



Proteínas Recombinantes – Cinética de Crescimento Celular e Expressão de rProteínas

Sumário da Aula

Introdução à cinética do crescimento celular e modos de operação de biorreatores

- Fases do crescimento celular
- Velocidades instantâneas e específicas de crescimento
- Fatores de conversão e produtividade
- Exemplos de cinética de crescimento celular
- Fenômenos relacionados à produção de rProteínas

Introdução à cinética do crescimento celular

Em primeiro lugar: Por que devemos estudar a cinética de crescimento celular?

O conhecimento de parâmetros cinéticos relacionados ao crescimento celular fornece subsídios importantíssimos para a compreensão de fenômenos encontrados nas mais variadas áreas do conhecimento, como microbiologia, fisiologia, medicina (ex. oncologia) e processos biotecnológicos.

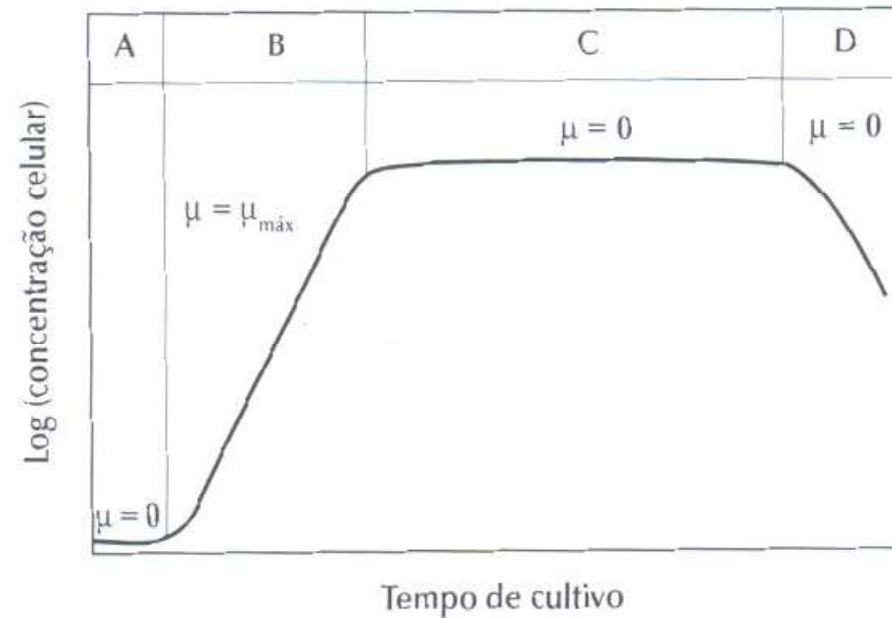
Jacques L. Monod



Em processos biotecnológicos, parâmetros como velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e e fatores de conversão são importantes por diversas razões. Dentre muitas, podemos destacar:

- Otimização ou comparação entre processos
- Otimização ou comparação entre linhagens
- Identificação do estado fisiológico das células
- Controle de processo
- Obtenção de dados necessários à análise técnico-econômica e viabilidade de processos

Fases do crescimento celular



- A – Fase lag, onde as células estão se adaptando ao novo meio (produção de enzimas, proteínas, estruturas, etc, necessárias ao crescimento). Crescimento muito pequeno ou nulo.
- B – Fase exponencial, onde as células adaptadas crescem a velocidade máxima na condição de cultivo.
- C – Fase estacionária, onde a concentração de substrato cai abaixo de um valor crítico necessário ao crescimento, ou devido ao acúmulo de metabólitos inibidores.
- D – Fase de declínio, onde a velocidade de morte celular é maior que a de crescimento.

Velocidades instantâneas e específicas de crescimento

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise de evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação.

Assim, a velocidade instantânea de crescimento celular está definida na equação 1:

$$r_x = \frac{dX_v}{dt} \cong \frac{\Delta X_v}{\Delta t} \quad (1)$$

Onde,

r_x = velocidade de crescimento celular (unidades de concentração celular/tempo)

X_v = concentração de células viáveis

t = tempo

Equações semelhantes podem ser descritas para a velocidade de consumo de substrato (r_s) e de síntese de produto (r_p):

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (2)$$

$$r_p = \frac{dP}{dt} \quad (3)$$

Onde,

r_s = velocidade de consumo de substrato

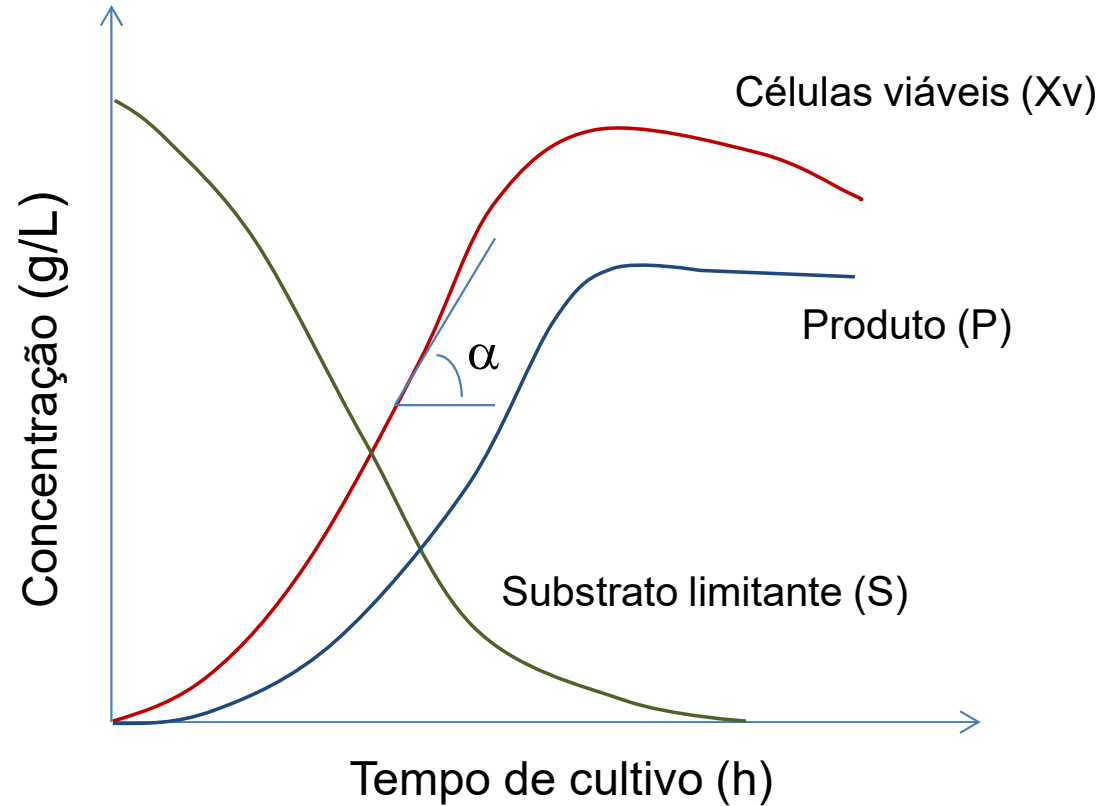
r_p = velocidade de síntese do produto

S = concentração de substrato

P = concentração do produto

Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

Curvas típicas de crescimento celular (X_v), consumo de substrato (S) e formação do produto (P)



$$r_X = \frac{dX_V}{dt}$$

Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

Durante um determinado intervalo de tempo, a concentração de células no interior de um biorreator pode variar significativamente, o que afeta todas as velocidades de transformação. Já a velocidade específica de crescimento (μ) é calculada a partir da velocidade de crescimento celular, dividida pela concentração celular naquele instante, e representa melhor a cinética de crescimento daquela população.

$$\mu_X = \frac{1}{X_V} \frac{dX_V}{dt} = \frac{1}{X_V} (r_X) \quad (4)$$

Onde,

μ_X = **velocidade específica de crescimento** ou taxa específica de crescimento (1/tempo, ex. h⁻¹)

Se a viabilidade celular for suficientemente elevada, a velocidade específica de crescimento pode ser calculada diretamente da concentração celular. Quando a morte celular é expressiva, o valor obtido pela equação 4 é, na verdade, a velocidade específica aparente.

$$\mu_X^{ap} = \mu_X - \mu_d \quad (5)$$

Onde,

μ_X^{ap} = velocidade específica aparente de crescimento

μ_d = velocidade específica de morte celular

Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

A velocidade específica de morte celular pode ser calculada utilizando-se a equação 6, diretamente a partir de Dados experimentais de concentração de células viáveis e mortas.

$$\mu_d = \frac{1}{X_v} \frac{dX_d}{dt} \quad (6)$$

Onde,

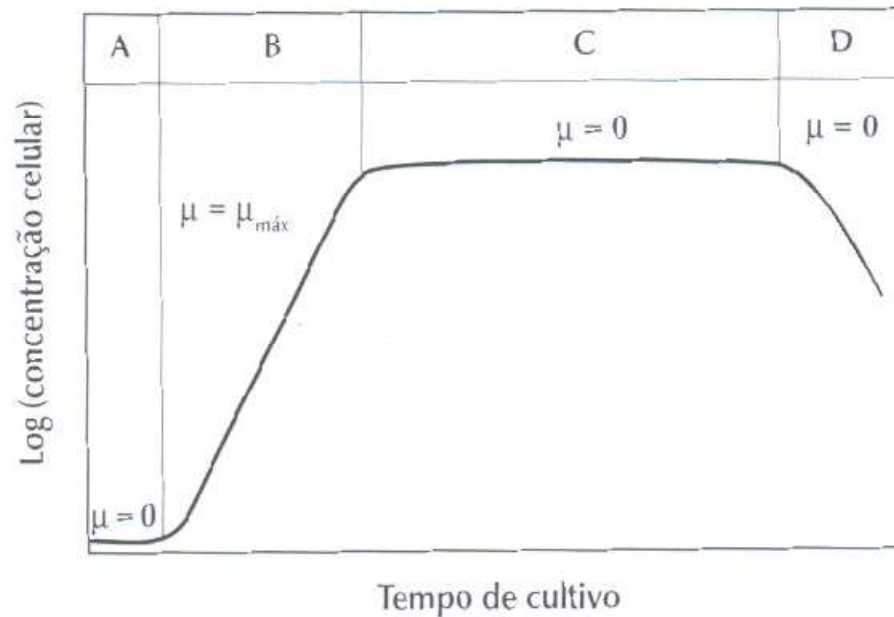
X_d = concentração de células mortas

A viabilidade celular pode ser obtida por diferentes métodos como uso de corante (*tripan blue*), conhecido como exclusão por corante, ou mesmo métodos que indiretamente quantificam a lise celular, como a medida de concentração da enzima lactato desidrogenase (LDH).



Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

Cálculo de μ a partir de dados experimentais:



Equacionamento:

$$\mu_X = \frac{1}{X_V} \frac{dX_V}{dt} \rightarrow \frac{1}{X_V} dX_V = \mu_X dt$$

$$\int_{x_0}^x \frac{1}{X_V} dX_V = \int_{t_0}^t \mu_X dt \rightarrow \ln(X) - \ln(X_0) = \mu_X t$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_X t \rightarrow X = X_0 \exp(\mu_X t)$$

Construindo-se uma curva de $\ln X_V$ versus tempo de cultivo, $\mu_{\text{máx}}$ pode ser obtido a partir do coeficiente angular da curva na fase de crescimento exponencial.

Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

A partir da velocidade específica pode-se obter o **tempo de duplicação (t_d)** na fase de crescimento exponencial, onde μ é constante e atinge seu valor máximo, pode ser descrito por:

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= \mu x \\ \ln \frac{X_2}{X_1} &= \mu(t_2 - t_1) \\ t_d &= \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu} \quad (7)\end{aligned}$$

Exemplos de tempos de duplicação:

Bactéria (*E. coli*) 0,3 – 0,9 horas

Leveduras 2 – 4 horas

Células de inseto 15 – 30 horas

CHO 12 – 24 horas

Vero 24 – 30 horas

FS-4 50 – 60 horas

Exemplo 1: Tempo de duplicação para cultura de Hibridoma

Os dados abaixo mostram resultados de crescimento celular de células de hibridoma cultivadas em batelada descontínua.

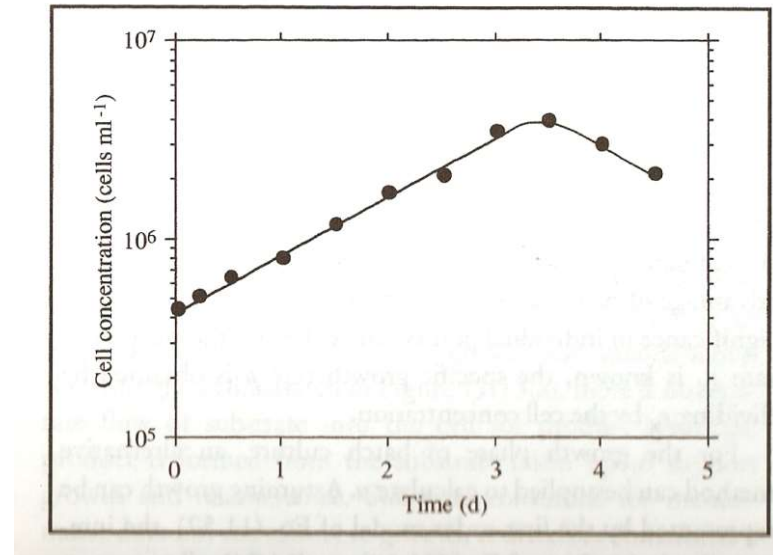
<i>Time</i> (d)	<i>Cell concentration</i> (cells ml ⁻¹ × 10 ⁻⁶)
0.0	0.45
0.2	0.52
0.5	0.65
1.0	0.81
1.5	1.22
2.0	1.77
2.5	2.13
3.0	3.55
3.5	4.02
4.0	3.77
4.5	2.20

Com base nos dados experimentais, determinar:

- A velocidade específica de crescimento na fase exponencial
- O tempo de duplicação (td)

Exemplo 1 (continuação):

Time (d)	Cell concentration (cells ml ⁻¹ × 10 ⁻⁶)
0.0	0.45
0.2	0.52
0.5	0.65
1.0	0.81
1.5	1.22
2.0	1.77
2.5	2.13
3.0	3.55
3.5	4.02
4.0	3.77
4.5	2.20



a) Plotando-se os dados em gráfico na forma **Ln da concentração celular vs tempo** e obtendo-se o coeficiente angular da curva (desprezando-se os três últimos pontos), obtém-se: $\mu_{\max} = 0,67 \text{ d}^{-1}$

b) A partir da equação (7), temos:

$$t_d = \frac{\ln 2}{0,67 \text{ d}^{-1}} = 1,0 \text{ d}$$

Velocidades instantâneas e específicas (continuação)

Da mesma forma como foi visto para o crescimento celular, podemos também definir as velocidades Específicas de consumo de substrato e a de síntese de produto:

$$\mu_S = \frac{1}{X_V} \left(-\frac{dS}{dt} \right) = \frac{1}{X_V} (r_S) \quad (8)$$

Onde,

μ_S = velocidade específica de consumo de substrato

$$\mu_P = \frac{1}{X_V} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{X_V} (r_P) \quad (9)$$

Onde,

μ_P = velocidade específica de síntese do produto

Produtividade

Uma outra forma simples e bastante utilizada de se avaliar o desempenho de um processo fermentativo diz respeito a produtividade em formação de biomassa e produto:

$$P_X = \frac{X_f - X_o}{t_f} \quad (15)$$

Onde,

P_X = Produtividade em formação de biomassa (g/L/h)

X_f = Concentração final de células (g/L)

X_o = Concentração inicial de células (g/L)

t_f = tempo total ou final de fermentação (h)

$$P_P = \frac{P_f - P_o}{t_{fP}} \quad (16)$$

Onde,

P_p = Produtividade do produto (g/L/h)

P_f = Concentração final de produto (g/L)

X_o = Concentração inicial produto (g/L)

t_{fP} = tempo total ou final de fermentação (h)

Formulações clássicas para crescimento celular, consumo de substratos e síntese de produtos

Em estudos cinéticos, estabeleceu-se um conjunto de expressões matemáticas capazes de descrever os fenômenos mais frequentes como limitações ou inibições do crescimento e da formação de produtos por determinados substratos ou produtos. Muitas dessas expressões não são resultado da análise de mecanismos cinéticos conhecidos e sim expressões matemáticas com parâmetros ajustáveis capazes de representar perfis cinéticos observados experimentalmente.

Crescimento celular limitado pelo substrato:

Equação de Monod

$$r_X = \mu_{\max} \frac{S}{k_S + S} X \quad (17) \quad \text{ou} \quad \mu_X = \mu_{\max} \frac{S}{k_S + S} \quad (18)$$

Onde,

μ_{\max} = máxima velocidade específica de crescimento celular

k_S = constante de limitação do crescimento pelo substrato S (ou constante de saturação para o crescimento)

S = concentração de substrato limitante

X = concentração celular

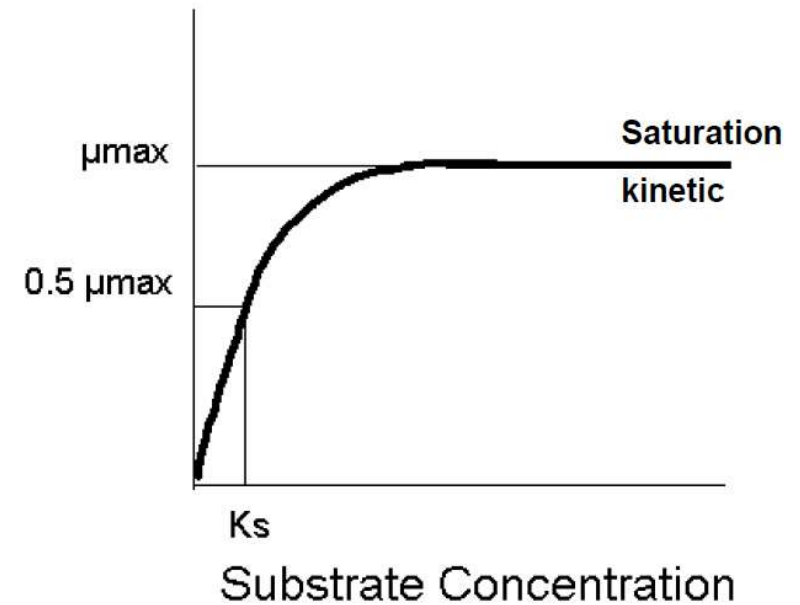
Formulações clássicas (continuação)

$$\mu_X = \mu_{\max} \frac{S}{k_S + S}$$

Se $S \gg K_S$, então $\mu \rightarrow \mu_{\max}$

Os dois parâmetros, (μ_{\max} e k_S), definem a relação entre μ e a concentração de substrato limitante S .

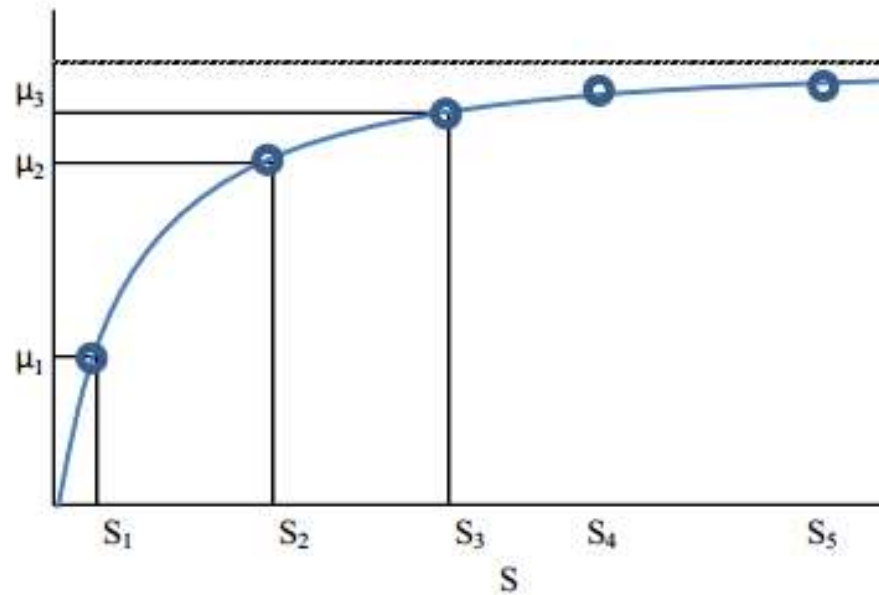
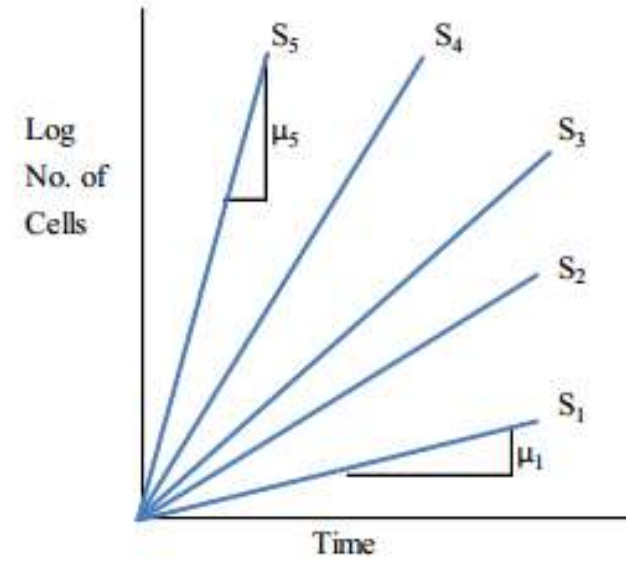
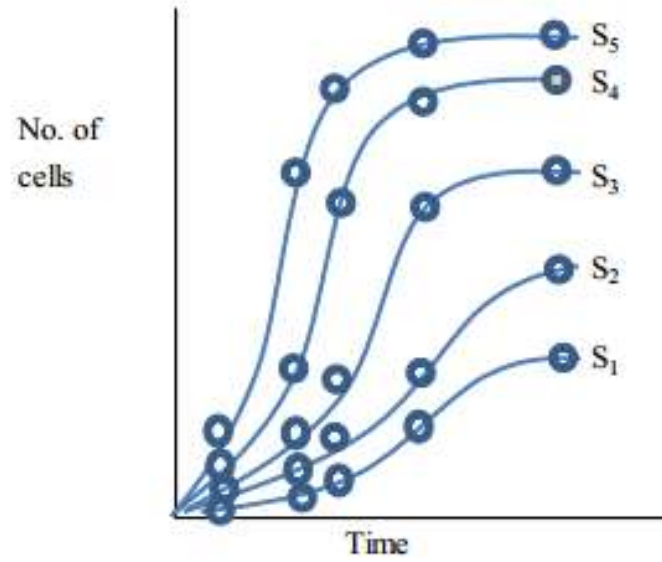
Entretanto, a equação de Monod leva em conta apenas um substrato limitante e não prevê fenômenos de inibição



$$\mu_X = \mu_{\max} \frac{S_1}{k_{S1} + S_1} * \frac{S_2}{k_{S2} + S_2}$$

Equação de Megee (19)

Formulações clássicas (continuação)



Perfis de formação do produto: Associado, Parcialmente Associado e Não Associado ao Crescimento

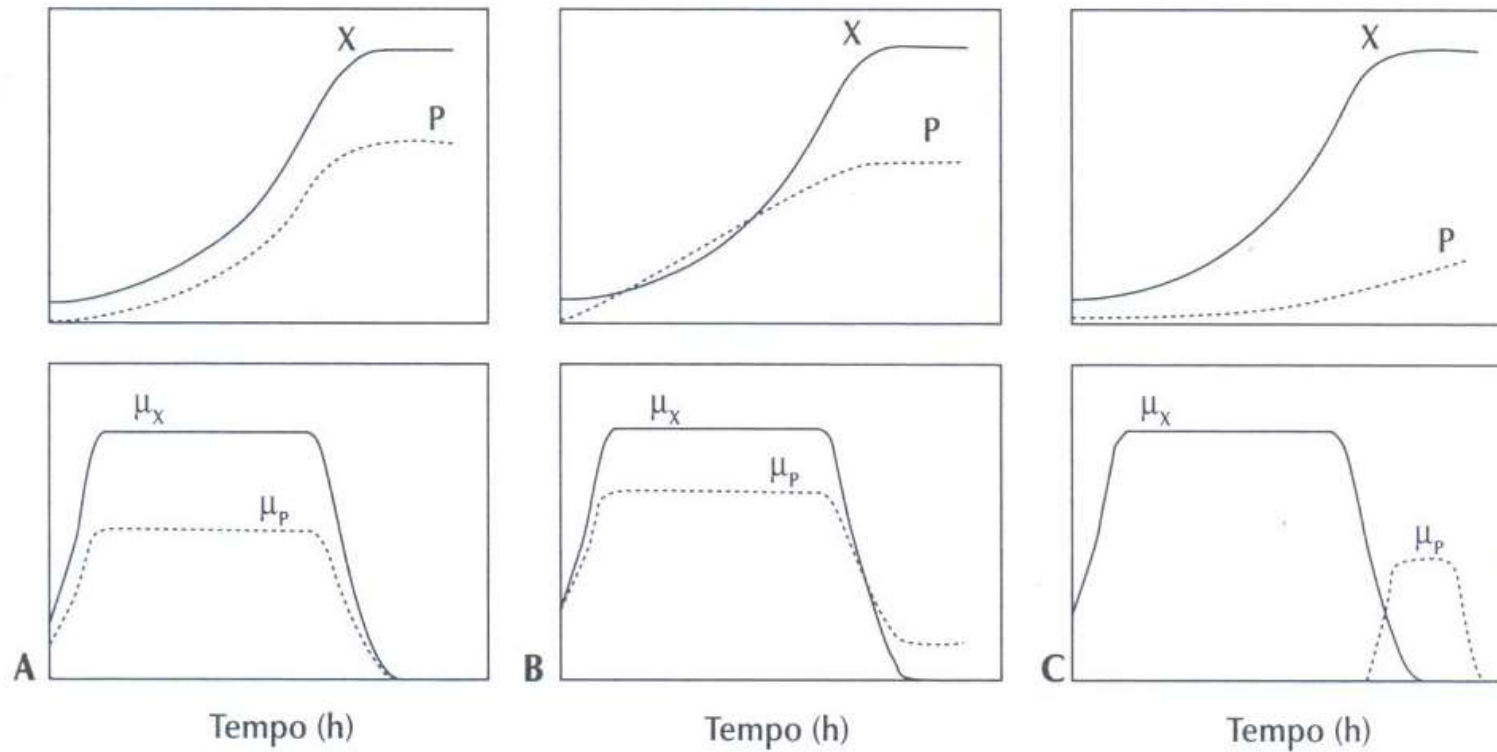


Figura 8.5 – Perfis de crescimento celular e síntese de produto para diferentes modelos de produção: (A) Associado ao crescimento. (B) Associado e não associado ao crescimento. (C) Não associado ao crescimento.

Exemplo 2: Perfis cinéticos para produção de anticorpos monoclonais

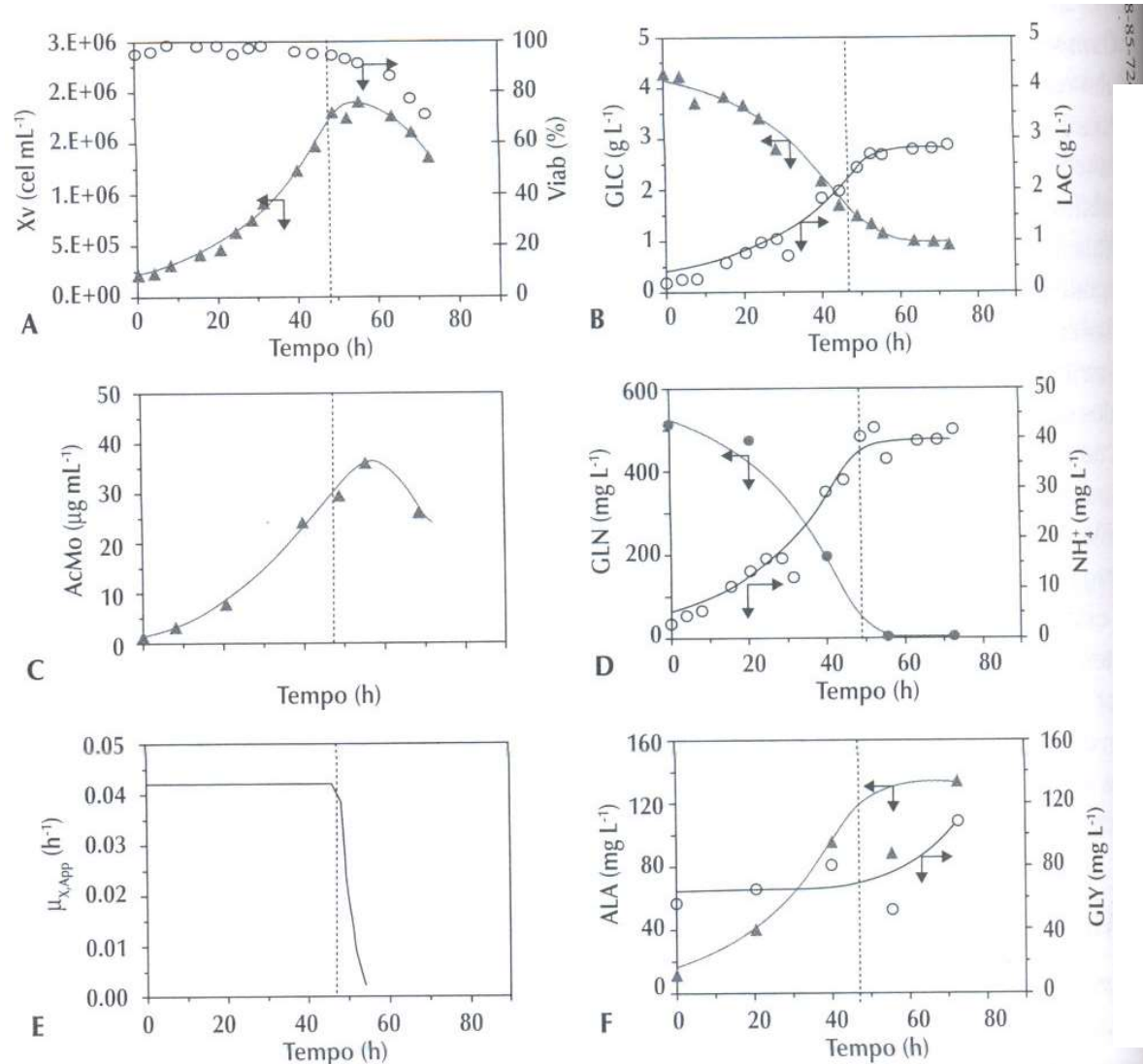
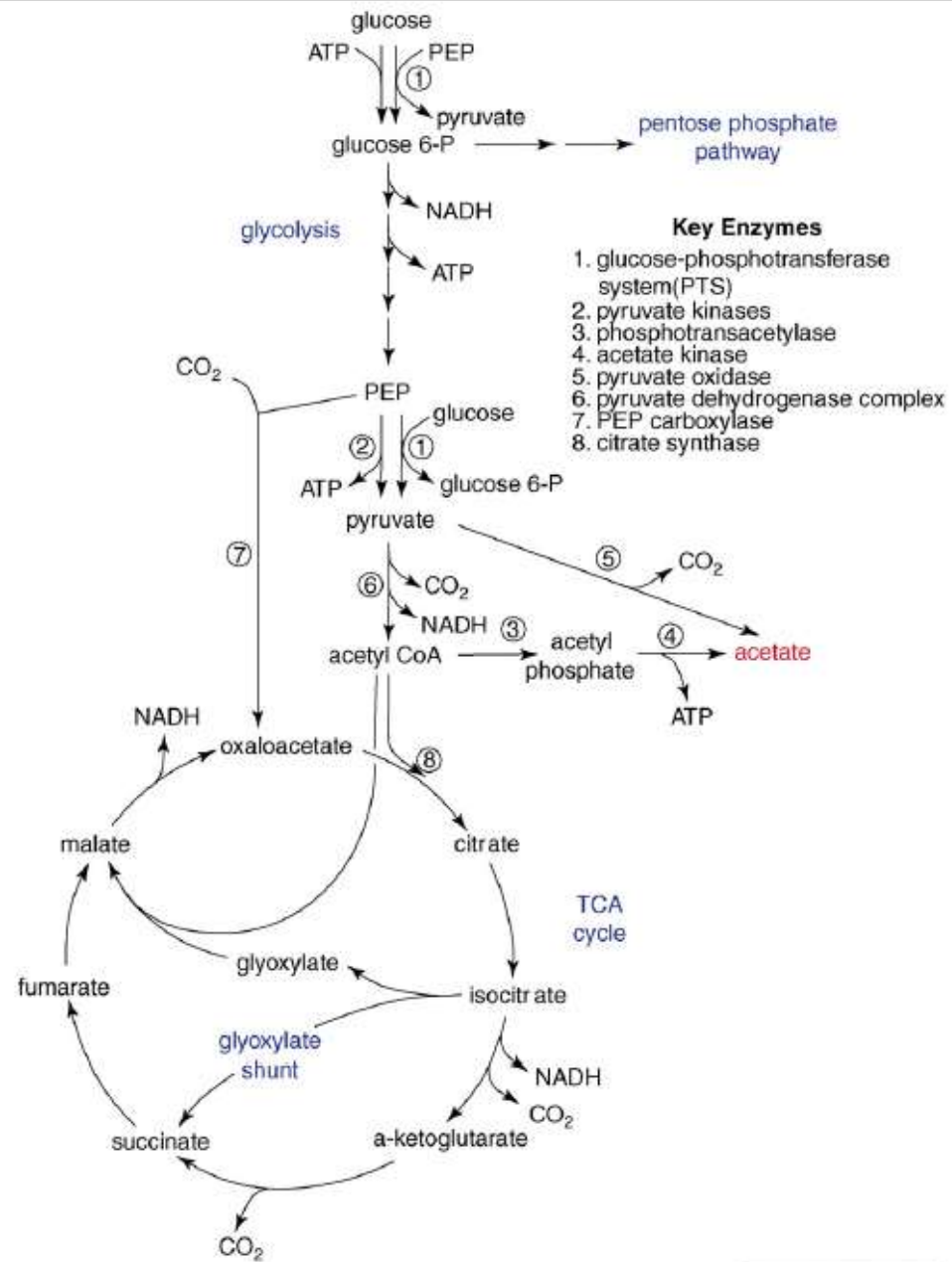


Figura 8.2 – Perfil cinético típico (hibridoma). (A) Concentração e viabilidade celular. (B) Concentrações de glicose (GLC) e de lactato (LAC). (C) Concentração de anticorpo monoclonal (AcMo). (D) Concentrações de glutamina (GLN) e de amônio (NH_4^+). (E) Velocidade específica de crescimento (μ_x). (F) Concentração de alanina e glicina. Adaptado de Lee⁹. Os símbolos correspondem a dados experimentais, e as linhas a ajuste manual dos dados. Linhas verticais indicam o instante no qual termina a fase exponencial de crescimento, isto é $\mu_x < \mu_{x,max}$.

Importante: Um problema crítico encontrado em cultivos de *E. coli* em altas densidades celulares é o acúmulo de acetato (*bacterial Crabtree effect*), além de outros ácidos orgânicos, levando à redução da velocidade específica de crescimento, formação de biomassa e produção da proteína recombinante.

Dentre as soluções que estão sendo buscadas para o problema está a redução das concentrações iniciais de glicose no meio, por exemplo através do uso da batelada alimentada (modo de operação do biorreator) ou mesmo a remoção do acetado do meio de cultura durante a operação do biorreator. Além disso, modificações em vias metabólicas tem sido estudadas visando à redução do acúmulo de acetato.



TRENDS in Biotechnology

Figure 2. Key biochemical pathways in *E. coli* involved in the aerobic consumption of glucose and the synthesis of acetate, carbon dioxide and biomass. *E. coli* consumes glucose principally by a phosphotransferase system (PTS), which simultaneously generates pyruvate from PEP. Acetate is formed from pyruvate by pyruvate oxidase and phosphotransacetylase/acetate kinase. PEP carboxylase is the principal 'anaplerotic' pathway needed to replenish TCA cycle intermediates consumed for biomass formation. Not all pathways are indicated.

Reduction of Acetate and Lactate Contributed to Enhancement of a Recombinant Protein Production in *E. coli* BL21

Tae-Su Kim^{1,2†}, Hyung-Moo Jung^{3†}, Sang-Yong Kim³, Liaoyuan Zhang¹, Jinglin Li¹, Sujan Sigdel¹, Ji-Hyun Park¹, Jung-Rim Haw^{2*}, and Jung-Kul Lee^{1*}

¹Department of Chemical Engineering, and ²Institute of SK-KU Biomaterials, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

³BioNgene Co., Ltd, Seoul 110-521, Republic of Korea

Received: March 9, 2015

Revised: March 18, 2015

Accepted: March 18, 2015

First published online
March 20, 2015

*Corresponding authors

J.-K.L.

Phone: +82-2-450-3505;

Fax: +82-2-458-3504;

E-mail: jkrhee@konkuk.ac.kr

J.-R.H.

Phone: +82-2-450-3499;

Fax: +82-2-2201-6447;

E-mail: rhaw@konkuk.ac.kr

[†]These authors contributed
equally to this work.

pISSN 1017-7825, eISSN 1738-8872

Copyright © 2015 by

Acetate and lactate in growth media are detrimental to the production of *Thermus* maltogenic amylase (ThMA), a heterologous protein, as well as to the growth of recombinant *Escherichia coli*. Only 50 mM of acetate or 10 mM of lactate reduced 90% of specific ThMA activity. In this study, mutant *E. coli* strains blocked in the *ackA-pta* or *ackA-pta* and *ldh* pathways were created, characterized, and assessed for their culture performance in 300 L-scale fermentation. The *ackA-pta* and *ldh* double-mutant strain formed significantly less lactate and acetate, and produced a concomitant increase in the excretion of pyruvate (17.8 mM) under anaerobic conditions. The *ackA-pta* mutant strain accumulated significant acetate but had an approximately 2-fold increase in the formation of lactate. The *ackA-pta* and *ldh* double-mutant strain had superior overall performance in large-scale culture under suboptimal conditions, giving 67% higher cell density and 66% higher ThMA activity compared with those of the control strain. The double-mutant strain also achieved a 179% improvement in volumetric ThMA production.

Keywords: Large-scale bioreactor, maltogenic amylase, metabolically engineered, production, recombinant protein

> Biotechnol Bioeng. 2018 Sep;115(9):2315-2327. doi: 10.1002/bit.26724. Epub 2018 May 22.

Improving culture performance and antibody production in CHO cell culture processes by reducing the Warburg effect

Maria Buchsteiner¹, Lake-Ee Quek^{1 2}, Peter Gray¹, Lars K Nielsen^{1 3}

Affiliations + expand

PMID: 29704441 DOI: 10.1002/bit.26724

Abstract

Lactate is one of the key waste metabolites of mammalian cell culture. High lactate levels are caused by high aerobic glycolysis, also known as the Warburg effect, and are usually associated with adverse culture performance. Therefore, reducing lactate accumulation has been an ongoing challenge in the cell culture development to improve growth, productivity, and process robustness. The pyruvate dehydrogenase complex (PDC) plays a crucial role for the fate of pyruvate, as it converts pyruvate to acetyl coenzyme A (acetyl-CoA). The PDC activity can be indirectly increased by inhibiting the PDC inhibitor, pyruvate dehydrogenase kinase, using dichloroacetate (DCA), resulting in less pyruvate being available for lactate formation. Here, Chinese hamster ovary cells were cultivated either with 5 mM DCA or without DCA in various batch and fed-batch bioreactor processes. In all cultures, DCA

FULL TEXT LINKS



ACTIONS



SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Biorreator de Bancada Tipo Tanque Agitado



Sugestão de vídeo – produção de GFP por *E. coli*

<https://www.youtube.com/watch?v=5eKdZ0dVCCo&t=796s>

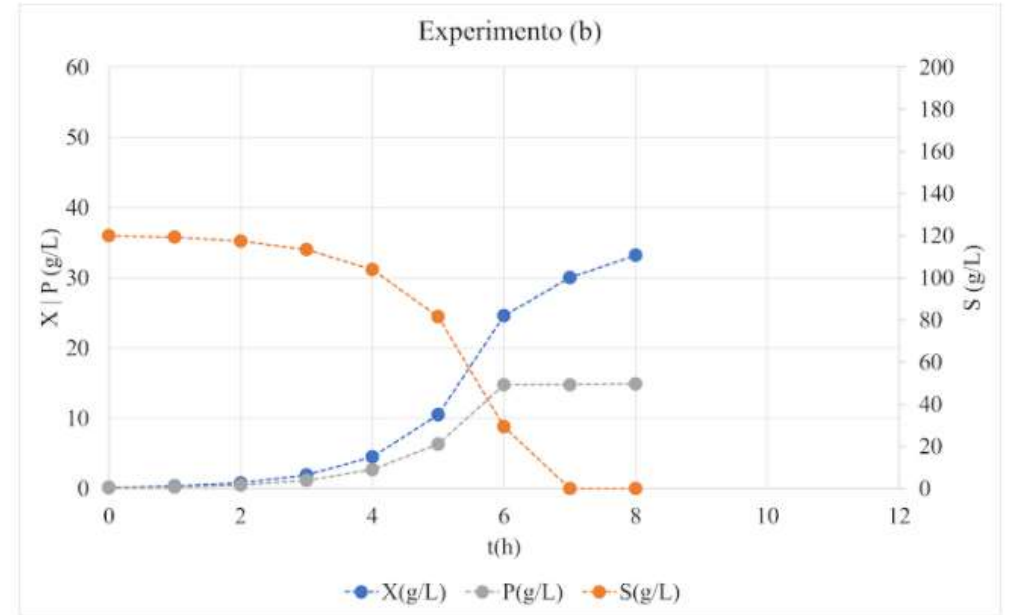
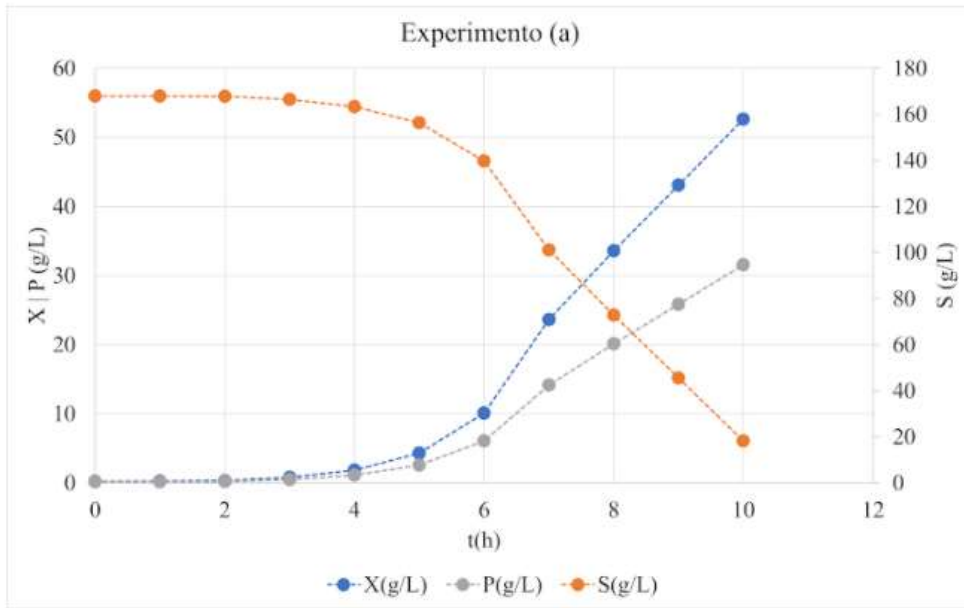


Exercício 1 – Em dois experimentos em batelada, foram obtidos os resultados abaixo. Responda às seguintes questões com base nesses dados. **a)** Qual foi a velocidade específica máxima em cada experimento? **b)** Qual é a produtividade de produto global em cada experimento? **c)** Se você fosse otimizar esse processo, como seria o experimento ideal para obter concentrações elevadas de produto?

Experimento (a)			
Tempo(h)	X(g/L)	S(g/L)	P(g/L)
0,0	0,25	168,0	0,15
1,0	0,29	167,9	0,17
2,0	0,34	167,8	0,20
3,0	0,79	166,5	0,47
4,0	1,85	163,4	1,11
5,0	4,32	156,4	2,59
6,0	10,11	139,8	6,07
7,0	23,66	101,1	14,19
8,0	33,57	72,8	20,14
9,0	43,11	45,5	25,86
10,0	52,65	18,3	31,59

Experimento (b)			
Tempo(h)	X(g/L)	S(g/L)	P(g/L)
0,00	0,15	120,0	0,09
1,00	0,35	119,3	0,21
2,00	0,82	117,5	0,49
3,00	1,92	113,4	1,15
4,00	4,49	103,9	2,70
5,00	10,52	81,6	6,31
6,00	24,60	29,4	14,76
7,00	30,05	0,0	14,80
8,00	33,21	0,0	14,90

Curvas obtidas nos experimentos do exercício 1:



Disposable Bioreactors – Larga escala

