

# *Revista da Graduação*

---

Vol. 5

No. 1

2012

15

---

**Seção: Faculdade de Engenharia**

## **ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE DE BIOMASSA E DE PROTEÍNA NA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE HORMÔNIO DE CRESCIMENTO RECOMBINANTE EM ESCHERICHIA COLI**

**Bruno Coccaro Pivatto**

Este trabalho está publicado na Revista da Graduação.

ISSN 1983-1374

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/11409>

# **Análise da Produtividade de Biomassa e de Proteína na Otimização da Produção de Hormônio de Crescimento Recombinante em *Escherichia coli***

Bruno Coccaro Pivatto  
07105819-2

Aluno da Faculdade de Engenharia

Curso de Engenharia Química - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Dezembro, 2011-11-29

Av. Ipiranga, 6681. Partenon. Porto Alegre/RS. CEP 90.619-900.

## **RESUMO**

A deficiência do hormônio de crescimento humano afeta uma em cada 15 mil crianças, sendo a reposição hormonal o único tratamento disponível. Alguns usos foram aprovados por órgãos reguladores, como para baixa estatura ao nascer e perda importante de massa muscular por HIV. O presente estudo tem por objetivo otimizar a produção de hormônio de crescimento humano recombinante em *Escherichia coli*, relacionando produtividade de biomassa com produtividade de proteína. Para tanto, foram realizadas sete fermentações em biorreatores de dois litros de capacidade, em sequência a outras que fizeram parte de um projeto de pesquisa. Os parâmetros de análise foram a composição de alimentação (concentração de sulfato de magnésio), a estratégia de alimentação (OD-stat ou combinação de OD-stat e linear) e a agitação (em cascata com o oxigênio dissolvido ou fixa). Os melhores resultados a 30 horas de cultivo, em termos de produtividade de biomassa e de proteína, foram obtidos com a adição de maiores concentrações de sulfato de magnésio à alimentação e com incrementos de agitação associados à estratégia de alimentação OD-stat. Também se observou que o tempo de máxima produtividade de biomassa não acompanhou o tempo de máxima produtividade de proteína, aspecto importante a ser considerado para fins de otimização na produção industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** hormônio de crescimento humano recombinante, *Escherichia coli*, biorreator, batelada-alimentada, otimização, produtividade.

## **ABSTRACT**

The human growth deficiency affects one in each 15 thousand children, and the hormonal replacement is the only available treatment. Some uses were approved by regulatory organizations, such as short stature at birth and important loss of muscle mass due to HIV. This study has for objective the optimization of the production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*, relating the biomass productivity with the protein productivity. For this purpose, seven fermentations in bioreactors with a capacity of two liters were carried out, in sequence to others that were part of a research project. The analysis parameters were the feed composition (concentration of magnesium sulfate), the feed strategy (DO-stat or the combination of DO-stat and linear) and the agitation (in cascade with the dissolved oxygen or fixed). The best results at 30 hours of culture, in terms of biomass and protein productivity, were obtained with the addition of higher magnesium sulfate concentrations to the feed and with increments of agitation associated to the OD-stat feed strategy. It was also observed that the maximum productivity of biomass did not accompany the time of maximum productivity of protein, which is an important aspect to be considered to industrial production optimization purposes.

**KEY-WORDS:** recombinant human growth hormone, *Escherichia coli*, bioreactor, fed batch, optimization, productivity.

## 1. Introdução

A deficiência do hormônio do crescimento humano afeta uma em cada 15 mil crianças. O único tratamento é a reposição hormonal, que prossegue até que as cartilagens parem de crescer, o que ocorre aproximadamente aos 16 anos de idade (EL-DORRY, 2001).

Alguns usos foram aprovados por órgãos reguladores, como para crianças de baixa estatura, crianças com baixo peso ao nascer em relação à idade gestacional e crescimento insuficiente até os dois anos de idade, adultos com deficiência ou insuficiência de hormônio de crescimento (por lesões hipofisárias) e perda importante de massa muscular por HIV. O hormônio de crescimento também tem sido usado por pessoas que desejam reverter ou retardar efeitos de envelhecimento e para promover melhor desempenho esportivo (WANNMACHER, 2006).

Até a década de 1970, a única maneira de obtê-lo era extraí-lo da glândula hipófise de cadáveres de seres humanos. Só a partir de 1979 começou a ser produzido, nos Estados Unidos, por meio da modificação do patrimônio genético de bactérias (EL-DORRY, 2001). Dentre as alternativas para a produção dessa enzima, pode-se citar a produção da enzima de maneira recombinante em *Escherichia coli* geneticamente modificada. A *Escherichia coli* é o organismo mais bem estudado da atualidade, o que facilita sua utilização para a produção de proteínas heterólogas. A manipulação genética possibilitou a criação de cepas mutantes com diferentes características que criam ambientes favoráveis para a expressão de proteínas com as mais variadas características (LIMA, 2004).

Industrialmente, os processos para a produção de proteínas recombinantes podem ocorrer de distintas formas, tais como a contínua, a em batelada e a em batelada-alimentada. Os processos em batelada-alimentada, também conhecidos como *Melle-Boinot*, têm se mostrado eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nos de fermentação alcoólica. Além de menores riscos de contaminação, esse processo apresenta grande flexibilidade de operação por permitir a utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos, pela possibilidade de realizar fases sucessivas no mesmo recipiente pelo controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo e pela capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (CARVALHO; SATO, 2001).

Para fins industriais, as fermentações em batelada-alimentada devem considerar alguns aspectos importantes. O processo fermentativo deve ser rápido, resultando em altos valores de

produtividade do produto desejado. O tempo de preparação dos biorreatores também deve ser reduzido dentro do possível, pois ele representa um "tempo morto", sem produção efetiva.

No Brasil, o hormônio de crescimento para a maioria das aplicações clínicas depende da sua importação. O preço extremamente elevado dessa droga acarreta uma limitação severa na sua aplicação clínica aos pacientes. A fabricação do hormônio de crescimento no mercado nacional provocaria uma diminuição nas importações desse medicamento, evitando que seu preço variasse conforme a oscilação do mercado internacional. Isso reduziria o seu preço, facilitando o acesso da população e do Sistema Único de Saúde (SUS) ao fármaco. Com isso, será possível substituir as importações do produto (de alto valor agregado) por um equivalente nacional, possibilitando, assim, uma economia de divisas para o país e a ampliação, a preços competitivos, da oferta desse medicamento aos usuários do SUS e ao mercado privado.

A maioria das investigações relacionadas a fermentações de alta densidade celular até então desenvolvidas esteve focada em elevar as concentrações celulares com pouca atenção ao rendimento específico de proteínas recombinantes. Em fermentações de alta densidade celular, elevar as concentrações celulares ajuda a aumentar o rendimento volumétrico de proteínas recombinantes (concentração de proteína), normalmente ao custo de menor rendimento específico (concentração de proteína por concentração celular) das mesmas (PANDA et al., 1999).

O objetivo deste trabalho é otimizar a produção de hormônio de crescimento humano recombinante em sua fração solúvel utilizando *Escherichia coli* em cultivos em biorreatores de dois litros de capacidade, relacionando em cada cultivo a produtividade de biomassa e a produtividade de proteína recombinante em dois momentos do cultivo: a 30 horas e à produtividade máxima de biomassa. Nesse contexto, a Quadro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda., dentro de um projeto de pesquisa patrocinado pela CAPES, já realizou um total de 27 fermentações na busca da otimização do processo, variando diferentes parâmetros, tais como a composição do meio, a composição da alimentação, a estratégia de alimentação, a agitação e a estratégia de indução química. Este estudo, dando sequência ao projeto de pesquisa, está focado na análise de sete novas fermentações que foram realizadas com vistas à otimização do processo e na busca de relações entre produtividade de biomassa e produtividade de proteína recombinante nos momentos citados. Variaram-se parâmetros como composição de alimentação (concentração de sulfato de magnésio), estratégia de alimentação (OD-stat ou combinação de OD-stat e linear) e agitação (em cascata com o oxigênio dissolvido ou fixa).

## 2. Fundamentação Teórica

Este trabalho envolveu pesquisa e consulta a diversas fontes, sendo alguns fundamentos básicos necessários à melhor compreensão do mesmo apresentados a seguir.

### 2.1 Processos Biotecnológicos

Segundo Doran (1995), os bioprocessos passam por uma série de etapas. As primeiras etapas consistem na manipulação de DNA, obtido de tecido animal, por exemplo. Essa parte do processo é realizada em laboratórios. Depois de construído o gene e inserido em um vetor de DNA, o plasmídeo pode ser inserido em micro-organismo como *Escherichia coli*. Os parâmetros de maior importância nessas etapas (1 a 11 da Figura 1) são a estabilidade do micro-organismo construído e o nível de expressão do produto desejado.

Depois da clonagem, as condições de crescimento devem ser estabelecidas. Para tal, são conduzidos testes de parâmetros como pH, temperatura e meio de cultivo em pequena escala (etapa 12 da Figura 1). Normalmente são utilizados frascos erlenmeyers de 250 mL a 1 L de capacidade.

Após o estabelecimento da melhor condição de crescimento, é necessário escalar o processo para biorreator de bancada (etapa 13 da Figura 1), que fornece melhor controle e monitoramento das variáveis. Nessa etapa, o modo de operação deve ser definido.

Uma vez que se tenha acumulado suficiente experiência sobre o processo fermentativo em questão e atingido desempenho adequado do ponto de vista econômico, pode-se ampliar o processo para escala piloto (etapa 14 da Figura 1). Se o escalonamento for bem sucedido, o processo em escala industrial pode ser iniciado (etapa 15 da Figura 1). Deve-se atentar à etapa de recuperação do produto (etapa 16 da Figura 1), pois essa é geralmente difícil e onerosa, podendo atingir 80 a 90% do custo total do processo.

Quando o produto atinge um grau suficiente de pureza, pode ser embalado e comercializado (etapa 17 da Figura 1). No caso de novos produtos farmacêuticos, testes clínicos são necessários. Depois de comprovada eficiência, ocorre a liberação para o comércio. Uma representação das etapas mencionadas pelas quais passam os processos biotecnológicos é esquematizada na Figura 1.

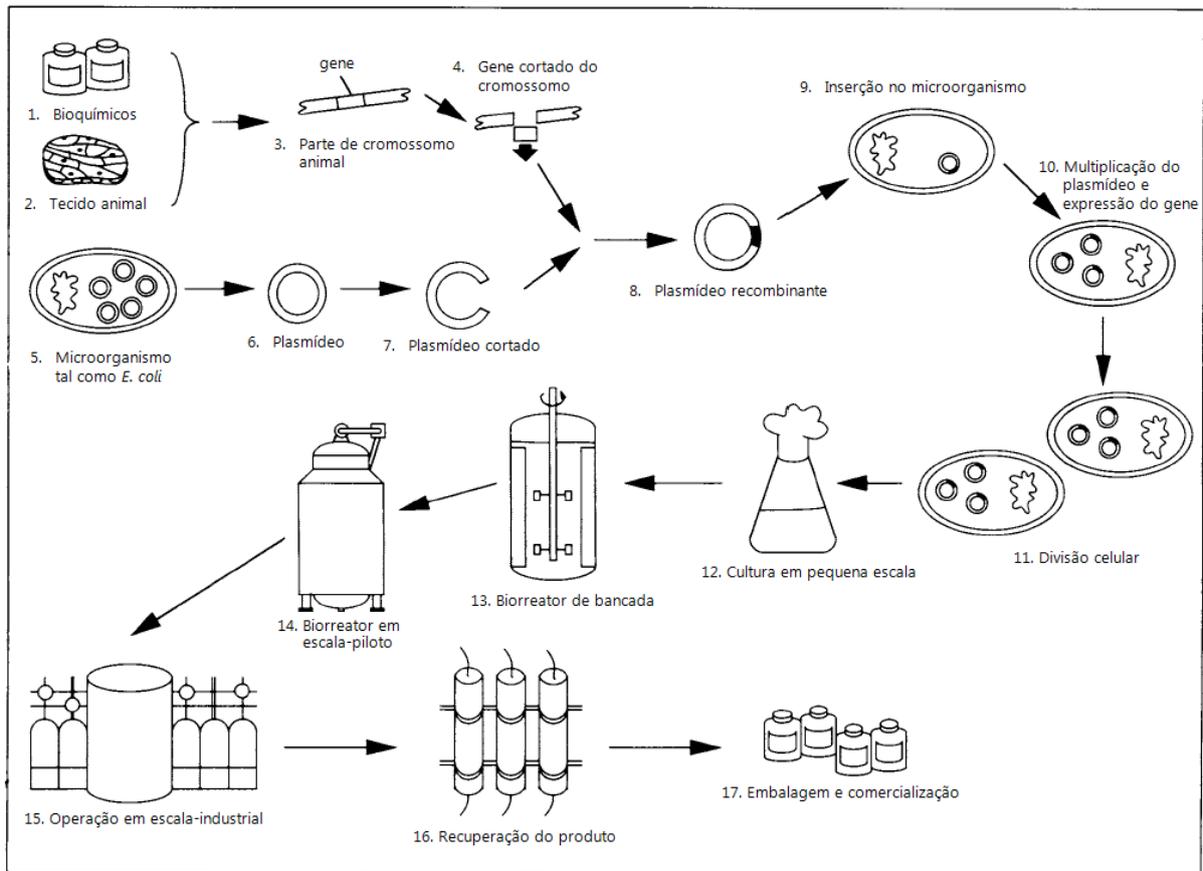


Figura 1 - Etapas do Processo de Elaboração de Produtos Derivados de DNA Recombinante  
 Fonte: Modificado de Doran (1995, p. 6).

## 2.2 Cultivos Celulares de Alta Densidade Utilizando *Escherichia coli*

Os cultivos em biorreator são importantes como estudos preliminares do comportamento da bactéria em condições mais controladas. Com eles, podem-se obter novas informações sobre a expressão da proteína bem como a curva de crescimento nas condições de biorreator. Segundo Lee (1996), *Escherichia coli* é o hospedeiro mais utilizado para produção de proteínas, principalmente porque é um sistema bastante estudado e muito bem caracterizado.

Como a maior parte das proteínas é acumulada na porção intracelular da *E. coli* recombinante, a produtividade é proporcional à densidade final de célula (BABAEIPOUR et al., 2007). Técnicas para cultivo de *E. coli* a altas densidades celulares têm sido desenvolvidas para aumentar a produtividade. Para tal, os processos são conduzidos frequentemente em batelada-alimentada. Concentrações celulares superiores a 50 gramas de célula seca por litro (g/L) podem ser obtidas rotineiramente em cultivos em batelada-alimentada, tanto para *E. coli* não-recombinante quanto para recombinante. Essa técnica, entretanto, apresenta algumas

limitações. O crescimento da *E. coli* pode ser inibido quando alguns nutrientes estão presentes no meio de cultivo acima de determinadas concentrações: glicose (50 g/L), amônia (3 g/L), ferro (1,15 g/L), magnésio (8,7 g/L), fósforo (10 g/L) e zinco (0,038 g/L) (LEE, 1996).

O maior problema dos cultivos celulares de altas densidades é a formação de acetato. O acetato é produzido sob condições anaeróbias ou de oxigênio limitante, entretanto cultivos de *E. coli* conduzidos com excesso de glicose também podem levar à formação de acetato, mesmo em condições aeróbias. O acetato é produzido quando o fluxo de carbono para a rota metabólica central excede a demanda de biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula. Concentrações de acetato superiores a 5 g/L em pH 7 inibem o crescimento de *E. coli* (KWEON et al., 2001; LEE, 1996). Para contornar esse problema, diversas estratégias de alimentação têm sido desenvolvidas a fim de controlar a velocidade específica de crescimento, limitando os nutrientes essenciais como fonte de carbono e nitrogênio. As metodologias de alimentação utilizadas nos cultivos celulares de altas densidades podem ser sem controle *feedback* ou com controle *feedback*, indireto ou direto (LEE, 1996).

As metodologias utilizadas sem controle *feedback* determinam a vazão de alimentação independente do andamento do cultivo. Quando se utiliza vazão constante, devido ao aumento da concentração celular no biorreator, a velocidade específica de crescimento reduz continuamente e o aumento da concentração celular decai ao longo do tempo. A elevação gradual (linear ou em degraus) da vazão de alimentação acompanha o crescimento celular, mas apenas no caso de a vazão estar bem ajustada às condições do cultivo. Para permitir que as células cresçam com uma velocidade específica de crescimento constante, foi desenvolvido o método de alimentação exponencial. Dessa forma, a produção de acetato pode ser minimizada pelo controle da taxa específica abaixo da taxa crítica para formação do mesmo (geralmente é mantida entre 0,1 e 0,3 h<sup>-1</sup>). A alimentação exponencial é uma metodologia simples de ser aplicada, mas eficiente, tanto que Korz e colaboradores (1995) conseguiram atingir concentrações celulares de 128 g/L e 148 g/L, utilizando como fonte de carbono glicose e glicerol, respectivamente.

As alimentações com controle *feedback* são mais sofisticadas. O controle indireto se baseia em medidas de parâmetros físicos do cultivo, como oxigênio dissolvido (OD), pH e velocidade de formação de CO<sub>2</sub> para alterar a vazão de alimentação. O método OD-stat é baseado no fato de que o oxigênio dissolvido no meio rapidamente aumenta quando há escassez de substrato. A alimentação é adicionada quando o oxigênio dissolvido ultrapassa um valor pré-determinado. Já o método pH-stat se baseia na observação de que o pH se eleva quando acaba a fonte de carbono. Quando a fonte de carbono é escassa, o pH se eleva

principalmente como resultado do aumento da concentração de íons amônio excretados pela célula. O sistema adiciona alimentação quando o pH passa de um determinado valor. A elevação de pH no meio é mais sutil do que a variação do oxigênio dissolvido. O sucesso dessas metodologias de alimentação está bastante atrelado à capacidade de controle do equipamento. Um controlador desajustado, nessas metodologias, pode alimentar em excesso no início do cultivo provocando inibição do crescimento por excesso de glicose, por exemplo, ou pode alimentar em escassez e, dessa forma, limitar o cultivo. Durante o crescimento celular, CO<sub>2</sub> é produzido proporcionalmente ao consumo da fonte de carbono. Monitorando a saída de gases do equipamento com o auxílio de um espectrômetro de massas, é possível, então, controlar a alimentação. A alimentação necessária também pode ser determinada através da medida da concentração de células presente no cultivo através de um turbidímetro a laser.

Controle em *feedback* direto também pode ser utilizado. Utilizando analisador de glicose *online*, é possível saber o quanto de glicose está presente no meio de cultivo em um determinado instante. Selecionando o intervalo em que se deseja trabalhar, o equipamento é capaz de controlar o quanto de glicose será adicionado ao cultivo.

O uso combinado de mais de uma técnica também é possível. Esse é o caso de Kim e colaboradores (2004), que utilizaram alimentação exponencial combinada com pH-stat para controlar a velocidade de crescimento a 0,1 h<sup>-1</sup>. Utilizando essa estratégia, obtiveram 101 g/L de *Escherichia coli*. Um resumo das metodologias de alimentação comentadas é apresentado no Quadro 1.

<b>Metodologias de Alimentação nos Cultivos em Batelada-Alimentada</b>	
Sem controle feedback	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vazão constante</li> <li>• Vazão elevada continuamente</li> <li>• Alimentação exponencial</li> </ul>
Com controle feedback	
Indireto	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• OD-stat</li> <li>• pH-stat</li> <li>• Medida de CO<sub>2</sub></li> <li>• Concentração celular</li> </ul>
Direto	
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Controle da concentração de substrato</li> </ul>

Quadro 1 - Metodologias de Alimentação nos Cultivos em Batelada-Alimentada  
 Fonte: Modificado de Lee (1996).

### 2.3 Nutrição dos Micro-Organismos, Fontes de Minerais e Uso de Sulfato de Magnésio

As necessidades nutricionais dos micro-organismos são diversas, uma vez que eles apresentam diferenças inerentes na sua capacidade de sintetizar os constituintes celulares a partir de nutrientes simples. A demanda por água, fontes de energia, carbono, nitrogênio e elementos minerais, assim como o acesso e a utilização de oxigênio, entretanto, é comum a todos os micro-organismos (PEREIRA JR., 2008).

Os micro-organismos necessitam, para suas funções estruturais e fisiológicas, de hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro e, em alguns casos, cloro. Em adição, requerem elementos-traços, os quais desempenham importante papel como constituintes de enzimas e coenzimas. Esses últimos incluem manganês, cobre, zinco, molibdênio, cromo, níquel, cobalto e boro e são, em geral, necessários em quantidades relativamente baixas (RHODES; FLETCHER, 1963; MADIGAN et al., 2000). Por sua vez, a água é essencial para a ação enzimática, dissolução de materiais orgânicos e inorgânicos e como reagente em muitos processos metabólicos. Seu teor nas células situa-se na faixa de 70 a 90 %. Os nutrientes inorgânicos podem agir de quatro formas no interior da célula: entrar no metabolismo levando à síntese de compostos necessários ao funcionamento da célula, estimular o metabolismo como cofator para reações enzimáticas, inibir o metabolismo e, finalmente, contribuir para as propriedades osmóticas (JENNINGS, 1988).

O uso de sulfato de magnésio na composição do meio de cultivo desempenha papel importante no metabolismo celular. O sulfato de magnésio é incorporado como uma fonte de íon magnésio que é necessário em uma variedade de reações enzimáticas, incluindo replicação de DNA (BIOSYSTEMS, 2009). Adicionar o íon magnésio ao meio de cultivo aumenta a densidade celular com uma aeração elevada (EXPRESSION TECHNOLOGIES INC., 2003).

## 2.4 Cinética de Processos Fermentativos

Segundo Hogg (2005), os organismos unicelulares se dividem de forma binária, ou seja, cada célula cresce até o seu tamanho final, replica o seu material genético e então se divide em duas células-filhas idênticas. Portanto, o crescimento é exponencial, mas alguns fatores colaboram para que ele não seja infinito, dentre eles a escassez dos nutrientes e o acúmulo de substâncias tóxicas.

### 2.4.1 Curva de Crescimento Microbiano

Após a inoculação de um meio de cultura, favorável ao desenvolvimento do micro-organismo em estudo, sob temperatura controlada e agitação adequada, observa-se o comportamento nos valores da concentração celular em função do tempo. Conforme Hiss (2001), as seguintes fases no crescimento são observadas:

Fase 1 - Conhecida como fase “lag” ou de latência, que se segue imediatamente após a inoculação do meio com o micro-organismo em questão. Trata-se de um período de adaptação durante o qual a célula sintetiza as enzimas necessárias ao metabolismo dos componentes presentes no meio. Durante essa primeira fase, não há reprodução celular e, assim,  $X = X_0$  = constante, sendo X a concentração celular em gramas de célula por litro, por exemplo.

Fase 2 - Essa é a fase de transição em que se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Há um aumento gradual, tanto da velocidade de reprodução (variação de concentração celular por variação de tempo) como da velocidade específica de crescimento (variação de concentração celular por variação de tempo e concentração celular), em que nem todos os micro-organismos completam a fase anterior simultaneamente. No fim dessa fase, a população inteira começa a se dividir em um intervalo regular médio de tempo.

Fase 3 - É denominada fase logarítmica ou exponencial, em que a velocidade específica de crescimento ( $\mu_x = \mu_m$ ) é constante e máxima. Nessas circunstâncias, a Equação (1) permite concluir que a velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração X, isto é:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \cdot X \quad (1)$$

Fase 4 - Conhecida como fase linear de crescimento, por apresentar a velocidade de reprodução constante. Contrariamente à fase exponencial antes comentada, a velocidade específica de crescimento não é constante na fase linear, decrescendo com o aumento da concentração celular e, portanto, com o tempo t de cultivo.

Fase 5 - Desaceleração. Devido ao esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura, necessários ao crescimento e, também, devido ao acúmulo de metabólitos inibidores, ambas as velocidades (de crescimento e específica) diminuem até se anularem no tempo  $t_f$ . Durante essa fase, o tempo de geração aumenta no decurso do cultivo, pois nem todos os micro-organismos se reproduzem em intervalos regulares de tempo.

Fase 6 - Estacionária. Nessa fase, X atinge o valor máximo e constante  $X_m$ , quando há um balanço entre a velocidade de crescimento e a velocidade de morte do micro-organismo.

Fase 7 - Declínio ou lise. O valor da concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas.

Uma representação da curva de crescimento do micro-organismo em cultivo descontínuo é apresentada na Figura 2, sendo a curva A em ordenadas lineares e a curva B em ordenadas logarítmicas. O objetivo do cultivo em batelada-alimentada é prolongar o crescimento celular, ou seja, eliminar a desaceleração do crescimento pela continuidade da fase 3.

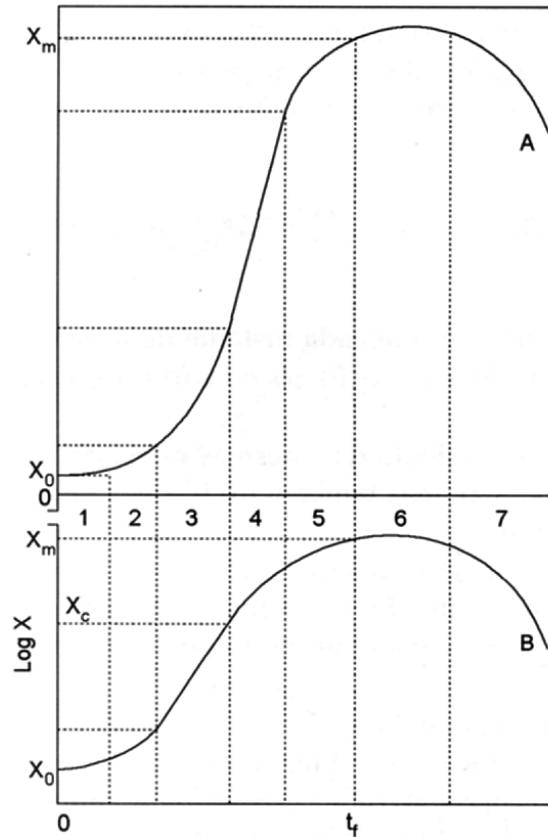


Figura 2 - Curva de Crescimento do Micro-organismo em Cultivo Descontínuo  
 Fonte: Modificado de HISS (2001, p. 104).

#### 2.4.2 Produtividade de Biomassa e de Produto

Uma definição especial de velocidade, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um processo fermentativo, é a produtividade em biomassa, definida pela Equação (2):

$$P_x = \frac{X_m - X_o}{t_f} \quad (2)$$

Os termos dessa equação, definidos na Figura 2, mostram que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo total ou final de fermentação,  $t_f$ .

A mesma definição pode ser aplicada à concentração do produto, denominada produtividade do produto (Equação (3)):

$$P_p = \frac{P_m - P_o}{t_{fp}} \quad (3)$$

onde  $t_{FP}$  não é necessariamente igual a  $t_f$ . A concentração inicial do produto é geralmente desprezível frente ao valor final ou máximo,  $P_m$ .

### 3. Metodologia

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos na empresa Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda. (4G) em parceria com o Centro de Pesquisa em Biologia Molecular e Funcional (CPBMF). Dando sequência ao projeto de pesquisa, realizaram-se sete novas fermentações com vistas à otimização do processo e na busca de relações entre produtividade de biomassa e produtividade de proteína recombinante em dois momentos do cultivo: a 30 horas e à produtividade máxima de biomassa. Para tanto, testes de expressão do hormônio de crescimento em géis de poli-acrilamida 12 % foram necessários, assim como quantificação de proteínas totais por Bradford e posterior quantificação do hormônio de crescimento por análise densitométrica.

Considerando que este processo sofre efeito de inúmeras variáveis (tais como a composição do meio, a composição da alimentação, a estratégia de alimentação, a agitação e a estratégia de indução química), o presente trabalho tem como foco exclusivo a otimização da produção de hormônio de crescimento recombinante em sua fração solúvel, relacionando em cada cultivo a produtividade de biomassa com a produtividade de proteína recombinante. Não são descritas em maiores detalhes as 27 fermentações já realizadas, mas somente aquelas decorrentes dos resultados aqui apresentados.

#### 3.1 Micro-organismo, Plasmídeo e Preparação do Inóculo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Escherichia coli* C43(DE3) e o plasmídeo pET30a(+) foi utilizado como vetor de expressão, ambos fornecidos pela Novagen (EUA).

Depois de construído o plasmídeo contendo o gene que codifica o hormônio de crescimento, a bactéria foi transformada por eletroporação. O plasmídeo pET30a(+) confere à bactéria resistência ao antibiótico canamicina, de modo que as bactérias contendo o plasmídeo podem ser facilmente selecionadas em placas com meio contendo esse antibiótico. Após a seleção, a bactéria foi cultivada em meio líquido, e um estoque foi feito em glicerol 30 % e mantido a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esse estoque foi identificado como *Master Cell Bank* (MCB) e utilizado como inóculo de todos os cultivos.

O pré-inóculo era realizado adicionando-se 100 µL do estoque em glicerol a 250 mL de Luria-Bertani (LB) e incubado por aproximadamente 10 h a 37 °C em incubadora com agitação orbital. No momento do inóculo, a Densidade Óptica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) do pré-inóculo era medida e calculava-se o volume necessário para uma  $DO_{600nm}$  inicial no biorreator de 0,1. O volume calculado era medido aproximadamente em uma garrafa e completado para 100 mL com meio de cultivo fresco igual ao do biorreator, completando um volume final no biorreator de 1 L. Finalmente, o inóculo era realizado com o auxílio de uma seringa. Assim que os 100 mL eram adicionados, a  $DO_{600nm}$  do biorreator era medida e esse tempo era considerado o tempo de início do crescimento.

### 3.2 Condições e Controle do Cultivo em Biorreator

Todos os cultivos foram desenvolvidos em biorreator de bancada com duas dornas de 2 L cada (BIOSTAT<sup>®</sup> B plus, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). O biorreator tem controle automático de temperatura, agitação, aeração e pH e mede diretamente oxigênio dissolvido com o auxílio de um eletrodo polarográfico. Além disso, o biorreator é equipado com três bombas peristálticas acopladas à unidade de controle para adição de ácido e álcali, sendo que o uso da outra bomba fica a critério do operador. Os eletrodos de pH e OD necessitam calibração antes de cada fermentação. O eletrodo de pH foi sempre calibrado antes da esterilização, utilizando-se padrões de pH 4,0 e 9,0. A sonda de OD era calibrada após a esterilização, borbulhando-se nitrogênio gasoso no meio de cultivo para expulsar todo o oxigênio, sendo que o valor em que a sonda estabilizava era considerado como 0 %. Em seguida, ar comprimido era borbulhado em condições semelhantes às do cultivo até estabilizar a leitura, momento em que se considerava 100 % da saturação.

A aeração inicial em todos os cultivos foi de 1 vvm, e ar atmosférico foi alimentado proveniente de um compressor. O OD foi mantido em 30 % da saturação através de agitação em cascata, ajustada para mínimo de 400 rpm e máximo de 1000 rpm. O pH foi mantido em 7,0 pela adição de ácido fosfórico 10% ou hidróxido de amônio 12,5 %. A temperatura foi mantida em 30 °C através de uma camisa de resfriamento. Uma representação dos biorreatores utilizados neste trabalho pode ser vista na Figura 3.



Figura 3 - Biorreator de Bancada BIostat® B Plus  
Fonte: <<http://www.labotec.co.za/news.asp?id=218>>, acesso em 12 de setembro de 2011.

O acompanhamento do cultivo foi realizado monitorando-se uma série de parâmetros a cada duas horas. O valor da glicose foi obtido através do analisador bioquímico YSI 2700 Select. A  $DO_{600nm}$  era medida em duplicata em todos os tempos de coleta para acompanhamento do crescimento. Em todos os cultivos, amostras de 1 mL foram coletadas e centrifugadas a 13000 rpm por 3 min. Os centrifugados contendo as células foram congelados à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da expressão de proteína utilizando eletroforese em géis de poli-acrilamida 12 %. O oxigênio dissolvido e a agitação, por sua vez, foram obtidos *on-line* para que, posteriormente, gráficos pudessem ser construídos.

### 3.3 Conversão de $DO_{600nm}$ para Biomassa (X)

O crescimento celular foi monitorado por medida de densidade óptica do meio de cultivo a 600 nm com espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 pro e relacionada com biomassa por medida de peso-seco. Para medida de peso-seco, três alíquotas de 10 mL foram coletadas do biorreator em tubos tipo falcons de 15 mL previamente pesados em balança analítica e centrifugadas por 10 minutos em centrífuga de mesa Eppendorf modelo 5416 na velocidade de 6000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* formado foi lavado com 5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Novamente as

alíquotas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O *pellet* formado foi levado à estufa a 56 °C onde permaneceu até atingir um peso constante. Os tubos então foram novamente pesados. A diferença encontrada foi relacionada à medida de densidade óptica mediante uma reta de correlação (Equação (4)), em que y é a biomassa em gramas de célula por litro e x é a densidade óptica.

$$y = 0,3255 x \quad (4)$$

Essa relação foi utilizada para todos os resultados apresentados neste trabalho envolvendo medida de densidade celular.

### 3.4 Verificação da Expressão do Hormônio de Crescimento

A expressão do hormônio de crescimento foi verificada utilizando eletroforese em géis de poli-acrilamida 12 %. Para tal, os centrifugados das amostras nos cultivos em biorreator foram ressuspensos em 1000 µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As amostras foram então rompidas por ultrassom e centrifugadas por 30 min a 13000 rpm e 4 °C. As frações solúveis foram separadas e congeladas a -20 °C até o momento das análises. O padrão de peso molecular *Page Ruler* (Bio-Rad Laboratories, Inc., EUA) foi utilizado como marcador.

### 3.5 Quantificação de Proteínas Totais e Análise Densitométrica

Para a quantificação do total de proteína expressa pelo micro-organismo, empregou-se a técnica de Bradford utilizando-se o espectrofotômetro Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100. Para a discriminação quantitativa das proteínas expressas e a consequente quantificação do hormônio de crescimento, foi realizada análise fotodensitométrica utilizando o equipamento BIO-RAD Model GS-700 Imaging Densitometer.

## 4. Resultados e Discussões

Partindo-se da última fermentação até então realizada, foram propostas sete novas fermentações. Como característica comum a todas elas, podem-se citar a composição do meio de cultivo e a estratégia de indução química. O meio era composto por 1 L meio de cultura M9, 10 mL glicose 500 g/L, 1 mL MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1 M, 1 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1 M, 1 mL solução traço, 1 mL tiamina 1 mg/mL e 600 µL kanamicina. A indução química, por sua vez, ocorria quando a DO<sub>600nm</sub> do cultivo alcançava um valor entre 18 e 20 e se dava pela adição de isopropil-β-D-

tiogalactopiranosídeo (IPTG), deixando a concentração no biorreator em 0,5 mM. Para melhor visualização das diferenças entre as condições das oito fermentações mencionadas, é apresentado o Quadro 2. Para fins de apresentação, considerou-se a fermentação de número 27 como a de número 1.

<b>Fermentação</b>	<b>Alimentação</b>	<b>Estratégia de alimentação</b>	<b>Agitação</b>
1	- 1 L M9 300 g/L glicose - 1 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat - Início em 6 h	800 rpm
2	- 960 mL M9 300 g/L glicose - 40 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat - Início em 6 h	800 rpm
3	- 960 mL M9 300 g/L glicose - 40 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat até 16 h - Linear 3-8 % até 50 h - Início em 6 h	- 800 rpm (OD-stat) - Em cascata com o OD (linear)
4	A1: - 250 mL M9 300 g/L glicose - 250 µL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 250 µL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 250 µL solução traço - 250 µL tiamina 1 mg/mL - 150 µL canamicina A2: - 720 mL M9 300 g/L glicose - 30 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 750 µL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 750 µL solução traço - 750 µL tiamina 1 mg/mL - 450 µL canamicina	- OD-stat até 16 h - Linear 3-8 % até 50 h - A1 até terminar e então A2 - Início em 6 h	- 800 rpm (OD-stat) - Em cascata com o OD (linear)
5	A1: - 720 mL M9 300 g/L glicose - 30 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 750 µL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 750 µL solução traço - 750 µL tiamina 1 mg/mL - 450 µL canamicina A2: - 250 mL M9 300 g/L glicose - 250 µL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 250 µL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 250 µL solução traço - 250 µL tiamina 1 mg/mL - 150 µL canamicina	- OD-stat até 16 h - Linear 3-8 % até 50 h - A1 até terminar e então A2 - Início em 6 h	- 800 rpm (OD-stat) - Em cascata com o OD (linear)
6	- 960 mL M9 300 g/L glicose - 40 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat - Início em 6 h	- 800 rpm (6-18 h) - 1000 rpm (18-26 h) - 1200 rpm (26-30 h)
7	- 960 mL M9 300 g/L glicose - 40 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat - Início em 6 h	- 800 rpm (6-16 h) - 1000 rpm (16-26 h) - 1200 rpm (26-36 h)
8	- 960 mL M9 300 g/L glicose - 40 mL MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1 M - 1 mL CaCl <sub>2</sub> 0,1 M - 1 mL solução traço - 1 mL tiamina 1 mg/mL - 600 µL canamicina	- OD-stat - Início em 6 h	- 800 rpm (6-18 h) - 1000 rpm (18-30 h) - 1200 rpm (30-42 h)

Quadro 2 - Roteiros das Fermentações

A fermentação de número 2 reproduziu as mesmas condições da fermentação 1, excetuando a adição de maior quantidade de sulfato de magnésio na composição de alimentação como tentativa de promover maior crescimento celular. A partir da análise de gráficos obtidos de fermentações anteriores, constatou-se que a estratégia de alimentação OD-stat, a partir de determinado tempo de cultivo, mostrou-se insuficiente e incapaz de acompanhar o crescimento celular. Os níveis de oxigênio dissolvido no meio decresciam e começavam a oscilar mais frequentemente abaixo do patamar necessário para a liberação de mais alimentação para o biorreator. A Figura 4, referente à fermentação 2, ilustra essa situação, apresentando graficamente a agitação, a quantidade alimentada e o oxigênio dissolvido em função do tempo.

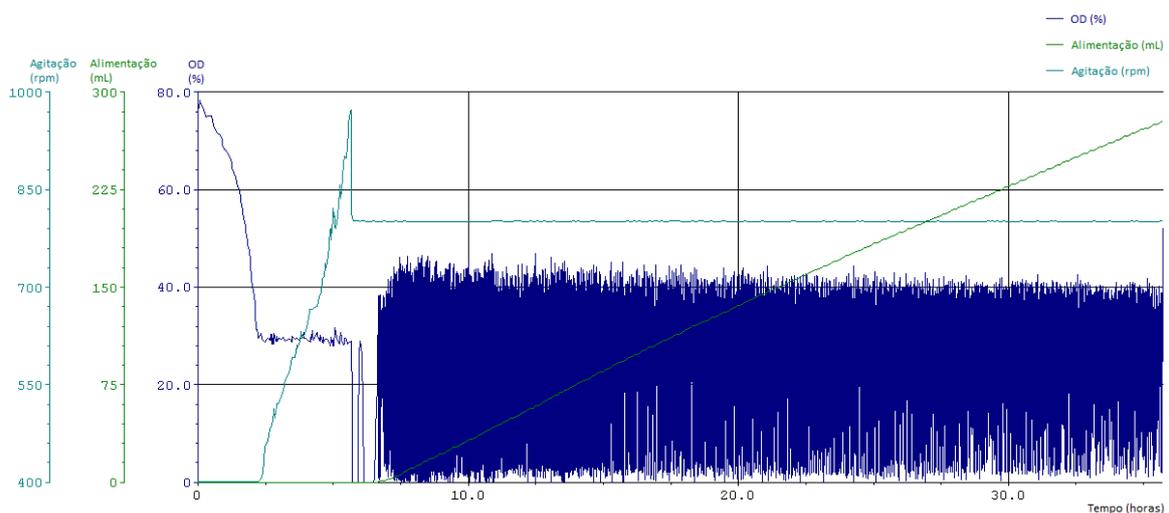


Figura 4 - Evolução de Parâmetros da Fermentação 2  
Fonte: Adaptado de Module Operator Service Program (2011).

Para solucionar esse problema, propôs-se a fermentação 3, que utilizou duas estratégias de alimentação distintas: a OD-stat e, posteriormente, a linear, variando de 3 a 8 % da capacidade da bomba de alimentação. As fermentações 4 e 5, por sua vez, testaram a influência da adição de sulfato de magnésio no fim e no início do cultivo, respectivamente. A partir do uso de duas alimentações com diferentes concentrações de sulfato de magnésio e usadas sucessivamente no mesmo cultivo, procuraram-se identificar variações no crescimento celular e na expressão da proteína recombinante. Como alternativa às variações propostas pela fermentação 3, realizaram-se as fermentações 6, 7 e 8, as quais apresentam condições idênticas às da fermentação 2, porém com incrementos de agitação a intervalos definidos. O objetivo da maior agitação foi proporcionar uma maior aeração do meio de cultivo, de tal forma a ultrapassar o patamar necessário para a liberação de mais alimentação e promover

maior crescimento celular. A Figura 5, referente à fermentação 6, ilustra essa situação, apresentando graficamente a agitação, a quantidade alimentada e o oxigênio dissolvido em função do tempo. É interessante observar que os aumentos de agitação estão associados a maiores inclinações na curva de quantidade alimentada em função do tempo e resultaram em uma maior quantidade alimentada.

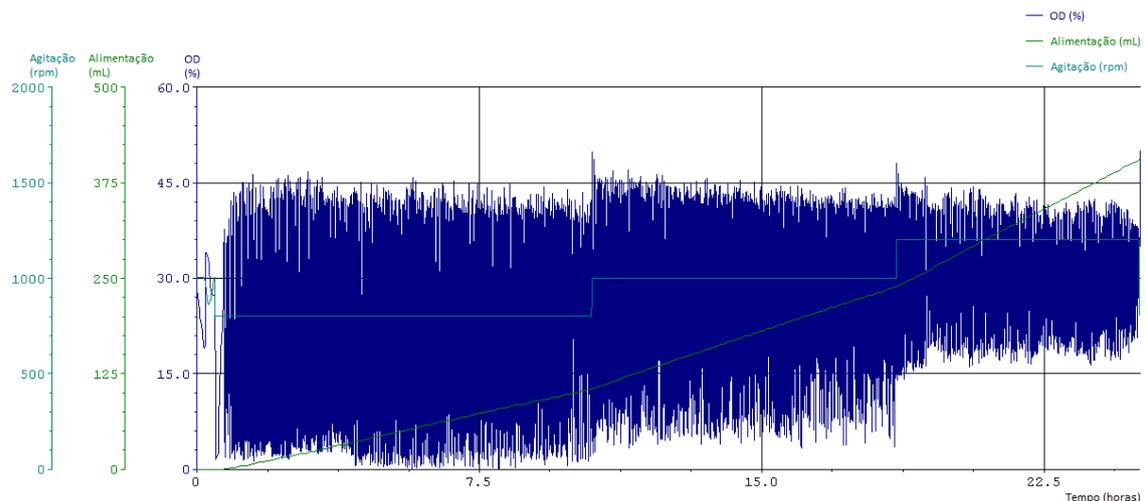


Figura 5 - Evolução de Parâmetros da Fermentação 6  
Fonte: Adaptado de Module Operator Service Program (2011).

Para os cálculos relacionados à produtividade de biomassa e de produto realizados neste trabalho, propôs-se uma modificação nas Equações (2) e (3). Considerou-se um “tempo morto” ( $t_m$ ) de 8 horas, equivalente ao período de lavagem, calibração, esterilização e montagem dos biorreatores e representado nas equações (5) e (6). O “tempo morto” foi utilizado como tentativa de englobar um processo fermentativo rotineiro no laboratório da empresa Quatro G.

$$P_x(t) = \frac{X(t)}{t + t_m} \quad (5)$$

$$P_p(t) = \frac{P(t)}{t + t_m} \quad (6)$$

Uma vez realizadas as fermentações, os testes de expressão de proteína em géis de poli-acrilamida e as quantificações de proteínas totais por Bradford e de hormônio de crescimento por densitometria, procederam-se às análises de produtividade de biomassa e de proteína. A análise a 30 horas de cultivo pode ser observada na Tabela 1. As colunas referentes aos valores de produtividade apresentam uma gradação de cor do vermelho ao verde, do menor para o maior valor, respectivamente.

Tabela 1 - Produtividade de Biomassa e de Proteína a 30 h

Fermentação	Biomassa (g <sub>biomassa</sub> /L)	Produtividade de biomassa (g <sub>biomassa</sub> /(L.h))	Proteína (g <sub>proteína</sub> /L)	Produtividade de proteína (g <sub>proteína</sub> /(L.h))	Produtividade específica de proteína (g <sub>proteína</sub> /(g <sub>biomassa</sub> .h))x1000
1	14,452	0,380	0,439	0,012	0,799
2	20,279	0,534	0,979	0,026	1,271
3	23,859	0,628	1,159	0,030	1,278
4	19,384	0,510	1,281	0,034	1,740
5	25,080	0,660	0,687	0,018	0,721
6	27,228	0,717	1,726	0,045	1,669
7	27,456	0,723	1,775	0,047	1,701
8	26,447	0,696	1,951	0,051	1,941

Embora a análise de produtividade a 30 horas seja insuficiente para descrever a evolução do processo fermentativo, escolheu-se tal horário por ele ser comum às fermentações realizadas e estar numa etapa relativamente avançada do cultivo. Comparando-se as fermentações 1 e 2, pode-se afirmar que a adição de sulfato de magnésio em maior concentração à alimentação foi favorável em termos de produtividade de biomassa e de proteína. A solução proposta pela fermentação 3 alcançou resultados positivos, ou seja, aumento das produtividades de biomassa e de proteína. Os resultados da fermentação 4, por sua vez, evidenciaram que a adição de sulfato de magnésio em maior concentração no fim da fermentação pode levar a menores produtividades de biomassa, mas a uma maior expressão proteica. A fermentação 5 mostrou o contrário: a adição de sulfato de magnésio em maior concentração no início da fermentação levou a maiores produtividades de biomassa, mas a uma menor expressão proteica. As fermentações de número 6, 7 e 8 alcançaram os melhores resultados em termos de produtividade de biomassa e de proteína, comprovando a eficiência dos incrementos de agitação realizados. É possível ainda observar no Quadro 3 as produtividades específicas de proteína (razão entre produtividade de proteína e concentração celular), evidenciando que a otimização obtida em produtividade de proteína não se deveu apenas a uma maior concentração de biomassa, mas também a uma maior produção de proteína recombinante por grama de célula.

A análise das produtividades de biomassa e de proteína à produtividade máxima de biomassa pode ser observada na Tabela 2. Novamente, as colunas referentes aos valores de produtividade apresentam uma gradação de cor do vermelho ao verde, do menor para o maior valor, respectivamente.

Tabela 2 - Produtividade de Biomassa e de Proteína à Produtividade Máxima de Biomassa

Fermentação	Tempo (h)	Biomassa (g <sub>biomassa</sub> /L)	Produtividade de biomassa (g <sub>biomassa</sub> /(L.h))	Proteína (g <sub>proteína</sub> /L)	Produtividade de proteína (g <sub>proteína</sub> /(L.h))
1	18	14,648	0,563	0,844	0,032
2	26	20,002	0,588	1,180	0,035
3	24	22,264	0,696	1,862	0,058
4	18	16,340	0,628	1,173	0,045
5	28	24,478	0,680	1,142	0,032
6	30	27,228	0,717	1,726	0,045
7	34	31,313	0,746	1,602	0,038
8	26	25,177	0,741	1,695	0,050

Fica difícil, em uma primeira análise, encontrar relações entre a produtividade máxima de biomassa e a produtividade de proteína associada, o que possivelmente se explica por envolver um comparativo entre tempos diferentes de fermentação. Não se pode dizer que as produtividades máximas de biomassa mais elevadas acompanharam as maiores produtividades de proteína. Como tendência geral, pode-se mencionar o fato de que os incrementos de agitação propostos nas fermentações 6, 7 e 8 implicaram um aumento de produtividade máxima de biomassa, assim como a conduziram a um horário mais avançado da fermentação (30, 34 e 26 horas, respectivamente).

A quantificação de proteínas totais por Bradford e a posterior quantificação de hormônio de crescimento por densitometria são métodos analíticos que trazem consigo uma margem de erro considerável, dificultando a exposição de relações mais específicas entre as fermentações realizadas. Pode-se, no entanto, comparar os valores de produtividade de proteína das duas análises apresentadas. De maneira geral, considerando-se mesmas fermentações, a produtividade de proteína assume valores maiores no horário de menor duração (a fermentação 4 apresenta 0,034 g<sub>proteína</sub>/(L.h) a 30 h e 0,045 g<sub>proteína</sub>/(L.h) a 18 h, por exemplo), o que leva a crer que existe uma duração ótima de fermentação na qual a produtividade de proteína seja máxima. Isso se torna importante do ponto de vista industrial, na medida em que prolongar as fermentações além desse ponto pode ocasionar maiores rendimentos volumétricos de proteína à custa de menor produtividade da mesma, onerando o processo fermentativo.

## 5. Considerações Finais

A partir da realização deste trabalho, algumas considerações referentes à produção de hormônio de crescimento recombinante utilizando *Escherichia coli* em biorreatores de dois litros de capacidade podem ser feitas, tais como:

- a) A adição de sulfato de magnésio em maior concentração à alimentação na fermentação 2 propiciou maiores produtividades de biomassa e de proteína em relação à fermentação 1. Comparando-se os resultados das fermentações 4 e 5 a 30 horas de cultivo, o sulfato de magnésio adicionado em maiores concentrações no início da fermentação implicou maiores produtividades de biomassa e menores produtividades de proteína. No fim da fermentação, menores produtividades de biomassa e maiores produtividades de proteína.
- b) A estratégia de alimentação OD-stat, a partir de determinado tempo de cultivo, mostrou-se insuficiente e incapaz de acompanhar o crescimento celular. O uso de duas estratégias de alimentação (OD-stat e, posteriormente, linear (fermentação 3)) e a associação da estratégia de alimentação OD-stat a incrementos de agitação (fermentações 6, 7 e 8) resultaram numa maior quantidade alimentada, propiciando maiores produtividades de biomassa e de proteína. Os incrementos de agitação, por sua vez, também conduziram a máxima produtividade de biomassa a um horário mais avançado da fermentação.
- c) A máxima produtividade de biomassa não acompanhou, necessariamente, a máxima produtividade de proteína. Constatou-se, comparando-se iguais fermentações entre as duas análises realizadas (a de 30 horas e a de máxima produtividade de biomassa), que a maior produtividade de proteína acontecia no horário de menor duração, o que levou a crer que existe uma duração ótima de fermentação na qual a produtividade de proteína seja máxima.
- d) Os melhores resultados, em termos de produtividade de biomassa e de proteína, foram obtidos com as fermentações 6, 7 e 8 e ocasionados pela adição de sulfato de magnésio à alimentação e pelos incrementos de agitação associados à estratégia de alimentação OD-stat. Comparando-se a fermentação 8 com a 1, observa-se um aumento de aproximadamente 325 % na produtividade de proteína a 30 horas de cultivo.

Como perspectivas para este trabalho, permanece a busca da otimização da produção de hormônio de crescimento recombinante. Sugerem-se fixar os parâmetros que resultaram

em maiores produtividades de biomassa e de proteína (maiores concentrações de sulfato de magnésio na alimentação e incrementos de agitação associados à estratégia de alimentação OD-stat) e variar outros não analisados neste trabalho, a exemplo do horário de indução química. Do ponto de vista industrial, deve-se atentar à duração ótima de fermentação na qual a produtividade de proteína seja máxima, na medida em que prolongar as fermentações além desse ponto pode ocasionar maiores rendimentos volumétricos de proteína à custa de menor produtividade da mesma, onerando o processo fermentativo.

## 6. Agradecimentos

Agradecimentos à CAPES, pelo financiamento do projeto; à Quatro G, pela bolsa de pesquisa; à Quatro G e ao CPBMF, pelo fornecimento do suporte técnico e equipamentos necessários para a realização da pesquisa; e à equipe da Quatro G, em especial a José Eduardo Nunes e a Rafael Munareto, pelos auxílios prestados durante a execução dos experimentos.

## 7. Referências

B. BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL. **Module Operator Service Program**. Goettingen, 2002, CD-ROM.

BABEIPOUR, V., SHOJAOSADATI, S.A., ROBATJAZI, S.M., KHALIZADEH, R., MAGHSOUDI, N. Over-production of human interferon- $\gamma$  by HCDC of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 112-117, 2007.

BIOSYSTEMS. **Instruções de uso - Caldo magnésio levedura caseína**. São José dos Pinhais: Biosystems, 2009.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, Willibaldo et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP: Edgar Blücher; 2001. p. 193-204.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 1ª ed. Holanda, Academic Press, 1995. 439 p.

EL-DORRY, Hamza. **Hormônio de crescimento**. São Paulo: USP, 2001. Disponível em <<http://www.redetec.org.br/inventabrasil/crescer.htm>>. Acesso em 12 de agosto de 2011.

EXPRESSION TECHNOLOGIES INC. **Bacterial *E. coli* Growth Media**. San Diego: Expression Technologies Inc., 2003.

HISS, Haraldo. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, Willibaldo et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP: Edgar Blücher; 2001. p. 93-122.

HOGG, S. **Essential Microbiology**. 1 ed. The University of Glamorgan, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2005. 468 p.

JENNINGS, D. H. Inorganic Nutrition. In: **Physiology of Industrial Fungi**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1988.

jj4bplus.jpg. Altura: 1063 pixels. Largura: 1181 pixels. 332,19 kb. Formato JPEG. Disponível em <<http://www.labotec.co.za/images/news/jj4bplus.jpg>> 2006. Acesso em 12 de setembro de 2011.

KIM, B.S., LEE, S.C., LEE, S.Y., CHANG, Y.K., CHANG, H.N. High cell density fed-batch cultivation of *Escherichia coli* using exponential feeding combined with pH-stat. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 26, p. 147-150, 2004.

KORZ, D.J., RINAS, U., HELLMUTH, K., SANDERS, E.A., DECKWER, W.D. Simple fed-batch techniques for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 39, p. 59-65, 1995.

KWEON, D.H., HAN, N.S., PARK, K.M., SEO, J.H. Over production of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 537-542, 2001.

LEE, S.Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Tib. Technology**, v. 14, p. 98-104, 1996.

LIMA, W. J. N. **Produção de Proteínas Recombinantes Utilizando *Escherichia coli* em Cultivos em Alta Densidade**. 2004. 181 f. Tese de Doutorado, Unicamp, Campinas, 2004.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. Brock **Biology of Microorganisms**. 9. ed. New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 2000.

PANDA, Amulya. K.; KHAN, R. H.; APPA RAO, K. B. C.; TOTTEY, S. M. Kinetics of inclusion body production in batch and high cell density fed-batch culture of *Escherichia coli* expressing ovine growth hormone. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 161-172, 1999.

PEREIRA JR., Nei. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p.

RHODES, A., FLETCHER, D. L. **Principles of Industrial Microbiology**. Oxford: Pergamon Press, 1963.

WANNMACHER, Lenita. **Hormônio de crescimento: uma panacéia?** Brasília: Uso racional de medicamentos: temas selecionados, 2006. Disponível em <[http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE\\_URM\\_HOC\\_0308.pdf](http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/HSE_URM_HOC_0308.pdf)>. Acesso em: 12 de agosto de 2011.