



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Erysipelothrix*
rhusiopathiae PARA PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA
ERISPELA SUÍNA**

Adilson José da Silva

São Carlos – SP
Março/ 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO DE *Erysipelothrix*
rhusiopathiae PARA PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA
ERISÍPELA SUÍNA**

Adilson José da Silva

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

Orientadores:
Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami
Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

São Carlos – SP
Março/2007

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

S586oc

Silva, Adilson José da.

Otimização das condições de cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* para produção de vacina contra erisipela suína / Adilson José da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
116 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Engenharia bioquímica. 2. Biotecnologia - indústria.
3. Proteínas - biotecnologia. 4. Vacina. 5. Biorreatores.
6. Otimização. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

Adilson José da Silva

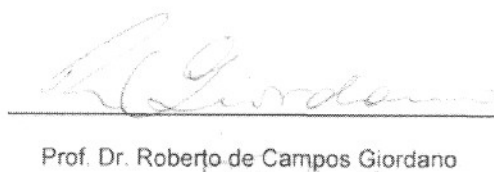
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

Aprovado em: 30/03/2007

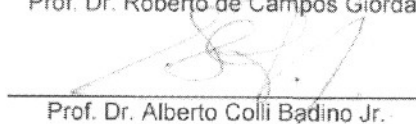
BANCA EXAMINADORA



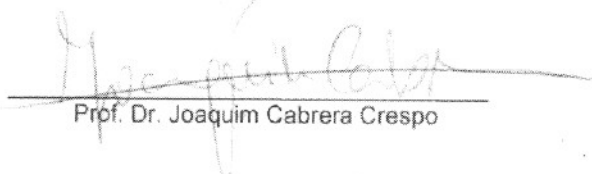
Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami



Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano



Prof. Dr. Alberto Colli Badino Jr.



Prof. Dr. Joaquim Cabrera Crespo

Dedico este trabalho aos meus pais, José Braz e Maria Ivone, e aos meus irmãos Fábio e Rose, pelo apoio incondicional, fundamental para minha formação pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami e Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano pela confiança em mim depositada, por toda a paciência e todos os ensinamentos, apoio e dedicada orientação. Agradeço também pelos exemplos de postura e profissionalismo, além do carinho e amizade ao longo destes dois anos.

A todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar pela ajuda, amizade e companheirismo. Manifesto meu agradecimento especial ao Dr. Álvaro de Baptista Neto pela paciência e dedicação em ensinar um químico a trabalhar com cultivo de microrganismos. Sua ajuda foi fundamental para minha formação e realização deste trabalho.

Aos demais amigos do Departamento de Engenharia Química, em especial à Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano e seus alunos Dasciana, Adriano e Wellington por me receberem tão bem no Laboratório de Tecnologia Enzimática, e ao amigo Sidnei pela importante colaboração durante a realização dos experimentos.

A Profa. Dr. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e as amigas Carmen, Juliana, Mônica e Márcia do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do DCF/UFSCar por toda a ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos técnicos Amadeus e Clarice, pela assistência durante os experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade e apoio oferecidos. Espero ter dado minha contribuição para a consolidação do Programa e aproveitamento para agradecer a todos os amigos do PPG-Biotec.

A todos os amigos da época da graduação cuja amizade se estendeu também até esta nova etapa. Agradeço também a todos os demais amigos.

A minha namorada Ana Paula pelo incentivo, carinho e compreensão permanentes e indispensáveis para que eu seguisse sempre em frente, com seus conselhos e paciência para me ouvir e me acalmar nos momentos difíceis. Também a sua família, por todo carinho e ajuda na forma de orações.

A Vallée S.A. pelo apoio financeiro e a Maria do Carmo Cilento pelos testes de imunização e toda colaboração.

A toda minha família pelo amor, incentivo e confiança. O apoio de vocês às minhas decisões foi fundamental, sempre.

A Deus pela graça da vida.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta a seu tamanho original.”
(A. Einstein)*

RESUMO

A erisipela suína está entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos na suinocultura mundial. O agente patogênico associado a esta doença é a bactéria *Erysipelothrix rhusiopathiae*, e as vacinas disponíveis atualmente para a prevenção da erisipela são produzidas com o caldo de cultivo deste microrganismo inativado ou atenuado. O principal antígeno identificado é uma proteína de superfície da bactéria encontrada no sobrenadante do caldo de cultivo ou aderida à parede celular através de interações com resíduos de colina dos ácidos teicóico e lipoteicóico desta estrutura. Diante da escassez de informações na literatura científica sobre estudos a respeito do crescimento deste patógeno, a empresa Vallée S.A, indústria brasileira de produtos farmacêuticos de uso veterinário, firmou uma parceria com pesquisadores do Departamento de Engenharia Química da UFSCar para o desenvolvimento da tecnologia de produção dessa vacina. Assim, o presente trabalho teve como objetivo otimizar as condições de cultivo de *E. rhusiopathiae* de forma a estabelecer um protocolo de produção de altas concentrações celulares deste microrganismo, suficientes para produzir uma vacina contra a erisipela suína que oferecesse grau de proteção igual ou superior às formulações disponíveis no mercado. Para tanto, o crescimento do microrganismo foi estudado em diferentes condições de aeração (aerobiose, microaerofilia e anaerobiose), foram avaliadas alterações nas concentrações dos nutrientes do meio de cultivo e foram realizados testes de imunização em camundongos com as vacinas preparadas. Os estudos sobre o efeito da aeração no crescimento do microrganismo e na expressão do antígeno foram realizados em biorreator de 4,0 L, com uma faixa de agitação entre 100 e 400 rpm e vazão de ar ou N₂ de 1,0 L/min. Os experimentos de aprimoramento do meio de cultivo foram conduzidos em câmara incubadora estática ou com agitação de 200 rpm. Já as vacinas foram preparadas em ambas as condições. A temperatura utilizada foi de 37°C e o pH inicial foi de 8,0 em todos os ensaios realizados. A expressão do antígeno foi avaliada por eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) utilizando amostras do sobrenadante dos cultivos ou a partir de extratos das células preparados com solução de cloreto de colina. Os resultados destas análises revelaram que a produção do antígeno acompanha o crescimento celular e sua expressão é favorecida na presença de oxigênio. Concentrações celulares de até 1,8 g/L foram atingidas, nas três diferentes condições de aeração empregadas, nos cultivos realizados em biorreator com controle automático de pH e utilizando o meio de cultivo com as concentrações de nutrientes aumentadas em 50% em relação ao meio Feist modificado descrito na literatura. As vacinas preparadas com os cultivos aeróbio e microaerófilo proporcionaram um maior grau de proteção nos testes de imunização realizados, e a formulação preparada a partir de um cultivo aeróbio realizado em biorreator com concentração celular superior a $2,0 \times 10^9$ UFC/mL conferiu o mesmo nível de proteção que três vacinas comerciais utilizadas para fins de comparação. Observações sobre os efeitos de inibição do crescimento provocadas por acúmulo de metabólitos ou excesso de substrato, indicaram o modo de operação do biorreator em batelada alimentada como promissor para obtenção de maior concentração celular. Em um experimento realizado nesta condição a biomassa foi aproximadamente quintuplicada em relação aos ensaios em batelada simples.

Palavras-chave: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, erisipela suína, condições de aeração, otimização de cultivo em biorreator, vacinas, SpaA.

ABSTRACT

Swine erysipelas is one of the diseases responsible for the great economic losses in swine-producing areas of the world. The bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* is the causative agent of erysipelas, and the vaccines currently available for prevention of this disease are produced with the whole broth culture containing the inactivated microorganism or its live-attenuated form. A surface protein was identified as the main antigen. It can be found in the culture supernatant or attached to the cell wall through interactions with the choline residues from the teichoic and lipoteichoic acids of this structure. Considering the lack of information in the scientific literature about studies concerning the growth pattern of this pathogen, the company Vallée S.A, a Brazilian industry of veterinary pharmaceutical products, established a partnership with researchers from the Chemical Engineering Department of UFSCar with the purpose of developing the technology required for the production of the cited vaccine. In this context, the objective of this work was to optimize the growing conditions of *E. rhusiopathiae* to establish a protocol for production of high cellular concentrations, enough to prepare a vaccine against swine erysipelas offering the same or a higher protection level compared to the commercially available formulations. To achieve this goal, the growth kinetics of this microorganism was investigated under different aeration conditions (aerobiosis, anaerobiosis and microaerophilic condition), changes in the medium nutrient's concentration were analyzed, and mice protection tests using the prepared vaccines were performed. The studies about the aeration influence on the microorganism growth and the antigen expression were made using a 4.0 L stirred-tank bioreactor, with an agitation frequency kept between 100 and 400 rpm and air or N₂ flow rate of 1.0 L/min. The studies for the improvement of the medium formulation were carried out in flasks incubated at static condition or under agitation of 200 rpm. The vaccines were prepared using medium harvested in both conditions. The temperature was set at 37°C and the initial pH at 8,0 in all experiments. Samples of culture supernatant and from cell extracts made with choline chloride were analyzed by electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) to evaluate the antigen expression. The preliminary electrophoresis results indicated that the antigen production is associated to the cell growth and its expression is favored in the presence of oxygen. Cellular concentrations around 1,8 g/L were reached, in all different aeration conditions employed, using the stirred-tank bioreactor operating with pH automatic control and using the culture medium with nutrients concentrations increased in 50 % from the Feist medium described in literature. The vaccines prepared in aerobic and microaerophilic condition led to higher protection levels in the challenge-exposure tests, and a formulation made from an aerobic culture in bioreactor having a cellular concentration over $2,0 \times 10^9$ CFU/mL showed the same immunizing power as the three commercial vaccines used for comparison purposes. Observations about the inhibitory effects of metabolites accumulation and substrate saturation on the microorganism growth pointed the fed-batch as a promising operation mode to produce larger amounts of biomass. Cellular concentrations reached in the experiment ran under these condition were increased around five times.

Keywords: *Erysipelothrix rhusiopathiae*, swine erysipelas, aeration conditions, optimization of bioreactor cultivation, vaccines, SpaA.

Lista de Figuras

Figura 2.1 – <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> NCTC 11004.....	8
Figura 3.1 – Esquema do procedimento utilizado para os experimentos realizados em uma etapa em meio líquido	32
Figura 3.2 – Procedimento de cultivo em frascos utilizando criotubos.....	33
Figura 3.3 – Etapas do procedimento para os ensaios em biorreator	35
Figura 3.4 – Etapas dos ensaios com diferentes condições de aeração para o preparo das bacterinas.....	41
Figura 4.1 – Valores da concentração de glicose e de densidade ótica do conjunto de ensaios S1 com o tempo de cultivo.	52
Figura 4.2 – Variação do valor de pH com o tempo de cultivo obtido no conjunto de ensaios S1.....	53
Figura 4.3 – Variação dos valores de DO nos cultivos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E, S2-F e S2-G em condições microaerófilas (a) ou aeróbias (b) com o tempo de cultivo.....	54
Figura 4.4 – Variação dos valores da concentração de glicose (Cs) nos cultivos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E, S2-F e S2-G em condições microaerófilas (a) ou aeróbias (b) com o tempo de cultivo..	55
Figura 4.5 – Valores de DO com o tempo de cultivo para os experimentos I1, I2 e I3	56
Figura 4.6 – Consumo de glicose com o tempo de cultivo para os experimentos I1, I2 e I3..	57
Figura 4.7 – Comparação entre os níveis de proteção conferidos pelas bacterinas preparadas em diferentes condições de aeração.....	58
Figura 4.8 – Crescimento celular dos cultivos realizados com diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura no meio.	59
Figura 4.9 – Consumo de glicose ao longo dos cultivos do conjunto de ensaios S5	60
Figura 4.10 – Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com meios de cultivo com diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura	60
Figura 4.11 – Comparação do crescimento celular dos cultivos realizados com ou sem adição de colina e/ou triptofano	61
Figura 4.12 – Eletroforese das amostras de sobrenadante e das proteínas de superfície da célula extraídas com solução de cloreto de colina, das quatro condições estudadas.....	63
Figura 4.13 – Acompanhamento do pH (a) e da velocidade de produção de dióxido de carbono (b) com o tempo de cultivo (Ensaio B1).....	64
Figura 4.14 – Formação de células, consumo de glicose e produção de ácido láctico no cultivo anaeróbico em biorreator com meio 1, durante batelada simples (Ensaio B1).....	64
Figura 4.15 – Valores de velocidade de produção de dióxido de carbono (a) e do pH (b) com o tempo do cultivo aeróbico com meio 1 (Ensaio B2).....	66
Figura 4.16 – Variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (a) e da frequência de agitação (b) com o tempo de cultivo (Ensaio B2)	67
Figura 4.17 – Variação da densidade ótica e das concentrações de glicose, ácido láctico e de células com o tempo de cultivo no ensaio aeróbico com meio 1 (Ensaio B2).....	67
Figura 4.18 – Valores de velocidade de produção de CO ₂ (a) e da variação de pH (b) com o tempo de cultivo no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3).....	69
Figura 4.19 – Variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (a) e da frequência de agitação (b) com o tempo de cultivo no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3). 69	
Figura 4.20 – Crescimento celular no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3)	70
Figura 4.21 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3).....	71

Figura 4.22 – Comparação entre os ensaios realizados com o meio de cultivo 1 em diferentes condições de aeração.	73
Figura 4.23 – Variação do pH (a) e da frequência de agitação (b) durante o ensaio microaerófilo, com o meio 2 e controle de pH (Ensaio B4).	74
Figura 4.24 – Crescimento celular no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 2 e controle de pH.	75
Figura 4.25 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 2.	75
Figura 4.26 – Comparação entre os três experimentos realizados em biorreator com o meio de cultivo 1 e o experimento microaerófilo realizado em biorreator com o meio de cultivo 2.	77
Figura 4.27 – Variações da frequência de agitação (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) e do pH (c) durante o cultivo aeróbio 1 com o meio de cultivo 2.	78
Figura 4.28 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 1 em biorreator com meio 2.	78
Figura 4.29 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio (1) em biorreator com meio 2 e controle de pH.	79
Figura 4.30 – Variações da frequência de agitação (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) e do pH (c) durante o cultivo aeróbio 2 com o meio de cultivo 2 e controle de pH.	81
Figura 4.31 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 2 em biorreator com meio 2 com controle de pH.	82
Figura 4.32 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio 2 em biorreator com meio 2 e controle de pH.	82
Figura 4.33 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 3 em biorreator com meio 2 e controle de pH.	83
Figura 4.34 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio 3 em biorreator com meio 2 e controle de pH.	84
Figura 4.35 – Comparação dos resultados dos testes de imunização em camundongos da bacterina preparada no ensaio 12 e três vacinas comerciais.	85
Figura 4.36 – Crescimento celular no ensaio anaeróbio com meio 2 e controle de pH.	85
Figura 4.37 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio anaeróbio em biorreator com meio 2 e controle de pH.	86
Figura 4.38 – Comparação do crescimento celular nos ensaios realizados com os meios de cultivo 1 e 2 nas diferentes condições de aeração.	88
Figura 4.39 – Comparação da produção de ácido láctico nos ensaios realizados com os meios de cultivo 1 e 2 nas diferentes condições de aeração.	89
Figura 4.40 – Eletroforese das amostras de extração das células com colina, das três condições de aeração estudadas.	90
Figura 4.41 – Relação entre concentração de glicose, ácido láctico e viabilidade celular.	91
Figura 4.42 – Comparação do crescimento celular entre os ensaios aeróbios com meio 2.	93
Figura 4.43 – Comparação do consumo de glicose e da produção de ácido láctico entre os cultivos aeróbios com meio 2.	93
Figura 4.44 – Curvas médias e desvio padrão dos perfis de consumo de glicose, formação de ácido láctico e crescimento celular dos ensaios aeróbios 1, 2 e 3 com meio 2.	94
Figura 4.45 – Simulação da etapa de batelada simples e da primeira fase de alimentação ($F = 0,05\text{L/h}$) utilizando os dados do ensaio B6.	97
Figura 4.46 – Simulação da segunda fase da etapa de batelada alimentada ($F = 0,12\text{L/h}$).	98

Figura 4.47 – Comparação entre a simulação e os dados experimentais para a batelada alimentada.....	99
Figura 4.48 – Crescimento celular do cultivo em batelada alimentada.....	100
Figura 4.49 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no cultivo em batelada alimentada.....	101
Figura 4.50 – Variação da rotação (a) e da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) no cultivo em batelada alimentada	102
Figura 4.51 – Velocidade de produção de CO ₂ (a) e variação do pH (b) durante o cultivo em batelada alimentada	103
Figura 4.52 – Eletroforese das amostras coletadas ao longo da batelada alimentada	104
Figura 4.53 – Comparação dos resultados de Densidade Ótica e produção de ácido láctico do cultivo em batelada alimentada e os ensaios em diferentes condições de aeração realizados em batelada simples.....	105
Figura 4.54 – Comparação entre o crescimento celular obtido nas condições experimentais descritas na literatura e as condições otimizadas.....	106

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 – Condições iniciais e principais resultados dos experimentos relatados na literatura sobre o cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i>	12
Tabela 3.1 – Composição do meio Ágar-Sangue	21
Tabela 3.2 – Composição do Tryptic Soy Agar	21
Tabela 3.3 – Composição do meio ágar-TPA	22
Tabela 3.4 – Composição da “Tryptose phosphate”	22
Tabela 3.5 – Meios líquidos de cultura utilizados nos experimentos.....	23
Tabela 3.6 – Lista dos experimentos, em ordem cronológica, com suas respectivas descrições e objetivos.....	36
Tabela 3.7 – Meios de cultura utilizados no conjunto de ensaios S2	38
Tabela 3.8 – Volume de inóculo e de meio de cultura nos cultivos I1, I2 e I3	40
Tabela 3.9 – Composição dos meios de cultivo utilizados no conjunto de ensaios S5	42
Tabela 3.10 – Condições testadas no conjunto de ensaios S6	44
Tabela 4.1 – Resultados de densidade ótica e UFC/mL no final dos cultivos de preparação das bacterinas.....	58
Tabela 4.2 – Balanço de carbono para cultivo anaeróbico (Ensaio B1), considerando 6 horas de cultivo e 3,0 L de volume	65
Tabela 4.3 – Balanço de carbono para cultivo aeróbico (Ensaio B1), considerando 9 horas de cultivo e 3,0 L de volume	68
Tabela 4.4 – Balanço de Carbono do ensaio microaerófilo com meio de cultivo 1	72
Tabela 4.5 – Resultados dos cultivos de <i>E. rhusiopathiae</i> realizados em diferentes condições de aeração com o meio 1	73
Tabela 4.6 – Resultados obtidos nos ensaios realizados com o meio 2 em diferentes condições de aeração	89
Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos dos ensaios em biorreator em batelada simples.....	92
Tabela 4.8 – Principais resultados dos ensaios aeróbios com meio 2 realizados em triplicata	94

Lista de abreviaturas e siglas

BHI: Brain Heart Infusion
BHIS: Brain Heart Infusion suplementado com soro animal
CER: velocidade de produção de dióxido de carbono
Cp: concentração de produto [g/L]
Cs: concentração de substrato [g/L]
Cx: concentração celular (g/L)
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO: densidade ótica
E. coli: Escherichia coli
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético
E. rhusiopathiae: Erysipelothrix rhusiopathiae
F: vazão volumétrica [L/h]
GW: dipeptídeo glicina-triptofano
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
kDa: kiloDalton
LPXTG: seqüência de aminoácidos leucina, prolina, aminoácido não especificado, treonina e glicina
M: molar (mol/L)
mM: milimolar
NMWL: limite nominal de massa molecular
PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS: solução de tampão fosfato
PspA: pneumococcal surface protein A
rpm: rotações por minuto
RspA: rhusiopathiae surface protein A
RspB: rhusiopathiae surface protein B
SDS: dodecilsulfato de sódio
SpaA: surface protective antigen A
S. pneumoniae: Streptococcus pneumoniae
TPA: tryptose phosphate
U_{ABS}: unidade de absorvância
UFC: unidades formadoras de colônia
Y_{xs}: coeficiente de rendimento de substrato a células [g_{células}/g_{substrato}]

Letras gregas

μ : velocidade específica de crescimento celular
 μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos.....	4
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	Vacinas.....	5
2.2	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	7
2.3	Cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i>	10
2.4	Produção, caracterização e extração do antígeno.....	13
2.5	Influência da aeração no cultivo de microrganismos.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1	Microrganismo.....	20
3.2	Meios de cultivo.....	20
3.2.1	Meios sólidos.....	20
3.2.1.1	Meio ágar-sangue.....	20
3.2.1.2	Meio ágar-TPA.....	22
3.2.2	Meios líquidos.....	22
3.3	Métodos analíticos, de purificação e de preparo de bacterinas.....	24
3.3.1	Determinação da concentração celular.....	24
3.3.1.1	Turbidimetria.....	24
3.3.1.2	Plaqueamento e Determinação de Células Viáveis.....	25
3.3.1.3	Método Gravimétrico.....	25
3.3.2	Determinação da concentração de etanol e de ácidos láctico, acético e fórmico.....	26
3.3.3	Determinação da concentração de glicose.....	26
3.3.4	Tratamento das amostras para análise da produção do antígeno (SpaA).....	26
3.3.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE.....	27
3.3.6	Preparo e testes de bacterinas.....	28
3.3.6.1	Inativação do cultivo e formulação das bacterinas.....	28
3.3.6.2	Teste das bacterinas.....	28
3.4	Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos.....	29
3.4.1	Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono.....	29
3.4.2	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.....	30
3.4.3	Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células.....	30
3.5	Metodologia experimental.....	31
3.5.1	Ativação do microrganismo em tubos inclinados e preparo de inóculo para ensaios em frascos.....	31
3.5.2	Preparação de cultura estoque em criotubos.....	32
3.5.3	Ativação de criotubos e preparo de inóculo para cultivos em frascos.....	33
3.5.4	Preparo de cultura estoque liofilizada.....	34
3.5.5	Cultivos em Câmara Incubadora.....	34
3.5.6	Cultivos em Biorreator.....	34
3.6	Descrição dos Experimentos.....	36
3.6.1	Experimentos em Câmara Incubadora.....	37
3.6.1.1	Conjunto S1 – Implementação da metodologia de cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i> em meio Feist disponível na literatura.....	37
3.6.1.2	Conjunto S2 – Otimização do meio de cultivo.....	38
3.6.1.3	Conjunto S3 – Otimização da fração de inóculo.....	39
3.6.1.4	Conjunto S4: Preparo de bacterinas em diferentes condições de aeração....	40

3.6.1.5	Conjunto S5: Aprimoramento do meio de cultivo com alteração nas concentrações de glicose e extrato de levedura.....	42
3.6.1.6	Conjunto S6: Cultivo com colina e /ou triptofano.....	43
3.6.2	Experimentos em Biorreator.....	44
3.6.2.1	Ensaio B1: Cultivo anaeróbico com o meio 1.....	44
3.6.2.2	Ensaio B2: Cultivo aeróbico com o meio 1.....	44
3.6.2.3	Ensaio B3: Cultivo microaerófilo (concentração de O ₂ em 5% da saturação com ar) com o meio 1.....	45
3.6.2.4	Ensaio B4: Cultivo microaerófilo (5% de O ₂) com o meio 2 e controle automático de pH.....	46
3.6.2.5	Ensaio B5: Cultivo aeróbico (30% de O ₂) com o meio 2 e controle automático de pH.....	46
3.6.2.6	Ensaio B6: Cultivo aeróbico (30% de O ₂) com o meio 2 e controle automático de pH (duplicata do ensaio 10).....	47
3.6.2.7	Ensaio B7: Cultivo aeróbico (30% de O ₂) com o meio 2 e controle automático de pH (triplicata do ensaio 10) para produção de bacterinas.....	47
3.6.2.8	Ensaio B8: Cultivo anaeróbico com o meio 2 e controle automático de pH.....	48
3.6.2.9	Ensaio B9: Cultivo aeróbico (30% O ₂) em batelada alimentada.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1	Experimentos em Câmara Incubadora.....	52
4.1.1	Conjunto S1.....	52
4.1.2	Conjunto S2.....	54
4.1.3	Conjunto S3.....	56
4.1.4	Conjunto S4.....	57
4.1.5	Conjunto S5.....	59
4.1.6	Conjunto S6.....	61
4.2	Experimentos em Biorreator.....	63
4.2.1	Ensaio B1 – cultivo anaeróbico com meio 1 sem controle de pH.....	63
4.2.2	Ensaio B2 – cultivo aeróbico com meio 1 sem controle de pH.....	66
4.2.3	Ensaio B3: cultivo microaerófilo com meio 1 sem controle de pH.....	69
4.2.4	Ensaio B4: cultivo microaerófilo com meio 2 e controle de pH.....	74
4.2.5	Ensaio B5: cultivo aeróbico (1) com meio 2 e controle de pH.....	77
4.2.6	Ensaio B6: cultivo aeróbico (2) com meio 2 e controle de pH.....	80
4.2.7	Ensaio B7: cultivo aeróbico (3) com meio 2 e controle de pH para o preparo de bacterina.....	83
4.2.8	Ensaio B8: cultivo anaeróbico com meio 2 e controle de pH.....	85
4.2.9	Comparação dos resultados obtidos em biorreator operado em batelada simples.....	87
4.2.10	Ensaio B9: cultivo aeróbico em batelada alimentada.....	95
5	CONCLUSÕES.....	108
6	REFERÊNCIAS.....	110

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura é uma atividade econômica que continua em franca expansão. O Brasil ocupa a 4ª colocação na produção de suínos, atrás da China, União Européia e Estados Unidos. Com uma média nos últimos cinco anos de 2,7 milhões de toneladas/ano, a carne suína brasileira representa 2,8% da produção mundial. Por ter um dos menores custos de produção, o Brasil se consolida como um dos grandes fornecedores no mercado mundial (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - dados da ABIPECS).

Dados publicados no ano de 2000 pela FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) indicam que o crescimento anual do consumo de carnes no mundo até 2015 deve ficar em torno de 2%. Considerando ser a carne suína a mais consumida no mundo, posição de liderança conquistada desde 1976, uma parcela significativa deste percentual deverá ser atendida pela expansão da produção de suínos. É nesse contexto que investimentos significativos têm sido realizados em diversos aspectos da suinocultura, como por exemplo, no melhoramento genético das matrizes ou na tecnologia de produção de vacinas.

O objetivo da utilização de vacinas na suinocultura é o de melhorar as condições de defesa dos animais contra os agentes patogênicos aos quais estão expostos continuamente no ambiente em que são criados. Em situações normais, as vacinas são usadas principalmente de maneira preventiva, mas eventualmente são administradas durante o curso de uma infecção com a finalidade de proteger aqueles animais do rebanho que estejam expostos ao risco dessa doença (Barcellos *et al.*, 1996).

O histórico do desenvolvimento das vacinas remonta a 1797 quando Edward Jenner descobriu a vacina contra o vírus da varíola. Já as primeiras vacinas contra doenças

bacterianas foram desenvolvidas com microrganismos atenuados no final do século XIX (Haesenbrouck *et al.*, 2004).

Louis Pasteur foi o descobridor da possibilidade de modificar artificialmente a virulência de agentes infecciosos e utilizá-los para induzir proteção. Em 1880, ele e seus colegas mostraram que uma linhagem atenuada de *Pasteurella multocida* era capaz de proteger galinhas de *fowl cholera*. A primeira vacina suína foi desenvolvida dois anos depois (Haesenbrouck *et al.*, 2004). Em 1882, Thuillier, um jovem colega de Pasteur, e Detmers em Chicago, independentemente, descobriram o agente etiológico da erisipela suína, *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Inoculando a bactéria em coelhos, animais pouco suscetíveis a *E. rhusiopathiae*, Pasteur e Thuillier observaram aumento na virulência de uma linhagem para os coelhos e o decréscimo da virulência para os suínos. A vacina atenuada da erisipela suína tinha sido descoberta (Bazin, 2003). Já em 1886, Salmon e Smith mostraram que pombos vacinados com *Salmonella* inativada por aquecimento foram protegidos contra um desafio com a mesma bactéria (Bazin, 2003). Este resultado abriu as portas para um novo tipo de vacina baseada em bactérias inativadas e/ou suas toxinas.

Atualmente, as vacinas contra doenças bacterianas consistem de microrganismos vivos atenuados, bactérias inativadas, componentes microbianos purificados, polissacarídeos conjugados a proteínas carreadoras, proteínas recombinantes ou DNA. Nem todos esses tipos de vacinas estão disponíveis para uso em suínos. As vacinas comumente empregadas contra doenças bacterianas na suinocultura contêm microrganismos inteiros inativados, componentes microbianos purificados, ou proteínas recombinantes. Vacinas com bactérias vivas são raramente utilizadas na Europa Ocidental e Japão (Haesenbrouck *et al.*, 2004). No caso da erisipela, a prevenção é feita pelo uso de vacinas com o microrganismo atenuado (Japão) e com o microrganismo inativado (demais países) contendo todo o caldo de cultivo já que o principal agente antigênico identificado é uma fração protéica de 64-69 kDa,

presente tanto na parede celular da bactéria quanto no sobrenadante do cultivo. Juntamente com a pneumonia enzoótica e a disenteria suína, a erisipela está entre as enfermidades que causam os maiores prejuízos na suinocultura mundial (Makino *et al.*, 1998). O agente causador da erisipela suína é o bacilo *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Estima-se que de 30 a 50% dos suínos sadios alojam este microrganismo em suas tonsilas e outros tecidos linfóides, e podem eliminar a bactéria nas fezes e secreções oronasais, criando uma importante fonte de infecção (Wood, 1992). As bactérias contaminam o solo, a água, o local de repouso dos animais e os alimentos, de forma que o contágio ocorre pela ingestão de alimentos ou água contaminados, bem como através de ferimentos na pele (Sobestiansky *et al.*, 1999). Fatores ambientais como mudanças de temperatura, ou de estresse, como alteração na dieta ou transporte repentino estão associados ao aparecimento da erisipela.

Apesar da complexidade e da falta de uma compreensão detalhada sobre a interação do microrganismo e o hospedeiro, as vacinas disponíveis comercialmente têm combatido satisfatoriamente essa doença em suas formas aguda e subaguda, porém são incapazes de preveni-la na forma crônica (Wood, 1992).

Os estudos sobre *E. rhusiopathiae* têm focado quase que exclusivamente a elucidação dos antígenos desse bacilo, com o propósito de tornar possível o desenvolvimento de uma vacina com as subunidades antigênicas desse patógeno. Porém, para viabilizar a produção eficiente, em escala industrial, tanto de vacina contendo subunidades antigênicas quanto das vacinas em uso (microrganismos atenuados ou inativados), são necessários estudos sobre a otimização do cultivo desse microrganismo em condições semelhantes às empregadas industrialmente, o que implica o uso de biorreatores tipo tanque agitado e aerado. Entretanto, nas publicações sobre o assunto, o cultivo de *E. rhusiopathiae* é feito em batelada com o uso de frascos, agitados ou não, em incubadora a 37°C e, portanto, sem o controle adequado de variáveis importantes, tanto para o crescimento celular quanto para a formação do produto,

como o pH e as condições de aeração. É necessário, porém, para a definição das condições ótimas de cultivo, que essas variáveis sejam adequadamente controladas, utilizando biorreatores equipados com instrumentos para medida e controle de temperatura, pH, suprimento de oxigênio dissolvido e velocidade de agitação.

Diante da escassez de informações sobre o processo de produção de vacina contra erisipela suína em escala industrial, a empresa Vallée S.A., indústria nacional que atua no mercado de medicamentos de uso veterinário, estabeleceu uma parceria (Projetos de Extensão ProEx 23112.000371/2005-74 e 23112.000193/2006-80) com pesquisadores do DEQ/UFSCar visando ao desenvolvimento de tecnologia para a produção da referida vacina. Este trabalho se insere nesse contexto.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- a) estudar o crescimento de *E. rhusiopathiae* em diferentes condições de aeração em biorreatores do tipo tanque agitado e aerado para determinação de parâmetros cinéticos de crescimento celular.
- b) avaliar a expressão de antígeno nas diferentes condições de cultivo empregadas.
- c) a partir das informações obtidas no item (a), estabelecer um protocolo de cultivo para a obtenção de altas concentrações celulares visando à posterior preparação de bacterinas (vacinas com o microrganismo inativado) que ofereçam grau de proteção similar ou superior às vacinas atualmente disponíveis no mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Vacinas

As vacinas são formulações que contêm agentes infecciosos ou seus produtos que induzem a produção de anticorpos pelo organismo vacinado. Atualmente existem diversas técnicas de confecção de vacinas, sendo que algumas destas surgiram recentemente com o avanço dos conhecimentos nos campos da Imunologia e Biologia Molecular. A escolha do tipo de vacina a ser produzida depende, dentre outros fatores, do nível de conhecimento do mecanismo de interação patógeno-hospedeiro e também do volume do investimento a ser feito no desenvolvimento do processo. As técnicas mais utilizadas na produção de vacinas estão resumidas a seguir (Abbas *et al.*, 1994):

- Organismos inteiros atenuados: utiliza formas não-patogênicas do microrganismo desejado. A perda da patogenicidade pode ser induzida pelo crescimento do patógeno em condições anormais. A vantagem das vacinas atenuadas é que o microrganismo atenuado simula uma infecção sem provocar a doença, e por estar vivo possibilita uma estimulação antigênica contínua, dando tempo suficiente para produção de células de memória pelo sistema imunológico do organismo infectado. Por outro lado, apresenta o risco do patógeno se converter em sua forma virulenta, principalmente quando este encontra sistemas imunes debilitados que permitem seu crescimento. Atualmente as técnicas de engenharia genética estão sendo utilizadas para contornar essas desvantagens, deletando os genes que causam a virulência.
- Organismos inteiros inativados: utiliza o microrganismo morto por aquecimento ou meios químicos, mas de forma que os antígenos de superfície permaneçam intactos.

Possui a vantagem de não permitir a multiplicação do patógeno, porém necessita do uso de adjuvantes para prolongar o tempo de exposição dos antígenos ao sistema imune.

- Subunidades antigênicas purificadas: utiliza apenas partes do patógeno, como proteínas e polissacarídeos, necessárias para induzir uma resposta imune, ao invés de organismos inteiros. Este tipo de vacina evita os riscos das vacinas celulares, porém tem um custo mais elevado de produção e de investimento em pesquisa e nem sempre proporciona nível de proteção semelhante aos das vacinas celulares.
- Peptídeos sintéticos: utiliza peptídeos que representam as regiões do antígeno (que nesse caso precisa ser protéico) que são identificadas pelas células do sistema imunológico. Tem a desvantagem de necessitar do uso de adjuvantes e de proteínas carregadoras para apresentação adequada dos peptídeos, além do elevado custo e dificuldade da síntese propriamente dita (Ertl e Xiang, 1996).
- Vetores vivos recombinantes: utiliza um microrganismo atenuado como vetor (viral ou bacteriano) para veicular os antígenos ou os genes codificantes dos antígenos no organismo vacinado. No caso de vetores bacterianos, podem ser usados microrganismos patogênicos atenuados (Ex: *Salmonella* spp.) ou comensais (Ex: *Lactobacillus* spp.). Apresenta a vantagem de possibilitar imunização oral ou nasal, além de dispensar o uso de adjuvantes.
- DNA em plasmídeos: Este método consiste na injeção de DNA na forma de plasmídeos em células receptoras, normalmente musculares, ocasionando uma forte resposta imune. A técnica acaba induzindo a expressão de proteínas codificadas por este DNA que então ativam linfócitos T citotóxicos e auxiliares, e a produção de anticorpos (Liu, 1995).

As vacinas utilizadas contra a erisipela suína são do tipo que contém o microrganismo atenuado ou inativado (Wood, 1992). Acredita-se que as vacinas com microrganismos vivos atenuados são mais eficientes na indução da imunidade mediada por células que as vacinas inativadas e que, portanto seriam mais efetivas contra bactérias intracelulares facultativas (como a *E. rhusiopathiae*). Porém, tem sido mostrado que as vacinas inativadas também são capazes de induzir a imunidade mediada por células, dependendo do adjuvante usado na formulação da vacina (Haesebrouck *et al.*, 2004).

Um aspecto importante sobre as vacinas contra a erisipela é o efeito de proteção cruzada oferecido por diferentes sorotipos de *E. rhusiopathiae*: embora as vacinas inativadas sejam preparadas com o sorotipo 1 e as vacinas atenuadas com o sorotipo 2, ambas oferecem proteção contra linhagens de *E. rhusiopathiae* de sorotipos 1 e 2. Esse efeito de proteção cruzada mostra que a proteção não é sorotipo-específica (Takahashi *et al.*, 1984).

2.2 *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Erysipelothrix rhusiopathiae é um bacilo Gram-positivo (embora possa parecer Gram-negativo porque descolore rapidamente no teste de Gram), anaeróbio facultativo, não formador de esporos, sem mobilidade e que é classificado no gênero *Erysipelothrix* juntamente com outras duas espécies, *E. tonsillarum* e *E. inopinata*. A espécie *E. rhusiopathiae* é classificada em 23 sorotipos e o tipo N, de acordo com os antígenos peptidoglicanos da parede celular da bactéria (Kucsera, 1973). Os suínos são suscetíveis a 15 sorotipos, sendo que o sorotipo 1 (subdividido em 1a e 1b) e o sorotipo 2 (subdividido em 2a e 2b) são os mais importantes na suinocultura – 80% das linhagens de *E. rhusiopathiae* isoladas de suínos pertencem aos sorotipos 1a, 1b e 2b (Wood e Harrington, 1978).

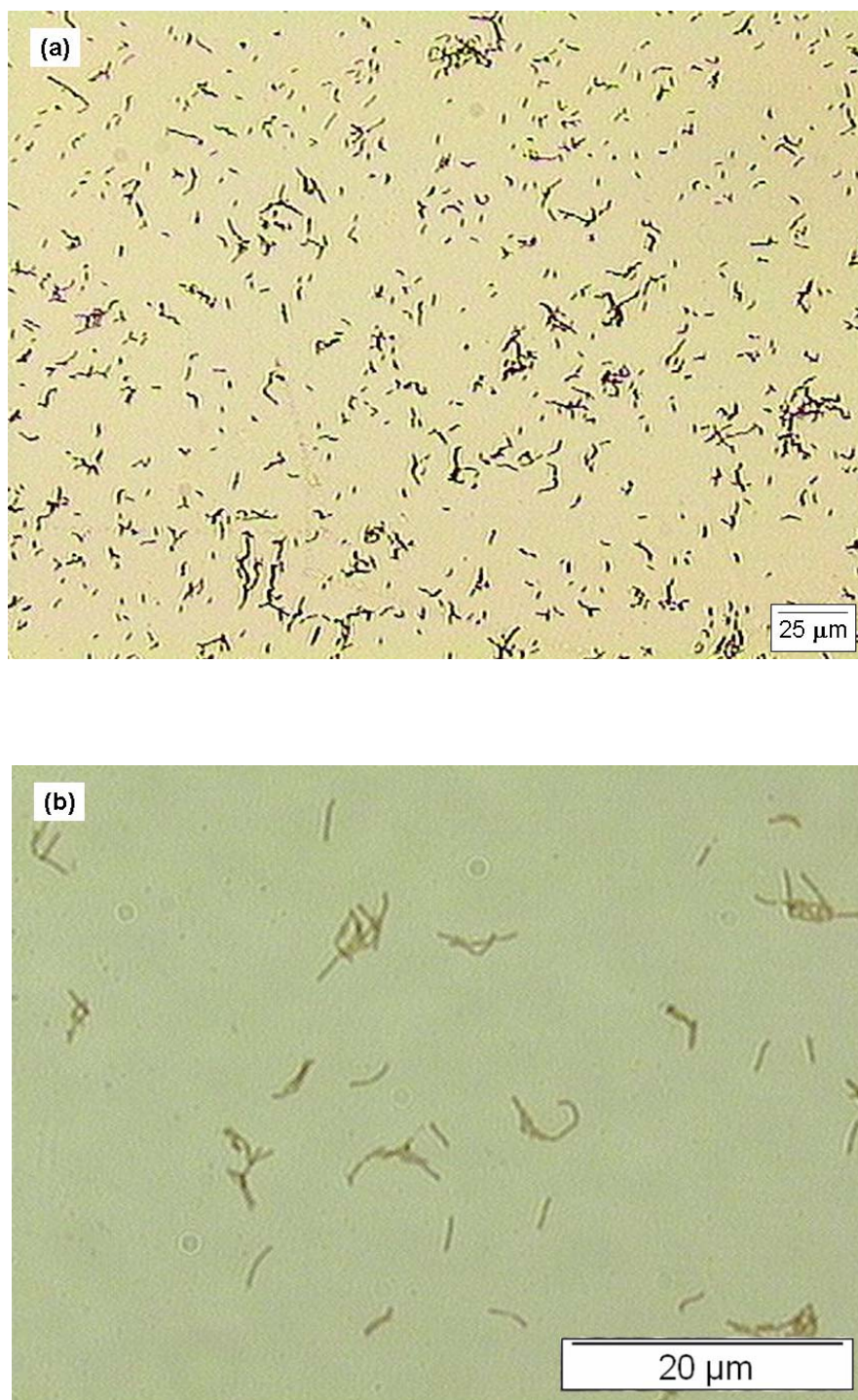


Figura 2.1 – *Erysipelothrix rhusiopathiae* NCTC 11004: (a) aumento de 200 vezes; (b) aumento de 1000 vezes. Imagens capturadas no Laboratório de Engenharia Bioquímica – DEQ/UFSCar.

O crescimento do microrganismo ocorre em temperaturas de 15 a 44°C, com a temperatura ótima variando entre 30 e 37°C. O pH ótimo situa-se na faixa de 7,2 a 7,6, mas pode variar entre 6,7 e 9,2 (Sneath *et al.*, 1951).

Lachmann e Deicher (1986) descreveram a presença de uma cápsula neste microrganismo e mais tarde estudos revelaram que esta estrutura estava relacionada com sua patogenicidade, sendo responsável pela resistência da bactéria à fagocitose e identificada como um antígeno não protéico com massa molecular de 14 a 22 kDa. Outro fator de virulência identificado é a enzima neuraminidase (Müller e Krassemann, 1976) que tem importante papel na adesão da bactéria e subsequente invasão das células hospedeiras. Estas observações sugerem que a patogenicidade de *E. rhusiopathiae* está principalmente relacionada à sua habilidade de sobrevivência no interior das células dos organismos infectados, mas as bases moleculares dessa interação assim como do mecanismo de aquisição de imunidade não estão completamente resolvidas (Shimoji, 2000).

Os maiores impactos comerciais provocados por infecções causadas por *E. rhusiopathiae* estão relacionados a doenças nos suínos, porém infecções em carneiros, perus e patos também são de importância econômica (Conklin e Steele, 1979).

Em suínos, *E. rhusiopathiae* causa a erisipela, também conhecida como ruiva dos suínos, enfermidade do tipo hemorrágica que provoca septicemia aguda ou subaguda e lesões crônicas proliferativas. A forma aguda é difícil de ser diferenciada de outras doenças, uma vez que produz elevação na temperatura e perda de apetite, embora os animais continuem bebendo água. A erisipela cutânea identifica-se claramente pela presença de manchas em forma de diamante, de cor púrpura na pele, situadas no abdômen e no dorso dos animais. A forma crônica pode causar artrite, aumento no tamanho das articulações e dificuldade de movimento. Já a erisipela cardíaca ocorre em suínos adultos, produzindo lesões nas válvulas

do coração. Também ocorrem falhas reprodutivas: nos machos a doença afeta a produção das células espermiogênicas, e nas fêmeas pode induzir o aborto.

Em humanos, o *E. rhusiopathiae* causa a erisipelóide (a erisipela humana é causada por estreptococos), uma lesão eritematosa e edematosa de pele, localizada, ocorrendo geralmente nas mãos e dedos, podendo haver inflamação nas articulações da região. É caracterizada como uma doença ocupacional, infectando pessoas que trabalham com manipulação ou processamento de carne, agricultores, pescadores, veterinários, trabalhadores de curtumes, laboratoristas entre outros (Reboli e Farrar 1989). A bactéria foi ocasionalmente isolada em casos de endocardite, mas raramente causa doença septicêmica aguda em humanos. A infecção ocorre através de ferimentos na pele, sendo muito rara a ocorrência de outras vias de penetração (Straw *et al.*, 1999).

2.3 Cultivo de *E. rhusiopathiae*

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

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

Feist *et al.* (1976) realizaram um estudo sobre as necessidades nutricionais de *E. rhusiopathiae* e verificaram que a maior parte das proteínas do soro de cavalo não era

consumida pelo microorganismo. Foi formulado então um meio de cultivo livre de soro, contendo glicose, Tween 80, extrato de levedura, peptona nº 2, arginina e tampão fosfato, desde então chamado de meio Feist, com o qual foram obtidos ótimos resultados para o crescimento do bacilo em estudo.

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

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

Todos os experimentos relatados foram conduzidos em frascos agitados, mantidos em câmara incubadora, sob condições estáticas ou sob agitação, sem o controle do pH e das condições de aeração. Os principais dados sobre estes cultivos estão resumidos na tabela a seguir:

Tabela 2.1 – Condições iniciais e principais resultados dos experimentos relatados na literatura sobre o cultivo de *E. rhusiopathiae*

Fonte	Kludas e Meeese (1967)	Groschup e Timoney (1990)	Zarkasie et al. (1996)
Linhagem do microrganismo	10-T	EI-6P; Me-7; T 28; SE-9; Frankfurt XI; Doggerschabe	Shizuoka-63, 82-510; 82-527; 44; Tama 96; Kg-2; SE-9
Meio de cultivo	BHIS	Feist modificado; BHIS	Feist modificado; Triptose fosfato com 0,1% de Tween 80
pH inicial	NC	8,0	8,0
Temperatura (°C)	NC	37	37
Fração de inóculo (v/v)	10%	1%	1%
Tempo de cultivo (h)	6	20	23
Conc. Celular (final da fase exponencial)	0,59 g/L	1,0 g/L ^{*1}	0,9 ^{*1} (DO a 420 nm)
μ_{\max} (h ⁻¹)	NC	0,45 ^{*2}	0,42 ^{*2}

NC – não consta.

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

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

Sobre as exigências nutricionais e o metabolismo de *E. rhusiopathiae*, sabe-se que, aparentemente, arginina não é sintetizada pelo microorganismo, mas é consumida em grandes quantidades e metabolizada em citrulina e ornitina. Tween 80, assim como a glicose, é considerado promotor do crescimento, e segundo Ewald (1981), o triptofano também desempenha este papel. Em estudo realizado com 14 diferentes carboidratos, somente glicose, frutose e galactose foram fermentadas em todas as condições testadas (White e Shuman, 1961). O catabolismo da glicose segue majoritariamente a via Embden-Meyerhof-Parnas, e uma pequena parcela é metabolizada pela via da hexose monofosfato. O principal metabólito produzido em condição anaeróbia é o ácido láctico, mas também há produção de ácido acético, ácido fórmico e etanol em menores quantidades (Robertson e McCullough, 1968).

2.4 Produção, caracterização e extração do antígeno

Diversos estudos têm sido realizados sobre a identificação do(s) antígeno(s) de *E. rhusiopathiae*.

White e Vervej (1970) descreveram um complexo glicolipoprotéico de 200kDa como um antígeno protetor extraído do sobrenadante do meio de cultura. Posteriormente, Rothe (1982) descreveu um antígeno protéico de 66-64 kDa, enquanto Lachman e Deicher (1986) mostraram que este antígeno estava presente tanto na parede celular como no meio de cultura.

Em 1990, Gálan e Timoney clonaram o gene correspondente a essa proteína da linhagem virulenta E1-6P de *E. rhusiopathiae* e expressaram um antígeno de 64 - 66 kDa fusionado à β -galactosidase em *E. coli*. Essa proteína recombinante ofereceu proteção incompleta nos testes de imunização com camundongos e atribuiu-se essa baixa atividade antigênica a possíveis alterações na conformação da proteína devido à fusão com a β -galactosidase.

Groschup *et al.* (1991) investigaram diferentes tratamentos (adição de ácido quente, de NaOH 10 mM, aplicação de ultra-som ou adição de EDTA) para obtenção de antígenos de *E. rhusiopathiae* (linhagens T 28 – sorotipo 2b, e Frankfurt XI – sorotipo N) tanto do sobrenadante como de extratos celulares. Os tratamentos com EDTA e com NaOH 10 mM produziram extratos altamente protetores, enquanto que o sobrenadante mostrou-se menos protetor.

Timoney e Groschup (1993) isolaram uma proteína de 66-64 kDa do antígeno de *E. rhusiopathiae* da linhagem Frankfurt XI, sorotipo N. Entretanto, a imunização de camundongos exclusivamente com a proteína isolada não levou à proteção alcançada com imunizações utilizando extratos brutos obtidos com NaOH 10mM ou EDTA. Os autores

sugeriram que formas de altas massas moleculares do antígeno formando complexos com glicolipídeos em extratos brutos, análogos ao complexo glicolipoprotéico de 200 kDa, poderiam ser mais imunogênicos do que o antígeno 66-64 kDa purificado.

Shimoji *et al.* (1994) sugeriram que o complexo glicolipoprotéico de 200 kDa descrito por White e Vervey seria a cápsula do microrganismo por esta estrutura estar relacionada com a proteção e também estar presente no sobrenadante do cultivo (segundo os autores a cápsula é facilmente removida da superfície da parede da bactéria). Porém, apesar da cápsula ser um fator determinante de virulência, ela é fracamente imunogênica e um teste feito com camundongos imunizados com a cápsula purificada não ofereceu proteção frente ao desafio com uma linhagem virulenta, sugerindo que uma molécula na superfície da célula, diferente da cápsula, deve ser importante na indução da produção de anticorpos protetores.

Zarkasie *et al.* (1995) prepararam vacinas utilizando a cultura inteira (células e sobrenadante), já que os antígenos estão presentes em ambas as fases. As vacinas ofereceram diferentes níveis de proteção em testes realizados com camundongos, de acordo com o meio de cultivo utilizado, sendo que neste estudo o meio à base de BHI suplementado com soro de cavalo apresentou melhores resultados que o meio Feist. O resultado oposto foi relatado por Groschup e Timoney (1990). Zarkasie *et al.* atribuíram a disparidade entre estes resultados ao fato de terem sido utilizadas diferentes linhagens do microrganismo tanto para a preparação das bacterinas quanto para o desafio em camundongos. De qualquer forma, ambos os estudos identificaram nas análises por immunoblotting a proteína de 64-66 kDa como o antígeno predominante.

Yamazaki *et al.* (1999) purificaram o antígeno denominado pelos autores como P64, contendo proteínas de 64 e 66 kDa a partir da linhagem Agata (sorotipo 5), e doses de 500 e 100 µg desse antígeno ofereceram o mesmo grau de proteção que a vacina com o microrganismo atenuado em testes de imunização realizados em suínos.

Kitajima *et al.* (2000) prepararam anticorpos monoclonais (MAbs) que reconheceram dois diferentes epítomos em uma mesma proteína de 67 kDa presente na extração com NaOH das células do microrganismo. Os autores estudaram quinze diferentes linhagens de *E. rhusiopathiae* que demonstraram apresentar diferentes quantidades do antígeno de 67 kDa e os resultados dos testes de imunização em camundongos indicaram que as bacterinas com maior concentração deste antígeno ofereceram maiores níveis de proteção.

Makino *et al.* (1998) expressaram em *E. coli* um antígeno de *E. rhusiopathiae* (sorotipo 2, linhagem Tama-96) de 606 resíduos de aminoácidos e 64 kDa designado como SpaA (surface protective antigen A) e sugeriram que a região C-terminal desta proteína poderia ser candidata a uma vacina de subunidade contra a erisipela. Shimoji *et al.* (1999) localizaram o epítomo protetor da SpaA na região N-terminal e Imada *et al.* (1999) produziram uma proteína truncada contendo essa região N-terminal da SpaA mais um hexâmero de histidina que conferiu proteção em suínos nos testes de imunização contra linhagens virulentas de *E. rhusiopathiae* sorotipos 1a e 2b (linhagens Fujisawa e 82-875 respectivamente). Foi observada também reação do antisoro tanto de camundongos quanto de suínos com uma proteína de 43 kDa, identificada como um fragmento da SpaA.

A análise da seqüência de aminoácidos da SpaA revelou uma região C-terminal composta por oito repetições de vinte aminoácidos cada, iniciadas pelo dipeptídeo glicina-triptofano (GW) (Makino *et al.*, 1998). Uma proteína com 597 aminoácidos mais um peptídeo sinal de 29 aminoácidos, resultando numa proteína de 69 kDa foi descrita por Shimoji *et al.* (1999) a partir da linhagem Fujisawa, sorotipo 1a, e devido a sua grande semelhança com a SpaA esta foi denominada de SpaA.1. Esta proteína possui em sua região C-terminal o mesmo módulo GW, porém apresenta nove repetições.

Esse mesmo motivo foi observado em proteínas de outras bactérias, entre elas a proteína PspA de *S. pneumoniae*, e está associado a um mecanismo específico de adesão de

algumas proteínas de superfície de bactérias Gram-positivas à parede celular. Neste mecanismo, as repetições da região C-terminal funcionam como uma âncora e fazem interações com os ácidos teicóico e lipoteicóico associados à membrana mediadas por resíduos de colina. Por essa razão essas proteínas são classificadas como CBP (*choline-binding proteins*). No caso tanto da SpaA quanto da PspA, a proteína é excretada para o meio de cultivo após ser sintetizada e volta para a parede celular onde fica presa através destas interações da porção C-terminal da molécula. O entendimento deste mecanismo de ancoramento destas proteínas fez surgir o interesse em novas estratégias de extração das mesmas, uma vez que se tratam de antígenos que podem vir a ser utilizados em vacinas de subunidades antigênicas. Um estudo realizado com *S. pneumoniae* mostrou que a PspA é liberada da parede celular e se apresenta majoritariamente no meio de cultivo quando utilizam-se altas concentrações de colina (de 0,5 a 3%) na formulação do meio, ou quando o microrganismo é cultivado em um meio deficiente em colina (Yother e White, 1994). As mesmas autoras patentearam esse método para obtenção e purificação desta proteína. No caso de cultivar o microrganismo num meio sem colina, deve-se usar de 0,0005 a 0,1% de etanolamina, que é então utilizada pela bactéria para síntese de sua parede. Neste caso, as proteínas que têm seu mecanismo de ancoramento dependente de colina não são capazes de prender-se à superfície celular e ficam livres no sobrenadante (Yother, 1993). Cabe dizer que existem proteínas que possuem o motivo GW, mas que não são excretadas para o meio ou têm um mecanismo de ligação à parede bacteriana distinto, como é o caso de uma autolisina de *S. pneumoniae*, por exemplo (Yother e White, 1994). Makino *et al.* (2000), mostraram que tanto o cultivo na presença de colina quanto a lavagem das células com uma solução deste composto liberam a SpaA da superfície celular de *E. rhusiopathiae*.

Duas novas proteínas de *E. rhusiopathiae*, denominadas RspA e RspB (*rhusiopathiae surface protein*), foram descobertas (os dois genes foram encontrados em todas

as linhagens de diferentes sorotipos estudadas) e tiveram a seqüência nucleotídica de seus genes determinada (Shimoji *et al.*, 2003). Ambas são proteínas de adesão celular encontradas tanto na superfície da bactéria quanto no sobrenadante do cultivo e possuem o motivo de adesão LPXTG, comum em bactérias Gram-positivas (Navarre e Schneewind, 1999). As duas proteínas foram expressas em *E. coli* e no desafio realizado com camundongos imunizados com essas proteínas recombinantes a RspA ofereceu proteção, sendo identificada portanto como um novo antígeno de *E. rhusiopathiae*.

Em 2004 um novo sistema de vacinação foi proposto por Cheun *et al.*, com a SpaA sendo produzida em *Lactococcus lactis*. A vacinação oral e nasal com esse microrganismo recombinante ofereceu proteção a todos os camundongos desafiados com 100 LD₅₀ da linhagem virulenta Tama-96 de *E. rhusiopathiae*.

Watanabe *et al.*, (2004) reportaram um polipeptídeo de 46,5 kDa preparado a partir da SpaA, porém sem o peptídeo sinal da região N-terminal e sem as seqüências de repetições do módulo GW da região C-terminal, como um possível antígeno protetor denominado de 46,5 KPA. Os autores patentearam o processo de produção dessa proteína em *Brevibacillus choshinensis*. Neste sistema de expressão, a proteína é excretada para o meio de cultivo e cerca de 50% do produto se torna insolúvel por um processo de coagulação na cultura. Então é feito um processo de ultrafiltração do material insolúvel, que é em seguida solubilizado em meio alcalino e o antígeno é purificado por cromatografia de troca iônica.

Como a proteína SpaA é expressa em sua forma solúvel em *E. coli*, e o processo de purificação desenvolvido por Watanabe *et al.*, com a proteína insolúvel envolve um processo de no mínimo três etapas, Ushijima, Sakaguchi, e Tokunaga, (2005) patentearam um processo de produção desse antígeno com algumas mutações em seu gene codante para obterem a SpaA insolúvel, nos corpos de inclusão do microrganismo. Assim, segundo os autores, a proteína é obtida com alto grau de pureza através de etapas simples de

centrifugação e lavagem e pode ser utilizada em processos de vacinação precisando para isso somente ser solubilizada e diluída.

2.5 Influência da aeração no cultivo de microrganismos

Aspectos morfológicos e metabólicos são diretamente influenciados pela condição de aeração empregada em cultivos microbianos. Os principais gases que afetam o crescimento celular são o oxigênio e o dióxido de carbono. Os organismos procariontes respondem de maneiras tão variadas à presença de oxigênio livre que são classificados em quatro diferentes grupos quanto seu comportamento frente as diferentes condições de aeração (Pelczar Jr, M. J., Chan, E. C. S., Krieg, N. R., 1986, p.100):

- a) Bactérias aeróbias: requerem oxigênio para o crescimento;
- b) Bactérias anaeróbias: não usam oxigênio para obter energia e este gás é tóxico para as mesmas; algumas espécies toleram baixos níveis de oxigênio (aerotolerantes);
- c) Bactérias anaeróbias facultativas: não requerem oxigênio para o crescimento apesar de poderem utilizá-lo para produção de energia se este estiver disponível.
- d) Bactérias microaerófilas: requerem baixos níveis de oxigênio para o crescimento, mas não toleram altas concentrações deste gás.

Não constam na literatura relatos sobre a influência da condição de aeração nos cultivos de *E. rhusiopathiae*. Estudos sobre outros microrganismos relatam alterações metabólicas e morfológicas provocadas por diferenças nas concentrações de oxigênio empregadas nos cultivos, como é o caso, por exemplo, de *Streptococcus pneumoniae*, bactéria patogênica, Gram-positiva e aerotolerante: Gonçalves *et al.*, (2006) verificaram que após ser cultivado em anaerobiose e passar para uma condição de aerobiose o microrganismo (sorotipo

23F) sofre uma alteração morfológica e libera sua cápsula no sobrenadante do cultivo, diferentemente da situação de ausência de oxigênio, onde a bactéria se apresenta envolvida por uma espessa cápsula. Assim as características morfológicas refletem os diferentes mecanismos de adaptação desenvolvidos para cada tipo de ambiente e situação, e as diferenças nas condições de aeração podem mimetizar estas mudanças em certa extensão. Segundo Weiser *et al.* (1994), as variações fenotípicas, que podem ser induzidas por alterações na oferta de oxigênio, são mecanismos importantes que permitem às bactérias patogênicas se adaptarem a diferentes nichos ambientais.

Assim, no contexto da produção de vacinas bacterianas, estudos sobre variáveis de processo que podem influenciar tanto o crescimento e metabolismo do microrganismo quanto características fenotípicas do mesmo, como é o caso da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultura, fazem-se extremamente relevantes para o desenvolvimento de protocolos de cultivo bacteriano que levem a altas concentrações celulares e de componentes antigênicos para a produção de tais vacinas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as cepas de *Erysipelothrix rhusiopathiae* NCTC 11004 e 11002 denominadas “cepa vacina” e “cepa desafio”, respectivamente. Esta última foi utilizada apenas nos testes imunológicos das bacterinas em camundongos, como agente de contaminação. Ambas as cepas foram conservadas em criotubos com sangue desfibrinado ou meio Feist com 10% (v/v) de glicerol, mantidos em ultrafreezer a -70 °C, e em ampolas liofilizadas.

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 Meios sólidos

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

3.2.1.1 Meio ágar-sangue

Este meio foi utilizado para verificação da morfologia e pureza das colônias durante os cultivos do microrganismo. Nesse meio, as células de *E. rhusiopathiae* provocam α -hemólise do sangue presente na formulação, o que juntamente com a forma, tamanho e

ausência de coloração das colônias permite a caracterização da espécie em estudo. A Tabela 3.1 mostra a composição do meio ágar-sangue utilizado.

Tabela 3.1 – Composição do meio Ágar-Sangue

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

* composição descrita na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição do Tryptic Soy Agar

Componente	Massa (g)
Hidrolizado enzimático de caseína	15
Hidrolizado enzimático de soja	5
NaCl	5
Ágar	15
pH 7.3 ± 0.2	

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

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

3.2.1.2 Meio ágar-TPA

Este meio foi utilizado durante os ensaios quando era necessário realizar a determinação da concentração de células viáveis (em unidades formadoras de colônias -UFC- por mL de meio de cultivo), pois facilita a visualização das colônias em comparação ao meio ágar-sangue. Sua composição é dada na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composição do meio ágar-TPA

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

A composição da Triptose Fosfato é dada pela Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição da Triptose Fosfato

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

3.2.2 Meios líquidos

Durante o decorrer do trabalho foram realizados dois experimentos de otimização do meio de cultivo (ensaios S2 e S5). O experimento S1 foi realizado com o meio

Feist modificado (Groschup e Timoney, 1990), a partir do qual foram feitas as novas formulações denominadas de meio 1, meio 2, meio 3 e meio 4 descritas na Tabela 3.5. O **meio 1** foi estabelecido no experimento S2 (primeira otimização do meio) e utilizado nos ensaios S3, S4, S5, B1, B2 e B3. Já o **meio 2** foi utilizado nos ensaios B4 a B8, e desenvolvido à partir dos estudos realizados no ensaio S5 (segunda otimização do meio) e na formulação de um novo sistema de tamponamento com a concentração de fosfato diminuída 10 vezes para os experimentos em reator com controle automático de pH. O **meio 3**, utilizado nos ensaios S5 e S6, é similar ao meio 2, porém possui em sua formulação o tampão fosfato concentrado, já que foi desenvolvido para a realização de ensaios em câmara incubadora, e o **meio 4** foi utilizado nas etapas de alimentação do ensaio B9 (batelada alimentada).

Tabela 3.5 – Meios líquidos de cultura utilizados nos experimentos

	Feist modificado	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4
Componente	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)
Glicose	6,0	6,0	9,0	9,0	150
Peptona	5,0	7,5	7,5	7,5	125
Extrato de levedura	5,0	5,0	7,5	7,5	125
Arginina	0,55	0,75	0,75	0,75	12,5
Tween 80	0,5*	0,75*	0,75*	0,75*	12,5*
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	76,02	-----	76,02	-----
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	-----	-----	6,805	-----	6,805
KH ₂ PO ₄	-----	-----	0,136	-----	0,136

pH=8,00

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

Para o preparo dos **meios 1 e 3** descritos na Tabela 3.5, inicialmente foi preparada a solução de Na₃PO₄.12H₂O (fosfato de sódio tribásico dodecahidratado), na qual foram dissolvidos os demais componentes do meio, sendo o Tween 80 adicionado por último,

seguido do ajuste do pH em 8,0 utilizando H_3PO_4 85% (m/v). A alta concentração deste tampão (0,2 M) é a mesma utilizada no meio Feist modificado.

No preparo dos **meios 2 e 4**, a solução de KH_2PO_4 20 mM (0,136 g KH_2PO_4 em 50 mL de água) foi adicionada a uma solução de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 20 mM (6,805 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ em 950 mL de água). Em seguida, foram dissolvidos os demais componentes do meio, sendo o Tween 80 adicionado por último, seguido do ajuste do pH em 8,0 utilizando H_3PO_4 85% (m/v)..

A esterilização dos meios líquidos descritos na Tabela 3.5 foi feita através de filtração em membrana estéril de 0,22 μm de diâmetro de poro.

3.3 Métodos analíticos, de purificação e de preparo de bacterinas

3.3.1 Determinação da concentração celular

3.3.1.1 Turbidimetria

A densidade ótica (DO) foi determinada através de leitura em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 420 nm. As amostras foram diluídas de três a dez vezes de modo que a leitura da absorbância não ultrapassasse o valor de 0,8, para garantir com segurança que a medida fosse realizada dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade ótica e concentração.

3.3.1.2 Plaqueamento e Determinação de Células Viáveis

A determinação do número de microrganismos viáveis (UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mililitro) foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

- a) diluições sucessivas da amostra até a concentração desejada na proporção de 1:10 (1,0 mL de suspensão de bactéria para 9,0 mL de solução salina, até a concentração no tubo de ensaio estar em torno de 1×10^3 UFC/mL);
- b) adição de 0,1 mL da suspensão de bactéria adequadamente diluída na placa de Petri (em duplicata ou triplicata, dependendo do experimento) contendo meio TPA (Tabela 3.3), em pelo menos duas concentrações diferentes, de forma a se obter em torno de 10 a 100 UFC na placa;
- c) incubação das placas a 37°C por 48 h;
- d) contagem das colônias formadas e cálculo da concentração de células viáveis;

3.3.1.3 Método Gravimétrico

A concentração celular foi ainda determinada pelo método gravimétrico nos ensaios realizados em biorreator. Neste procedimento, inicialmente filtrou-se um volume conhecido de amostra em uma membrana com diâmetro de poro de $0,22 \mu\text{m}$ previamente pesada. A amostra foi então lavada com água destilada, submetida à secagem por 24 horas em estufa a 80°C e pesada.

3.3.2 Determinação da concentração de etanol e de ácidos láctico, acético e fórmico

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

3.3.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada nos ensaios S1, S5, B1 e B2 através do método de DNS, descrito em literatura (Miller, 1959), e por HPLC nos experimentos B6 a B9 (mesmas condições da análise dos metabólitos descrita no item 3.3.2).

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

Após o término do cultivo, as amostras foram inativadas como descrito no item 3.3.6.1.

O processamento da amostra tinha então como etapa inicial a separação entre as células e o sobrenadante por centrifugação a 4°C, 20 minutos e 11000 rpm. Em seguida, as células foram ressuspendidas numa solução de NaCl 0,9% (m/v) e colina 2% (m/v), em um volume 10x menor que o volume original de amostra, e deixadas sob leve agitação *overnight* a 4°C. No dia seguinte a solução foi filtrada numa membrana de 0,22 µm de diâmetro de

poro, concentrada 10x por ultrafiltração (sistema Amicon Ultra da Millipore, NMWL de 30kDa) e congelada.

O sobrenadante foi concentrado 10x por ultrafiltração (sistema Pellicon 2 da Millipore, NMWL de 10 kDa) e diafiltrado com 50 volumes de uma solução de NaCl 0,9% (m/v) no mesmo sistema. Em seguida a solução resultante foi concentrada mais 10x por ultrafiltração (sistema Amicon Ultra da Millipore, NMWL de 30 kDa) e congelada.

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

3.3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

Após o tratamento descrito no item 3.3.5, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) em um sistema Hoefer mini VE da Amershan Pharmacia Biotech.

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

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

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

3.3.6 Preparo e testes de bacterinas

3.3.6.1 Inativação do cultivo e formulação das bacterinas

Neste procedimento os cultivos foram interrompidos com a adição de 0,3% (v/v) de formalina como descrito em Zarkasie *et al.* (1996). Duas alíquotas de 0,1 mL do cultivo inativado foram transferidas para duas placas contendo meio ágar-TPA para confirmação da eficácia do procedimento de inativação, as quais foram incubadas a 37°C por 48 h. A formulação das bacterinas foi feita com hidróxido de alumínio em gel, como descrito em Eamens *et al.* (2006).

3.3.6.2 Teste das bacterinas

Foram seguidas as instruções da *British Pharmacopoeia (Veterinary)*, 2002, para a realização dos testes de avaliação do grau de proteção conferido em camundongos pelas bacterinas preparadas. Os testes foram realizados no Instituto Biológico, São Paulo.

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* com 17 a 20 g. Os animais foram divididos em grupos (vacina(s) teste(s), vacina(s) referência(s) e controle negativo) com 10 camundongos cada. A vacinação foi feita por via subcutânea com 1/50 da

dose de suínos, e 21 dias após a vacinação foi realizado o desafio com um injeção intraperitoneal de 0,3 mL de uma cultura de *E. rhusiopathiae* virulenta (cepa desafio), correspondendo a 1000 DL₅₀. Os animais foram observados por 8 dias e foram registrados o número de mortos em cada grupo.

3.4 Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos

3.4.1 Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono

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

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

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

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

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

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

3.4.2 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, conforme descrito em Bailey e Ollis (1986).

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

onde: μ é a velocidade específica de crescimento celular

Cx é a concentração celular

Considerando a fase exponencial de crescimento celular, quando $\mu = \mu_{\max}$, determina-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento integrando-se e rearranjando-se a Equação 2 para obter a Equação 3.

$$\ln\left(\frac{Cx}{Cx_0}\right) = \mu_{\max} \cdot t \quad (3)$$

onde: Cx_0 é a concentração celular de microrganismo no tempo “zero”, e t é o tempo de cultivo.

A Equação 3 é linear, e o valor de μ_{\max} pode ser obtido através do método dos mínimos quadrados.

3.4.3 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células

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

$$Cx - Cx_0 = Y_{x/s} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad (4)$$

onde: C_s é a concentração de substrato

C_{S_0} é a concentração inicial de substrato

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

3.5 Metodologia experimental

3.5.1 Ativação do microrganismo em tubos inclinados e preparo de inóculo para ensaios em frascos

Nos experimentos S1 a S3 e na preparação do primeiro banco de criotubos utilizou-se o microrganismo conservado em criotubos com sangue. Neste caso, foram retiradas pequenas alíquotas, por raspagem de células em sangue com alça, que foram transferidas para um tubo de ensaio contendo cerca de 5 mL de tampão PBS (20 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 150 mM de NaCl com o pH ajustado em 7,2). Transferiu-se em seguida a suspensão resultante para tubos inclinados com meio TPA (Tabela 3.3), espalhando-se a mesma na superfície dos “slants” com alça de platina.

Os tubos inoculados foram mantidos a 37°C por 48 h para o crescimento do microrganismo.

Após o crescimento em meio sólido, as células foram ressuspensas com solução de PBS de tal modo que a DO_{420} obtida ficasse em torno de 0,5 a 1,0, dependendo do experimento realizado (geralmente de 2 a 3 tubos inclinados em 5 mL de PBS).

Esta suspensão em tampão PBS foi utilizada como inóculo em proporções que variavam entre 1 a 20 mL de suspensão para 100 ou 50 mL de meio de cultivo. Os ensaios em

frascos foram conduzidos a 37°C, sem agitação, ou com agitação de 200 rpm, dependendo do experimento. O procedimento descrito está esquematizado na Figura 3.1.

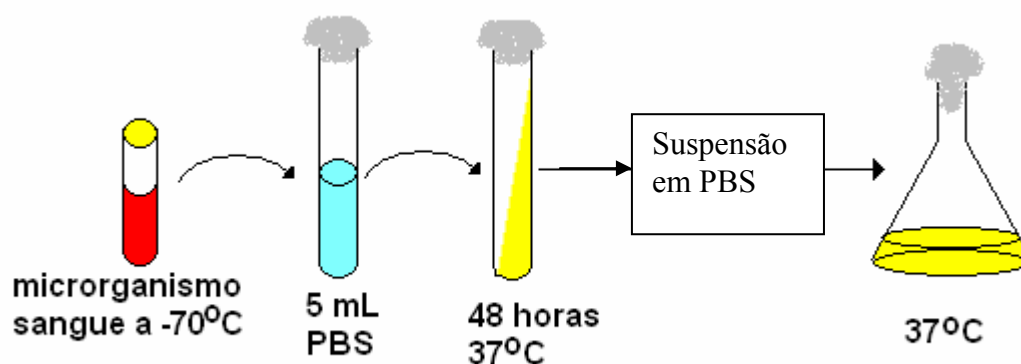


Figura 3.1 – Esquema do procedimento utilizado para os experimentos realizados em uma etapa em meio líquido

3.5.2 Preparação de cultura estoque em criotubos

Para a preparação dos dois primeiros bancos de criotubos o crescimento do microrganismo foi feito em uma etapa em meio sólido (slants com TPA) e duas etapas em meio líquido (50 e 500 mL), tal como descrito no item 3.5.1.

Após o crescimento do microrganismo, foi adicionado ao caldo de cultivo (volume de 500 mL) 100 mL de solução de glicerol 60% de modo que a concentração final de glicerol fosse de 10%. Em seguida, a suspensão de células foi transferida para os criotubos em alíquotas de 3 mL, e estes foram congelados a -70°C.

Na preparação dos bancos de criotubos subseqüentes, o crescimento do microrganismo foi feito em duas etapas em meio líquido, tal como descrito no item 3.5.3.

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

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

Em seguida as soluções foram transferidas para os criotubos em alíquotas de 3mL, enquanto eram homogeneizadas continuamente, e por fim os criotubos foram congelados e armazenados a -70°C .

3.5.3 Ativação de criotubos e preparo de inóculo para cultivos em frascos

Os ensaios S4, S5 e S6 foram realizados em duas etapas em meio líquido como mostrado na Figura 3.2.

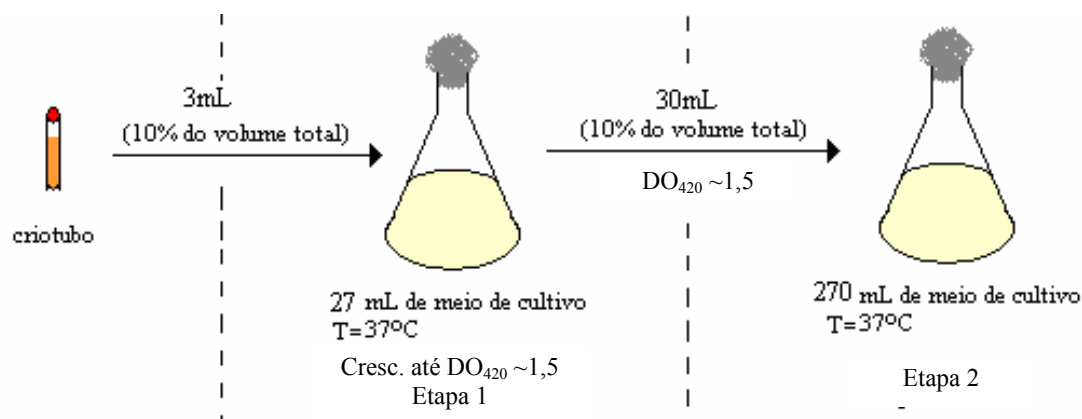


Figura 3.2 – Procedimento de cultivo em frascos utilizando criotubos

Nestes experimentos, inicialmente um criotubo contendo 3 mL de suspensão de células foi utilizado para inocular 27 mL de meio em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, estático. Quando a densidade ótica foi superior a 1,5, os 30 mL de caldo de cultivo foram utilizados para inocular 270 mL de meio em um frasco Erlenmeyer de 1,0 L, estático.

3.5.4 Preparo de cultura estoque liofilizada

Foram liofilizadas as cepas vacina e desafio de *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Inicialmente o microrganismo foi cultivado em placas de ágar-sangue por 48 h e em seguida foi ressuspendido em solução de albumina 3% (m/v), como descrito em Stoew *et al.* (1980). Cerca de 10 gotas da suspensão resultante foram transferidas para ampolas de liofilização estéreis utilizando pipetas Pasteur. As ampolas foram congeladas a -70°C por pelo menos 8 horas e depois liofilizadas. Após a liofilização, as ampolas foram seladas a vácuo com o uso de um maçarico.

3.5.5 Cultivos em Câmara Incubadora

Estes ensaios foram realizados com os meios de cultivo 1 e 3, a 37°C , com agitação de 200 rpm para os estudos em condições aeróbias, ou estáticos nos ensaios anaeróbios e microaerófilos. Os procedimentos utilizados nestes experimentos estão esquematizados nas Figuras 3.1 e 3.2. No caso do experimento S6, a etapa 2 mostrada na Figura 3.2 foi utilizada como o inóculo dos ensaios.

3.5.6 Cultivos em Biorreator

Foram realizados nove cultivos em reator (Ensaio B1 a B9) sendo cinco aeróbios (30% O_2 dissolvido), dois microaerófilos (5% de O_2 dissolvido) e dois anaeróbios. O procedimento utilizado nos experimentos em reator é visualizado na Figura 3.3. Inicialmente, um criotubo contendo 3 mL de células em suspensão foi utilizado para inocular 27 mL de

meio em um frasco Erlenmeyer de 250 mL, estático. Quando a densidade ótica foi superior a 1,5, os 30 mL de caldo de cultivo foram utilizados para inocular 270 mL de meio de cultura em frasco Erlenmeyer de 1,0 L, estático. Esperou-se o microrganismo crescer até densidade ótica superior a 1,5 e o caldo resultante foi utilizado para inocular 2,7 L de meio de cultivo no biorreator. Para os ensaios B1, B2 e B3 as três etapas (ativação, preparo do inóculo e ensaio no biorreator) foram feitas utilizando-se o meio 1. Para os demais ensaios, utilizou-se o meio 1 para as etapas de ativação e preparo do inóculo e o meio 2 para o ensaio no reator.

Para a realização dos cultivos B1 a B5 e B9, foi utilizado o biorreator modelo Bioflo II (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA), equipado com analisador de dióxido de carbono (Rosemount, modelo 880) e fluxômetro de massa (Cole Parmer modelo EW33116-10). Todos os equipamentos estão conectados a um sistema de controle e aquisição de dados. Para os ensaios B6, B7 e B8 foi utilizado o biorreator modelo Bioflo III (New Brunswick Sci. Co. Inc., USA).

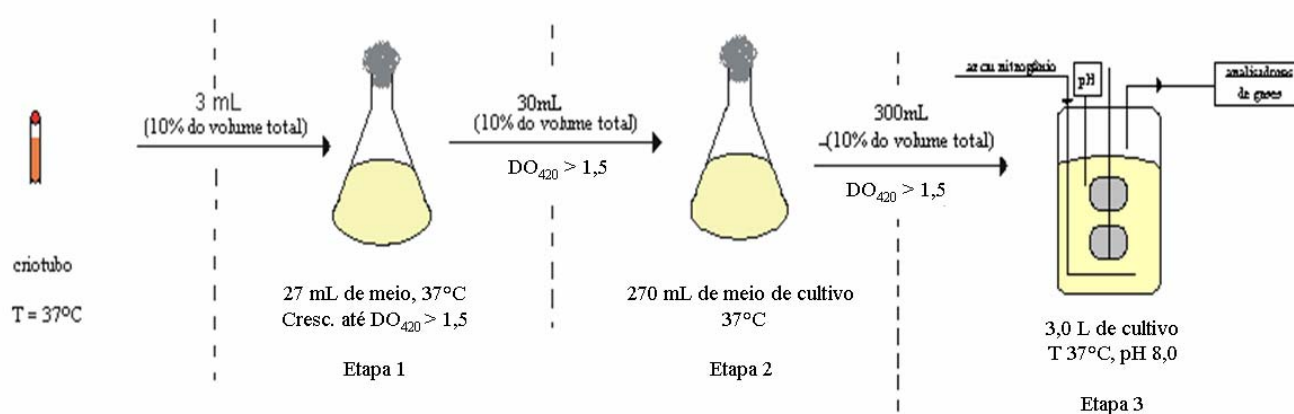


Figura 3.3 – Etapas do procedimento para os ensaios em biorreator

3.6 Descrição dos Experimentos

A Tabela 3.6 lista os experimentos realizados neste trabalho que apresentaram os resultados mais relevantes e que serão aqui discutidos.

Tabela 3.6 – Lista dos experimentos, em ordem cronológica, com suas respectivas descrições e objetivos

Ensaio	Descrição/objetivos
Conjunto S1	<ul style="list-style-type: none"> - Implementação da metodologia de cultivo de <i>E. rhusiopathiae</i> em meio Feist disponível na literatura - Influência da disponibilidade de oxigênio no crescimento
Conjunto S2	<ul style="list-style-type: none"> - Otimização do meio de cultivo
Conjunto S3	<ul style="list-style-type: none"> - Otimização da fração de inóculo
B1	<ul style="list-style-type: none"> - Implementação de procedimento para cultivo em biorreator em condições anaeróbias - Estudo da influência da ausência de oxigênio no crescimento e metabolismo - Determinação de gás carbônico e dos metabólitos produzidos durante o cultivo
B2	<ul style="list-style-type: none"> - Implementação de procedimento para cultivo em biorreator em condições aeróbias - Estudo da influência da presença de oxigênio no crescimento e metabolismo - Determinação de gás carbônico e dos metabólitos produzidos durante o cultivo
B3	<ul style="list-style-type: none"> - Implementação de procedimento para cultivo em biorreator em condições microaerófilas (5% de O₂) - Determinação de gás carbônico e dos metabólitos produzidos durante o cultivo - Implementação de procedimento para contagem de UFC/mL

Conjunto S4	- Preparo de bacterinas em diferentes condições de aeração
Conjunto S5	- Aprimoramento do meio de cultivo com aumento das concentrações de glicose e extrato de levedura
B4	- Cultivo em biorreator em condição microaerófila (5% de O ₂) com o meio aprimorado e controle de pH - Teste do novo sistema de tamponamento e avaliação de sua influência no crescimento celular
B5	- Cultivo em biorreator em condição aeróbia (30% de O ₂) com o meio aprimorado e controle de pH
B6	- Repetição do ensaio 10 - coleta de amostras para posterior avaliação da produção de antígeno (SpaA) e comparação com a condição anaeróbia
B7	- Preparo de bacterinas em biorreator (condições do ensaio 10) com UFC/mL > 2,0 x 10 ⁹ para teste em camundongos
B8	- Cultivo em biorreator em condição anaeróbia com o meio aprimorado e controle de pH - coleta de amostras para posterior avaliação da produção de antígeno (SpaA) e comparação com a condição aeróbia
Conjunto S6	- cultivo em câmara incubadora na presença de colina e/ou triptofano
B9	- batelada alimentada em condição aeróbia (30% de O ₂)

S = “Shaker”; B = Biorreator

3.6.1 Experimentos em Câmara Incubadora

3.6.1.1 Conjunto S1 – Implementação da metodologia de cultivo de *E. rhusiopathiae* em meio Feist disponível na literatura

Esse experimento foi realizado com o objeto de testar as condições de cultivo de *E. rhusiopathiae* mencionadas na literatura. O procedimento de cultivo adotado foi o

descrito no item 3.5.1 e o meio utilizado para o cultivo foi o meio Feist modificado (descrito na Tabela 3.5). Nesse caso, foi utilizado 1 mL de suspensão com uma DO de 0,5 para inocular os frascos contendo 100 mL de meio de cultivo.

O experimento S1 foi realizado em duas condições de aeração: aeróbia e microaerófila. Na condição aeróbia, o ensaio foi realizado em mesa incubadora rotativa a uma temperatura de 37°C e agitado a 200 rpm. Na condição microaerófila o experimento foi realizado em estufa a 37°C.

Nesse ensaio foram retiradas amostras para a determinação da densidade ótica, concentração de glicose e acompanhamento do pH do meio durante o cultivo.

3.6.1.2 Conjunto S2 – Otimização do meio de cultivo

Esse experimento foi realizado com o objetivo de se obter um meio de cultivo que apresentasse um melhor crescimento celular e consumo integral da glicose, o que não foi observado no meio Feist modificado (Ensaio S1). Foram testados seis diferentes meios de cultivos, descritos na Tabela 3.7, tanto na condição microaerófila como na aeróbia. Também foi testada uma fração maior de inóculo (10%).

Tabela 3.7 – Meios de cultura utilizados no conjunto de ensaios S2

	Meio A	Meio B	Meio C	Meio D	Meio E	Meio F	Meio G
Glicose (g/L)	6	0	10	6	6	6	6
Peptona (g/L)	5	5	5	7,5	5	5	7,5
Ext. levedura (g/L)	5	5	5	5	5	5	5
Arginina (g/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,5	0,75
Tween 80 (mL/L)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,75	0,75
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O (g/L)	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02	76,02

pH=8,00

Nesse experimento, foram retiradas amostras de 2 mL para análise de concentrações de células (por densidade ótica) e de glicose.

O procedimento de preparação do inóculo foi o mesmo descrito no item 3.5.1. Nos experimentos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E e S2-F foram testados os meios A, B, C, D, E, e F (Tabela 3.7), respectivamente, em condição aeróbia (câmara incubadora a 200 rpm). Nos experimentos S2-A', S2-B', S2-C', S2-D', S2-E' e S2-F' foram testados os mesmos meios (meio A, B, C, D, E e F) em condição microaerófila. Os experimentos S2-G e S2-G' foram realizados com o meio G (Tabela 3.7), porém com uma fração de inóculo representando 10% do volume de trabalho, sendo o primeiro aeróbio e o segundo microaerófilo.

Em todos os experimentos, exceto os experimentos S2-G e S2-G', inoculou-se 0,5 mL de suspensão de microrganismo em 50 mL de meio de cultivo. Nos experimentos S2-G e S2-G' inoculou-se cerca de 5 mL de suspensão de microrganismo em 45 mL de meio de cultivo.

3.6.1.3 Conjunto S3 – Otimização da fração de inóculo

Esse experimento foi realizado com o objetivo de se otimizar a fração de inóculo a ser utilizada nos experimentos seguintes, de forma a minimizar o tempo de fase *lag* do crescimento do microrganismo. Para isso, realizaram-se três ensaios com frações de inóculo (v/v) de 20% (I1), 10% (I2) e 5% (I3), conforme descrito na Tabela 3.8. O valor da densidade ótica dos inóculos utilizados foi de 1,0.

Tabela 3.8 – Volume de inóculo e de meio de cultura nos cultivos I1, I2 e I3

Experimento	Volume de inóculo (mL)	Volume de meio (mL)
I1	10	40
I2	5	45
I3	2,5	47,5

O meio utilizado foi o meio 1 (Tabela 3.5) e as culturas foram mantidas em condição microaerófila a 37°C. Amostras de cerca de 2 mL foram retiradas ao longo do cultivo para a determinação da concentração de glicose e do valor da densidade ótica.

3.6.1.4 Conjunto S4: Preparo de bacterinas em diferentes condições de aeração

Neste experimento o microrganismo foi cultivado em condição aeróbia, anaeróbia e microaerófila para avaliação da produção do antígeno em diferentes condições de aeração. Foram preparadas bacterinas dos três ensaios e foram feitas a avaliação e comparação da proteção conferida em camundongos por estas suspensões.

Os ensaios foram realizados em duplicata e todos os cultivos partiram do mesmo criotubo.

A etapa de ativação foi realizada em um frasco erlenmeyer com rodilhão de algodão contendo 27 mL de meio, sem agitação. Após atingir-se DO próxima a 1,5, foi iniciada a etapa de preparação do inóculo. Nesta fase, foram utilizadas as mesmas condições de cultivo a serem utilizadas na etapa seguinte, dos ensaios. Assim, o inóculo do ensaio aeróbio foi preparado num erlenmeyer com rodilhão de algodão e sob agitação de 200 rpm, o inóculo do ensaio anaeróbio foi preparado num frasco Duran com borbulhamento de nitrogênio, e o do microaerófilo num erlenmeyer com rodilhão de algodão, estático. Nesta etapa foram utilizados frascos de 250 mL com 45 mL de meio e inoculados com 8mL do

caldo da etapa de ativação. Os ensaios foram realizados com 90 mL de meio e o volume de inóculo transferido para cada frasco foi de 10 mL. Os cultivos aeróbios e anaeróbios foram feitos em frascos de 500 mL e os microaerófilos em frascos de 250 mL. As etapas do procedimento de cultivo do microrganismo estão esquematizadas na Figura 3.4.

Para cada cultivo, no momento em que a DO se aproximou de 1,5 foi retirada uma alíquota do caldo para o procedimento das diluições sucessivas seguido do plaqueamento para contagem de UFC/mL necessário para a formulação das doses de vacina a serem testadas. Logo em seguida o cultivo foi interrompido e tratado como descrito no item 3.3.6. Por fim, foi feita a formulação das vacinas como descrito em Eamens *et al.* (2006), e as bacterinas foram enviadas para os testes em camundongos, realizados no Instituto Biológico, São Paulo.

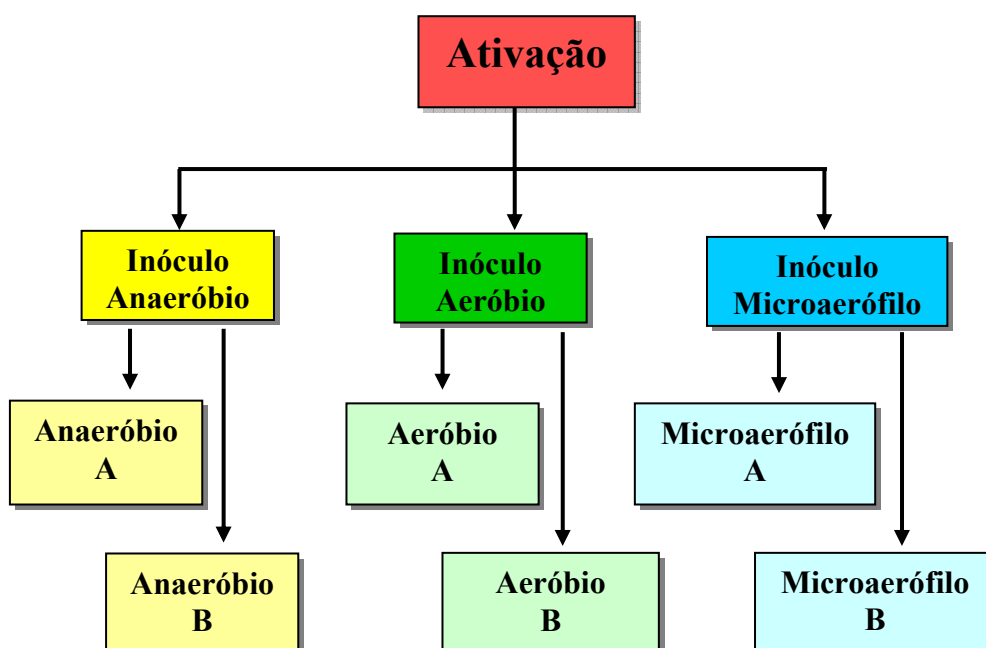


Figura 3.4 – Etapas dos ensaios com diferentes condições de aeração para o preparo das bacterinas

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

3.6.1.5 Conjunto S5: Aprimoramento do meio de cultivo com alteração nas concentrações de glicose e extrato de levedura

Este experimento teve como objetivo avaliar o crescimento de *E. rhusiopathiae* no meio 1 suplementado com maiores concentrações de glicose e extrato de levedura de modo a desenvolver uma nova formulação do meio de cultivo que proporcionasse a obtenção de maiores concentrações celulares ao final da batelada. Para isso, foram realizados três ensaios com as formulações dos meios de cultivo indicadas na Tabela 3.9.

Tabela 3.9 – Composição dos meios de cultivo utilizados no conjunto de ensaios S5

	Meio I	Meio II	Meio III
componente	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)	Concentração (g/L)
Glicose	6,0	9,0	12,0
Ext. Levedura	5,0	7,5	7,5
Peptona	7,5	7,5	7,5
Arginina	0,75	0,75	0,75
Tween 80	0,75 mL/L	0,75 mL/L	0,75 mL/L
Na ₃ PO ₄ .12H ₂ O	76,02	76,02	76,02

pH = 8,00

O meio I é o que vem sendo chamado até aqui de meio 1, cuja formulação foi desenvolvida no ensaio S2. O meio II possui em sua composição um aumento de 50% na

concentração de glicose e de extrato de levedura, e o meio III tem 100% a mais de glicose e 50% a mais de extrato de levedura comparado ao meio I.

Os cultivos foram realizados em duas etapas em meio líquido como descrito no item 3.5.3.

Foram realizadas análises da concentração de glicose e dos metabólitos com amostras retiradas dos três ensaios ao longo do cultivo. O crescimento celular foi acompanhado pela leitura da densidade ótica do caldo.

3.6.1.6 Conjunto S6: Cultivo com colina e /ou triptofano

Este experimento foi realizado para verificação da liberação ou não do antígeno (SpaA) no meio de cultivo na presença de colina e para verificar se o meio utilizado apresentava deficiência de triptofano, um aminoácido que segundo Ewald (1981) é promotor do crescimento de *E. rhusiopathiae* e, além disso, está presente no antígeno de interesse em quantidade considerável (16 resíduos por molécula).

Para tanto, foram realizados quatro cultivos de 300 mL, utilizando o meio 2, suplementado ou não com colina e triptofano, tendo a 2ª etapa descrita no item 3.5.3 como o inóculo das quatro condições listadas na Tabela 3.10. No momento em que os cultivos atingiram DO igual a 3,0 foi retirado um volume de 200 mL do caldo de cada frasco que em seguida foram inativados como no procedimento de preparação das bacterinas descrito no item 3.3.6.1 e submetidos ainda ao procedimento descrito no item 3.3.5, para análise da expressão do antígeno. O volume de 100 mL restantes de cada condição teve o crescimento celular acompanhado até a fase de morte.

Tabela 3.10 – Condições testadas no conjunto de ensaios S6

Ensaio/suplemento	Condição A	Condição B	Condição C	Condição D
Cloreto de colina 2%	Não	Sim	Não	Sim
Triptofano 0,75g/L	Não	Não	Sim	Sim

3.6.2 Experimentos em Biorreator

3.6.2.1 Ensaio B1: Cultivo anaeróbio com o meio 1

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo 1 (Tabela 3.5) sob condição anaeróbia. A vazão de nitrogênio utilizada no biorreator foi de 0,5 L/min e a frequência de rotação foi mantida em 130 rpm para homogeneizar o sistema. Foram retiradas amostras a cada meia hora para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e de ácido lático. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gás carbônico.

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

3.6.2.2 Ensaio B2: Cultivo aeróbio com o meio 1

Este experimento também foi realizado utilizando o meio de cultivo 1 (Tabela 3.5), porém sob condição aeróbia. A vazão de ar utilizada foi de 1,0 L/min e a frequência de agitação variou de 100 a 400 rpm para controlar a concentração de oxigênio dissolvido em 30% de seu valor de saturação.

Nesse experimento também foram retiradas amostras a cada meia hora para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), concentração de glicose e de ácido láctico. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gás carbônico, e os dados experimentais foram utilizados para a determinação dos valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$.

3.6.2.3 Ensaio B3: Cultivo microaerófilo (concentração de O₂ em 5% da saturação com ar) com o meio 1

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo 1 (Tabela 3.5) sob condição microaerófila. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a frequência de rotação foi automaticamente controlada de forma a manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 5% de seu valor de saturação. Foram retiradas amostras a cada meia hora para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos: ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico e etanol. Sete das amostras coletadas foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em ágar-TPA para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). No final do cultivo uma amostra foi retirada, inativada e liofilizada para posterior identificação e purificação do antígeno. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gás carbônico.

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

3.6.2.4 Ensaio B4: Cultivo microaerófilo (5% de O₂) com o meio 2 e controle automático de pH

Este experimento foi realizado sob condição microaerófila utilizando o meio de cultivo 2 (Tabela 3.5) cuja composição apresenta 50% a mais de glicose e extrato de levedura, além de um tampão 10 vezes mais diluído em relação ao meio 1. Neste ensaio o pH foi controlado e ajustado em 8,0 pela adição automática de NaOH 4 M. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a frequência de rotação foi automaticamente controlada de forma a manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 5% de seu valor de saturação. Foram retiradas amostras a cada hora para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos. Como no ensaio anterior, sete das amostras coletadas foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em ágar-TPA para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). Durante o experimento, foram retiradas e liofilizadas cinco amostras, previamente inativadas, para análises posteriores sobre a produção do antígeno com a evolução do cultivo. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gás carbônico.

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

3.6.2.5 Ensaio B5: Cultivo aeróbio (30% de O₂) com o meio 2 e controle automático de pH

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo 2 (Tabela 3.5) sob condição plenamente aeróbia. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a frequência de agitação foi mantida entre 100 e 400 rpm de forma a permitir a homogeneização do sistema e manter a porcentagem de oxigênio dissolvido em 30% de seu valor de saturação.

Foram retiradas amostras a cada hora nas quatro primeiras horas do cultivo e posteriormente a cada 30 minutos para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos. Seis das amostras coletadas foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em ágar-TPA para contagem de UFC/mL. A composição do gás produzido foi analisada em analisador de gás carbônico.

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

3.6.2.6 Ensaio B6: Cultivo aeróbio (30% de O₂) com o meio 2 e controle automático de pH (duplicata do ensaio 10)

Este experimento foi realizado nas mesmas condições do ensaio anterior para confirmação dos resultados obtidos. Neste ensaio, foram retiradas quatro amostras durante o cultivo para comparação da produção do antígeno com o ensaio em anaerobiose. Essas amostras foram inativadas e liofilizadas. A composição do gás produzido não foi analisada, pois não foi utilizado o biorreator equipado com o analisador de gás carbônico.

3.6.2.7 Ensaio B7: Cultivo aeróbio (30% de O₂) com o meio 2 e controle automático de pH (triplicata do ensaio 10) para produção de bacterinas

As condições deste ensaio foram as mesmas do experimento 10.

As amostras para análise de glicose, massa seca e dos metabólitos foram retiradas a cada hora após 4,5 h de cultivo.

Para o preparo das bacterinas foram retiradas duas amostras de aproximadamente 90 mL em dois momentos específicos: o primeiro no final da fase

exponencial de crescimento (DO ~ 3,5) e o segundo após ter início a fase de morte celular. Ambas as amostras foram tratadas como descrito no item 3.3.4 e a amostra com DO de aproximadamente 3,5 foi utilizada para testar o nível de proteção conferido por esta formulação de acordo com as instruções da *British Pharmacopoeia (Veterinary)*, apresentadas no item 3.3.4.1. Vale comentar que de acordo com a farmacopéia, deveria ser utilizada uma bacterina de referência. Como no Brasil o Ministério da Agricultura não regulamenta a produção dessa vacina e não fornece essa amostra de referência, optou-se por utilizar vacinas comerciais como referência.

3.6.2.8 Ensaio B8: Cultivo anaeróbio com o meio 2 e controle automático de pH

Este experimento foi realizado utilizando o meio de cultivo 2 (Tabela 3.5) sob condição anaeróbia. A vazão de nitrogênio utilizada no biorreator foi de 0,5 L/min e a frequência de rotação foi mantida em 200 rpm para homogeneizar o sistema. Foram retiradas amostras em intervalos de 0,5 ou 1 h para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos. Cinco das amostras coletadas foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em ágar-TPA para contagem de UFC/mL.

Ainda neste ensaio, foram retiradas duas amostras durante o cultivo e outra no final para comparação da produção do antígeno com o ensaio em aerobiose. Essas amostras foram inativadas e armazenadas a 4°C. A composição do gás produzido não foi analisada, pois não foi utilizado o biorreator equipado com o analisador de gás carbônico.

3.6.2.9 Ensaio B9: Cultivo aeróbio (30% O₂) em batelada alimentada

Este experimento foi realizado em aerobiose (concentração de O₂ de 30% do seu limite de saturação) utilizando o meio de cultivo 2 (Tabela 3.5) para a etapa de batelada simples e o meio de cultivo 4 (Tabela 3.5) para a etapa de alimentação. A vazão de ar utilizada no biorreator foi de 1,0 L/min e a frequência de agitação foi mantida entre 100 e 400rpm.

O Software AnaBio 1.0 (Silva et al., 2003) foi utilizado para simular os perfis de crescimento celular, produção de ácido lático e consumo de glicose em função de diferentes valores de vazão de alimentação e concentração de glicose no meio suplementar, a partir dos dados do experimento aeróbio (2) (ensaio B6). Foi proposto um modelo matemático não estruturado baseado no balanço de massa do processo (Equações 5 a 7) e na expressão cinética de Andrews-Levenspiel (Shuler e Kargi, 2002) com inibição mista pelo substrato e produto (Equação 8),

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - k_D - \frac{F}{V} \right) \cdot C_X \quad (5)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(\frac{F}{V} \right) \cdot (C_{SF} - C_S) - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \right) \cdot \mu \cdot C_X \quad (6)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha \cdot \mu) \cdot C_X - \frac{F}{V} \cdot C_P \quad (7)$$

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*} \right)^n \quad (8)$$

onde,

μ (h⁻¹): velocidade específica de crescimento;
 μ_{\max} (h⁻¹): velocidade específica máxima de crescimento;
 C_S (g/L): concentração de substrato;
 C_P (g/L): concentração de produto;

C_X (g/L): concentração celular;
 V (L): volume de trabalho do biorreator;
 F (L/h): vazão de alimentação;
 C_{SF} (g/L): concentração de glicose no meio suplementar;
 α (g_{lactato}/g_{células}): coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de lactato associada ao crescimento;
 $Y_{X/S}$ (g_{células}/g_{glicose}): fator de conversão de substrato em células;
 $Y_{P/S}$ (g_{lactato}/g_{glicose}): fator de conversão de substrato em lactato;
 k_D (h⁻¹): coeficiente de morte celular;
 C_{S1} (g/L): concentração de substrato a partir da qual se inicia a morte celular;
 K_S (g/L): constante de saturação;
 K_{IS} (g/L): constante de inibição pelo substrato;
 C_{p^*} (g/L): concentração crítica de lactato para efeito de inibição pelo produto;
 n : parâmetro do modelo de Levenspiel com inibição pelo produto.

Os valores médios dos dados experimentais (da fase exponencial) dos cultivos em batelada simples conduzidos em triplicata foram utilizados para a determinação dos valores dos fatores de conversão e da velocidade máxima específica de crescimento do microrganismo. Os demais parâmetros foram estimados igualando-se F a zero e através de um ajuste visual do modelo também aos dados experimentais das bateladas simples.

Baseando-se nos resultados das simulações, foi adotada uma estratégia de alimentação em dois estágios, de forma a manter o crescimento celular em fase exponencial e a concentração de glicose entre 4 e 8,0 g/L, evitando efeitos de inibição por excesso de substrato ou morte celular por escassez de nutrientes. Dessa forma, após as 7,5 h de batelada simples, iniciou-se a adição de meio de cultivo concentrado (meio 4) no biorreator numa vazão de 0,05 L/h. Esta primeira etapa de alimentação teve duração de 4 h. Em seguida, a vazão foi aumentada para 0,12 L/h, durante um período de 8,5h.

Foram retiradas amostras do cultivo a cada hora para a leitura da densidade ótica, determinação da concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e dos metabólitos. Cinco das amostras coletadas foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em ágar-TPA para contagem de UFC/mL. A concentração de dióxido de carbono

no gás efluente do fermentador foi monitorada por um analisador de gás carbônico acoplado ao sistema de aquisição de dados do biorreator.

Durante o experimento foram também coletadas amostras para avaliar a produção do antígeno com o aumento da concentração celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimentos em Câmara Incubadora

4.1.1 Conjunto S1

Este experimento teve como objetivo implementar a metodologia de cultivo de *E. rhusiopathiae* disponível na literatura além de iniciar os estudos da influência da aeração no crescimento do microrganismo.

Os valores da concentração de glicose e da densidade ótica obtidos no ensaio S1 são vistos na Figura 4.1. A Figura 4.2 mostra a variação do pH com o tempo de cultivo. Os ensaios foram realizados em frascos de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo e foram iniciados com inóculo de 1% (v/v).

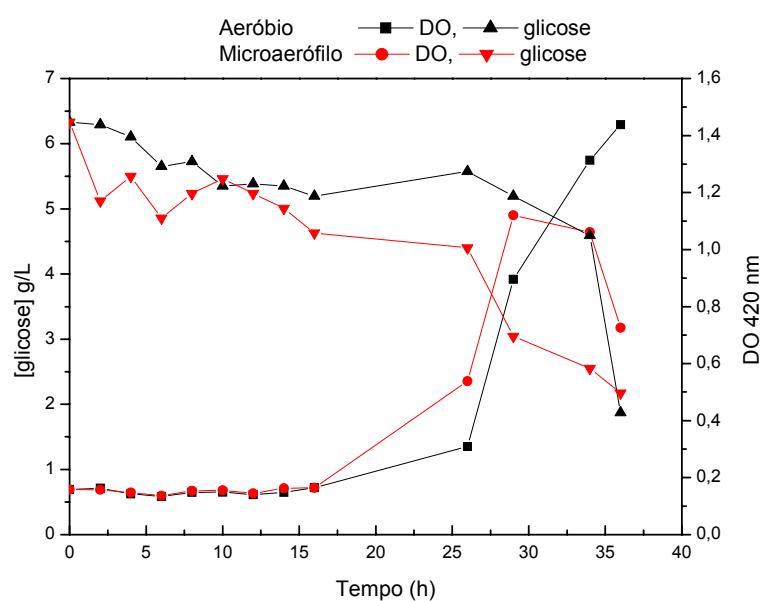


Figura 4.1 – Valores da concentração de glicose e de densidade ótica do conjunto de ensaios S1 com o tempo de cultivo.

Como pode ser observado na Figura 4.1, o ensaio realizado em condições aeróbias (com agitação de 200 rpm) apresenta, aparentemente, um maior valor de densidade ótica no final do experimento, indicando um maior crescimento celular. No entanto, é importante ressaltar que devido ao rápido crescimento na fase exponencial, é provável que a densidade ótica do cultivo microaerófilo (cultivo estático) também tenha atingido valores mais altos, que não foram medidos devido à ausência de amostragem no período compreendido entre 29 e 36 horas de ensaio. Quanto à grande fase *lag* apresentada nos dois cultivos, esta foi menor em condições anaeróbias.

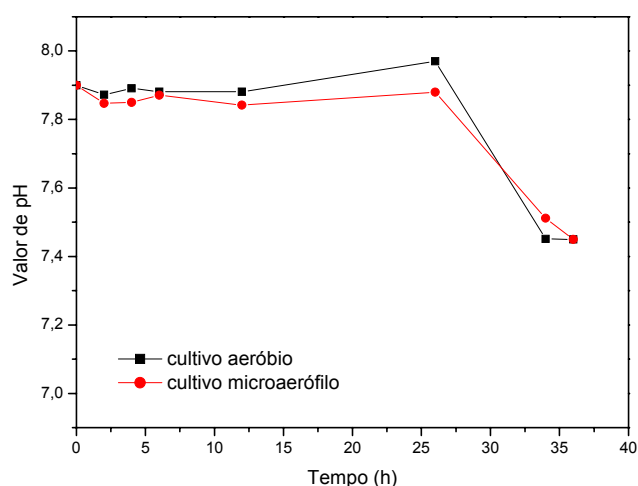


Figura 4.2 – Variação do valor de pH com o tempo de cultivo obtido no conjunto de ensaios S1.

Já em relação à variação do valor de pH (Figura 4.2), este apresentou uma queda quando o crescimento do microrganismo ocorreu mais intensamente, tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias. Nota-se ainda que o pH sofreu uma queda de 0,5 em relação a seu valor inicial. Tal fato indicou uma alta produção de ácido devido ao metabolismo da glicose para a produção de energia.

Quanto ao consumo de glicose, observou-se que esse substrato não foi consumido totalmente. Tal fato indicou que outro nutriente estava limitando o crescimento do microrganismo.

4.1.2 Conjunto S2

Neste experimento, realizado em frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo, foram testadas diferentes formulações com variações nas concentrações de glicose, peptona, arginina e Tween 80 para avaliar a influência da concentração de cada um destes nutrientes no crescimento do microrganismo separadamente. A Figura 4.3 mostra os valores de densidade óptica observados nos experimentos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E, S2-F e S2-G realizados tanto em condições aeróbias como microaerófilas. A Figura 4.4. mostra os valores da concentração de glicose com o tempo de cultivo para os mesmos experimentos.

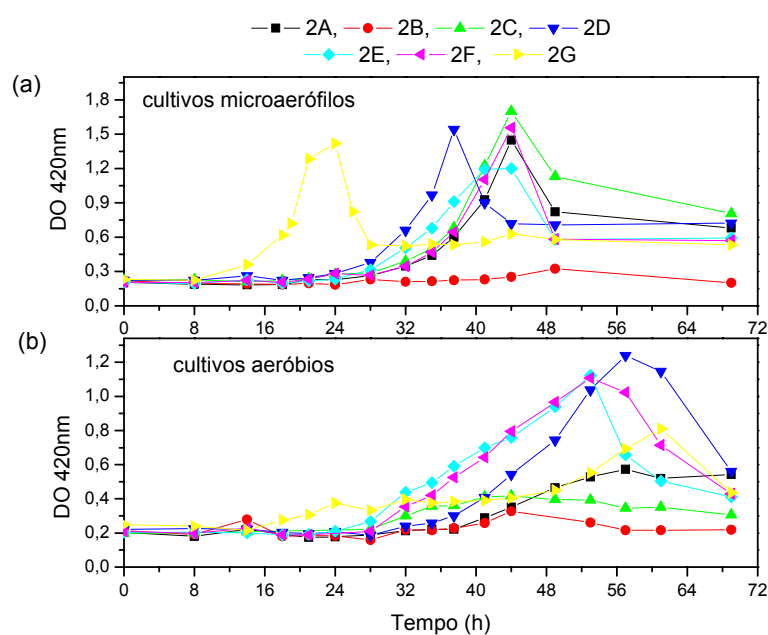


Figura 4.3 – Variação dos valores de DO nos cultivos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E, S2-F e S2-G em condições microaerófilas (a) ou aeróbias (b) com o tempo de cultivo. S2-A: Meio Feist; S2-B: Meio Feist sem glicose; S2-C: Meio Feist com 10 g/L de glicose; S2-D: Meio Feist com 7,5 g/L de peptona; S2-E: Meio Feist com 0,75 g/L de arginina; S2-F: Meio Feist com 0,75 mL/L de Tween; e S2-G: Meio Feist com concentrações de Tween, peptona e arginina 50% maiores, e inóculo de 10% (v/v).

Pela Figura 4.3 observa-se que o meio Feist modificado (Tabela 3.5) apresenta um déficit nutricional. Os meios suplementados com mais 50% de nutrientes selecionados apresentaram valores de DO maiores que o do meio Feist modificado. Por esse motivo optou-

se por acrescentar 50% destes nutrientes e adotou-se o meio G (Tabela 3.7) para os experimentos subsequentes (este meio passou a ser chamado de meio 1).

Quanto ao aumento da concentração inicial de glicose no meio de cultivo, pôde-se notar pela Figura 4.3 que, na condição aeróbia, não houve crescimento do microrganismo. Já na condição microaerófila, o aumento da concentração de glicose não influenciou significativamente o crescimento celular. Neste ensaio foram ainda observados os maiores valores de DO e um menor tempo de fase *lag*.

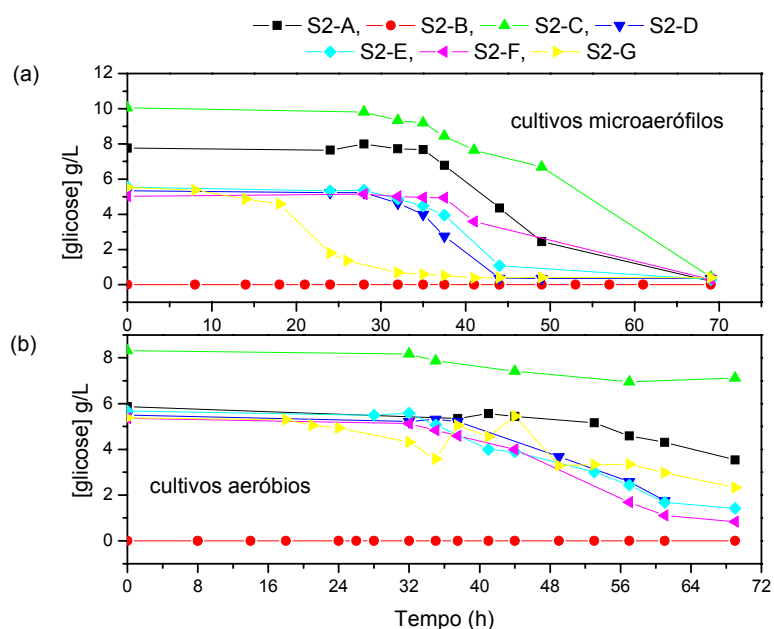


Figura 4.4 – Variação dos valores da concentração de glicose (C_s) nos cultivos S2-A, S2-B, S2-C, S2-D, S2-E, S2-F e S2-G em condições microaerófilas (a) ou aeróbias (b) com o tempo de cultivo. S2-A: Meio Feist; S2-B: Meio Feist sem glicose; S2-C: Meio Feist com 10 g/L de glicose; S2-D: Meio Feist com 7,5 g/L de peptona; S2-E: Meio Feist com 0,75 g/L de arginina; S2-F: Meio Feist com 0,75 mL/L de Tween; e S2-G: Meio Feist com concentrações de Tween, peptona e arginina 50% maiores, e inóculo de 10% (v/v).

Nos cultivos com uma maior fração de inóculo (10%), observou-se um menor tempo de fase *lag* e, com relação ao consumo de substrato, os gráficos da Figura 4.4 mostram que a glicose foi totalmente consumida nos cultivos microaerófilos, mas não na condição aeróbia. Também não foi observado crescimento do microrganismo nos experimentos realizados sem a adição de glicose ao meio de cultivo.

A partir dos resultados obtidos no Ensaio 2, optou-se por cultivar o microrganismo em condições microaerófilas (frasco estático), além de suplementar o meio Feist modificado, aumentando em cerca de 50% a concentração dos nutrientes peptona, arginina e Tween 80, como já foi mencionado.

4.1.3 Conjunto S3

Neste experimento foram testadas diferentes frações de inóculo com intuito de reduzir o tempo da fase *lag* do crescimento do microrganismo. Os cultivos, com volume total de 50 mL em cada condição, foram conduzidos em frascos de 250 mL estáticos. Os valores da densidade ótica e da concentração de glicose dos experimentos I1 (inóculo 20% v/v), I2 (10% v/v) e I3 (5% v/v) são apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6, respectivamente.

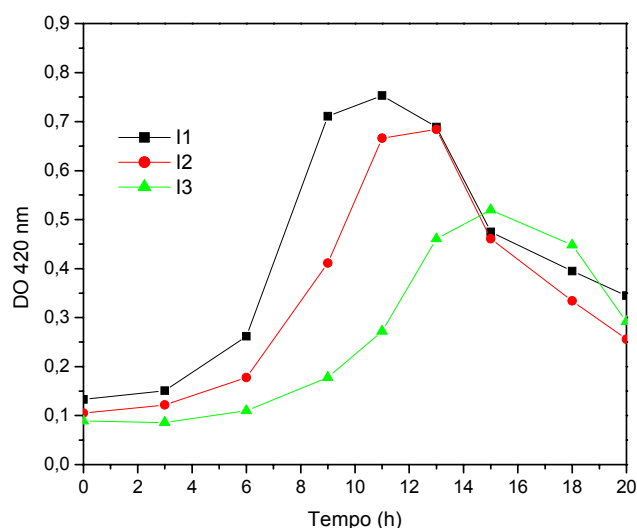


Figura 4.5 – Valores de DO com o tempo de cultivo para os experimentos I1, I2 e I3

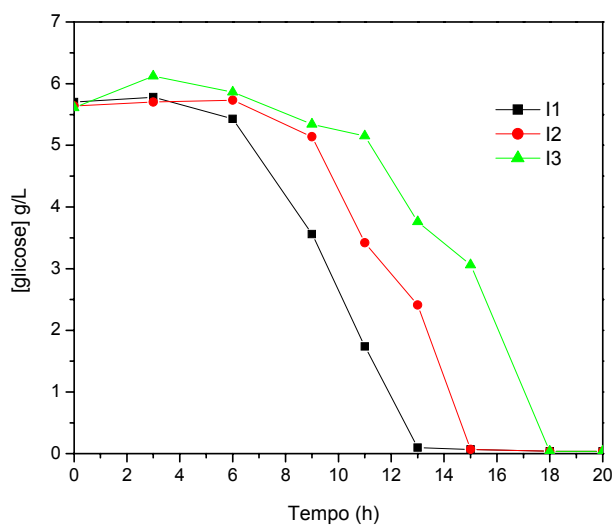


Figura 4.6 – Consumo de glicose com o tempo de cultivo para os experimentos I1, I2 e I3

Pela Figura 4.5 observa-se que o menor tempo de fase *lag* foi obtido no cultivo com 20% de inóculo, seguidos pelos experimentos I2 (10%) e I3 (5%), respectivamente.

Apesar do melhor resultado obtido no ensaio I1, optou-se inocular os experimentos subsequentes com 10% de inóculo com um valor de DO em torno de 1,0 u_{ABS} . Essa opção foi feita por não se observar uma diferença significativa entre os cultivos I1 e I2 com relação a DO máxima atingida. Observa-se na Figura 4.6 que em todos os experimentos a glicose foi totalmente consumida, sendo exaurida em tempos diferentes de acordo com a concentração celular de cada condição experimental, determinada pela fração de inóculo transferida.

4.1.4 Conjunto S4

O objetivo deste experimento foi preparar bacterinas (vacinas com o microrganismo inativado) em diferentes condições de aeração para investigar o papel da

oxigenação na produção de antígeno e para definir quais as melhores condições para a continuação dos estudos. A Tabela 4.1 resume os resultados dos cultivos realizados.

Tabela 4.1 – Resultados de densidade ótica e UFC/mL no final dos cultivos de preparação das bacterinas

Experimento	DO final (420 nm)	UFC/mL ($\times 10^8$)	Tempo de cultivo (h)
Microaerófilo A	1,59	2,62	5,0
Microaerófilo B	1,58	2,55	5,0
Aeróbio A	1,75	1,67	6,5
Aeróbio B	1,77	2,82	6,5
Anaeróbio A	1,52	5,59	7,0
Anaeróbio B	1,65	-----	7,0

Devido a problemas experimentais não foi possível realizar a contagem do ensaio anaeróbio B e, por isso a bacterina desse ensaio foi formulada com base na contagem do cultivo anaeróbio A.

A partir dos resultados obtidos nos testes de imunização dos camundongos com as bacterinas preparadas, mostrados na Figura 4.7, concluiu-se que os próximos estudos seriam realizados em condições microaerófilas e aeróbias já que estas foram as condições que geraram os melhores resultados em termos de proteção oferecida aos animais vacinados. Como a literatura recomenda (Eamens *et al.*, 2006) que as vacinas sejam formuladas utilizando suspensões contendo no mínimo $2,0 \times 10^9$ UFC, estabeleceu-se a obtenção dessa concentração celular como principal objetivo a ser alcançado nos ensaios em biorreator.

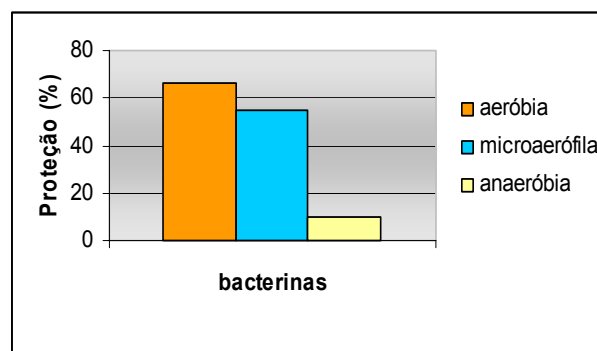


Figura 4.7 – Comparação entre os níveis de proteção conferidos pelas bacterinas preparadas em diferentes condições de aeração

4.1.5 Conjunto S5

Este experimento teve como objetivo estudar a influência do aumento da concentração de glicose e de extrato de levedura no crescimento do microrganismo a fim de propor uma nova formulação para o meio de cultivo que levasse a uma maior formação de biomassa. A Figura 4.8 mostra os perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos.

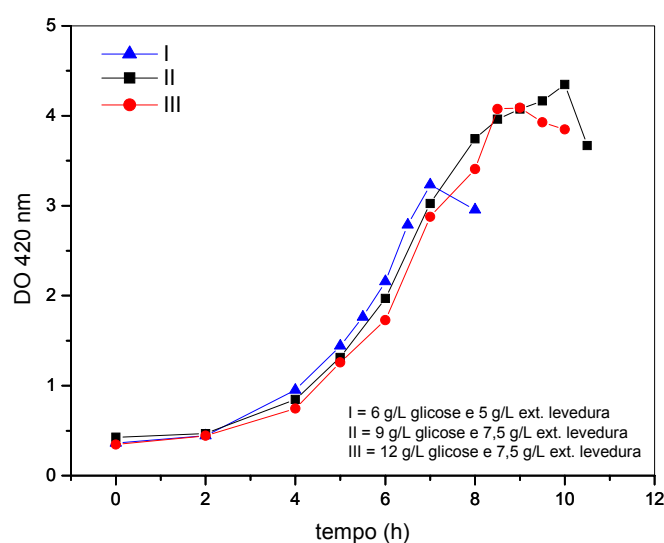


Figura 4.8 – Crescimento celular dos cultivos realizados com diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura no meio.

Observou-se um aumento significativo na concentração celular final atingida nos ensaios com maiores concentrações de glicose e extrato de levedura, sendo que nestas condições (experimentos II e III) foram obtidas densidades óticas superiores a 4,0. A DO máxima atingida foi registrada na condição II, e no ensaio com maior concentração de glicose a velocidade de crescimento foi um pouco inferior a observada nos outros dois cultivos.

As análises de glicose e dos metabólitos não puderam ser realizadas com as amostras do final do cultivo nos ensaios I e III, mas pelos gráficos mostrados nas Figuras 4.9 e 4.10 é possível verificar que o perfil da concentração dos metabólitos nestes cultivos seguiu

a mesma tendência observada no ensaio II e o consumo da glicose foi mais lento no início do ensaio III, onde a maior concentração desse substrato pode ter provocado uma leve inibição do crescimento celular, fato já observado no ensaio S2.

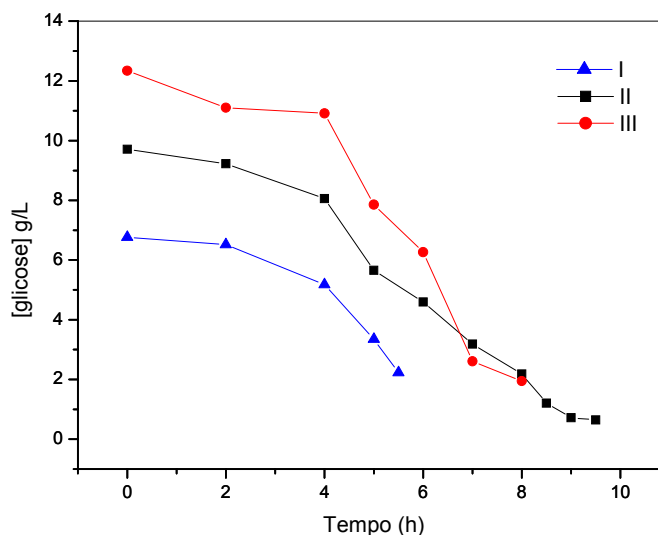


Figura 4.9 – Consumo de glicose ao longo dos cultivos do conjunto de ensaios S5

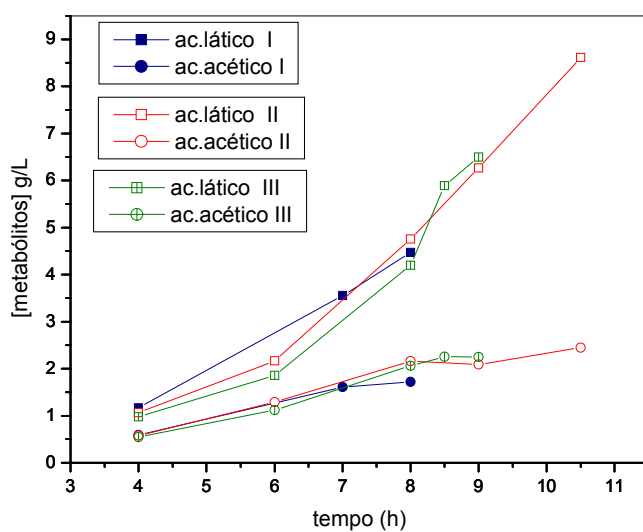


Figura 4.10 – Comparação do perfil de produção de metabólitos nos ensaios com meios de cultivo com diferentes concentrações de glicose e extrato de levedura

A Figura 4.10 mostra que, com a utilização de meio mais rico, foram produzidas altas concentrações de ácido láctico, que ultrapassaram 8,5 g/L ao final do cultivo II (condição microaerófila). As concentrações finais dos metabólitos dos ensaios I e III não foram determinadas.

A partir dos resultados deste experimento foi estabelecido o meio de cultivo II, chamado a partir de então de meio 2, como o meio de cultivo a ser utilizado nos ensaios em biorreator, com a alteração posterior na composição do tampão.

4.1.6 Conjunto S6

Neste experimento investigou-se uma possível deficiência de triptofano no meio, que poderia acarretar em perdas no crescimento celular e na produção do antígeno, e também foi estudado o uso da colina na formulação do meio para provocar a liberação do antígeno para o sobrenadante do cultivo. Os ensaios foram realizados com o meio 3, em frascos de 1,0 L estáticos, com volume total de 300 mL de caldo. A Figura 4.11 mostra o perfil de crescimento celular nas quatro condições estudadas.

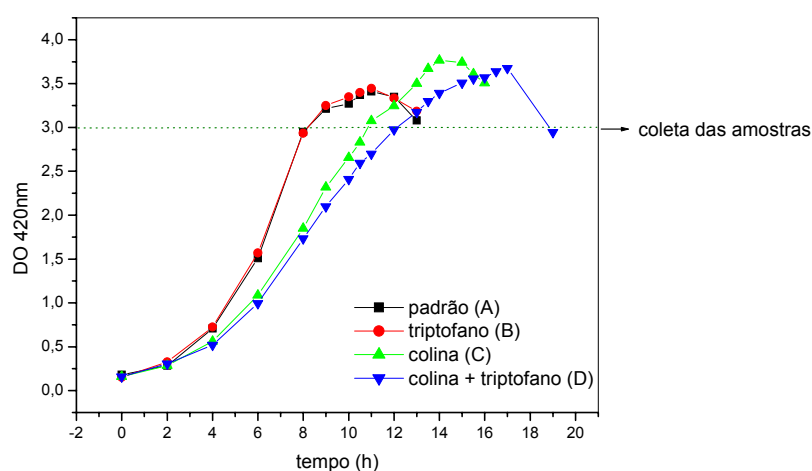


Figura 4.11 – Comparação do crescimento celular dos cultivos realizados com ou sem adição de colina e/ou triptofano

Observa-se que os dois cultivos com a colina presente no meio têm o crescimento celular mais lento, porém atingem os valores de DO acima de 3,5 como nos demais ensaios. Provavelmente esse efeito de inibição do crescimento provocado pela colina pode ser significativamente reduzido após a realização de estudo sobre o momento mais adequado para fazer a adição deste composto já no caldo de cultivo, e não desde o preparo do meio.

Já pela análise das condições A e C, verificou-se a inexistência de deficiência de triptofano no meio utilizado até então (meio 2, condição A), já que as curvas de crescimento celular com e sem adição extra desse aminoácido não apresentaram distinção nenhuma entre si.

Pela análise da Figura 4.12 observa-se claramente a presença de maiores quantidades do antígeno (proteína de 67 kDa) no sobrenadante dos ensaios realizados com a presença da colina no meio de cultivo (linhas 7 e 9). Esse resultado viabiliza a tentativa de preparação de uma vacina utilizando somente o sobrenadante do cultivo, o que traria benefícios significativos, como o aumento do tempo de prateleira da vacina preparada e uma possível diminuição dos efeitos de irritação local na pele dos animais vacinados.

Observando-se ainda a imagem da Figura 4.12 verifica-se um possível efeito de inibição da produção do antígeno pela presença de triptofano livre (linha 8), mas os resultados são insuficientes para fundamentar essa afirmação.

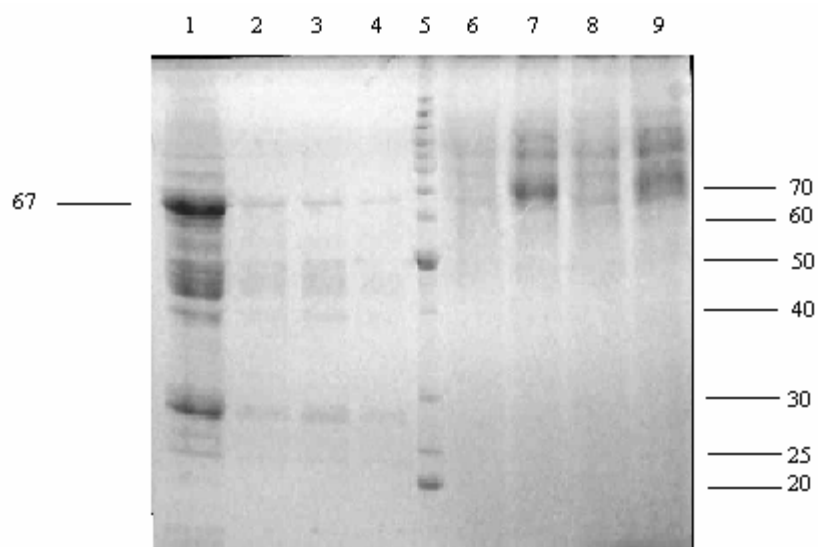


Figura 4.12 – Eletroforese das amostras de sobrenadante e das proteínas de superfície da célula extraídas com solução de cloreto de colina, das quatro condições estudadas. Linhas 1 a 4: amostras concentradas da extração com colina das proteínas de superfície das células dos cultivos A, B, C e D, respectivamente; Linha 5: Padrões de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen); Linhas 6 a 9: amostras concentradas do sobrenadante dos cultivos A, B, C e D respectivamente. Ao lado direito da foto são mostradas as massas moleculares dos padrões, e ao lado esquerdo a posição e a massa molecular do antígeno.

A = cultivo padrão; B = cultivo com colina; C = cultivo com triptofano; D = cultivo com colina e triptofano.

4.2 Experimentos em Biorreator

4.2.1 Ensaio B1 – cultivo anaeróbico com meio 1 sem controle de pH

A Figura 4.13 mostra os valores da velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) e de pH com o tempo de cultivo. Já a Figura 4.14 mostra a variação na concentração de células (g/L), DO, produção de ácido lático e consumo de glicose obtida no ensaio realizado em condições anaeróbicas.

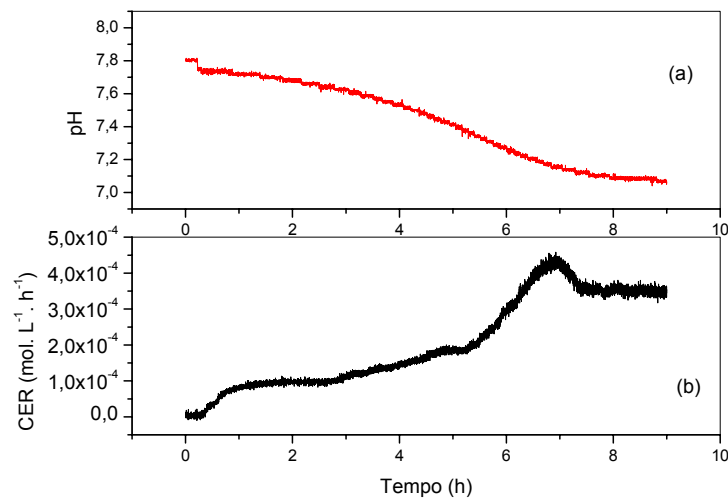


Figura 4.13 – Acompanhamento do pH (a) e da velocidade de produção de dióxido de carbono (b) com o tempo de cultivo (Ensaio B1)

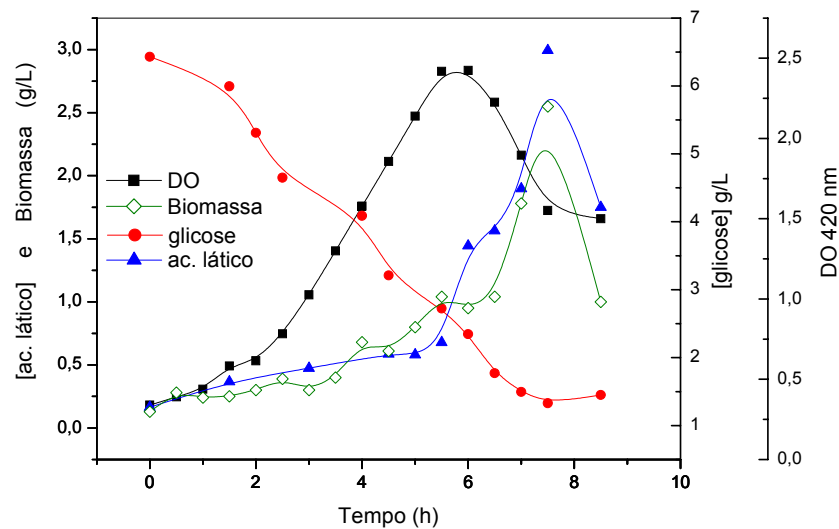


Figura 4.14 – Formação de células, consumo de glicose e produção de ácido lático no cultivo anaeróbico em biorreator com meio 1, durante batelada simples (Ensaio B1)

A Figura 4.13 mostra que a produção de gás carbônico aumenta durante as primeiras 8 horas de cultivo, enquanto dura a fase exponencial de crescimento. No mesmo período, o pH cai de 7,8 para 7,0. A Figura 4.14 mostra que as curvas de acompanhamento do crescimento celular (Biomassa e DO) apresentam a mesma tendência na maior parte do crescimento exponencial. Fica também evidente a ausência de fase estacionária pelo rápido

decréscimo dos valores DO e de CER ao final do crescimento exponencial. Os elevados valores de Biomassa observados no final da batelada ($t = 7$ e $7,5$ h) estão provavelmente relacionados à interferência dos *debris* celulares resultantes da degradação celular retidos no filtro ou a erro experimental. A glicose foi totalmente consumida e o acúmulo de ácido láctico atinge quase 3 g/L ao final do cultivo. Como não há formação de gás carbônico nas reações metabólicas que levam à produção de ácido láctico, é provável que outro metabólito tenha sido produzido durante o cultivo. De fato, o balanço de carbono realizado para este ensaio (Tabela 4.2) mostrou que a diferença entre o carbono consumido e a soma do carbono encontrado nos produtos é de mais de 38%. Outras análises em HPLC foram realizadas nos ensaios seguintes em biorreator para a identificação dos demais produtos metabólicos do microrganismo.

Tabela 4.2 – Balanço de carbono para cultivo anaeróbico (Ensaio B1), considerando 6 horas de cultivo e 3,0 L de volume

	Substrato/Produto	Concentração	Massa molecular	Mols de C	%
Consumido	Glicose	4,10 g/L	180,15	0,41	100
Produzido	Células	0,95 g/L	25,80	0,11	26,8
Produzido	Ácido láctico	1,40 g/L	90,08	0,14	34,1
Produzido	Dióxido de carbono	$7,60 \times 10^{-4}$ mol/L	44,01	$2,28 \times 10^{-3}$	0,6
Diferença (Consumido-Produzido)				0,16	38,5

Os valores obtidos para a formação de biomassa e consumo de glicose neste ensaio levaram ao cálculo de um fator de conversão de glicose em células de 0,21. Os valores de μ_{\max} determinados por regressão linear utilizando os dados de densidade ótica e concentração celular foram muito semelhantes ($0,37$ e $0,38 \text{ h}^{-1}$, respectivamente). Cabe ainda comentar que estes valores são relativamente altos considerando-se que o cultivo foi realizado em condições anaeróbias.

4.2.2 Ensaio B2 – cultivo aeróbio com meio 1 sem controle de pH

A Figura 4.15 mostra os valores da velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) e de pH.

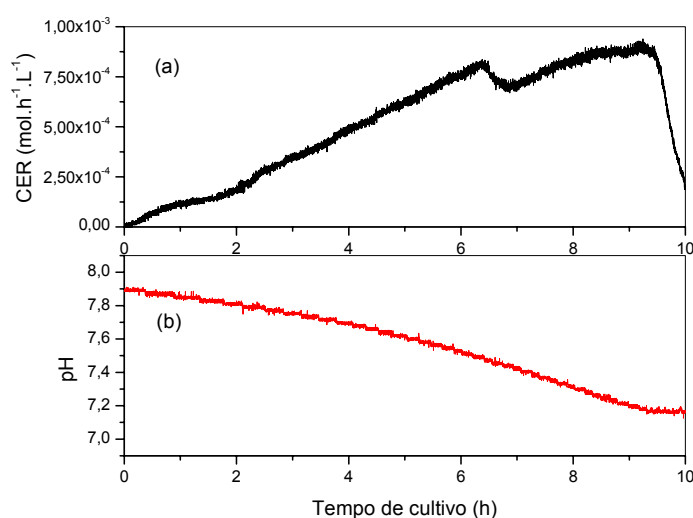


Figura 4.15 – Valores de velocidade de produção de dióxido de carbono (a) e do pH (b) com o tempo do cultivo aeróbio com meio 1 (Ensaio B2)

A Figura 4.16 mostra a variação da frequência de agitação e da porcentagem de oxigênio dissolvido com o tempo de cultivo. Já a Figura 4.17 mostra a variação nas concentrações de glicose, biomassa e ácido lático e ainda a densidade ótica durante o ensaio.

As Figuras 4.15 e 4.16 mostram que o microrganismo consumiu oxigênio, produzindo praticamente o dobro de gás carbônico produzido no ensaio anaeróbio. No entanto, segundo os dados apresentados na Figura 4.17 os valores de densidade ótica não foram significativamente diferentes dos observados no ensaio anaeróbio, o que significa que a energia produzida pela respiração não foi convertida em massa celular. Os dados de biomassa indicam que houve uma produção até menor de células do que no ensaio anaeróbio, mas como pode ter ocorrido erro na determinação desta variável, esta observação não pode ser tomada como conclusiva. Conforme esperado, a produção de ácido lático foi menor do que no ensaio

anaeróbico e é provável que outros metabólitos tenham sido formados. A produção de outros metabólitos é confirmada pelo balanço de carbono para o Ensaio B2 (Tabela 4.3) que indica uma diferença de quase 50% entre o carbono consumido e o presente nos produtos detectados. A análise completa dos metabólitos passou a ser realizada a partir do próximo ensaio em biorreator.

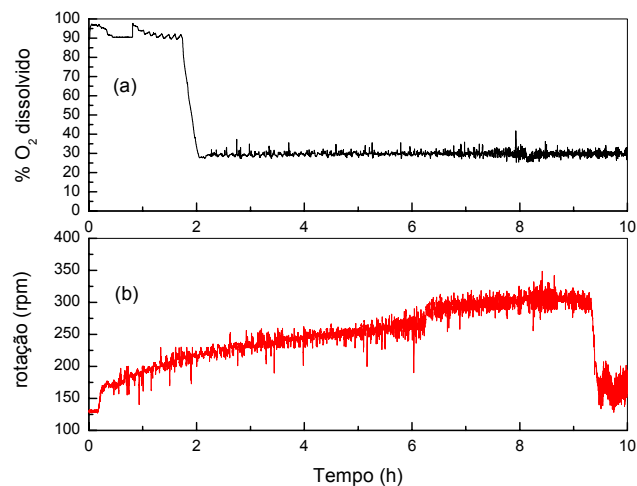


Figura 4.16 – Variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (a) e da frequência de agitação (b) com o tempo de cultivo (Ensaio B2)

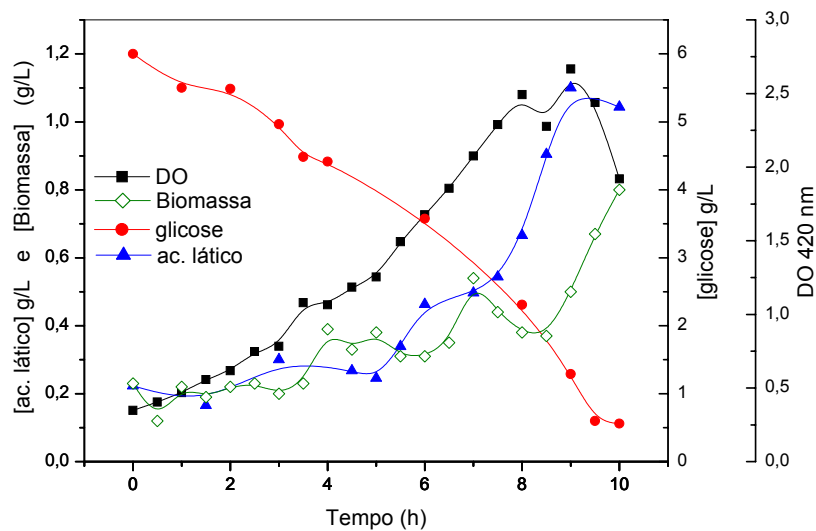


Figura 4.17 – Variação da densidade ótica e das concentrações de glicose, ácido láctico e de células com o tempo de cultivo no ensaio aeróbico com meio 1 (Ensaio B2).

Tabela 4.3 – Balanço de carbono para cultivo aeróbio (Ensaio B1), considerando 9 horas de cultivo e 3,0 L de volume

	Produto	Concentração	Massa molecular	Mols de C	%
Consumido	Glicose	4,75 g/L	180,15	0,475	----
Produzido	Células	1,06 g/L	25,80	0,123	25,9
Produzido	Ácido láctico	1,10 g/L	90,08	0,11	23,2
Produzido	Dióxido de carbono	$4,68 \times 10^{-3}$ mol/L	44,01	$1,40 \times 10^{-2}$	2,9
Diferença: Consumido - Produzido				0,228	48

O valor de $Y_{x/s}$ foi determinado utilizando os valores experimentais da concentração celular e de glicose e o valor obtido para este parâmetro foi de 0,17 g/g. A partir dos valores experimentais da concentração celular determinados pela densidade ótica calculou-se o valor de μ_{max} , de 0,26 h⁻¹.

A comparação entre os resultados do experimento realizado em condições anaeróbias (Ensaio B1) e os do ensaio aeróbio revelou informações surpreendentes. Contradizendo o comportamento esperado, a velocidade máxima específica de crescimento foi maior na ausência (0,38 h⁻¹) do que na presença de oxigênio (0,26 h⁻¹). Isto pode ser indicação de deficiências na fosforilação oxidativa ou no sistema de transporte de elétrons de *E. rhusiopathiae*. Da mesma forma, a conversão de glicose em biomassa foi mais elevada em condições anaeróbias (0,21 g/g) do que em aeróbias (0,17 g/g), o que reforça a hipótese do microrganismo ter deficiências no metabolismo respiratório.

4.2.3 Ensaio B3: cultivo microaerófilo com meio 1 sem controle de pH

A Figura 4.18 mostra os valores da velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) e da variação de pH com o tempo de cultivo. Já a Figura 4.19 mostra a variação da frequência de agitação e da porcentagem de oxigênio dissolvido durante o cultivo.

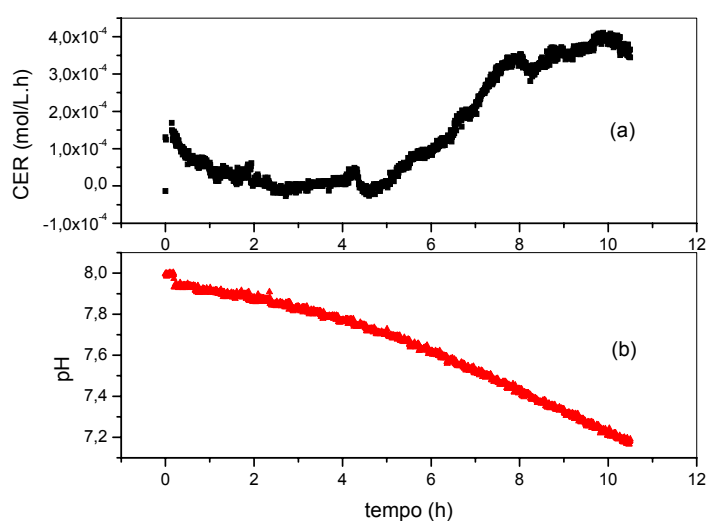


Figura 4.18 – Valores de velocidade de produção de CO_2 (a) e da variação de pH (b) com o tempo de cultivo no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3).

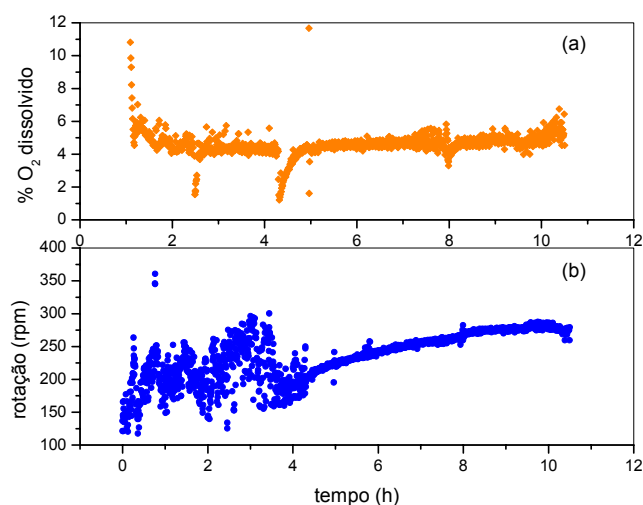


Figura 4.19 – Variação da porcentagem de oxigênio dissolvido (a) e da frequência de agitação (b) com o tempo de cultivo no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3).

A Figura 4.18(a) mostra que a produção de gás carbônico durante o cultivo foi significativa, tendo sua velocidade intensificada durante a fase exponencial do crescimento, chegando ao valor de $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ próximo ao final da batelada. Observa-se no gráfico da Figura 4.18(b) uma queda acentuada do pH com o decorrer do experimento partindo de 8,0 e atingindo o valor de 7,2, mesmo utilizando-se tampão em alta concentração ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M). Este resultado reproduz o comportamento observado nos ensaios aeróbio e anaeróbio anteriores.

O crescimento celular acompanhado pela leitura da densidade ótica (DO) a 420nm, pelo método gravimétrico (massa seca) e pela contagem de UFC/mL está representado na Figura 4.20. Já a Figura 4.21 mostra a produção dos metabólitos comparada ao consumo de glicose e ao crescimento celular.

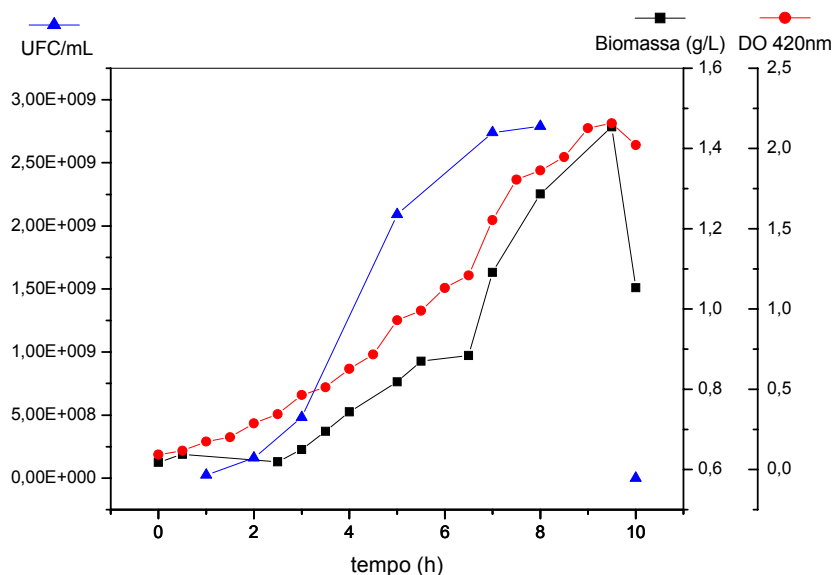


Figura 4.20 – Crescimento celular no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3)

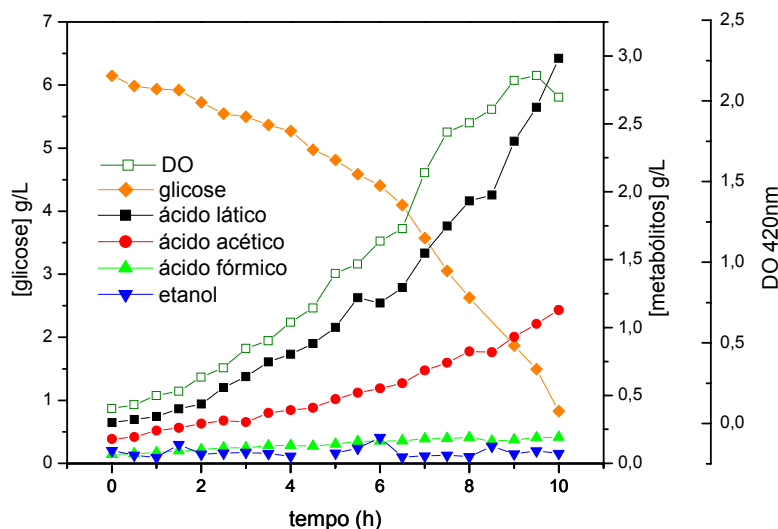


Figura 4.21 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 1 (Ensaio B3)

Pelo gráfico da Figura 4.20 observa-se que as curvas do acompanhamento do crescimento celular (Biomassa e DO) apresentam a mesma tendência a partir do início da fase exponencial. A DO máxima é atingida com 9,5 h de cultivo e chega a 2,16. Nesse mesmo momento foi registrado também o valor máximo da concentração celular pelo método gravimétrico, de 1,45 g/L. A contagem de UFC/mL não foi realizada no tempo de 9,5 h pela impossibilidade de determinação prévia do ponto de máximo do crescimento celular, porém com 8h de cultivo havia $2,8 \times 10^9$ UFC/mL. Vale comentar que a amostra plaqueada após o início da fase de morte celular não apresentou crescimento de nenhuma colônia, indicando que após o término da fase exponencial, já que há ausência de uma fase estacionária, há uma grande perda de viabilidade.

Pela análise dos metabólitos realizada por HPLC, como pode ser visto na Figura 4.21, foi confirmada a formação de ácido acético, ácido fórmico e etanol, além de ácido láctico já identificado nos ensaios anteriores. O ácido láctico é o principal metabólito desse microrganismo nas condições empregadas, e neste ensaio atingiu concentração de 3,0

g/L ao final do cultivo. O segundo metabólito mais produzido foi o ácido acético cuja concentração chegou a 1,1 g/L no final da batelada. A glicose foi integralmente consumida e o crescimento celular cessou quando a concentração deste substrato atingiu valores inferiores a 2,0 g/L.

A partir dos resultados das análises dos metabólitos deste ensaio microaerófilo, realizadas por HPLC, e do gás carbônico presente na corrente gasosa efluente do biorreator, foi feito o balanço de carbono para este experimento (Tabela 4.4). Obteve-se um déficit de apenas 6,5% ao final do cultivo, indicando que os principais catabólitos foram mensurados.

Tabela 4.4 – Balanço de Carbono do ensaio microaerófilo com meio de cultivo 1

	Produto	Massa molecular	mols de C	%
Consumido	Glicose	180,15	0,47	100
Produzido	Células	25,80	$9,72 \times 10^{-2}$	20,89
Produzido	Ac. Lático	90,08	0,23	49,95
Produzido	Ac. Acético	60,05	$8,49 \times 10^{-2}$	18,25
Produzido	Ac. Fórmico	46,3	$8,16 \times 10^{-3}$	1,75
Produzido	Etanol	46,05	$1,21 \times 10^{-2}$	2,60
Produzido	CO ₂	44,01	$7,84 \times 10^{-5}$	0,02
Diferença (Consumido – Produzido):				6,54

Comparando-se o resultado deste ensaio com os experimentos aeróbio e anaeróbio realizados até então, foram observados comportamentos semelhantes em relação aos níveis de concentração celular ao longo do cultivo, com variações nos tempos de duração do crescimento, conforme mostra a Figura 4.22(a). Nas três diferentes condições de aeração empregadas, verificou-se ausência de fase estacionária pelo rápido decréscimo dos valores de densidade ótica ao final da fase exponencial de crescimento.

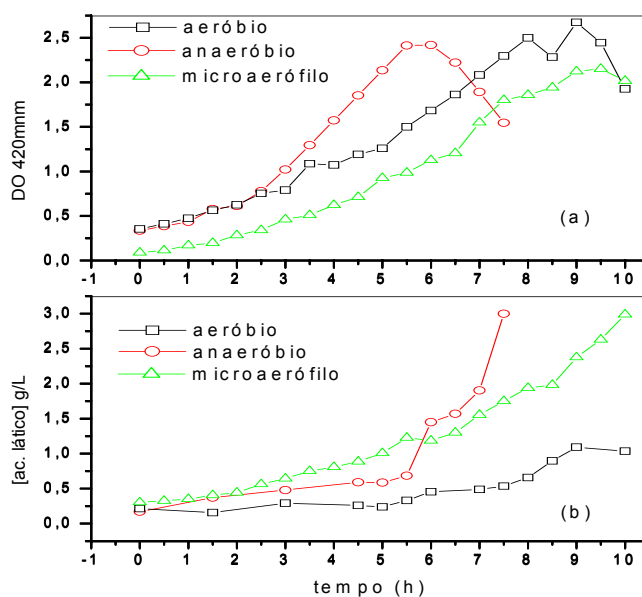


Figura 4.22 – Comparação entre os ensaios realizados com o meio de cultivo 1 em diferentes condições de aeração.

A condição microaerófila, com 5% do limite de saturação de O₂ dissolvido, apresentou comportamento intermediário, de modo geral, entre as condições de ausência e saturação de oxigênio. Como mostrado na Tabela 4.5 observou-se, nesta condição, menor formação de gás carbônico e alta produção de ácido láctico e dos demais metabólitos, o que aproxima os resultados deste cultivo com os obtidos em anaerobiose. Porém, os valores para o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e para a velocidade específica máxima de crescimento são semelhantes aos calculados para a condição aeróbia.

Tabela 4.5 – Resultados dos cultivos de *E. rhusiopathiae* realizados em diferentes condições de aeração com o meio 1

	Anaeróbio	Aeróbio	Microaerófilo
μ_{\max} (h ⁻¹)*	0,38	0,26	0,31
DO max	2,38	2,62	2,16
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,21	0,17	0,16
pH final	7,1	7,2	7,2
[ac.lático] _{final} (g/L)	3,0	1,1	3,0
[CO ₂] _{final} (mol)	$3,96 \times 10^{-3}$	$1,56 \times 10^{-2}$	$4,14 \times 10^{-3}$

* calculado pela DO₄₂₀

4.2.4 Ensaio B4: cultivo microaerófilo com meio 2 e controle de pH

A Figura 4.23 representa o perfil do pH durante o ensaio e a variação da frequência de agitação para a manutenção da concentração de O_2 dissolvido em 5% do seu valor de saturação.

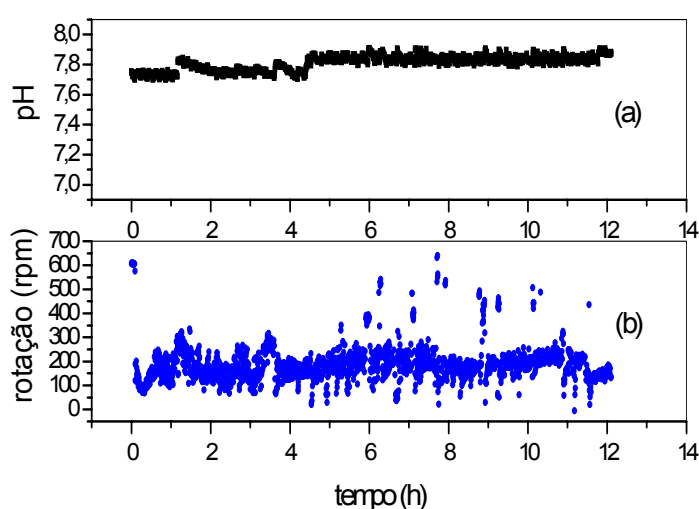


Figura 4.23 – Variação do pH (a) e da frequência de agitação (b) durante o ensaio microaerófilo, com o meio 2 e controle de pH (Ensaio B4).

Observa-se pela Figura 4.23 que o controle automático do pH e o novo sistema tamponante funcionaram adequadamente, mantendo o pH praticamente constante durante todo o cultivo, oscilando apenas entre 7,7 e 7,9. Já a rotação oscilou entre 100 e 350 rpm, aproximadamente, garantindo a oxigenação do meio desejada.

O crescimento celular pode ser visto na Figura 4.24, e a Figura 4.25 mostra a produção dos metabólitos *versus* o consumo da glicose, juntamente com a curva do crescimento celular representada pelas medidas de densidade ótica do caldo.

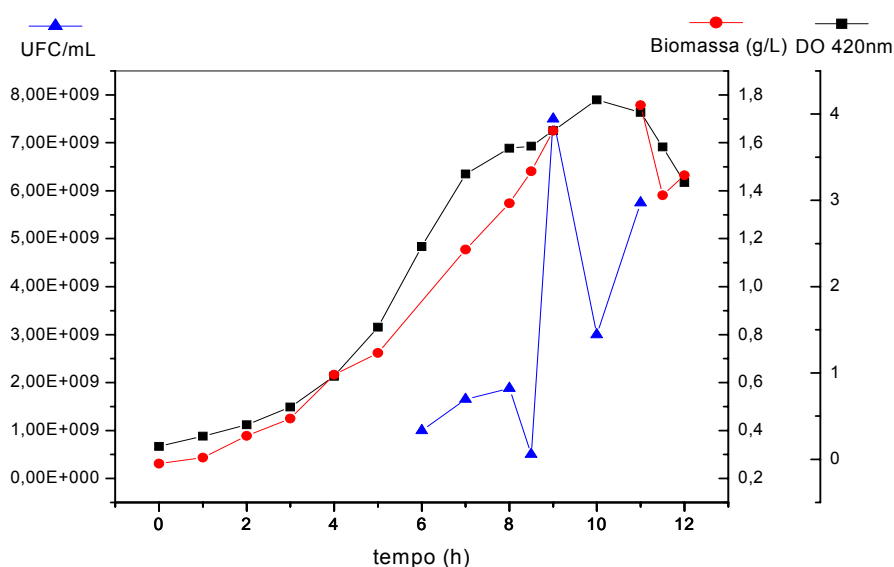


Figura 4.24 – Crescimento celular no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 2 e controle de pH.

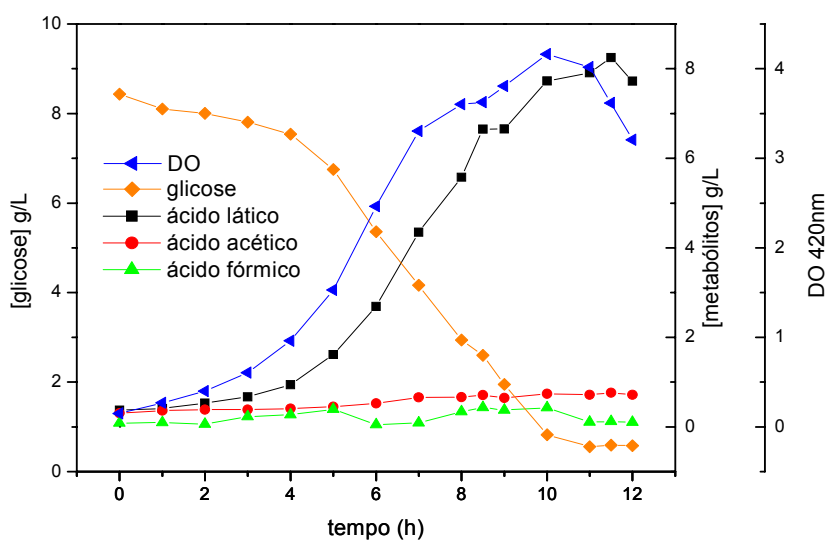


Figura 4.25 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio microaerófilo em biorreator com meio 2

Pelos resultados mostrados na Figura 4.24 observa-se que a nova formulação do meio possibilitou um grande aumento no crescimento celular, e no ponto máximo da concentração de células a DO atingida foi de 4,16. Verifica-se também, que o controle de pH implementado neste ensaio provocou alteração no perfil da curva de crescimento, com o

surgimento de uma fase intermediária entre o final do crescimento exponencial e a fase de morte. O acompanhamento da concentração celular realizado pela massa seca confirmou que nas novas condições empregadas houve maior formação de biomassa, e embora o ponto onde foi registrado o maior valor de DO não tenha sido mensurado pelo método gravimétrico por problemas experimentais, é possível estimar que a concentração celular neste ensaio tenha chegado a valores entre 1,8 e 2,0 g/L. A contagem de UFC/mL não pôde ser considerada como representativa do perfil de crescimento neste ensaio, pois com as alterações realizadas aqui, a metodologia para o plaqueamento necessitou de modificações quanto às diluições a serem utilizadas.

Os resultados da análise da produção de metabólitos, mostrados na Figura 4.25, revelaram que o microrganismo tolera bem as altas concentrações de ácido lático excretadas no meio, pois o acúmulo deste metabólito no final do cultivo atingiu valores superiores a 8,0 g/L. Esta constatação descartou a hipótese de que estivesse ocorrendo inibição do crescimento pela presença do ácido lático nas condições empregadas. Na verdade o problema causado pelos ácidos orgânicos excretados no meio pelo microrganismo estava relacionado principalmente à queda do pH gerada, e não somente a efeitos tóxicos, pois como foi observado neste experimento, com o pH controlado e mantido próximo a 8,0, as altas concentrações dos ácidos não afetaram o crescimento celular, que foi interrompido apenas, ou principalmente, pela exaustão da glicose. A realização de experimentos em batelada alimentada contribuirá na verificação de possíveis efeitos tóxicos provocados por concentrações de ácido lático acima das atingidas nos experimentos em batelada simples.

Os avanços obtidos com a utilização do meio de cultivo 2, aliado ao controle automático do pH, podem ser melhor visualizados na Figura 4.26 pela comparação dos resultados deste experimento com os outros três ensaios em biorreator realizados com o meio de cultivo 1.

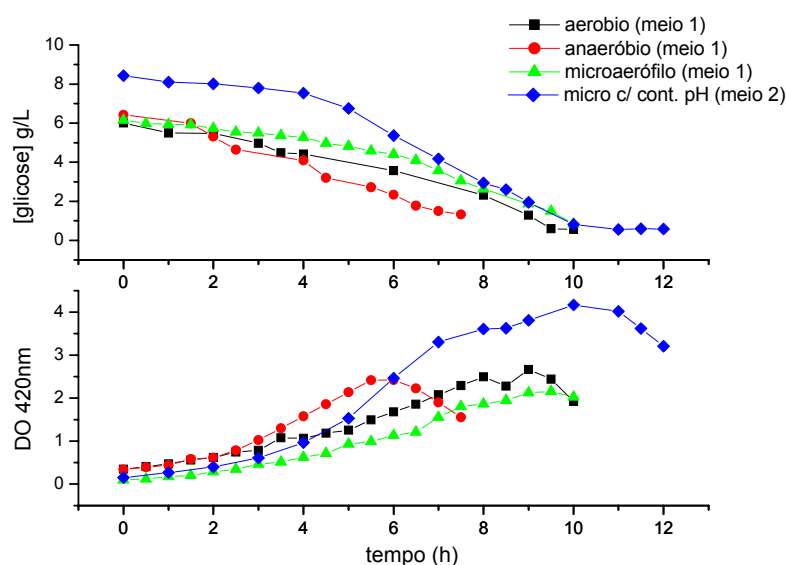


Figura 4.26 – Comparação entre os três experimentos realizados em biorreator com o meio de cultivo 1 e o experimento microaerófilo realizado em biorreator com o meio de cultivo 2

Pela comparação dos valores medidos de densidade ótica entre o ensaio realizado com o meio de cultivo 2 e os demais (dentre os quais a DO máxima registrada foi na condição anaeróbia), observa-se que houve um aumento no crescimento celular de aproximadamente 55%. Verifica-se também um aumento no tempo da batelada, provocado pela fase estacionária presente no ensaio onde houve controle do pH.

4.2.5 Ensaio B5: cultivo aeróbio (1) com meio 2 e controle de pH

Neste experimento foi estudada a condição plenamente aeróbia com o meio suplementado e com o pH controlado. Na Figura 4.27 são mostrados os perfis de três dos parâmetros controlados durante o ensaio para a execução deste experimento.

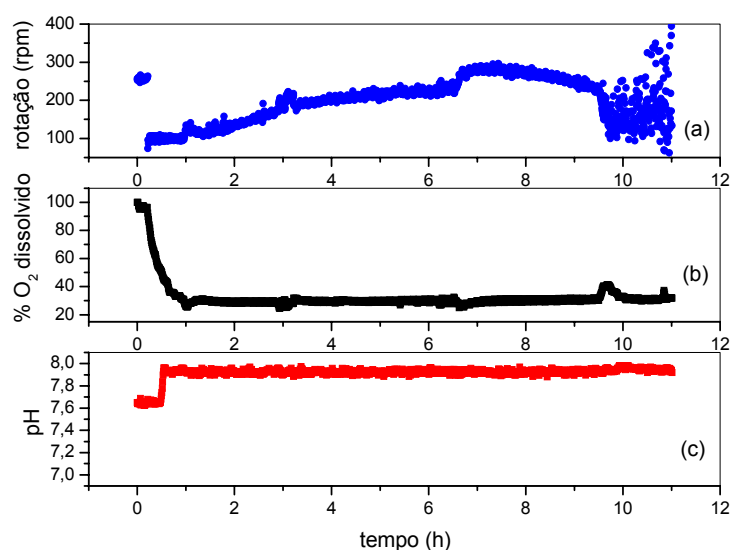


Figura 4.27 – Variações da frequência de agitação (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) e do pH (c) durante o cultivo aeróbio 1 com o meio de cultivo 2

Como pode ser visto na Figura 4.27, a agitação do meio variou entre 100 e 300 rpm para manter a porcentagem de O₂ dissolvido em 30% do seu limite de saturação. Já o pH, após os 30 minutos iniciais do ensaio, foi mantido entre 7,9 e 8,0 durante todo o cultivo.

A Figura 4.28 apresenta os resultados do acompanhamento do crescimento celular.

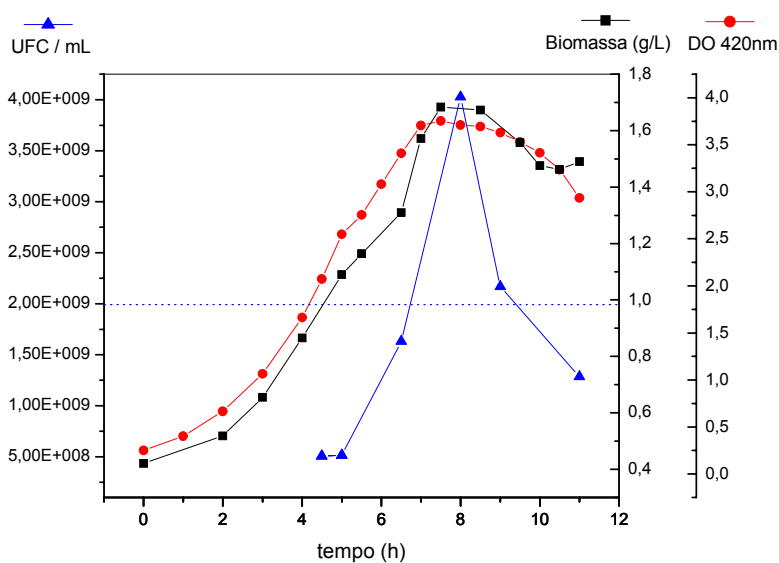


Figura 4.28 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 1 em biorreator com meio 2

A Figura 4.29 apresenta as concentrações dos metabólitos gerados e da glicose consumida ao longo do cultivo, juntamente com o perfil do crescimento celular acompanhado pela DO do caldo durante a batelada.

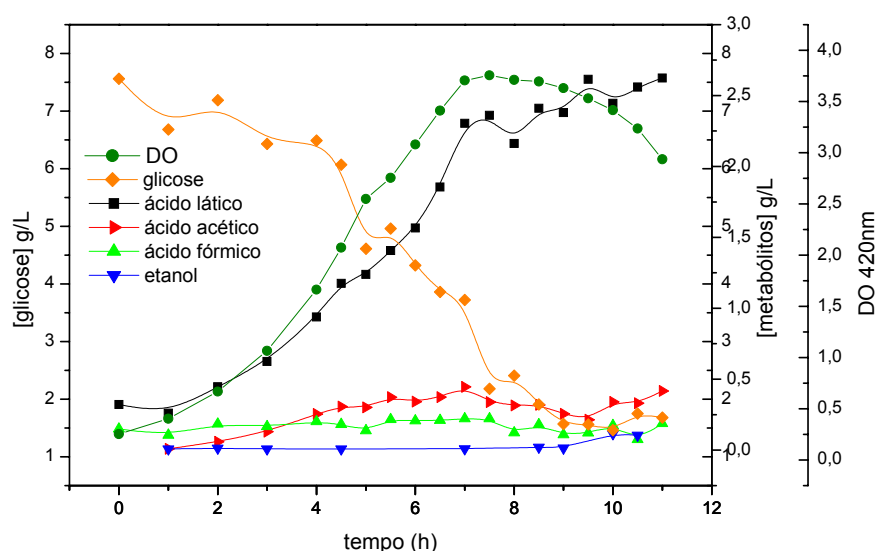


Figura 4.29 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio (1) em biorreator com meio 2 e controle de pH.

As curvas da DO e de biomassa (g/L) visualizadas na Figura 4.28 apresentam a mesma tendência durante todo o cultivo, com exceção do final, onde há interferência dos *debris* celulares na medida da massa seca. A DO máxima atingida foi de 3,75 e no mesmo ponto, com 7,5 horas de ensaio, a concentração celular em g/L também atinge seu valor máximo, chegando próximo de 1,7 g/L.

O perfil do crescimento celular observado neste experimento foi bastante semelhante ao do ensaio microaerófilo com o meio de cultivo 2, ficando aqui ainda mais evidente a presença da fase estacionária. O tempo da batelada foi reduzido na condição aeróbia.

A meta de atingir-se concentração celular de $2,0 \times 10^9$ UFC/mL, representada pela linha pontilhada na Figura 4.28, foi ultrapassada, e com 8h de cultivo o valor de $4,0 \times 10^9$

UFC/mL foi alcançado. O acompanhamento do crescimento do microrganismo pela contagem de UFC/mL revelou ainda um comportamento de intensa queda na viabilidade das células logo após o ponto de maior concentração celular. Esta observação tão importante não pode ser feita pela curva da DO porque nesta leitura não há distinção entre as células viáveis e não viáveis. Mais ainda, no acompanhamento da concentração celular pela densidade ótica todas as células íntegras, mesmo já tendo perdido sua viabilidade, contribuem para o resultado da medida, desde que o processo de lise celular não tenha ocorrido com as células mortas. Por isso, justifica-se tamanhas diminuições nas contagens de UFC/mL entre medidas consecutivas (realizadas após o ponto de máximo da concentração celular), quando entre os mesmos pontos, medidos agora pela DO, as diferenças sejam mínimas. A perda de viabilidade está provavelmente relacionada à baixa concentração de glicose presente no meio após 8 h de cultivo.

Quanto à produção dos metabólitos, como pode ser visto na Figura 4.29, a concentração de ácido láctico ficou abaixo de 3,0 g/L. Como já observado no ensaio aeróbio com meio 1, as vias fermentativas foram acionadas mesmo em condições plenamente aeróbias. Os demais ácidos orgânicos também foram produzidos e o etanol foi identificado em concentrações mínimas.

4.2.6 Ensaio B6: cultivo aeróbio (2) com meio 2 e controle de pH

Este experimento foi a duplicata do ensaio B5. Todas as condições empregadas no experimento anterior foram repetidas aqui, porém num outro biorreator sem o sistema de aquisição de dados. Por isso os valores da frequência de agitação, porcentagem de oxigênio dissolvido, e de pH foram registrados a cada 30 minutos, nos momentos das coletas das amostras. A Figura 4.30 mostra o acompanhamento destas três variáveis durante o cultivo.

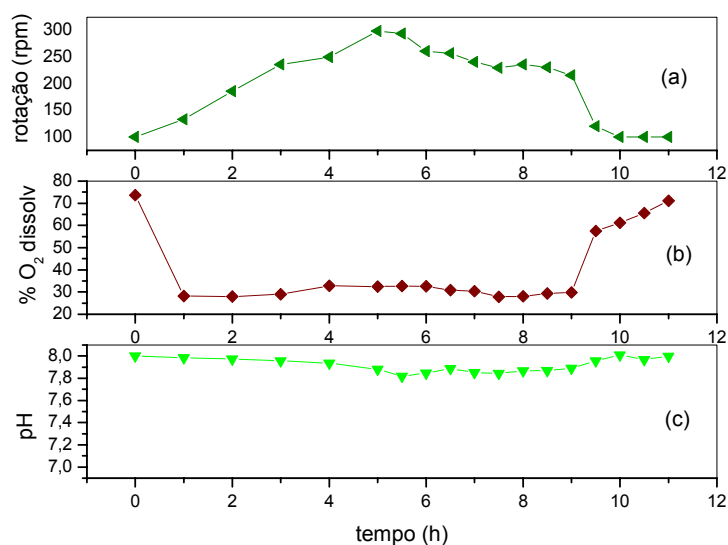


Figura 4.30 – Variações da frequência de agitação (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) e do pH (c) durante o cultivo aeróbio 2 com o meio de cultivo 2 e controle de pH

Como mostra a Figura 4.30(a), a rotação variou entre 100 e 300 rpm durante a batelada, e o oxigênio dissolvido foi mantido em 30% do seu limite de saturação no decorrer do experimento como pode ser visto no gráfico da Figura 4.30(b). A porcentagem de oxigênio dissolvido começa a aumentar assim que se inicia a fase de morte celular e este é um dos parâmetros que pode ser utilizado para definição do momento adequado de interrupção da batelada para a produção de bacterinas. Como nos demais ensaios realizados com controle de pH, neste ensaio esta variável foi bem controlada e mantida entre 7,8 e 8,0 durante todo o cultivo, como mostra o gráfico da Figura 4.30(c).

O perfil do crescimento celular pode ser visto na Figura 4.31, e a Figura 4.32 apresenta a produção dos metabólitos, o consumo da glicose e a curva da densidade ótica do caldo ao longo do cultivo.

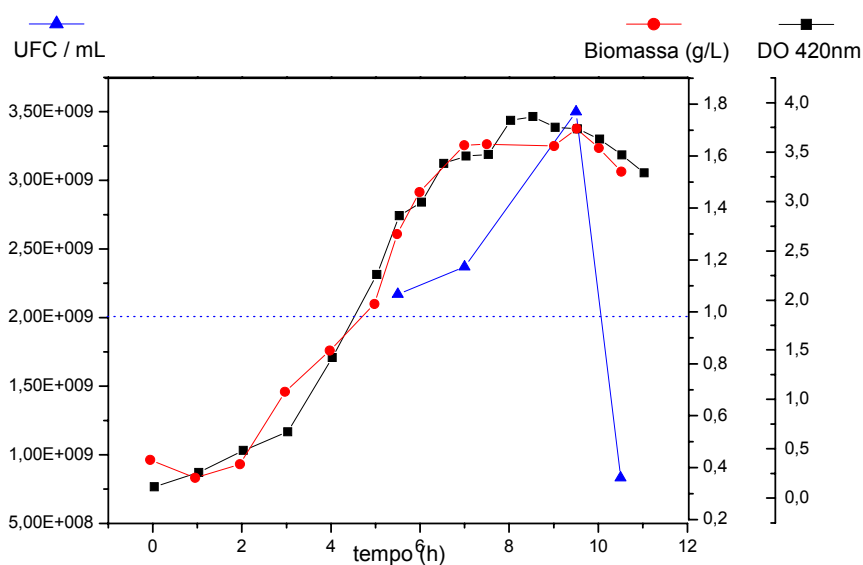


Figura 4.31 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 2 em biorreator com meio 2 com controle de pH.

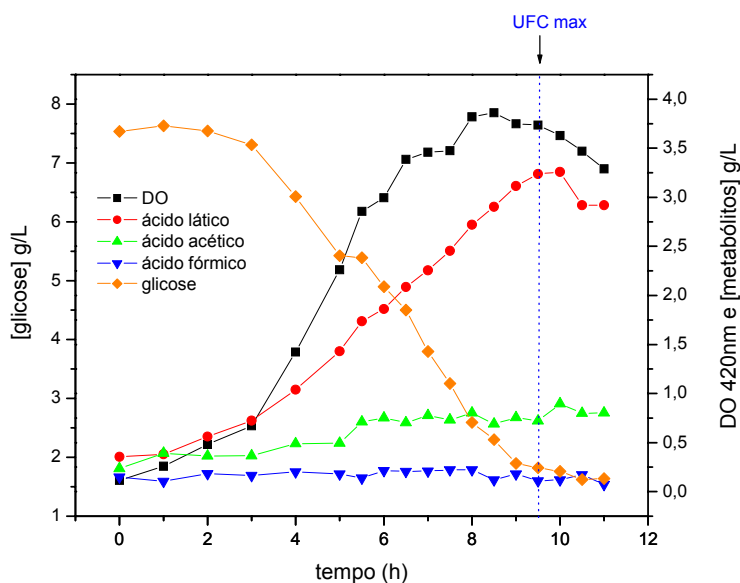


Figura 4.32 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio 2 em biorreator com meio 2 e controle de pH.

Os resultados mostrados na Figura 4.31 são bastante semelhantes aos obtidos no ensaio B5. Há uma ótima correspondência entre os perfis das curvas de crescimento celular representado pelas medidas de densidade ótica e pelo método gravimétrico em ambos os experimentos, e os valores de DO e biomassa (g/L) máximos neste ensaio foram de 3,86 e 1,7, respectivamente, sendo muito semelhantes aos do ensaio anterior. A meta de $2,0 \times 10^9$

UFC/mL foi superada novamente, e com 9,5 h de cultivo a concentração celular atingida foi de $3,5 \times 10^9$ UFC/mL.

O gráfico da Figura 4.32 mostra que a produção de metabólitos ao longo do experimento foi semelhante à observada anteriormente, com um leve aumento na concentração final de ácido láctico que chegou a 3,26 g/L com 10 h de ensaio.

4.2.7 Ensaio B7: cultivo aeróbio (3) com meio 2 e controle de pH para o preparo de bactéria

A Figura 4.33 apresenta o crescimento do microrganismo medido pela densidade ótica, pela massa seca e pela contagem de UFC/mL durante o cultivo. Já na Figura 4.34 estão representados o consumo de glicose, a produção de metabólitos e a curva de DO ao longo do experimento.

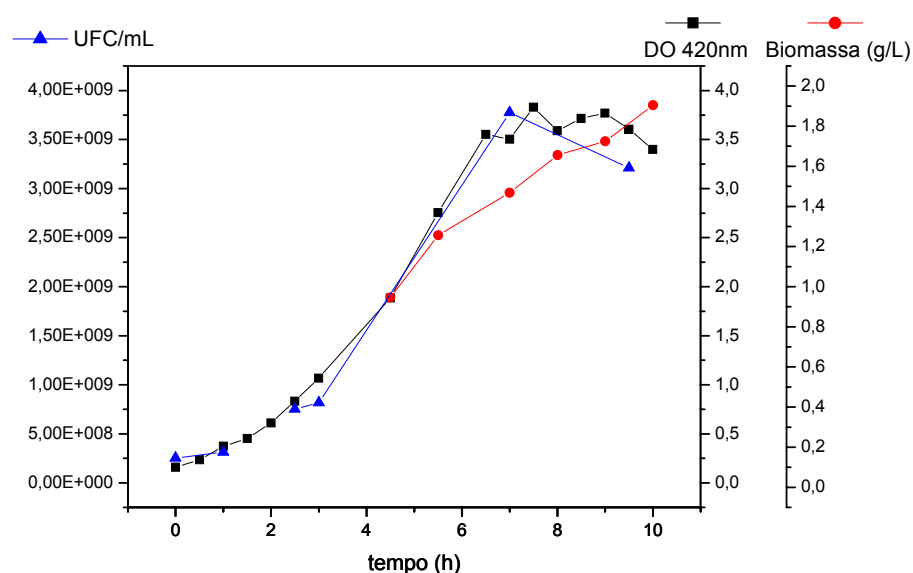


Figura 4.33 – Crescimento celular no ensaio aeróbio 3 em biorreator com meio 2 e controle de pH

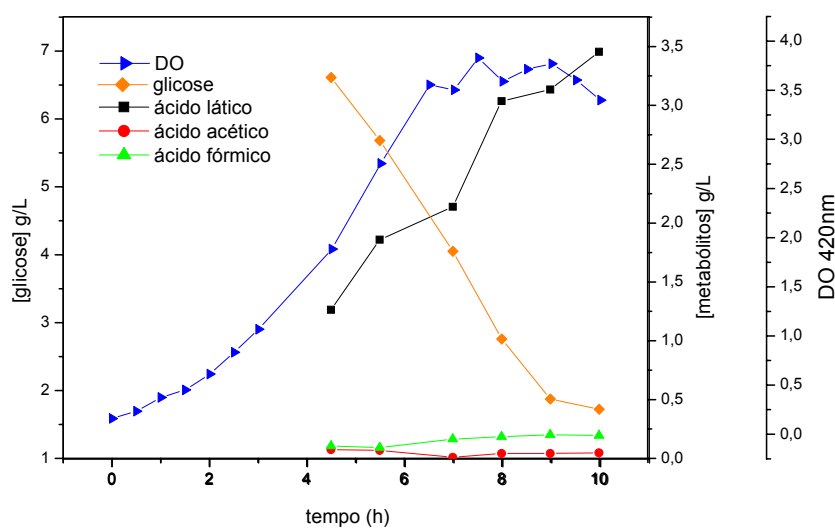


Figura 4.34 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio aeróbio 3 em biorreator com meio 2 e controle de pH

Pela análise dos dados da Figura 4.33, verifica-se um comportamento muito semelhante no perfil de crescimento celular ao registrado nos outros dois ensaios realizados nas condições empregadas aqui.

A concentração dos metabólitos e o consumo de glicose só foram mensurados após 6,5 h de cultivo, mas é possível notar pela Figura 4.34 que não há nenhuma diferença significativa entre os resultados obtidos nestas análises e o comportamento esperado, tendo os ensaios anteriores como padrão de comparação.

Foi preparada uma bacterina para ser testada em camundongos com uma amostra coletada quando a concentração celular chegou a $3,5 \times 10^9$ UFC/mL.

Os resultados do teste de imunização, realizados no Instituto Biológico, mostraram que a vacina preparada conferiu o mesmo nível de proteção oferecido pelas vacinas disponíveis no mercado, como apresentado na Figura 4.35.

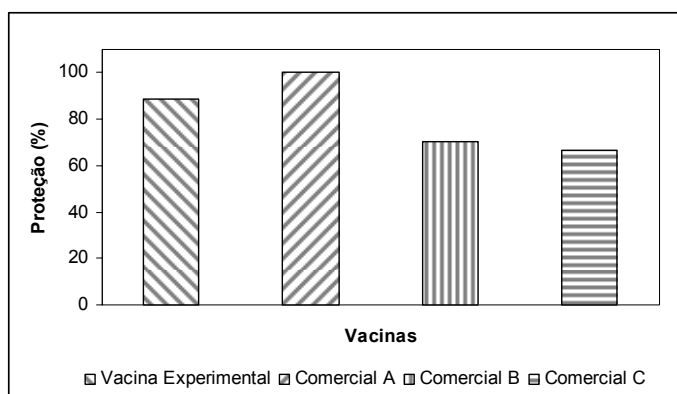


Figura 4.35 – Comparação dos resultados dos testes de imunização em camundongos da bactéria preparada no ensaio 12 e três vacinas comerciais

4.2.8 Ensaio B8: cultivo anaeróbico com meio 2 e controle de pH

A Figura 4.36 mostra o crescimento do microrganismo medido pela densidade óptica, pela massa seca e pela contagem de UFC/mL durante o cultivo. Já na Figura 4.37 estão representados o consumo de glicose, a produção de metabólitos e a curva de DO ao longo do experimento.

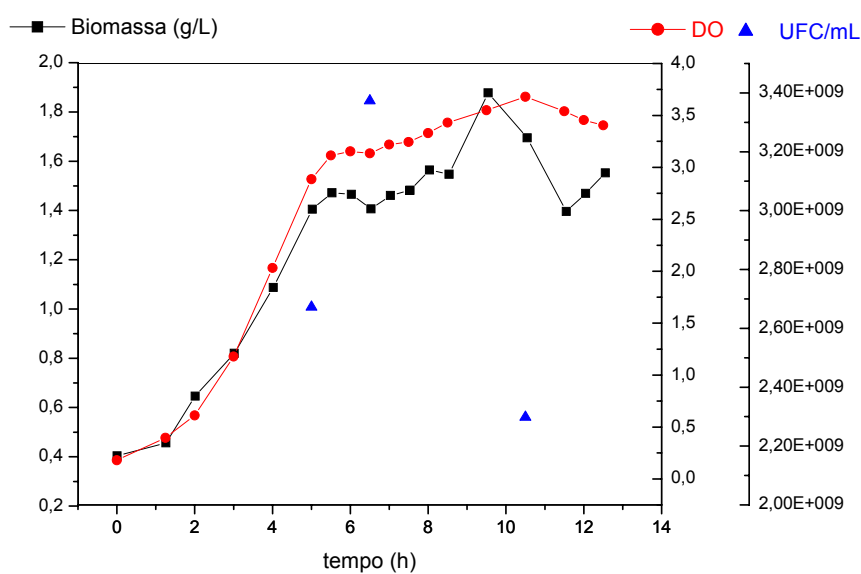


Figura 4.36 – Crescimento celular no ensaio anaeróbico com meio 2 e controle de pH

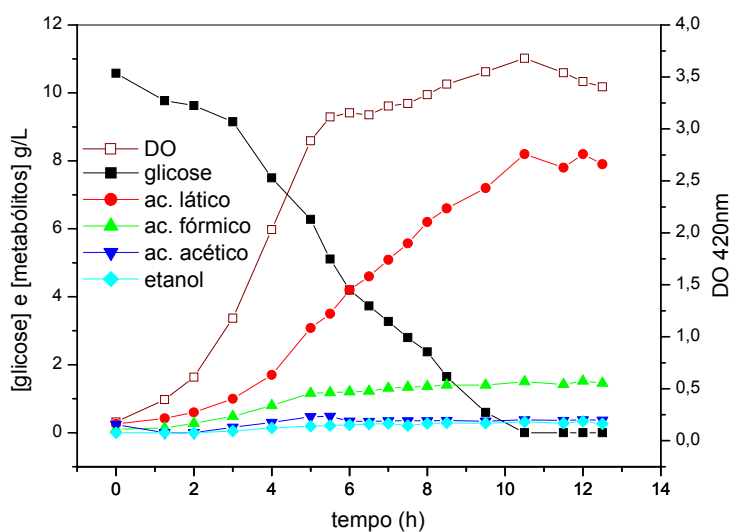


Figura 4.37 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no ensaio anaeróbico em biorreator com meio 2 e controle de pH

Como pode ser visto na Figura 4.36, o crescimento do microrganismo nesta condição foi semelhante ao observado nos ensaios aeróbios, porém a concentração celular máxima levou um tempo maior para ser atingida, ficando em torno de 3,7. Os dados de massa seca e de UFC/mL também foram semelhantes aos obtidos em aerobiose chegando em quase 2 g/L e $3,5 \times 10^9$, respectivamente. Já sobre o perfil da curva algumas diferenças foram notadas: a velocidade de crescimento do microrganismo na fase exponencial foi muito mais pronunciada que nos ensaios aeróbios, como indica o μ_{\max} calculado de $0,61 \text{ h}^{-1}$ (calculado usando os valores de DO), e a duração da fase estacionária foi maior nesta condição.

Sobre os metabólitos verificou-se, como esperado e ilustrado na Figura 4.37, uma alta produção de ácido láctico, ultrapassando o valor de 8,0 g/L, como ocorrido no ensaio micraeorófilo com o meio 2, e diferentemente dos demais ensaios realizados observou-se uma maior produção de ácido fórmico que de ácido acético.

Neste ensaio, o efeito de inibição do crescimento celular provocado pelo ácido láctico foi claramente observado. Os resultados mostram que a fase exponencial de crescimento chega ao final por volta de seis horas após o início do cultivo, quando ainda há 4

g/L de glicose no meio. Neste momento, a concentração de ácido láctico é de apenas 4 g/L, mas, aparentemente, já é suficiente para inibir o crescimento. Isso significa que a inibição do crescimento pelo lactato ocorre de maneiras diferentes na presença de oxigênio (o microrganismo é menos sensível ao lactato) e em condições anaeróbicas (onde o microrganismo fica mais sensível ao acúmulo deste metabólito), pois no ensaio microaerófilo com meio 2, houve produção de mais de 8 g/L de ácido láctico e não foi observado este efeito de inibição. O fato da velocidade de consumo da glicose não ter sido diminuída após este momento ($t = 6$ h) confirma que a longa fase estacionária que se inicia após o final da fase exponencial é reflexo do efeito de inibição do crescimento pelo lactato e não da falta de algum nutriente no meio.

4.2.9 Comparação dos resultados obtidos em biorreator operado em batelada simples

Grandes avanços foram alcançados ao longo dos ensaios realizados nesta fase em decorrência principalmente dos resultados de aprimoramento do meio de cultivo e também pela implementação do controle automático de pH no biorreator. Nestas novas condições foram alcançadas as concentrações celulares necessárias para a produção de vacinas, e dentre outras coisas, foi possível também iniciar as investigações sobre os fatores limitantes do crescimento do microrganismo em estudo.

A Figura 4.38 mostra os avanços obtidos nas três diferentes condições de aeração estudadas com a suplementação do meio de cultivo empregada nos ensaios com o meio 2.

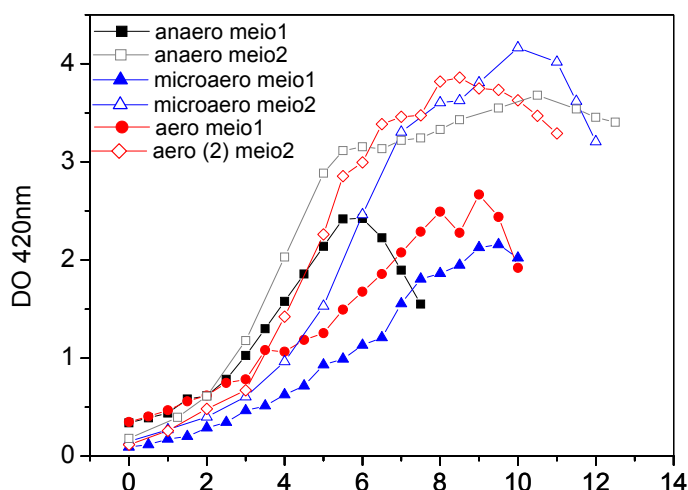


Figura 4.38 – Comparação do crescimento celular nos ensaios realizados com os meios de cultivo 1 e 2 nas diferentes condições de aeração

Como pode ser observado no gráfico da Figura 4.38, os ganhos na produção de biomassa foram significativos com o controle de pH e a utilização do meio 2, independentemente da condição de aeração empregada, variando de cerca de 40 a 55%. A maior concentração de nutrientes intensificou o crescimento celular e conseqüentemente foram registrados maiores valores de μ_{\max} nos ensaios com o meio suplementado. Foram observadas também alterações nos perfis das curvas de crescimento, com o surgimento de uma fase intermediária entre o final da fase exponencial e o início do processo de morte celular. Esse comportamento foi mais pronunciado na condição anaeróbia, porém neste experimento o motivo para o surgimento de uma longa fase estacionária foi o acúmulo de metabólitos, e não apenas o controle do pH como nas demais condições. As diferenças na produção de ácido lático foram significativas tanto entre os ensaios realizados com diferentes meios de cultivo (meios 1 e 2) quanto entre as diferentes condições de aeração, como mostra a Figura 4.39

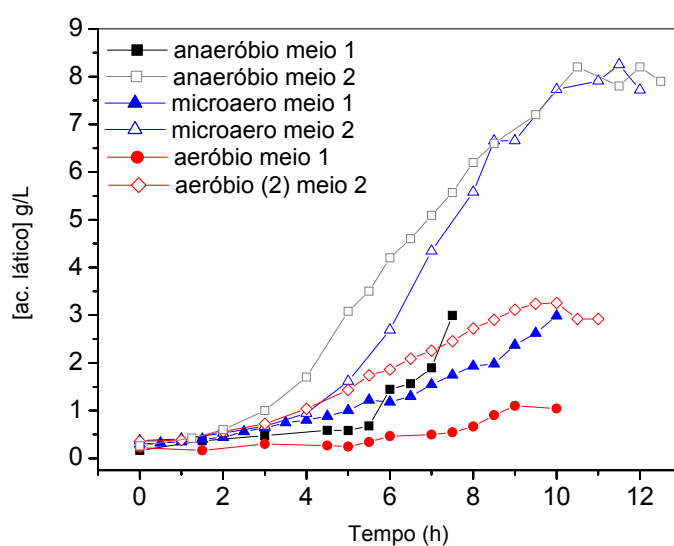


Figura 4.39 – Comparação da produção de ácido láctico nos ensaios realizados com os meios de cultivo 1 e 2 nas diferentes condições de aeração

Um resumo dos resultados obtidos nos experimentos realizados com o meio 2 é apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Resultados obtidos nos ensaios realizados com o meio 2 em diferentes condições de aeração

	Anaeróbio	Aeróbio**	Microaerófilo
μ_{\max} (h^{-1})*	0,61	0,51	0,43
DO ₄₂₀ máxima	3,68	3,82	4,17
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,15	0,23	0,19
[ac.lático] _{final} (g/L)	8,20	3,11	8,25

*calculado a partir dos dados de Densidade Ótica

**média dos ensaios aeróbios 1, 2 e 3 com meio 2 (ensaios B5, B6 e B7)

A maior velocidade específica máxima de crescimento foi registrada em anaerobiose, porém neste experimento a concentração celular máxima atingida foi a menor entre as três condições estudadas. Tal fato é explicado pelo efeito de inibição provocado pelo acúmulo de ácido láctico, que se mostrou mais tóxico na ausência de oxigênio, já que no ensaio microaerófilo foi atingida a maior concentração celular máxima apesar da alta concentração deste metabólito.

De forma semelhante aos resultados dos ensaios com o meio 1 (Tabela 4.5) a condição microaerófila apresentou comportamento intermediário entre as condições de ausência e saturação de oxigênio, pois apesar da alta produção de metabólitos semelhante ao ensaio anaeróbico, os valores para a concentração celular máxima e para a velocidade específica máxima de crescimento se assemelham aos calculados para a condição aeróbia.

Já na avaliação da produção de antígeno realizada por análises de eletroforese de extratos da parede celular (Figura 4.40), verificou-se a ausência da banda da SpaA na amostra do ensaio anaeróbico. Esta observação parece estar de acordo com os resultados dos testes de imunização das bacterinas preparadas em diferentes condições de aeração, onde a vacina com o caldo do cultivo anaeróbico ofereceu o menor grau de proteção dentre as três condições testadas. Análises de imunodeteção precisam ainda ser realizadas para confirmar estes resultados.

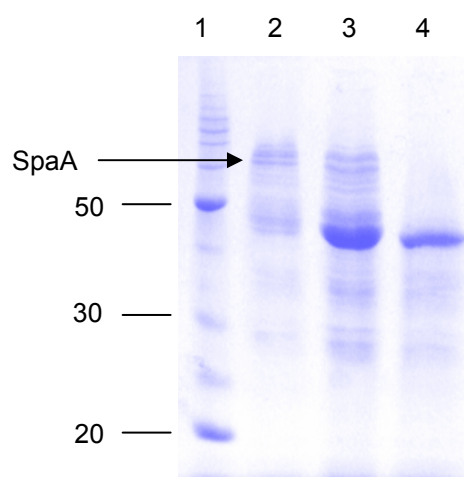


Figura 4.40 – Eletroforese das amostras de extração das células com colina, das três condições de aeração estudadas. Linha 1: Padrões de massa molecular (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen); Linha 2: cultivo aeróbico; Linha 3: cultivo microaerófilo; Linha 4: cultivo anaeróbico

Verificou-se também pela comparação dos resultados entre os diversos experimentos, uma possível relação entre a perda de viabilidade e a concentração de glicose

no meio. Observou-se, como é possível visualizar na Figura 4.41, que após a concentração de glicose cair a níveis abaixo de 2,0 g/L, ocorre em geral uma queda brusca na viabilidade celular. A partir dessa constatação, sugere-se que o momento adequado para interromper a batelada e obter-se $\text{UFC/mL} > 2,0 \times 10^9$ seja quando a concentração de glicose no meio estiver se aproximando desse valor. Cabe salientar que este valor de 2,0 g/L indicado aqui, se refere à análise da glicose por HPLC como descrita no item 3.3.2. Outros métodos de análise da concentração desse substrato no meio como, por exemplo, o método enzimático, podem indicar um valor ligeiramente diferente de 2,0 g/L, devido as diferenças de sensibilidade existentes entre os diferentes métodos de dosagem de açúcares e a possíveis interferências na análise por DNS provocadas por componentes do meio de cultivo. A hipótese de o ácido láctico estar interferindo na viabilidade foi descartada pelos dados obtidos no ensaio microaerófilo com o meio de cultivo 2, quando a concentração desse metabólito chegou a 8,0 g/L sem inibir o crescimento celular (essa afirmação é válida para cultivos em batelada simples, conduzidos em condições aeróbias e microaerófilas). As regiões destacadas pelos círculos se referem ao momento em que a concentração celular ultrapassa $2,0 \times 10^9$ UFC/mL e continua em crescimento até o ponto de máximo.

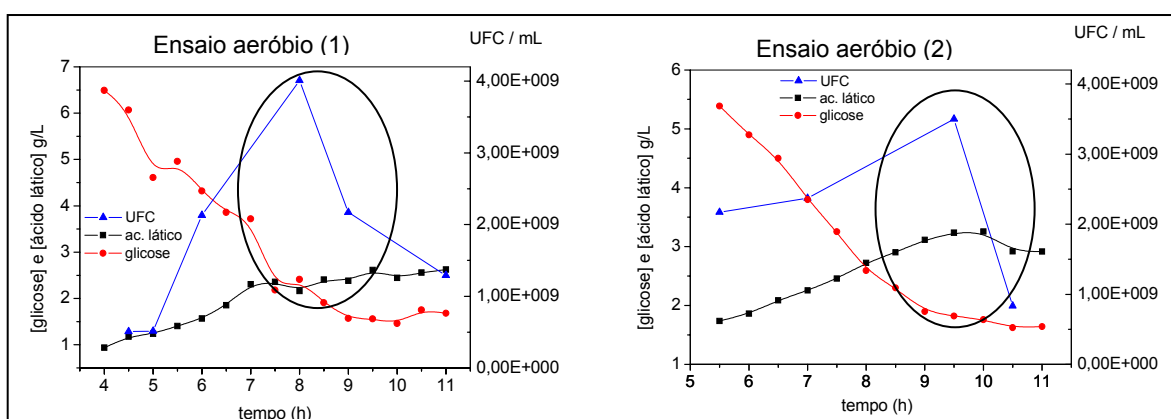


Figura 4.41 – Relação entre concentração de glicose, ácido láctico e viabilidade celular

A Tabela 4.7 lista alguns parâmetros cinéticos dos ensaios realizados em biorreator em batelada simples. Os dados mostram que houve um aumento expressivo nos

valores de velocidade específica máxima de crescimento após os experimentos passarem a ser realizados com o meio 2. Com exceção do ensaio anaeróbico com o novo meio, nos outros experimentos observou-se ganhos também nos fatores de conversão de substrato em células. No caso do ensaio anaeróbico, este parâmetro foi prejudicado pelo tempo mais longo da batelada. O valor de $Y_{x/s}$ do ensaio aeróbico 3 não pôde ser calculado, pois neste experimento não foi feita a determinação de biomassa (g/L) inicial.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos dos ensaios em biorreator em batelada simples

Ensaio	$Y_{x/s}$ (g/g)	μ_{\max} (h^{-1}) calculado pela DO
B1 – anaeróbico (meio 1)	0,21	0,38
B2 – aeróbico (meio 1)	0,17	0,26
B3 – microaero (meio 1)	0,18	0,31
B4 – microaero (meio 2)	0,19	0,43
B5 – aeróbico 1 (meio 2)	0,23	0,46
B6 – aeróbico 2 (meio 2)	0,22	0,54
B7 – aeróbico 3 (meio 2)	-----	0,54
B8 – anaeróbico (meio 2)	0,15	0,61

Apesar do crescimento do microrganismo ser ligeiramente favorecido nas condições com baixa ou nenhuma presença de oxigênio, a condição aeróbia foi escolhida para continuação do estudo de otimização deste processo, agora em batelada alimentada, devido aos bons resultados das vacinas preparadas nesta condição e principalmente porque qualquer estratégia para maximizar a produção de biomassa no cultivo deste microrganismo deve contornar o problema de inibição do crescimento celular provocado pelo acúmulo de ácido láctico, o que é alcançado naturalmente na condição de aerobiose. Dessa forma, o estudo desta condição de aeração foi realizado em triplicata.

A Figura 4.42 compara o crescimento celular acompanhado pela leitura de densidade ótica e pela medida da produção de biomassa ao longo dos três experimentos.

Observa-se uma ótima reprodutibilidade dos resultados obtidos. O perfil de consumo de glicose e de produção de ácido láctico também se mostraram bastante semelhantes nos três ensaios realizados (Figura 4.43).

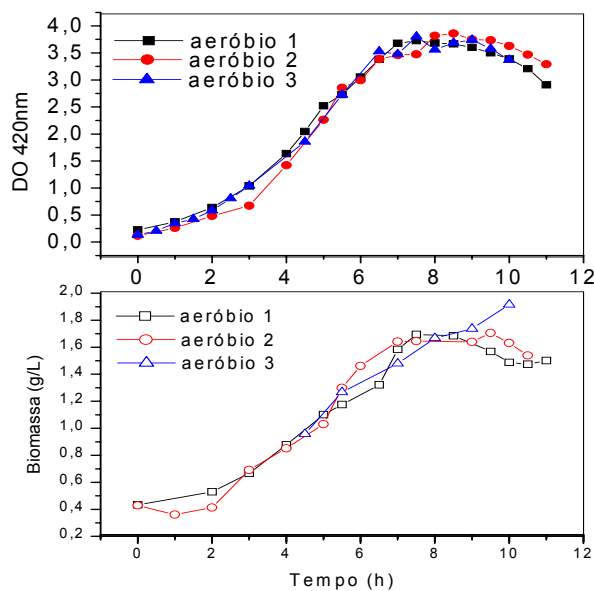


Figura 4.42 – Comparação do crescimento celular entre os ensaios aeróbios com meio 2

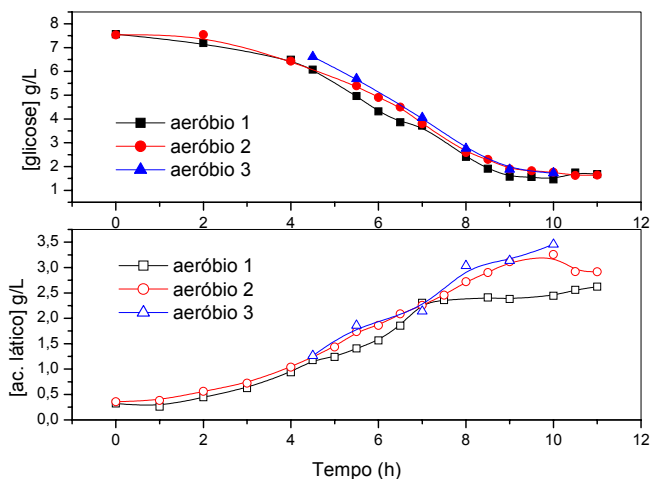


Figura 4.43 – Comparação do consumo de glicose e da produção de ácido láctico entre os cultivos aeróbios com meio 2

A partir destes resultados, foram confeccionadas curvas médias com desvio padrão para o crescimento celular e para os perfis de consumo de substrato e produção de metabólito (Figura 4.44).

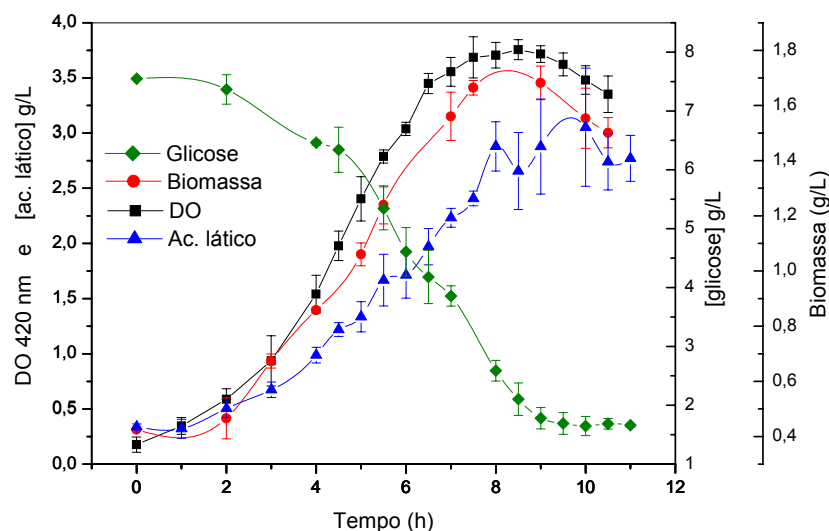


Figura 4.44 – Curvas médias e desvio padrão dos perfis de consumo de glicose, formação de ácido láctico e crescimento celular dos ensaios aeróbios 1, 2 e 3 com meio 2

Observa-se pela Figura 4.44 que os resultados obtidos permitiram uma boa descrição do comportamento dos diversos parâmetros avaliados ao longo dos experimentos. Além disso, verifica-se a boa correlação entre as medidas de densidade ótica e do método gravimétrico para o acompanhamento do crescimento microbiano. A Tabela 4.8 resume esses resultados.

Tabela 4.8 – Principais resultados dos ensaios aeróbios com meio 2 realizados em triplicata

	Aeróbio 1	Aeróbio 2	Aeróbio 3	Média	Desvio padrão
μ_{\max} (h^{-1})	0,46	0,54	0,54	0,51	0,046
Y_{xs} (g/g)	0,23	0,22	-----	0,225	0,007
DO máxima	3,76	3,86	3,83	3,82	0,051
Biomassa máxima (g/L)	1,68	1,71	1,73	1,71	0,025
UFC/mL máxima	$4,0 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$3,2 \times 10^8$
[ac. láctico] máxima (g/L)	2,62	3,25	3,46	3,11	0,437

Observa-se a grande semelhança entre os resultados dos três ensaios, mostrando a boa reprodutibilidade do protocolo estabelecido para o cultivo de *E. rhusiopathiae* em condições aeróbias.

4.2.10 Ensaio B9: cultivo aeróbio em batelada alimentada

O esclarecimento do fator determinante no processo de interrupção do crescimento celular, identificado como as baixas concentrações de glicose, juntamente com a verificação do papel inibitório de altas concentrações desse substrato no crescimento do microrganismo apontaram a batelada alimentada como um modo de operação altamente promissor para atingir-se maior formação de biomassa nesse processo, e os resultados obtidos neste experimento comprovaram que esta hipótese estava correta.

Para a realização deste ensaio foi feita uma simulação prévia dos perfis de concentração celular (C_x), de substrato (C_s) e de produto (C_p) (considerando o ácido lático como o produto) ao longo do tempo com o software AnaBio 1.0. Os resultados do ensaio B6 (cultivo aeróbio (2) com meio 2) foram utilizados para o ajuste dos parâmetros cinéticos do modelo de crescimento com inibição mista, pelo substrato e pelo produto, de Andrews-Levenspiel.

A equação a seguir descreve o modelo utilizado:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_S + C_s + \frac{C_s^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_p}{C_p^*}\right)^n$$

A Figura 4.45 apresenta a simulação feita a partir dos dados do ensaio B6. Os valores dos parâmetros μ_{\max} e dos fatores de conversão foram calculados a partir dos

resultados do ensaio 11, enquanto os valores dos demais parâmetros foram atribuídos de forma a obter o melhor ajuste visual aos dados experimentais.

Para simular o aumento da vazão de alimentação durante o cultivo em batelada alimentada, a simulação foi dividida em 2 etapas. Na primeira etapa (Figura 4.45), a alimentação foi iniciada após 7,5 h de cultivo, com uma vazão de 0,05 L/h. Para a segunda etapa, utilizou-se como condições iniciais os valores finais simulados para a etapa 1 e adotou-se uma vazão de alimentação de 0,12 L/h (Figura 4.46). Os valores adotados para as vazões de alimentação foram escolhidos a partir de simulações realizadas no software AnaBio 1.0, levando em conta o volume do reator, a proposta de manter as células em crescimento exponencial com a menor produção de ácido lático possível, e também mantendo a concentração de glicose entre 4 e 8,0 g/L.

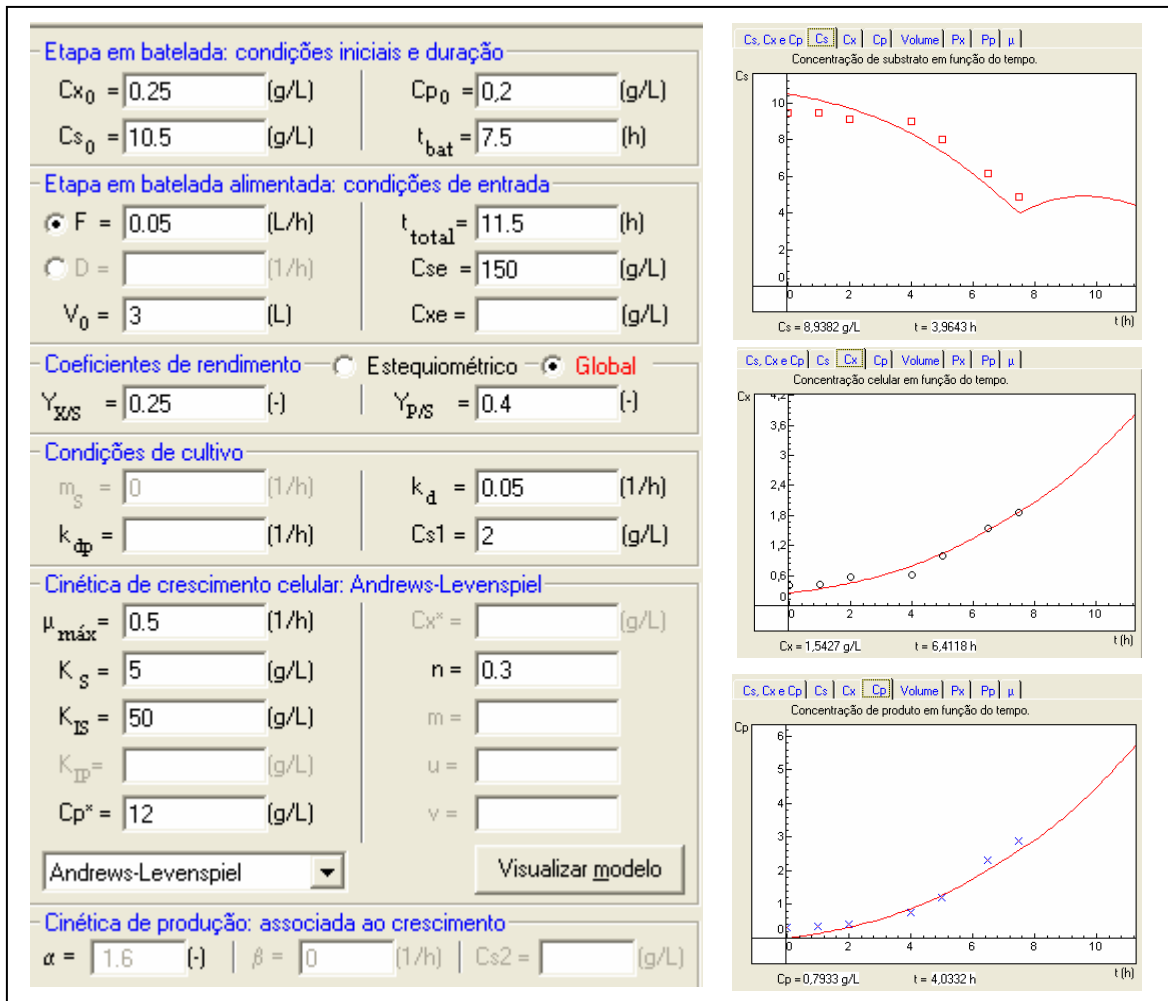
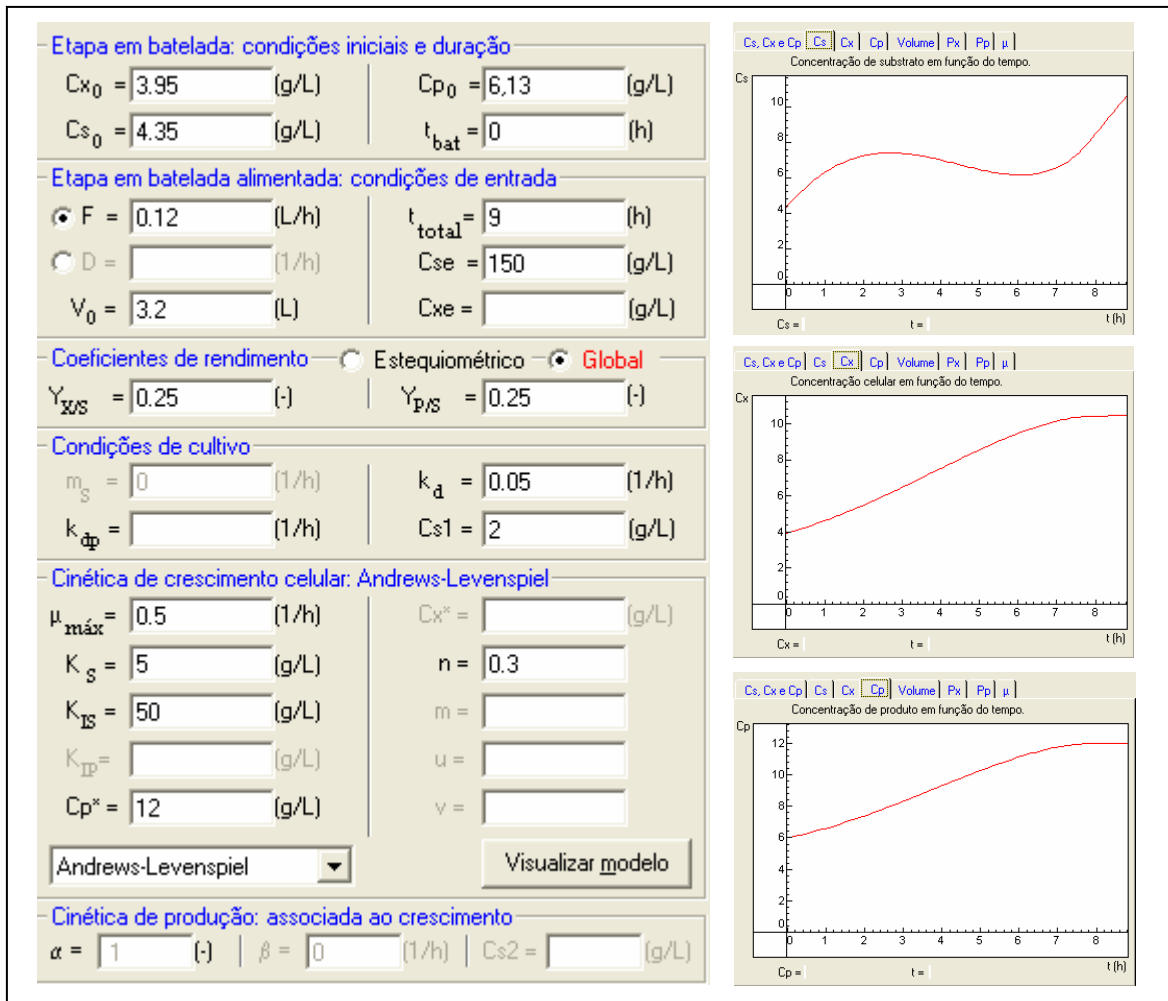


Figura 4.45 – Simulação da etapa de batelada simples e da primeira fase de alimentação ($F = 0,05\text{L/h}$) utilizando os dados do ensaio B6



O campo “tempo total da etapa em batelada alimentada” diz respeito às nove horas de alimentação com vazão de entrada de 0,12 L/h.

Figura 4.46 – Simulação da segunda fase da etapa de batelada alimentada ($F = 0,12$ L/h)

A Figura 4.47 mostra a comparação entre a simulação e os pontos experimentais.

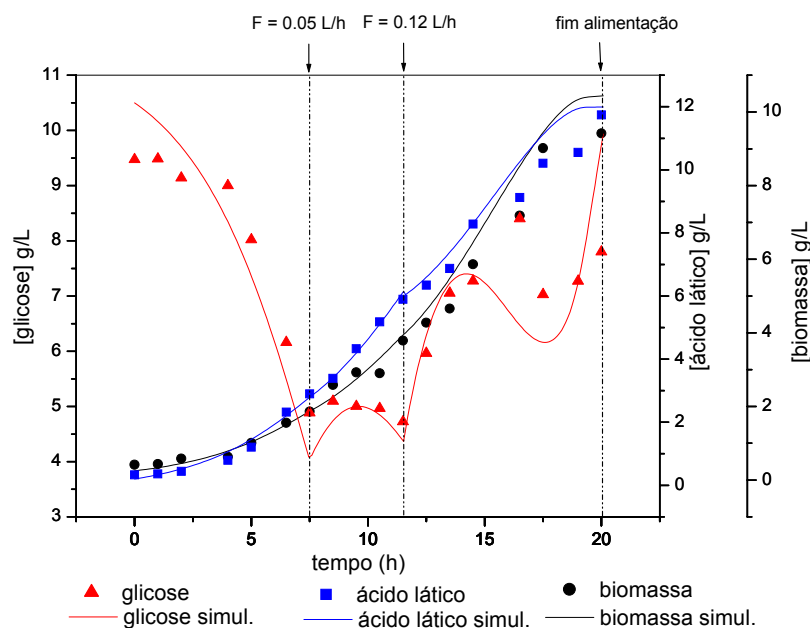


Figura 4.47 – Comparação entre a simulação e os dados experimentais para a batelada alimentada

Como pode ser visto na Figura 4.43, utilizando o valor agora conhecido para C_{p^*} de 12,0 g/L e diminuindo o coeficiente de rendimento de substrato a produto ($Y_{p/s}$) para 0,25 na segunda etapa de alimentação, obteve-se um bom ajuste dos resultados experimentais com os dados simulados tanto para o crescimento celular quanto para a formação de ácido láctico, o que mostra que houve uma boa estimativa dos parâmetros cinéticos do processo na simulação realizada. Devido a concentração de glicose inicial ter sido superior a utilizada na simulação, a concentração de substrato ficou um pouco acima do esperado. Esse comportamento pode ter sido influenciado também pelo valor superestimado de C_{p^*} e/ou pela falta de maior precisão na estimativa da constante de saturação K_s . O modelo indica ainda que se a alimentação fosse prolongada por mais tempo, na mesma vazão utilizada nesta segunda fase do experimento, ocorreria um acúmulo de glicose no meio acima do desejado nas próximas horas.

A Figura 4.48 mostra a produção de biomassa acompanhada pela densidade ótica, massa seca e contagem de UFC/mL.

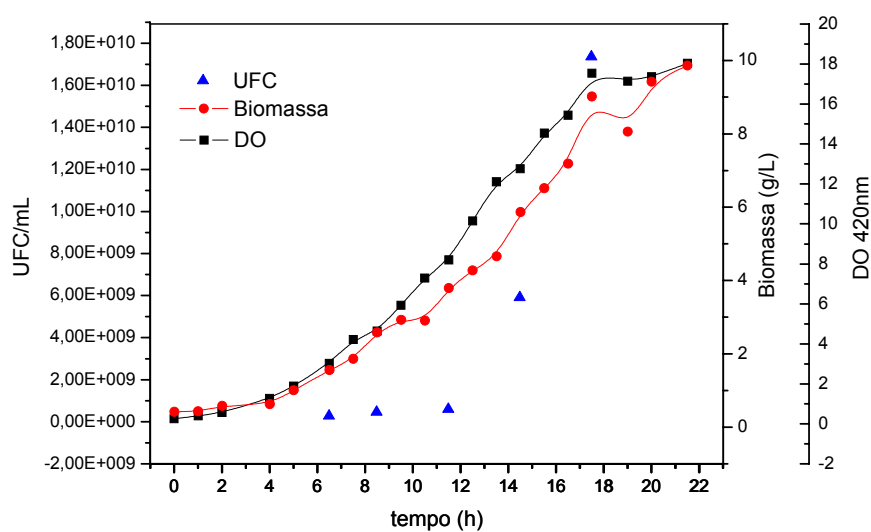


Figura 4.48 – Crescimento celular do cultivo em batelada alimentada

Observa-se que as condições empregadas possibilitaram um crescimento celular constante e intenso até cerca de 9,0 g/L de células, onde começa a haver inibição do crescimento por efeito do acúmulo de ácido láctico. A partir deste ponto, atinge-se uma fase estacionária, onde a glicose consumida é utilizada para manutenção da população de células tolerante a atual concentração de lactato. Ao final do cultivo a massa celular atingida foi de aproximadamente 10,0 g/L, correspondendo a uma leitura de densidade ótica de 18,0 e contagem de $1,7 \times 10^{10}$ UFC/mL.

A produção de metabólitos e o consumo de glicose frente ao crescimento celular são mostrados na Figura 4.49.

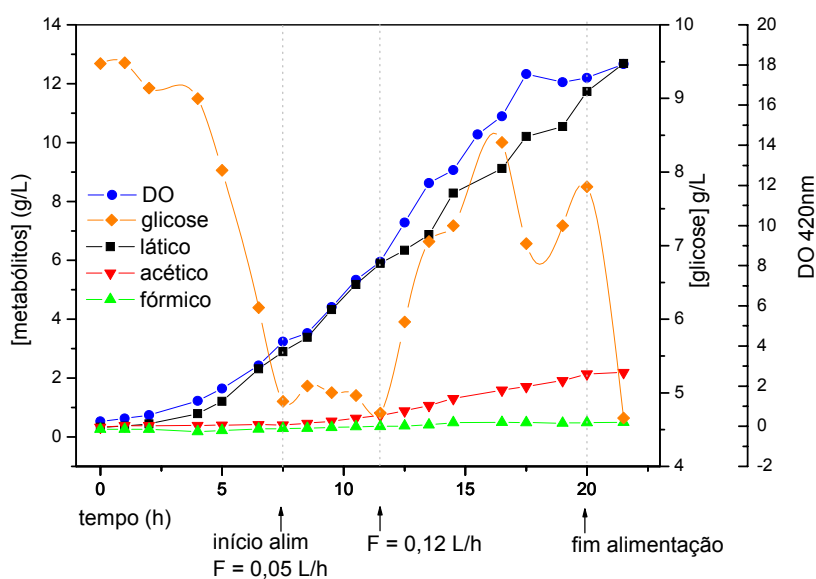


Figura 4.49 – Comparação entre a produção de metabólitos, o consumo de glicose e o crescimento celular medido pela DO no cultivo em batelada alimentada

Como observado nos ensaios aeróbios anteriores, as vias fermentativas do microrganismo foram ativadas mesmo em condições plenamente aeróbias. Foi registrado um grande acúmulo de ácido lático e a concentração limite deste metabólito que provoca inibição efetiva do crescimento celular foi alcançada. Após atingir-se 10 g/L de lactato, como dito, ocorreu uma interrupção no aumento da produção de biomassa e atingiu-se uma fase onde a concentração celular permaneceu praticamente constante apesar do aumento contínuo da quantidade de metabólitos presente no meio.

Não foi detectada produção de etanol, e o segundo metabólito mais produzido foi o ácido acético como observado nos demais ensaios aeróbios.

A concentração de glicose permaneceu dentro dos limites adequados para não provocar efeitos de inibição ou de morte celular durante todo o experimento. Após 7,5 h de ensaio, a concentração deste substrato caiu abaixo de 5,0 g/L e deu-se início então à alimentação do biorreator. A vazão utilizada nesta primeira etapa de injeção de meio de cultivo concentrado foi suficiente para sustentar o mesmo ritmo de crescimento celular da

batelada simples por apenas quatro horas, quando a concentração de glicose voltou a cair abaixo do valor de 5,0 g/L. Neste momento então, a vazão de alimentação foi aumentada dando início à segunda etapa da batelada alimentada que possibilitou a continuidade do aumento da biomassa até o ponto onde surgiu o efeito de inibição do crescimento celular provocado pela alta concentração de ácido lático. Houve acúmulo de glicose nesta etapa do experimento, porém não acima do valor de 12,0 g/L a partir do qual estima-se (com base em observações experimentais) que o processo de inibição do crescimento do microrganismo provocado por excesso de substrato tenha início.

Com o fim da alimentação, a glicose residual no meio foi rapidamente consumida e teve início o processo de morte celular, melhor visualizado pelo aumento da concentração de oxigênio dissolvido no meio sem aumento da agitação no biorreator, como mostra a Figura 4.50.

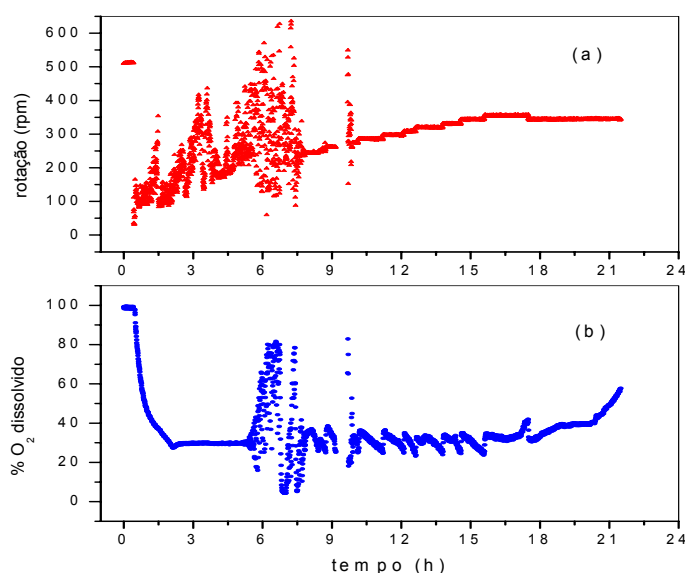


Figura 4.50 – Variação da rotação (a) e da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) no cultivo em batelada alimentada

Pelos dados apresentados na Figura 4.50 é possível notar claramente que após 17,5 h de cultivo o consumo de oxigênio é desacelerado, indicando que o processo de morte

celular passou a ocorrer com maior intensidade, reflexo das altas concentrações de metabólitos presentes no meio. As oscilações na concentração de oxigênio dissolvido entre 6 e 8 horas, aproximadamente, foram provocadas por falhas no sistema de controle automático da agitação no interior do biorreator, e foram contornadas adotando-se o sistema manual de controle e variando a agitação de forma a manter a concentração de O_2 no meio de cultivo entre 25 e 35% do seu limite de saturação.

A Figura 4.51 mostra os valores da velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) e da variação de pH com o tempo de cultivo.

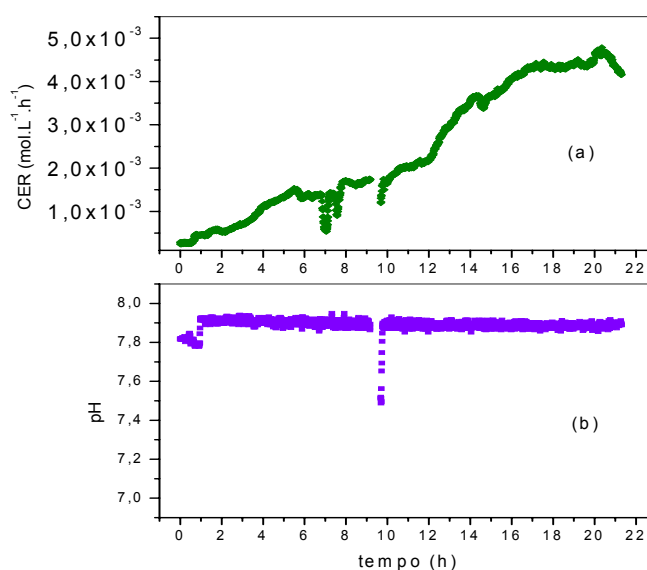
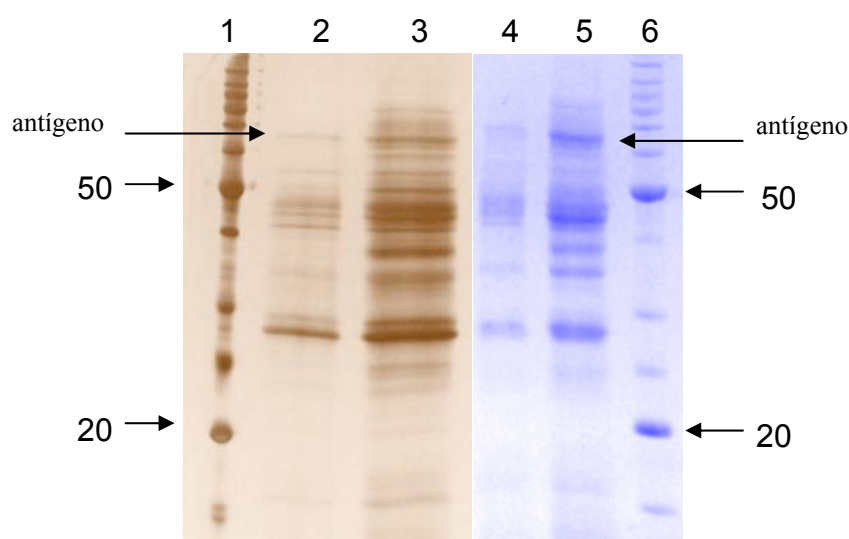


Figura 4.51 – Velocidade de produção de CO_2 (a) e variação do pH (b) durante o cultivo em batelada alimentada

Como pode ser observado, o controle do pH foi efetivo mantendo esta variável constante em torno de 7,9 durante todo o experimento. A queda momentânea do pH no tempo de aproximadamente 10 horas foi causada por uma queda de energia elétrica. O perfil de produção de CO_2 seguiu a tendência do crescimento celular e a fração molar deste gás na corrente gasosa efluente do biorreator chegou a 67%. A velocidade máxima atingida de produção deste metabólito foi de $6,0 \times 10^{-3} mol.L^{-1}.h^{-1}$.

A Figura 4.52 mostra a análise por eletroforese dos extratos feitos com solução de cloreto de colina a partir das células das amostras coletadas ao longo do cultivo em batelada alimentada. Como esperado, verificou-se o aumento na concentração de antígeno, bem como das demais proteínas da parede celular, com o avanço da produção de biomassa.

As amostras foram reveladas por métodos diferentes em razão das diferenças nas concentrações de proteína das mesmas: as amostras de 6,5 e 12,5 horas foram reveladas com nitrato de prata, pois não foram visualizadas no gel revelado com Coomassie Brilliant Blue; já as amostras de 17,5 e 20 horas apresentaram o efeito de “overloading” na revelação com prata e foram então reveladas com o corante Coomassie Brilliant Blue.



1 e 6: Padrões de massa molecular BenchMark Protein Ladder – Invitrogen; 2 a 5: extrato da parede celular preparado com solução de colina 2% das amostras do cultivo em batelada alimentada nos tempos de 6,5, 12,5, 17,5 e 20 horas.

Figura 4.52 – Eletroforese das amostras coletadas ao longo da batelada alimentada

Por fim, a Figura 4.53 mostra os resultados do ensaio em batelada alimentada comparados aos em ensaios realizados em batelada simples.

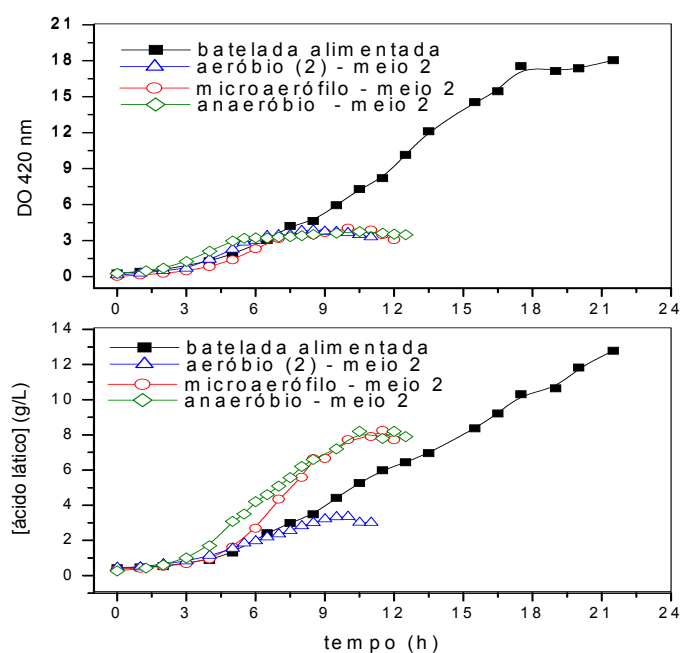


Figura 4.53 – Comparação dos resultados de Densidade Ótica e produção de ácido lático do cultivo em batelada alimentada e os ensaios em diferentes condições de aeração realizados em batelada simples

A análise dos resultados mostrados na Figura 4.53 indica que a batelada alimentada apresentou um aumento de quase cinco vezes no valor máximo de DO atingido em um tempo apenas duas vezes maior que nos ensaios de batelada simples. A produção de ácido lático seguiu o mesmo perfil do ensaio aeróbio (2) durante a etapa de batelada simples e em seguida acompanhou o crescimento do microrganismo ultrapassando 12,0 g/L. Nos ensaios com menor ou nenhuma disponibilidade de oxigênio a produção deste ácido orgânico ocorreu mais intensamente na etapa de batelada simples como esperado, indicando que a batelada alimentada nestas condições de aeração seria inviável.

Finalizando a análise dos resultados gerados neste trabalho, a Figura 4.54 mostra a comparação, em termos de biomassa produzida, entre o cultivo realizado nas condições experimentais descritas na literatura (Experimento S1) e os ensaios conduzidos sob as condições aqui otimizadas para este processo.

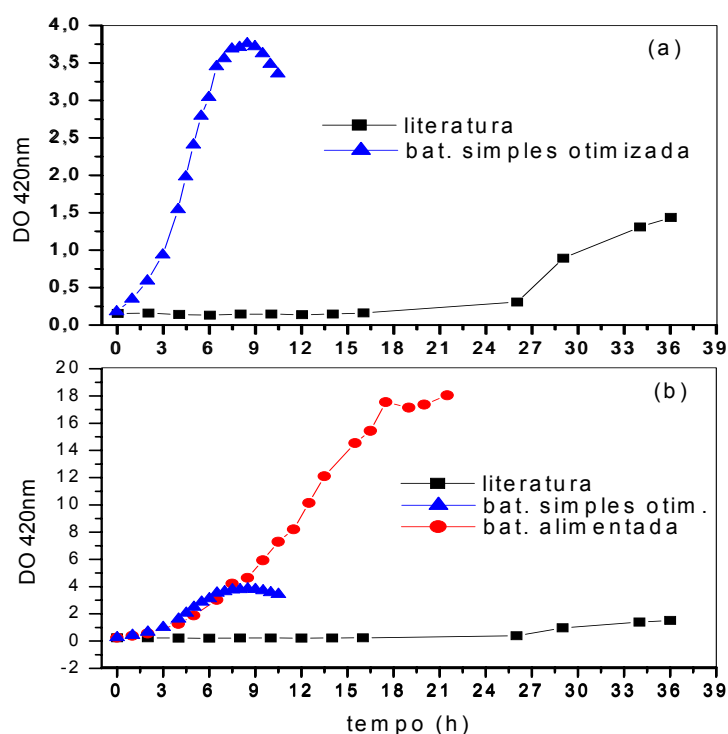


Figura 4.54 – Comparação entre o crescimento celular obtido nas condições experimentais descritas na literatura e as condições otimizadas.

A Figura 4.54 mostra de forma clara o grande avanço obtido aqui em relação ao cultivo do bacilo *E. rhusiopathiae* descrito na literatura, com vista para a produção em larga escala de uma vacina contra este patógeno. Diversos aspectos do cultivo do microrganismo foram sucessivamente estudados, de forma que os melhores resultados em cada etapa passaram gradativamente a ser incorporados na metodologia de cultivo proposta ao longo dos experimentos. Entre os fatores com impacto direto na produção de biomassa, perfil de crescimento celular e produção de antígeno foram estudados, por exemplo, a preservação das células em criotubos congelados a -70°C , a fração de inóculo, a formulação do meio, o cultivo do microrganismo em biorreator, o controle do pH, a influência da concentração de oxigênio dissolvido, a produção de metabólitos, entre outros. Assim, a combinação dos estudos da influência de cada um destes parâmetros possibilitou como mostra a Figura 4.54,

uma grande diminuição na fase *lag* de crescimento, um aumento significativo na velocidade de crescimento do microrganismo e a obtenção de altas concentrações celulares. Dessa forma, foi estabelecido um protocolo de cultivo da bactéria em estudo que responde de forma satisfatória ao objetivo principal deste trabalho, de obtenção de alta concentração celular e estabelecimento de condições ótimas de cultivo de *E. rhusiopathiae* para produção de vacina contra erisipela suína.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo realizado permitiram não só obter as informações necessárias para implantação do processo para produção da vacina contra erisipela suína mas, principalmente, contribuíram para uma ampliação significativa do conhecimento sobre o cultivo deste microrganismo, seu metabolismo e a associação entre a expressão do antígeno e o crescimento celular. Em consequência do avanço alcançado, naturalmente algumas questões requerem ainda estudos mais aprofundados para que possam ser completamente elucidadas.

No que se refere ao desenvolvimento de tecnologia, pode-se concluir que:

- a) o protocolo para o cultivo de *Erysipelothrix rhusiopathiae* 11004 em batelada simples foi definido, com produção de concentração celular superior a necessária para a formulação das bacterinas que ofereceram proteção equivalente às vacinas disponíveis no mercado, no teste de imunização com camundongos.
- b) os resultados dos estudos realizados mostraram que a nova formulação para o meio de cultivo desenvolvida no ensaio S5, juntamente com o procedimento de controle do pH garantiram a obtenção de concentrações celulares superiores a $2,0 \times 10^9$ UFC/mL nas três diferentes condições de aeração estudadas. A suplementação do meio com quantidades adicionais de glicose e extrato de levedura e o pH mantido em $8,0 \pm 0,2$ levaram, ainda, a aumentos nos valores de conversão de substrato em células e também nas velocidades de crescimento celular.
- c) Os resultados dos cultivos com 30% de oxigênio dissolvido, realizados em triplicata, mostraram alta reprodutibilidade do protocolo desenvolvido. Nesta condição foi possível ainda estabelecer uma correlação entre a leitura de DO e a concentração de glicose no caldo de cultivo que pode ser utilizada para o monitoramento do momento adequado para

interrupção da batelada e obtenção da concentração celular superior à mínima necessária para a formulação das vacinas.

d) devido a capacidade do microrganismo em estudo apresentar-se tolerante a altas concentrações de ácido láctico, o modo de operação em batelada alimentada em condição de aerobiose se mostrou como um recurso viável para a obtenção de quantidades ainda maiores de biomassa, o que pode contribuir para um aumento de produtividade no processo de produção desta vacina.

Em termos de geração de conhecimentos acadêmicos sobre *E. rhusiopathiae*, o presente trabalho apresentou as seguintes contribuições:

- elucidação do metabolismo em condições aeróbias, anaeróbias e microaerófilas, por meio da quantificação dos metabólitos e de gás carbônico produzidos, levando à constatação que a bactéria não consegue utilizar eficientemente o oxigênio para produção de energia e conseqüente aumento de biomassa, embora seja capaz de consumi-lo;
- identificação da perda da viabilidade associada a baixas concentrações de glicose no meio, (faltando ainda esclarecer se a perda de viabilidade afeta a expressão do antígeno);
- indicação, a partir dos resultados de testes preliminares de imunização de camundongos, de que a presença de oxigênio é necessária para a plena expressão do antígeno.

Estudos adicionais seriam importantes para elucidar as seguintes questões:

- a otimização da composição do meio de cultivo;
- estabelecimento de um método complementar à eletroforese para efetiva quantificação da produção de antígeno;
- estabelecimento de metodologia para extração do antígeno com colina em meios contendo altas densidades celulares.

6 REFERÊNCIAS

- ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína <www.abipecs.com.br > . Data de acesso: 07/10/06.
- ABBAS, A.K., LITCHMAN, A.H., PROBER, J.S. Cellular and Molecular Immunology, 2ª edição. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2ª edição, McGraw Hill, 1986.
- BALOWS, A. The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2ª edição, Springer-Verlag New York Inc, p. 1629-1642, 1991.
- BARCELLOS, D.E.S.N., SOBESTIANSKY, J., PIFFER, I. Utilização de vacinas em produção de suínos. Suinocultura Dinâmica, Ano V (19), 1996.
- BAZIN, H. A brief history of the prevention of infectious diseases by immunizations. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v.26, p.293-308, 2003.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial, v.1: Fundamentos, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.
- British Pharmacopoeia (Veterinary), p. 2285, 2002
- CHEUN, H. I., KAWAMOTO, K., HIRAMATSU, M., TAMAOKI, H., SHIRAHATA, T., IGIMI, S., MAKINO, S.-I. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. Journal of Applied Microbiology, v.96, p.1347-1353, 2004.

- CONKLIN, R. H., STEELE, J. H., Erysipelothrix infeccions. Series in Zoonoses, v.1, seção A, p. 327-337, 1979. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.
- EAMENS, G.J., CHIN, J.C., TURNER, B., BARCHIA, I. Evaluation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccines in pigs by intradermal challenge and immune responses. Veterinary Microbiology, v.116 , p. 138-148, 2006.
- ERTL, H.C.J., XIANG, Z. Novel vaccine approaches. Journal of Immunology, v.156 (10), p.3579-3582, 1996.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations <www.fao.org>. Data de acesso: 02/10/06
- FEIST, H., FLOSSMAN, K. D., ERLER, W. Einige untersuchungen zum nährstoffbedarf der rotlaufbakterien. Archiv Fur Experimentelle Veterinarmedizin, v.30, p.49-57, 1976.
- GALAN, J. E., TIMONEY, J.F. Cloning and expression in Escherichia coli of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Infection and Immunity, v.58, p.3116-3121, 1990.
- GONÇALVES, V. M., TAKAGI, M., CARNEIRO, S. M., DE CAMPOS GIORDANO, R., TANIZAKI, M. M. Introduction of air in the anaerobic culture of *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F induces the release of capsular polysaccharide from bacterial surface into the cultivation medium. Journal of Applied Microbiology, v.101, p.1009-1014.
- GROSCHUP, M. H., TIMONEY, J. F. Modified Feist broth as a serum-free alternative for enhanced production of protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Journal of Clinical Microbiology, v.28, p.2573-2575, 1990.
- GROSCHUP, M. H., CUSSLER, K., WEISS, R., TIMONEY, J. F. Characterization of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Epidemiol. Infect., v.107, p.637-649, 1991.

- HAESEBROUCK, F., PASMANS, F., CHIERS, K., MAES, D., DUCATELLE, R., DECOSTERE, A. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Veterinary Microbiology*, v.100, p. 255-268, 2004.
- HILLEMANN, M.R. DNA Vectors: Precedents and safety. *Annals New York Academy of Science*, 772, p.1-14, 1995.
- IMADA, Y., GOJI, N., ISHIKAWA, H., KISHIMA, M., SEKIZAKI, T. Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infection and Immunity*, v.67, p.4376-4382, 1999.
- KITAJIMA, T., OISHI, E., AMIMOTO, K., UI, S., NAKAMURA, H., OKADA, N., SASAKI, O., YASUHARA, H. Protective effect of NaOH-extracted *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine in pigs. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.60 (1), p.9-14, 1998.
- KITAJIMA, T., OISHI, E., AMIMOTO, K., UI, S., NAKAMURA, H., ODA, K., KATAYAMA, S., IZUMIDA, A., SHIMIZU, Y. Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v.62 (10), p.1073-1077, 2000.
- KLUDAS, K. H., MEESE, M. the significance of various supplements in nutrient media for the appearance of the immunizing antigen *Erysipelothrix insidiosa*. Characterization of effective serum components. *Folia Microbiology*, v.13, p.515-517, 1967.
- KUCSERA, G. Proposal for standardization of the designations used for serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.23, p.184-188, 1973.
- LACHMANN, P. G., DEICHER, H. Solubilization and characterization of surface antigenic components of *Erysipelothrix rhusiopathiae* T28. *Infection and Immunity*, v.52, p.818-822, 1986.

- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p680-685, 1970.
- LECRERC, C. New approaches in vaccine development. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v.26, p.329-341, 2003.
- LIU, M.A. Overview of DNA vaccines. *Annals New York Academy of Science*, 772, p.15-20, 1995.
- MAKINO, S., YAMAMOTO, K., MURAKAMI, S. SHIRAHATA, T., UEMURA, K., SAWADA, T. WAKAMOTO, H., MORITA, H. Properties of repeat domain found in a novel protective antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Microbial Pathogenesis*, v.25, p.101-109, 1998.
- MAKINO, S.-I., YAMAMOTO, K., ASAKURA, H., SHIRAHATA, T. Surface antigen, SpaA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces. *FEMS Microbiology Letters*, v.186, p.313-317, 2000.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento <www.agricultura.gov.br> <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2005/04.04.XLS>. Data de acesso: 10/10/06.
- NAVARRE, W.W., SCHNEEWIND, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.63 (1), p.174-229, 1999.
- PELCZAR JR, J. M.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiology*, 5ª edição. McGraw-Hill, USA, 1986..
- REBOLI, A. C., FARRAR, W. E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an occupational pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.2 (4), p.354-359, 1989.

- SCHUBERT, K., FIEDLER, F. Structural investigations on the cell surface of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Systematic and Applied Microbiology*, v.24, p. 26-30, 2001.
- SHIMOJI, Y., YOKOMIZO, Y., SEKIZAKI, T., MORI, Y., KUBO, M. Presence of a capsule in *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its relationship to virulence for mice. *Infection and Immunity*, v.62 (7), p.2806-2810, 1994.
- SHIMOJI, Y., MORI, Y., FISCHETTI, V.A. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity. *Infection and Immunity*, v.67, p.1646-1651, 1999.
- SHIMOJI, Y. Review: Pathogenicity of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: virulence factors and protective immunity. *Microbes and Infection*, v.2, p.965-972, 2000.
- SHIMOJI, Y., OGAWA, Y., OSAKI, M., KABEYA, H., MARUYAMA, S., MIKAMI, T., SEKIZAKI, T. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *Journal of Bacteriology*, v.185 (9), p.2739-2748, 2003.
- SHULER, M. L.; KARGI, F. *Bioprocess Engineering: basic concepts*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2002.
- SILVA, F.H., MOURA, L.F., BADINO Jr, A.C. AnaBio 1.0: Um Programa para Análise de Biorreatores, XIV Simpósio Nacional de Fermentação, anais, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, 2003.
- SNEATH, P.H.A., ABBOTT, J.D., CUNLIFFE, A.C. The bacteriology of Erysipeloid. *British Medical Journal*, v.2, 1063-1066, 1951.
- SOBESTIANSKY, J., BARCELLOS, D., MORES, N., CARVALHO, L.F.O.S., OLIVEIRA, S. (ed.). *Clínica e Patologia Suína*, Goiânia, Brasil. Art 3, 1999.

- STRAW, B., D'ALLAIRE, S., MENGELING, W.L., TAYLOR, D.J. (ed.). Diseases of Swine, 8ª edição. Iowa State University Press, USA, 1999.
- STOEW, I., JOTOW, M., SIMEONOW, St., CHRISTOWA, Ch. Verwendung von getrocknetem Serumalbumin als Schutzmedium bei der Gewinnung von lyophilisierter Lebendvaccine gegen den Schweinerotlauf. Archives of Experimental Veterinary Medicine, v.34, p. 59-61, 1980.
- TAKAHASHI, H., TAKAGI, T., SAWADA, T., SETO, K. Cross protection in mice and swine immunized with live erysipelas vaccine to challenge exposure with strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* of various serotypes. American Journal of Veterinary Research, v.45, p.2115-2118, 1984.
- TAKAHASHI, H. Antigen presentation in vaccine development. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, v.26, p.309-328, 2003.
- TIMONEY, J.F., GROSCUP, M.H. Properties of protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Veterinary Microbiology, v.37, 381-387, 1993.
- USHIJIMA, T. (JP); SAKAGUCHI, M. (JP); TOKUNAGA, E. (JP). CHEMO SERO THERAPEUT RES INST (JP); USHIJIMA TOSHIHIRO (JP); SAKAGUCHI MASASHI (JP); TOKUNAGA EIJI (JP). Process for producing *Erysipelothrix rhusiopathiae* surface protective antigen mutant in *Escherichia coli*. Japanese Patent Publication number: WO2005-083072. SEPT, 09 2005.
- WATANABE, F., TAKAGI, H., EBISU, S., MURAHASHI, Y., YOKOMIZO, Y., IMADA, Y., TSUJI, T. NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH, HIGETA SHOTU CO LTD, FUJITA GAKUEN. Recombinant subunit vaccine against *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Japanese Patent Publication number: 2000-279179. OCT 10 2000.
- WEISER, J. N., AUSTRIAN, R., SCREENIVASAN, P.K., MASURE, H. R. Phase variation in pneumococcal opacity: relationship between colonial morphology and nasopharyngeal colonization. Infection and Immunity, v.62, p.2582-2589, 1994.

- WHITE, T.G., SHUMAN, R.D., Fermentation reactions of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Journal of Bacteriology, v.82, p.595-599, 1961.
- WHITE, R. R., VERWEY, W. F. Isolation and characterization of a protective antigen-containing particle from culture supernatant fluids of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Infection and Immunity, v.1, p.380-386, 1970.
- WOOD, R. L., HARRINGTON Jr, R. Serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae* isolated from swine and from soil and manure of swines pens in the United States. American Journal of Veterinary Research, v.39, p.1833-1840, 1978.
- WOOD, R.L. Erysipelas. In a A. D. Leman et al. (ed.), Disease of swine. Iowa State University Press, USA. p.475-486, 1992.
- YAMAZAKI, Y., SATO, H., SAKAKURA, H., SHIGETO, K., NAKANO, K., SAITO, H., MAEHARA, N. Protective activity of the purified protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pigs. Journal of Veterinary Medicine B, v.46, p.47-55, 1999.
- YOTHER, J. Choline in methods for obtaining and purifying cell-free pneumococcal surface proteins from *Streptococcus pneumoniae* and use of the proteins in protection against pneumococcal infection. European Patent Office. PCT Int. Appl. (1993), 30 pp. CODEN: PIXXD2 WO 9324000 A1 19931209 CAN 120:116836 NA 1994:116836 CAPLUS.
- YOTHER, J., WHITE, J. Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* protein PspA. Journal of Bacteriology, v.176 (10), p.2976-2985, 1994.
- ZARKASIE, K., SAWADA, T., YOSHIDA, T., TAKAHASHI, I., TAKAHASHI, T. Growth ability and immunological properties of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Journal of Veterinary Medicine Science, v.58 (1), p.87-90, 1996.