

CULTIVO DE *Escherichia coli* RECOMBINANTE EM BIORREATOR AIRLIFT PRESSURIZADO

G. CAMPANI¹, G. G. SILVA¹, J. H. BONOMO¹, J. V. L. ANDRADE¹, M. M. JESUS¹, C. B. BORGES¹, A. C. L. HORTA¹, R. C. GIORDANO¹, A. C. BADINO¹ e T. C. ZANGIROLAMI¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos
E-mail para contato: gilson.campani@yahoo.com

RESUMO – Diversas proteínas são produzidas em *Escherichia coli* recombinante empregando reatores convencionais (tanque agitado e aerado), mas há poucos estudos envolvendo o biorreator airlift, cujas vantagens são: menor complexidade de construção, baixo risco de contaminação e maior eficiência energética na transferência de oxigênio. Devido ao alto consumo de oxigênio característico dessa bactéria, a operação em sobrepressão se apresenta como um recurso para compensar a menor transferência de oxigênio no biorreator airlift. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a influência da pressão, dentre outras variáveis, sobre as produtividades de biomassa e da proteína recombinante (PspA). Os experimentos foram conduzidos em biorreator airlift de cilindros concêntricos (5 L) equipado com controle automático de pressão, pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. A pressurização do reator (2,5 bar) possibilitou alcançar valores de produtividade em biomassa e em proteína recombinante de até $1,27 \pm 0,06$ gMS/L.h e 201 ± 8 mgPspA/gMS, respectivamente. Os resultados obtidos comprovam o efeito positivo da pressão sobre a transferência de oxigênio.

1. INTRODUÇÃO

Avanços nas áreas de microbiologia e biologia molecular trouxeram, nas últimas quatro décadas, grandes melhorias nos bioprocessos, em especial nas indústrias de biotecnologia, acarretando em aumentos de produtividade e de qualidade dos produtos (Vojinovic *et al.*, 2006). Como consequência, desde então, há um crescente número de produtos biotecnológicos sendo lançados e comercializados como, por exemplo, nas áreas farmacêutica, de alimentos e de energia (Vojinovic *et al.*, 2006). Nesse contexto, a *Escherichia coli* é um dos microrganismos mais utilizados para a produção de proteínas heterólogas, uma vez que há ampla caracterização metabólica e genética deste organismo e métodos precisos e rápidos para a modificação de seu genoma (Demain e Vaishnav, 2009).

Com relação aos tipos de reatores utilizados em cultivos de *E. coli*, os estudos encontrados na literatura empregam, quase que exclusivamente, biorreatores convencionais (tanque agitado e aerado) (Korz *et al.*, 1995; Shiloach e Fass, 2005; Horta, 2011; Santos, 2012; Silva *et al.*, 2013). Mais recentemente, alguns estudos têm abordado o desenvolvimento de reatores não convencionais, tal como do tipo rocking motion (Glazyrina *et al.*, 2010). Porém, cultivos de *E. coli* em reatores pneumáticos, em especial o biorreator airlift, que encontra grande aplicação industrial, têm sido pouco estudados (Kracke-Helmet *et al.*, 1991; Janardhan *et al.*, 2007), evidenciando um

amplo campo de pesquisa a ser explorado.

Nesse cenário, o presente trabalho teve como objetivos estudar o cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator airlift de circulação interna adaptado para operação em sobrepressão, avaliando-se o efeito da pressão e de outras variáveis do processo sobre as produtividades de biomassa e da proteína recombinante (PspA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo, Meio de Cultura e Biorreator

Foi cultivado o bacilo gram-negativo *Escherichia coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA4Pro, que expressa um fragmento da proteína imunogênica PspA (PspA4Pro) presente na parede celular do procarioto *Streptococcus pneumoniae*. Esta construção foi obtida no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Butantan pela pesquisadora Dra. Eliane N. Miyaji. O plasmídeo pET37b+ contém o promotor T7 (induzido por IPTG ou lactose) e gene de resistência à canamicina.

Para a realização dos cultivos no biorreator, foi utilizado meio de cultivo complexo de autoindução (Studier, 2005) adaptado por Santos (2012), contendo glicose (10 g/L) e glicerol (60 g/L) como fontes de carbono; Phytone (10 g/L) e extrato de levedura (5 g/L) como fontes de nitrogênio; lactose (20 g/L) como indutor da expressão da proteína recombinante; tiamina (45 mg/L), canamicina (100 mg/L), propilenoglicol 30% v/v (1 mL/L) e sais diversos. Para a preparação das pré-culturas (inóculo e pré-inóculo), a composição do meio de cultura foi a mesma utilizada no cultivo em biorreator, com exceção da glicose (0,5 g/L), do glicerol (5 g/L) e da lactose (ausente). Todos os componentes foram previamente esterilizados por autoclavagem ou filtração (poro de 0,2 μ m).

Os ensaios foram realizados em biorreator encamisado airlift de cilindros concêntricos de 5 L de volume útil (Badino *et al.*, 2004) dotado de controle automático de pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido (COD) (Campani *et al.*, 2013) e pressão, dentre outras funcionalidades.

2.2. Métodos Analíticos

O crescimento celular foi avaliado através da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm (DO_{600nm}) e por meio da medida de massa seca – C_x (gMS/L) –. A partir dos valores de C_x , calculou-se a produtividade de biomassa – P_x (gMS/L.h).

Concentrações de glicerol, lactose, glicose e metabólitos (ácidos acético, lático e fórmico) foram determinadas por HPLC (sistema Waters Co; bombas HPLC 510, injetor W717, refratômetro W410 e leitor de UV PDA W996) utilizando a coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad) como fase estacionária e uma solução de H_2SO_4 5 mM como fase móvel, a uma vazão de 0,6 L/min a 50°C.

A estabilidade do plasmídeo foi estimada através do repique de unidades formadoras de colônia em meio sólido LB-ágar com e sem antibiótico (100 mg/L de canamicina) e a produção de proteína quantificada por SDS-PAGE e densitometria de banda (Campani, 2014). A partir de cada valor estimado para a concentração de PspA solúvel (C_{PspA}), foi possível

calcular a produção específica – $Y_{PspA/X}$ (mgPspA/gMS) – e a produtividade – P_{PspA} (mgPspA/L.h) –, ambas de PspA solúvel.

O comportamento reológico do caldo foi avaliado durante a fase de indução do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift pressurizado utilizando reômetro de cilindros concêntricos (Brookfield®, modelo DC-III+). Através de regressão não linear pelo método dos mínimos quadrados (Marquardt, 1963), o modelo descrito pela lei das potências (Equação 1) foi ajustado aos dados de velocidade de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) e tensão de cisalhamento (τ) medidos. Com isso, foram obtidos os valores dos índices de escoamento (n) e de consistência (K) para cada amostra. Finalmente, através da Equação 2 e dos índices estimados, foi calculado μ_{ap} adotando $\dot{\gamma}$ correspondente à condição de operação do biorreator.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (1)$$

$$\mu_{ap} = K \cdot \dot{\gamma}^{n-1} \quad (2)$$

A fim de complementar a análise reológica, foi realizado o acompanhamento da morfologia celular em microscópio ótico (Olympus®, modelo BX50) utilizando amostras do caldo retiradas no decorrer do cultivo e tratadas pelo método de Gram (Kyle *et al.*, 2012). As imagens das lâminas bacteriológicas foram obtidas sob uma ampliação de 400 vezes através de sistema acoplado de aquisição digital de imagens.

2.2. Procedimento Experimental

Para a realização dos cultivos, uma suspensão de células de *E. coli* BL21(DE3)pET37b+/PspA4Pro estocadas a -80 °C com 10% v/v de glicerol foi inicialmente estriada em placa de Petri com LB-ágar e 100 mg/L de canamicina. Em seguida, a placa foi incubada por 24 h a 37°C, sendo, então, transferida uma colônia para o pré-inóculo (erlenmeyer estéril de 500 mL contendo 30 mL de meio de cultura). Este foi incubado em câmara rotativa a 270 rpm e 37°C por cerca de 5 h até uma DO_{600nm} próxima de 2,5. O cultivo do inóculo foi iniciado com a adição de 5 mL do pré-inóculo em cada um dos três erlenmeyers estéreis de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura. A suspensão foi incubada a 270 rpm e 37°C por cerca de 4 h até uma DO_{600nm} próxima de 2,5, quando foi transferido todo o volume do inóculo (0,3 L) para o biorreator airlift, dando início ao cultivo.

As condições de cultivo empregadas foram: temperatura inicial de 31°C (reduzida progressivamente), pH de 6,7 (fase crescimento) e 6,9 (fase de indução) controlado através da adição de NH_4OH ou HCl , pressão absoluta de até 2,5 bar e COD entre 20 e 50% de saturação (ar à pressão atmosférica e 31°C).

Amostras foram retiradas ao longo dos experimentos para a determinação de densidade ótica, estabilidade do plasmídeo, reologia, morfologia e concentrações de biomassa, metabólitos, açúcares e da proteína de interesse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois cultivos de *E. coli* foram realizados no biorreator airlift, sendo um experimento de referência, conduzido sob pressão atmosférica, e o outro em sobrepressão.

3.1. Ensaio em Biorreator Airlift sem Pressurização

No cultivo de *E. coli* de referência (sem pressurização), obteve-se o perfil de crescimento celular apresentado na Figura 1, com C_x inicial de $0,16 \pm 0,01$ gMS/L e final de 20 ± 1 gMS/L, após 35 h, quando o cultivo foi interrompido devido à insuficiência do fornecimento de oxigênio para o caldo de cultivo frente à alta demanda celular, obtendo-se P_x de $0,57 \pm 0,03$ gMS/L.h. Essa produtividade é bastante inferior à alcançada em biorreator convencional (tanque agitado e aerado), de $2,3 \pm 0,1$ gMS/L.h, relatada por Santos (2012) para o mesmo microrganismo. A explicação para o baixo valor de P_x obtido no biorreator airlift é o crescimento celular mais lento em virtude das baixas temperaturas empregadas (mínima de 15°C). A redução gradual de temperatura até 15°C a partir de 12 h de cultivo (3 h antes do início da fase de indução) foi um recurso adicional empregado nesse experimento na tentativa de manter a COD nos níveis desejados através da redução da demanda celular por oxigênio. Quanto à formação de metabólitos, verificou-se um baixo acúmulo de ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico e acético), todos abaixo de 1,5 g/L, indicando o correto balanceamento dos nutrientes presentes no meio de cultivo e a ausência de metabolismo fermentativo, ou seja, o fornecimento adequado de oxigênio para as células.

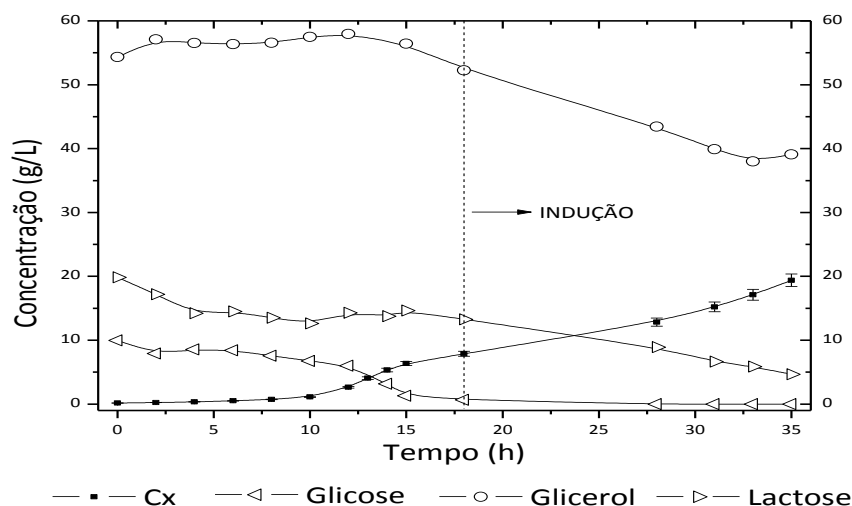


Figura 1 - Concentrações de biomassa (C_x), glicose, glicerol e lactose ao longo do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator airlift. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas de C_x em triplicata.

A fase de indução, com duração de 17 h, teve início com o esgotamento da glicose em 18 h de cultivo, quando começou o consumo mais intenso da lactose e do glicerol, conforme destacado na Figura 1. O $Y_{PspA/X}$ foi de 47 ± 1 mgPspA/gMS, sendo bastante inferior àquele alcançado em biorreator convencional (Santos, 2012), de 239 ± 7 mgPspA/gMS. Possivelmente, essa baixa produção de PspA solúvel se deve à reduzida atividade metabólica das células nas baixas temperaturas empregadas durante a indução (inferiores a 20°C), o que naturalmente também resulta em menor velocidade de síntese da proteína recombinante. Esse fato já havia sido constatado por Santos (2012) em cultivo conduzido a 25°C, no qual o $Y_{PspA/X}$ foi 50% inferior ao observado a 31°C. Como consequência da menor produção de proteína, do reduzido acúmulo de biomassa e do elevado tempo total de cultivo (35 h, ao

invés das 17 h necessárias em biorreator convencional), o P_{PspA} obtido (27 ± 2 mgPspA/L.h) foi significativamente inferior ao alcançado em biorreator convencional (550 ± 40 mgPspA/L.h). A estabilidade plasmidial se manteve elevada durante a fase de indução, sendo superior a 90%, indicando um baixo estresse metabólico nas células.

3.2. Ensaio em Biorreator Airlift Pressurizado

Através do cultivo de *E. coli* no biorreator airlift operado sob pressurização, atingiu-se, a partir de um C_x inicial de $0,106 \pm 0,006$ gMS/L, um C_x final de 30 ± 2 gMS/L, após 23,5 h de cultivo (Figura 2). O valor final de P_x foi de $1,27 \pm 0,06$ gMS/L.h, que é superior ao alcançado no airlift sem pressurização ($0,57 \pm 0,03$ gMS/L.h), mas inferior ao obtido no biorreator convencional ($2,3 \pm 0,1$ gMS/L.h) (Santos, 2012). A explicação para isso se deve à temperatura mínima empregada durante o cultivo no biorreator airlift pressurizado, de 26°C. Essa redução da temperatura acarretou em menor P_x em relação ao cultivo controle em reator convencional à 31°C (Santos, 2012). Entretanto, em relação ao ensaio em biorreator airlift sem pressurização, o maior P_x se deve à menor redução da temperatura, de 31 para 26°C no airlift pressurizado, ao invés da redução de 31 para 15°C no ensaio sem pressurização. A estratégia de controle da COD adotada foi sequencial (Figura 2), manipulando primeiramente a vazão de ar (QAR), seguida pela pressão, vazão de oxigênio puro (QO2) e, finalmente, a temperatura, possibilitando uma menor utilização de oxigênio puro, bem como uma redução menos drástica da temperatura. Com o aumento da pressão, foi preciso elevar a vazão mássica de gás, de acordo com a lei dos gases ideais, a fim de manter a vazão volumétrica do gás constante dentro do biorreator. As baixas concentrações acumuladas dos ácidos láctico, fórmico e acético, com valores abaixo de 0,7 g/L, refletem a efetividade do sistema de controle da COD adotado.

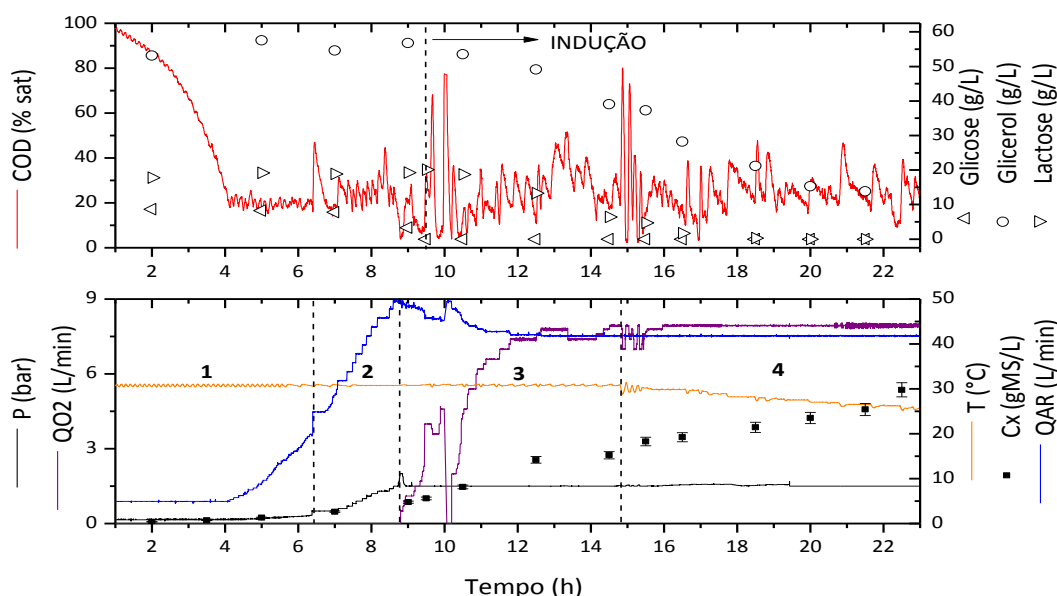


Figura 2 - Concentrações de biomassa (C_x), glicose, glicerol e lactose e perfil de resposta da COD com respeito à manipulação de QAR (Etapa 1), pressão (Etapa 2), QO2 (Etapa 3) e temperatura (Etapa 4) no cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator airlift pressurizado. Os valores de QAR e QO2 apresentados são relativos à condição padrão de 1 atm e 21,1°C. As barras de desvio padrão apresentadas se referem a medidas em triplicata.

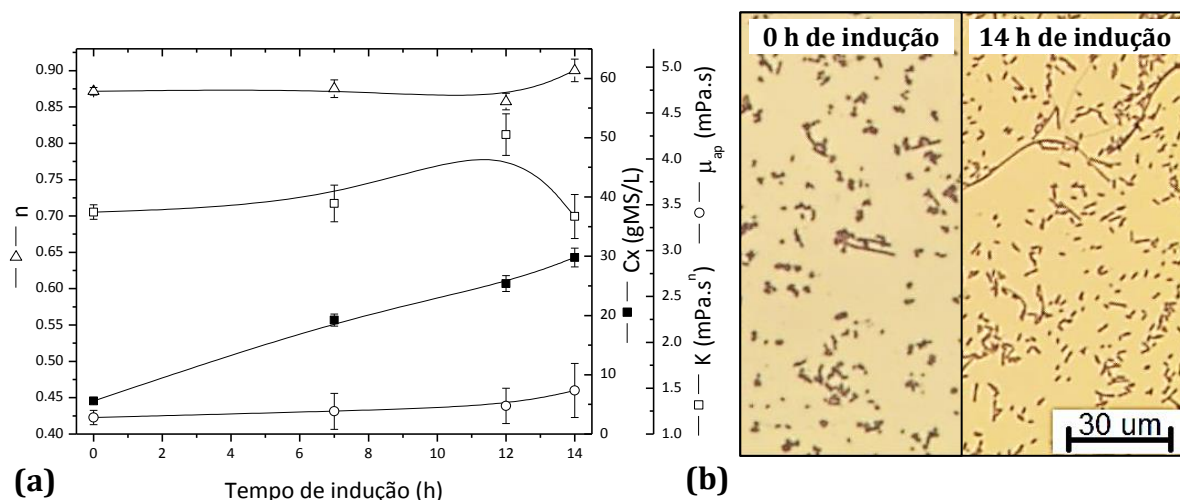


Figura 3 - (a) C_x , acompanhamento reológico (n , K e μ_{ap}) e (b) imagens de microscopia ótica (ampliação de 400x) de amostras retiradas ao longo da fase de indução do cultivo em batelada de *E. coli* em biorreator airlift pressurizado. As barras de desvio se referem ao desvio padrão das medidas em triplicata de C_x e ao erro padrão das estimativas de n , K e μ_{ap} .

Por outro lado, a retenção do plasmídeo caiu de 87% no tempo 0 h de indução para 48,1% no fim da fase de indução, após 14 h. Essa menor estabilidade plasmidial, em relação à alcançada no cultivo em biorreator airlift sem sobrepressão (superior a 90%), reflete o estresse metabólico celular decorrente da superexpressão da proteína recombinante (PspA) pelas células. De fato, o $Y_{PspA/X}$ máximo obtido no biorreator airlift pressurizado, após 12 h de indução, foi bastante superior, de 201 ± 8 mgPspA/gMS contra 47 ± 1 mgPspA/gMS alcançado no biorreator airlift sem pressurização, ou seja, um aumento de 4,3 vezes. Esse valor de 201 ± 8 mgPspA/gMS está próximo ao obtido no ensaio controle em reator convencional à 31°C (239 ± 7 mgPspA/gMS) (Santos, 2012). Novamente, como ocorrido com P_x , a redução da temperatura para um valor intermediário (26°C) entre a redução efetuada no biorreator airlift sem pressurização (para 15°C) e a temperatura empregada no reator convencional (31°C) explicam esses resultados de $Y_{PspA/X}$. Como consequência dos valores de P_x e $Y_{PspA/X}$ alcançados no biorreator airlift pressurizado, obteve-se um P_{PspA} (260 ± 20 mgPspA/L.h) intermediário entre o atingido no airlift sem pressurização (27 ± 2 mgPspA/L.h) e no reator convencional (550 ± 40 mgPspA/L.h) (Santos, 2012).

Neste ensaio, foi feito também um acompanhamento da reologia do caldo de cultivo e da morfologia das células ao longo da fase de indução. O fluido apresentou comportamento não Newtoniano do tipo pseudoplástico ($n < 1$), com os valores de n , K e μ_{ap} mostrados na Figura 3. As estimativas de μ_{ap} foram baseadas em $\dot{\gamma}$ médio de 4000 s^{-1} , valor alcançado no biorreator airlift de cilindros concêntricos (5 L) operado com fluido não Newtoniano ($K=0,180 \text{ Pa.s}^n$ e $n=0,461$) e vazão de gás de 21 L/min (Cerri *et al.*, 2008). Possivelmente, o comportamento pseudoplástico do caldo se deve à filamentação das células (Figura 3), que, segundo Jeong e Lee (2003), está relacionada à superexpressão de proteínas recombinantes. Considerando o erro padrão associado às estimativas de μ_{ap} verifica-se que este parâmetro não sofre alteração no decorrer da fase de indução. Portanto, pode-se afirmar que o crescimento celular e a síntese da proteína recombinante durante a fase de indução não afetam a viscosidade do caldo de cultivo e, de acordo com Cerri *et al.* (2008), a transferência de

oxigênio.

4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, comprovou-se que a elevação da pressão é uma forma promissora de controlar a COD em biorreator airlift de cilindros concêntricos. A pressurização do reator melhorou a transferência de oxigênio, possibilitando uma menor redução da temperatura no controle da COD, em relação ao cultivo sem sobrepressão, o que proporcionou aumentos de 2,2 e 9,6 vezes nas produtividades de biomassa e proteína recombinante (PspA), respectivamente.

Foi possível também constatar que a reologia do caldo de cultivo permaneceu praticamente inalterada durante a fase de indução, para a faixa de concentrações celulares estudadas e nas condições de indução empregadas. Isso significa que, mesmo com a superexpressão da proteína recombinante PspA, o efeito do aumento da concentração celular até 30 gMS/L é praticamente irrelevante para a viscosidade do caldo e a velocidade de transferência de oxigênio.

O desenvolvimento de um ambiente de cultivo baseado no biorreator airlift adaptado para operar em sobrepressão é igualmente útil em cultivos de outros microrganismos, contribuindo para o desenvolvimento de bioprocessos de um modo geral. A elaboração futura de um sistema robusto de controle da COD envolvendo pressões superiores proporcionariam produtividades ainda maiores no biorreator airlift.

5. AGRADECIMENTOS:

Beneficiário de auxílio financeiro da CAPES (Brasil) e da FAPESP (Brasil).

6. REFERÊNCIAS

- BADINO, A. C.; HOKKA, C. O.; CERRI, M. O. Biorreator pneumático de circulação interna e uso do mesmo. BR n. PI 0404703-6, 2004.
- CAMPANI, G. Reator airlift operado em sobrepressão: construção, caracterização da transferência de oxigênio e aplicação em cultivos de *Escherichia coli* recombinante. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.
- CAMPANI, G.; SILVA, G. G.; BADINO, A. C.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; HORTA, A. C. L. Análise de variáveis para controle da concentração de oxigênio dissolvido em biorreator airlift. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 19., 2013, Foz do Iguaçu. Anais... 1 DVD.
- CERRI, M. O.; FUTIWAKI, L.; JESUS, C. D. F.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 39, p. 51-57, 2008.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 297-306, 2009.
- GLAZYRINA, J.; MATERNE, E. M.; DREHER, T.; STORM, D.; JUNNE, S.; ADAMS, T.;

- GRELLER, G.; NEUBAUER, P. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor. *Microbial Cell Factories*, v. 9, p. 1-11, 2010.
- HORTA, A. C. L. H. Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de *E. coli* recombinante. 2009. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- JANARDHAN, S.; PANDIARAJA, P.; THIRUGNANAM, S.; BALAMURALI, M. N.; FERNANDO, K.; MODY, H. C.; DESAI, P. K.; MEENAKSHISUNDARAM, S.; KALIRAJ, P. Production, purification and diagnostic application of filarial recombinant protein WbSXP-1 expressed in salt inducible *Escherichia coli*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 34, n. 10, p. 675-683, 2007.
- JEONG, K. J.; LEE, S. Y. Enhanced production of recombinant proteins in *Escherichia coli* by filamentation suppression. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 2, p. 1295-1298, 2003.
- KRACKE-HELMET, H. A.; RINAS, U.; HITZMANN, B.; SHÜGERL, K. Cultivation of recombinant *Escherichia coli* and production of fusion in 60-L bubble column and airlift tower loop reactors. *Enzyme Microbiology Technology*, v.13, p.554-564, 1991.
- KORZ, D. J.; RINAS, U.; HELLMUTH, K.; SANDERS, E. A.; DECKWER, W. D. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, v. 39, p. 59-65, 1995.
- KYLE, S.; JAMES, K. A. R.; MCPHERSON, M. J. Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microbial Cell Factories*, v. 11, n. 28, p. 1-8, 2012.
- MARQUARDT, D. W. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, v. 11, n. 2, p. 431-441, 1963.
- SANTOS, M. P. Avaliação da temperatura de indução e de fontes de nitrogênio na produção de proteína de superfície de *Streptococcus pneumoniae* em *Escherichia coli* recombinante. 2012. 106 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2012.
- SHILOACH, J.; FASS, R. Growing *Escherichia coli* to high cell density: a historical perspective on method development. *Biotechnology Advances*, v. 23, p. 345-357, 2005.
- SILVA, A. J.; HORTA, A. C. L.; VELEZ, A. M.; IEMMA, M. R. C.; SARGO, C. R.; GIORDANO, R. L. C.; NOVO, M. T. M.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *rE. coli* fed-batch cultures. *SpringerPlus*, v. 2, p. 322, 2013.
- STUDIER, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking culture. *Protein Expression and Purification*, v.41, p. 313-322, 2005.
- VOJINOVIC, V.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, L. P. Real-time bioprocess monitoring – Part I: In situ sensors. *Sensors and Actuators B*, v. 114, p. 1083-1091, 2006.