of a fed-batch bioprocess for the heterologous production of hSCOMT in *Escherichia coli*. *Journal Microbiology Biotechnology*, v. 19, 972 – 981, 2009.

PICHICHERO, M., CASEY, J., BLATTER, M. ROTHTEIN, E., RYALL, R., BYBEL, M., GILMET, G., PAPA, T. Comparative trial of the safety and immunogenicity of quadrivalent (A, C, Y, W135) meningococcal polysaccharide-diphtheria conjugate vaccine versus quadrivalent polysaccharide vaccine in two to ten year old children. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 24, 57- 62, 2005.

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

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

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

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

ROSSI, M. Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli* RR1. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química. São Paulo/SP.

SEEGER, A., SCHNEPPE, B., MC CARTHY, J. E. G., DECKWER, W. D., RINAS, U. Comparison of temperature-induced and isopropyl-beta-d-thiogalacto-pyranoside-inducer synthesis of basic fibroblast growth-factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 17 (10), 947-953, 1995.

SHOJAOSADATI, S. A.; KOLAEIL, S. M. V.; BABAEIPOUR, V. E FARNOUD, A. M. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 6 (2), 63 – 84, 2008.

SHULER, M. L., KARGI. F. *Bioprocess Engineering: basic concepts*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2002.

SINGH, S. M., PANDA, A. K. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 99, 303-310, 2005

SILVA, M. Clonagem, expressão e purificação das proteínas de superfície PsaA e fragmentos de PspA de *Streptococcus pneumoniae*. 2005. 149 f. Tese (doutorado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação Interunidades: USP/Instituto Butantan/ IPT. São Paulo, 2005.

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

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

STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking. *Protein Expression and Purification*, v. 41 (1), 207–234, 2005.

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

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

YAN, J., ZHAO, S. F., MAO, Y. F., LUO, Y. H. 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, 1755 – 1758, 2004.

YEE, L., BLANCH, H. W. Recombinant protein expression in high cell density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 10, 1550-1556, 1992.

YIM, S. C., JEONG, K. J., CHANG, H. N., LEE, S. Y. High-level secretory production of human granulocyte-colony stimulation factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosystems Engineering*, v. 24, 249 - 254, 2001.

ZHANG, Y., TAIMING, L., LIU, J. Low temperature and glucose enhanced T7 RNA polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, v.29 (1), 132–139, 2003.

## APÊNDICE

### **Improved *rE. coli* High Cell Density Cultivation Conditions for Glycerol as Carbon Source**

Cíntia R Sargo<sup>1\*</sup>, Antonio C L Horta<sup>1\*</sup>, Adilson J Silva<sup>1</sup>, Maurício Possedente<sup>1</sup>, Maria M P Machado<sup>2</sup>, Raquel L C Giordano<sup>1</sup>, Roberto C Giordano<sup>1</sup>, Viviane M Gonçalves<sup>3</sup>, Teresa C Zangirolami<sup>1§</sup>

1 Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química, São Carlos, BR

2 Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química, São Carlos, BR

3 Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, BR

\*These authors contributed equally to this work

§Corresponding author

Dr (Mrs) Teresa Cristina Zangirolami

Department of of Chemical Engineering

Universidade federal de São Carlos, São Carlos

São Paulo - Brazil

## **1. Abstract**

### 1.1 Background

Pneumococcal surface protein A (PspA) is an important pneumococcal virulence factor and a potential vaccine candidate. A recombinant fragment of PspA gene from clade 3 of *S. pneumoniae* was cloned into pET37b and the plasmid was inserted into *E. coli* BL21(DE3) for improved protein production in high cell density cultures (HCDC). The experiments were carried out in 5-L bioreactor, using an automatically controlled exponential feeding and glycerol as carbon source. The standard defined medium formulation was modified to improve performance of the process for glycerol as growth limiting substrate and induction by both IPTG and lactose was studied.



## 1.2 Results

Specific growth rates up to  $0.57 \text{ h}^{-1}$ , biomass formation yield of  $0.56 \text{ g DCW}(\text{g}_{\text{glycerol}})^{-1}$  and cellular productivities around  $6.0 \text{ g (DCW) L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  were achieved in shortened *rE. coli* HCDC by increasing the thiamine concentration in the medium, adding phosphate salts to the feeding medium and raising the growth phase temperature to  $37^{\circ}\text{C}$ . The performance of lactose as inducer was investigated by implementing an innovative induction strategy, which consisted of addition of a lactose pulse followed by a continuous supply of lactose mixed with glycerol in the feeding solution. The results indicated similar protein maximum yield ( $220 \text{ mg/g DCW}$ ), productivity [ $1.3 \text{ g (DCW) L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ] and concentration ( $26 \text{ g L}^{-1}$ ) when using IPTG or lactose. These values are significantly higher than some of the best reported in the literature, confirming the efficacy of the proposed biomass formation and protein production strategy.

## 1.3 Conclusions

Key variables that influence both growth and recombinant protein production were investigated, including alterations of medium formulation, temperature and inducer, as well as growth and induction strategies. Glycerol showed outstanding performance as carbon source, enabling high growth rates without acetate formation. Together with automatic control of the exponential feeding profile, the cultivation strategy employed resulted in higher rates of cell growth and protein production, leading to shorter cultivations with higher productivities and, consequently, lower production costs. This work is an important contribution to the field of HCDC with glycerol as carbon source and lactose as inducer.

## 2. Introduction

*Streptococcus pneumoniae* is a major cause of diseases including pneumonia, otitis, meningitis, and bacteremia. About 1 million children die of pneumococcal disease every year, mostly in developing countries, and elderly people are at risk worldwide [1]. Currently available conjugate vaccines against *S. pneumoniae* are based on the protection given by capsular polysaccharides (PS), used either alone (23-valent vaccine) or conjugated to a carrier protein (10 and 13-valent vaccines). The covalent linkage of the PS to a carrier

protein through chemical conjugation alters the immune response against PS. As a result, a T-cell dependent response is achieved, a booster effect is observed and children are protected [2]. However, the commercially available conjugate vaccines are produced with proteins unrelated to the pneumococcal disease, such as non-toxic diphtheria protein CRM<sub>197</sub>. An alternative to broaden the coverage of conjugate vaccines is to use a pneumococcal protein as carrier [3, 4]. Many pneumococcal proteins, such as pneumolysin, PsaA, PspC and PspA exhibit antigenic properties and are potential vaccine candidates. The pneumococcal surface protein A (PspA) is an important virulence factor which inhibits complement deposition on the pneumococcal surface and was found in all pneumococci isolated from clinical material [5, 6]. Moreover, PspA is projected outside of the PS capsule and has been proven protective in several animal models [7]. Due to its unique antigenic characteristics, PspA was selected to produce an alternative protein carrier for pneumococcal conjugate vaccines [4]. In this context, the choice of a high productivity PspA process is crucial for lowering production costs and for supplying an accessible high efficiency vaccine against *S. pneumoniae* able to be used in public mass vaccination campaigns. The use of *Escherichia coli* as host to produce PspA offers a highly suitable strategy to achieve this goal. *E. coli* is the most frequently used prokaryotic expression system for the high-level production of heterologous proteins. This bacterium has been well characterized at the molecular level, and the introduction of foreign genes into it is easily carried out. In addition, there are well-established protocols for *rE. coli* cultivation up to high cell densities, using inexpensive media and readily available fermentation equipment [8, 9].

Bioprocess-based approaches for the optimization of specific levels of the target protein include manipulation of growth medium composition, induction period, inducer concentration and temperature, together with control of the specific growth rate before and after induction [10].

After obtaining a high concentration of cells, the foreign gene expression can then be induced, resulting in high final yields of the recombinant protein. Lactose and IPTG are widely used for foreign gene expression in the *lac/T7* expression system of *E. coli*. IPTG is a reagent with potential toxicity and high cost, which restricts its application as inducer for industrial production of genetically engineered proteins. Lactose is a less expensive, natural, environmentally friendly inducer of *lac/T7* promoters. However, the low solubility of lactose in aqueous solutions, and its uptake as carbon source during the induction phase, make the selection of the induction strategy a difficult task. For these reasons, there are only a few

reports that have described the use of lactose as inducer for heterologous protein production in high-density fermentations of *E. coli* [11, 12]. Lim *et al.* (2004) [13] used a combination of lactose and glycerol in a defined medium to feed the bioreactor in a DO-stat fashion, which enabled them to increase the product concentration 1.6-fold and to improve the quality of the inclusion body formed. However, early induction caused by the presence of lactose in the feed medium led to low biomass accumulation [ $\sim 35$  g (DCW) L<sup>-1</sup>] and productivity [1.4 g (DCW) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>].

Fed-batch culture is the operational mode most frequently used in order to achieve high cell concentrations [14] and when applied to heterologous protein production, the cultivation is usually carried out in three stages: batch, fed-batch and induction phases. Cultivation conditions, namely carbon source, temperature and supplementary feed flow rate influence the performance of the culture in terms of both biomass and recombinant protein production [15, 16]. Glucose is a readily assimilated carbon source for *E. coli*, and provides high maximum specific growth rates. However, the cell can readily direct its metabolism towards the formation of undesirable metabolites, which can cause inhibition of both growth and protein production. Acetate, which is known to be the main inhibitor of growth and protein synthesis [17, 18, 19], is formed when the carbon flux into the central metabolic pathway exceeds biosynthetic demands and the capacity for energy generation within the cell [17]. For this reason, in order to prevent acetate formation, fed-batch cultures using glucose as carbon source are started with low glucose concentrations (10 - 30 g L<sup>-1</sup>) [20, 21, 22, 23].

In addition, using glucose the growth rate has to be kept as close as possible to the critical specific growth rate (0.1 - 0.3 h<sup>-1</sup>), during both batch and fed-batch phases, by growing the cells at a sub-optimal temperature and/or manipulating the supplementary feed flow rate [21, 24]. For the *lac* promoter expression system induced with lactose, a tight control of the residual glucose concentration at the induction phase is required due to the strong glucose inhibition effect on *lac operon* [25].

Glycerol is a promising carbon source for high-density *E. coli* cultivations. It is well known that the glycerol uptake rate is low compared to that of glucose, as glycerol does not possess an active transport system for entry into *E. coli* cells, unlike glucose [26]. Due to this important difference, higher growth rates can be employed during the feeding phase when cells are grown on glycerol, with little formation of acetate [17, 27]. This more intense growth condition may also avoid stress responses due to substrate starvation, and heterologous protein production is not hampered by the use of carbon and energy sources for maintenance

requirements [28]. The latter consideration is especially important for cultures based on glycerol, as the maintenance requirement for this carbon source is around ten times higher than that for glucose [29]. In addition, as discussed by Sandén *et al.* (2002) [28], higher specific growth rates favor protein production by influencing both the protein synthesis apparatus and energy production. Another important advantage of glycerol as a substrate for high cell density cultures is the production of cells that are more resistant to storage under freezing conditions, compared to those produced with glucose. This is an important feature for downstream processing, and helps to prevent protein losses during cell disruption and purification steps [27].

For all these reasons, the highest cell concentrations of recombinant *E. coli* reported in the literature have been obtained using glycerol as carbon source and an exponential feeding strategy [148 g (DCW) L<sup>-1</sup>] [24], or by removing inhibitory substances through dialysis [190 g (DCW) L<sup>-1</sup>] [30]. This cell density is very close to the maximum possible density of an *E. coli* liquid culture, which is estimated to be about 200 g (DCW) L<sup>-1</sup> [31]. These good results were obtained despite the reported medium formulations being based simply on the replacement of glucose by glycerol, without considering the differences during the processing of these two carbon sources through the central metabolic pathway of the cell.

In this study, we initially focused on improving biomass productivity in high cell density recombinant *E. coli* cultivations with glycerol as carbon source, by changing the concentrations of key components in the defined medium formulation. The influence of temperature on growth and PspA3 production was then investigated. Finally, a novel induction strategy, which combined pulse and continuous addition of lactose, was compared to the conventional induction strategy with IPTG pulse.

### 3. Materials and methods

#### 3.1 Strain and plasmid

The N-terminal recombinant fragment of the PspA gene from clade 3 of family 2 of *S. pneumoniae* was cloned into the pET37b+ plasmid vector (Department of Microbial Genetics, National Institute of Genetics Shizuoka-ken, Japan) with a polyhistidine tag in the amino terminal, and inserted into *E. coli* BL21(DE3). This construct was kindly provided by Dr. Eliane Miyaji (Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil).



### 3.3 Culture conditions

Preliminary studies employing different temperatures were conducted in shake flasks, with agitation at 280 rpm for 14-22 h. Erlenmeyer flasks (500 mL volume) containing 50 mL of batch medium Cult. 1 (Table 1), with 20 g L<sup>-1</sup> of glycerol, were used in these studies. After identification of the most suitable conditions for growth and protein production, bioreactor runs were carried out to study the conditions selected for the high cell density cultures. The procedures employed for cell activation, inoculum preparation and propagation are briefly described below.

### 3.4 Pre-culture

The first pre-culture (30 mL of pre-culture medium in a 500 mL flask) was started with a single colony grown on LB agar/kanamycin medium (5 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 10 g L<sup>-1</sup> tryptone, 10 g L<sup>-1</sup> NaCl, 20 g L<sup>-1</sup> agar and 50 mg L<sup>-1</sup> kanamycin), incubated using a rotary shaker at 37°C at 280 rpm for 12-14 h. After this step, three further pre-cultures (each containing 100 mL of batch medium in 1000 mL flasks) were inoculated with the first pre-culture (1% v/v) and incubated using a rotary shaker at 37°C and 280 rpm for 6-10 h. For the shake flasks studies, cultures were grown under the same conditions, up to an optical density (OD<sub>600</sub>) of ~2.5, prior to induction with lactose or IPTG pulses.

### 3.5 Bioreactor operation

The four high cell density cultures (Cultivations 1 to 4) were carried out in a 5.0 L bioreactor monitored using SuperSys\_HCDC<sup>R</sup> [40]. The pH was maintained at pH 6.7 (GLI PRO pH meter) by addition of NH<sub>4</sub>OH using an on/off pump. When feeding was started, the pH set point was raised to 6.9 to boost nitrogen source supply. All instruments were controlled using a Compact FieldPoint 2020 controller (cFP-2020, National Instruments). Dissolved oxygen content (DOC) was monitored using a dissolved oxygen sensor (Mettler Toledo Inpro 6800 probe, connected to a CE O<sub>2</sub> 4050 transmitter), and maintained at 30% by a controller which automatically changed both agitation speed (between 200 and 900 rpm) and the composition of the gas stream supplied to the bioreactor (by mixing pure oxygen with air) [33]. The inlet gas flow rate was maintained at ~5 L min<sup>-1</sup> using two

mass flow controllers (GFC, Aalborg). The broth permittivity and conductivity were monitored using a biomass sensor (Fogale Nanotech), with data acquisition via cFP. The exhaust gas composition was analyzed using a Sick/Maihak S.710 analyzer, and data were acquired via cFP.

The fed-batch phase was started after consumption of the glycerol initially present in the batch medium, indicated by an increase of the dissolved oxygen concentration and a decrease of the stirrer speed [40]. For all experiments, the exponential feeding flow rate was calculated using Equation 1 [24], and was automatically controlled by the supervisory system.

$$F = \left( \frac{\mu_{\text{SET}}}{Y_{\text{XS}}} + m \right) \cdot \frac{C_{\text{X0}} \cdot V_0}{C_{\text{S0}} - C_{\text{SR}}} \cdot e^{(\mu_{\text{SET}} \cdot t)} \quad (1)$$

In Equation 1,  $F$  ( $\text{Lh}^{-1}$ ) is the feed flow rate,  $\mu_{\text{SET}}$  ( $\text{h}^{-1}$ ) is the desired specific growth,  $Y_{\text{XS}}$  ( $\text{g DCW g}_{\text{glycerol}}^{-1}$ ) is the biomass yield coefficient on glycerol,  $m$  ( $\text{g DCW g}_{\text{glycerol}}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) is the maintenance coefficient,  $C_{\text{X0}}$  [ $\text{g (DCW) L}^{-1}$ ] and  $V_0$  (L) correspond to the cellular concentration and volume, respectively, at the beginning of the fed-batch phase,  $C_{\text{S0}}$  ( $\text{g}_{\text{glycerol}} \text{L}^{-1}$ ) is the carbon source concentration in the supplementary medium and  $C_{\text{SR}}$  ( $\text{g}_{\text{glycerol}} \text{L}^{-1}$ ) represents the residual glycerol concentration.

In order to set up Equation 1 using the SuperSys HCDC control software, the biomass yield coefficient ( $Y_{\text{X/S}}$ ) was set to  $0.4 \text{ g (DCW) g}_{\text{glycerol}}^{-1}$  (Cultivations 1 and 2) and updated to  $0.5 \text{ g (DCW) g}_{\text{glycerol}}^{-1}$  (Cultivations 3 and 4). The maintenance coefficient ( $m$ ) was set to  $0.3 \text{ g}_{\text{glycerol}} \text{ g DCW}^{-1} \text{ h}^{-1}$  and the residual glycerol concentration ( $C_{\text{SR}}$ ) to  $5 \text{ g}_{\text{glycerol}} \text{ L}^{-1}$ .

Although Cultivations 1 to 4 were carried out under very similar growth conditions, some differences should be pointed out. Concerning temperature, Cultivations 1 and 2 were carried out at  $30^\circ\text{C}$ , while Cultivations 3 and 4 were kept at  $37^\circ\text{C}$  during the growth phase and at either  $30^\circ\text{C}$  (Cultivation 3) or  $25^\circ\text{C}$  (Cultivation 4) during the induction phase. The increase in the temperature during biomass formation stages aimed at speeding up cell growth. On the other hand, the choice of the temperature for the induction stage was based on the results of previous shake flask experiments.

The feed flow rate control for Cultivations 1, 2 and 4 was according to the classical approach, with pre-defined growth phase  $\mu_{\text{SET}}$  values of  $0.1 \text{ h}^{-1}$  (Cultivation 1),  $0.3 \text{ h}^{-1}$  (Cultivation 2), and  $0.4 \text{ h}^{-1}$  (before induction) and  $0.2 \text{ h}^{-1}$  (after induction) (Cultivation 4). For Cultivation 1, a pre-defined  $\mu_{\text{SET}}$  of  $0.08 \text{ h}^{-1}$  was used during the induction phase. For

Cultivations 2 and 4, the  $\mu_{SET}$  value was gradually reduced during the induction phase, following the growth deceleration caused by the recombinant protein production, according to the glycerol concentration measured in the broth.

A novel control strategy was adopted in the case of Cultivation 3. In this experiment,  $\mu_{SET}$  was automatically adjusted according to the growth rate estimated using a softsensor based on on-line biomass concentrations measured by a capacitance probe [40].

### 3.6 Analytical methods

Cellular growth was measured according to the culture broth optical density at a wavelength of 600 nm ( $OD_{600nm}$ ), as well as by dry cell weight measurements [ $g$  (DCW)  $L^{-1}$ ] and on-line estimates of broth permittivity ( $pFcm^{-1}$ ). For Cultivations 2, 3 and 4 biomass concentration ( $C_x$ ) calculated from optical density (OD) measurements according to the calibration curve  $C_x = 0.49 \cdot OD$ , which was checked by  $\sim 4$  dry cell weight measurements made at different phases of the cultivation. The concentrations of metabolites were determined by HPLC (Waters Corp. system), using an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad) and a 5 mM sulfuric acid solution as mobile phase (at a flow rate of  $0.6 mL min^{-1}$ ). The column temperature was  $60^\circ C$ . Organic acids were detected at 210 nm (Waters 486 UV detector), while glycerol, glucose, lactose and galactose were measured with a refractive index detector (Waters 410). Glycerol was also monitored throughout the fermentation, using a triglycerides determination kit (Laborlab). Protein synthesis was checked by SDS-PAGE, and the gels were photographed in order to estimate protein production using the ImageJ software [41].

For plasmid stability estimation, serial dilutions of culture broth samples were spread onto LB agar plates, without antibiotic, and incubated at  $37^\circ C$  for 24 h, after which about 100 colonies were transferred to LB agar plates with or without kanamycin ( $50 mg L^{-1}$ ). Plasmid stability was determined by calculating the percentage of colonies resistant to kanamycin [32].

## 4. Results and Discussion

Results from shake flask runs and four bioreactor cultivations are presented and discussed in the followings. Each experiment was planned and performed to meet specific



goals. Preliminary shake flask experiments were carried out to provide information regarding the influence of temperature on protein production during the induction phase. In the first three bioreactor cultures, different growth temperatures and defined medium formulations were compared and their influence on biomass productivity was assessed. Two different induction protocols were then studied in HCD bioreactor cultures. The Cultivation 3 was used to test a novel strategy for heterologous gene expression having lactose as inducer, while the standard induction strategy with IPTG was applied at Cultivation 4, for comparison.

#### 4.1 Influence of temperature and inducer on PspA3 production in shake flasks

Temperature and inducer are important parameters influencing recombinant protein production. Preliminary shake flask experiments were therefore carried out with the *E. coli* BL21 (DE3) carrying pET 37b/PspA3 in order to identify the most suitable induction temperature, using lactose as inducer. Protein expression was followed by SDS-PAGE analysis (Figure 1) and quantified by ImageJ software [38], the main results are summarized in Table 2. The highest productivity was achieved at 20°C (39.8 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>). However, it can be risky to use this temperature in HCDC with defined medium, because it can lead to the precipitation of salts due to their lower solubility. Hence, 25 and 30 °C were identified as the most suitable temperatures for the induction phase, because both also resulted in good productivities (32.7 and 38.6 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectively). By following plasmid loss, it was found that at 30 °C there was plasmid retention of 80% after 10 h induction, which was similar to plasmid retention at the other temperatures. By taking into account that growth is favored at 30 °C, this temperature was employed during induction with lactose in bioreactor cultures.

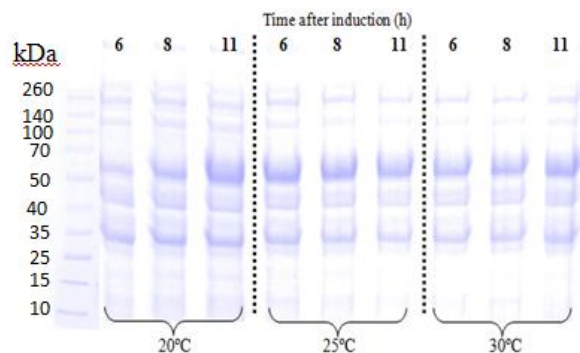


Figure 1- SDS-PAGE of lactose as the inducer in shake flask. Effect of temperature on PspA3 production by lactose in shake flask experiments. Protein molecular weight standards on the left.

Table 2 - PspA3 yields and productivities in shake flask experiments using different temperatures and lactose as inducer.

	20°C	25°C	30°C
Maximum PspA yield (mg/g DCW)	186 ± 5	171 ± 5	168 ± 5
Maximum PspA productivity (mg L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	39.8	32.7	38.6

#### 4.2 Fine-tuning of temperature and High Cell Density (HCD) medium composition for glycerol as carbon source

The biomass formation phase was studied using four high cell density cultures with three different medium compositions and two different temperatures. Cultivation 1 was a standard experiment, which was performed with a medium composition identical to the defined medium proposed by Seeger *et al.* (1995) [32]. For Cultivations 2 and 3, the concentrations of key medium components, such as thiamine, phosphate and others, were changed in both batch and feeding media, as detailed in Table 1. In addition, the temperature used during the growth phase (prior to induction) was changed from 30°C (Cultivations 1 and 2) to 37°C (Cultivations 3 and 4). The main results obtained in Cultivations 1 - 4 are presented in Figures 2 - 5, and are summarized in Table 3.

Cultivation 1 was conducted according to conventional HCDC protocols (Korz *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 1995). The feeding phase started at 15.8 h and was very effective in maintaining a low glycerol concentration during the last 20 h of cultivation. A maximum biomass concentration of 72 g (DCW) L<sup>-1</sup> was achieved 29 h after the start of the culture, and the on-line permittivity data closely followed biomass formation during this phase. The most interesting feature revealed in Figure 2 is the unusual acetate formation profile. Acetate was not observed during the batch phase, even for a specific growth rate as high as 0.37 h<sup>-1</sup> (Table 3). However, the acetate concentration quickly increased up to 6.0 g L<sup>-1</sup> during the fed-batch phase, when the specific growth rate was maintained at 0.1 h<sup>-1</sup> and the dissolved oxygen concentration was kept at 30 % of saturation (data not shown). This result indicated that acetate formation was most likely due to an unbalanced medium composition (and not to metabolic overflow), since the feeding medium originally proposed by Seeger *et al.* (1995) lacked phosphate salts (Table 1). In fact, Korz *et al.* (1995) [24] mentioned that phosphate could become the growth limiting factor, and they attributed acetate formation to a shortage of this nutrient.

Table 3 - Kinetic parameters, biomass production and productivity for Cultivations 1 - 4. Values for  $\mu_{\max}$  and  $Y_{X/S}$  estimated from data collected during the batch phase.

	Cultivation with glucose*	Cult. 1	Cult. 2	Cult. 3	Cult. 4
Temperature (batch and fed-batch)	30°C	30°C	30°C	37°C	37°C
Temperature (induction)	30°C	30°C	-	30°C	25°C
Final biomass $C_x$ [g (DCW) L <sup>-1</sup> ]	62	72	116	120	126
Cultivation time (h)	29.5	34	21.5	20	23.7
Cellular productivity** (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	2.1	2.1	5.4	6.0	5.3
[Acetate] <sub>max</sub> (g L <sup>-1</sup> )	4.5	6.0	0.7	0.0	0.0
Yield coefficient $Y_{X/S}$ (g <sub>x</sub> /g <sub>s</sub> )	0.35	0.44 ± 0.05	0.56 ± 0.04	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.03
Maximum specific growth $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	0.54	0.37 ± 0.03	0.36 ± 0.03	0.57 ± 0.02	0.40 ± 0.01

\*From Carvalho *et al.* (2011) [27]. \*\*Productivity estimated from maximum biomass concentration data.

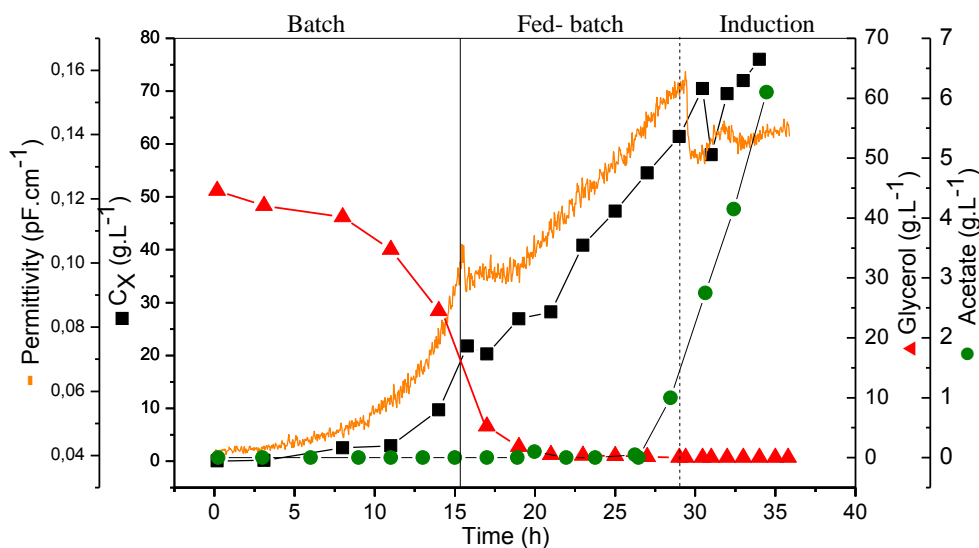


Figure 2 - Results of Cultivation 1 Biomass formation, substrate uptake and acetate production in high cell density culture of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 using Seeger's medium (with glycerol as carbon source). Fed-batch mode started with specific growth rate  $\mu_{\text{set}} = 0.1 \text{ h}^{-1}$  at  $t = 15.8 \text{ h}$ . Induction at  $t = 29.5 \text{ h}$ , with IPTG pulse and growth rate reduced to  $0.08 \text{ h}^{-1}$

Based on the hypothesis raised from Cultivation 1 concerning acetate formation, Cultivation 2 was carried out by setting the exponential feeding profile to a value close to the maximum specific growth rate attained during the batch phase ( $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$ ). In addition, the feeding medium was supplemented with  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  salts (Table 1). Finally, the thiamine concentration was raised to boost glycerol uptake, since thiamine pyrophosphate (TPP) acts as coenzyme in two controlling steps of the glycolytic pathway

[26]. As shown in Figure 3, no acetate formation was observed in this experiment, and the biomass concentration reached  $116 \text{ g (DCW) L}^{-1}$  after only 23 h of culture. Permittivity again closely followed biomass formation. Glycerol accumulated to  $20 \text{ g L}^{-1}$  during the fed-batch phase, probably due to the high fixed value of  $\mu_{\text{SET}}$  used. Nevertheless, high glycerol concentrations did not either trigger acetate formation or influence cell growth.

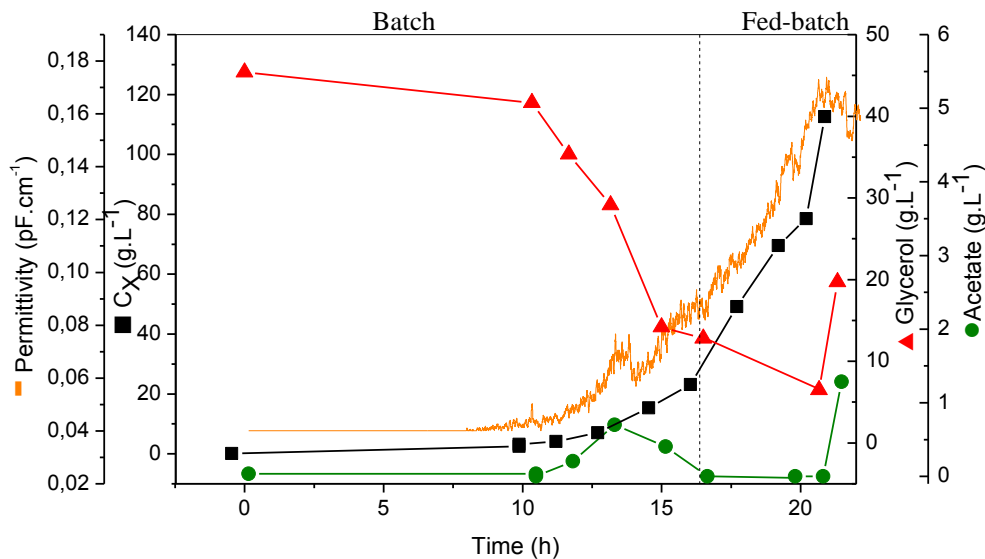


Figure 3 - Results of Cultivation 2: Biomass formation and substrate uptake during high cell density fed-batch cultivation of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 using glycerol as carbon and energy source and modified defined medium (Table 1). Fed-batch mode started with a pre-defined specific growth rate of  $\mu_{\text{set}} = 0.3 \text{ h}^{-1}$  at  $t = 16.5 \text{ h}$ . Biomass concentration ( $C_x$ ) calculated from optical density (OD) measurements according to the calibration curve:  $C_x = 0.49 \cdot \text{OD}$ .

For Cultivations 3 and 4, the batch medium formulation was adjusted to fit the glycerol concentration used in all experiments, which was 33% higher than the concentration employed by Korz *et al.* (1995). The temperature during the growth phase was also changed to  $37^\circ\text{C}$  in both experiments (compared to  $30^\circ\text{C}$  in Cultivations 1 and 2). Furthermore, a new strategy for feed flow rate control was implemented in Cultivation 3, based on the on-line estimation of specific growth rate from permittivity data and automatic update of the  $\mu_{\text{set}}$  value [33]. Figures 4 and 5 show similar final biomass concentrations of  $120 \text{ g (DCW) L}^{-1}$  and  $125 \text{ g (DCW) L}^{-1}$  for Cultivations 3 and 4, respectively. No acetate formation occurred, despite the accumulation of glycerol observed in both experiments. Cultivation 4 was carried out as a standard HCDC, and the exponential feeding profile followed a fixed  $\mu_{\text{SET}}$  value of  $0.4 \text{ h}^{-1}$ , which probably caused the intense glycerol accumulation throughout the fed-batch phase.

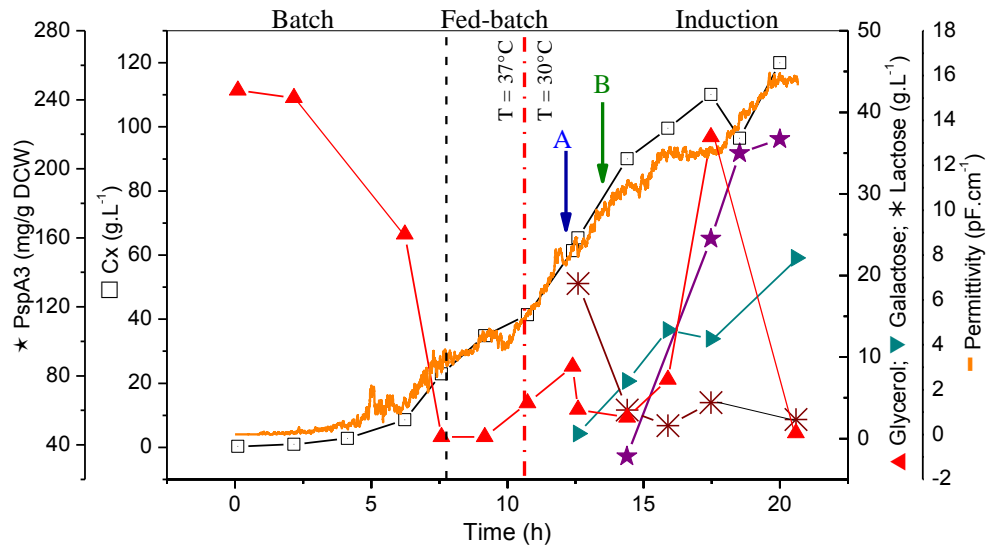


Figure 4 - Results of Cultivation 3: Growth, substrate uptake and protein expression during high cell density fed-batch cultivation of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 using glycerol as carbon source and modified defined medium (Table 1). Fed-batch mode carried out with automatic control of specific growth rate ( $\mu_{set}$  started at  $t=7.8$  h with Feeding Medium 1. A) Induction initiated by addition of  $20 \text{ g L}^{-1}$  of lactose at  $t = 12.5$  h. B) At 13.12 h, Feeding Medium 1 was switched to Feeding Medium 2, containing lactose. Biomass concentration ( $C_x$ ) calculated from optical density (OD) measurements according to the calibration curve:  $C_x = 0.49 \cdot OD$ . Changes in cultivation temperature indicated in red.

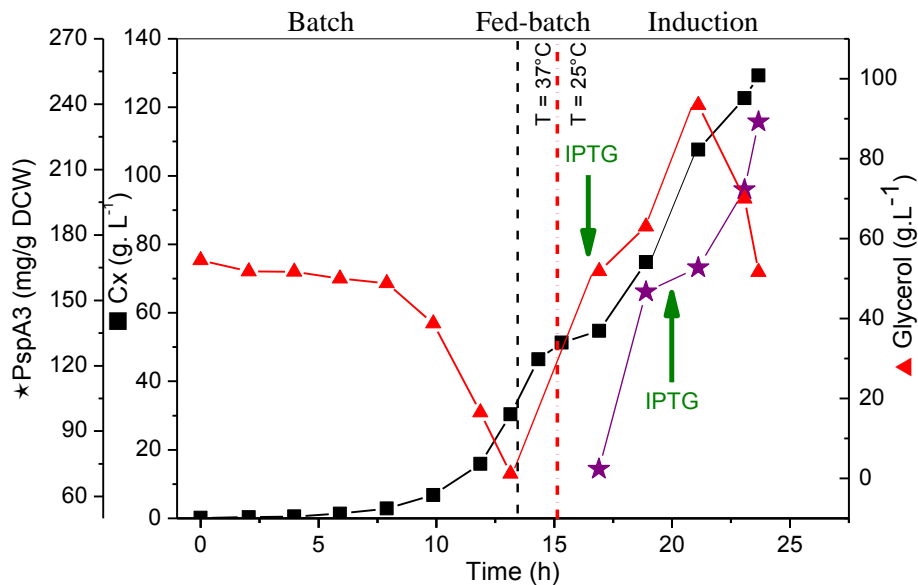


Figure 5 - Results of Cultivation 4: Growth, substrate uptake and protein expression during high cell density fed-batch cultivation of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3 using glycerol as carbon source and modified defined medium (Table 1). Fed-batch mode started with pre-defined  $\mu_{set}$  of  $0.4 \text{ h}^{-1}$  at  $t=13.0$  h. Induction by addition of IPTG  $1 \text{ mM}$  at  $t = 16$  h and  $0.5 \text{ mM}$  at  $t = 20$ . Permittivity data not available. Biomass concentration ( $C_x$ ) calculated from optical density (OD) measurements according to the calibration curve:  $C_x = 0.49 \cdot OD$ . Changes in cultivation temperature indicated in red.

A deeper analysis of the changes in the pattern of growth during Cultivation 3 can be obtained from the data shown in Figure 6. The specific growth rate ( $\mu$ ), estimated from on-line permittivity measurements, showed a continuously decreasing profile due to the effects of temperature, low glycerol concentration and stress caused by protein synthesis (Figure 6a). The carbon dioxide evolution rate (CER) and F (calculated according to Equation 1, below) had similar profiles (Figure 6b), because both are influenced by specific growth rate and biomass accumulation. The oscillations in F, CER and dissolved oxygen concentration (DOC) (Figure 6b) were caused by the shutdowns and start-ups of the feeding pump, required to reduce glycerol accumulation. It should be noted that the control of DOC, which combined automatic stirrer speed actuation and enrichment of air with O<sub>2</sub> [33], was very precise, and

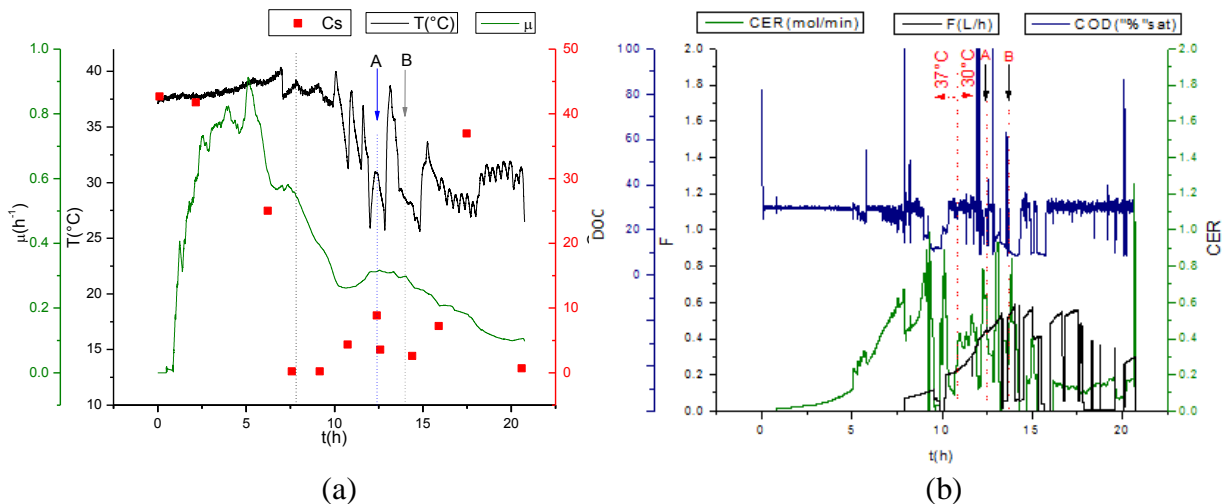


Figure 6 - Results of Cultivation 3: (a) On-line data for temperature (T) and specific growth rate ( $\mu$ ); (b) Carbon evolution rate (CER), dissolved oxygen concentration (DOC) and feed flow rate (F) for high cell density

Cultivation 3. Fed-batch mode carried out with automatic control of specific growth rate ( $\mu_{\text{set}}$  at  $t=7.8$  h with Feeding Medium 1. A: Induction initiated by addition of 20 g L<sup>-1</sup> of lactose at  $t = 12.5$  h. B: At 13.12 h, Feeding Medium 1 was switched to Feeding Medium 2, containing lactose. Changes in cultivation temperature indicated in red.

The main results of all the HCDC performed in the present study are summarized in Table 3. The changes made on temperature as well as the compositions of the batch and fed-batch media resulted in a reduction of 12 hours in the cultivation time (from 34 hours for Cultivation 1 to only 22 hours for Cultivation 3). By raising the temperature to 37°C, a  $\mu_{\text{máx}}$  of 0.57h<sup>-1</sup> (Cultivation 3) was achieved, equivalent to almost 1.6-fold increase, without acetate formation. Furthermore, changes in batch medium composition, mainly the higher thiamine concentration employed, increased the biomass formation yield coefficient by almost 30 % (Cultivations 2, 3 and 4). In fact, Yoon *et al.* (2003) [34] reported that during *rE.*

*coli* HCD cultures in defined medium with glucose as carbon source, several genes involved in the biosynthesis of thiamine were up-regulated throughout the fed-batch mode with strong up-regulation at the end of the culture. This finding suggests that the addition of higher thiamine concentrations may be required to compensate the intensified uptake of this vitamin. The same study reported that the expression of phosphate starvation genes was most strongly up-regulated toward the end of cultivation, what emphasizes the need for keeping higher phosphate concentrations during the cultivation. In addition, the present work showed that acetate formation on glycerol is very likely connected to phosphate depletion at higher biomass concentrations: negligible acetate accumulation was observed in Cultivations 2 to 4 (Figures 3, 4, 5 and Table 3) after phosphate salts were added to the feeding media (Table 1).

Table 3 also includes the results reported by Carvalho *et al.* (2011), who cultivated the same *rE. coli* clone expressing a PspA3 fragment in bioreactors using fed-batch operation and glucose or glycerol as carbon sources. In the present work, the maximum specific growth rate with glycerol (at 30°C) was about 30% lower than with glucose (Cultivations 1 and 2), as expected. However, at 37°C it approached the value attained with glucose. In addition, all of the yield coefficients obtained with glycerol were higher than those reported for glucose by Carvalho *et al.* (2011), due to the high acetate production using glucose.

Although Cultivation 4 was carried out at 37°C during the batch phase, it exhibited a maximum specific growth rate of only 0.4 h<sup>-1</sup> (Table 3). This slower growth was probably caused by the inoculum, which was transferred at the late exponential growth phase and led to a lag phase lasting 8 h (Figure 5).

The changes implemented in the culture conditions resulted in Cultivations 2, 3 and 4 consistently reaching final biomass concentrations of 116 – 126 g (DCW) L<sup>-1</sup>, with cell productivities in the range 5.3 - 6.0 g (DCW) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Table 3). These are significantly superior to reported values with glycerol as carbon source, which were in the range 1.5 - 4.1 g (DCW) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Table 5). In fact, the only higher productivities reported 7.0 and 7.56 g (DCW) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> were achieved using glucose as carbon source and highly laborious experimental procedures, including quasi-real time monitoring of glucose and acetate concentrations [35] or fed-batch culture performed with cell recycle [36].

### 4.3 Protein production using lactose and IPTG as inducers in bioreactor cultivations

Most of the HCDC employed for producing heterologous proteins in *E. coli* under the *lac* promoter control rely on the conventional induction strategy based on pulse addition of IPTG or lactose after the desired biomass concentration is reached. This strategy was originally developed for shake flask experiments, and although it works using bioreactors, novel approaches should be investigated. A number of recent studies have focused on the development of strategies using lactose as inducer [13, 37]. As mentioned previously, lactose has several advantages compared to IPTG: it is natural, non-toxic and cheap. For these reasons, lactose is the most suitable inducer for recombinant protein production on an industrial scale. However, implementation of a feasible induction strategy is difficult, due to the consumption of lactose as carbon source, its low solubility and the large amount required to trigger protein expression.

In this work, both IPTG (Cultivations 1 and 4) and lactose (Cultivation 3) were studied as inducers. Although the main focus was to set up an improved strategy for lactose, protein expression with IPTG as inducer was also investigated for comparison purposes.

The first attempt to produce PspA3 in bioreactor HCDC was in Cultivation 1. A pulse of IPTG was applied at  $t = 29.5$  h, shortly after which a decrease in permittivity was caused by viability loss associated with heterologous gene expression. For the same reason, during the induction phase, permittivity data did not fit the trends of biomass formation indicated by optical density or dry cell weight measurements. The loss of cell viability was also confirmed by CFU counting and plasmid retention, which changed from 96% (just before induction) to 79% (at 35.8 h). In spite of the changes in cell viability and plasmid retention, PspA3 production was very low to be detected by densitometry of SDS-PAGE bands of Cultivation 1 samples. This was probably related to the cultivation strategy adopted during the induction phase, which was different from that successfully applied by Carvalho *et al.* (2011) [27] using glycerol as carbon source: a pulse containing 0.5 mM IPTG and 20 g L<sup>-1</sup> lactose;  $\mu_{\text{SET}}$  (Eq. 1) of 0.05 h<sup>-1</sup>. Since maintenance requirements are higher for glycerol [29], the low  $\mu_{\text{SET}}$  (0.08 h<sup>-1</sup>) kept during the induction was probably insufficient to supply the energy required for protein synthesis in the absence of lactose, which was used as a secondary carbon source in the work of Carvalho *et al.* [27]. Furthermore, the acetate concentration reached during induction phase of Cultivation 1 (6.0 g L<sup>-1</sup>) is almost twice the observed at Carvalho *et al.* [27] and certainly inhibited the protein production.



For Cultivation 2, there was no induction phase because the experiment had to be interrupted after ~ 21 h due to an accidental alkali addition that raised the pH to 10.

In Cultivation 3, an innovative induction strategy with lactose was applied. We combined pulse addition, which is important to speed up protein synthesis by the cell, with continuous addition of lactose, as a component of the induction feeding medium, in order to maintain the inducer concentration at a minimum level throughout the 8 to 12 h induction phase. Cultivation 3 was therefore carried out as an exponential feeding fed-batch culture of *E. coli* BL21 (DE3) pET 37b/PspA3, which was divided into four stages (as indicated in Figure 4). After the complete exhaustion of glycerol in the batch culture (at  $t = 7.8$  h), the fed-batch operation was started with addition of Feeding Medium 1 (automatically adjusted  $\mu_{\text{SET}}$ , Figure 4). The induction phase was initiated by adding a pulse of lactose ( $20 \text{ g L}^{-1}$ ) when biomass reached about  $50 \text{ g (DCW) L}^{-1}$ . In this phase, the temperature was reduced from  $37^\circ\text{C}$  (the value used for growth during the batch and fed-batch phases) to  $30^\circ\text{C}$ , as indicated by the previous results for protein expression in the shake flask experiments. One hour after pulse addition, the feeding medium was switched to Feeding Medium 2, which contained a mixture of lactose and glycerol.

For comparison, Cultivation 4 was carried out as a standard HCDC, using a pre-defined feeding profile and IPTG as inducer, as shown in Figure 5. Fed-batch operation was started with addition of Feeding Medium 1 ( $\mu_{\text{set}} = 0.40 \text{ h}^{-1}$ ). The induction phase was initiated by adding IPTG ( $1 \text{ mM}$ ) when biomass reached about  $50 \text{ g (DCW) L}^{-1}$ . In this phase, the temperature was reduced from  $37$  to  $25^\circ\text{C}$ , as previous experiments showed that this was the best temperature for IPTG induction [38]. After 4 hours of induction, a new IPTG pulse ( $0.5 \text{ mM}$ ) was applied to ensure enough inducer pressure for maximum PspA3 synthesis at the high biomass concentration present.

The time profiles for protein yield in Cultivations 3 and 4 are also included in Figures 4 and 5. Continuous lactose supply was effective in promoting increased PspA3 production, and enabled a shorter induction phase, lasting only six hours. The lactose concentration remained at the desired low levels throughout the induction phase (Figure 4). Lactose was steadily converted to glucose, which was completely taken up by the cells, whereas the galactose concentration built up because *E. coli* BL21 is not able to assimilate this sugar. Increased glycerol accumulation observed at the mid-induction phase was a consequence of the preference of the cells for glucose. These results indicated that the

Feeding Medium 2 formulation could be improved by setting a lactose/glycerol ratio slightly higher than the value of 0.4 (w/w) employed for Cultivation 3.

For induction using IPTG, the conventional single pulse addition was clearly not sufficient to promote protein synthesis by the entire accumulated biomass. When the second IPTG pulse was added, the protein yield started to increase rapidly again, and reached 230 mg/g DCW within 3 h (Figure 5). Glycerol accumulation, which occurred in both experiments during the induction phase, did not affect protein formation, because no acetate was produced. Besides that, in contrast to glucose, glycerol does not repress the *lac* promoter [39], and its accumulation is therefore not problematic when using lactose as inducer, which is another important advantage of using glycerol as carbon source.

Further information concerning protein production during Cultivations 3 and 4 is provided in Figure 7 and Table 4. Using SDS-PAGE analysis and posterior quantification (Table 4), maximum estimated yields of PspA3 were 220 mg/g DCW using lactose as inducer, and 232 mg/g DCW using IPTG. Maximum concentrations and productivities were also very similar for both inducers.

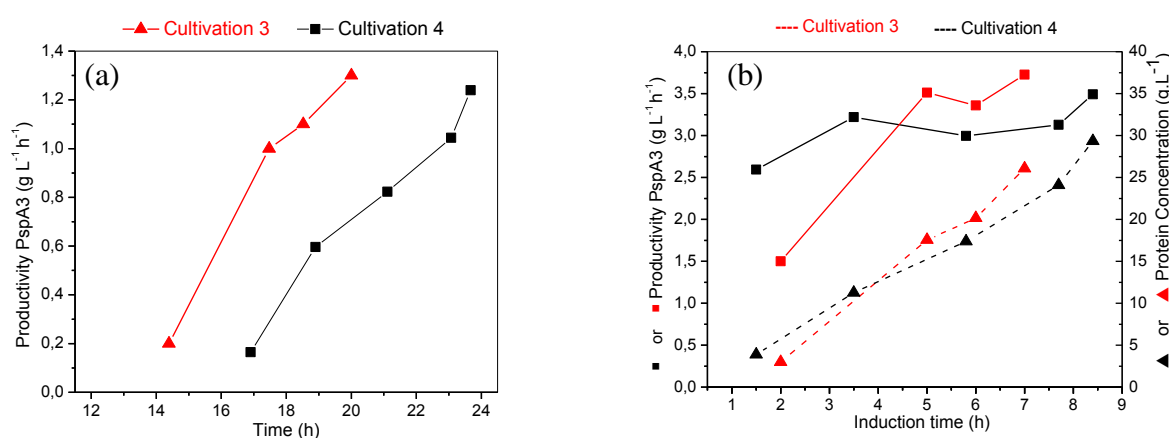


Figure 7 - Protein production of Cultivation 3 and 4: a) Overall protein productivity profiles for Cultivations 3 and 4 (productivity calculated using total cultivation time). Induction of Cultivation 3 started at  $t = 12.5$  h; induction of Cultivation 4 started at  $t = 16$  h. b) Protein productivity and concentration during induction phase (productivity calculated using the time corresponding only to induction period).

To assess the influence of time on protein production profiles, productivity can be calculated considering either total cultivation time (Figure 7a) or just the length of induction period (Figure 7b). Figure 7a shows that productivity increased with total cultivation time using either lactose or IPTG as result of the intracellular protein accumulation taking place along the induction phase. Figure 7a also shows that the productivity with lactose as inducer was superior to that with IPTG. However, the inferior productivity with IPTG as

inducer was mainly caused by the long lag phase at the beginning of Cultivation 4. When the values of productivity were corrected, excluding the lag phase period from the total time, the productivity curves of Figure 7a become closer. In fact, Figure 7b confirms that both induction protocols led to very similar protein production patterns. As expected, protein concentration increased continuously at practically the same rate during the induction period, regardless the inducer used (Figure 7b). For IPTG as inducer, protein productivity during induction phase approached stabilization after the usual  $\sim 4$  h of induction. However, as a consequence of the new strategy employed at Cultivation 3, the same stabilization was observed after only  $\sim 5$  h of lactose induction, which is considerably shorter than the usual 8 h required.

A smaller plasmid loss during the induction phase was observed for Cultivation 4 (65% plasmid retention after 7 h of induction) than for Cultivation 3 (where plasmid retention fell to 50% after 8 h of induction). The higher plasmid loss for Cultivation 3 could be due to the higher induction temperature used, as well as the more aggressive induction strategy. The decoupling between biomass concentration and permittivity after protein synthesis was triggered, as observed in Figure 2, which is in agreement with the expected loss of cell viability during induction.

Comparison of protein yields and productivities for shake flask and bioreactor experiments (Tables 2 and 4, respectively) showed the far superior performance of the latter, which presented an approximately 30% higher yield and a 30-fold increase in productivity. This was due to the inherently better control of cultivation conditions including pH, dissolved oxygen tension as well as concentration of carbon and nitrogen sources.

Table 4 - Protein yield and production during high cell density Cultivations 3 and 4 of *E. coli* BL21 (DE3) pET37b/PspA3. Cultivation 3 induced by lactose (pulse and continuous addition) and Cultivation 4 induced by IPTG pulse.

	Time (h)	$C_x$ (g (DCW) L <sup>-1</sup> )	PspA3 yield (mg/g DCW <sup>-1</sup> )	PspA3 conc. (g L <sup>-1</sup> )	Protein productivity (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
Cultivation 3	20	120	220 ± 4	26 ± 1	1.3
Cultivation 4	23.7	126	232 ± 4	29 ± 1	1.2

Finally, for comparative purposes, Table 5 presents some of the reported results for heterologous protein production using *E. coli* BL21 (or similar strains), under the control of the *lac* operon, most of them carried out with IPTG as inducer. Most of reported values for protein productivity are in the range of 0.1 to 0.16 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> and are significantly

lower than the best productivity achieved in this work ( $\sim 1.3 \text{ gPspA3 L}^{-1}\text{h}^{-1}$  – Table 4). The best protein productivity ( $\sim 2.6 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) was reported for human interferon, a molecule of  $\sim 20 \text{ kDa}$ , which was also produced in a HCDC of high biomass productivity.

The high final protein concentrations achieved, about  $25 \text{ g L}^{-1}$ , are far superior to typical protein concentrations, which lie in the range  $5 - 6 \text{ g L}^{-1}$  (it is important to point out that protein size and structure should have been considered for a more complete comparison). PspA3 has a molecular mass of  $45 - 60 \text{ kDa}$ , and is a larger protein than human interferon or fibroblast growth factor (listed in Table 5), which have molecular masses of around  $20 \text{ kDa}$ .

Table 5 - Some reported biomass and protein productivities in high cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli*.

Host Strain	Medium	Culture time (h)	Biomass productivity (g (DCW) $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Product	Inductor	Protein productivity (g $\text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	Ref.
BL21 (DE3)	Defined (glucose)	32	1.75	hIFN- $\gamma$ *	IPTG	0.162	[23]
BL21 (DE3)	Defined (glycerol)	40	1.52	hIFN- $\gamma$ *	IPTG	0.138	[23]
TGI	Defined (glucose)	$\sim 35$	$\sim 3.90$	bFGF**	IPTG	$\sim 0.030$	[32]
BL21 (DE3)	Complex (glucose)	34	$\sim 1.03$	hsBLyS***	Lactose	0.110	[42]
BL21 (DE3)	Defined (glucose)	29.5	2.1	rfPspA3	IPTG	0.12	[27]
BL21 (DE3)	Defined (glycerol)	33	1.9	rfPspA3	IPTG	0.09	[27]
BL21 (DE3)	Defined (glucose)	16.5	7.0	hIFN- $\gamma$ *	IPTG	2.57	[35]

\*hIFN-  $\gamma$ : Human interferon- $\gamma$ .

\*\*bFGF: Human basic fibroblast growth factor.

\*\*\*hsBLyS: Human soluble B lymphocyte stimulator.

The results of Carvalho *et al.* (2011), who cultivated the same *rE. coli* expressing the same fragment of PspA gene, provide a good reference for comparison. We believe that the excellent protein concentrations, yields and productivities achieved in this work are due to three major factors: i) increased biomass productivity as a result of a better balance in medium formulation and higher specific growth rates; ii) more efficient gene expression due to the use of larger amounts of inducers; iii) faster expression due to the higher growth rates and the induction strategies employed.

## 5. Conclusions

In the near future, most of the protein-based drugs used for treating human and animal diseases, as well as industrial enzymes, will probably be produced as heterologous proteins by host organisms. Although the cultivation process itself normally has a low impact on the overall cost of the process, the attainment of high protein yield and productivity is crucial for minimizing the costs of downstream processes.

The present study describes a new protocol for growing *rE. coli* at high density in defined medium containing glycerol as carbon source, which comprises four stages: the three usual batch and exponential fed-batch phases followed by a short induction phase triggered with pulse addition, which is extended and enhanced by a fourth phase, where lactose and glycerol are continuously supplied by the feeding medium. The success of this novel cultivation strategy also relies on the improved composition of batch and fed batch media, which contained more thiamine and phosphate salts than the defined media formulation employed elsewhere [10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 31, 32, 36, 42]. In addition, the feeding strategy based on rather high specific growth rates ( $\mu_{SET}$  never below  $0.3 \text{ h}^{-1}$  in Eq. 1 for the growth phase) proved to be very effective on supporting higher maintenance requirements inherent to glycerol [29]. Besides, it enabled residual glycerol concentration in the range of 5 to  $10 \text{ g L}^{-1}$ , which is crucial for keeping fast growth and for avoiding the stress caused by low residual substrate concentration.

By applying the aforementioned cultivation strategy, similar protein production was achieved using either lactose or IPTG. It is concluded that lactose, an inexpensive and non-toxic substance, can be used as a very efficient inducer of T7/*lac* promoter. The proposed strategy could be scaled-up for *rE. coli* cultivation in industrial bioreactors. The procedure provided a three-fold increase in biomass productivity [from  $2.1$  to  $6.0 \text{ g (DCW) L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ], a 3.9-fold increase in protein yield (from  $56$  [27] to  $220 \text{ mg/g DCW}$ ) and a ten-fold increase in protein productivity (from  $0.12$  [27] to  $1.2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). To our knowledge, these values are similar or superior to the best reported in the literature for fed-batch cultures of *rE. coli* carried out with glycerol as carbon source.

As a final comment, it is worthy to point out that glycerol, for several reasons, poses as a very suitable carbon source for *rE. coli* high cell density cultures. It prevents the formation of undesirable metabolites when phosphate concentrations in the feeding medium are adjusted to meet cell requirements. Since organic acid formation is not coupled to a

threshold growth rate when glycerol is used as the main carbon source, supplementary medium feeding rates can be kept close to the actual cell growth rate during all cultivation phases. Similarly, with glycerol, temperature can be kept between 30 and 37°C to achieve faster growth rates, without triggering metabolic overflow.

The higher thiamine and phosphate concentrations used in the present work were decisive for achieving high biomass formation and protein production. Further enhancements will be pursued by manipulating key cultivation conditions. Hence, the exploitation of glycerol full potential as carbon source depends on efforts to study cell patterns at transcriptome and proteome levels as well as to translate this knowledge as improved cultivation conditions.

## 6. Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian research funding agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## 7. References

- [1] Miyaji EM, Ferreira DM, Lopes APY, Brandileone MCC, Dias WO, Leite LCC: 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* 2002, 70:5086–5090.
- [2] Bagaert D, Hermansa PWM, Adrian PV, Rümke HC, de Groot R: Pneumococcal vaccines: an update on current strategies. *Vaccine* 2004, 22:2209–2220.
- [3] Briles DE, Hollingshead SK, Nabors GS, Paton JC, Brooks-Walter A: The potential for using protein vaccines to protect against otitis media caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* 2000, 19 Suppl 1:S87-95.
- [4] Csordas FC, Perciani CT, Darrioux M, Goncalves VM, Cabrera-Crespo J, Takagi M, Sbrogio-Almeida ME, Leite LC, Tanizaki MM: Protection induced by pneumococcal surface protein A (PspA) is enhanced by conjugation to a *Streptococcus pneumoniae* capsular polysaccharide. *Vaccine* 2008, 26:2925-2929.

- [5] Rolo D, Ardanuy C, Fleites A, Martín R, Liñares J: Diversity of pneumococcal surface protein A (PspA) among prevalent clones in Spain. *BMC Microbiology* 2009, 9:1471-2180.
- [6] Hollingshead SK, Baril L, Ferro S, King J, Coan P, Briles DE: Pneumococcal Proteins Epi Study Group. Pneumococcal surface protein A (PspA) family distribution among clinical isolates from adults over 50 years of age collected in seven countries. *Journal of Medicine Microbiology* 2006, 55:215-21.
- [7] Jedrzejak MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2001, 65:187-207.
- [8] Hannig G, Makrides SC: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Tib Tech* 1998, 16:54-60.
- [9] Donovan RD, Robinson CW, Glick BR: Optimizing inducer and culture conditions for expression of forcing proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 1996, 16:145-154.
- [10] Kilikian BV, Suárez ID, Liria CW, Gombert AK: Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry* 2000, 35:1019-1025.
- [11] Zhang HB, Mao XQ, Wang YJ, Hu XQ: Effect of different culture conditions for dextransucrase production in *Escherichia coli* using lactose as inducer. *African Journal of Biotechnology* 2009, 8:1577-1582.
- [12] Yan J, Zhao SF, Mao YF, Luo YH: Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. *World Journal of Gastroenterology* 2004, 10:1755-1758.
- [13] Lim HK, Lee SU, Shung SI, Jung KH, Seo JH: Induction of the T7 promoter using lactose for production of recombinant plasminogen Kringle 1-3 in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2004, 14:225-230.
- [14] Yim SC, Jeong KJ, Chang HN, Lee SY: High-level secretory production of human granulocyte-colony stimulation factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Bioprocess Biosystems Engineering* 2001, 24:249-254.
- [15] Shojaosadati SA, Kolaei SMV, Babaeipour V, Farnoud AM: Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. *Iranian Journal of Biotechnology* 2008, 6:63-84.

- [16] Passarinha LA, Bonifácio MJ, Queiroz JA: Application of a fed-batch bioprocess for the heterologous production of hSCOMT in *Escherichia coli*. *Journal Microbiology Biotechnology* 2009, 19:972–981.
- [17] Lee SY: High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tib Tech* 1996, 14:98-105.
- [18] Kleman GL, Strohl WR: Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high-cell-density fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 1994, 60:3952-3958.
- [19] Luli GW, Strohl WR; Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 1990, 56:1004-1011.
- [20] Babu KR, Swaminathan S, Marten S, Khanna N, Rinas U: Production of interferon-a in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins. *Applied Microbiology Biotechnology* 2000, 53:655-660.
- [21] Menzella HG, Ceccarelli EA, Gramajo HC: Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 82:809-817.
- [22] Nikerel E, Öner E, Kirdar B, Yildirim R: Optimization of medium composition for biomass production of recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal* 2006, 32:1–6.
- [23] Khalilzadeh R, Shojaosadati SA, Bahrami A, Maghsoudi N: Fed-batch cultivation of recombinant *Escherichia coli* producing human interferon- $\gamma$  under controlled specific growth rate. *Iranian Journal of Biotechnology* 2004, 2:113-122.
- [24] Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Snaders EA, Deckwer WD: Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 1995, 39:59–65.
- [25] Donovan RS, Robinson CW, Glick BR: Review: optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. *Journal of Industrial Microbiology* 1996, 16:145-54.
- [26] Lehninger AL: *Princípios de Bioquímica*. Fourth edition. Sarvier, 2006.
- [27] Carvalho RJ, Cabrera-Crespo J, Gonçalves VM: Development of production and purification processes of recombinant fragment of pneumococcal surface protein A in *E. coli* using different carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011(in press).



- [28] Sandén AM, Prytz I, Tubulekas I, Förberg C, Le H, Hektor A: Limiting factors in *Escherichia coli* fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering* 2002, 81:158-166.
- [29] Neijssel OM, Teixeira de Mattos MJ, Tempest DW: Growth yield and energy distribution. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Second edition. Edited by Neidhardt FC. Washington D.C., ASM Press, 1999, Chapter 107:10.
- [30] Fuchs C, Koster D, Wiebusch S, Mahr K, Eisbrenner G, Märkl H: Scale-up of dialysis fermentation for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 2002, 93:243-251.
- [31] Shiloacha J, Fass R: Growing *E. coli* to high cell density - A historical perspective on method development. *Biotechnology Advances* 2005, 23:345-357.
- [32] Seeger A, Schneppe B, McCarthy JEG, Deckwer WD, Rinas U: Comparison of temperature- and isopropyl-P-D-thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 1995, 17:947-953.
- [33] Horta ACL, Zangirolami TC, Giordano RC, Cruz AJG, Reis GB, Jesus CDF: Supervisory system for bioreactor high cell density cultivations. Application for software registration 2010, n° 0000271004222441 INPI, Brazil.
- [34] Yoon SH, Han MJ, Lee SY, Jeong KJ, Yoo JS: Combined transcriptome and proteome analysis of *Escherichia coli* during high cell density culture. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 81: 753-763.
- [35] Babaeipour V, Shojaosadati SA, Robotjazi SM, Khalilzadeh R, Maghsoudi N: Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 2007, 42: 112-117.
- [36] Märkl H, Zenneck C, Dubach ACH, Ogbonna JC: Cultivation of *Escherichia coli* to high cell densities in a dialysis reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1993, 39:48-52.
- [37] Menzella HG, Ceccarelli EA, Gramajo HC: Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. *Biotechnology and Bioengineering* 2003, 82:809-817.
- [38] Sargo CR, Horta ACL, Campani GJr, Possedente M, Silva AJ, Gonçalves VM, Zangirolami TC, Giordano RC: Otimização da produção da proteína PspA em cultivos de

- Escherichia coli* recombinante para desenvolvimento de uma vacina pneumocócica. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 8, 2011, Caxias do Sul. Anais Sinaferm 2011.
- [39] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology* 2008, 6:613-624.
- [40] Horta ACL, Silva AJ, Sargo CR, Gonçalves VM, Zangirolami TC, Giordano RC: Robust artificial intelligence tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant *E. coli* cultivations. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2011 (in press).
- [41] Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ: Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* 2004, 11:36-42.
- [42] 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* 2006, 28:477-483.